



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Medicine and Health

Relevanz des MEK/ERK-Signalweges in der hepatischen
Karzinogenese

Carina Friederike Rupp

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health
der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der
Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Kathrin Schumann, Ph.D.

Prüfende der Dissertation:

1. Priv. – Doz. Dr. Ursula Ehmer
2. Priv. – Doz. Dr. Jennifer Altomonte

Die Dissertation wurde am 08.01.2024 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die School of Medicine and Health am
08.05.2024 angenommen.

Zusammenfassung

Leberkarzinome gehören zu den häufigsten malignen Tumoren weltweit und, unter anderem aufgrund geringer Therapieoptionen, zu den häufigsten krebsbedingten Todesursachen. Für die Entwicklung neuer und gezielter Therapien ist daher die Vertiefung des Verständnisses der hepatischen Karzinogenese notwendig. Um die hepatische Karzinogenese *in vivo* zu untersuchen, wurde ein bereits zuvor etabliertes Mausmodell für das Cholangiozelluläre Karzinom (CCC) verwendet. CCCs sind nach Hepatozellulären Karzinomen (HCC) die zweithäufigsten primären Lebermalignome. Das verwendete CCC-Mausmodell ($Rb^{lox/lox};p53^{lox/lox};Kras^{LSL-G12D/+}$ oder RPK) weist Mutationen in Signalwegen auf, die auch im humanen CCC alteriert sind. Insbesondere *KRAS*-Mutationen konnten zuvor häufig in humanen cholangiozellulären Karzinomen nachgewiesen werden. Das Augenmerk dieser Arbeit lag auf der Analyse eines wichtigen RAS-abhängigen Signalweges, dem MEK/ERK-Signalweg. Die Untersuchung dieses RAS-abhängigem Signalweges wurde anhand eines compound Knock-out Mausmodelles ($Rb^{lox/lox};p53^{lox/lox};Kras^{LSL-G12D/+};Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-};Rosa26^{LSL-YFP}$) durchgeführt. Analysen ergaben, dass eine *Mek1/2*-Defizienz in der Leber zu einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben nach Tumorentstehung führt. Des Weiteren konnten bei Tieren mit *Mek1/2*-Defizienz eine verringerte Prävalenz und Größe von Lungenmetastasen beobachtet werden. Bei der histologischen Analyse der Tumore zeigte sich interessanterweise eine Änderung der Differenzierung. *Mek1/2*-defiziente Tumore wiesen im Gegensatz zu RPK-Kontrolltieren seltener eine cholangiozelluläre Differenzierung auf. Es wurden hepatozelluläre Karzinome und Mischtumore detektiert. Außerdem zeigten sich innerhalb der *Mek1/2*-defizienten Tumore ausschließlich schlecht differenzierte und undifferenzierte Tumore. Somit konnte für den MEK/ERK-Signalweg eine Relevanz bezüglich der Tumordifferenzierung nachgewiesen werden. Zur weiteren Einordnung der Ergebnisse erfolgte die Durchführung von *in vitro* Zellkulturversuchen mit dem MEK1/2-Inhibitor PD0325901. Neben einer Änderung des morphologischen Zellphänotyps zeigte sich nach MEK1/2-Inhibition eine vermehrte mRNA-Expression HCC-spezifischer Differenzierungsmarker. In der RNA-Sequenzierung von Tumorgewebe zeigte sich in der Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) eine Anreicherung eines *CTNNB1*-Gensets in MEK1/2-defizienten Tumoren als Hinweis für eine erhöhte Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Mit der darauffolgenden Analyse der Protein- und relativen mRNA-Expression von Zielproteinen und -genen konnte durch die erhöhte relative mRNA-Expression des Zielgens *Axin2* sowohl in den *in vivo*- als auch den *in vitro*- Versuchsdaten ein weiterer Hinweis auf eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges gefunden werden. Diese gesteigerte Aktivität des Wnt/ β -Catenin Signalweges kann als möglicher zugrundeliegender Pathomechanismus für die beobachtete Differenzierungsänderung angesehen werden, da dieser Signalweg häufig im HCC, aber nicht im CCC aktiviert ist.

Abstract

Hepatic carcinomas are among the most common malignant tumors worldwide and one of the leading causes of cancer-related deaths, mostly due to limited therapeutic options. Therefore, deepening our understanding of hepatic carcinogenesis is necessary for the development of new and targeted therapies. To study hepatic carcinogenesis *in vivo*, a previously established mouse model for cholangiocarcinoma (CCA) was used. CCA are the second most common primary liver malignancy after hepatocellular carcinoma (HCC). The CCA mouse model used for this analysis ($Rb^{lox/lox};p53^{lox/lox};Kras^{LSL-G12D/+}$ or RPK) comprises mutations in signaling pathways that are also altered in human CCA. In particular, *KRAS* mutations are frequently detected in human cholangiocarcinoma. The focus in this work was on the analysis of an important RAS-dependent signaling pathway, the MEK/ERK pathway. The study of this RAS-dependent pathway was performed using a compound knock-out mouse model ($Rb^{lox/lox};p53^{lox/lox};Kras^{LSL-G12D/+};Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Rosa26^{LSL-YFP}$). Our analysis revealed that *Mek1/2* deficiency resulted in a significantly prolonged overall survival after tumor initiation. Furthermore, a reduced prevalence and size of lung metastases were observed in animals with *Mek1/2* deficiency. Strikingly, histological analysis of the tumors revealed a change in tumor differentiation. *Mek1/2*-deficient tumors were less likely to show cholangiocellular differentiation in contrast to those of RPK control animals. Instead, hepatocellular carcinomas and mixed tumors were detected in the majority of animals. Moreover, in *Mek1/2*-deficient tumors, only poorly differentiated and undifferentiated tumors were observed. Thus, a relevance for MEK/ERK signaling for tumor differentiation could be demonstrated. To further classify the results, *in vitro* cell culture experiments were performed using the MEK1/2 inhibitor PD0325901. In addition to a change in morphological cell phenotype, increased mRNA expression of HCC-specific differentiation markers was evident after MEK1/2 inhibition. In RNA sequencing of tumor tissue, gene set enrichment analysis (GSEA) revealed enrichment of a *CTNNB1* gene set in *MEK1/2*-deficient tumors as evidence for increased activity of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Subsequent analysis of mRNA expression levels of target genes revealed increased expression of the Wnt/ β -catenin target gene *Axin2* in both *in vivo* and *in vitro* experimental data. This increased activity of Wnt/ β -catenin signaling could present an underlying pathomechanism for the observed differentiation change, as this pathway is frequently activated in HCC but not in CCA.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II
Abstract.....	III
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie und Ätiologie von primären Leberkarzinomen.....	1
1.2 Hepatokarzinogenese.....	4
1.2.1 <i>Cell of origin</i> (COO).....	5
1.2.2 Mutationen in der Hepatokarzinogenese.....	6
1.3 Der RAS-Signalweg im CCC.....	9
1.4 Mausmodelle.....	13
1.4.1 Tierversuche.....	13
1.4.2 Genetisch modifizierte Tiermodelle.....	13
1.4.3 Cre/loxP-System als Beispiel für Rekombinationssysteme.....	14
1.4.4 CCC- und HCC-Mausmodelle.....	16
1.4.5 <i>Rb^{lox/lox};p53^{lox/lox};Kras^{LSL-G12D/+}</i> (RPK)-Mausmodell.....	18
1.4.6 <i>RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Rosa26^{LSL-YFP}</i> - Mausmodell.....	19
1.5 Versuchsaufbau <i>in vivo</i>	21
1.5.1 Induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Albumin-Promotors (<i>Alb^{CreER}</i>).....	21
1.5.2 Hepatische Expression einer induzierbaren Cre-Rekombinase durch Hepatozyten-Transfektion mittels hydrodynamischer Schwanzveneninjektion.....	22
1.6 Versuchsaufbau <i>in vitro</i>	22
1.6.1 Behandlung von RPK-Tumorzelllinien mit dem MEK1/2-Inhibitor PD0325901.....	22
1.7 Problemstellung.....	22
2 Material.....	24
2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial.....	24
2.2 Antikörper, Enzyme und Plasmide.....	29
2.3 Puffer und Lösungen.....	31
2.4 Zellkultur Medien und Reagenzien.....	34
2.5 Geräte und Programme.....	35
3 Methodik.....	38
3.1 Tierhaltung.....	38
3.2 Mauslinien.....	38
3.3 Genotypisierung.....	39
3.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	41
3.3.2 Agarosegelelektrophorese.....	42
3.4 Tiermodelle.....	42

3.4.1	Hydrodynamische Schwanzvenen Injektion (HTVI).....	42
3.4.2	Tamoxifeninjektion.....	43
3.4.3	Organentnahme und Aufbereitung der Proben.....	43
3.5	Histologische Färbungen.....	44
3.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	44
3.5.2	Immunfluoreszenz Färbung (IF-Färbung).....	44
3.5.3	Immunhistochemische Färbung (IHC-Färbung).....	45
3.6	Proteinnachweis mittels Western Blot.....	47
3.6.1	Proteinisolierung.....	47
3.6.2	Western Blot.....	47
3.7	Nachweis und Quantifizierung der aus Tumor- und Gewebeproben gewonnenen DNA und RNA.....	49
3.7.1	DNA-Extraktion aus Tumor- und Gewebeproben.....	49
3.7.2	RNA-Extraktion aus Tumor- und Gewebeproben.....	50
3.7.3	Gewinnung von cDNA (<i>complementary</i> DNA, komplementäre DNA).....	51
3.7.4	Quantitative „ <i>real-time</i> “-PCR (qRT-PCR).....	51
3.7.5	RNA-Sequenzierung und Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).....	55
3.8	Zellkultur.....	55
3.8.1	Kultivierung und Versuchsdurchführung.....	55
3.8.2	RNA-Analyse.....	55
3.9	Statistische Auswertung der Daten.....	56
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Darstellung des Rekombinationserfolgs der verschiedenen <i>Mek1/2</i> -Mausmodelle durch Immunfluoreszenzfärbung.....	57
4.2	Nachweis der Deletion von <i>Rb</i> , <i>p53</i> und <i>Map2k1</i>	59
4.3	Tumorentwicklung und Metastasenbildung bei <i>RPK; Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-}</i> im Vergleich zu <i>RPK;Pdk1^{lox/lox}-</i> und <i>RPK</i> -Tieren.....	61
4.3.1	Verlängerte Überlebensrate.....	61
4.3.2	Metastasierung.....	62
4.4	Aktivität des MEK/ERK-Signalwegs in Tumoren.....	65
4.4.1	Analyse der mRNA-Expression von Zielgenen des MEK/ERK- sowie des PI3K/AKT-Signalweges.....	68
4.5	Differenzierungsänderung in <i>Mek1/2</i> -defizienten Tumoren.....	71
4.5.1	Analyse der mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern.....	73
4.6	mRNA-Expression in <i>RPK</i> -Tumorzelllinien nach Behandlung mit einem MEK1/2-Inhibitor.....	75
4.7	Aktivität des Hippo/Yap-Signalweges.....	77
4.8	Analyse der mRNA-Expression von relevanten Zielgenen des NOTCH-Signalweges.....	79
4.9	Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges.....	81
5	Diskussion.....	85
5.1	Überlebensdauer und Signalwegaktivität bei Tumorentwicklung.....	85

Inhaltsverzeichnis

5.2	Metastasierungspotential	89
5.3	Tumordifferenzierung.....	90
6	Fazit.....	96
7	Literaturverzeichnis.....	97
8	Eidesstattliche Erklärung	107
9	Publikationsliste	108
10	Danksagung	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien für die durchgeführten Versuche	24
Tabelle 2: Für die durchgeführten Versuche verwendetes Verbrauchsmaterial	27
Tabelle 3: Kommerziell erhältliche Kits	28
Tabelle 4: Für histologische Färbungen und Western Blot verwendete Primärantikörper	29
Tabelle 5: Für histologische Färbungen und Western Blot verwendete Sekundärantikörper	30
Tabelle 6: Plasmide	30
Tabelle 7: Für die durchgeführten Analysen verwendete Enzyme	30
Tabelle 8: Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung	31
Tabelle 9: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung	32
Tabelle 10: Reagenzien für Zellkultur	34
Tabelle 11: Für die Zellkultur verwendete Medien und ihre Zusammensetzung	34
Tabelle 12: Für die Durchführung der Versuche verwendete technische Geräte	35
Tabelle 13: Zur Analyse und Auswertung der Ergebnisse verwendete Programme	37
Tabelle 14: Mauslinien	39
Tabelle 15: Zur Genotypisierung eingesetzte Primer mit ihren zugehörigen Sequenzen	40
Tabelle 16: PCR-Reaktionsmix	41
Tabelle 17: PCR-Reaktionstemperaturen	41
Tabelle 18 Verwendete Primärantikörper für histologische Färbungen mit angewandeter Verdünnung	46
Tabelle 19 Verwendete Sekundärantikörper für histologische Färbungen mit angewandeter Verdünnung	46
Tabelle 20: Polyacrylamidgele für Western Blots	48
Tabelle 21: Für Deletions-PCR eingesetzte Primer mit ihren zugehörigen Sequenzen	50
Tabelle 22: Deletions-PCR Reaktionstemperaturen und -zeiten	50
Tabelle 23: Verwendete Primer für die quantitative real-time PCR (qPCR) mit ihren jeweiligen Sequenzen	52
Tabelle 24: Medianes Überleben	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung cholangiozellulärer Karzinome anhand ihrer anatomischen Lokalisierung in Anlehnung an (El-Diwany et al., 2019)	4
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Ras-abhängigen Signalwege PI3K/AKT und MEK/ERK in Anlehnung an (Technology, 2003).	12
Abbildung 3: Veranschaulichung des verwendeten Cre/loxP Rekombinationssystems.....	19
Abbildung 4: Repräsentative Tumore in <i>RPK</i> -Versuchstieren.....	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung.....	21
Abbildung 6: Darstellung der Rekombinationseffizienz der verschiedenen <i>RPK;Mek1/2</i> -Versuchsmodelle durch Immunfluoreszenzfärbung	57
Abbildung 7: Nachweis der Deletion von <i>Rb</i> , <i>p53</i> und <i>Map2k1 (Mek1)</i> in Versuchstieren des <i>RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2};Rosa26^{LSL-YFP}</i> -Genotypes	59
Abbildung 8: Einfluss der <i>Mek1/2</i> -Defizienz auf Tumorentwicklung und Überlebensproportionen	61
Abbildung 9: Einfluss der <i>Mek1/2</i> -Defizienz auf das Metastasierungspotential	62
Abbildung 10: Einfluss der <i>Pdk1</i> - und <i>Mek1/2</i> -Defizienz auf das Metastasierungspotential. Darstellung anhand histologischer Färbungen.....	64
Abbildung 11: Aktivität der RAS-abhängigen Signalwege PI3K/AKT und MEK/ERK.....	66
Abbildung 12: Relative mRNA-Expression von Zielgenen des MEK/ERK-Signalweges <i>Mek1/2</i> -defizienter Tumore	68
Abbildung 13: Analyse der relativen mRNA-Expression von Zielgenen des PI3K/AKT- Signalweges <i>Mek1/2</i> -defizienter Tumore	69
Abbildung 14: Relevanz der <i>Mek1/2</i> -Defizienz in Bezug auf die Tumordifferenzierung <i>in vivo</i>	71
Abbildung 15: Analyse der relativen mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern <i>Mek1/2</i> -defizienter Tumore	73
Abbildung 16: <i>RPK</i> -Tumorzelllinien nach <i>Mek1/2</i> -Inhibition durch PD0325901	75
Abbildung 17: Analyse des Hippo/YAP-Signalwegs auf Protein- und mRNA-Ebene in <i>Mek1/2</i> -defizienten Lebertumoren.....	77
Abbildung 18: Analyse der relativen mRNA-Expression von Zielgenen des NOTCH-Signalweges <i>Mek1/2</i> -defizienter Tumore.....	79

Abbildung 19: Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Mek1/2-defizienten Tumoren82

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
AFP	Alphafetoprotein
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Alb	Albumin Gen
AKT	Proteinkinase B
pAKT^{Ser473}	Phosphorylierte Proteinkinase B an Serin473
pAKT^{Thr308}	Phosphorylierte Proteinkinase B an Threonin308
ANOVA	Analysis of variance
ApoE	Apolipoprotein E (<i>ApoE.HCR.hAAT</i>)
APS	Ammoniumphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK19	Zytokeratin 19
cm	Zentimeter
cm²	Quadratzentimeter
COO	Cell of origin
Cre	Cre Rekombinase
Da	Dalton
del	deletiert
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle medium

Abkürzung	Erklärung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH₂O	Demineralisiertes Wasser
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Estrogenrezeptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
pERK	Phosphorylierte extracellular-signal regulated kinase
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEF	guanine exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GTP	Guanosintriphosphat
H0	Nullhypothese
H1	Alternativhypothese
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSB5	Hyperactive Sleeping Beauty Transposase 5

Abkürzung	Erklärung
HSP90	Hitzeschockprotein 90
HTVI	Hydrodynamic tail vein injection
IDH1	Isocitratdehydrogenase 1
IDH2	Isocitratdehydrogenase 2
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilo Dalton
Kras	G-Protein, erste Identifikation im Kirsten Rat Sarcoma Virus
l	Liter
loxP	Locus of X-over of P1
LSCG	Liver Cancer Study Group of Japan
LSL	loxP-stop-loxP
mA	Milli Ampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MAP2K1)
MEK2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 2 (MAP2K2)
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter

Abkürzung	Erklärung
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Micro RNA
mut	mutiert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Nicht alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht alkoholische Steatohepatitis
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PDK2	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2
PFA	Paraformaldehyd
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
pTA	Pre-TCR alpha
Rb	Retinoblastoma-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
Rosa26	Reverse Oriented Splice Acceptor, Clone 26
RPK	$Rb^{lox/lox}; p53^{lox/lox}; Kras^{LSL-G12D/+}$
rpm	Umdrehungen pro Minute
SB	Sleeping Beauty Transposase

Abkürzung	Erklärung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SD	Standardabweichung
SPF-Haltung	Spezifisch pathogenfreie Haltung
TAE	Tris Acetat EDTA
TAM	Tamoxifen
Taq	Taq-Polymerase (DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>)
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)
TBS-T	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, 1,2-bis (dimethylamino) ethane
TP53/Trp53	Transformation related protein 53
UICC	Union internationale contre le cancer
V	Volt
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
YFP	Yellow fluorescent protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie von primären Leberkarzinomen

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist die jährliche Zahl der Krebstoten inzwischen höher als die Zahl der durch koronare Herzkrankheit oder Schlaganfall verursachten Todesfälle (Ferlay et al., 2015). Durch veränderte Lebensumstände und einem erhöhten hygienischen Standard hat sich im Lauf der letzten Jahre die Art der lebensbedrohlichen Erkrankungen besonders in den Industrienationen verändert. So haben durch Infektionserkrankungen bedingte Todesfälle in Deutschland heutzutage einen kleineren Anteil als jene in Folge einer Krebserkrankung. Aufgrund der hohen Mortalität gehören Malignome der Leber weltweit zu den häufigsten krebsbedingten Todesursachen mit ungefähr 782.000 Todesfällen im Jahr 2018 (Akinyemiju et al., 2017; Bray et al., 2018). Weitere Hauptursachen der krebsbedingten Todesfälle sind neben den primären Leberkarzinomen die Lungen- und Magenkarzinome (Ferlay et al., 2015). Der Begriff des Leberkarzinoms umfasst eine Gruppe Malignome verschiedener histologischer Differenzierung. Als häufigster auftretender Subtyp der Leberkarzinome gilt mit circa 80 % das hepatozelluläre Karzinom (HCC). Zweithäufigster Vertreter der Leberkarzinome ist mit 15 % das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) (Petrick et al., 2016).

In den Jahren von 1990 bis 2015 erhöhten sich die Inzidenzen von Lebermalignomen um gut 75 %. Dies wird unter anderem durch das steigende Durchschnittsalter der Bevölkerung, sowie durch das Bevölkerungswachstum und die veränderten Lebens- und Ernährungsgewohnheiten erklärt (Akinyemiju et al., 2017). Etwa 80 % aller neu diagnostizierten Leberkarzinomerkrankungen werden in weniger industriell entwickelten Regionen festgestellt (Ferlay et al., 2015). Weltweit betrachtet gelten Leberkarzinome bei Männern als fünfthäufigste Krebserkrankung und stehen an zweiter Stelle aller Krebstodesursachen. Bei Frauen stehen sie an neunter Stelle der Krebserkrankungen und an sechster Stelle der Krebstodesursachen (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2015). Bei isolierter Betrachtung der CCCs konnte dabei in den USA eine um circa 30 % erhöhte Inzidenzrate bei Männern festgestellt werden (Everhart & Ruhl, 2009). Innerhalb der CCCs zeigt sich damit die leichte Tendenz eines Geschlechtsdimorphismus. Neben den Inzidenzen liegt auch die Mortalitätsrate für CCCs bei Männern leicht höher als bei Frauen (Razumilava & Gores, 2014). Ein Geschlechtsdimorphismus bezüglich der Mortalität lässt sich häufig auch bei anderen Karzinomentitäten erkennen und stellt sich im Vergleich zu CCCs teilweise ausgeprägter dar (Ferlay et al., 2015). Beispielsweise erkranken dreimal so viele Frauen an Schilddrüsenkarzinomen wie Männer. Im Gegensatz dazu erkranken viermal so viele Männer an Malignomen der Harnblase als Frauen (Bray et al., 2018). Eine fokussierte Betrachtung der

steigenden Inzidenzen der CCCs lässt innerhalb dieser Gruppe der Leberkarzinome weitere Unterschiede erkennen. Während die Inzidenzen der intrahepatischen CCCs in den USA in den letzten Jahren deutlich anstiegen, stellen sich die Zahlen der extrahepatischen CCCs als weitestgehend stabil dar (Saha, Zhu, Fuchs, & Brooks, 2016). Die Ursachen hierfür sind bisher unklar.

Wie bereits beschrieben zählt zur häufigsten histologischen Unterart der Leberkarzinome mit 80 % das HCC, gefolgt vom CCC (Petrick et al., 2016). Des Weiteren kommen auch gemischte HCC/CCC-Tumore oder undifferenzierte Formen vor (Yeh, 2010). Bei Betrachtung der verschiedenen Tumorentitäten der Leber fallen Unterschiede in der epidemiologischen Verbreitung auf. So sind die insgesamt selteneren CCCs in hohem Ausmaß in Thailand oder Ostasien verbreitet (Jemal et al., 2011). Besonders hohe Raten diagnostizierter HCCs lassen sich dagegen in anderen Teilen Asiens und in Afrika in Gebieten der Sub-Sahara finden (Mittal & El-Serag, 2013). In diesen Teilen Afrikas wird die Präsenz des HCCs als endemisch angesehen, wohingegen CCCs dort nur selten diagnostiziert werden. Als zugrundeliegender Faktor für die Unterschiede in der Ausbreitung werden verschiedene spezifische Risikofaktoren für die jeweiligen Subtypen diskutiert (Okuda, Nakanuma, & Miyazaki, 2002).

CCCs stellen mit circa 15 % die zweitgrößte Gruppe aller Lebermalignome dar (Okuda et al., 2002; Petrick et al., 2016). Einige Risikofaktoren und Vorerkrankungen, die zur Entstehung eines CCCs beitragen sind bereits bekannt. Als mögliche Risikofaktoren für die Entstehung eines CCCs werden unter anderem spezifische Erkrankungen wie eine primäre sklerosierende Cholangitis (PSC), ein Gallensteinleiden und angeborene Fehlbildungen des Gallensystems angesehen. Die PSC gilt in westlichen Ländern als einer der Risikofaktoren mit dem höchsten Risiko zur Entwicklung eines intrahepatischen CCCs (El-Diwany, Pawlik, & Ejaz, 2019). Erkrankungen der Gallenwege scheinen über die Entstehung chronischer Entzündungen eine Rolle in der Karzinogenese einzunehmen (Jemal et al., 2011). Weitere Risikofaktoren stellen eine Hepatitis B Virus (HBV)- oder Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion mit oder ohne folgende Chronifizierung, eine Leberzirrhose oder Exposition gegenüber lebertoxischen Stoffen dar. Als lebertoxische Stoffe gelten unter anderem Aflatoxin A und erhöhter Alkoholkonsum. Infektiöse Erkrankungen der Leber, wie beispielsweise eine chronische HCV-Infektion oder eine HBV-Infektion zeigen höhere Inzidenzen im asiatischen Raum (Shlomai, de Jong, & Rice, 2014). Jedoch stellt beim CCC vor allem eine Infektion mit dem HCV einen der bedeutenderen Risikofaktoren dar (Okuda et al., 2002). Neben Infektionserkrankungen der Leber scheint bei Entwicklung eines CCCs auch eine chronische metabolische Vorerkrankung wie Diabetes Mellitus sowie verstärkter Alkohol- und Nikotinkonsum eine Rolle zu spielen (Farshidfar et al., 2017). Besonders hohe Inzidenzen für das CCC sind in Thailand oder anderen Teilen Ostasiens sowie in Teilen Südamerikas bekannt (Jemal et al., 2011; Patel, 2002). Einer der in Süd- und Ostasien häufig zugrundeliegenden Risikofaktoren ist eine parasitäre Infektion mit

den Leberegelarten *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis*. Durch die parasitäre Besiedlung kommt es wie bei anderen Erkrankungen der Gallenwege zur Entstehung einer chronischen Entzündung. Die chronische Entzündung wird als mögliche Grundlage der Hepatokarzinogenese angesehen (Rizvi & Gores, 2013). Neben der in diesen Regionen häufigeren parasitären Infektion wird außerdem auch die spezifische Ernährungsweise als beitragender Faktor diskutiert. Die dort vermehrt konsumierten Produkte auf Basis von fermentiertem Fisch enthalten Dimethylnitrosamin-produzierende Bakterien. Dimethylnitrosamine gelten sowohl isoliert als auch in Kombination mit Leberegelinfektionen als Risikofaktor für die Entstehung eines CCCs. Beide Risikofaktoren werden als potenzielle Ursache für höhere Inzidenzen des CCCs im asiatischen Raum angesehen (Okuda et al., 2002; Thamavit, Bhamarapavati, Sahaphong, Vajrasthira, & Angsubhakorn, 1978).

Für die Entstehung des HCCs hingegen sind viele Risikofaktoren bereits besser bekannt. Diese ähneln vielen der vermuteten Risikofaktoren des CCCs und beinhalten Infektionserkrankungen der Leber (HBV, HCV), lebertoxische Stoffe (Aflatoxin oder Alkohol) sowie Autoimmunerkrankungen der Leber. In Industrienationen, wie zum Beispiel den USA oder auch Deutschland, gilt eine Steatohepatitis oder eine Leberzirrhose, oft durch Alkoholmissbrauch verursacht, als Hauptrisikofaktor für die Entstehung vieler HCCs (Jemal et al., 2011). Insgesamt entstehen in westlichen Ländern viele HCCs auf dem Boden einer zumeist ethyltoxischen Leberzirrhose. Auch eine HBV- oder HCV-Infektion gilt als bekannter Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC. Eine durch eine HBV- oder HCV-Infektion bedingte HCC-Erkrankungen entstehen dabei in 70 bis 90 % der Fälle auf dem Boden einer dadurch vorliegenden Leberzirrhose. Ohne die Entstehung einer Zirrhose ist eine HCC-Entstehung bei zugrundeliegender NAFLD oder HBV-Infektion möglich aber deutlich seltener gegeben (D. Q. Huang, El-Serag, & Loomba, 2021; Jemal et al., 2011; Mittal & El-Serag, 2013; J. D. Yang et al., 2011). Erkrankungen der Gallenwege zählen hingegen ausschließlich zu den Risikofaktoren des CCCs. Die große Bandbreite der verschiedenen Risikofaktoren für CCCs und auch HCCs ist mit verantwortlich für die weltweit gesehen regional unterschiedlichen Inzidenzen der beiden Leberkarzinomentitäten.

Rund 80 % der Patient*innen mit einem Leberkarzinom werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium oder mit einer bereits multifokalen Ausbreitung diagnostiziert. Häufig liegen zusätzlich weitere Komorbiditäten vor (Spangenberg, Thimme, & Blum, 2009). Gründe für eine Diagnosestellung von cholangiozellulären Tumoren in einem bereits fortgeschrittenen Stadium sind unter anderem spät auftretende Symptome und fehlende Marker zur Früherkennung (Charbel & Al-Kawas, 2011). Metastasierungen von intrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen erfolgen bevorzugt entlang des venösen Systems wohingegen perihiliäre Tumore meist den Wegen des lymphatischen Systems folgen. Seltener metastasieren intrahepatische Tumore auch entlang des lymphatischen oder des Gallensystems (Razumilava & Gores,

2014). Therapieoptionen des CCCs fokussieren sich meist auf lokale Therapien wie den Versuch der kurativen Tumorresektion (El-Diwany et al., 2019; Rizvi, Khan, Hallemeier, Kelley, & Gores, 2018). Als systemische Therapie kommt in fortgeschrittenen und inoperablen Stadien beispielsweise eine Chemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin in Kombination mit Durvulumab zum Einsatz (Oh et al., 2022; Razumilava & Gores, 2014; Rizvi et al., 2018). Zur Therapie von HCCs steht in einigen Erkrankungsfällen mit der Lebertransplantation eine weitere Säule der Therapie zur Verfügung. Relevant für die Durchführung einer Transplantation ist unter anderem eine lokale Begrenzung des Malignoms auf die Leber. Selten kommt eine Lebertransplantation auch für frühe Stadien und einzelne Subtypen des CCCs nach neoadjuvanter Chemo- und Radiotherapie in Betracht (Rizvi et al., 2018). Für cholangiozelluläre Tumore lag die 5-Jahres Überlebensrate zuletzt bei 10 % (Razumilava & Gores, 2014; Rizvi & Gores, 2013).

1.2 Hepatokarzinogenese

Cholangiozelluläre Karzinome lassen sich je nach Wachstumsort genauer klassifizieren. Nach anatomischer Einteilung kann grob zwischen intrahepatischen und extrahepatischen Gallengangstumoren unterschieden werden. Ferner ist eine genauere Einteilung der extrahepatischen Tumore in distale, perihiläre oder proximale Tumore möglich (Abbildung 1). Dabei bezieht sich die Einteilung in distale und proximale CCCs auf die Richtung des Galleflusses. Mit 50 % und 40 % sind distale und proximale Tumore die häufigsten anatomischen Lokalisationen von CCCs (Razumilava & Gores, 2014). Perihiläre Gallengangstumore sind auch unter dem Eigennamen „*Klatskin Tumor*“ bekannt (Blechacz & Gores, 2008).

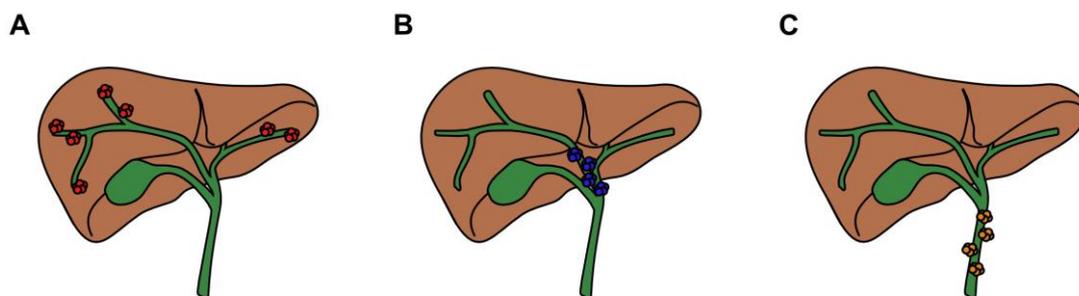


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung cholangiozellulärer Karzinome anhand ihrer anatomischen Lokalisierung in Anlehnung an (El-Diwany et al., 2019)

(A) Anatomische Lokalisation intrahepatischer cholangiozellulärer Karzinome (Rot)

(B) Anatomische Lokalisation perihilärer cholangiozellulärer Karzinome (Blau)

(C) Anatomische Lokalisation extrahepatischer cholangiozellulärer Karzinome (Orange)

Eine genauere anatomische Klassifizierung der hepatozellulären Tumore erfolgt dagegen nicht. CCCs werden außerdem aufgrund ihrer makroskopischen Erscheinung genauer eingeteilt. Nach der Liver Cancer Study Group of Japan (LSCGJ) kann eine Einteilung in „*mass-forming*“, „*periductal-infiltrating*“ und „*intraductal-growing*“ vorgenommen werden. Nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) und der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) muss neben diesen Formen als eine Weitere ein „gemischter Typ“ bedacht werden (Cardinale et al., 2013). Neben einer makroskopischen Klassifizierung ist eine zusätzliche Einteilung nach histologischen Gesichtspunkten möglich. Histomorphologisch stellen sich CCCs als Adenokarzinome mit guter, mäßiger oder schlechter Differenzierung dar. Dabei sind besonders zwei verschiedene Differenzierungen zu unterscheiden. Cholangiozelluläre Karzinome mit zylindrischen, Muzin-produzierenden Drüsen und Karzinome mit kubischen, nicht Muzin-produzierenden Drüsen (Cardinale et al., 2013). Bisher ergeben sich aus der histopathologischen Differenzierung jedoch keine therapeutischen Konsequenzen.

1.2.1 *Cell of origin* (COO)

Wie bereits genauer beschrieben, zählen CCCs zu den zwei größten Subgruppen der primären Lebermalignome. Dennoch ist der ursprüngliche Zelltyp, die sogenannte „*cell of origin*“, aus denen sie hervorgehen, gegenwärtig nicht eindeutig identifiziert. Im Folgenden soll die Herkunft cholangiozellulärer Karzinome näher betrachtet werden. In Abgrenzung vom HCC, das von den Hepatozyten ausgeht, wurde beim CCC aufgrund der histomorphologischen Differenzierung lange davon ausgegangen, dass es sich um eine „epitheliale Krebsart der Gallengänge“ handelt und diese somit auf Cholangiozyten zurückgeht (Y. Zhu & Kwong, 2020). Die Epithelzellen der Gallengänge werden hierbei als Ursprung angesehen (Okuda et al., 2002). Neben einer direkten Herkunft aus den Gallengängen werden aufgrund von molekularen Gemeinsamkeiten zwischen HCCs und CCCs auch gemeinsame Ursprungszellen diskutiert. In Frage kommen dafür sogenannte Vorläuferzellen (*liver progenitor cells*) und Stammzellen (*stem cells*) (Blechacz & Gores, 2008; Coulouarn et al., 2012). Auch in anderen Tumorarten, wie beispielsweise dem Kolonkarzinom, Prostatakarzinom oder Glioblastom gelten Vorläuferzellen der Parenchymzellen als Ursprungszellen (Moeini, Haber, & Sia, 2021). Des Weiteren liegen Erkenntnisse vor, dass intrahepatische CCCs neben Cholangiozyten und Vorläuferzellen auch aus Hepatozyten entstehen können (B. Fan et al., 2012; Moeini et al., 2021; Sekiya & Suzuki, 2012). In genetisch modifizierten Mausmodellen konnten gezeigt werden, dass sowohl Cholangiozyten wie auch Hepatozyten als Ursprungszellen für CCCs dienen können (Y. Zhu & Kwong, 2020). Als Fazit bleibt, dass wahrscheinlich verschiedene Zelltypen innerhalb der heterogenen Gruppe der CCCs als Ursprungszellen in fungieren können. Mit dem Wissen über die zugrundeliegenden

Herkunftszellen könnte in Zukunft eine genauere Differenzierung der verschiedenen Tumorentitäten möglich sein.

1.2.2 Mutationen in der Hepatokarzinogenese

Bei allgemeiner molekularpathologischer Betrachtung von Malignomen fallen häufig auslösende spezifische Mutationen auf. Diese verursachen unter anderem eine fehlende Regulation von Wachstum, Differenzierung und Zelltod in den betroffenen Zellen. Verantwortlich sind dabei besonders sogenannte Tumorsuppressor- und Protoonkogene. Protoonkogene fungieren als eine Art Vorstufe von Onkogenen, da diese erst nach einer erfolgten Mutation als Onkogen agieren. Dabei kann die Art der Mutationen sehr vielfältig sein. So können beispielsweise Punktmutationen oder Translokationen auf Chromosomenebene zur Aktivierung der Protoonkogene führen (Torry & Cooper, 1991). Dieser Vorgang wird auch als „*gain-of-function*“ bezeichnet. Als bekannte Onkogene gelten zum Beispiel Gene der Ras Proteinfamilie. So finden sich in humanen Lungenkarzinomen häufig aktivierende Mutationen im *KRAS*-Gen (Román et al., 2018). Tumorsuppressorgene hingegen verhindern, als Gegenspieler zu den Onkogenen, ein ungebremstes Wachstum oder sorgen für den Abbau von fehlerhaftem Material. Nach einer „*loss-of-function*“ Mutation eines Tumorsuppressorgenes ist diese Funktion eingeschränkt und erleichtert dadurch ein tumoröses Wachstum (Ghosh et al., 2017).

Eine Mutation im Tumorsuppressorgen *TP53* ist sowohl in HCCs wie auch in CCCs häufig identifizierbar (Cancer Genome Atlas Research Network, 2017; Churi et al., 2014; Fujimoto et al., 2012). In HCCs steht der von p53-abhängige Signalweg an zweiter Stelle der am häufigsten veränderten Signalwege (Guichard et al., 2012). Innerhalb des p53 Signalweges finden sich sowohl in HCCs als auch in CCCs die Mutationen am häufigsten im Tumorsuppressorgen *TP53* (Zou et al., 2014).

Weiter wurden Mutationen in *β-CATENIN* für die HCC Entstehung und Mutationen in *KRAS* für die CCC Entstehung nachgewiesen (Nault & Zucman-Rossi, 2011). *KRAS*-Mutationen zeigen mit einem Vorkommen von bis zu 25 % in intrahepatischen und mit 12 % in extrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen eine deutliche Häufung. In Gallenblasenkarzinomen konnten dagegen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Mutationen im *KRAS*-Gen nachgewiesen werden (Nakamura et al., 2015). Verglichen mit HCCs, in denen eine Mutation von *KRAS* in 1,6 % der untersuchten Fälle gezeigt werden konnte, scheint der RAS-Signalweg somit vorwiegend in CCCs von relevanter Bedeutung für die Tumorentstehung zu sein (Guichard et al., 2012; Zou et al., 2014). Jedoch konnte im Gegensatz zu diesen Studien in der Arbeit des Cancer Genome Atlas Research Network durch eine breite Analyse von Signalwegen auch in hepatozellulären Tumoren die Gene *RAS*, *RAF*, *MAPK* und *PI3K* als häufiger mutiert aufgezeigt werden (Cancer Genome Atlas Research

Network, 2017). Dies zeigt eine potenziell relevante Bedeutung der RAS-abhängigen Signalwege auch für die Karzinogenese von HCCs. CCCs mit Mutationen in *TP53* sowie in *KRAS* zeigen laut der von Zou et al. (2014) durchgeführten Studie ein deutlich schlechteres Langzeitüberleben des Patienten (Zou et al., 2014). Neben Mutationen in *TP53* und *RAS*-Genen konnten auch Mutationen in Genen mit indirektem Einfluss auf die Proliferation, wie im Wachstumsfaktor *TGFβ* mit einem kürzeren Überleben in Verbindung gesetzt werden (Boerner et al., 2021).

In Mischtumoren mit hepatozellulären und cholangiozellulären Anteilen konnte in bis zu 25 % der analysierten Tumore eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beobachtet werden (Coulouarn et al., 2012). In HCCs konnte der Wnt/ β -Catenin-Signalweg als der am häufigsten veränderte Signalweg identifiziert werden. Als häufigste auftretende Mutation innerhalb des Wnt/ β -Catenin-Signalweges konnten Mutationen im *CTNNB1* Gen nachgewiesen werden (Marquardt, Andersen, & Thorgeirsson, 2015). Außerdem konnte in CCCs und HCCs eine Assoziation zwischen den gemeinsam auftretenden Mutationen im *RPS6KA3* (Ribosomal Protein S6 Kinase A3) und im *AXIN1* Gen dargestellt werden. Das *RPS6KA3* Gen kodiert für die ribosomale S6 Protein Kinase 2 (RSK2), welche funktional dem MEK/ERK-Signalweg zugeordnet werden kann. Dies deutet einen Zusammenhang zwischen der Signaltransduktion von RAS über MAPK nach Inaktivierung von *RSK2* und dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg an. (Guichard et al., 2012) Bei Betrachtung des RAS/PI3K-Signalweges in Sequenzierungsdaten von HCCs und CCCs konnten Differenzen der Mutationsfrequenzen beobachtet werden. Während in CCCs die am häufigsten mutierten Stellen des RAS/PI3K-Signalweges in *KRAS* und *PTEN* zu finden sind, liegt in HCCs am häufigsten das bereits erwähnte *RPS6KA3* Gen mutiert vor (Zou et al., 2014).

Andere durchgeführte Studien und Analysen von CCCs zeigten unter anderem Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *TP53* und *PTEN* sowie in den Onkogenen *KRAS*, *BRAF* und *IDH1* und 2 (Borger et al., 2012; Farshidfar et al., 2017). Mutationen in *KRAS*, *IDH1* und *PTEN* werden in intrahepatischen CCCs auch als sogenannte „*driver mutations*“ angesehen (Marquardt et al., 2015). Auf die verschiedenen Untergruppen des CCCs bezogen sind Mutationen in *IDH1* (Isocitratdehydrogenase 1) und *IDH2* (Isocitratdehydrogenase 2) vor allem häufig in intrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen vertreten. Seltener konnten diese Mutationen auch in extrahepatischen CCCs nachgewiesen werden (Borger et al., 2012; Kipp et al., 2012). Patienten mit intrahepatischen CCCs und bestätigten *IDH1* und *IDH2* Mutationen zeigten im Vergleich zu CCCs ohne diese Mutationen ein verlängertes Überleben (Kipp et al., 2012; Wang et al., 2013). Ein Nachweis von *IDH1* und *IDH2* Mutationen war bisher unter anderem für Gliome und myeloische Leukämien aber seltener für solide Tumore bekannt (Wang et al., 2013). Mutationen in *TP53* hingegen scheinen vermehrt in Gallenblasenkarzinomen vertreten (Jiao et al., 2013; Nakamura et al., 2015).

Sequenzierungsstudien von humanen cholangiozellulären Tumoren konnten außerdem Unterschiede bei Mutationsfrequenz und Vorkommen mit potenziellen Risikofaktoren in Zusammenhang bringen. So konnte für CCCs beispielsweise eine Mutation in *TP53* häufiger bei Patienten mit einer parasitären Infektion des *Opisthorchis viverrini* beobachtet werden (Chan-On et al., 2013). Gegenteilig ist eine Häufung von *IDH1* und *IDH2* Mutationen bei CCCs auf Basis einer Leberegelinfektion, die nicht durch den Parasiten *Opisthorchis viverrini* verursacht wurde, auffallend (Chan-On et al., 2013). Ferner konnte eine *TP53* Mutation für CCCs und auch HCCs häufiger in Bezug zu einer Infektion mit HBV gesetzt werden (J. Huang et al., 2012; Marquardt et al., 2015; Zou et al., 2014).

Als weitere häufig mutierte Gene in HCCs und CCCs wurden Gene mit Beteiligung an der Chromatin-Remodellierung entdeckt. Für HCCs konnten diese Gene als dritthäufigste Mutationsstelle nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei insbesondere um Gene, die für die Proteine ARID1A und ARID2 kodieren. Beide sind Teil des SWItch/Sucrose Non-Fermentable (SWI/SNF) -Remodellierungskomplexes, für den zuvor Tumorsuppressorfunktionen aufgezeigt werden konnten. Derartige Mutationen sind bereits aus Karzinomen des Magens, der Ovarien und der Blase bekannt (Fujimoto et al., 2012; Guichard et al., 2012; Jiao et al., 2013). In der durchgeführten Studie von Fujimoto et al. (2012) konnten Mutationen in Chromatin-Regulatoren, wie beispielsweise *ARID1A* und *ARID2* in circa 50 % aller untersuchten HCCs nachgewiesen werden (Fujimoto et al., 2012). *ARID2* zeigte sich in HCV positiven HCCs als häufig mutiert (J. Huang et al., 2012). Neben diesen beiden Genen konnte mit *BAP1* ein weiteres für die Chromatin-Modellierung relevantes Gen in CCCs nach Leberegelinfektion als mutiert nachgewiesen werden. Auch BAP1 agiert als Tumorsuppressor (Chan-On et al., 2013). Zum Teil konnte in HCCs auch eine gleichzeitig vorliegende Mutation des *TP53*- und des *ARID1A*-Gens nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang beider Mutationen ist nicht auszuschließen (J. Huang et al., 2012; Zou et al., 2014). Neben den beschriebenen heterogenen Mutationen konnten in intrahepatischen CCCs *FGFR2* Genfusionen beobachtet werden. In intrahepatischen CCCs stellen sie die häufigsten wiederkehrenden nachweisbaren Veränderungen dar, während sie in anderen primären Leberkarzinomen selten nachgewiesen wurden (Boerner et al., 2021; Marquardt et al., 2015; Sia et al., 2015). Da sowohl in CCCs als auch in HCCs bisweilen gleiche, aber auch unterschiedliche Mutationen detektiert werden konnten, sind eigene, separate sowie gemeinsame, molekulare Mechanismen für die Karzinogenese denkbar. Für die Prävalenz der einzelnen Mutationen scheint ein Zusammentreffen des genetischen Hintergrundes und der persönlichen Exposition gegenüber Risikofaktoren ausschlaggebend zu sein (Zou et al., 2014).

Hiermit wurden nur einige der häufigsten bekannten Mutationen erwähnt. Weitere seltenere Mutationen sorgen für eine breite Heterogenität innerhalb der Lebermalignome und auch

innerhalb der einzelnen histologischen Subtypen (Jiao et al., 2013). So sind im Durchschnitt 40 genomische Auffälligkeiten pro hepatozellulärem Karzinom bekannt. Allerdings ist zum jetzigen Zeitpunkt keine alleinige Mutation bekannt, die bei mehr als 25 % der untersuchten Karzinome vorliegt (Boerner et al., 2021). Zu beachten ist außerdem, dass nicht jede entdeckte Mutation und Veränderung als eine für die Hepatokarzinogenese entscheidende Mutation, eine sogenannte „*driver mutation*“, anzusehen ist (Llovet et al., 2016).

Therapeutisch steht bei nicht chirurgisch resektablen CCCs, wie bereits zuvor erwähnt, mit Gemcitabin und Cisplatin eine standardmäßige systemische Chemotherapie in Kombination mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor Durvalumab zur Verfügung (Oh et al., 2022; Razumilava & Gores, 2014). Bei fehlendem Ansprechen der Erstlinientherapie liegen je nach Art der vorliegenden Veränderungen verschiedene Therapieoptionen vor. Der Ansatz der personalisierten Medizin mit der sogenannten „*targeted therapy*“ für eine gezielte systemische Behandlung ist deshalb von großer Bedeutung. In den letzten Jahren konnte für einige häufigere Mutationen eine gezielte Therapiemöglichkeit entwickelt und so der Schritt in Richtung einer gezielten personalisierten Therapie unternommen werden. Zum jetzigen Zeitpunkt werden diese nur im palliativen Setting eingesetzt. Für CCCs mit nachgewiesenen *FGFR2*-Mutationen wurde der Kinaseinhibitor Pemigatinib etabliert (Abou-Alfa et al., 2020; AWMF, 2023; Bekaii-Saab et al., 2020; Hoy, 2020). Weitere personalisierte Therapien sind unter anderem vorhanden mit Dabrafenib bei *BRAF*-Mutationen und Ivosidenib bei *IDH1*-Mutationen (AWMF, 2023; Subbiah et al., 2020; A. X. Zhu et al., 2021). Bei den vorhandenen Möglichkeiten einer gezielten personalisierten Therapie ist eine Sequenzierung der Tumoren nach Diagnosestellung für die weitere Therapieplanung sinnvoll.

1.3 Der RAS-Signalweg im CCC

Wie zuvor beschrieben, liegen der Karzinogenese zumeist eine oder mehrere Mutationen in relevanten Genen zugrunde. Durch diese Mutationen erfolgt die Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter für die Zelle notwendiger Signalwege. In diese als Netzwerk organisierten Signalwege sind viele einzelne Proteine eingebunden. Zudem bestehen zwischen den einzelnen Signalwegen Verbindungen und andererseits auch Umgehungswege oder können bei Aktivierung und Inaktivierung neu zustande kommen. Die zuvor erwähnten molekulargenetischen Analysen der verschiedenen Lebertumorentitäten zeigten vor allem in CCCs eine häufig vorliegende Mutation im *KRAS*-Gen (Farshidfar et al., 2017; Nakamura et al., 2015; Nault & Zucman-Rossi, 2011). Auch konnten Mutationen in weiteren Teilen der RAS-abhängigen Signalwege detektiert werden (Cancer Genome Atlas Research Network, 2017; Guichard et al., 2012). Nachfolgend sollen die RAS-Proteine und die zugehörigen Signalwege detaillierter besprochen werden. Ein Schwerpunkt ist dabei die genauere Betrachtung des später untersuchten RAF/MEK/ERK-Signalweges.

Bei der Gruppe der RAS-Proteine handelt es sich um mehrere verschiedene monomere G-Proteine, die in zahlreichen humanen Tumoren mutiert sein können. Dazu gehören die Protein-Isoformen HRAS, NRAS, KRAS4A und KRAS4B. Die verschiedenen Formen von KRAS kommen durch alternatives Splicing zustande (Degirmenci, Wang, & Hu, 2020). Durch die RAS-Proteine werden mehrere Signalkaskaden aktiviert. Zu den wichtigsten RAS-abhängigen Signalwegen gehören dabei der RAF/MEK/ERK-Signalweg und der PI3K/AKT-Signalweg. Beide wurden häufig in Tumoren als genetisch verändert nachgewiesen (Sanchez-Vega et al., 2018). Wie zuvor beschrieben konnten Auffälligkeiten beider Signalwege für HCCs und CCCs aufgezeigt werden (Ally et al., 2017; Guichard et al., 2012). Bei KRAS und seinen nachfolgenden Signalwegskomponenten handelt es sich um wichtige molekulare Bestandteile zur Aktivierung von Zellwachstum und Zellproliferation (Chung et al., 2016; Razumilava & Gores, 2014; S. Yang & Liu, 2017). RAS-Proteine befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran und fungieren als Schalter und Signalwandler. Funktionell handelt es sich bei den RAS-Proteinen um GTPasen (Degirmenci et al., 2020). Durch Bindung von GTP (Guanosintriphosphat) liegt ein aktiver Zustand vor, die sogenannte aktive Konstitution. Die Bindung erfolgt unter Einfluss des *guanine exchange factor* (GEF) Proteins SOS1 (Degirmenci et al., 2020). Nach Ablauf der hydrolytischen Spaltung zu GDP (Guanosindiphosphat) kann wieder eine Inaktivierung erreicht werden (Vetter & Wittinghofer, 2001). Die in verschiedenen Karzinomen beobachtete Mutationen innerhalb der RAS-Proteinfamilie befinden sich zu 85 % in KRAS gefolgt von NRAS mit 12 % (Degirmenci et al., 2020). Wird durch eine Mutation im zugrundeliegenden Gen von beispielsweise der Isoform KRAS die hydrolytische Aktivität eingeschränkt, so kann dies dazu führen, dass KRAS konstitutiv aktiviert vorliegt. Eine Inaktivierung ist nicht mehr möglich. Dies hat zur Folge, dass auch die nachgeschalteten Kinasen der Signalwege durch Phosphorylierung dauerhaft aktiv sind. Dadurch kommt es zu einer ungebremsten Proliferation und einem verlängerten Überleben der betroffenen Zellen. Deshalb wird für konstitutiv aktives KRAS oftmals auch der Begriff des onkogenen KRAS verwendet (Degirmenci et al., 2020). Für die vorliegende Arbeit steht die Bedeutung eines des wichtigsten RAS-abhängigen Signalwege, der RAF/MEK/ERK-Signalweg, für die hepatische Karzinogenese im Mittelpunkt.

Der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg setzt sich aus den Proteinkinasen RAS, RAF, MEK und ERK in der genannten Abfolge zusammen (Abbildung 2). Diesem Signalweg wird ein wichtiger Beitrag zur zellinternen Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung und Überleben zugeschrieben (S. Yang & Liu, 2017). Auf die Besonderheiten der RAS-Proteinfamilie wurde bereits eingegangen. Als wichtiger Vertreter der Familie besteht RAF wie auch RAS aus mehreren Anteilen (A-RAF, B-RAF, RAF-1). Zur Gruppe der MEK-Proteine werden MEK1, MEK2, MEK3, MEK4 und MEK5 gerechnet. Weiter werden JNK1/2/3, ERK1/2, ERK5 sowie P38 MAPK zur ERK Familie gezählt, wobei in der hier beschriebenen Signalkaskade

vornehmlich ERK1/2 eine wichtige Rolle einzunehmen scheint (S. Yang & Liu, 2017). Die Aktivierung der verschiedenen Kinasen erfolgt bei jedem Schritt dieser Kaskade durch Phosphorylierung. Erfolgt die Phosphorylierung von ERK1/2 zu phospho-ERK1/2 (P-ERK) hat dies multiple Folgeeffekte, wie beispielweise eine gesteigerte Proliferation, Differenzierung oder ein längeres Zellüberleben zur Folge (S. Yang & Liu, 2017). Neben dem beschriebenen aufeinander folgenden Aktivitätsverlauf der Kinasen existieren selbstregulierende gegenläufige Feedback-Schleifen. Einerseits wird somit ein direkter Effekt auf RAS mit dem GEF ausgeübt, andererseits besteht durch eine weitere Phosphorylierung von RAF ein negatives Feedback mit nachfolgender Hemmung des Signalweges (Degirmenci et al., 2020). Neben diesen genannten Feedback-Schleifen ist auch eine Rückkopplung auf die MEK Proteine bekannt (S. Yang & Liu, 2017). Sowohl für den RAF/MEK/ERK, als auch für den PI3K/AKT-Signalweg ist bereits bei anderen Tumorentitäten bekannt, dass sie häufig für die Tumorentstehung zumindest mitverantwortlich sind. So wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass bei Pankreastumoren eine spezifische Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges relevant ist, während in Lungentumoren der MEK/ERK-Signalweg eine größere Rolle zu spielen scheint (Eser et al., 2013). Für Tumoren der Leber ist bisher noch nicht bekannt, welcher Signalweg für die Tumorentstehung hauptsächlich relevant ist.

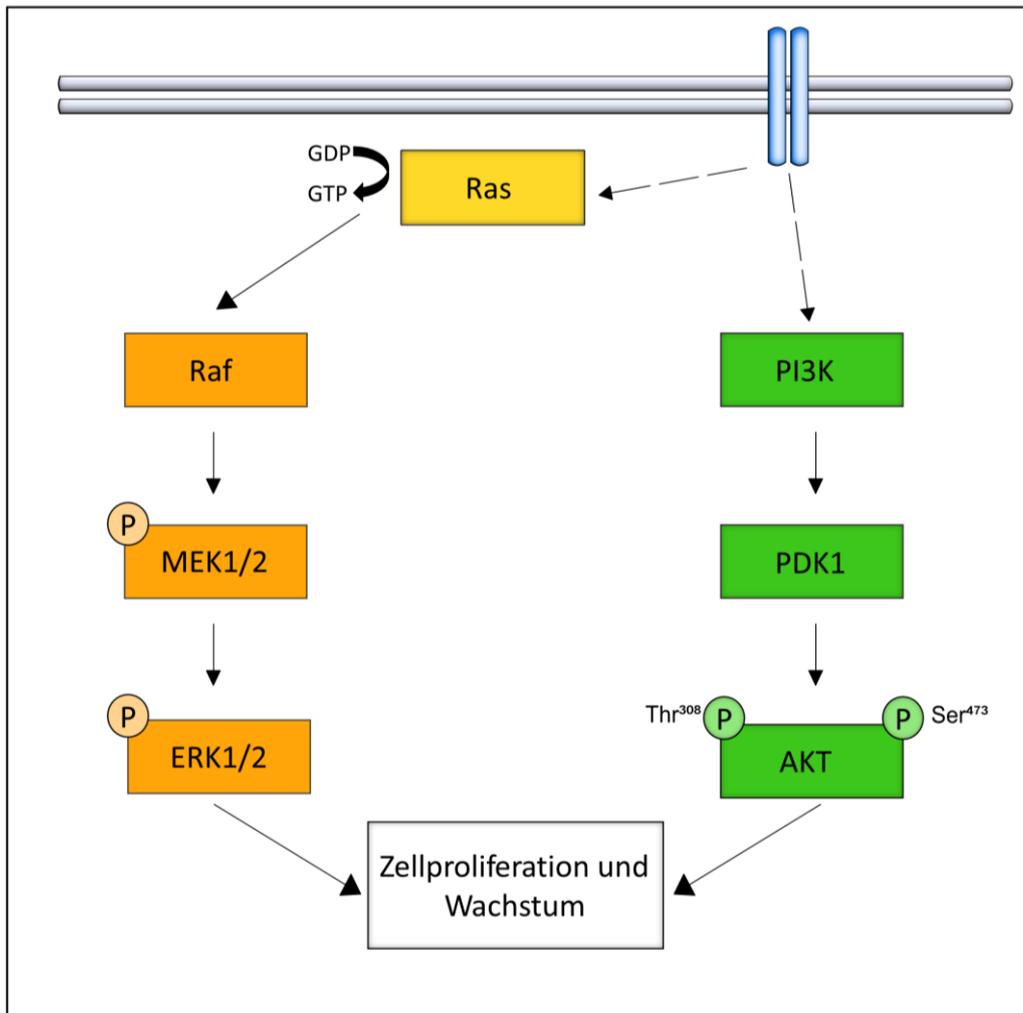


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Ras-abhängigen Signalwege PI3K/AKT und MEK/ERK in Anlehnung an (Technology, 2003).

Durch Bindung eines Wachstumsfaktors an den in der Zellmembran lokalisierten Rezeptor beginnt die Signaltransduktion über RAS. Die Phosphorylierung der Signalwegkomponenten (symbolisiert durch (P)) fungiert als Aktivierung der Kinasen. Exemplarische Darstellung des PI3K/AKT- und der MEK/ERK-Signalweges für zwei mögliche Abfolgen der RAS abhängige Signaltransduktion.

1.4 Mausmodelle

1.4.1 Tierversuche

Für die im Folgenden beschriebenen durchgeführten Tierversuche wurden Mäuse als Versuchstiere verwendet. Tiermodelle im Allgemeinen sind für die Analyse von Karzinomen besonders gut geeignet, da sie eine Untersuchung grundlegender Prinzipien und Abläufe *in vivo* ermöglichen. *In vivo* durchgeführte Forschung erzielt realistische Ergebnisse, da Faktoren, wie beispielsweise der Einfluss der intrazellulären Umgebung sowie auch externe Umweltfaktoren miteinbezogen werden können. Die Darstellung und Analyse der in einem Organismus stattfindenden komplexen Zusammenhänge ist dadurch möglich. Die Maus (*mus musculus*) ist mit rund 61 % aller Tierversuche in Europa die für Experimente am meisten verwendete Tierart (Vetmeduni, 2016). Weiter gilt die Maus als das genetisch am besten studierte und analysierte Säugetier (Eppig, 2017). Bei einer vollständigen Sequenzierung des Mausgenoms ergab sich eine bis zu 99 % Übereinstimmung mit dem menschlichen Genom (Hall, Limaye, & Kulkarni, 2009). Dies ist besonders ausschlaggebend für den umfangreichen Einsatz im Tierversuch. Ein weiterer Grund für die häufige Verwendung von Mäusen ist die mit Hilfe verschiedener Techniken leicht durchführbare Manipulation des Genoms (siehe 1.4.2). Für Tierversuche mit genetisch veränderten Tieren sind Mäuse auch deshalb geeignet, da durch eine schnelle Fortpflanzung und große Wurfgrößen innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne ausreichend dimensionierte Versuchsgruppen aufgebaut werden können (Eppig, 2017; Hall et al., 2009). Dies erspart nicht nur Zeit, sondern auch Ressourcen wie Platz für Haltung und Versorgung der Tiere. Dennoch darf dabei nicht vergessen werden, dass aufgrund der zwar geringen, aber vorhandenen Unterschiede im Genom und fehlenden Umweltfaktoren, Ergebnisse aus Tierversuchen nicht direkt und keinesfalls ohne Einschränkungen auf den Menschen übertragbar sind. Weiter muss beachtet werden, dass zwar durch eine kurze Reproduktionszeit schnell größere Kohorten erreicht werden können, die Zahlen der Versuchstiere in offiziellen Tierversuchen jedoch durch das Tierschutzgesetz eingegrenzt sind. Einzelheiten regelt die Tierschutz-Versuchstierverordnung – TierSchVersV (Bundesamt für Justiz, 2021). Danach sind Tierversuche in Deutschland nur nach zugelassenem Tierversuchsantrag möglich. Dies verhindert konsequent unnötiges Leiden der Tiere und fördert überlegtes Handeln in deutschen Laboratorien.

1.4.2 Genetisch modifizierte Tiermodelle

In vielen Tierversuchen werden heutzutage genetisch modifizierte Mäuse verwendet. Hierbei sind grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze zu unterscheiden. Eine Variante stellt die gezielte Modifikation eines bestimmten Gens dar. Hierbei wird durch gezielte Manipulation von Genen eine vererbare Modifikation des Genoms erreicht. Meist handelt es sich dabei um

sogenannte *Knock-in*-, *Knock-out*- oder seltener auch *Knock-down*-Mäuse. Wie der Name schon andeutet, werden dabei wahlweise Gene eingebracht, entfernt oder unterdrückt (Doyle, McGarry, Lee, & Lee, 2012). Dies erfolgt unter anderem durch Nutzung des Prinzips der homologen Rekombination (Hall et al., 2009). Auf *in vitro* kultivierte Maus-Stammzellen wird ein extra produzierter Inaktivierungsvektor übertragen, der unter anderem das zu inaktivierende Gen enthält. Dieser Genabschnitt trägt entweder eine Mutation, die eine Transkription verhindert oder so mutiert ist, dass nach Ablesen ein defektes Gen entsteht. Durch homologe Rekombination erfolgt nur in Teilen eine Rekombination des „veränderten“ Gens mit entsprechenden Stellen im funktionierenden Genom. Mit verschiedenen Markern lässt sich eine erfolgreiche Rekombination nachweisen. Stammzellen mit erfolgreicher Rekombination können nun in einer Empfängermaus ausgetragen werden (Doyle et al., 2012). Durch Kreuzen der Tiere ist der Erhalt homozygoter Tiere mit verändertem Genlocus möglich. Neben inaktivierenden Mutationen besteht auch die Möglichkeit auf eine vergleichbare Weise aktivierende Mutationen einzubringen. (Hall et al., 2009; Tong, Huang, Ashton, Li, & Ying, 2011). Durch diese gezielte Veränderung können annähernd realistische Verhältnisse für mögliche Vergleiche mit dem Menschen geschaffen werden.

Eine weitere Variante ist die Verwendung von transgenen Mäusen. Dabei erfolgt der Einbau eines Transgens gezielt oder ungezielt. Bei einer ungezielten Veränderung erfolgt die Manipulation nicht an einer bestimmten Stelle, sondern findet an einer zufälligen Stelle im Genom statt. Durch die im Vergleich zur gezielten Genmanipulation ungenaueren Methode sind größere Schwankungen in der Expression der veränderten Gene möglich. (Hall et al., 2009; Kumar, Larson, Wang, McDermott, & Bronshteyn, 2009)

Weitere Unterscheidungen lassen sich bei Betrachtung der Expression aufzeigen. In sogenannten konstitutiven oder auch konventionellen *Knock-out* Modellen betrifft der Knock-out alle Zellen und Organe des Organismus. Entstehende Effekte sind daher nicht eindeutig den Genveränderungen zuzuordnen (Robert Lukowski, 2005). Hingegen exprimieren konditionale beziehungsweise konstitutionelle Modelle genetische Veränderungen organspezifisch oder erst nach Induktion (McLellan, Rosenthal, & Pinto, 2017; Metzger, Clifford, Chiba, & Chambon, 1995). Diese gewebespezifischen Veränderungen, durch beispielsweise das im Folgenden beschriebene Cre/loxP System, erlauben eine klarere Zuordnung zu Zielfunktionen der veränderten Gene oder speziellen Zelltypen (Hall et al., 2009; Robert Lukowski, 2005).

1.4.3 Cre/loxP-System als Beispiel für Rekombinationssysteme

Ein aufgrund seiner Einfachheit und Effektivität häufig verwendetes Rekombinationssystem ist das sogenannte Cre/loxP-System (McLellan et al., 2017). Dafür werden in den meisten Fällen zwei genetisch veränderte Mauslinien benötigt (Robert Lukowski, 2005): Eine Zielmaus mit

„gefloxten“ Genen und eine Linie mit exprimierender Cre-Rekombinase. In der Zielmaus werden die gewünschten Gene mit loxP- (locus of X-over of P1) Erkennungssequenzen flankiert („gefloxte“). Dabei handelt es sich um spezifische Sequenzen, die ihren Ursprung im Bakteriophagen P1 haben (Sauer & Henderson, 1988). Diese können durch die Cre-Rekombinase detektiert, anschließend herausgeschnitten, und folglich deaktiviert werden. Das „Floxxen“ spezieller Bereiche im Genom wird durch homologe Rekombination embryonaler Stammzellen erreicht (McLellan et al., 2017; Robert Lukowski, 2005). Durch das „Floxxen“ der Bereiche ist das Gen in seiner Funktion nicht beeinträchtigt. Erst durch Kreuzen mit einer gewebsspezifische Cre-Rekombinase enthaltenden Maus, beziehungsweise gezielte Expression einer Cre-Rekombinase wird das Herausschneiden des Bereichs in den Zielzellen ermöglicht (Nagy, 2000). Relevant für die Durchführung gezielter Versuche sind eine sichere Gewebsspezifität sowie die Möglichkeit eines kontrollierten Zeitpunktes der Rekombination. Die in den durchgeführten Versuchen benötigte Gewebsspezifität für Lebergewebe wurde durch die Verwendung des leberspezifischen Albumin-Promotors (Alb^{CreER}) oder des ApoE-Promotors (pTA-Cre) erreicht.

Um einen kontrollierbaren Beginn der Rekombination zu erreichen, wurden Liganden-aktivierbare Fusionsproteine mit Cre-Rekombinasen entwickelt (Feil et al., 1996; Kim, Kim, Im, & Fang, 2018). In dieser Arbeit werden Cre-Rekombinasen mit Bindungsdomänen für Östrogenrezeptormodulatoren verwendet. Als Östrogenrezeptormodulator wurde Tamoxifen eingesetzt. Das entstandene Fusionsprotein wird als CreER^{T2} oder auch CreERT bezeichnet (Kim et al., 2018). Hierdurch kommt es erst nach einer Tamoxifengabe zur Expression der Cre-Rekombinase und somit folglich zu einer zeitpunktkontrollierten Rekombination.

Um Mäuse verwenden zu können, die keine im Genom verankerte Cre-Rekombinase exprimieren, gibt es Möglichkeiten einer nachträglichen Einbringung einer Cre-Rekombinase zum Beispiel durch virale Vektoren. Hierbei kann unter anderem auf ein Cre-exprimierendes Adenovirus zurückgegriffen werden. Der Einsatz von viralen Vektoren ist ein häufiges Herangehen (Anton & Graham, 1995; Sheahan, Bellamy, Dunbar, Harrison, & Prost, 2007).

Eine Methode, speziell Hepatozyten genetisch zu verändern, ist die hydrodynamische Schwanzveneninjektion, die eine Transfektion von Leberzellen *in vivo* erlaubt. Hierbei erfolgt die zügige Injektion eines im Vergleich zum Körpergewicht der Maus großen Volumens (Volumen entspricht 10 % des Körpergewichts) über die Schwanzvenen. Durch das Ausmaß des Injektionsvolumens findet übergangsweise ein Rückwärtsversagen des Herzens statt, wodurch ein Volumenrückstau über die *Vena cava inferior* bis in die Lebervenen erfolgt. Aufgrund des Rückstaus kann eine Transfektion der Hepatozyten erfolgen.

Zur spezifischen Einbringung einer aktivierbaren Cre-Rekombinase in Hepatozyten wurde ein Vektorplasmid mit einer Östrogenrezeptor (ER)-gekoppelten Cre-Rekombinase unter

Kontrolle eines modifizierten ApoE-Promotors (pTA-CreER) verwendet (Ehmer et al., 2014). Das verwendete Transposon-System mit der sleeping beauty Transposase gewährleistet eine Integration des Konstruktes in das Wirtsgenom und eine damit verbundene effektive Transfektion der Leberzellen. Die *Sleeping Beauty (SB)* Transposase ist ein synthetisches Transposon, das basierend auf Sequenzen transpositionell inaktiver Elemente konstruiert wurde (Ivics & Izsvak, 2015). Sie interagiert mit Erkennungssequenzen am jeweiligen Ende der DNA-Sequenz, schneidet diese aus und integriert sie an einer neuen Stelle im Genom. Diese kann im Selben, aber auch in einem anderen DNA-Molekül liegen. Die Insertion erfolgt an spezifischen Erkennungssequenzen, sogenannten TA-Dinukleotiden, die im Genom weit verbreitet sind (Ivics & Izsvak, 2015). In den Versuchen zu dieser Arbeit wird die *hyperactive sleepy beauty transposase 5 (HSB5)* verwendet, um eine Integration der ApoE-CreER-Gensequenz in das Hepatozyten-Genom zu erreichen.

1.4.4 CCC- und HCC-Mausmodelle

Für die Analyse hepatischer Tumoren im Mausmodell stehen verschiedene genetische Modelle zur Verfügung. Abhängig von den genetischen Veränderungen kommt es zu der Entwicklung von CCCs oder HCCs, während innerhalb einiger Modelle sowohl HCCs als auch CCCs, teilweise sogar innerhalb eines Versuchstiers, entstehen. In vielen der heutzutage bekannten CCC-Mausmodellen wird zur Sicherung der Gewebespezifität ein Albumin-Promotor verwendet. Dieser gewährleistet zuverlässig die Leberspezifität. Häufig kommt es aber zur Entwicklung von HCCs und CCC innerhalb desselben Modells (Y. Zhu & Kwong, 2020). Als mögliche Erklärung geben Y. Zhu und Kwong (2020) die Expression von Albumin in Hepatozyten und in Cholangiozyten sowie auch in Hepatoblasten an. Die im folgenden beschriebenen Mausmodelle wurden Großteils durch Anwendung des zuvor bereits beschriebenen Cre/lox-over in P1 Systems generiert. Als Promotor für reine CCC-Mausmodelle kommen beispielsweise CK19 (Kreatinkinase 19) oder SOX9 (SRX-Box Transcription Factor 9) in Betracht. Beide Proteine werden in der Leber vorherrschend in Cholangiozyten exprimiert (Y. Zhu & Kwong, 2020). Der durch Verwendung verschiedener Promotoren zu erwartende Unterschied konnte anhand eines Mausmodelles mit onkogenem *Kras* und Knock-out des Tumorsuppressorgens *Tp53* gezeigt werden. Unter Verwendung eines *Albumin*-Promotors entwickelten sich gleichermaßen HCCs wie CCCs, wohingegen unter SOX9 nahezu nur CCCs entstanden. In weiteren Mausmodellen mit CK19 als Promotor konnten bei einem *Knock-out* von *Tp53* sowie in einem Mausmodell mit onkogenem *Kras* und *Knock-out* von *Pten* (Phosphatase and Tensin homolog) ausschließlich CCCs detektiert werden. *Pten* fungiert als Tumorsuppressor und ist an der Regulation des PI3K/AKT-Signalweges beteiligt (Y. Zhu & Kwong, 2020). Nicht nur die Art des Promotors scheint für die Tumorentstehung und Art der Differenzierung von Bedeutung zu sein. In einem Modell mit

Verwendung von AlbCre und onkogenem *Kras* sowie *Knock-out* von *Pten* wurde die Tumorformation durch eine Tamoxifeninjektion initiiert. Erfolgte die Injektion bereits nach zehn Tagen, entwickelten sich ausschließlich CCCs. Eine Tamoxifeninjektion nach 56 Tagen hingegen hatte zur Folge, dass nur HCCs detektiert werden konnten. Als Unterschied konnte eine unterschiedliche Transfektion durch Tamoxifen nachgewiesen werden. Bei einer Tamoxifeninjektion nach zehn Tagen erfolgte eine Transfektion von Hepatozyten und Cholangiozyten, wohingegen nach 56 Tagen nur Hepatozyten transfiziert werden konnten (Ikenoue et al., 2016). Dies legt nahe, dass besonders Cholangiozyten in diesem Modell als Ursprungszellen für CCCs fungieren. Dieser Theorie entgegenstehend konnte in einem Mausmodell mit erfolgtem *Knock-out* von *Pten* und *Tgfbr2* (transforming growth factor beta receptor 2) unter Verwendung des Hepatozyten-spezifischen Promotors *Tbg* (thyroxine-binding globulin) ausschließlich CCCs nachgewiesen werden (Mu et al., 2016). Dies zeigt auf, dass auch Hepatozyten als mögliche Ursprungszellen von CCCs in Betracht kommen. Wie bereits zuvor beschrieben, können somit wahrscheinlich mehrere Zelltypen als Ursprungszellen von CCCs fungieren. Daneben scheint die Tumordifferenzierung Richtung CCC und HCC von den spezifischen genetischen Veränderungen abzuhängen. Neben der Wahl des Promotors ist vor allem auch die Art beziehungsweise der Ort der genetischen Manipulation ausschlaggebend. In sogenannten HTVI (hydrodynamic tail vein injection) Mausmodellen, bei denen ausschließlich Hepatozyten transfiziert werden, konnten mit aktiviertem AKT in Verbindung mit *Yap1* ausschließlich CCCs beobachtet werden (Yamada et al., 2015; Yamamoto et al., 2017). Im Gegensatz dazu folgte auf eine Kombination von aktiviertem *Akt* mit *Nras* oder *Myc* zum Teil HCCs und CCCs sowie ausschließlich CCCs (Ho et al., 2012; Yamamoto et al., 2017). Als weitere CCC-Mausmodelle stehen *Pten-knock-out* in Kombination mit *Tgfbr2*-Mutationen zur Verfügung. Diese Kombination führte zusammen mit verschiedenen Promotoren wie *CK19*, *Albumin* oder *Prom1* (prominin 1) sowie mit *Tbg* einzig zu CCCs (Mu et al., 2016). Lediglich in einer Studie mit Verwendung eines AlbCre-Promotors konnten neben CCCs auch HCCs detektiert werden (Y. Zhu & Kwong, 2020). Zusammenfassend stehen zur Analyse von Malignomen der Leber somit einige verschiedene genetische Mausmodelle zur Verfügung. Die Varianz der Modelle erlaubt eine sowohl spezifische und auch breitere Untersuchung der verschiedenen Karzinomentitäten. Außerdem ist durch die breite Verwendung verschiedener Tumorsuppressorgene und Signalwege eine tiefere Analyse möglicher Mechanismen der Leberkarzinomentstehung möglich.

1.4.5 $Rb^{lox/lox};p53^{lox/lox};Kras^{LSL-G12D/+}$ (RPK)-Mausmodell

In den Versuchen für diese Arbeit wurde das bereits bei früheren Untersuchungen etablierte $Rb^{lox/lox};p53^{lox/lox};Kras^{LSL-G12D/+}$ -Mausmodell (RPK) als Grundlage verwendet. Es handelt sich dabei um ein CCC-Mausmodell. Dieses Modell wurde mit Hilfe der zuvor beschriebenen Methoden zur Insertion und Deletion von verschiedenen Genen entwickelt. Bei den Genen *Rb* und *p53* handelt es sich jeweils um bekannte Tumorsuppressorgene. Sowie bei *Rb* wie auch bei *p53* ist jeweils ein Exon durch loxP-Stellen (bezeichnet durch $^{lox/lox}$) eingegrenzt. Durch den Einsatz einer Cre-Rekombinase (Abbildung 3) ist eine Rekombination und damit eine Deletion des betroffenen Gens möglich (McLellan et al., 2017). Bei *Kras* handelt es sich, wie bereits zuvor geschildert, um ein Protoonkogen. Hier kommt es durch die Verwendung einer Cre-Rekombinase zur Expression von konstitutiv aktivem *Kras*. Dies wird durch die Verwendung einer vorgesetzten LoxP-stop-loxP Sequenz (LSL-Kassette) erreicht. Durch den Einsatz der Cre-Rekombinase erfolgt hier die Deletion der Stop-Sequenz und damit die Expression des onkogenen KRAS. Hierbei handelt es sich um eine heterozygote Mutation. Einerseits, da vor der Rekombination kein Ablesen des KRAS-Genes stattfindet und andererseits, da das Vorhandensein einer funktionierenden Wildtyp Kopie notwendig zum Überleben ist (Doyle et al., 2012; Jackson et al., 2001; Krasinskas, Moser, Saka, Adsay, & Chiosea, 2013).

Wie bereits zuvor beschrieben, erfolgt die gewebsspezifische Expression einer induzierbaren Cre-Rekombinase (CreER) unter Kontrolle des Albumin-Promotors (Alb^{CreER}) und die gezielte Rekombination zu einem definierten Zeitpunkt durch Injektion von Tamoxifen (Feil et al., 1996; Kim et al., 2018). Eine weitere durchgeführte Versuchsvariante besteht aus einer Versuchstierpopulation ohne genetisch exprimierte Cre-Rekombinase. In diesem Modell erfolgt die Expression einer Cre-Rekombinase durch Transfektion der Hepatozyten mit einem CreER-Plasmid mittels hydrodynamischer Schwanzveneninjektion. Dabei erfolgt eine genomische Integration der Cre-Rekombinase durch Kombination mit einem bereits etablierten pc-HSB5-Plasmid-Konstrukt, welches aufgrund katalysierender Eigenschaften eine stabile Rekombination gewährleistet. Anders als bei der zuvor beschriebenen Durchführung erfolgt hier die Expression unter Kontrolle eines modifizierten leberspezifischen ApoE-Promotors (ApoE.HCR.hAAT) (Ehmer et al., 2014; Hubner et al., 2018).

Um eine erfolgreiche Rekombination in den Hepatozyten nach Injektion detektieren zu können, wurden Tiere mit einem fluoreszierenden YFP-Reporter gen unter Kontrolle des *Rosa26*-Genlokus verwendet. Die Expression erfolgt nach Deletion einer vorgeschalteten LSL-Kassette nach gleichem Prinzip wie die bereits beschriebene Expression von onkogenem *Kras*. Nach erfolgreicher Aktivierung der Cre-Rekombinase und nachfolgender Rekombination konnte YFP durch eine Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch detektiert werden (Ehmer et al., 2014).

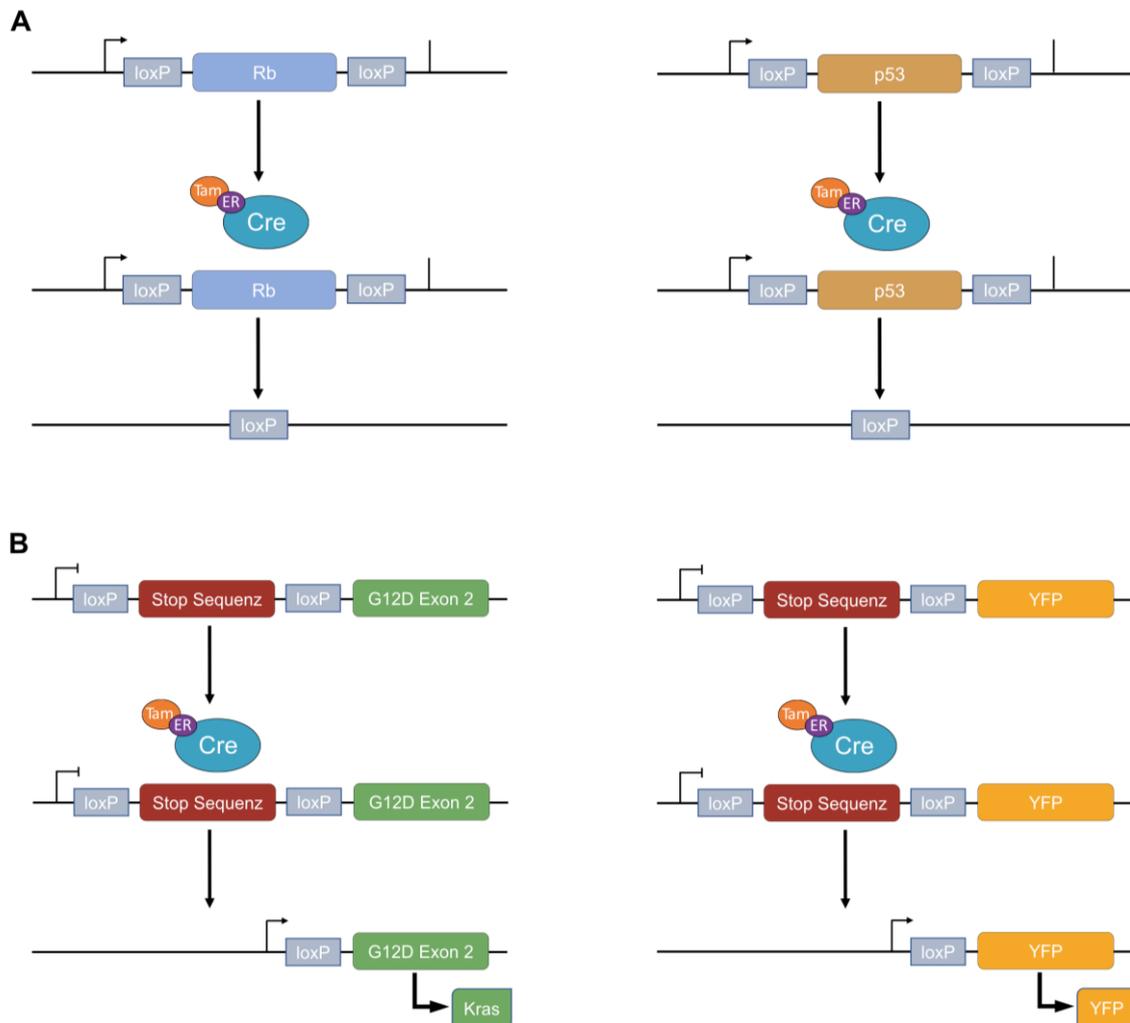


Abbildung 3: Veranschaulichung des verwendeten Cre/LoxP Rekombinationssystems

(A) Darstellung des LoxP Rekombinationssystems für die Tumorsuppressorgene *Rb* und *p53* ($Rb^{lox/lox};p53^{lox/lox}$)

(B) Darstellung des LoxP Rekombinationssystems unter Verwendung von Stop Kassetten zur Aktivierung von onkogenem *Kras*^{LSL-G12D/4} und YFP (*Rosa26*^{LSL-YFP})

Die schematische Darstellung des Rekombinationssystems stellt jeweils exemplarisch ein Exon des betroffenen Gens dar.

1.4.6 *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Rosa26^{LSL-YFP}*- Mausmodell

Aufbauend auf das zuvor beschriebene bereits etablierte Mausmodell wurde für die durchgeführten Versuche mit dem *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Rosa26^{LSL-YFP}*-Mausmodell (*MEK1/2*-Mausmodell) ein weiteres Modell etabliert. Zusätzlich zur Deletion der Gene *Rb* und *p53* sowie der Expression von onkogenem *Kras* liegt hier durch Anwendung der Cre/LoxP-Systems eine Deletion des *Map2k1*-Gens vor. Des Weiteren ist in diesem Mausmodell ein konstitutiver *Knock-out* des *Map2k2*-Gens erfolgt. Die Manipulation dieser beiden

Genbereiche sorgt für eine Beeinflussung der Aktivität des MEK/ERK-Signalweges. Durch die Deletion beziehungsweise des *Knock-outs* erfolgt eine Inaktivierung der Signalkaskade.

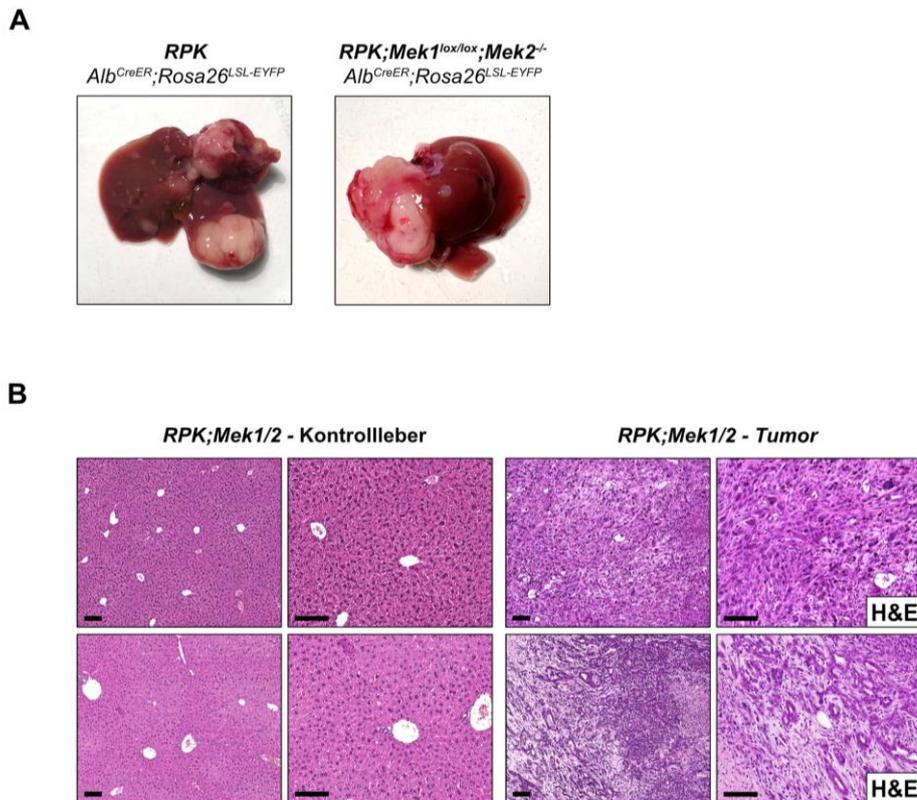


Abbildung 4: Repräsentative Tumore in RPK-Versuchstieren

- (A) Repräsentative makroskopische Tumore in RPK-Versuchstieren: RPK- Versuchstier (links); *Mek1/2*-defizientes Versuchstier (rechts).
- (B) Repräsentative histopathologische Färbungen mit Hämatoxylin/Eosin (H&E) von Lebergewebe von *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2};Rosa26^{LSL-YFP}* Kontrolltieren und Tumorgewebe von *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2};Rosa26^{LSL-YFP}* Versuchstieren. Maßstab 100 µm.

1.5 Versuchsaufbau *in vivo*

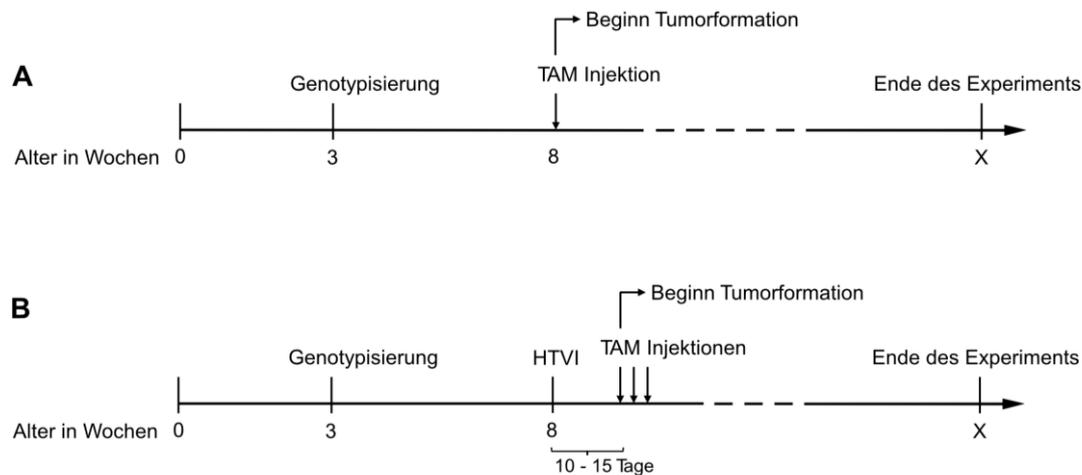


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung

(A) Versuchsablauf bei Versuchstieren mit *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Rosa26^{LSL-YFP}*-Genotyp

(B) Versuchsablauf bei Versuchstieren mit *RPK; Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};AlbCre^{ERT2};Rosa26^{LSL-YFP}*-Genotyp

1.5.1 Induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Albumin-Promotors (*Alb^{CreER}*)

Dieser Versuchsaufbau wird bei Versuchstieren mit *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2}*-Genotyp und Kontrolltieren mit *RPK;Alb^{CreERT2}*-Genotyp verwendet. Hier liegt die Cre-Rekombinase gekoppelt an einen Östrogenrezeptor (ER) durch Integration in das Genom bereits in den Hepatozyten vor. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des leberspezifischen Albumin-Promotors. Durch die einmalige intraperitoneale Injektion von 1 µg Tamoxifen, einem Östrogenrezeptormodulator, erfolgt die Expression der Cre-Rekombinase. Dadurch kommt es zur Deletion der „geflochten“ Gene (*Rb^{lox/lox}, p53^{lox/lox}, Mek1^{lox/lox}*) beziehungsweise durch die Verwendung einer LSL-Kassette bedingten Expression von konstitutiv aktivem Kras (McLellan et al., 2017). Eine Injektion der Versuchs- und Kontrolltiere mit Tamoxifen erfolgt nach Erreichen eines Alters von acht Wochen. Dieser Versuchsaufbau ist in Abbildung 5 A dargestellt.

1.5.2 Hepatische Expression einer induzierbaren Cre-Rekombinase durch Hepatozyten-Transfektion mittels hydrodynamischer Schwanzveneninjektion

Bei diesem Versuchsaufbau werden Versuchstiere des *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-}*-Genotyps und Kontrolltiere mit *RPK*-Genotyp verwendet. Auch hier erfolgt die Aktivierung mit Hilfe einer intraperitonealen Tamoxifeninjektion. Zuvor ist jedoch die Injektion eines Plasmids mittels hydrodynamischer Schwanzveneninjektion (HTVI) notwendig. Es handelt sich um ein Plasmid mit einer ER-gekoppelten Cre-Rekombinase (mit Sleeping Beauty Transposase), in diesem Fall unter Kontrolle eines modifizierten ApoE-Promotors (pTA-CreER). Um dabei eine stabile Rekombination zu erhalten, ist 10-15 Tage später die Durchführung einer Tamoxifeninjektion (1 mg intraperitoneal) an drei aufeinanderfolgenden Tagen erforderlich (Hubner et al., 2018). Auch in diesem Versuchsaufbau beginnt die Versuchsdurchführung für die Versuchs- und Kontrolltiere, hier mit der HTVI, im Alter von acht Wochen. Der genaue Ablauf ist in Abbildung 5 B schematisch dargestellt.

Bei beiden Versuchsvarianten erfolgt die Analyse nach stattgefundener Tumorformation. Somit kann die Tumorentwicklung und -ausbreitung sowie eine mögliche Metastasen Entwicklung beobachten werden.

1.6 Versuchsaufbau *in vitro*

1.6.1 Behandlung von RPK-Tumorzelllinien mit dem MEK1/2-Inhibitor PD0325901

Nach Abschluss der durchgeführten *in vivo*-Tierversuche erfolgte zur weiteren Analyse und zur Generierung von funktionellen Daten die Durchführung eines *in vitro* Zellkulturversuches. Für die Versuchsdurchführung erfolgte die Kultivierung von vier verschiedenen, aus Tumoren des *RPK*-Mausmodells gewonnenen Zelllinien. Alle Zelllinien wurden mit dem MEK1/2-Inhibitor PD0325901 behandelt.

1.7 Problemstellung

In den letzten Jahren konnten in vielen Bereichen der Tumorforschung zahlreiche Fortschritte erreicht werden: genauere Erkenntnisse über den Ablauf der Malignomentstehung und -entwicklung zeigten neue therapeutische Ansatzpunkte auf und erlaubten die Entwicklung und Testung neuer Medikamente. Dadurch konnten die Therapien einiger Malignome deutlich verbessert und somit erfreulicherweise häufig auch die Mortalität gesenkt werden. Allerdings ist bezüglich der Entstehung von Karzinomen in der Leber über den detaillierten Ablauf der Karzinogenese bisher noch zu wenig bekannt. Mit den dieser Arbeit

zugrundeliegenden Versuchen sollen die molekularen Mechanismen der hepatischen Karzinogenese genauer analysiert werden, um für eine mögliche spätere Therapieentwicklung grundlegende Erkenntnisse zu gewinnen.

Um für zukünftige Therapien eine mögliche Angriffsstelle zu detektieren, erfolgt durch die Versuche dieser Arbeit eine gezielte Untersuchung des MEK/ERK-Signalweges. Aufgrund der bereits vorliegenden Forschungsdaten bezüglich des MEK/ERK-Signalweges in der hepatischen Karzinogenese könnte bei *Mek1/2*-Deletion eine veränderte oder auch reduzierte Tumorentwicklung möglich sein. Anhand der Überlebensraten in der Versuchstier- und der Kontrolltiergruppe erfolgt die Analyse der Ausprägung und Geschwindigkeit einer möglichen Tumorentwicklung. Bei Bestätigung eines verminderten karzinogenen Charakters bei *Mek1/2*-Deletion, könnte auch ein Einfluss auf Metastasierungsverhalten vorliegen. Daher wurden auch Lungen- sowie Peritonealmetastasen der Gruppen analysiert. Tumore, die trotz vorliegender *Mek1/2*-Deletion entstanden wurden histologisch untersucht, um den Einfluss des MEK/ERK-Signalweges auf die Art der Differenzierung festzustellen. Da es bei ausgeschaltetem MEK/ERK-Signalweg zur Tumorentwicklung kam, müssen weitere, die Karzinogenese fördernde, Signalwege zugrunde liegen oder andere Signalwege zumindest an der Entstehung beteiligt sein. Um für einen späteren Zeitpunkt eine gezielte und effektive Therapie entwickeln zu können, war die differenzierte Darstellung weiterer relevanter Signalwege von großer Bedeutung.

Diese einzelnen Betrachtungen sollen zusammengenommen eine Schlussbewertung der Relevanz des MEK/ERK-Signalweges für die hepatische Karzinogenese erlauben.

2 Material

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien für die durchgeführten Versuche

Reagenz	Hersteller
2-Log DNA ladder (0.1–10.0 kb)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH, München
Antigen Unmasking Solution (citrat-basiert)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Complete Tabletten (EDTA-freier Protease-Inhibitor)	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Direct-PCR Lysepuffer	Viagen Biotech, Inc., Los Angeles, CA, USA
Ear lysis buffer	Viagen Biotech, Inc., Los Angeles, CA, USA
Eosin	Waldeck GmbH, Münster
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (80 %), vergällt	Brüggemann Alcohol GmbH, Heilbronn
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glycerol Rotipuran®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Reagenz	Hersteller
Glycin Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Goat Serum G9663	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
GREENTaq® ReadyMix™ PCR reaction mix	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Hämalaun nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
HCl (Chlorwasserstoff)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO USA
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isotonische Kochsalzlösung (NaCl) 0,9 %, steril	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO USA
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Miglyol®812	CH.-B-1906005 Caesar&Loretz GmbH, Hilden
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Nonidet® P40 (NP40)	AppliChem GmbH, Darmstadt
PD0325901 (Mirdametinib)	Selleck Chemicals, Houston, TX, USA
Pertex Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf
Phosphataseinhibitor mix I	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
REDTaq® ReadyMix™ PCR reaction mix	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Roti® Histol (HistoClear)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Histofix 4 % (phosphat-gepufferte Formalinlösung)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS Pellets (Natriumdodecylsulfat),	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
SYBR®-Green MasterMix Power	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO USA
TEMED (Tetramethylethylen-diamin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Reagenz	Hersteller
TE-Puffer, pH 8,0	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-HCl Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trockenmilchpulver	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tween® 20	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO USA
Vectashield Eindeckmedium	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Wasserstoffperoxid 30 % Rotipuran®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 2: Für die durchgeführten Versuche verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
8er-Softstrips (0,2 ml) (PCR-Tubes)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim; Eppendorf AG, Hamburg
Chirurgische Einmalskalpelle	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
CL-XPosure™ Filme	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Conical Tubes, 15 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Einbettkassetten	Medite GmbH, Burgdorf
Kanülen braun/grau steril	B. Braun SE, Melsungen
Messpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
MicroAmp® optical 96-well reaction plate	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
Microtom-Klingen S35 and C35	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Nitrozellulosemembran Immobilon®	Milipore, Merck KGaA, Darmstadt
Objektträger Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen safe seal professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Spritzen Omnifix®, 3 ml, steril	B. Braun SE Melsungen
Whatman Papier, 3 mm	GE Healthcare Europe GmbH, München

Tabelle 3: Kommerziell erhältliche Kits

Kit	Hersteller
Avidin/Biotin blocking Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Nextera XT DNA Library Preparation Kit	Illumina, Inc., San Diego, CA
DAB (3,3'-diaminobenzidine) Substrat Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
ProtoScript® First Strand cDNA Synthese Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Maxwell® 16 LEV simplyRNA Kit	Promega GmbH, Mannheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase (Standard)	VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.2 Antikörper, Enzyme und Plasmide

Tabelle 4: Für histologische Färbungen und Western Blot verwendete Primärantikörper

Antikörper	Hersteller/Herkunft
Akt (pan) (C67E7), #4691	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
α -Tubulin Antibody, #2144	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Anti- β -Catenin (Purified mouse)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-GFP, chicken IgY fraction, unconj.	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
GFP Tag Polyclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Hsp90 α/β (f-8), sc-13119	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
Ki67	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2), #9102	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP®, #4060	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Phospho-Akt (Ser473), #9271	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E), #2965	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XPC, #4370	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Tabelle 5: Für histologische Färbungen und Western Blot verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller/Herkunft
Alexa Fluor® 555 Donkey anti-goat IgG(H+L)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 Goat anti-rat IgG(H+L)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
AlexaFluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
AlexaFluor® 555 Goat anti-Mouse IgG	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
AlexaFluor® 555 Goat anti-Rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Biotinylated Goat anti-Mouse IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Biotinylated Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

Tabelle 6: Plasmide

Plasmid	Hersteller/Herkunft
pTC (ApoE.HCR.hAAT)	Ehmer et al. 2014

Tabelle 7: Für die durchgeführten Analysen verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
GREENTaq® DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO USA
Maxima RT Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA,
Proteinase K, recombinant, PCR grade	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
REDTaq® DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Recombinant M-MuLV reverse transcriptase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
PhotoScript II Enzyme Mix (10 X)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

2.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer (pH 8,0)	10 mM Tris
	5 mM EDTA
	0,5 % SDS
	0,4 M NaCl
	mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen
Protein Ladungspuffer (Laemmli), pH 6,8, 50fach	10 % SDS
	50 % Glycerol
	228 mM TrisHCl
	0,75 mM Bromphenolblau
	5 % 2-MercaptoEtOH
TAE-Puffer, pH 8,5, 50fach	2 M Tris
	50 mM EDTA
	5,71 % Essigsäure
TE-Puffer	10 mM Tris
	1 mM EDTA
	mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
TENSV Lysepuffer, pH 7,9	50 mM HEPES
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0.5 % Nonidet P40
	10 % Glycerol

Puffer	Zusammensetzung
	Phosphataseinhibitor (vor Gebrauch hinzugeben)
	25 mM Tris
Western Blot Laufpuffer	192 mM Glycin
	0.1 % SDS
Western Blot Sammelgelpuffer, pH 6,8	1.5 M TrisHCl
	25 mM Tris
Western Blot Transferpuffer	192 mM Glycin
	20 % Methanol
Western Blot Trenngelpuffer, pH 8,8	0.5 M TrisHCl

Tabelle 9: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung

Lösung	Zusammensetzung
Agarose-Gel 2 %	3 g Agarose gelöst in 150 ml TAE 1fach
	5 % Goat Serum
Blockinglösung IF	1 % BSA gelöst in PBS
	5 % Goat Serum
Blockinglösung IHC	10 % Avidin gelöst in PBS
Blockinglösung Western Blot	5 % Skim Milk gelöst in TBS

Lösung	Zusammensetzung
PBS 10fach	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ mit HCl einstellen auf pH 7,4 mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
PBS-T (0,2 %)	100 ml PBS 10fach 900 ml ddH ₂ O 2 ml TWEEN
Strippinglösung	25 mM Glycin- HCl pH 2,0 1 % SDS
TBS 10fach	87,66 g NaCl 4,24 g TRIS 26 g TRIS-HCl mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
TBS-T (0,2 %)	100 ml TBS 10fach 900 ml ddH ₂ O 2 ml TWEEN

2.4 Zellkultur Medien und Reagenzien

Tabelle 10: Reagenzien für Zellkultur

Reagenzien	Hersteller/Herkunft
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
MTT reagent	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Penicillin (10000 units/mL) / Streptomycin (10000 µg/mL) solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
0.25% Trypsin-EDTA (1x), phenol red	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 11: Für die Zellkultur verwendete Medien und ihre Zusammensetzung

Zellkultur Medium	Zusammensetzung
Zellkulturmedium	DMEM
	10 % FCS
	1 % Penicillin/Streptomycin
Freezing-Medium	DMEM
	10 % FCS
	1 % Penicillin/Streptomycin
	10 % DMSO

2.5 Geräte und Programme

Tabelle 12: Für die Durchführung der Versuche verwendete technische Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage ABS-N/ABJ-NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Autoklav 2549 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
AxioCam HRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
EcoVac Vakuumpumpe	schuett-biotec GmbH, Göttingen
Einschweißgerät Folio FS 3602	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern
Filmkassetten	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg
Forma™ 900 Series Upright Ultra-Low Temperature Freezers	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA,
Gel docs XR+ Dokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasware, Schott Duran®	Schott AG, Mainz
Homogenizer SilentCrusher M	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
Incubator B6120	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Infrarotlampe IL11	Beurer GmbH, Ulm
Laborwaage, 2,5 kg	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Magnetrührer, Ikamag® RCT	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mastercycler™ Nexus Thermal Cycler	Eppendorf AG, Hamburg
Maxwell® 16 Instrument	Promega GmbH, Mannheim
Microplate reader Anthos 2001	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
Microtome Microm HM355	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Microtome Microm HM355S	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Mikroskop Axio Imager A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen

Gerät	Hersteller
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop DM LB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskopkamera AxioCam MRm	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrowelle R-631	SHARP business systems Deutschland
Mini Zentrifuge Spectrafuge C1301-b, 230	Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiskan FC Version 1.00.96	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
MR 2002 Heizplatt/Magnetprüher	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
NextSeq 500	Illumina, Inc., San Diego, CA, USA
Owl™ EasyCast™ B2 Minigel- Elektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Paraffin-Wasserbad Microm SB80	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
pH-Meter 521	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Pipetten Reference®, Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG,
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
Schüttler DRS-12	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Spectrophotometer NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
StepOnePlus™ real time PCR system	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Tissue processor ASP 300	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Gerät	Hersteller
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5702 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 13: Zur Analyse und Auswertung der Ergebnisse verwendete Programme

Programm	Herkunft
Aperio Image Scope	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Affinity Designer	Serif (Europe) Ltd, Nottingham, UK
AxioVision 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen
DESeq2 v1.18.1	Bioconductor
Dropseq tool v1.12	McCarroll Lab, Department of Genetics, Harvard Medical School, MA, USA
GraphPad Prism 5	La Jolla, CA, USA
ImageJ	Wayne Rasband, Public Domain
MS Office	Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA
StepOne™ v2.3	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA

3 Methodik

In den nachfolgenden Abschnitten werden die zur Probengewinnung und Analyse eingesetzten Methoden und Reagenzien sowie verwendete Geräte und Programme besprochen.

3.1 Tierhaltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte nach vorgeschriebener deutscher Tierschutz-Versuchstierverordnung unter vorgegebenen Hygienebedingungen. Die in diesen Versuchen verwendeten Versuchstiere wurden in der Versuchstierhaltung des Zentrums für präklinische Forschung (ZPF) am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gehalten. In dieser Versuchstierhaltung werden alle verwendeten Materialien vor Einbringung in den Versuchsbereich physikalisch oder chemisch desinfiziert. Außerdem besteht eine individuelle Käfigbelüftung. Dies stellt eine spezifisch pathogenfreie Tierhaltung (SPF-Haltung) sicher. Des Weiteren erfolgt ein regelmäßiges Hygienemonitoring durch die Tierpfleger/innen. Es wurden ausschließlich männliche Versuchs- und Kontrolltiere verwendet.

3.2 Mauslinien

Die in den Versuchen eingesetzten Mauslinien besitzen einen gemischt genetischen Hintergrund. Gezielte Genmutationen sind durch Verwendung des Cre/LoxP-Systems erreicht worden. Gemeinsame genetische Grundlage der eingesetzten Mauslinien bildet das bereits zuvor etablierte *RPK*-Mausmodell. Durch Verpaarungen der Mauslinien *Mek1^{lox/lox}*, *Map2k2^{-/-}*, *Pdk1^{lox/lox}*, *Alb^{CreER}* und *Rosa26^{LSL-YFP}* mit *RPK*-Versuchstieren konnten die zugrundeliegenden Mauslinien erzeugt werden.

Mek1^{lox/lox} ist eine Mauslinie in der das Exon 2 des *Map2k1*-Gens mit Einsatz des Cre/LoxP-Systems mit *loxP*-Stellen flankiert wurde und durch eine Cre-Expression eine konditionale Deletion erfolgt.

Map2k2^{-/-} bezeichnet eine Mauslinie, in der ein konstitutiver *Knock-out* des *Map2k2*-Genbereiches vorliegt. Dieser Genlocus kodiert für MEK2. Ein *Knock-out* kann unter regulären Bedingungen durch das MEK1-Protein ausgeglichen werden. Somit sind durch den *Knock-out* von *Map2k2* keine phänotypischen Auffälligkeiten zu erwarten.

Die Mauslinie *Pdk1^{lox/lox}* beschreibt eine Mauslinie in der durch Einsatz des Cre-LoxP-Systems eine konditionale Deletion von *Pdk1* erzeugt wurde. Hierbei erfolgt eine Flankierung der Exone 3 und 4 des Genlocus durch *loxP*-Stellen und Deletion nach Cre-Expression.

Alb^{CreER} bezeichnet eine Mauslinie in der eine mit einem Östrogenrezeptor gekoppelte Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines Albumin-Promotors exprimiert wird. Durch

Tamoxifeninjektion oder Gabe kann hier eine hepatozytenspezifische Expression der Cre-Rekombinase erreicht werden.

Bei der Mauslinie *Rosa26^{LSL-YFP}* handelt es sich um eine Mauslinie mit einem *Knock-in* eines Gens, welches für das gelb-fluoreszierende Protein (YFP, yellow fluorescent protein) kodiert. Vorgeschaltet ist eine stummgeschaltende *LSL*-Kassette welche eine Expression des YFP erst nach Deletion bei Cre-Aktivierung sicherstellt. *Rosa26^{LSL-YFP}* fungiert allgemein als Reporter-Gen.

Tabelle 14: Mauslinien

Bezeichnung	Genotyp
RPK	<i>Rb^{lox/lox},p53^{lox/lox},Kras^{LSL-G12D/+};Rosa26^{LSL-YFP}</i>
RPK AlbCreER	<i>Rb^{lox/lox},p53^{lox/lox},Kras^{LSL-G12D/+},Alb^{CreERT2};Rosa26^{LSL-YFP}</i>
RPK Mek1/2	<i>Rb^{lox/lox},p53^{lox/lox},Kras^{LSL-G12D/+},Mek1^{lox/lox},Map2k2^{-/-};Rosa26^{LSL-YFP}</i>
RPK Mek1/2 AlbCreER	<i>Rb^{lox/lox},p53^{lox/lox},Kras^{LSL-G12D/+},Mek1^{lox/lox},Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2},Rosa26^{LSL-YFP}</i>
RPK Pdk1	<i>Rb^{lox/lox},p53^{lox/lox},Kras^{LSL-G12D/+},Pdk1^{lox/lox};Rosa26^{LSL-YFP}</i>
RPK Pdk1 AlbCreER	<i>Rb^{lox/lox},p53^{lox/lox},Kras^{LSL-G12D/+},Pdk1^{lox/lox},Alb^{CreERT2},Rosa26^{LSL-YFP}</i>

3.3 Genotypisierung

Für jedes Versuchstier erfolgt die Genotypisierung anhand des Gewebes, das beim Setzen der Markierungssohrmarken gewonnen wird. Dies erfolgt drei Wochen nach Geburt, gleichzeitig mit der Separierung der Mutter. Für die Genotypisierung mittels PCR (Polymerase chain reaction) wird zunächst eine Extraktion der DNA aus dem Gewebe durchgeführt. Die Ohrstanzen werden über Nacht nach Zugabe von 50 µl „*ear lysis buffer*“ (Viagen Biotech, Los Angeles, USA) und je 0,7 µl Proteinase K bei 55 °C in der PCR-Maschine inkubiert. Nach kurzem Vortexen am nächsten Tag erfolgt eine erneute Inkubation für 90 Minuten bei 85 °C, um die Proteolyse abubrechen. Der dabei im Reaktionsgefäß entstandene Überstand wird für die PCR zur Genotypisierung weiterverwendet.

Nach dem Beenden eines Experiments wird von jedem getöteten Versuchstier 1 cm des Schwanzes als Schwanzspitzenbiopsie entnommen und bei -20 °C konserviert. Anhand dieser Biopsie erfolgt eine erneute Genotypisierung, um mögliche Fehler und Verwechslungen in der Genotypisierung auszuschließen. Die DNA-Extraktion aus Schwanzspitzenbiopsien erfolgt nach dem gleichen Prinzip der Extraktion aus Ohrstanzen. Alleiniger Unterschied ist die Verwendung eines anderen Lysepuffers, der speziell für Schwanzbiopsien („*tail lysis buffer*“)

geeignet ist. Mit der erhaltenen DNA erfolgt eine erneute Durchführung der verschiedenen PCRs. In Tabelle 15 sind die verwendeten Primer und ihre Sequenzen abgebildet.

Tabelle 15: Zur Genotypisierung eingesetzte Primer mit ihren zugehörigen Sequenzen

Gen	Primer Name	Sequenz (5' - 3')
<i>Alb^{CreER}</i>	CreInt Forward	CAATGGTAGGCTCACTCTGG
	CreInt Reverse	AACACACACTGGCAGGACTG
	Cre347	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG
	Cre349	CAGGGTGTTATAAGCAATCCC
<i>LSL-Kras^{G12D}</i>	Kras G12D mut_UP	CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC
	Kras WT UP1	CACCAGCTTCGGCTTCCTATT
	Kras URP Lp1	AGCTAATGGCTCTCAAAGGAATGTA
<i>Mek1^{lox}</i>	MEK1B3	GCGAACTGGGAGCTGGCAACGGTGGAG
	MEK1B2	TGGAGCTGGAGTCACGGGTGGTTGTAA
	MEK1A4	GACGTGGTGAACAGGAAAGGGATTGGG
<i>Map2k2^{-/-}</i>	MEK2 forward	TAACAGAAGGGGAAGGAGAGAGTGG
	MEK2 reverse	CACCCTGGCTGTTCCCTTACACCT
	MEK2 mut reverse	TCGTGGTATCGTTATGCGCC
<i>p53^{lox}</i>	p53 delta forward	CACAAAAACAGGTTAAACCCAG
	p53 lox reverse	AGCACATAGGAGGCAGAGAC
<i>Rb^{lox}</i>	RB lox 5'	CTCTAGATCCTCTCATTCTTCCC
	RB lox 3'	CCTTGACCATAGCCCAGCAC
<i>Rosa26^{LSL-YFP}</i>	R26-univF	AAAGTCGCTCTGAGTTGT TAT
	R26-TVA-GT-SA-mu	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
	R26-wtR	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

3.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Nach abgeschlossener DNA-Extraktion aus den Gewebebiopsien, erfolgt die DNA-Amplifikation anhand der Polymerase Kettenreaktion. Jede Standard PCR besteht aus den gleichen Grundsubstanzen. Diese sind in Tabelle 16 dargestellt. Die bereits fertigen RedTaq® und GreenTaq® Ready Mix™ enthalten unter anderem die für den Ablauf der Reaktion notwendige dNTPs sowie eine *Taq*-Polymerase. Der Ablauf der PCRs erfolgt nach den allgemein bekannten Standardschritten. Die idealen Temperaturen für die verschiedene Punkte sind in Tabelle 17 angegeben. Für jedes Allel werden spezifische Primer in Form eines eigenen Primer-Mixes verwendet.

Tabelle 16: PCR-Reaktionsmix

Reagenz	Volumen in µl
<i>RedTaq® / GreenTaq® Ready Mix™</i>	10
Destilliertes H ₂ O	8
Primer Mix	1
DNA	1
Gesamtvolumen	20

Tabelle 17: PCR-Reaktionstemperaturen

PCR	Größe PCR Produkt	Annealing-Temperatur	Annealing-Zeit [min] pro Zyklus
<i>AlbCreER</i>	Kontrolle 300 bp / mut 400 bp	60 °C	00:30
<i>LSL-Kras^{G12D}</i>	WT 270 bp / mut 170 bp	55 °C	00:45
<i>Mek1^{lox}</i>	WT 470 bp / mut 520 bp	72 °C	00:40
<i>Map2k2^{-/-}</i>	WT 310 bp / mut 190 bp	62 °C	01:00
<i>p53^{lox}</i>	WT 350 bp / mut 450 bp	56 °C	00:45
<i>Rb^{lox}</i>	WT 260 bp / mut 308 bp	56 °C	00:45
<i>Rosa26^{LSL-YFP}</i>	WT 500 bp / mut 250 bp	60 °C	00:30

3.3.2 Agarosegelelektrophorese

Nach vollständiger DNA-Amplifikation erfolgen Auswertung und Analyse der PCR mittels Agarosegelelektrophorese. Für die Herstellung eines Agarosegels (1 %ig) werden 2 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer (1 x) bis zum Kochen erhitzt. Nach langsamer Abkühlung unter Rühren mithilfe eines Magnetrührers werden 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das noch flüssige Gel wird auf eine Platte gegossen und durch das Einsetzen von Kämmen werden beim Aushärten Geltaschen generiert. Nach vollständigem Verfestigen des Agarose Gels werden die Taschen mit 12 µl der DNA-Proben befüllt. Außerdem wird in mindestens eine Geltasche 5 µl eines DNA-Markers (2-Log DNA *ladder*) zur sicheren Größenzuordnung der Banden pipettiert. Durch das Anlegen einer Spannung bis maximal 110 V findet eine elektrophoretische Auftrennung der DNA-Banden nach Größe statt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgt nach Anheftung des Ethidiumbromids und nach Anregung durch UV-Strahlung mit dem Gel docs XR+ Dokumentationssystem.

3.4 Tiermodelle

3.4.1 Hydrodynamische Schwanzvenen Injektion (HTVI)

Ziel der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion ist eine Transfektion der Hepatozyten durch ein Transposonkonstrukt. Es handelt sich um ein Plasmid mit einer ER^{T2}-gekoppelten Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines leberspezifischen Promoters, das von Erkennungssequenzen für die *Sleeping Beauty*-Transposase flankiert ist, und welches zusammen mit einem Expressionsplasmid für die *Sleeping Beauty*-Transposase injiziert wird.

Die HTVI der Versuchstiere wird im Alter von acht bis zehn Wochen durchgeführt. Bei der Injektionslösung handelt es sich um eine Lösung mit 10 µg pTA-Cre und 1 µg pHSB5 je Milliliter. Zur Herstellung der Lösung werden 100 µg pTA-Cre und 10 µg pHSB5 in 10 ml isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) aufgenommen. Die Menge der Injektion erfolgt in Relation zum Körpergewicht der Maus. Dabei handelt es sich mit 10 % des Körpergewichts um ein großes Volumen. So erfolgt bei einer 20 g schweren Maus eine Injektion mit einem Volumen in Höhe von 2 ml und somit 20 µg pTA-Cre und 1 µg pHSB5.

Der Ablauf der hydrodynamischen Schwanzveneninjektion beginnt mit dem Wiegen der Versuchstiere und dem Vorbereiten der korrekten Volumenmenge der Injektionslösung in einer sterilen 3 ml Spritze. Mit Hilfe einer Immobilisationsvorrichtung wird die Maus fixiert und daraufhin der Schwanz unter einer Infrarotlichtlampe für 30 - 45 Sekunden unter kontinuierlicher Kontrolle langsam erwärmt. Die durch die Erwärmung erreichte Dilatation der peripheren Schwanzvenen sorgt für eine erleichterte Injektion. Nach vorheriger Desinfektion erfolgt die intravenöse Injektion des kompletten Volumens mit einer 26 G Kanüle innerhalb von

5-10 Sekunden. Nach erfolgter Injektion wird die Maus aus der Vorrichtung entnommen, die Stelle der Injektion komprimiert und die Maus für weitere 30 Minuten beobachtet.

3.4.2 Tamoxifeninjektion

Durch die hydrodynamische Schwanzveneninjektion (siehe 3.4.1) wird eine Transfektion der Hepatozyten mit stabiler Integration des von Sleeping Beauty-Erkennungssequenzen DNA-Konstrukts in das Hepatozytengenom erreicht. Nach 10 - 15 Tagen ist, die durch die Injektion verursachte, transiente Leberschädigung abgeklungen und eine Aktivierung der Östrogenrezeptor-gekoppelten Cre-Rekombinase durch Tamoxifen möglich, um eine Gendeaktivierung oder -deletion zu erreichen. Tamoxifen, trans-1-(4- β -dimethylaminoethoxyphenyl)-1,2-diphenylbut-1-ene, ist eine oft verwendete Substanz, die an Östrogenrezeptoren bindet und mit diesen interagiert (Shagufta & Ahmad, 2018). Für die Herstellung werden 10 mg Tamoxifen in 40 μ l reinem Ethanol (100 %) für circa 15 Minuten bei 55 °C erwärmt, bis eine vollständige Lösung erreicht ist. Mit Miglyol wird die Lösung daraufhin auf einen Milliliter aufgefüllt, vermischt und für weitere 10 - 15 Minuten bei 55 °C erwärmt. Durch regelmäßiges Vortexen wird ein vollständiges Lösen und eine gleichmäßige Durchmischung gewährleistet. Bei Versuchstieren nach hydrodynamischer Schwanzveneninjektion werden 100 μ l der Tamoxifenlösung in den linken unteren Quadranten des Abdomens injiziert. Es erfolgt somit eine intraperitoneale Injektion einer Tamoxifen Dosis von 1 mg pro Maus. Der Injektion geht eine Desinfektion des Abdomens mit 70 % Ethanol voraus. Es werden hier drei der beschriebenen Injektionen an drei direkt aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. In einem parallelen Versuchsansatz mit Versuchstieren des *AlbCre^{ER}*-Genotypes ist eine einmalige Injektion von 1 μ g zur Induktion einer Genrekombination in Hepatozyten ausreichend. Hier erfolgt die Expression der Cre-Rekombinase unter einem Albumin Promotor. Um die korrekte Dosierung zu erreichen, wird die oben beschriebene Lösung weiter mit Miglyol verdünnt. Auch hier erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 100 μ l pro Versuchstier.

3.4.3 Organentnahme und Aufbereitung der Proben

Sind die vordefinierten Versuchsabbruchkriterien wie zum Beispiel ein bestimmter prozentualer Gewichtsverlust erreicht oder bestehen Anzeichen für Tumorwachstum, werden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet. Vor Beginn der Sektion wird die Körperoberfläche mit Ethanol (70 %) desinfiziert. Die Eröffnung der Bauchhöhle beginnt mit einem medialen Längsschnitt. Nach Eröffnung wird die Bauchhöhle auf mögliche Tumoren oder Metastasen inspiziert. Darauf findet nach Darstellung der *Vena cava inferior* und der Pfortader eine Injektion von circa 1 ml dH₂O oder NaCl über die *Vena cava inferior* und gleichzeitig eine Durchtrennung der Pfortader statt. Damit wird eine retrograde Auswaschung

des vorhandenen Blutes aus der Leber erreicht. Nach Durchtrennung der hepatischen Ligamente ist eine Entnahme der Leber am Leberhilus möglich. Ein Teil des linken lateralen Leberlappens und ein Teil eines gegebenenfalls aufgefundenen und makrodissektierten Tumors werden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zur späteren molekularbiologischen Aufarbeitung konserviert. Der Rest der Leber, der Tumor, ein Teil des Darms, die Lunge und falls vorhanden weitere Gewebeteile mit sichtbaren Metastasen werden für 48 h in 4 % PFA (Paraformaldehyd) aufbewahrt. Nach 48 h wird das PFA durch 70 % Ethanol ersetzt und die Organe werden über Nacht in der Entwässerungsmaschine dehydratisiert. Zur Vorbereitung der Gewebeschnitte werden die Organe in Paraffin eingebettet und tiefgekühlt. Mittels eines Mikrotoms werden 2,5 µm dicke Schnitte erstellt und jeweils zwei aufeinanderfolgende Schnitte auf einem Objektträger für histologische Färbungen aufgebracht.

3.5 Histologische Färbungen

3.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Für die Hämatoxylin-Eosin Färbung werden die Gewebeschnitte auf dem Objektträger zweimal für jeweils 5 Minuten in ROTI®Histol eingetaucht und dadurch von Paraffin befreit. Anschließend erfolgt eine Rehydratisierung der Schnitte durch eine absteigende Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %). Diese wird durch Eintauchen in dH₂O für eine Minute gestoppt. Danach erfolgt die Färbung mit einer Hämalaunlösung nach Mayer. Nach der Auswaschung mit laufendem Leitungswasser für 5 - 10 Minuten werden die Schnitte mit Eosin für 30 - 45 Sekunden gegengefärbt. Abschließend werden die Schnitte für jeweils 25 Sekunden mit Ethanol (96 %) und Isopropanol gewaschen und danach erneut mit ROTI®Histol entparaffiniert. Zu der Fixierung der Färbung folgt eine Abdeckung mit Hilfe von Pertex-Eindeckmedium und eines Deckglases.

3.5.2 Immunfluoreszenz Färbung (IF-Färbung)

Die Entparaffinierung und Rehydratisierung der Gewebeschnitte erfolgt wie bei der bereits beschriebenen Hämatoxylin-Eosin Färbung. Durch das Erhitzen in einer Citrat-basierten Antigen-*unmasking solution* für 3 Minuten bei maximaler Wärmestufe in einer Mikrowelle und für weitere 16 Minuten bei reduzierter Wattzahl wird eine Antigendemaskierung bei den Gewebeschnitten erreicht. Daraufhin folgt ein dreimaliges Waschen mit PBS-T (phosphatgepufferte Salzlösung, 0,2 % Tween®) für jeweils 10 Minuten, gefolgt von Inkubieren mit einer *Blocking-Lösung*, bestehend aus BSA (1 %) und Goat Serum (5 %) gelöst in PBS-T, für 60 Minuten. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T wird eine Lösung des ersten Antikörpers für zunächst 30 Minuten bei 37 °C und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die

Lösung des Antikörpers erfolgt in der bereits beschriebenen *Blocking*-Lösung. Exakte Bezeichnungen und angewendete Verdünnungen sind in Tabelle 18 aufgeführt. Der zweite Gewebeschnitt auf dem Objektträger wird mit *Blocking*-Lösung ohne Antikörper als Negativkontrolle inkubiert. Der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Zweitantikörper (Tabelle 19) (gelöst in *Blocking*-Lösung) wird nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T (0,2 %) bei Raumtemperatur für eine Stunde auf die Gewebeschnitte gegeben. Anschließend erfolgt ein weiterer dreimaliger Waschgang für je 10 - 20 Minuten. Zum Schutz vor Austrocknung werden die Schnitte mit Hilfe von Vectorshield-Eindeckmedium und einem Deckglas abgedeckt und zusätzlich mit Lack versiegelt. Die Aufbewahrung erfolgt in lichtschützenden Mappen bei 4 °C.

3.5.3 Immunhistochemische Färbung (IHC-Färbung)

Für die immunhistochemische Analyse werden die Gewebeschnitte wie zuvor beschrieben zunächst entparaffiniert, rehydratisiert und antigendemaskiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T 0,2 % für je 5 Minuten erfolgt das Blocken der endogenen Peroxidase mit 3 % H_2O_2 -Lösung. Hierfür wird 1 ml 30 % H_2O_2 -Lösung mit 9 ml dH_2O verdünnt. Es folgt ein weiterer Waschschrift mit dreimaligem Waschen mit PBS-T 0,2 % für jeweils 5 Minuten. Anschließend werden die Gewebeschnitte mit *Blocking*-Lösung (5 % Goat Serum, 10 % Avidin in PBS) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (PBS-T 0,2 %, 3 x 5 Minuten) ist der Gewebeschnitt für den Erstantikörper vorbereitet. Dieser wird mit 5 % Goat Serum, 10 % Biotin, gelöst in PBS, verdünnt und zunächst für 30 Minuten bei 37 °C, darauffolgend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper und ihre Verdünnungen sind in Tabelle 18 aufgelistet. Auf die Inkubation erfolgt nach erneutem Waschen (PBS-T, 3 x 5 Minuten) die Inkubation des biotinylierten Zweitantikörpers (verdünnt mit PBS) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die Konzentrationen der eingesetzten Zweitantikörper sind in Tabelle 19 angegeben. Durch einen erneuten Waschschrift werden auch hier unspezifische Antikörperbindungen gelöst. Darauf folgt eine Inkubation mit ABC-Lösung (Vectastain ABC Kit) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Diese Lösung wird bereits 30 Minuten zuvor hergestellt. Nächste Schritte sind erneutes Waschen mit PBS-T, die Inkubation mit DAB-Lösung unter mikroskopischer Kontrolle, das Abstoppen der Farbreaktion durch dH_2O und Gegenfärben der Schnitte mit Hämatoxylin für circa 2 Sekunden. Nach Klarspülen durch Leitungswasser für 5 - 10 Minuten, erneuter Dehydratisierung und Entparaffinierung durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %) und ROTI®Histol, erfolgt die Sicherung der Schnitte mit Pertex-Eindeckmedium und Deckglas.

Als weitere spezielle immunhistochemische Färbungen werden Färbungen gegen Cytokeratin 19 (CK19) und HepPar1 durchgeführt. Das Anfertigen und die Beurteilung erfolgte durch die Fachärztin für Pathologie PD Dr. med. C. Mogler, Institut für Pathologie am Klinikum rechts

der Isar, München. CK19 ist ein Marker von Cholangiozyten und wird für die Diagnostik einer cholangiozellulären Differenzierung verwendet (Y. Zhu & Kwong, 2020), wohingegen die HepPar1-Färbung zur Verifizierung hepatozellulärer Differenzierung verwendet wird. Der HepPar1-Antikörper gilt als ein sensitiver Marker zur Detektion eines HCCs in immunhistochemischen Färbungen (Z. Fan, van de Rijn, Montgomery, & Rouse, 2003; Y. Zhu & Kwong, 2020).

Tabelle 18 Verwendete Primärantikörper für histologische Färbungen mit angewandeter Verdünnung

Primärantikörper	Verdünnungen IF - Färbung	Verdünnungen IHC - Färbung
Anti-β-Catenin (Purified mouse)		1:1000
GFP Tag Polyclonal Antibody	1:100	
Ki67	1:75	
Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E), #2965		1:200
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XPC, #4370		1:300

Tabelle 19 Verwendete Sekundärantikörper für histologische Färbungen mit angewandeter Verdünnung

Sekundärantikörper	Verdünnungen IF - Färbung	Verdünnungen IHC - Färbung
AlexaFluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG	1:500	
AlexaFluor® 555 Goat anti-Mouse IgG	1:400	
AlexaFluor® 555 Goat anti-Rabbit IgG	1:500	
Biotinylated Goat anti-Mouse IgG (H+L)		1:500
Biotinylated Goat anti-Rabbit IgG (H+L)		1:500

3.6 Proteinnachweis mittels Western Blot

3.6.1 Proteinisolierung

Als Vorbereitung für die Proteinisolierung wird zunächst ein Mastermix aus TENSV-Puffer und Complete® (25 x Protease- und Phosphatase-Inhibitor) hergestellt. Hierzu wird eine Tablette Complete® in 2 ml dH₂O gelöst. Insgesamt wird für jede Probe 1 ml Mastermix benötigt, der sich aus 40 µl Complete® und 960µl TENSV-Puffer zusammensetzt. Für eine Proteinisolierung werden bei -80 °C gelagerte Gewebeproben verwendet und zusammen mit 500 µl des vorbereiteten Mastermixes homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgt mittels des Silent Crusher M. Anschließend wird die Suspension für 20 Minuten auf Eis gekühlt und mit weiteren 500 µl Puffer (TENSV-Complete) aufgefüllt. Danach werden die Proben 10 Minuten lang bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert und ein Teil des dadurch entstandenen Überstandes für die Proteinmessung nach einer 1:10 Verdünnung mit TENSV-Puffer weiterverwendet. Der restliche Überstand wird bei -80 °C sofort tiefgefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wird das Pierce BCA-Protein Assay-Kit verwendet. Zunächst folgt das Ansetzen des Mastermix der *Working Solution*. Je 7 µl Probe werden mit 700 µl *Working Solution* verdünnt und als Triplets mit einem Volumen von 200 µl auf eine 96-well-Platte pipettiert. Außerdem wird zur Messung eine Standardkurve benötigt. Hierfür erfolgt jeweils die Zugabe von 0 µl, 3,5 µl, 7 µl, 10,5 µl, 14 µl, und 17,5 µl zu 700 µl *Working Solution*. Das Pipettieren erfolgt dabei erneut in Form von Triplets eines Volumens von 200 µl auf derselben 96-well-Platte wie diejenige die Proben. Nach Abschluss einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C erfolgt die Messung der Proteinkonzentration bei $\lambda=562$ nm im Multiskan FC.

Der Rest des Überstandes kann direkt weiterverarbeitet werden. Um für alle Proben eine gleiche Proteinkonzentration zu erhalten, werden unterschiedliche Probenvolumina, abhängig von der jeweiligen Proteinkonzentration, mit TENSV-Puffer verdünnt und anschließend 1:5 mit Lämmli-Puffer ergänzt. Abschließend werden die Proben für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen und erneut abzentrifugiert. Fertig aufbereitet werden die Proben bei -20 °C gelagert und können anschließend für einen Western Blot verwendet werden.

3.6.2 Western Blot

Ein Proteinnachweis ist mittels Auftrennung des Proteingemischs durch vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und anschließendem Western-Blot möglich.

Die Auftrennung im Polyacrylamid-Gel erfolgt im Bereich des Sammelgels zunächst bei 30 - 60 V, im Bereich des Trenngels bei einer Spannung von circa 100 V. Die Zusammensetzung

der verschiedenen Polyacrylamid-Gele ist in Tabelle 20 aufgeführt. Durch Anlagerung von SDS (Natriumdodecylsulfat) an die Proteine wird eine weitgehend einheitliche Ladungsdichte hergestellt und eine Auftrennung nach molarer Masse möglich. Der eigentliche Blot erfolgt für weitere zwei Stunden bei 400 mA. Damit wird der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran gewährleistet. Diese wird nach Entfernung aus der Blot Apparatur mit 5 % *Skim Milk* TBS-T (Magermilchpulver in TBS-T gelöst) für eine Stunde inkubiert. Dadurch werden freie Protein-Bindungsstellen, die nicht gezielt von Antikörpern gebunden werden können, blockiert. Nach dem Klarspülen der Membran mit TBS-T (0,2 %) wird eine Erstantikörperlösung (verdünnt mit 5 % BSA in TBS-T) zur Inkubation über Nacht bei 4 °C aufgetragen. Vor Inkubation mit der Zweitantikörperlösung (verdünnt mit 5 % *Skim Milk*) für eine Stunde wird die Membran dreimal mit TBS-T (0,2 %) für je 15 Minuten gewaschen. Für die Aktivierung der Membran nach einem weiteren Waschschrift mit TBS-T (0,2 %) wird eine Chemolumineszenz-Lösung Pierce™ ECL-Lösung oder bei niedrigen Proteinkonzentrationen ECL™ *Prime* aufgetragen und für eine Minute mit Lichtschutz inkubiert.

Tabelle 20: Polyacrylamidgele für Western Blots

Gel	Bestandteile für 2 Gele
Sammelgel (4,8 %)	1,3 ml Tris (1 M, pH 6,8)
	100 µl SDS 10 %
	10 µl APS 10 %
	10 µl TEMED
	6,9 ml dH ₂ O
Trenngel (10 %)	2,5 ml Tris (1.5 M, pH 8,8)
	100 µl SDS 10 %
	100 µl APS 10 %
	15 µl TEMED
	4,0 ml dH ₂ O
	3,3 ml Acrylamid 30 %

Bis zur Detektion der Ergebnisse dient eine Filmkassette zur lichtgeschützten Aufbewahrung der Membran. Zur Detektion kommen CL-XPosure™ Filme zum Einsatz, die in der

Dunkelkammer entwickelt werden. Eine Digitalisierung kann anschließend mit herkömmlichen Scannern erfolgen. Als weitere Möglichkeit der Detektion steht das Gel docs XR+ Dokumentationssystem zur Verfügung. Hiermit ist eine sofortige Digitalisierung möglich.

3.7 Nachweis und Quantifizierung der aus Tumor- und Gewebeproben gewonnenen DNA und RNA

3.7.1 DNA-Extraktion aus Tumor- und Gewebeproben

Neben der bereits beschriebenen Methodik der DNA-Isolierung aus den zur Markierung verwendeten Ohrstanzen wird außerdem die nachfolgend beschriebene weitere Variante der DNA-Isolierung aus Tumor- und Lebergewebe angewendet. Sie wird verwendet, um die nach Tamoxifeninjektion erfolgte Deletion bestimmter Gene mittels Deletions-PCR (Δ PCR) direkt in den Tumor- und Gewebeproben nachzuweisen. Hierfür werden 1 mm große Gewebestücke der in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Proben über Nacht in $300\text{ }\mu\text{l}$ Zellysepuffer (pH-Wert = 8,0) und $10\text{ }\mu\text{l}$ Proteinase K-Lösung bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 15.000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden $200\text{ }\mu\text{l}$ des Überstandes in ein neues Gefäß mit $200\text{ }\mu\text{l}$ Isopropanol (2-Propanol) transferiert. Nach erneutem Zentrifugieren wird der Überstand restlos verworfen und $300\text{ }\mu\text{l}$ kaltes $70\text{ }\%$ Ethanol hinzugegeben. Es folgt ein weiteres Zentrifugieren und Abkippen der Lösung. Das in dem Eppendorfgefäß zurückgebliebene Pellet wird langsam bei Raumtemperatur getrocknet (ungefähr 60 Minuten). Die Proben werden nach Hinzugabe von $100\text{ }\mu\text{l}$ TE-Puffer über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und danach bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Die Durchführung einer Deletions-PCR erfolgt analog zu der bereits beschriebenen

Polymerase Kettenreaktion (PCR). Der Unterschied dazu besteht im Ziel des Nachweises und damit in der Auswahl und Verwendung anderer Primer. Mit der bereits beschriebenen PCR ist ein Nachweis mutierter (mut) oder Wildtyp (WT) Allele möglich. Im Gegensatz dazu wird die Deletions-PCR, wie der Name bereits andeutet, zum Nachweis erfolgter Gendeletionen eingesetzt. In unserem Versuchsaufbau handelt es sich dabei um folgende „gefloxte“ Gene: *Rb*^{lox/lox}, *p53*^{lox/lox}, *Mek1*^{lox/lox}. Durch die Tamoxifen induzierte Aktivierung der Cre Rekombinase erfolgte die Deletion der Gene spezifisch nur in den Hepatozyten. Deshalb werden für den Nachweis einer Deletion in diesem Fall isolierte DNA aus Leber oder Tumorgewebe benötigt. In den Ohrstanzen oder Schwanzbiopsien sollte aufgrund der Gewebespezifität keine Deletion nachweisbar sein. Die Durchführung der Deletions-PCR verläuft, nach denselben Schritten wie bei der Standard PCR. Als Unterschied werden hier jedoch spezielle, auf die Deletion zugeschnittene, Primer verwendet. Die verwendeten Primer und ihre Sequenzen sind in Tabelle 21 aufgelistet. Der Ablauf der PCR, sowie die benötigten Annealing-Temperaturen und Zeiten sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 21: Für Deletions-PCR eingesetzte Primer mit ihren zugehörigen Sequenzen

Gen	Primer Name	Sequenz (5' - 3')
<i>Map2k2</i> ^{-/-}	MEK2 forward	TAACAGAAGGGGAAGGAGAGAGTGG
	MEK2 reverse	CACCCTGGCTGTTCCCTTACACCT
	MEK2 mut reverse	TCGTGGTATCGTTATGCGCC
<i>p53</i> ^{lox}	p53 delta forward	CACAAAACAGGTTAAACCCAG
	p53 delta reverse	GAAGACAGAAAAGGGGAGGG
<i>Rb</i> ^{lox}	Rb Δ	GCAGGAGGCAAAAATCCACATAAC
	RB lox 5'	CTCTAGATCCTCTCATTCTTCCC

Tabelle 22: Deletions-PCR Reaktionstemperaturen und -zeiten

PCR	Größe PCR-Produkt	Annealing-Temperatur	Annealing-Zeit [min] pro Zyklus
<i>Mek1</i> ^{lox}	del 600 bp	72 °C	00:40
<i>p53</i> ^{lox}	del 550 – 600 bp	56 °C	00:45
<i>Rb</i> ^{lox}	del 700 bp	58 °C	00:45

3.7.2 RNA-Extraktion aus Tumor- und Gewebeproben

Die Isolation von RNA erfolgt mit dem Maxwell® 16-Instrument unter Verwendung des Maxwell® 16 LEV simplyRNA Isolations-Kit. Hierfür werden von den bei -80 °C gelagerten Gewebeprobe jeweils 1-2 mm große Gewebestücke abgetrennt und unter Kühlung in einer Mischung aus Homogenisierungslösung und Thioglycerol suspendiert. Mit dem Homogenizer Silent Crusher M werden die Proben so lange zerkleinert, bis eine makroskopisch vollständige Suspension erreicht wird. Das erhaltene Lysat wird unter Raumtemperatur bei maximaler Geschwindigkeit (15.000 rpm) zentrifugiert und der Überstand zu 200 µl Lysepuffer hinzugefügt. Nach kurzzeitigem Vortexen der Probe erfolgen die weiteren Schritte der Isolation gemäß dem Maxwell® 16 LEV simplyRNA Herstellerprotokoll. Zur Konzentrationsbestimmung und Verifizierung der Reinheit der gewonnenen RNA erfolgt eine Messung durch den Spektrophotometer NanoDrop 1000.

3.7.3 Gewinnung von cDNA (*complementary* DNA, komplementäre DNA)

Ein Teil der gewonnenen RNA wird anschließend zur Analyse in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgt durch Verwendung des ProtoScript® First Strand cDNA Synthese-Kit. Je nach vorliegender RNA-Konzentration und Versuchsreihe erfolgt ein Umschreiben auf eine spezifische cDNA-Konzentration. Die maximale cDNA-Konzentration beträgt 1 µg/µl. Die gewonnene cDNA wird bei -20 °C gelagert.

3.7.4 Quantitative „*real-time*“-PCR (qRT-PCR)

Zur Analyse und Quantifizierung spezifischer Gene wird mit der cDNA der Tumor- und Gewebeproben eine Quantitative „*real-time*“ PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Das Prinzip der qPCR beruht auf dem Ablauf einer Polymerasekettenreaktion zur Vervielfältigung der Nukleinsäure (siehe 0) in Kombination mit einer Quantifizierung der cDNA. Die Quantifizierung wird anhand Fluoreszenzbestimmungen durchgeführt. Um dies zu ermöglichen, werden Fluoreszenzfarbstoffe, wie der hier verwendete SYBR® Green eingesetzt. Diese lagern sich während der Kettenreaktion in die entstehende DNA ein. Somit entsteht ein der DNA-Menge proportionales Fluoreszenzsignal, welches jeweils nach jeder abgelaufener DNA-Elongation bestimmt wird. Diese stetige Analyse wird durch die Bezeichnung mit „*real-time*“ PCR verdeutlicht (Thermo Fisher Scientific, 2021).

Zur Detektion der mRNA einzelner Gene werden Gen-spezifische Primer benutzt. Die verwendeten Primer sowie die zugehörigen Sequenzen finden sich in Tabelle 23. Das StepOnePlus™ real time PCR-System ermöglicht die Durchführung und Analyse der qPCR. Auf einer MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Platte wird für jedes Well ein Reaktionsmix mit einem Volumen von 20 µl pipettiert. Dieser setzt sich aus je 10 µl SYBR® Green, 7 µl Nuklease-freiem Wasser, je 1 µl Forward- und Reverse-Primer und 1 µl cDNA zusammen. Für alle durchgeführten qPCRs erfolgt die Referenzmessung anhand des „*housekeeping*“-Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). GAPDH wird als „*housekeeping*“-Gen für Referenzmessungen verwendet, da es aufgrund seiner wichtigen Funktion für das Zellüberleben in allen zellkernhaltigen Zellen vorkommt (Pfaffl, 2001). Die Detektion erfolgt für alle zu analysierenden Gene sowie für GAPDH als Referenz in Triplikaten. Das StepOnePlus™ real time PCR-System führt zur Sicherung der Spezifität nach Abschluss der PCR zusätzlich eine Analyse der verschiedenen Schmelzkurven durch. Dadurch lassen sich Hintergrundaktivitäten, die auf mögliche Verunreinigungen hindeuten könnten, von den spezifischen Reaktionen abgrenzen.

Die statistische Analyse betrachtet die jeweilige mRNA-Expression der Zielgene im Verhältnis zum „*housekeeping*“-Gen (GAPDH). Die Auswertung erfolgt unter Verwendung der StepOne™ v2.3-Software und Microsoft Excel nach dem Prinzip der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – Methode (Pfaffl, 2001). Der

Ct-Wert ist die Anzahl der Amplifikationszyklen, nach denen ein festgelegter Grenzwert überschritten wird. (Thermo Fisher Scientific, 2021)

Tabelle 23: Verwendete Primer für die quantitative real-time PCR (qPCR) mit ihren jeweiligen Sequenzen

Gen	Primer Name	Sequenz (5' - 3')
<i>Albumin</i>	m_Alb_F	AGTGTTGTGCAGAGGCTGAC
	m_Alb_R	TTCTCCTTCACACCATCAAGC
<i>Alphafetoprotein (Afp)</i>	m_Afp_F	GTTCTGGCATGCTGCAA
	m_Afp_R	CCTTTGCAATGGATGCTCTC
<i>Amotl2</i>	m_Amotl2_F	AGTTGGAGCTGCGTCTGC
	m_Amotl2_R	GGTGCCTGTCTGCCTCTG
<i>Ascl2</i>	m_Ascl2_F	GAGAGCTAAGCCCGATGGA
	m_Ascl2_R	AGGTCCACCAGGAGTCACC
<i>Axin2</i>	m_Axin2_F	GAGAGTGAGCGGCAGAGC
	m_Axin2_R	CGGCTGACTCGTTCTCCT
<i>Bad</i>	m_Bad_F	GGAGCAACATTCATCAGCAG
	m_Bad_R	TACGAACTGTGGCGACTCC
<i>Ccnd1</i>	m_Ccnd1_F	CATCCATGCGGAAAATCG
	m_Ccnd1_R	CAGGCGGCTCTTCTTCAA
<i>CD44</i>	m_CD44_F	CTCCTTCTTTATCCGGAGCAC
	m_CD44_R	TGGCTTTTTGAGTGACACAGT
<i>Ctgf</i>	m_Ctgf_F	TGACCTGGAGGAAAACATTAA
	m_Ctgf_R	AGCCCTGTATGTCTTCACACT
<i>Cyr61</i>	m_Cyr61_F	GGATCTGTGAAGTGCGTCCT
	m_Cyr61_R	CTGCATTTCTTGCCCTTTTT
<i>Dkk1</i>	m_Dkk1_F	CCGGGAACTACTGCAAAAAT

Gen	Primer Name	Sequenz (5' - 3')
	m_Dkk1_R	CCAAGGTTTTCAATGATGCTT
<i>Dkk2</i>	m_Dkk2_F	CTGGTACCCGCTGCAATAAT
	m_Dkk2_R	CATGGTTGCGATCTCTATGC
<i>E2f1</i>	m_E2f1_F	TGCCAAGAAGTCCAAGAATCA
	m_E2f1_R	CTTCAAGCCGCTTACCAATC
<i>Eif4b</i>	m_Eif4b_F	TATGACAGACGGGATGATCG
	m_Eif4b_R	GGTTCAGTCTGGGTCTCTGG
<i>Ephb2</i>	m_Ephb2_F	TAGACATGCCTTGCAACAACC
	m_Ephb2_R	GTCTCGTTGACGCTGGAGAT
<i>Fos</i>	m_Fos_F	AGAGCGCCCCATCCTTAC
	m_Fos_R	TTCTCTTCCTCTTCAGGAGATAGC
<i>Fosl1</i>	m_Fosl1_F	CCCAGTACAGTCCCCCTCA
	m_Fosl1_R	TCCTCCTCTGGGCTGATCT
<i>FoxO3a</i>	m_FoxO3a_F	GCTAAGCAGGCCTCATCTCA
	m_FoxO3a_R	TTCCGTCAGTTTGAGGGTCT
<i>Gadd45</i>	m_Gadd45_F	AGAGCAGAAGACCGAAAGGA
	m_Gadd45_R	CGTAATGGTGGCCTGACTC
<i>GAPDH</i>	m_GAPDH_F	AAGAGGGATGCTGCCCTTAC
	m_GAPDH_R	CCATTTTGTCTACGGGACGA
<i>Gpc3</i>	m_Gpc3_F	CGGTGGTTAGCCAGATCATT
	m_Gpc3_R	CTTGGGCACAGACATGGTT
<i>Hes1</i>	m_Hes1_F	TGCCAGCTGATATAATGGAGAA
	m_Hes1_R	CCATGATAGGCTTTGATGACTTT
<i>Hey1</i>	m_Hey1_F	CATGAAGAGAGCTCACCCAGA

Gen	Primer Name	Sequenz (5' - 3')
	m_Hey1_R	CGCCGAACTCAAGTTTCC
<i>Lgr5</i>	m_Lgr5_F	GTGTCTTTTTGCCTTTTGACG
	m_Lgr5_R	TGTCAGTCCAAGAACTGGTGT
<i>Mdm2</i>	m_Mdm2_F	AGGGCACGAGCTCTCAGAT
	m_Mdm2_R	TCTCCTTCAAAAGAGTCTGTATCG
<i>Myc</i>	m_Myc_F	CCTAGTGCTGCATGAGGAGA
	m_Myc_R	TCTTCCTCATCTTCTTGCTCTTC
<i>Nfkb1</i>	m_Nfkb1_F	GAGGAGACCGGCAACTCA
	m_Nfkb1_R	GTCCATCTCCTTGGTCTGCT
<i>Nrarp</i>	m_Nrarp_F	GCTACACATCGCCGCTTT
	m_Nrarp_R	TTGGCCTTGGTGATGAGATA
<i>Pdk2</i>	m_Pdk2_F	TGGCTAAGCTCCTGTGTGAC
	m_Pdk2_R	CATGTGAATGGGCTGGTTG
<i>Rps6kb2</i>	m_Rps6kb2_F	CCTGGAGTGCCTCAGTGG
	m_Rps6kb2_R	ATGGCCCAGGGCTAGTGT
<i>Spp1</i>	m_Spp1_F	GGAAACCAGCCAAGGTAAGC
	m_Spp1_R	TGCCAATCTCATGGTCGTAG
<i>Vimentin</i>	m_Vimentin_F	CCAACCTTTTCTTCCCTGAAC
	m_Vimentin_R	TTGAGTGGGTGTCAACCAGA
<i>Wif1</i>	m_Wif_F	CCAAGGAGACCTGTGCTCTAA
	m_Wif_R	TCTCGACACTGGCACTTGTT
<i>Zytokeratin 19 (Krt19)</i>	m_Krt19_F	AGTCCCAGCTCAGCATGAA
	m_Krt19_R	TAACGGGCCTCCGTCTCT

3.7.5 RNA-Sequenzierung und Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Zur genaueren Analyse und Quantifizierung der Genexpression innerhalb der entstandenen Lebertumore erfolgte die Durchführung einer RNA-Sequenzierung. Hierfür wurde für die zuvor vorliegende RNA zur Sequenzierung in cDNA überführt. Anschließend wurden im Rahmen einer Kollaboration GSEA-Datensets generiert. Verwendet wurden hierfür die vorher durch RNA-Sequenzierung erhaltene Daten. In der GSEA wurden signifikant unterschiedliche Gensets hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz kuratiert und für weitere Analysen ausgewählt. Hierdurch konnten überexprimierte Gene und Gruppen von Genen innerhalb größerer Datensets hervorgehoben werden.

3.8 Zellkultur

3.8.1 Kultivierung und Versuchsdurchführung

Die Kultivierung und Versuchsdurchführung der *RPK*-Tumorzelllinien erfolgt stets unter steriler Arbeitsweise nach etablierten Standardprotokollen. Die Zellen werden in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin Medium kultiviert. Die Inkubation aller Zelllinien erfolgt bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Pro Zelllinie werden 50 - 100.000 Zellen auf 6-Well-Platten in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät. Nach 24 h Inkubationszeit erfolgt eine Behandlung mit dem MEK1/2-Inhibitor PD0325901, bei einer Endkonzentration von 10 µM. Hierfür erfolgt die Verdünnung des MEK1/2-Inhibitors mit DMSO auf eine Konzentration von 5 mM. Die Inkubationszeit mit dem MEK1/2-Inhibitor beträgt 48 h. Die Kontrollen wurden für 48 h mit reinem DMSO inkubiert. Für die Ernte wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bis zur Ablösung der Zellen inkubiert. Die abgelösten Zellen werden im Medium aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 0,5 rcf für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das entstandene Pellet mit 1 ml PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren mit denselben Einstellungen wird das gewonnene Zellpellet für spätere RNA-Extraktion bei -80 °C tiefgefroren.

3.8.2 RNA-Analyse

Die Analyse der RNA der verwendeten Zelllinien erfolgt nach dem gleichen Prinzip, das auch zur Analyse der Gewebeproben verwendet wurde. Lediglich der erste Schritt zur Aufbereitung und Homogenisierung der Proben entfällt bei den durch Zellkultur gewonnenen Pellets. Nach Hinzugabe des Gemischs aus *Homogenization Solution* und Thioglycerol ist eine durch kurzes Vortexen und Pipettieren ausreichende Durchmischung zu erreichen. Danach erfolgt, wie in RNA-Extraktion aus Tumor- und Gewebeproben genauer beschrieben, die Isolation nach dem

Maxwell® 16 LEV simplyRNA Herstellerprotokoll. Anschließend erfolgt ein Umschreiben in cDNA und die Durchführung von quantitativen „*real-time*“ PCRs.

3.9 Statistische Auswertung der Daten

Zur statistischen Analyse werden der Students t-Test, der Chi Quadrat-Test und die ANOVA verwendet.

Für die denen in dieser Arbeit durchgeführten Students t-Tests wird das Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Zusätzlich zum beschriebenen Students t-Test wird bei qualitativen und kategorialen Zielgrößen nach gleichem Prinzip der Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

Während der Students t-Test und der Chi Quadrat-Test ausschließlich für den Vergleich zweier Gruppen verwendet werden können, erlaubt die ANOVA einen direkten Vergleich mehrerer Stichprobengruppen (Mishra, Singh, Pandey, Mishra, & Pandey, 2019). Für wiederholtes Testen wird zur Vermeidung der fälschlichen Annahme einer Signifikanz die Bonferroni Korrektur angewendet. Unter der Bonferroni Korrektur versteht man eine Anpassung des Signifikanzniveaus α je nach Anzahl der durchgeführten Testwiederholungen (Curtin & Schulz, 1998).

Alle beschriebenen statistischen Tests werden unter Verwendung der GraphPad Prism 5 oder der Microsoft Excel Software durchgeführt.

Zur Darstellung der Überlebenszeiten der Versuchstiere wird eine Kaplan-Meier-Kurve verwendet. Die statistische Auswertung der Überlebenszeiten zweier Versuchskohorten erfolgte durch die Anwendung eines Log-rank-Testes.

4 Ergebnisse

Die Durchführung der Versuche erfolgt mit dem Ziel, mögliche Unterschiede in der hepatischen Tumorentstehung in den Versuchstieren mit stattgehabter *Mek1/2*-Deletion im Unterschied zu der Tumorentwicklung in den Kontrolltieren ohne diese Deletion zu untersuchen. Hierbei wurde besonders auf die Überlebenszeit der Tiere, die Metastasierung sowie die histologische Differenzierung der Tumore fokussiert. Die Betrachtung der Überlebenszeit erlaubt den Vergleich der jeweiligen Dauer bis zur Tumorentwicklung. Des Weiteren wurden die Tumore gezielt auf für die Hepatokarzinogenese, relevante Signalwege untersucht. Die Erläuterung der Ergebnisse erfolgt stets im Vergleich mit der Versuchstierpopulation der *RPK*-Versuchstiere. Teilweise erfolgt ein weiterer Vergleich zu einer Versuchstierpopulation der *RPK;Pdk1;AlbCreER* Mauslinie. Diese Ergebnisse stammen, sofern nicht näher bezeichnet, aus einer vorangegangenen Forschungsarbeit von Thomas Rösner.

4.1 Darstellung des Rekombinationserfolgs der verschiedenen *Mek1/2*-Mausmodelle durch Immunfluoreszenzfärbung

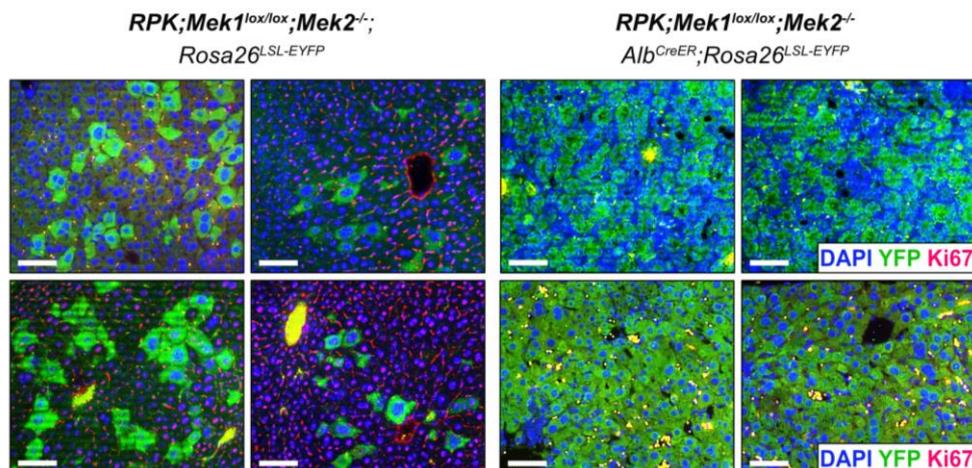


Abbildung 6: Darstellung der Rekombinationseffizienz der verschiedenen *RPK;Mek1/2*-Versuchsmodelle durch Immunfluoreszenzfärbung

Exemplarische Bilder von Immunfluoreszenzfärbungen der Lebern von *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Rosa26^{LSL-YFP}*-Versuchstieren (links) und *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2};Rosa26^{LSL-YFP}*-Versuchstieren (rechts) nach Ende der Versuchsdurchführung.

Dargestellt ist eine Immunfluoreszenzfärbung gegen YFP (grün), den Zellkernfarbstoff DAPI (blau), sowie Ki67 (rot) als Proliferationsmarker.

Jeweils repräsentative Darstellung zweier Bildausschnitte; Maßstab 100 μ m.

Es wurden zwei verschiedene Versuchsmodelle zur Tumorinduktion untersucht. Zum Nachweis des Rekombinationserfolgs und damit Darstellung der Effektivität beider Modelle erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung von Lebergewebeschnitten beider Versuchstierkohorten. Im ersten untersuchten Versuchsmodell findet die Tumorinduktion durch Expression einer bereits in das Genom integrierten Cre-Rekombinase, gekoppelt an einen Östrogenrezeptor statt. Dies erfolgt unter Kontrolle eines Albumin-Promotors. Durch die Injektion des ER-Modulators Tamoxifen erfolgt die Aktivierung der Cre-Rekombinase. Der zweite Versuchsansatz unterscheidet sich in Bezug auf das Vorliegen der Cre-Rekombinase. Hierbei wird die Cre-Rekombinase als Plasmid durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion in das Genom von Hepatozyten eingebracht. Die Expression erfolgt unter Kontrolle eines modifizierten ApoE-Promotors (pTA-CreER). Die Aktivierung erfolgt wie im ersten Versuchsaufbau durch eine intraperitoneale Tamoxifeninjektion.

Zum Nachweis des Rekombinationserfolgs wurde eine Färbung gegen YFP, DAPI sowie Ki67 durchgeführt. YFP-positive Zellen sind als Cre-rekombinierte Zellen zu werten. DAPI stellt sich in der Immunfluoreszenzfärbung als blau dar und markiert hierdurch den Zellkern (Atale, Gupta, Yadav, & Rani, 2014). Ki67 kommt als Proliferationsmarker zum Einsatz, da es sich in mitotisch aktiven Zellkernen nachweisen lässt (Bengtsson & Ranefall, 2019). Exemplarische Färbungen beider Versuchstierkohorten sind in Abbildung 6 dargestellt. In der Kohorte mit erfolgter Schwanzveneninjektion zeigten sich sehr unterschiedliche Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung. Die Zahl der angefärbten Zellen und somit der Zellanzahl mit erfolgter Rekombination variierte sowohl zwischen den verschiedenen Versuchstieren wie auch innerhalb der Leber des Versuchstiers. Dies ist exemplarisch in Abbildung 6 (links) nachzuvollziehen. Zeigte sich in einigen Gebieten der Leberschnitte eine ausgeprägte Grünfärbung (linke Spalte) so konnten in anderen Gebieten desselben Gewebeschnittes nur vereinzelte Zellen angefärbt werden (rechte Spalte). Hingegen konnte in Versuchstieren mit Verwendung des *Alb^{CreERT2}*-Promotors eine stabile und gleichmäßige Darstellung der YFP-positiven Zellen erreicht werden. Dies konnte sowohl innerhalb eines Versuchstieres sowie auch zwischen Versuchstieren derselben Kohorte dargestellt werden (Abbildung 6, rechte Seite).

Aufgrund der variablen Rekombinationsergebnisse des Versuchsaufbaus mit Schwanzveneninjektion erfolgte die Konzentration auf den Versuchsaufbau mit *Alb^{CreERT2}*-Promotor. Die Schwankungen der Effizienz sind auf die bereits in Kapitel 3.4.1 beschriebene Abhängigkeit von der Durchführung der HTVI zurückzuführen. Aufgrund der Schwankungen ist von einem ungleichen Erfolg und einem variablen Effekt auf eine mögliche Tumorentwicklung auszugehen. Bei Versuchstieren des Genotyps *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2}* kann von geringeren Schwankungen ausgegangen werden, da die Durchführung aufgrund einer geringeren Anzahl von Versuchsschritten komplikationsärmer ist. Durch

Fokussierung der Zucht auf Versuchstiere mit bereits in das Genom integrierter Cre-Rekombinase konnte eine ausreichend große Versuchspopulation generiert werden. In den hier präsentierten Ergebnissen werden ausschließlich Tiere des *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2}* bis zur Tumorentwicklung betrachtet.

4.2 Nachweis der Deletion von *Rb*, *p53* und *Map2k1*

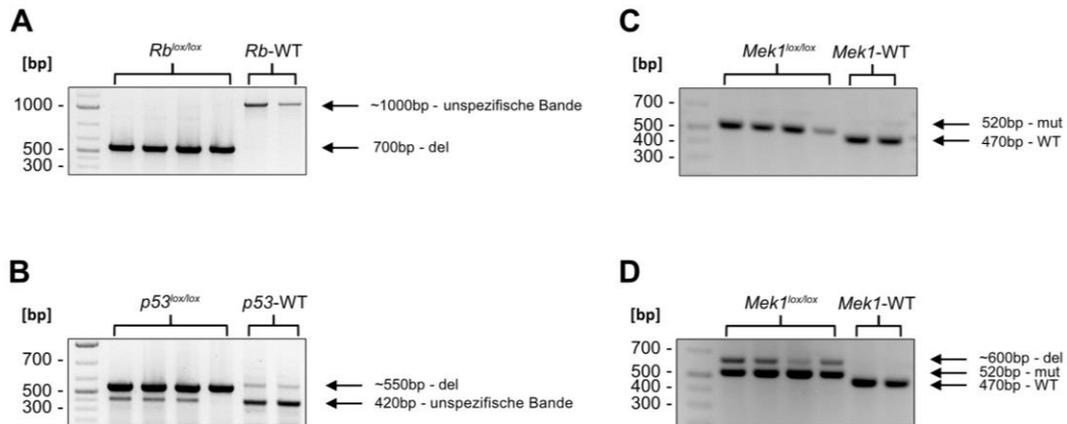


Abbildung 7: Nachweis der Deletion von *Rb*, *p53* und *Map2k1* (*Mek1*) in Versuchstieren des *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2};Rosa26^{LSL-YFP}*-Genotypes

- (A) Darstellung der Deletion von *Rb* in Versuchstieren (mut) im Vergleich zu Kontrolltieren (*Rb*-WT), *Rb^{del}* 700 bp, unspezifische Bande ~1000 bp
- (B) Darstellung der Deletion von *p53* in Versuchstieren (mut) im Vergleich zu Kontrolltieren (*p53*-WT), *p53^{del}* 550 bp, unspezifische Bande 420 bp
- (C) Darstellung der Mutation von *Mek1* in Versuchstieren (mut) im Vergleich zu Kontrolltieren (*Mek1*-WT), *Map2k1^{mut}* 520 bp, *Map2k1^{wt}* 470 bp
- (D) Darstellung der erfolgten Deletion von *Mek1* in Versuchstieren (del) im Vergleich zu Kontrolltieren (*Mek1*-WT), *Map2k1^{del}* ~600 bp, *Map2k1^{mut}* 520 bp, *Map2k1^{wt}* 470 bp

Der Nachweis der erfolgten Deletion der Gene *Rb*, *P53* und *Map2k1* nach Anwendung des Cre/LoxP-Systems wurde durch die Durchführung einer Deletions-PCR erbracht. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese der Deletions-PCRs sowie der PCR von *Mek1* dargestellt. Als Vergleichsprobe wurde jeweils ein Versuchstier gewählt, das den Wildtyp des zu vergleichenden Gens exprimiert. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um reine Wildtyp Versuchstiere. Die Darstellung der Deletion konnte durch den Nachweis einer zur erfolgten Deletion passenden Größe des Deletions-PCR Produktes durchgeführt werden. Somit konnte für die erfolgreiche Deletion von *Rb* ein Deletions-PCR Produkt mit der Größe von 700 bp detektiert werden. Hingegen stellte sich das Deletions-PCR Produkt von *p53* mit 550 – 600 bp dar. In Abbildung 7 C ist zusätzlich die Gelelektrophorese der *Mek1* PCR aus den bei der

Ohrmarkierung gewonnen Gewebeproben dargestellt. Hier zeigt sich das PCR-Produkt der vorliegenden Mutation mit einer Bandengröße von 520 bp im Vergleich zu einem Versuchstier mit Wildtyp *Map2k1*-Gen. Das Deletions-PCR Produkt von *Mek1* entspricht einer Größe von 600 bp und ist in Abbildung 7 D dargestellt.

Durch den Nachweis der Deletionsprodukte in der PCR kann für die abgebildeten Versuchstiere eine definitive Deletion der Gene *Rb*, *P53* und *Map2k1* gesichert werden.

4.3 Tumorentwicklung und Metastasenbildung bei *RPK; Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-}* im Vergleich zu *RPK;Pdk1^{lox/lox}*- und *RPK*-Tieren

4.3.1 Verlängerte Überlebensrate

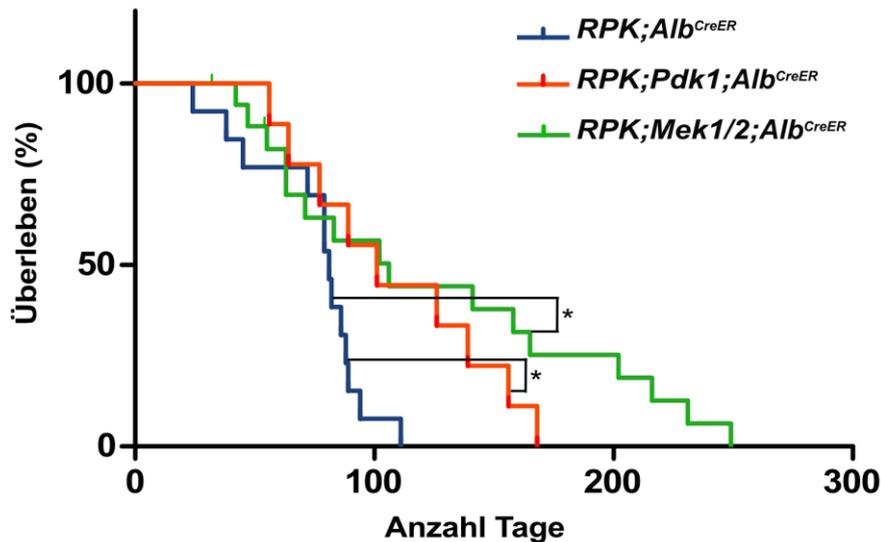


Abbildung 8: Einfluss der *Mek1/2*-Defizienz auf Tumorentwicklung und Überlebensproportionen
 Überlebensdauer männlicher Versuchstiere: *RPK* (n=13), *RPK;Pdk1* (n=9), *RPK;Mek1/2* (n=18), signifikant verlängertes Überleben bei *Mek1/2*- und *Pdk1*-Defizienz im Vergleich zu *RPK* Versuchstieren; *, p < 0,05, Statistische Analyse mittels Log-Rank Test.

Tabelle 24: Medianes Überleben

	<i>RPK;Alb^{CreER}</i>	<i>RPK;Pdk1;Alb^{CreER}</i>	<i>RPK;Mek1/2;Alb^{CreER}</i>
Medianes Überleben [Tage]	81	101	106

RPK;Alb^{CreERT2}-, *RPK;Pdk1^{lox/lox};Alb^{CreERT2}-* sowie *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2}* Versuchstiere wurden bis zur Tumorentwicklung beobachtet und die Überlebenszeiten in Abbildung 8 als Prozentwerte anhand einer Kaplan-Maier Kurve dargestellt. Versuchstiere aller drei Versuchskohorten, die bis zum Eintreten des Todes noch keinen Tumor entwickelt hatten, wurden in der Kaplan-Maier Überlebenskurve zensiert. Somit wurden nur Tiere als Ereignis registriert, bei denen nach Versterben ein Tumor diagnostiziert werden konnte. Insgesamt zeigten Tiere der Mauslinien *RPK;Pdk1;Alb^{CreER}* und *RPK;Mek1/2;Alb^{CreER}* ein

verlängertes medianes Überleben (Tabelle 24). Ein durchgeführter Log-Rank (Mantel-Cox)-Test zeigte einen signifikanten Unterschied in den Überlebenszeiten zwischen *RPK;Alb^{CreERT2}* und *RPK;Pdk1^{lox/lox};Alb^{CreERT2}* ($p=0,0209$) sowie auch zwischen *RPK;Alb^{CreERT2}* und *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2}* ($p=0,0156$).

4.3.2 Metastasierung

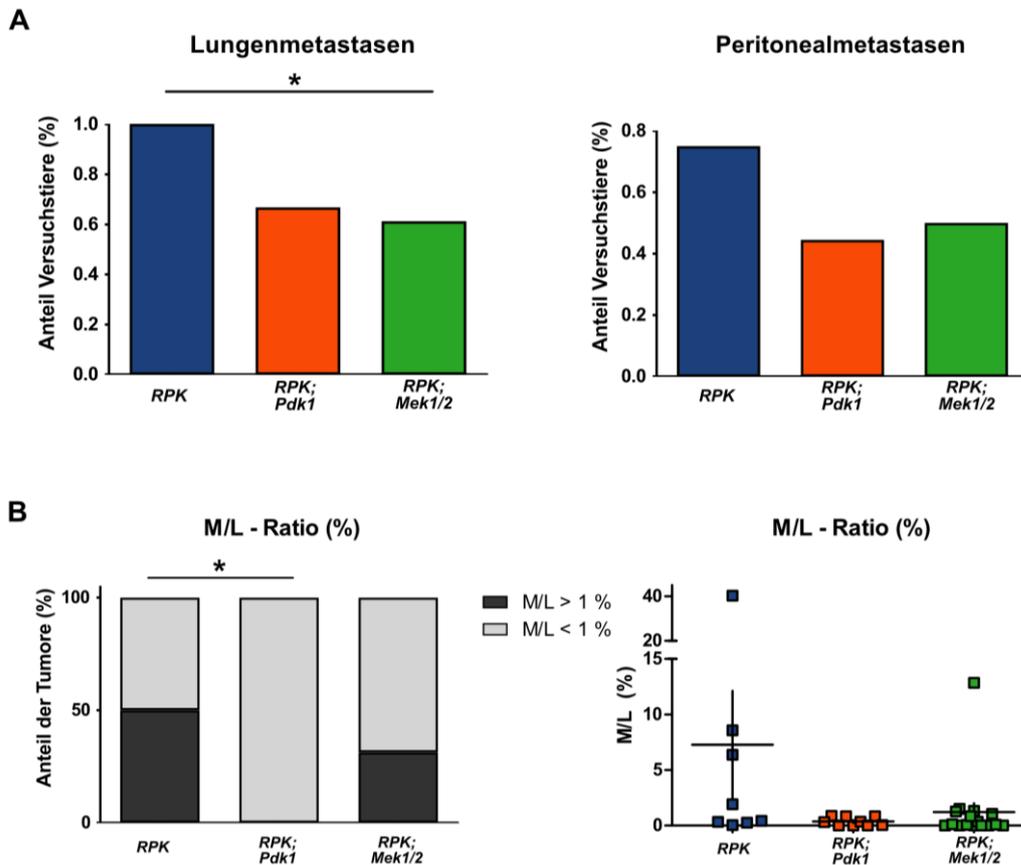


Abbildung 9: Einfluss der *Mek1/2*-Defizienz auf das Metastasierungspotential

(A) Vergleich des Metastasierungspotentials bei den Versuchskohorten; *RPK* ($n=8$), *RPK;Pdk1* ($n=9$), *RPK;Mek1/2* ($n=18$); signifikante Reduktion der Lungenmetastasen in *Mek1/2*-defizienten und nicht signifikante Reduktion in *Pdk1*-defizienten im Vergleich zu *RPK*-Versuchstieren; peritoneale Metastasierung von *Mek1/2*- und *Pdk1*-defizienten *RPK*-Tieren im Vergleich zu *RPK*-Versuchstieren; *, $p < 0,05$; statistische Auswertung mittels exaktem Chi-Quadrat-Test.

(B) Vergleich der Größe der Lungenmetastasen der Versuchskohorten; Analyse anhand des Verhältnisses der Metastasen-/Lungenfläche (M/L) in Lungengewebeschnitten; Vergleich der Versuchsgruppen nach M/L-Verhältnis > oder < des Grenzwertes von 1 %

M/L - Ratio % (Links): *, $p < 0,05$. Statistische Auswertung mittels exaktem Chi-Quadrat-Test (Fisher Yates Test oder Exakter Fisher Test).

M/L - Ratio % (Rechts): *RPK* $7,28 \pm 4,85$ % vs. *RPK;Pdk1* $0,36 \pm 0,13$ % bzw. *RPK;Mek1/2* $1,22 \pm 0,79$ %. Statistische Auswertung mittels Students t-Test.

Versuchstiere, die bis zur Tumorentwicklung unter Beobachtung standen, wurden auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht. Leberkarzinome des *RPK*-Mausmodells zeigten häufig eine Metastasierung in die Lunge und in das Peritoneum. Daher wurde die Metastasierung dieser beiden Bereiche analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Versuchstiere des *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2}* Genotyps zeigten eine signifikant reduzierte Metastasierung in die Lunge. Eine Reduktion der Lungenmetastasen wurde zuvor auch bei *Pdk1*-defizienten Versuchstieren, jedoch ohne Signifikanz, beobachtet. Bezüglich der Peritonealmetastasen konnte keine signifikante Reduktion dokumentiert werden. Eine genauere Analyse der Lungenmetastasen zeigte eine deutliche Größenreduktion in *Mek1/2*-defizienten Tieren. Während die Lungenmetastasen der Kontrolltiergruppe (*RPK;Alb^{CreERT2}*) bei circa 50 % der Versuchstiere größer 1 % der Lungenfläche waren, stellten sich die Metastasen in beiden Versuchsgruppen (*Pdk1*-defizient, *Mek1/2*-defizient) in der Mehrzahl der Tiere als kleiner dar. Ein Vergleich beider Versuchstierkohorten (*Pdk1*- und *Mek1/2*-defizient) zeigte, dass *Pdk1*-defiziente Tumore in allen beobachteten Fällen Lungenmetastasen mit einer Größe <1 % der Lungenfläche verursachten. *Mek1/2*-defiziente Tiere dagegen zeigten Lungenmetastasen in einem kleineren Ausmaß als die Kontrollgruppe, jedoch waren diese anders als bei *Pdk1*-defizienten Tumoren nicht immer begrenzt auf weniger als 1 % der Lungenoberfläche (Abbildung 9 B). Allerdings konnte bezüglich der *Mek1/2*-defizienten Tumore im Vergleich zu beiden anderen Tumorgruppen kein signifikanter Unterschied der durch Metastasen betroffenen Lungenfläche abgebildet werden.

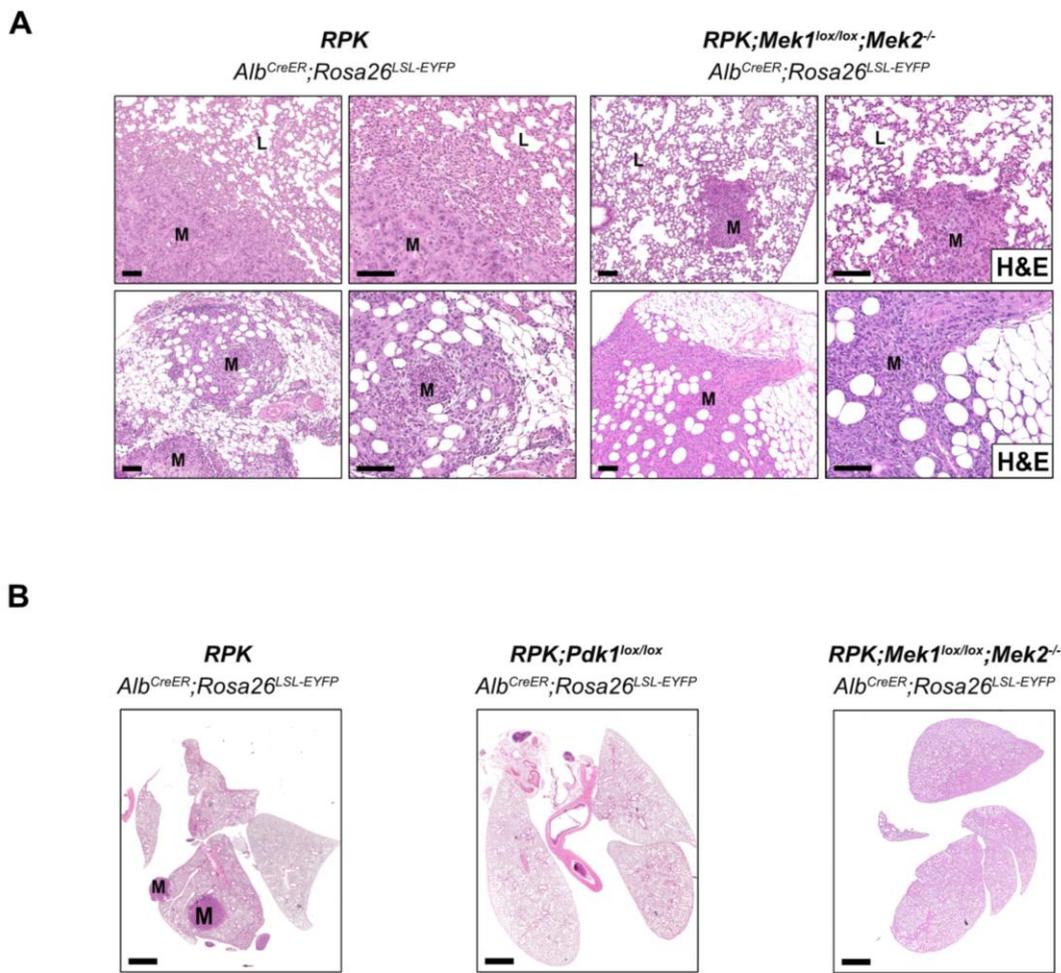


Abbildung 10: Einfluss der *Pdk1*- und *Mek1/2*-Defizienz auf das Metastasierungspotential. Darstellung anhand histologischer Färbungen

- (A) Repräsentative mikroskopische Erscheinung von Metastasen in Lunge (oben) und Peritoneum umgeben von abdominalem Fettgewebe (unten) in Hämatoxylin/Eosin (H&E) Färbung; jeweils Färbungen von *RPK* und *RPK;Mek1/2*- Versuchstieren (M = Metastase, L = Lunge); Maßstab 100 μ m.
- (B) Lungenschnitte einer metastasierten Lunge eines *RPK*-Lebertumors (links) im Vergleich zu zwei Lungen ohne Metastasen eines *Pdk1*-defizienten (Mitte) und eines *Mek1/2*-defizienten Lebertumors (rechts) in HE-Färbung (M = Metastase); Maßstab 2 mm.

4.4 Aktivität des MEK/ERK-Signalwegs in Tumoren

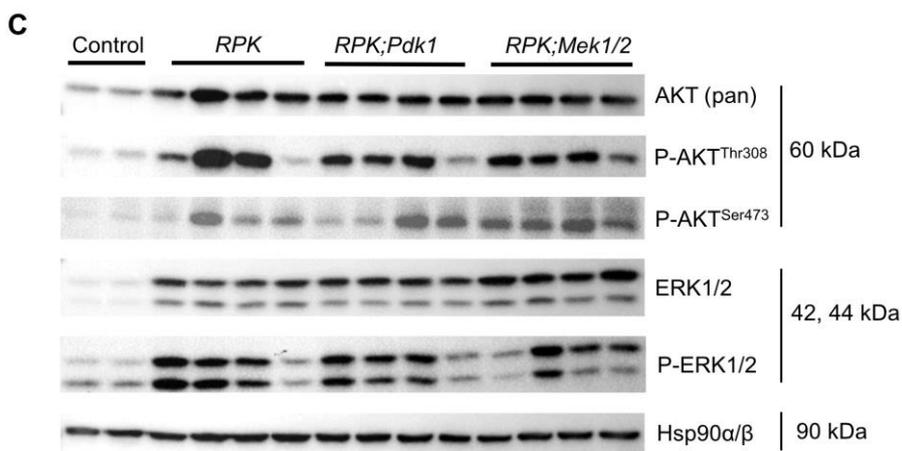
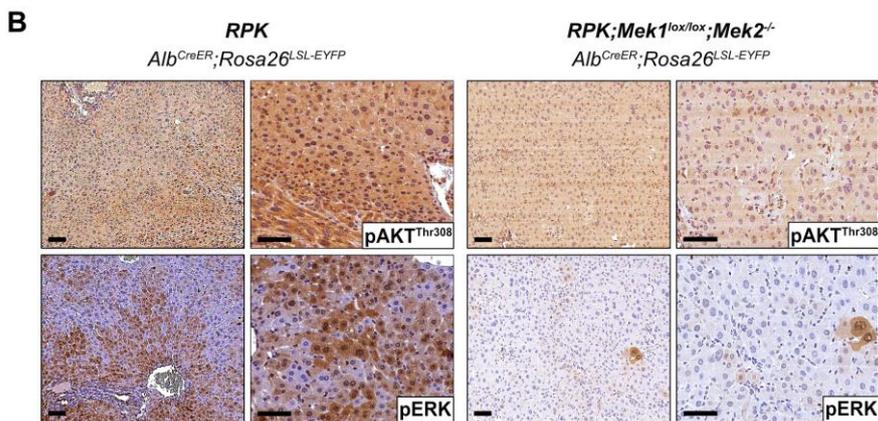
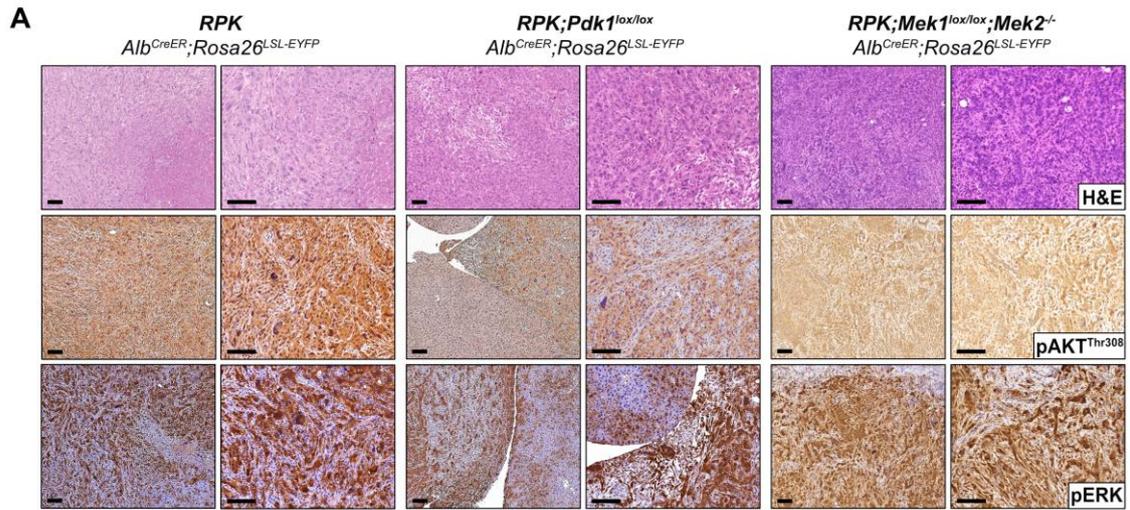


Abbildung 11: Aktivität der RAS-abhängigen Signalwege PI3K/AKT und MEK/ERK

- (A) HE-Färbungen (oben) und immunhistochemische Färbungen gegen phospho-AKT^{Thr308} (pAKT^{Thr308}) (Mitte) für die Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges und phospho-ERK (pERK) (unten) für die Aktivität des MEK/ERK-Signalweges; Jeweils repräsentative Darstellung von Tumorarealen aller Versuchsgruppen; Maßstab 100 µm.
- (B) Immunhistochemische Färbungen gegen phospho-AKT^{Thr308} (pAKT^{Thr308}) (oben) für die Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges und phospho-ERK (pERK) (unten) für die Aktivität des MEK/ERK-Signalweges; Jeweils repräsentative Darstellung von tumorfreiem Lebergewebe von *RPK*- sowie *RPK;Mek1/2*-defizienten Versuchstieren; Maßstab 100 µm.
- (C) Nachweis der Proteinexpression von AKT (pan), pAKT^{Thr308}, pAKT^{Ser473}, ERK1/2, pERK1/2 und Hsp90α/β in Kontrollleberproben (n=2) sowie in *RPK*-Tumoren (n=4), *RPK;Pdk1*-Tumoren (n=4) und *RPK;Mek1/2*-Tumoren (n=4) durch Western Blot.

Durch immunhistochemische Färbungen und Western Blots erfolgte die Analyse der Signalwegaktivität in Leber und Tumorgewebe. Ziel war eine Darstellung der durch die Deletion hervorgerufenen verminderten Aktivität der beeinflussten Signalwege. Der Fokus der Untersuchung lag in der Detektion des RAF/MEK/ERK-Signalweges, sowie als Vergleich in der Untersuchung des PI3K/AKT-Signalweges. Eine Analyse von Tumorgewebe erfolgte in den Tumoren von *RPK* sowie *Pdk1*- und *Mek1/2*-defizienten Versuchstieren. Kontrollen mit tumorfreiem Lebergewebe wurden aus *RPK*-Tieren ohne Tamoxifeninjektion gewonnen.

Zur Detektion der Signalwege wurden immunhistochemische Färbungen gegen phospho-ERK (P-ERK, pERK) für den MEK/ERK-Signalweg und gegen phospho-AKT^{Thr308} (P-AKT^{Thr308}, pAKT^{Thr308}) für den PI3K/AKT-Signalweg durchgeführt. *RPK*-Tumore zeigten im Allgemeinen für beide Signalwege eine deutliche Alteration.

Die immunhistochemische Färbung gegen P-ERK (Abbildung 11 A) zeigt in den *RPK*-Tumoren eine eindeutige Expression in Tumor- sowie in tumorfreien Arealen. Eine P-ERK-Expression stellt sich in der Färbung durch eine Braunfärbung der Zellen dar. In den bereits vorliegenden Färbungen der *Pdk1*-defizienten Tumoren zeigte sich eine den *RPK*-Tumoren vergleichbare Intensität der P-ERK-Expression. In diesen beiden Versuchskohorten konnte eine besonders intensive Färbung in den Tumorarealen dargestellt werden.

Auffallend zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung für P-ERK eine weiterhin deutlich sichtbare Expression des RAF/MEK/ERK-Signalweges in Tumoren *Mek1/2*-defizienter Versuchstiere. In diesen Tumoren zeigte die Färbung gegen P-ERK zur Detektion der Aktivität des RAF/MEK/ERK-Signalweges eine spezifische, hauptsächlich auf das Tumorareal fokussierte, erhöhte Expression. Neben der deutlichen Anfärbung in den Tumorarealen ließen sich vereinzelt auch Zellen außerhalb des eigentlichen Tumorgewebes anfärben. Bei genauer Betrachtung dieser Zellen konnten teilweise bereits vorkommende Kernatypien festgestellt werden (Abbildung 11 B).

Die immunhistochemische Färbung auf P-AKT^{Thr308} zeigte dagegen eine weniger spezifische Anfärbung. Auch hier konnte eine starke Expression in Tumorgewebe registriert werden. Verglichen mit der Färbung gegen P-ERK zeigt die P-AKT^{Thr308} Färbung in allen Versuchskohorten eine starke Expression im Tumorgewebe, jedoch weist das tumorfremie Lebergewebe ebenfalls eine starke Positivität für P-AKT^{Thr308} auf. In *Mek1/2*-defizienten Tumoren wurde außerdem eine starke Expression von P-AKT^{Thr308} im peripheren gesunden Lebergewebe festgestellt. Die Expression von P-AKT^{Thr308} stellte sich in den *Mek1/2*-defizienten Tumoren als vergleichbar mit der Expression in den *RPK*-Tumoren dar.

Zur quantitativen Analyse der Proteinexpression wurden Western Blots aus Tumorgewebe durchgeführt (Abbildung 11 C). Es erfolgte jeweils die parallele Analyse von *RPK*, *Pdk1*- und *Mek1/2*-defizienten Tumoren im Vergleich zu nicht tumorösem Lebergewebe von Kontrolltieren. Die untersuchten Tumore zeigten innerhalb ihrer zugehörigen Gruppe zum Teil sehr variable Ergebnisse.

Die Expression von P-AKT^{Thr308} und P-AKT^{Ser472} zeigte sich in den untersuchten Tumoren deutlich erhöht im Vergleich zu Kontrolllebern ohne Tumorformation als Hinweis für eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. Auch in Tumoren der *Pdk1*-defizienten Versuchstiere war eine erhöhte Expression zu beobachten. Eine hohe Expression von ERK1/2 und P-ERK1/2 als Zeichen einer Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges konnte in allen Tumorgruppen nachgewiesen werden. Hingegen zeigten die Kontrollproben nur eine geringe Expression von ERK1/2 und P-ERK1/2. Bei einem Vergleich der *Mek1/2*-defizienten Tumore mit den Kontrollproben konnte ebenfalls eine vermehrte Expression nachgewiesen werden. Die Ladekontrolle zum Nachweis einer für alle Proben verwendeten gleichen Proteinmenge erfolgte mit Hsp90 α/β .

In den Tumoren der *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2}* Versuchskohorte war, anders als zuvor erwartet, keine deutliche oder signifikante Hochregulation von P-AKT^{Thr308} oder P-AKT^{Ser473}, als Zeichen einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges, zu erkennen.

4.4.1 Analyse der mRNA-Expression von Zielgenen des MEK/ERK- sowie des PI3K/AKT-Signalweges

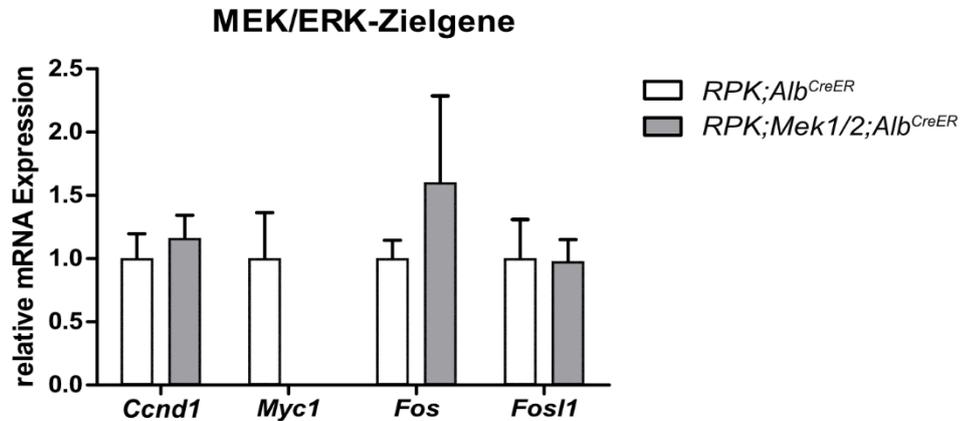


Abbildung 12: Relative mRNA-Expression von Zielgenen des MEK/ERK-Signalweges Mek1/2-defizienter Tumore

Relative mRNA-Expression von Zielgenen des MEK/ERK-Signalweges in *RPK*-Tumoren, und *RPK;Mek1/2*-Tumoren.

Genexpression analysiert durch qRT-PCR (Normierung auf *Gapdh*). Expression der *RPK;Mek1/2*-Tumoren dargestellt als Fold-Change gegenüber arithmetischem Mittel der Expressionswerte der *RPK*-Tumore. Statistische Analyse mittels Students-t-test; *, $p < 0,05$.

Anhand der durchgeführten Western-Blots konnte die Signalwegaktivität in den verschiedenen Versuchskohorten auf Proteinebene untersucht werden. Die immunhistochemischen Färbungen erlaubten eine Beurteilung möglicher Unterschiede zwischen Tumor und tumorfreiem Lebergewebe. Um die Aktivität des MEK/ERK- und des PI3K/AKT-Signalweges auf Höhe der mRNA-Expression zwischen den verschiedenen Versuchskohorten zu vergleichen, erfolgte die Analyse bestimmter Zielgene mit der Durchführung von qRT-PCRs. Die Untersuchung der Zielgene erlaubt des Weiteren eine genauere spezifischere Analyse einzelner Bestandteile der Signalwege.

Als MEK/ERK-Zielgene wurden *Ccnd1* (Cyclin D1), *Myc1* (Myelocytomatose 1), *Fos* (Fos Proto Oncogene) und *Fosl1* (Fos Like 1 oder Fos related antigen 1 (FRA-1)) untersucht. Die Expression von *Ccnd1* und *Fosl1* lieferte keinen nennenswerten Unterschied zwischen den Gruppen. Das Zielgen *Fos* zeigte in den *Mek1/2*-defizienten Tumoren eine leicht erhöhte relative mRNA-Expression im Vergleich mit den *RPK*-Tumoren. *Myc* (Myelocytomatose) ist ein häufig fehlreguliertes Protoonkogen, welches in einigen Malignomen für die Zellzyklusprogression und eine fehlgerichtete Apoptose verantwortlich ist (Stine, Walton, Altman, Hsieh, & Dang, 2015). *Myc* wird durch viele verschiedene Signale aktiviert. Dazu

zählen unter anderem der Wnt/ β -Catenin- und MEK/ERK-Signalweg (Campisi, Gray, Pardee, Dean, & Sonenshein, 1984). Für alle verwendeten Zielgene wurde die relative mRNA-Expression der *Mek1/2*-defizienten Tumore im Vergleich zu *RPK*-Tumoren analysiert. Für *Myc* konnte, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zielgenen des MEK/ERK-Signalweges, eine deutliche, jedoch nicht signifikante, Reduktion der Expression in den *Mek1/2*-defizienten Tumoren beobachtet werden (Abbildung 12). Dies kann auf eine verminderte Aktivierung durch den MEK/ERK-Signalweg zurückzuführen sein.

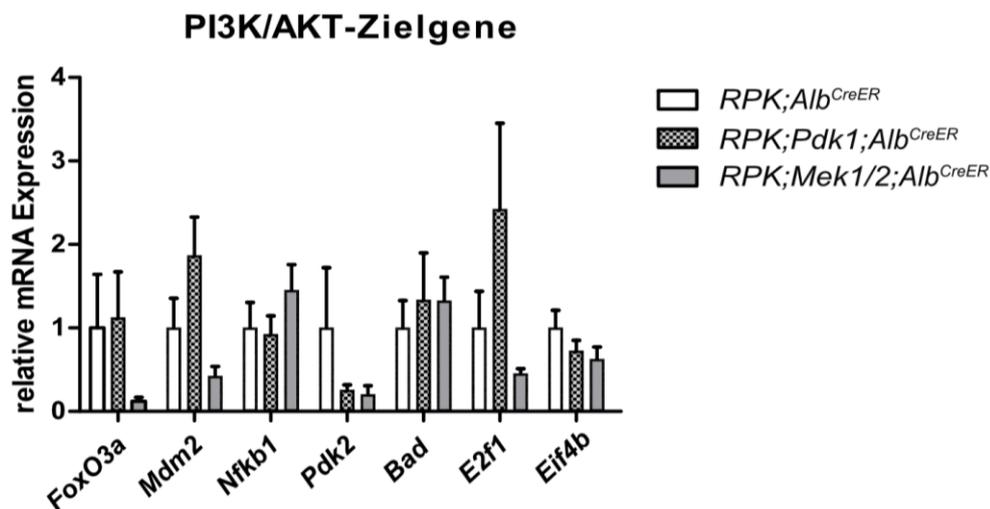


Abbildung 13: Analyse der relativen mRNA-Expression von Zielgenen des PI3K/AKT- Signalweges Mek1/2-defizienter Tumore

Relative mRNA-Expression von Zielgenen des PI3K/AKT-Signalweges in *RPK*-Tumoren, *RPK;Pdk1*-Tumoren und *RPK;Mek1/2*-Tumoren.

Genexpression analysiert durch qRT-PCR (Normierung auf *Gapdh*). Expression der *RPK;Mek1/2*-Tumoren dargestellt als Fold-Change gegenüber arithmetischem Mittel der Expressionswerte der *RPK*-Tumore. Statistische Analyse mittels Students-t-test; *, $p < 0,05$.

Mit qRT-PCRs erfolgte auf gleiche Art wie die Analyse des MEK/ERK-Signalweges eine spezifische Untersuchung der Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges auf Höhe der mRNA-Expression. Die Analyse der mRNA-Expressionen erfolgte in den *Mek1/2*-defizienten Tumoren. Daten bezüglich der Expression in *RPK* und *Pdk1*-defizienten Tumoren lagen dankenswerterweise bereits vor.

Zu den getesteten AKT-Zielgenen zählen *E2f1* (E2f transcription factor 1), *Eif4b* (eucariotic translation initiation factor 4b), *Pdk2* (pyruvate dehydrogenase kinase2), *Mdm2* (mouse double minute 2 homologue) sowie *Nfkb1* (nuclear factor kappa b subunit 1). Diese Gene haben gemeinsame Funktionsbereiche in der Regulation und Aktivierung von Zellmigration und -proliferation sowie Zellüberleben (K. Chen et al., 2016; Pierce et al., 1999).

Die relative mRNA-Expression von *E2f1*, *Eif4b* und *Mdm2* wies in *Mek1/2*-defizienten Tumoren im Vergleich zu beiden anderen Versuchsgruppen keine signifikante Veränderung auf. *Mek1/2*-defiziente Tumore zeigten wie *Pdk1*-defiziente Tumore keine nachweisbar signifikante verminderte Expression von *Pdk2*, verglichen mit *RPK*-Tumoren. Auch für die Expression von *Nfkb1* konnte kein signifikanter Unterschied dargestellt werden.

Bad (Bc2-associated agonist of cell death) und *Foxo3a* (Forkhead box O3) sind weitere Zielgene des PI3K/AKT-Signalweges. Beide üben proapoptotische Effekte aus und unterliegen einer negativen Regulierung und Inaktivierung durch den PI3K/AKT- und den MEK/ERK-Signalweg (Y. Liu et al., 2018; S. Yang & Liu, 2017). Für beide Zielgene konnte in *Mek1/2*-defizienten Tumoren jedoch keine Veränderung der mRNA-Expression im Vergleich zu *RPK* beziehungsweise *Pdk1*-defizienten Tumoren gezeigt werden (Abbildung 13). Erklärend hierfür wäre eine wahrscheinlich gleichbleibende weiterhin aktive Inhibition durch den unbeeinflussten PI3K/AKT-Signalweg.

4.5 Differenzierungsänderung in *Mek1/2*-defizienten Tumoren

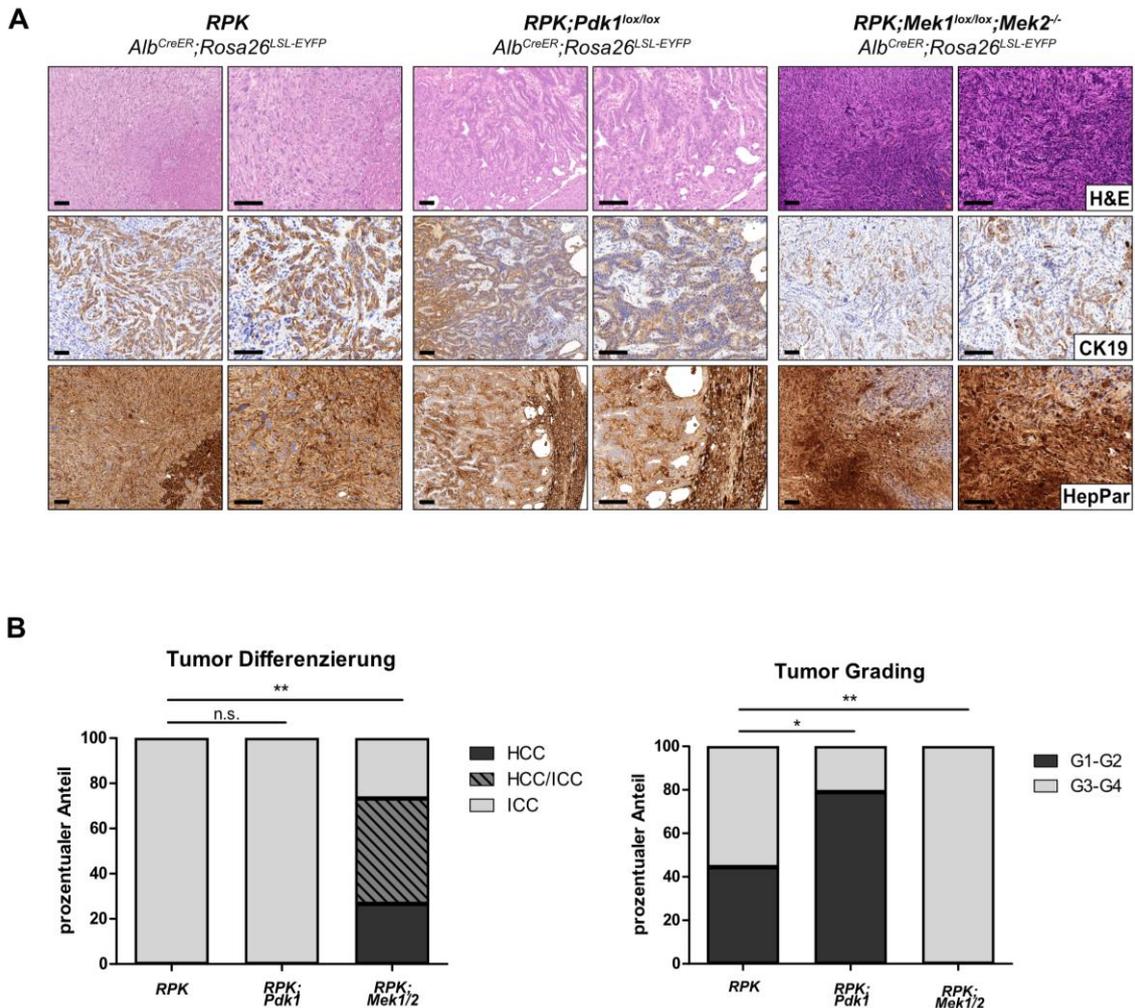


Abbildung 14: Relevanz der *Mek1/2*-Defizienz in Bezug auf die Tumordifferenzierung *in vivo*

(A) Repräsentative histopathologische Färbungen für Hämatoxylin/Eosin (H&E) Färbungen (oben), immunhistochemische Färbungen für Zytokeratin 19 (CK19) (Mitte) und HepPar (unten) von; *RPK*, *RPK;Pdk1*, *RPK;Mek1/2*-Tumoren; Maßstab 100 µm.

(B) Links: Tumordifferenzierung entwickelter Tumoren durch histomorphologisches Erscheinungsbild und immunhistochemische Färbungen für Zytokeratin 19 (CK19) und HepPar, Einteilung in cholangiozelluläre (CCC), hepatozelluläre (HCC) und Mischtumoren (HCC/CCC).

Rechts: Grading von *RPK*- (n=18), *RPK;Pdk1*- (n=19) und *RPK;Mek1/2*-Tumoren (n=18); Anzahl der gut bis mäßig differenzierten (G1-G2, schwarz) und der niedrig bis undifferenzierten Tumore (G3-G4, grau) in den verschiedenen Versuchskohorten; *, p < 0,05 **; p < 0,01; n.s., nicht signifikant.

Alle drei Versuchskohorten wurden bezüglich ihrer Gewebedifferenzierung histopathologisch analysiert. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen gegen CK19 und HepPar zum Nachweis einer hepatozellulären oder cholangiozellulären Differenzierung angefertigt. Exemplarische Ausschnitte der angefertigten Färbungen sind in Abbildung 14 zusammengestellt.

Neben der Einteilung in hepatozelluläre, cholangiozelluläre sowie gemischte Tumore erfolgte ein histopathologisches Grading anhand folgender Einteilung: G1 für gut differenziertes bösartiges Gewebe mit hoher Übereinstimmung des Ursprungsgewebes, G2 für mäßig und G3 für niedrig differenziertes bösartiges Gewebe. Die Kategorie G4 bezeichnet nicht differenziertes bösartiges Gewebe.

Die statistische Auswertung zeigt in der Versuchskohorte der *Pdk1*-defizienten *RPK*-Versuchstiere sowie in der *RPK*-Kontrollgruppe ausschließlich Lebertumore mit cholangiozellulärer Differenzierung. In der Kohorte der *Mek1/2*-defizienten Versuchstiere ließ sich ein signifikanter Unterschied der Differenzierung nachweisen. Neben einigen CCCs exprimierten viele Tumore typische hepatozelluläre Merkmale. Neben HCC/CCC-Mischtumoren konnten mehrere *Mek1/2*-defiziente Tumoren als HCCs klassifiziert werden (Abbildung 14 A und B).

Auch bei Analyse des Gratings der Tumore bestanden Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchskohorten. Rund 50 % der *RPK*-Tumore waren hoch bis gut differenziert. Bei den Tumoren der *RPK;Pdk1^{lox/lox};Alb^{CreERT2}* Versuchskohorte zeigte sich ein signifikant höherer Anteil hoch bis gut differenzierter Tumore mit 75 % aller Tumoren dieser Kohorte. Dagegen zeigte sich bei den Tumoren der *Mek1/2*-defizienten Tiere ausschließlich schlecht und undifferenzierte Tumore. Dieses hoch signifikante Ergebnis weist auf einen Einfluss des MEK/ERK-Signalweges auf Art und Ausprägung der Differenzierung hepatischer Tumore hin.

4.5.1 Analyse der mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern

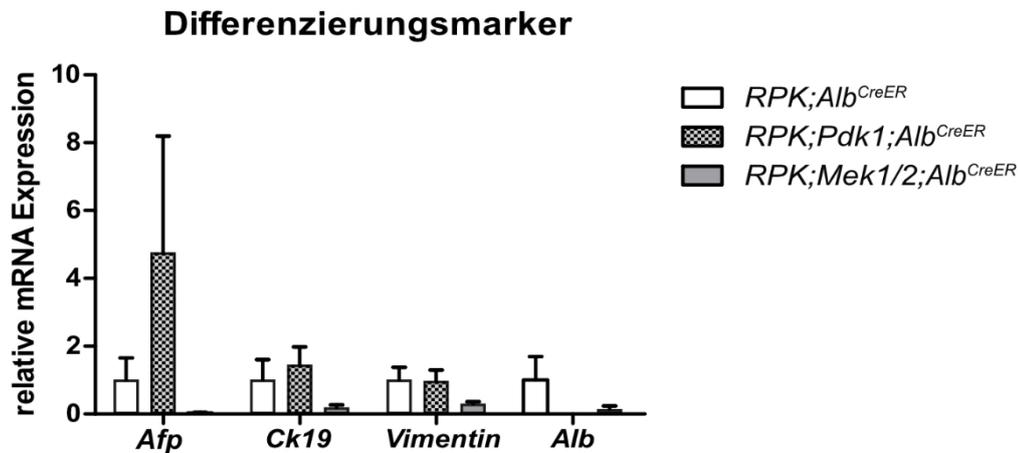


Abbildung 15: Analyse der relativen mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern Mek1/2-defizienter Tumore

Relative mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern in *RPK*-Tumoren, *RPK;Pdk1*-Tumoren und *RPK;Mek1/2*-Tumoren.

Genexpression analysiert durch qRT-PCR (Normierung auf *Gapdh*). Expression der *RPK;Mek1/2*-Tumoren dargestellt als Fold-Change gegenüber arithmetischem Mittel der Expressionswerte der *RPK;AlbCreER* Tumore. Statistische Analyse mittels Students-t-test; *, $p < 0,05$.

Wie bereits beschrieben, konnte in immunhistochemischen Färbungen eine Differenzierungsänderung in *Mek1/2*-defizienten Tumoren beobachtet werden. Um potenzielle Unterschiede in der Differenzierung der entstandenen Tumore zwischen den untersuchten Versuchspopulationen zu detektieren, wurde die mRNA-Expression typischer Markerproteine analysiert. Bei den verwendeten Markerproteinen handelte es sich um AFP, ALBUMIN und CK19 (Zytokeratin 19; Genname *Krt19*) sowie VIMENTIN (Abbildung 15). Als Marker für hepatozelluläre Differenzierung wurde die mRNA-Expression von *Albumin* und *Afp* verwendet. Beide gelten als spezifische Marker zur Detektion von Zellen hepatozytärer Herkunft (Kakar, Muir, Murphy, Lloyd, & Burgart, 2003; Shahid et al., 2015). AFP wird neben der Verwendung im Forschungsbereich auch im klinischen Alltag in die Diagnosestellung miteinbezogen (Schacherer & Schlottmann, 2009). Um hingegen eine mögliche cholangiozelluläre Differenzierung nachzuweisen, wurde die mRNA-Expression von *Ck19* analysiert. CK19 ist ein weitverbreiteter Marker zur Unterscheidung von Gallengangskarzinomen von hepatozellulären Karzinomen (Jain, Fischer, Serra, & Chetty, 2010). VIMENTIN ist ein Protein, das zu den Intermediärfilamenten gerechnet wird und somit ubiquitär in den Zellen vorhanden ist. Es zählt als Marker für epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (Satelli & Li, 2011). Zur Detektion mesenchymaler Zellen sowie Fibroblasten wurde VIMENTIN als Marker für HCC eingesetzt

(Goodpaster et al., 2008; van Zijl et al., 2009). Die Auswertung der relativen mRNA-Expression zeigte für die Versuchsgruppe der *Mek1/2*-defizienten Tumore stets eine niedrigere Expression aller genannten Differenzierungsmarker. Interessanterweise zeigten sich sowohl für den cholangiozellulären Marker *Ck19* als auch für die hepatozellulären Marker *Afp* und *Albumin* eine verminderte Expression im Vergleich zu den *RPK*-Tumoren. Dies ist möglicherweise vereinbar mit dem höheren Anteil entdifferenzierter Tumore, der in *Mek1/2*-defizienten Tieren beobachtet wird.

4.6 mRNA-Expression in *RPK*-Tumorzelllinien nach Behandlung mit einem MEK1/2-Inhibitor

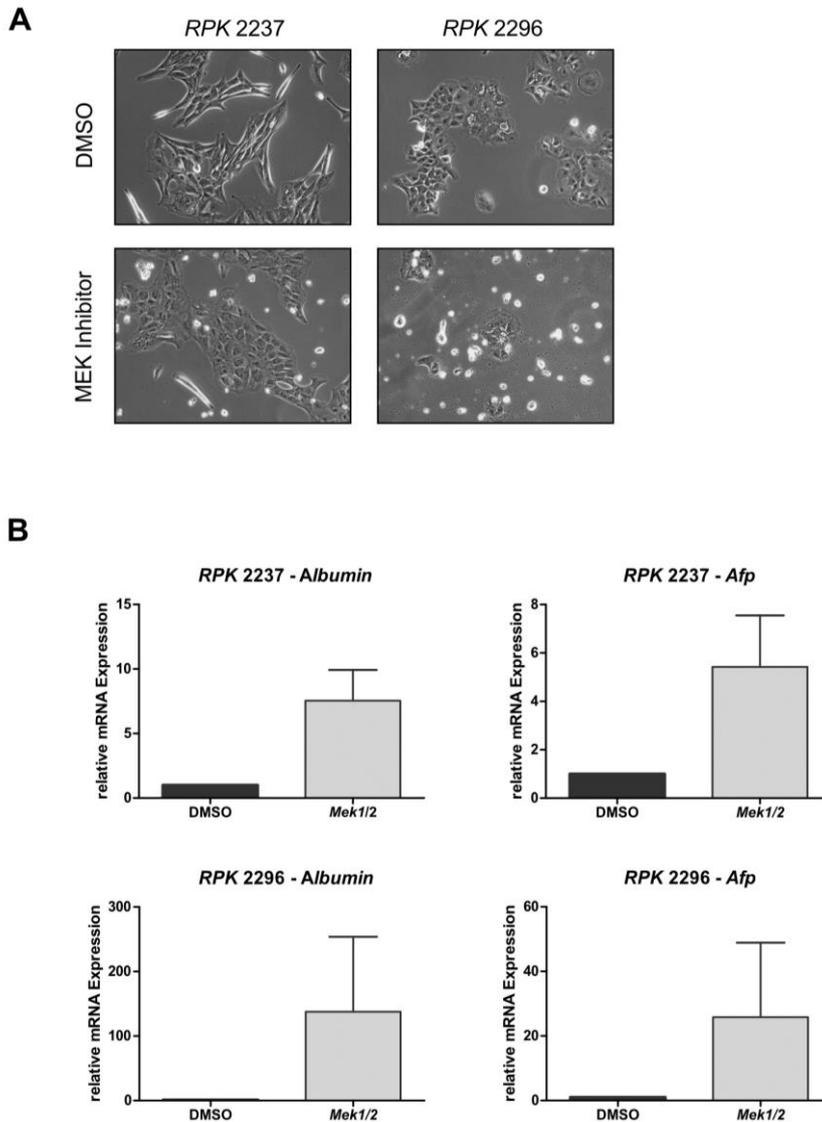


Abbildung 16: *RPK*-Tumorzelllinien nach Mek1/2-Inhibition durch PD0325901

- (A) Repräsentative mikroskopische Darstellung der *RPK*-Tumorzelllinien 2237 (links) und 2296 (rechts) nach 48 h Behandlung mit DMSO (oben) oder dem MEK1/2-Inhibitor PD0325901 (unten).
- (B) Relative mRNA-Expression der Differenzierungsmarker *Albumin* und *Afp* in *RPK*-Tumorzelllinien nach 48 h Behandlung mit dem MEK1/2-Inhibitor PD0325901 im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollzellen; Genexpression analysiert mittels qRT-PCR, Expression nach Mek1/2-Inhibition dargestellt als Fold-Change gegenüber normierter Expressionswerte nach DMSO-Behandlung. Statistische Analyse mittels Students-t-Test; *, $p < 0,05$.

Um mögliche funktionell relevante Signalwege für die beobachtete Differenzierungsänderung in *Mek1/2*-defizienten Tumoren zu untersuchen, wurden RPK-Tumorzellen *in vitro* untersucht. Aus Lebertumoren von *RPK*-Versuchstieren gewonnene Tumorzelllinien wurden nach Behandlung mit dem MEK1/2-Inhibitor PD0325901 hinsichtlich der mRNA-Expression von hepatozytären Differenzierungsmarkern untersucht. Der verwendete MEK1/2-Inhibitor PD0325901 wird zur Vereinfachung nachfolgend nur als MEK1/2-Inhibitor bezeichnet. Zur Analyse standen zu Beginn vier Zelllinien zur Verfügung. Zwei Zelllinien konnten aufgrund erschwerter Kultivierung nicht weiter analysiert werden. Vollständig untersucht wurden die beiden Zelllinien *RPK* 2237 und *RPK* 2296. Mikroskopische Aufnahmen beider Zelllinien nach 48-stündiger Behandlung mit dem MEK1/2-Inhibitor und DMSO zeigten eine deutliche Änderung des Zellphänotyps (Abbildung 16 A). Da in den *in vivo* Versuchen die histologische Untersuchung einen möglichen Einfluss der MEK-Inhibition auf eine Änderung der Art der Differenzierung beobachtet worden war, lag der Fokus auf einer Untersuchung der für die hepatozelluläre Differenzierung bekannten Marker. Untersucht wurden unter anderem die relative mRNA-Expression von *Albumin* und *Afp*. Beide sind etablierte Marker für hepatozelluläre Karzinome und zeigten eine deutliche Hochregulierung nach Behandlung mit dem MEK1/2-Inhibitor (Abbildung 16 B). Aufgrund größerer Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen und der daraus folgenden großen Standardabweichung ergab sich keine Signifikanz. Jedoch zeigte sich in jeder Versuchsdurchführung eine klare Tendenz hin zu einer deutlich stärkeren Expression beider Marker nach Behandlung mit dem MEK1/2-Inhibitor. Dies unterstützt die in den immunhistochemischen Färbungen detektierte Differenzierungsänderung in *Mek1/2*-defizienten Tumoren. Außerdem stärkt dies die aufgestellte Hypothese, dass eine Inhibition des RAF/MEK/ERK-Signalweges einen Einfluss auf die Differenzierung der Tumore hin zu einer hepatozellulären Differenzierung hat.

4.7 Aktivität des Hippo/Yap-Signalweges

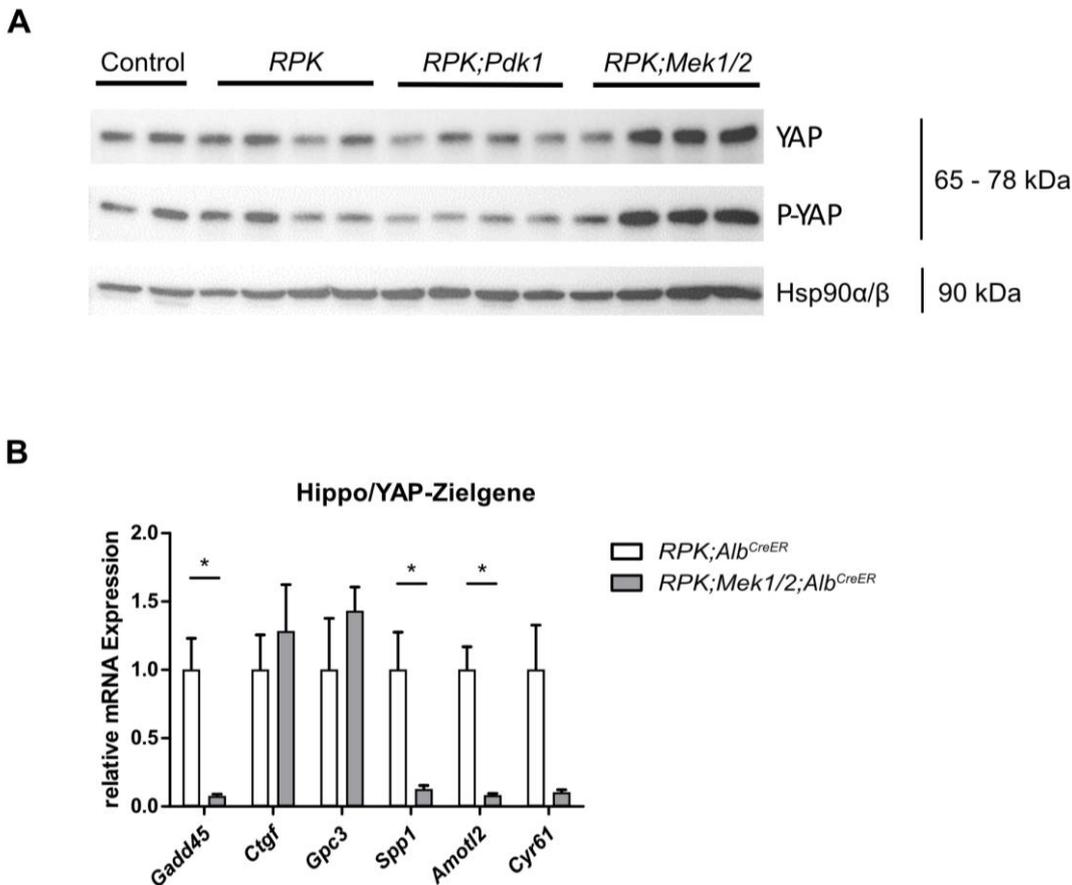


Abbildung 17: Analyse des Hippo/YAP-Signalweges auf Protein- und mRNA-Ebene in *Mek1/2*-defizienten Lebertumoren

- (A) Nachweis der Proteinexpression von YAP, phospho-YAP (P-YAP) und Hsp90 α/β in Kontrollleberproben (n=2) sowie in *RPK*-Tumoren (n=4), *RPK;Pdk1*-Tumoren (n=4), *RPK;Mek1/2*-Tumoren (n=4) durch Western Blot.
- (B) Relative mRNA-Expression von Zielgenen des Hippo/YAP-Signalweges in *RPK*-Tumoren und *RPK;Mek1/2*-Tumoren; Genexpression analysiert durch qRT-PCR (Normierung auf *Gapdh*). Expression der *RPK;Mek1/2*-Tumoren dargestellt als Fold-Change gegenüber dem arithmetischem Mittel der Expressionswerte der *RPK*-Tumore. Statistische Analyse mittels Students-t-Test; *, p < 0,05.

Da es in dem verwendeten *Mek1/2*-Mausmodell trotz Ausschaltung des MEK/ERK-Signalweges nach gewisser Zeit zur Entwicklung von Tumoren kam, erfolgte zur Detektion eines für die Tumorentstehung relevanten Signalweges die Analyse der mRNA-Expression von Zielgenen des Hippo/YAP-Signalweges sowie die Durchführung eines Western Blots auf YAP und P-YAP (Abbildung 17). Eine alternative Überexpression des Hippo/YAP-Signalweges in Form einer Expression von *Yap1* konnte bereits von Kapoor et. al. innerhalb eines *Kras* Mausmodells für duktales Adenokarzinome der Bauchspeicheldrüse

gezeigt werden (Kapoor et al., 2014). Ein ähnlicher Mechanismus wäre daher auch für das hier verwendete *RPK;Mek1/2*-Mausmodell denkbar.

YAP (Yes-associated protein) ist eine Hauptkomponente des Hippo/YAP-Signalweges und fungiert innerhalb des Signalweges als transkriptioneller Co-Aktivatoren. In den durchgeführten Western Blots konnte in *Mek1/2*-defizienten Tumoren keine signifikant erhöhte Expression von YAP sowie P-YAP im Vergleich zu den Kontrollebern und anderen Tumorkohorten beobachtet werden.

Zur weiteren Analyse der Aktivität des YAP-Onkoproteins in *Mek1/2*-defizienten Tumoren erfolgte die Untersuchung der relativen mRNA-Expression von YAP-Zielgenen. Unter anderem wurden *Cyr61* (*Cysteine-rich angiogenic inducer 61* oder *CCN family member 1*) und *Ctgf* (*connective tissue growth factor* oder *CCN2*) als zu testende Zielgene ausgewählt. Beide sind Downstream-Effektoren des YAP-Co-Transkriptionsfaktors (Shome, von Woedtke, Riedel, & Masur, 2020). Ihnen werden wichtige Funktionen bei der Regulation der Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -differenzierung zugeschrieben. Des Weiteren sind sie involviert in Inflammationsreaktionen und Angiogenese (Brigstock, 2002). Eine Aktivierung von *Ctgf* kann unter anderem direkt durch YAP erfolgen (Moon et al., 2020). Auch *Gadd45* (*Growth arrest and dna damage 45*) wird, neben einer Rolle als Stresssensor, ein Effekt auf die Zellproliferation, den Zellzyklus und Apoptose zugeschrieben (Salvador, Brown-Clay, & Fornace, 2013). Als ein weiteres YAP-Zielgen ist *Spp1* (*secreted phosphoprotein 1* oder *Osteopontin (Opn)*) an der Regulierung von Zellproliferation, -migration und Inflammation beteiligt (Wen, Jeong, Xia, & Kong, 2016). *Gpc3* (Glypican – 3) sowie *Amotl2* (*Angiomotin Like 2*) sind weitere gut untersuchte YAP-Zielgene. Während *Amotl2* durch negative Regulierung eine Translokation von YAP unterbindet, konnte für *Gpc3* eine Rolle in der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen gezeigt werden (Miao et al., 2013; Rotoli et al., 2017). Aufgrund der beschriebenen Funktionen wurde die relative mRNA-Expression der genannten YAP-Zielgene in Tumoren der *RPK*-Kontrollgruppe und den *Mek1/2*-defizienten Tumoren untersucht (Abbildung 17 A). Die Zielgene *Spp1*, *Amotl2*, *Cyr61* sowie *Gadd45* zeigten zum Teil signifikant verminderte mRNA-Expressionen in den *Mek1/2*-defizienten Tumoren verglichen mit *RPK*-Tumoren. Für *Ctgf* und *Gpc3* zeigte sich dagegen kein Unterschied in der mRNA-Expression. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in *Mek1/2*-defizienten Tumoren keine erhöhte Aktivität von YAP im Vergleich zu *RPK*-Tumoren vorliegt. Vielmehr verweist die Herabregulation einiger Zielgene auf eine verminderte Aktivierung von YAP. Dies widerlegt somit die Hypothese, dass nach Unterbindung des MEK/ERK-Signalweges der Hippo/YAP-Signalweg für die Tumorentstehung verantwortlich ist. Ein mit den Erkenntnissen von Kapoor et. al. (2014) vergleichbares Ergebnis konnte somit nicht gezeigt werden.

4.8 Analyse der mRNA-Expression von relevanten Zielgenen des NOTCH-Signalweges

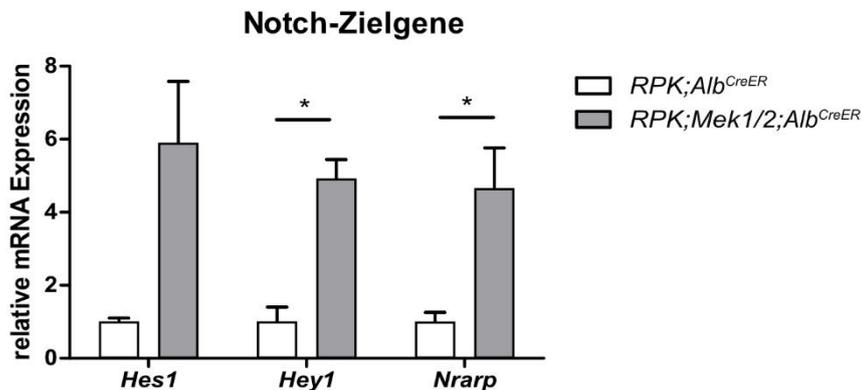


Abbildung 18: Analyse der relativen mRNA-Expression von Zielgenen des NOTCH-Signalweges Mek1/2-defizienter Tumore

Relative mRNA-Expression von Zielgenen des NOTCH-Signalweges in *RPK*-Tumoren, *RPK;Pdk1*-Tumoren und *RPK;Mek1/2*-Tumoren.

Genexpression analysiert durch qRT-PCR (Normierung auf *Gapdh*). Expression der *RPK;Mek1/2*-Tumoren dargestellt als Fold-Change gegenüber arithmetischem Mittel der Expressionswerte der *RPK*-Tumore. Statistische Analyse mittels Students-t-test; *, $p < 0,05$.

Der NOTCH-Signalweg besitzt eine relevante Funktion bezüglich der Entwicklung und Differenzierung vieler Organe. Eines davon ist das hepatobiliäre System (Geisler et al., 2008). Untersuchungen ergaben, dass dieser Signalweg eine wichtige Funktion zur biliären Differenzierung von Vorläuferzellen innehat. Bei einer inaktivierenden Mutation innerhalb des NOTCH-Signalweges kann es zu einer intrahepatischen Gallengangshypoplasie (Alagille-Syndrom) kommen. Der Zusammenhang zwischen fehlerhaftem NOTCH-Signalweg und diesem Krankheitsbild zeigt bereits die Bedeutung des Signalweges für die biliäre Differenzierung auf. Des Weiteren konnte durch Aktivierung des NOTCH-Signalweges eine Differenzierungsänderung von Hepatozyten zu Cholangiozyten auch nach Abschluss der Ausdifferenzierung beobachtet werden (Geisler et al., 2008; Kodama, Hijikata, Kageyama, Shimotohno, & Chiba, 2004; Zong et al., 2009). Der NOTCH-Signalweg zeigt somit die Fähigkeit zur „Umprogrammierung“ der Zellfunktion hin zu einer biliären Differenzierung.

Da in den immunhistochemischen Färbungen eine Differenzierungsänderung der entstandenen Tumore nachgewiesen werden konnte, erfolgte die detaillierte Untersuchung des NOTCH-Signalweges.

Hes1 (hairy and enhancer of split-1), *Hey1* (Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1) und *Nrarp* (NOTCH regulated ankyrin repeat protein) wurden ausgewählt, um die

Aktivität des NOTCH-Signalweges zu analysieren. Alle drei sind wichtige Bestandteile oder Downstream-Targets des NOTCH-Signalwege. *Hes1*, *Hey1* und *Nrarp* zeigten in den *Mek1/2*-defizienten Tumoren eine signifikant erhöhte relative mRNA-Expression verglichen mit *RPK*-Tumoren (Abbildung 18). Dies ist mit einer Aktivierung des NOTCH-Signalweges zu vereinbaren und mag einen alternativen relevanten Signalweg für die Hepatokarzinogenese darstellen. Der NOTCH-Signalweg spielt, wie zuvor beschrieben, eine relevante Rolle in der biliären Differenzierung von Zellen. Die in den immunhistochemischen Färbungen festgestellte Differenzierungsänderung hin zu vermehrt HCCs hätte daher eine verminderte mRNA-Expression der NOTCH-Zielgene in den *Mek1/2*-defizienten Tumoren vermuten lassen. Im Gegensatz dazu konnte jedoch eine Aktivierung des NOTCH-Signalweges aufgezeigt werden.

4.9 Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges

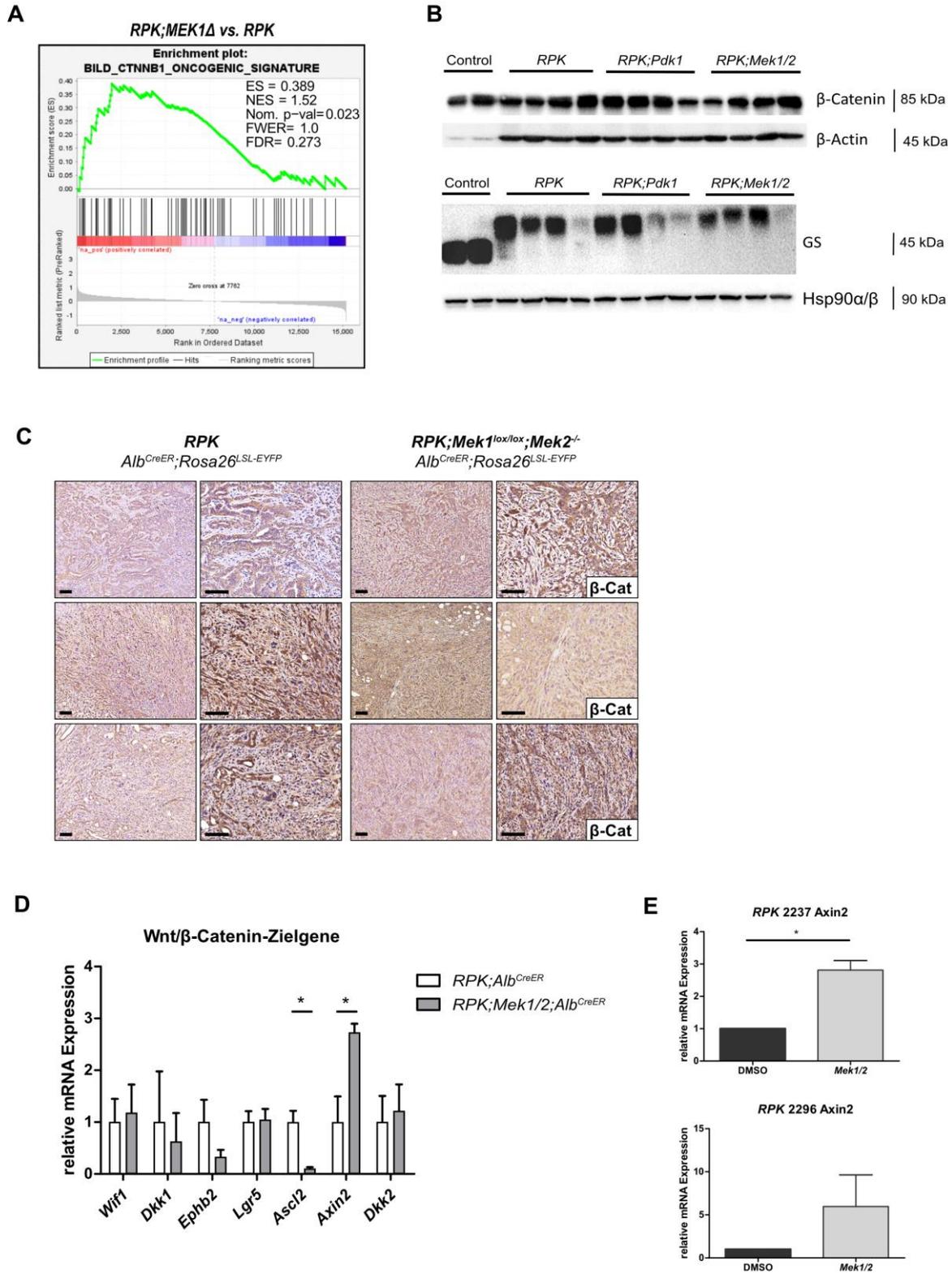


Abbildung 19: Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in *Mek1/2*-defizienten Tumoren

- (A) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) von *RPK;Mek1/2*- im Vergleich zu *RPK*-Tumore-; Enrichment eines *CTNNB1*-Gensets in *RPK;Mek1/2*-Tumoren. *Cttnb1* kodiert für β -Catenin
- (B) Nachweis der Proteinexpression von β -CATENIN, β -ACTIN, Glutamin Synthetase (GS) und HSP90 α/β in Kontrollleberproben (n=2) sowie in *RPK*-Tumoren (n=4), *RPK;Pdk1*-Tumoren (n=4), *RPK;Mek1/2*-Tumoren (n=4) durch Western Blot.
- (C) Repräsentative immunhistochemische Färbungen für β -Catenin von *RPK* und *RPK;Mek1/2* Tumoren; Maßstab 100 μ m.
- (D) Relative mRNA-Expression von Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in *RPK*-Tumoren und *RPK;Mek1/2*-Tumoren; Genexpression analysiert durch qRT-PCR (Normierung auf *Gapdh*). Expression der *RPK;Mek1/2*-Tumoren dargestellt als Fold-Change gegenüber arithmetischem Mittel der Expressionswerte der *RPK*-Tumore. Statistische Analyse mittels Students-t-Test; *, p < 0,05.
- (E) Signifikante Steigerung der relativen mRNA-Expression von *Axin2*, Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in *RPK*-Tumorzelllinien (2237, oben; 2296, unten) nach 48 h Behandlung mit dem *Mek1/2*-Inhibitor PD0325901; Genexpression analysiert durch qRT-PCR, Expression nach *Mek1/2*-Inhibition dargestellt als Fold-Change gegenüber normierter Expressionswerte nach DMSO-Behandlung. Statistische Analyse mittels Students-t-test; *, p < 0,05.

Um Signalwege zu identifizieren, die bei *Mek1/2*-defizienten Tumoren einen Einfluss auf die Differenzierung haben könnten, wurde RNA aus Tumoren isoliert und mittels RNA-seq untersucht. Verglichen wurden *RPK* und *Mek1/2*-defiziente Tumore. Die Aufarbeitung und Analyse der RNA-Proben mittels GSEA übernahmen dankenswerterweise Dr. Rupert Öllinger und Dr. Thomas Engleiter vom Institut für Molekulare Onkologie, Klinikum rechts der Isar der Technische Universität München. In der GSEA zeigte sich unter anderem ein Enrichment einer *CTNNB1*-Gensignatur. *Cttnb1* kodiert für das intrazelluläre Protein β -CATENIN. Durch das Enrichment der *Cttnb1*-Gensignatur lässt sich die Korrelation einer verstärkten Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in *Mek1/2*-defizienten Tumoren darstellen.

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg besitzt eine wichtige Rolle innerhalb der hepatischen Entwicklung sowie der Zellproliferation und -regeneration. Es ist bereits bekannt, dass er, wie auch der hier genauer untersuchte MEK/ERK-Signalweg, einen für die Hepatokarzinogenese relevanten Signalweg darstellt. Außerdem wurden Mutationen in *CTNNB1* in HCCs häufig nachgewiesen (Fatima, Lee, & Luk, 2011; He & Tang, 2020; Russell & Monga, 2018). Aufgrund der bereits bekannten Relevanz des Signalweges für die allgemeine hepatische Entwicklung, der häufig vorliegenden Mutationen in *CTNNB1* sowie des Enrichments der *CTNNB1*-Gensignatur erfolgte die weitere Untersuchung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Bezug auf die in den Tumoren vorliegende *Mek1/2*-Defizienz.

Zur Analyse einer möglichen Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges erfolgten weitere Untersuchungen der Protein- und RNA-Expression in Tumorproben. In der Immunhistochemie

konnte, bei insgesamt sehr hoher intertumoraler Variabilität der Ergebnisse, keine verstärkte Expression oder vermehrte nukleäre Expression von β -Catenin in den *Mek1/2*-defizienten Tumoren detektiert werden. Zur weiteren Untersuchung der Signalwegaktivität erfolgte eine quantitative Proteinanalyse mittels Western Blots für den Nachweis von β -Catenin und dem Zielprotein Glutaminsynthetase (GS) des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (Abbildung 19 B). Auch hier zeigten sich weder für β -Catenin noch für den Nachweis der Glutaminsynthetase signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorkohorten bei erneut sehr hoher Variabilität zwischen den einzelnen Tumorproben. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch in der Proteinanalyse zwischen den Tumorkohorten und den Kontrollproben dargestellt werden. Die Glutaminsynthetase gilt als wichtiges Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in der Leber (Loeppen et al., 2002). Sie ist als Enzym ein Bestandteil des Stickstoffwechsels und wird in Hepatozyten exprimiert (Gebhardt & Mecke, 1983).

Zur Beurteilung der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, auf die die RNAseq-Ergebnisse hinweisen, wurde die relative mRNA-Expression von Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges analysiert. *Axin2* und *Ccnd1* (Cyclin D1) konnten bereits als Targetgene des Wnt/ β -Catenin-Signalweges mit onkogenen Prozessen in Verbindung gebracht werden (Li et al., 2016). Mutationen in *AXIN2* und *CCND1* konnten bereits in HCCs detektiert werden (Taniguchi et al., 2002). *Dkk1* (Dickkopf Wnt Signaling Pathway Inhibitor 1) und *Dkk2* (Dickkopf Wnt Signaling Pathway Inhibitor 2) sind zwei Vertreter einer Familie von sekretorisch aktiven Proteinen, die als Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin-Signalweges fungieren. Sowohl *Dkk1* wie auch *Dkk2* sind außerdem innerhalb des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in einen negativen Feedback-Loop eingebunden und entfalten somit innerhalb der Signalkaskade Downstream sowie Upstream eine Wirkung. Für beide Vertreter konnte bereits in mehreren Studien eine Überexpression in hepatozellulären Karzinomen nachgewiesen werden. (Fatima et al., 2011) Aufgrund der möglichen Wirkung von *Dkk1* als Inhibitor oder Aktivator des Wnt/ β -Catenin-Signalweges wird *Dkk1* als Onkogen sowie als Tumorsuppressorgen angesehen. Hinweise zeigen, dass dies abhängig von der betreffenden Zellpopulation ist. (L. Chen, Li, Li, Wang, & Xie, 2013)

Die Zielgene *Wif1*, *Dkk2*, *Dkk1* sowie *Lgr5* und *Ephb2* zeigten keinerlei signifikante Veränderungen der mRNA-Expression in *Mek1/2*-defizienten Tumoren im Vergleich zu *RPK*-Tumoren. Für das Zielgen *Ascl2* (*Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor2*) konnte sogar eine signifikante Herunterregulation im Vergleich zu den untersuchten *RPK*-Tumoren festgestellt werden.

Für eines des prominentesten Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, *Axin2*, konnte jedoch eine deutliche und signifikant höhere relative mRNA-Expression in den *Mek1/2*-defizienten Tumoren gezeigt werden (Abbildung 19 D). Somit weisen die Daten aus GSEA und vermehrter

Axin2-Expression zwar zusammen auf eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges hin, allerdings scheinen im RPK-Modell nicht alle untersuchten Zielgene relevant zu sein. Zusätzlich wird die Analyse einer Aktivierung des Signalwegs durch eine hohe Variabilität der Proteinexpression zwischen den Tumoren erschwert.

Zur weiteren Analyse einer möglichen Verbindung zwischen dem MEK/ERK und dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg erfolgte daher eine Untersuchung *in vitro* mit Analyse der *Axin2*-Expression der mit einem MEK1/2-Inhibitor behandelten Tumorzelllinien. *Axin2* zeigte auch in den behandelten Zellen eine deutliche und zum Teil signifikant vermehrte mRNA-Expression. Somit konnte ein identischer Anstieg der relativen *Axin2* Expression vor dem Hintergrund einer MEK-Defizienz beziehungsweise Inhibition in den *in vivo*-Versuchen sowie in dem vorliegenden *in vitro*-Versuch gezeigt werden.

5 Diskussion

Leberkarzinome gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Während sie bei Frauen als neunthäufigste Krebserkrankung gilt, gehört sie bei Männern zu den fünf häufigsten Krebserkrankungen. Viele relevante Risikofaktoren, wie beispielsweise Hepatitis oder Alkoholkonsum, sind heutzutage als Ursache für die Entstehung bekannt. Aufgrund einer zumeist sehr späten Diagnose und der hohen Variabilität zwischen und auch innerhalb der verschiedenen Lebermalignomen ist eine langfristig erfolgreiche Therapie nur selten möglich. So steht eine Leberkarzinomerkrankung bei Männern an zweiter Stelle der gesamten krebsbedingten Todesursachen (Ferlay et al., 2015). Einige neue Erkenntnisse konnten im Bereich neuer diagnostischer Marker gewonnen werden. Jedoch fehlt weiterhin ein alltagstauglicher Tumormarker zur Früherkennung. (Anwanwan, Singh, Singh, Saikam, & Singh, 2020; Z. Liu, Yang, Li, Jiao, & Lv, 2020) In den letzten Jahren konnten außerdem bereits Schritte hin zu möglichen Systemtherapien zur Behandlung der Leberkarzinome unternommen werden, jedoch sind noch keine breit anwendbare erfolgreiche Therapiemöglichkeiten verfügbar (Anwanwan et al., 2020; Demir, Lee, & Kaseb, 2021). Dies unterstreicht die Notwendigkeit der in dieser Arbeit durchgeführten Grundlagenforschung zur Hepatokarzinogenese.

In der vorliegenden Arbeit ist die gezielte Untersuchung des MEK/ERK-Signalweges als möglicher für die Hepatokarzinogenese relevanter Signalweg erfolgt. Hierfür wurde das Überleben innerhalb der Versuchstier- und der Kontrolltiergruppe zur Analyse der Ausprägung und Geschwindigkeit einer Tumorentwicklung genutzt. Des Weiteren erfolgte ein Vergleich der Tumormetastasierung sowie der histologischen Differenzierung der entstandenen Tumore. Aufgrund der nachgewiesenen Tumorentwicklung in *Mek1/2*-defizienten Tumoren wurden weiterführende Analysen anderer potenziell relevanter Signalwege ergänzt.

5.1 Überlebensdauer und Signalwegaktivität bei Tumorentwicklung

Bei Betrachtung der Überlebensdauer der *Mek1/2*- sowie der *Pdk1*-defizienten Versuchspopulationen, verglichen mit der *RPK*-Kontrolltierkohorte, konnte ein signifikant verlängertes Überleben der Versuchskohorten festgestellt werden. Da in beiden Versuchskohorten jeweils ein Signalweg durch den angewendeten Versuchsaufbau eingeschränkt worden war, lässt dies die Schlussfolgerung einer ausschlaggebenden Relevanz des jeweiligen Signalweges für die Tumorentstehung in dem hier verwendeten *RPK*-Mausmodell zu.

In beiden Versuchskohorten kam es trotz Inaktivierung eines Signalweges zu einer Tumorgenese. Eine vollständige Verhinderung der Tumorentstehung konnte nicht erreicht werden. Das verlängerte Überleben der Versuchstiere kann auf ein geringeres oder

langsames Tumorwachstum zurückgeführt werden. Da in beiden Versuchskohorten (*Pdk1*- und *Mek1/2*-defiziente Versuchstiere) jeweils nur einer der beiden primär beobachteten Signalwege (PI3K/AKT- und MEK/ERK-Signalweg) eingeschränkt worden war, stützt dies die Vermutung einer kompensatorischen Aktivierung des anderen oder eines weiteren Signalweges. Die Aktivität beider Signalwege wurde anhand immunhistochemischer Färbungen und der Durchführung von Western Blots überprüft.

Durch immunhistochemische Färbungen konnte in aus dem *RPK*-Mausmodell hervorgegangenen Tumoren eine deutlich erhöhte Expression des MEK/ERK-Signalweges wie auch des PI3K/AKT-Signalweges beobachtet werden. Bei Analyse der Expression der Signalwege in *Mek1/2*-defizienten Versuchstieren ist aufgrund der zugrundeliegenden Theorie eine verminderte Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges und eine damit einhergehende verminderte Expression von P-ERK zu vermuten. Jedoch konnte in den immunhistochemischen Färbungen gegen P-ERK auch in *Mek1/2*-defizienten Tumoren eine hohe Expression beobachtet werden. Diese beschränkte sich, anders als in den *RPK*-Kontrolltieren, weitestgehend auf Tumorareale.

Als eine mögliche Erklärung für die vorhandene Expression von P-ERK ist eine nicht vollständig erfolgte Deletion von *Mek1* in einigen Hepatozyten bei gleichzeitig erhaltener Rekombination von *Rb*, *p53* und *Kras* zu nennen. Diese Hypothese würde erklären, dass besonders Zellen mit noch vorhandenem *Mek1*-Gen und dadurch aktivem MEK/ERK-Signalweg für die Tumorentstehung verantwortlich sind. Dieser Erklärungsansatz bezieht sich ausschließlich auf *Mek1*. *Mek2* hingegen ist als kompletter *Knock-out* unabhängig von der Expression der Cre-Rekombinase. Das Vorhandensein von Zellen ohne vollständige Deletion von *Mek1* in Tumorarealen betont die Relevanz und Bedeutung des MEK/ERK-Signalweges für die Tumorentstehung. Dies unterstützend zeigte die immunhistochemische Färbung gegen P-ERK nur vereinzelte P-ERK exprimierende Zellen im gesunden, die Tumoren umgebenden, Lebergewebe. In Hepatozyten ohne P-ERK Expression kann von einer vollständigen *Mek1*-Deletion ausgegangen werden.

Die immunhistochemischen Färbungen gegen P-AKT^{Thr308} ergaben in *Mek1/2*-defizienten Tumoren ein mit den *RPK*-Kontrolltieren vergleichbares Ergebnis. In den Tumorarealen konnte auch hier eine verstärkte Expression von P-AKT^{Thr308} beobachtet werden. Anders als für P-ERK konnte für P-AKT^{Thr308} eine generelle Expression auch in gesundem Lebergewebe gezeigt werden. Dies deutet auf eine generelle Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges im Lebergewebe hin und stellt verglichen mit der geringeren Anfärbbarkeit von P-ERK in gesundem Lebergewebe einen Unterschied dar. Aufgrund des nicht beeinflussten PI3K/AKT-Signalweges war dieses Ergebnis zu erwarten.

Zur weiteren Bestätigung der Signalwegaktivierung erfolgte die Analyse der Proteinexpression durch Western Blots. Allerdings ist anzumerken, dass innerhalb der einzelnen Versuchskohorten eine große Variabilität besteht. Eine eindeutige Ergebnisinterpretation wird dadurch erschwert. Die Variabilität kann unter anderem durch den innerhalb einer Gruppe unterschiedlichen Grad und zum Teil auch die Art der Differenzierung der Tumore zustande gekommen sein. So kann besonders in der Gruppe der *Mek1/2*-defizienten Tumore das Vorkommen verschiedener Leberkarzinomsubtypen einen Einfluss auf die variable Proteinexpression ausgeübt haben. Wie bereits beschrieben, kam es innerhalb dieser Gruppe zur Entwicklung von cholangiozellulären, hepatozellulären und gemischten Karzinomen. Außerdem mag sich zusätzlich der Fortschritt der Tumorentwicklung auf die Ergebnisse ausgewirkt haben. Tumore wurden erst bei äußerlich bemerkbarem Einfluss auf den Allgemeinzustand des Versuchstiers extrahiert. Je nach Lokalisation des Tumors kam es bis zu diesem Zeitpunkt zu einem unterschiedlichen Ausmaß der Tumorausdehnung. Die genauere Betrachtung der Entstehungsorte der Tumore zeigte, dass Tumore nahe des Leberhilus früher zu Überlebenseinschränkungen führten und somit in einem bereits früheren Wachstumsstadium detektiert werden konnten. Entwickelten sich die Tumore weiter in der Peripherie der Leber, so war ein ausgedehnteres Wachstum bis zur Beeinträchtigung möglich. Tumorgewebe gehört zu den schnell proliferierenden Geweben, welche eine intensive Blut- und Nährstoffversorgung benötigen. Umso größer und fortgeschrittener die tumoröse Ausbreitung ist, desto schwieriger ist eine Aufrechterhaltung der Versorgung des gesamten Tumorgebietes. Dies hat zur Folge, dass bei größeren Tumoren im Zentrum häufig eine ausgedehnte Gewebsnekrose beobachtet werden kann. Das Vorliegen einer Nekrose konnte in den entsprechenden Tumoren mikroskopisch bestätigt werden. In Tumorarealen mit ausgeprägter Nekrose ist eine unterschiedlich fortgeschrittene Proteindegradation nicht auszuschließen, da es durch Hypoxie besonders in den Kernarealen des Tumors zur Nekrose kommen kann während äußere Tumorbereiche noch ausreichend versorgt werden können (Kunz & Ibrahim, 2003; Lee et al., 2018). Da bei -80 °C aufbewahrtem Gewebe makroskopisch eine Unterscheidung von ehemals vitalem und bereits nekrotischem Tumorgewebe nicht machbar ist, war bereits die Gewinnung von ausreichenden Proteinkonzentrationen erschwert. Die unterschiedlich stark fortgeschrittene Nekrose der verwendeten Tumoren kann durch Degradation einiger nachgewiesener Proteine einen Einfluss auf die intern schwankenden Ergebnisse ausgeübt haben.

Die Analyse der durchgeführten Western Blots zur Untersuchung des PI3K/AKT- und MEK/ERK-Signalweges zeigte eine verstärkte Proteinexpression innerhalb der Tumoren verglichen mit den Proben der Kontrolllebern. Somit konnte eine erhöhte Aktivität beider Signalwege in Tumorgewebe festgestellt werden. Dies bestätigt die bereits gewonnenen Erkenntnisse einer erhöhten Aktivität beider Signalwege in tumorösem Gewebe aus den

immunhistochemischen Färbungen. Die *Pdk1*-defizienten Tumoren zeigten eine ähnliche Expression von AKT, P-AKT^{Thr308} und P-AKT^{Ser473} wie die beiden anderen untersuchten Tumorkohorten. Dies könnte, wie bereits bei der *Mek1/2*-Defizienz beschrieben, auf eine unvollständige Inaktivierung dieses Signalweges in den für die Tumorentstehung zugrundeliegenden Zellen zurückzuführen sein. Da in den durchgeführten Western Blots eine Analyse des PI3K/AKT-Signalweges über eine Bestimmung von AKT und P-AKT^{Thr308} erfolgt ist, könnte eine weitere Erklärung die alternative Aktivierung von AKT über parallele Signalwege, ohne Einbeziehung von *Pdk1*, sein.

Die Ergebnisse des Western Blots der *Mek1/2*-defizienten Tumoren konnten zeigen, dass diese Tumore im Vergleich zu den Kontrollen deutlich erhöhte ERK1/2 und P-ERK Expressionen aufweisen. Dies deutet auf einen hochregulierten MEK/ERK-Signalweg während der Tumorentstehung hin. Verglichen mit den beiden anderen Tumorkohorten zeigten sich die P-ERK-Expressionen jedoch vermindert. Zurückzuführen ist dies am ehesten auf die durch die *Mek1/2*-Mutation erfolgte Inaktivierung. Die trotz Inaktivierung vorliegende Restaktivität lässt sich am ehesten durch die bereits beschriebene mögliche unvollständige Deletion von *Mek1* im Tumorgewebe erklären. Zur besseren Veranschaulichung der stattgefundenen *Mek1/2*-Deletion wäre eine Gegenüberstellung der Proben aus Kontrollebern mit jeweils tumorfreiem Lebergewebe der *RPK* und *Mek1/2*-defizienten Tumoren sinnvoll. Dies konnte aufgrund der zahlreichen kleinen, teils nur mikroskopisch sichtbaren Tumorknoten in der Restleber der Tiere nicht realisiert werden

Bei einer durch die *Mek1/2*-Defizienz bedingten Einschränkung des MEK/ERK-Signalweges muss die dennoch vorhandene Tumorentwicklung auf weiteren Mechanismen begründet sein. Theoretisch denkbar wäre hierbei eine alternative stärkere Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges, dessen Relevanz zur Tumorentstehung bereits von T. Roesner zuvor beschrieben worden war. Eine deutlich stärkere Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges mit erhöhter P-AKT^{Thr308} oder P-AKT^{Ser472} Proteinexpression konnte im Vergleich zu den *RPK*-Tumoren in den durchgeführten Western Blots nicht beobachtet werden. Des Weiteren konnte auch in der Analyse der relativen mRNA-Expression keine verstärkte Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges gezeigt werden. Hierbei ist zu beachten, dass AKT innerhalb des PI3K/AKT-Signalweges anderen Regulierungen wie beispielsweise mTOR, einer Proteinkinase, unterliegt. Die Proteinkinase mTOR reguliert Zellproliferation- und Wachstum innerhalb des PI3K/AKT-Signalweges durch Phosphorylierung von AKT zu aktivem P-AKT^{Ser472} (Sun, Wankell, Palamuthusingam, McFarlane, & Hebbard, 2021). Da der PI3K/AKT-Signalweg nicht als allein für die Tumorentstehung verantwortlicher Signalweg festgestellt werden konnte, führt dies zu der Annahme, dass ein oder mehrere andere Signalwege in der Tumorbildung von großer Relevanz sind. Andere RAS-abhängige Signalwege sind unter anderem der Hippo/YAP-Signalweg und der Rho-Signalweg (Soriano, Alcón-Pérez, Vicente-Manzanares, &

Castellano, 2021; Zinatizadeh et al., 2021). Diese Signalwege agieren möglicherweise zusätzlich parallel des MEK/ERK-Signalwegs oder fungieren bei dessen Inaktivierung kompensatorisch als Ersatz.

Zur weiteren Bestätigung und Sicherung der Relevanz beider Signalwege wäre es sinnvoll, weiterführende Untersuchungen mit Tiermodellen durchzuführen, in denen beide Signalwege, der PI3K/AKT- und der MEK/ERK-Signalweg gleichzeitig eingeschränkt vorliegen. Dies würde eine gemeinsame Untersuchung beider Signalwege vereinfachen und mögliche alternative, für die Tumorentstehung relevante Signalwege leichter und eindeutiger demaskieren.

5.2 Metastasierungspotential

Die Ausbreitung und Verteilung der Erkrankung ist oft ein ausschlaggebender Faktor für therapeutische Optionen. Radikale kurative Therapien sind meist nur bei lokalem Befall indiziert. Für eine effektive Behandlung von Leberkarzinomen ist deshalb das Metastasierungspotential und Geschwindigkeit der Tumorverbreitung relevant.

Versuchstiere des Genotypes *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2}* entwickelten signifikant seltener Lungenmetastasen als *RPK* Kontrolltiere. Die verminderte Metastasenprävalenz und -größe kann als weiteres Indiz für die Bedeutung des MEK/ERK-Signalweges während der Tumorgenese gesehen werden. Zu beachten ist, dass alle vorliegenden Metastasen erst nach Abschluss des Versuches analysiert wurden. Dies bedeutet, dass aufgrund des unterschiedlichen Tumorwachstums eine große Variabilität der zugrundeliegenden Entwicklungszeitspanne vorliegt. Da *RPK*-Versuchstiere eine schnelle Tumorentwicklung zeigten, erfolgte hier die Detektion von Metastasen bereits nach wenigen Wochen. *Mek1/2*-defiziente Versuchstiere entwickelten Tumore erst nach längerer Zeit, wodurch sich auch der Zeitraum einer möglichen Metastasierung deutlich erweitert. Trotz der Möglichkeit eines verlängerten Metastasenwachstums zeigte sich eine signifikant verminderte Anzahl an Lungenmetastasen. Zudem fand eine Reduktion der peritonealen Metastasierung statt. Deshalb sind die Ergebnisse der reduzierten Metastasierungstendenz der *Mek1/2*-defizienten Tumore als verlässlich anzusehen. Möglicherweise liegt die verminderte Metastasierung direkt dem Einfluss der MEK/ERK-Signalweginaktivierung zugrunde. Andererseits kann die verminderte Metastasierung auf eine allgemeine langsamere Proliferation der Tumorzellen zurückzuführen sein.

Häufig wird das Metastasierungspotential einer Tumorerkrankung und damit die Aggressivität des Tumorwachstums mit der Differenzierungsausprägung in Zusammenhang gebracht (Jögi, Vaapil, Johansson, & Pählman, 2012). Bei anderen Tumorentitäten, beispielsweise in Lungenadenokarzinomen, konnte in Mausmodellen bereits eine geringe Differenzierung mit einem hohen Metastasierungspotential in Zusammenhang gebracht werden (Lambert,

Pattabiraman, & Weinberg, 2017). Interessanterweise konnte dies in dem hier untersuchten Mausmodell nicht beobachtet werden. Stattdessen wurden trotz des Auftretens vermehrt entdifferenzierter Tumore weniger Metastasen detektiert.

5.3 Tumordifferenzierung

Für eine effektive Therapie ist die genaue Kenntnis über die Art der Erkrankung ausschlaggebend. Umso gezielter und passender der Einsatz einer Therapie, desto effektiver und nebenwirkungsärmer präsentiert sie sich in der Regel. Neben den häufigsten Typen der primären Lebertumore, dem hepatozellulären und dem cholangiozellulären Karzinom, liegen häufig weitere seltenere Unterarten oder Mischtumore vor (Okuda et al., 2002; Petrick et al., 2016). Bei Betrachtung der zugrundeliegenden Mutationen besteht selbst innerhalb der einzelnen Tumorarten eine große Variabilität (Totoki et al., 2011).

Dem MEK/ERK-Signalweg werden ausschlaggebende Effekte auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen zugeschrieben (S. Yang & Liu, 2017). Der Einfluss des MEK/ERK-Signalweges auf die Differenzierung von Hepatozyten konnte anhand der Versuchstiere mit *RPK;Mek1^{lox/lox};Map2k2^{-/-};Alb^{CreERT2}*-Genotyp aufgezeigt werden. Deutlich wurde dies anhand der Analyse der Tumore auf deren Differenzierung in verschiedene Subtypen der Leberkarzinome. Nach Deletion von *Mek1/2* konnten vermehrt Mischtumore, bestehend aus hepatozellulären sowie cholangiozellulären Anteilen, und hepatozelluläre Tumore beobachtet werden. Es wurden zu einem geringen Anteil cholangiozelluläre Karzinome detektiert. Hier konnte ein signifikanter Unterschied der aufgetretenen Subtypen zwischen den *Mek1/2*-defizienten Tumoren auf der einen und den *RPK* und *Pdk1*-defizienten Tumoren auf der anderen Seite nachgewiesen werden. Dies erlaubt die Zuordnung von differenzierungsfördernden Effekten des MEK/ERK-Signalweges und bestätigt damit die von Yang & Liu (2017) bereits beschriebenen Effekte des MEK/ERK-Signalweges auf die Differenzierung von Zellen. Die vorhandene Aktivität des MEK/ERK-Signalweges in den *RPK* sowie in den *Pdk1*-defizienten Tumoren hat somit mit großer Wahrscheinlichkeit einen Einfluss auf die ausschließliche Entstehung von cholangiozellulären Tumoren. Die weiterhin beobachteten Tumore des cholangiozellulären Subtypus und Mischtumore könnten einerseits auf die nicht in allen Tumorzellen vollständig vorliegende *Mek1/2*-Deletion zurückzuführen sein. Andererseits muss davon ausgegangen werden, dass weitere Mechanismen und Signalwege, neben dem MEK/ERK-Signalweg, für die Differenzierung zu cholangiozellulären Tumoren relevant sein müssen.

Die immunhistochemisch detektierte Differenzierungsänderung konnte durch qPCR-Auswertungen der mRNA-Expression der untersuchten Tumore bestätigt werden. Hierbei wurden sowohl cholangiozelluläre wie auch hepatozelluläre Marker untersucht. Der

cholangiozelluläre Marker *Ck19* sowie die hepatozellulären Marker *Afp* und *Albumin* zeigten eine verminderte Expression im Vergleich zu den *RPK*-Tumoren. Dies lässt sich möglicherweise mit den weniger differenzierten Tumoren in *Mek1/2*-defizienten Versuchstieren erklären.

Auch in den durchgeführten *in vitro* Versuchen an *RPK*-Tumorzelllinien zeigten sich schlüssige Ergebnisse der mRNA-Expression. Nach Inkubation der Zelllinien mit dem MEK1/2-Inhibitor konnte eine deutlich erhöhte mRNA-Expression der hepatozellulären Marker *Afp* und *Albumin* dargestellt werden. Eine erhöhte Expression dieser Marker bestätigt die in den immunhistochemischen Färbungen dargestellte Differenzierungsänderung hin zu vermehrt hepatozellulären Tumoren.

Neben der Änderung der Differenzierungsrichtung in *Mek1/2*-defizienten Tumoren konnte außerdem auch eine Veränderung des Differenzierungsgrades beobachtet werden. Die schwächere und weniger ausgeprägte Entdifferenzierung in *Mek1/2*-defizienten Tumoren zeigt einen weiteren Aspekt des MEK/ERK-Signalweges bezüglich der Differenzierung. Hatten Tumore mit aktivem MEK/ERK-Signalweg anteilig eine hohe bis gute Differenzierung so konnte in allen analysierten *Mek1/2*-defizienten Versuchstieren nur mäßig differenzierte bis nicht differenzierte Tumore nachgewiesen werden. Jedoch muss auch hierbei davon ausgegangen werden, dass der MEK/ERK-Signalweg nicht allein für eine hohe Differenzierung verantwortlich ist. Die Hälfte aller *RPK*-Tumore ohne weitere Deletionen zeigte eine gute bis mäßige Differenzierung. Unter den restlichen *RPK*-Tumoren konnten teilweise auch vollständig undifferenzierte Tumore beobachtet werden. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass im Gegensatz dazu ein aktiver MEK/ERK-Signalweg allein nicht direkt zu gut oder hoch differenzierten Tumoren führt. Weiter zeigt ein Vergleich mit *Pdk1*-defizienten Tumoren, dass auch ein Herabsenken der Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges einen signifikanten Einfluss auf den Grad der Differenzierung zu haben scheint. Jedoch führt eine verminderte Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges im Gegensatz zur Beeinflussung des MEK/ERK-Signalweges nicht zur Entdifferenzierung, sondern zur besseren Differenzierung der Tumore. Andersherum scheint eine Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges eine Entdifferenzierung zur Folge zu haben. Gut möglich wäre daher, dass in *Mek1/2*-defizienten Tumoren die vorhandene Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges die Entdifferenzierung fördert. Der Einfluss beider Signalwege auf den Grad der Differenzierung stellt sich somit als entgegengesetzt dar. In der Forschung weiterer Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom und dem Kolorektalen Karzinom konnte der PI3K/AKT-Signalweg bereits in Zusammenhang mit der Art der Zelldifferenzierung gebracht werden (Riggio et al., 2012; Zhang et al., 2019).

Wie bereits erläutert, konnte nach Inaktivierung des MEK/ERK-Signalweges eine hepatozelluläre Differenzierung in Tumoren nachgewiesen werden. Um eine Erklärung für den

Differenzierungswechsel zu erhalten, erfolgte die Analyse weiterer Signalwege. Der Fokus lag hierbei unter anderem auf der Untersuchung des Hippo/YAP-Signalweges, des NOTCH-, sowie des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Der Hippo/YAP-Signalweg wurde gewählt, da Überexpressionen des Hippo/YAP-Signalweges bereits innerhalb eines Kras Mausmodells beobachtet werden konnte (Kapoor et al., 2014).

Als möglicher kompensatorisch aktiver Signalweg wurde der Hippo/YAP-Signalweg auf seine Protein- und mRNA-Expression in den Tumorkohorten untersucht. Die Untersuchung der Proteinexpression von YAP zeigte keinen signifikanten Unterschied in *Mek1/2*-defizienten Tumoren. In den Daten der relativen mRNA-Expression zeigte sich in einigen untersuchten Zielgenen eine signifikante Herunterregulierung der mRNA-Expression. In *Mek1/2*-defizienten Tumoren konnte somit keine erhöhte Aktivität von YAP im Vergleich zu *RPK*-Tumoren dargestellt werden. Vielmehr weisen die Ergebnisse auf eine verminderte Aktivierung von YAP hin. Dies widerspricht der Hypothese, dass nach Unterbindung des MEK/ERK-Signalweges der Hippo/YAP-Signalweg für die stattgefundene Tumorentstehung verantwortlich ist. Des Weiteren konnten damit Ergebnisse aus bereits bekannten Untersuchungen von Solberg et al. (2019), die eine Interaktion des Hippo/Yap-Signalweges mit dem MEK/ERK-Signalweges zeigten, in dem hier untersuchten Mausmodell nicht bestätigt werden (Solberg, Melheim, Strand, Olsen, & Krauss, 2019).

Neben dem Hippo/YAP-Signalweg erfolgte eine Analyse des NOTCH-Signalweges. Der NOTCH-Signalweg wurde aufgrund seiner bereits bekannten Relevanz in der Entwicklung und Differenzierung des hepatobiliären System genauer analysiert. Zwar konnte der NOTCH-Signalweg mit der Entwicklung der intrahepatischen Gallenwege in Verbindung gebracht werden, allerdings ist seine genaue Funktion innerhalb dieses Prozesses noch nicht vollständig erforscht. Erschwerend ist hierbei, dass homozygote Mutationen in Genen des NOTCH-Signalweges zu einer Fehlentwicklung der Organe, sowie häufig auch zu embryonalem Versterben der Versuchstiere führt (Geisler et al., 2008). Dies spiegelt jedoch auch die Bedeutung des Signalweges für die Organentwicklung wider. Eine erhöhte Aktivität des Signalweges konnte mit einer Differenzierungsänderung von Hepatozyten zu Cholangiozyten in Bezug gebracht werden (Geisler et al., 2008). So konnte bei NOTCH-Signalwegaktivität die Entwicklung von biliärem Epithel innerhalb hepatozytär gebildeter Leberläppchen durch Zong et al. (2009) gezeigt werden (Zong et al., 2009). Die Fähigkeit des NOTCH-Signalweges, eine biliäre Differenzierung in Hepatozyten oder hepatischen Vorläuferzellen anzuregen, konnte durch Zender et al. (2013) weiter bestätigt werden (Zender et al., 2013). Die Zusammenschau dieser Ergebnisse legt eine Bedeutung des NOTCH-Signalweges für die CCC-Entstehung nahe. Neben Malignomen der Leber konnte eine Dysregulation des NOTCH-Signalweges bereits in weiteren Karzinomentitäten, wie beispielsweise in Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Katoh & Katoh, 2020; Shen &

Reedijk, 2021). Weitere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass *Notch1* eine proliferationsinhibierende Wirkung auf Hepatozyten hat und somit als Tumorsuppressorgen zu fungieren scheint (Croquelois et al., 2005; Zender et al., 2013).

Die beobachtete Hochregulierung der für den NOTCH-Signalweg spezifischen Zielgene erlaubt die Hypothese einer vermehrten Aktivität des Signalweges in *Mek1/2*-defizienten Tumoren. Diese beobachtete Aktivierung des NOTCH-Signalweges ist vereinbar mit bereits der zuvor in Mammakarzinomen, nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen sowie in hämatologischen Malignitäten nachgewiesener Aktivierung (Katoh & Katoh, 2020). Wie bereits beschrieben, war aufgrund der vermehrten hepatozellulären Differenzierung und des bekannten Einflusses des Signalweges auf die biliäre Entwicklung eine verminderte Aktivität des Signalweges zu erwarten. Entgegen diesen Erwartungen zeigte sich jedoch eine vermehrte Aktivität.

Ein Zusammenhang zwischen dem MEK/ERK- und NOTCH-Signalweg konnte bereits von Tremblay et al., 2013 für Tumorzellen des Pankreas dargestellt werden. In Tumorzellen des Pankreas führte eine Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges zu einer erhöhten Aktivität des NOTCH-Signalweges. Dies wurde durch eine erhöhte Expression des Zielgenes *Hes1* gezeigt (Tremblay, Paré, Arsenault, Douziech, & Boucher, 2013). Auch diese bereits nachgewiesene Regulation konnte in dem untersuchten Mausmodell nicht bestätigt werden. Es zeigte sich eine gegenteilige Regulierung. Wodurch die detektierte Abweichung der NOTCH-Signalwegaktivität in *Mek1/2*-defizienten Tumoren, verglichen mit den *RPK*-Tumoren bedingt ist, lässt sich bisher nicht erklären.

Ein weiterer Schwerpunkt der Analyse lag auf dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Für diesen Signalweg konnte in kolorektalen Karzinomen bereits ein Zusammenhang der erhöhten Aktivität des Signalweges mit unterdrücktem beziehungsweise inaktiviertem MEK/ERK-Signalweg gezeigt werden (Zhan et al., 2019). Mutationen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges konnten in größerer Anzahl in hepatozellulären Karzinomen nachgewiesen werden (Coulouarn et al., 2012; Nault & Zucman-Rossi, 2011).

Die Proteinexpressionen von β -Catenin und Glutaminsynthetase zeigten, wie bereits in Abbildung 19 B dargestellt, variable Ergebnisse innerhalb der Tumore einer Versuchskohorte. Aus diesem Grund ist eine Aktivierung nur schwer zu detektieren. Auch in den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich eine gleichmäßige β -Catenin-Expression vergleichbar zu den *RPK*-Tumoren. Eine eindeutige Aussage zu einer vorliegenden Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges ist anhand dieser Ergebnisse somit nicht zu treffen.

Die Auswertungen der relativen mRNA-Expression anhand von qPCRs ergaben sowohl für die *in vivo* sowie auch für die *in vitro* Versuche eine signifikant erhöhte Expression von *Axin2*,

eines wichtigen Zielgens des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (H. Liu et al., 2016; Taniguchi et al., 2002). Da in dem durchgeführten *in vitro* Zellkulturversuch mit einem MEK1/2-Inhibitor anhand der relativen mRNA-Expression sowohl Differenzierungsänderungen wie auch eine erhöhte Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges gezeigt werden konnten, ist von einer Aktivierung dieses Signalweges auszugehen. Des Weiteren konnte auch in der durchgeführten GSEA eine signifikante Anreicherung von β -CATENIN-regulierten Zielgenen gezeigt werden. Dies ist ein weiterer Hinweis für eine verstärkte Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in *Mek1/2*-defizienten Tumoren, auch wenn eine vermehrte Aktivierung auf Proteinebene nicht eindeutig nachweisbar ist.

Die Bedeutung der Mek1/2-Inhibition für die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges konnte bereits von Zhan et. al. (2019) gezeigt werden. Zhan et. al. identifizierten MEK1/2-Inhibitoren als effektive Aktivatoren des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges in kolorektalen Tumorzelllinien. Neben weiteren Zielgenen konnte dabei nach MEK1/2-Inhibition eine erhöhte *Axin2* Expression in den Tumorzelllinien detektiert werden. Eine erhöhte Aktivität des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges nach MEK-Inhibition an kolorektalen Karzinomzellen konnte auch von Solberg et. al. (2019) gezeigt werden. Hierbei konnte nach MEK-Inhibition eine durch YAP ausgelöste erhöhte Transkription von *Axin2* nachgewiesen werden (Solberg et al., 2019). Die erhöhte Expression von *Axin2* könnte aber auch durch eine alternative oder parallele Aktivierung eines verwandten Signalweges bedingt sein. Jedoch muss dabei bedacht werden, dass die untersuchten Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalweges gewebsspezifisch relevant sind. So konnten auch in der Untersuchung von Solberg et. al. (2019) nur vereinzelte Zielgene, unter anderem *Axin2*, als hochreguliert nachgewiesen und somit eine Aktivierung des Signalweges aufgezeigt werden. Weiter geht aus den bereits zuvor diskutierten Ergebnissen hervor, dass keine Aktivierung des Hippo/YAP-Signalweges vorzuliegen scheint. Damit kann der von Solberg et. al. (2019) vorbeschriebene Regulationsmechanismus von *Axin2* über eine erhöhte YAP-Expression im vorliegenden Mausmodell ausgeschlossen werden. Dieser Signalweg ist damit wahrscheinlich für die Hepatokarzinogenese bei *Mek1/2-Defizienz* nicht ausschlaggebend.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Varianz der Ergebnisse bei Verdacht auf eine vorliegende Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges ist, dass beide analysierten Proteine, Glutaminsynthetase und β -CATENIN, nicht als geeignete Markerproteine fungieren. Dies könnte durch Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges oder vorliegende Unterschiede der Proteinexpression im Zytosol und Kern bedingt sein (He & Tang, 2020). Erfolgt die Signaltransduktion des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges über β -CATENIN, so erfolgt eine Translokation des Proteins in den Zellkern. Dort findet eine durch β -CATENIN vermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren statt und führt zu einer verstärkten Differenzierung und Proliferation des Gewebes (Pai et al., 2017). Da eine Analyse der

Proteinexpression anhand von Western Blots eine exakte und sehr feine Analysemethode darstellt, ist es gut möglich, dass der durchgeführte Western Blot aus diesem Grund die Unterschiede nicht darstellen konnte. Zur genaueren Auswertung könnte eine Analyse der Proteinexpressionen aufgetrennt nach zytosolischem und nukleärem Protein hilfreich sein.

Die immunhistochemischen Färbungen konnten keine klaren Unterschiede zwischen *Mek1/2*-defizienten Lebertumoren und *RPK*-Tumoren darstellen. Denkbar ist, dass immunhistochemische Färbungen gegen β -CATENIN nicht ausreichend selektiv fungieren, um eine Änderung zu detektieren. Da es sich möglicherweise um eine sehr spezifische und selektive Expressionsänderung in Form einer nukleären Expression von β -CATENIN zu handeln scheint (wie zuvor bei der Methodik des Western Blots beschrieben), könnte eine immunhistochemische Färbung gegen β -Catenin nicht die geeignete Methodik sein (Anthony, Robbins, Ahmed, & Lee, 2020). Eine Darstellung einer nukleären Expression ist technisch durchaus möglich jedoch als komplizierter anzusehen (He & Tang, 2020). Die Ergebnisse dieser Färbung können somit relativiert werden.

Durch die klaren und signifikanten Ergebnisse der relativen mRNA-Expressionen sowie der Ergebnisse der durchgeführten GSEA erscheint eine erhöhte Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in *Mek1/2*-defizienten Lebertumoren zum jetzigen Zeitpunkt wahrscheinlich. Die gefundenen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen und des Western-Blots erfordern eine weiterführende und erneute Verifizierung. Für die beobachtete Differenzierungsänderung der *Mek1/2*-defizienten Tumore kommt die verstärkte Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges als verantwortlicher Signalweg in Betracht. Zur eingehenden Analyse und Bestätigung der Relevanz des Wnt/ β -Catenin-Signalweges ist die weitere Erhebung und Auswertung detaillierter Sequenzierungsdaten bei anderen *Mek1/2*-defizienten Tumoren ein möglicher notwendiger Schritt. Durch genauere und umfangreichere Sequenzierungsdaten könnte eine erneute Bestätigung der Relevanz des Signalweges für Klarheit sorgen. Ein neuer Angriffspunkt für potenzielle Therapeutika ließe sich damit sichern. Zudem könnte eine weiterführende Diagnostik noch weitere potenziell wichtige Signalwege für die Differenzierungsänderung demaskieren zusätzliche Angriffspunkte für Therapeutika offenlegen.

6 Fazit

Aufgrund der stark begrenzten Möglichkeiten zur Therapie eines Leberkarzinoms ist die Entwicklung von neuen Therapeutika und die Aneignung des dafür notwendigen Wissens über die Krankheitsentstehung von großer Priorität.

Ziel dieser Arbeit war daher die detaillierte Untersuchung des MEK/ERK-Signalweges in der hepatischen Karzinogenese anhand des bereits zuvor etablierten *RPK-Mausmodells* für cholangiozelluläre Tumore. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte in engem Bezug zu der zuvor erstellten Arbeit „Analyse der Bedeutung des MEK/ERK- und des PI3K/AKT-Signalwegs in einem genetischen Mausmodell der hepatischen Karzinogenese“ von T. Rösner. Anhand der Auswertung der Überlebensproportionen, des Metastasierungspotentials sowie der Begutachtung der Tumordifferenzierung und Aktivität verschiedener Signalwege konnte eine eindeutige Relevanz des MEK/ERK-Signalweges für die hepatische Karzinogenese nachgewiesen werden. Eine Inaktivierung des MEK/ERK-Signalweges hat somit ein verlängertes Überleben mit langsamerem Tumorwachstum und verringerter Metastasenprävalenz zur Folge. Des Weiteren verursacht die Inaktivität der MEK/ERK-Enzymkaskade eine vermehrte hepatozelluläre Differenzierung mit deutlich schlechterem Grad der Differenzierung. Als möglicher für die Differenzierungsänderung bei *Mek1/2*-Defizienz verantwortlicher Signalweg wurde unter anderem der Wnt/ β -Catenin-Signalweg genauer untersucht. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg konnte bei *Mek1/2*-Defizienz als verstärkt aktiviert nachgewiesen werden. Dies konnte durch vermehrte mRNA-Expression und durch erhöhter Expressionswerte assoziierter Gene in einer RNA-Sequenzierung nachgewiesen werden. Somit scheint eine Beeinflussung der Differenzierung und Tumorentstehung durch den Signalweg möglich zu sein. Beide Signalwege, der PI3K/AKT- und MEK/ERK-Signalweg, zeigten einen Einfluss auf die Tumorentstehung.

Als nächsten Schritt kann sich eine noch tiefere und genauere Charakterisierung Ras-abhängiger Signalwege in der hepatischen Karzinogenese die Generierung eines *RPK-Mausmodells* mit gleichzeitig vorliegender *Pdk1*- und *Mek1/2*-Defizienz anschließen.

Durch die Inaktivierung beider Ras-abhängigen Signalwege könnte ein noch stärker verlangsamtes Tumorwachstum oder auch eine generelle Unterbindung der Tumorentstehung erreicht werden. Dies wäre eine Grundlage zur Entwicklung einer medikamentösen Therapie.

7 Literaturverzeichnis

- Abou-Alfa, G. K., Sahai, V., Hollebecque, A., Vaccaro, G., Melisi, D., Al-Rajabi, R., . . . Vogel, A. (2020). Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*, *21*(5), 671-684. doi:10.1016/s1470-2045(20)30109-1
- Akinyemiju, T., Abera, S., Ahmed, M., Alam, N., Alemayohu, M. A., Allen, C., . . . Fitzmaurice, C. (2017). The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol*, *3*(12), 1683-1691. doi:10.1001/jamaoncol.2017.3055
- Ally, A., Balasundaram, M., Carlsen, R., Chuah, E., Clarke, A., Dhalla, N., . . . Laird, P. W. (2017). Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*, *169*(7), 1327-1341.e1323. doi:10.1016/j.cell.2017.05.046
- Anthony, C. C., Robbins, D. J., Ahmed, Y., & Lee, E. (2020). Nuclear Regulation of Wnt/ β -Catenin Signaling: It's a Complex Situation. *Genes (Basel)*, *11*(8). doi:10.3390/genes11080886
- Anton, M., & Graham, F. L. (1995). Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. *J Virol*, *69*(8), 4600-4606. doi:10.1128/jvi.69.8.4600-4606.1995
- Anwanwan, D., Singh, S. K., Singh, S., Saikam, V., & Singh, R. (2020). Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, *1873*(1), 188314. doi:10.1016/j.bbcan.2019.188314
- Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C., & Rani, V. (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J Microsc*, *255*(1), 7-19. doi:10.1111/jmi.12133
- AWMF. (2023, 08/2023). Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome. Retrieved from https://www.dgvs.de/wp-content/uploads/2023/04/LL_Hepatozellulaeres_Karzinom_und_biliaere_Karzinome_Langversion_4.0_30.08.2023.pdf
- Bekaii-Saab, T. S., Valle, J. W., Van Cutsem, E., Rimassa, L., Furuse, J., Ioka, T., . . . Vogel, A. (2020). FIGHT-302: first-line pemigatinib vs gemcitabine plus cisplatin for advanced cholangiocarcinoma with FGFR2 rearrangements. *Future Oncol*, *16*(30), 2385-2399. doi:10.2217/fon-2020-0429
- Bengtsson, E., & Ranefall, P. (2019). Image Analysis in Digital Pathology: Combining Automated Assessment of Ki67 Staining Quality with Calculation of Ki67 Cell Proliferation Index. *Cytometry A*, *95*(7), 714-716. doi:10.1002/cyto.a.23685
- Blechacz, B., & Gores, G. J. (2008). Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology*, *48*(1), 308-321. doi:10.1002/hep.22310
- Boerner, T., Drill, E., Pak, L. M., Nguyen, B., Sigel, C. S., Doussot, A., . . . Jarnagin, W. R. (2021). Genetic Determinants of Outcome in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology*, *74*(3), 1429-1444. doi:10.1002/hep.31829
- Borger, D. R., Tanabe, K. K., Fan, K. C., Lopez, H. U., Fantin, V. R., Straley, K. S., . . . Iafrate, A. J. (2012). Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist*, *17*(1), 72-79. doi:10.1634/theoncologist.2011-0386
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for

- 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brigstock, D. R. (2002). Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). *Angiogenesis*, 5(3), 153-165. doi:10.1023/A:1023823803510
- Bundesamt für Justiz. (2021). Tierschutzgesetz §8. Retrieved from http://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/__8.html
- Campisi, J., Gray, H. E., Pardee, A. B., Dean, M., & Sonenshein, G. E. (1984). Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. *Cell*, 36(2), 241-247. doi:10.1016/0092-8674(84)90217-4
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2017). Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*, 169(7), 1327-1341.e1323. doi:10.1016/j.cell.2017.05.046
- Cardinale, V., Bragazzi, M. C., Carpino, G., Torrice, A., Fraveto, A., Gentile, R., . . . Alvaro, D. (2013). Cholangiocarcinoma: increasing burden of classifications. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2(5), 272-280. doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2013.10.02
- Chan-On, W., Nairismägi, M. L., Ong, C. K., Lim, W. K., Dima, S., Pairojkul, C., . . . Teh, B. T. (2013). Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. *Nat Genet*, 45(12), 1474-1478. doi:10.1038/ng.2806
- Charbel, H., & Al-Kawas, F. H. (2011). Cholangiocarcinoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, and diagnosis. *Curr Gastroenterol Rep*, 13(2), 182-187. doi:10.1007/s11894-011-0178-8
- Chen, K., Yang, J., Li, J., Wang, X., Chen, Y., Huang, S., & Chen, J. L. (2016). eIF4B is a convergent target and critical effector of oncogenic Pim and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in Abl transformants. *Oncotarget*, 7(9), 10073-10089. doi:10.18632/oncotarget.7164
- Chen, L., Li, M., Li, Q., Wang, C. J., & Xie, S. Q. (2013). DKK1 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion through β -catenin/MMP7 signaling pathway. *Mol Cancer*, 12, 157. doi:10.1186/1476-4598-12-157
- Chung, S. I., Moon, H., Ju, H. L., Kim, D. Y., Cho, K. J., Ribback, S., . . . Ro, S. W. (2016). Comparison of liver oncogenic potential among human RAS isoforms. *Oncotarget*, 7(6), 7354-7366. doi:10.18632/oncotarget.6931
- Churi, C. R., Shroff, R., Wang, Y., Rashid, A., Kang, H. C., Weatherly, J., . . . Javle, M. (2014). Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications. *PLoS One*, 9(12), e115383. doi:10.1371/journal.pone.0115383
- Coulouarn, C., Cavard, C., Rubbia-Brandt, L., Audebourg, A., Dumont, F., Jacques, S., . . . Terris, B. (2012). Combined hepatocellular-cholangiocarcinomas exhibit progenitor features and activation of Wnt and TGF β signaling pathways. *Carcinogenesis*, 33(9), 1791-1796. doi:10.1093/carcin/bgs208
- Croquelois, A., Blindenbacher, A., Terracciano, L., Wang, X., Langer, I., Radtke, F., & Heim, M. H. (2005). Inducible inactivation of Notch1 causes nodular regenerative hyperplasia in mice. *Hepatology*, 41(3), 487-496. doi:10.1002/hep.20571
- Curtin, F., & Schulz, P. (1998). Multiple correlations and Bonferroni's correction. *Biol Psychiatry*, 44(8), 775-777. doi:10.1016/s0006-3223(98)00043-2
- Degirmenci, U., Wang, M., & Hu, J. (2020). Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*, 9(1), 198. doi:10.3390/cells9010198

- Demir, T., Lee, S. S., & Kaseb, A. O. (2021). Systemic therapy of liver cancer. *Adv Cancer Res*, 149, 257-294. doi:10.1016/bs.acr.2020.12.001
- Doyle, A., McGarry, M. P., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2012). The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res*, 21(2), 327-349. doi:10.1007/s11248-011-9537-3
- Ehmer, U., Zmoos, A. F., Auerbach, R. K., Vaka, D., Butte, A. J., Kay, M. A., & Sage, J. (2014). Organ size control is dominant over Rb family inactivation to restrict proliferation in vivo. *Cell Rep*, 8(2), 371-381. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.025
- El-Diwany, R., Pawlik, T. M., & Ejaz, A. (2019). Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*, 28(4), 587-599. doi:10.1016/j.soc.2019.06.002
- Eppig, J. T. (2017). Mouse Genome Informatics (MGI) Resource: Genetic, Genomic, and Biological Knowledgebase for the Laboratory Mouse. *ILAR J*, 58(1), 17-41. doi:10.1093/ilar/ilx013
- Eser, S., Reiff, N., Messer, M., Seidler, B., Gottschalk, K., Dobler, M., . . . Saur, D. (2013). Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell*, 23(3), 406-420. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.023
- Everhart, J. E., & Ruhl, C. E. (2009). Burden of digestive diseases in the United States Part III: Liver, biliary tract, and pancreas. *Gastroenterology*, 136(4), 1134-1144. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.038
- Fan, B., Malato, Y., Calvisi, D. F., Naqvi, S., Razumilava, N., Ribback, S., . . . Willenbring, H. (2012). Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J Clin Invest*, 122(8), 2911-2915. doi:10.1172/jci63212
- Fan, Z., van de Rijn, M., Montgomery, K., & Rouse, R. V. (2003). Hep par 1 antibody stain for the differential diagnosis of hepatocellular carcinoma: 676 tumors tested using tissue microarrays and conventional tissue sections. *Mod Pathol*, 16(2), 137-144. doi:10.1097/01.Mp.0000052103.13730.20
- Farshidfar, F., Zheng, S., Gingras, M.-C., Newton, Y., Shih, J., Robertson, A. G., . . . Kwong, L. N. (2017). Integrative Genomic Analysis of Cholangiocarcinoma Identifies Distinct IDH-Mutant Molecular Profiles. *Cell Reports*, 18(11), 2780-2794. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.033
- Fatima, S., Lee, N. P., & Luk, J. M. (2011). Dickkopfs and Wnt/ β -catenin signalling in liver cancer. *World J Clin Oncol*, 2(8), 311-325. doi:10.5306/wjco.v2.i8.311
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., & Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20), 10887-10890. doi:10.1073/pnas.93.20.10887
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), E359-386. doi:10.1002/ijc.29210
- Fujimoto, A., Totoki, Y., Abe, T., Boroevich, K. A., Hosoda, F., Nguyen, H. H., . . . Nakagawa, H. (2012). Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet*, 44(7), 760-764. doi:10.1038/ng.2291
- Gebhardt, R., & Mecke, D. (1983). Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *EMBO J*, 2(4), 567-570.
- Geisler, F., Nagl, F., Mazur, P. K., Lee, M., Zimber-Strobl, U., Strobl, L. J., . . . Siveke, J. T. (2008). Liver-specific inactivation of Notch2, but not Notch1, compromises intrahepatic bile duct development in mice. *Hepatology*, 48(2), 607-616. doi:10.1002/hep.22381

- Ghosh, S., Salot, S., Sengupta, S., Navalkar, A., Ghosh, D., Jacob, R., . . . Maji, S. K. (2017). p53 amyloid formation leading to its loss of function: implications in cancer pathogenesis. *Cell Death Differ*, *24*(10), 1784-1798. doi:10.1038/cdd.2017.105
- Goodpaster, T., Legesse-Miller, A., Hameed, M. R., Aisner, S. C., Randolph-Habecker, J., & Collier, H. A. (2008). An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem*, *56*(4), 347-358. doi:10.1369/jhc.7A7287.2007
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I. B., . . . Zucman-Rossi, J. (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, *44*(6), 694-698. doi:10.1038/ng.2256
- Hall, B., Limaye, A., & Kulkarni, A. B. (2009). Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol, Chapter 19, Unit 19 12 19 12 11-17*. doi:10.1002/0471143030.cb1912s44
- He, S., & Tang, S. (2020). WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers. *Biomed Pharmacother*, *132*, 110851. doi:10.1016/j.biopha.2020.110851
- Ho, C., Wang, C., Mattu, S., Destefanis, G., Ladu, S., Delogu, S., . . . Calvisi, D. F. (2012). AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) and N-Ras (neuroblastoma ras viral oncogene homolog) coactivation in the mouse liver promotes rapid carcinogenesis by way of mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1), FOXM1 (forkhead box M1)/SKP2, and c-Myc pathways. *Hepatology*, *55*(3), 833-845. doi:10.1002/hep.24736
- Hoy, S. M. (2020). Pemigatinib: First Approval. *Drugs*, *80*(9), 923-929. doi:10.1007/s40265-020-01330-y
- Huang, D. Q., El-Serag, H. B., & Loomba, R. (2021). Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *18*(4), 223-238. doi:10.1038/s41575-020-00381-6
- Huang, J., Deng, Q., Wang, Q., Li, K. Y., Dai, J. H., Li, N., . . . Han, Z. G. (2012). Exome sequencing of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, *44*(10), 1117-1121. doi:10.1038/ng.2391
- Hubner, E. K., Lechler, C., Rosner, T. N., Kohnke-Ertel, B., Schmid, R. M., & Ehmer, U. (2018). Constitutive and Inducible Systems for Genetic In Vivo Modification of Mouse Hepatocytes Using Hydrodynamic Tail Vein Injection. *J Vis Exp*(132). doi:10.3791/56613
- Ikenoue, T., Terakado, Y., Nakagawa, H., Hikiba, Y., Fujii, T., Matsubara, D., . . . Furukawa, Y. (2016). A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. *Sci Rep*, *6*, 23899. doi:10.1038/srep23899
- Ivics, Z., & Izsvak, Z. (2015). Sleeping Beauty Transposition. *Microbiol Spectr*, *3*(2), MDNA3-0042-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0042-2014
- Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., . . . Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev*, *15*(24), 3243-3248. doi:10.1101/gad.943001
- Jain, R., Fischer, S., Serra, S., & Chetty, R. (2010). The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *18*(1), 9-15. doi:10.1097/PAI.0b013e3181ad36ea
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, *61*(2), 69-90. doi:10.3322/caac.20107
- Jiao, Y., Pawlik, T. M., Anders, R. A., Selaru, F. M., Streppel, M. M., Lucas, D. J., . . . Wood, L. D. (2013). Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1,

- ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet*, 45(12), 1470-1473. doi:10.1038/ng.2813
- Jögi, A., Vaapil, M., Johansson, M., & Pählman, S. (2012). Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. *Ups J Med Sci*, 117(2), 217-224. doi:10.3109/03009734.2012.659294
- Kakar, S., Muir, T., Murphy, L. M., Lloyd, R. V., & Burgart, L. J. (2003). Immunoreactivity of Hep Par 1 in hepatic and extrahepatic tumors and its correlation with albumin in situ hybridization in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 119(3), 361-366. doi:10.1309/8I872rphejrkf5jj
- Kapoor, A., Yao, W., Ying, H., Hua, S., Liewen, A., Wang, Q., . . . DePinho, R. A. (2014). Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. *Cell*, 158(1), 185-197. doi:10.1016/j.cell.2014.06.003
- Katoh, M., & Katoh, M. (2020). Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review). *Int J Mol Med*, 45(2), 279-297. doi:10.3892/ijmm.2019.4418
- Kim, H., Kim, M., Im, S. K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*, 34(4), 147-159. doi:10.5625/lar.2018.34.4.147
- Kipp, B. R., Voss, J. S., Kerr, S. E., Barr Fritcher, E. G., Graham, R. P., Zhang, L., . . . Halling, K. C. (2012). Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*, 43(10), 1552-1558. doi:10.1016/j.humpath.2011.12.007
- Kodama, Y., Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K., & Chiba, T. (2004). The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology*, 127(6), 1775-1786. doi:10.1053/j.gastro.2004.09.004
- Krasinskas, A. M., Moser, A. J., Saka, B., Adsay, N. V., & Chiosea, S. I. (2013). KRAS mutant allele-specific imbalance is associated with worse prognosis in pancreatic cancer and progression to undifferentiated carcinoma of the pancreas. *Mod Pathol*, 26(10), 1346-1354. doi:10.1038/modpathol.2013.71
- Kumar, T. R., Larson, M., Wang, H., McDermott, J., & Bronshteyn, I. (2009). Transgenic mouse technology: principles and methods. *Methods Mol Biol*, 590, 335-362. doi:10.1007/978-1-60327-378-7_22
- Kunz, M., & Ibrahim, S. M. (2003). Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol Cancer*, 2, 23. doi:10.1186/1476-4598-2-23
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670-691. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037
- Lee, S. Y., Ju, M. K., Jeon, H. M., Jeong, E. K., Lee, Y. J., Kim, C. H., . . . Kang, H. S. (2018). Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 3537471. doi:10.1155/2018/3537471
- Li, Y., Jin, K., van Pelt, G. W., van Dam, H., Yu, X., Mesker, W. E., . . . Zhang, L. (2016). c-Myb Enhances Breast Cancer Invasion and Metastasis through the Wnt/ β -Catenin/Axin2 Pathway. *Cancer Res*, 76(11), 3364-3375. doi:10.1158/0008-5472.Can-15-2302
- Liu, H., Mastriani, E., Yan, Z. Q., Yin, S. Y., Zeng, Z., Wang, H., . . . Liu, S. L. (2016). SOX7 co-regulates Wnt/ β -catenin signaling with Axin-2: both expressed at low levels in breast cancer. *Sci Rep*, 6, 26136. doi:10.1038/srep26136
- Liu, Y., Ao, X., Ding, W., Ponnusamy, M., Wu, W., Hao, X., . . . Wang, J. (2018). Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Mol Cancer*, 17(1), 104. doi:10.1186/s12943-018-0856-3

- Liu, Z., Yang, D., Li, Y., Jiao, Y., & Lv, G. (2020). HN1 as a diagnostic and prognostic biomarker for liver cancer. *Biosci Rep*, *40*(7). doi:10.1042/bsr20200316
- Llovet, J. M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., & Gores, G. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, *2*, 16018. doi:10.1038/nrdp.2016.18
- Loeppen, S., Schneider, D., Gaunitz, F., Gebhardt, R., Kurek, R., Buchmann, A., & Schwarz, M. (2002). Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital. *Cancer Res*, *62*(20), 5685-5688.
- Marquardt, J. U., Andersen, J. B., & Thorgeirsson, S. S. (2015). Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat Rev Cancer*, *15*(11), 653-667. doi:10.1038/nrc4017
- McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., & Pinto, A. R. (2017). Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol*, *7*(1), 1-12. doi:10.1002/cpmo.22
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., & Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(15), 6991-6995. doi:10.1073/pnas.92.15.6991
- Miao, H. L., Pan, Z. J., Lei, C. J., Wen, J. Y., Li, M. Y., Liu, Z. K., . . . Chen, M. (2013). Knockdown of GPC3 inhibits the proliferation of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of YAP. *J Cell Biochem*, *114*(3), 625-631. doi:10.1002/jcb.24404
- Mishra, P., Singh, U., Pandey, C. M., Mishra, P., & Pandey, G. (2019). Application of student's t-test, analysis of variance, and covariance. *Ann Card Anaesth*, *22*(4), 407-411. doi:10.4103/aca.ACA_94_19
- Mittal, S., & El-Serag, H. B. (2013). Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J Clin Gastroenterol*, *47* Suppl(0), S2-6. doi:10.1097/MCG.0b013e3182872f29
- Moeini, A., Haber, P. K., & Sia, D. (2021). Cell of origin in biliary tract cancers and clinical implications. *JHEP Rep*, *3*(2), 100226. doi:10.1016/j.jhepr.2021.100226
- Moon, S., Lee, S., Caesar, J. A., Pruchenko, S., Leask, A., Knowles, J. A., . . . Chaqour, B. (2020). A CTGF-YAP Regulatory Pathway Is Essential for Angiogenesis and Barrierogenesis in the Retina. *iScience*, *23*(6), 101184. doi:https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101184
- Mu, X., Pradere, J. P., Affò, S., Dapito, D. H., Friedman, R., Lefkovitch, J. H., & Schwabe, R. F. (2016). Epithelial Transforming Growth Factor- β Signaling Does Not Contribute to Liver Fibrosis but Protects Mice From Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*, *150*(3), 720-733. doi:10.1053/j.gastro.2015.11.039
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, *26*(2), 99-109. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686599>
- Nakamura, H., Arai, Y., Totoki, Y., Shirota, T., Elzawahry, A., Kato, M., . . . Shibata, T. (2015). Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet*, *47*(9), 1003-1010. doi:10.1038/ng.3375
- Nault, J. C., & Zucman-Rossi, J. (2011). Genetics of hepatobiliary carcinogenesis. *Semin Liver Dis*, *31*(2), 173-187. doi:10.1055/s-0031-1276646
- Oh, D.-Y., Ruth He, A., Qin, S., Chen, L.-T., Okusaka, T., Vogel, A., . . . Valle Juan, W. (2022). Durvalumab plus Gemcitabine and Cisplatin in Advanced Biliary Tract Cancer. *NEJM Evidence*, *1*(8), EVIDoaa2200015. doi:10.1056/EVIDoaa2200015

- Okuda, K., Nakanuma, Y., & Miyazaki, M. (2002). Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 1: epidemiology and etiology. *J Gastroenterol Hepatol*, 17(10), 1049-1055. doi:10.1046/j.1440-1746.2002.02781.x
- Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mota, J. M., Costa, R., Leite, C. A., Barroso-Sousa, R., . . . Giles, F. J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 101. doi:10.1186/s13045-017-0471-6
- Patel, T. (2002). Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. *BMC Cancer*, 2, 10. doi:10.1186/1471-2407-2-10
- Petrick, J. L., Braunlin, M., Laversanne, M., Valery, P. C., Bray, F., & McGlynn, K. A. (2016). International trends in liver cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1978-2007. *Int J Cancer*, 139(7), 1534-1545. doi:10.1002/ijc.30211
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Pierce, A. M., Schneider-Broussard, R., Gimenez-Conti, I. B., Russell, J. L., Conti, C. J., & Johnson, D. G. (1999). E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. *Mol Cell Biol*, 19(9), 6408-6414. doi:10.1128/mcb.19.9.6408
- Razumilava, N., & Gores, G. J. (2014). Cholangiocarcinoma. *Lancet*, 383(9935), 2168-2179. doi:10.1016/s0140-6736(13)61903-0
- Riggio, M., Polo, M. L., Blaustein, M., Colman-Lerner, A., Lüthy, I., Lanari, C., & Novaro, V. (2012). PI3K/AKT pathway regulates phosphorylation of steroid receptors, hormone independence and tumor differentiation in breast cancer. *Carcinogenesis*, 33(3), 509-518. doi:10.1093/carcin/bgr303
- Rizvi, S., & Gores, G. J. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*, 145(6), 1215-1229. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.013
- Rizvi, S., Khan, S. A., Hallemeier, C. L., Kelley, R. K., & Gores, G. J. (2018). Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol*, 15(2), 95-111. doi:10.1038/nrclinonc.2017.157
- Robert Lukowski, S. W., Pascal Weinmeister, Susanne Feil und Robert Feil (2005). Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOspektrum*, 287, 288. Retrieved from https://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=934579
- Román, M., Baraibar, I., López, I., Nadal, E., Rolfo, C., Vicent, S., & Gil-Bazo, I. (2018). KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Mol Cancer*, 17(1), 33. doi:10.1186/s12943-018-0789-x
- Rotoli, D., Morales, M., Ávila, J., Maeso, M. D. C., García, M. D. P., Mobasher, A., & Martín-Vasallo, P. (2017). Commitment of Scaffold Proteins in the Onco-Biology of Human Colorectal Cancer and Liver Metastases after Oxaliplatin-Based Chemotherapy. *Int J Mol Sci*, 18(4). doi:10.3390/ijms18040891
- Russell, J. O., & Monga, S. P. (2018). Wnt/ β -Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology. *Annu Rev Pathol*, 13, 351-378. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-044010
- Saha, S. K., Zhu, A. X., Fuchs, C. S., & Brooks, G. A. (2016). Forty-Year Trends in Cholangiocarcinoma Incidence in the U.S.: Intrahepatic Disease on the Rise. *Oncologist*, 21(5), 594-599. doi:10.1634/theoncologist.2015-0446
- Salvador, J. M., Brown-Clay, J. D., & Fornace, A. J., Jr. (2013). Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 793, 1-19. doi:10.1007/978-1-4614-8289-5_1

- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., . . . Schultz, N. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*, *173*(2), 321-337.e310. doi:10.1016/j.cell.2018.03.035
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*, *68*(18), 3033-3046. doi:10.1007/s00018-011-0735-1
- Sauer, B., & Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(14), 5166-5170. doi:10.1073/pnas.85.14.5166
- Schacherer, D., & Schlottmann, K. (2009). Diagnostik und Staging des HCC. *Hepatitis&more Ausgabe 1 - 2009*. Retrieved from https://www.hepatitisandmore.de/archiv/2009-1/Hep1_09_FoBiSchacherer.pdf
- Sekiya, S., & Suzuki, A. (2012). Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J Clin Invest*, *122*(11), 3914-3918. doi:10.1172/JCI63065
- Shagufta, & Ahmad, I. (2018). Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *Eur J Med Chem*, *143*, 515-531. doi:10.1016/j.ejmech.2017.11.056
- Shahid, M., Mubeen, A., Tse, J., Kakar, S., Bateman, A. C., Borger, D., . . . Deshpande, V. (2015). Branched chain in situ hybridization for albumin as a marker of hepatocellular differentiation: evaluation of manual and automated in situ hybridization platforms. *Am J Surg Pathol*, *39*(1), 25-34. doi:10.1097/pas.0000000000000343
- Sheahan, S., Bellamy, C. O., Dunbar, D. R., Harrison, D. J., & Prost, S. (2007). Deficiency of G1 regulators P53, P21Cip1 and/or pRb decreases hepatocyte sensitivity to TGFbeta cell cycle arrest. *BMC Cancer*, *7*, 215. doi:10.1186/1471-2407-7-215
- Shen, Q., & Reedijk, M. (2021). Notch Signaling and the Breast Cancer Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, *1287*, 183-200. doi:10.1007/978-3-030-55031-8_12
- Shlomai, A., de Jong, Y. P., & Rice, C. M. (2014). Virus associated malignancies: the role of viral hepatitis in hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol*, *26*, 78-88. doi:10.1016/j.semcancer.2014.01.004
- Shome, D., von Woedtke, T., Riedel, K., & Masur, K. (2020). The HIPPO Transducer YAP and Its Targets CTGF and Cyr61 Drive a Paracrine Signalling in Cold Atmospheric Plasma-Mediated Wound Healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, 4910280. doi:10.1155/2020/4910280
- Sia, D., Losic, B., Moeini, A., Cabellos, L., Hao, K., Revill, K., . . . Llovet, J. M. (2015). Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2-PPHLN1 fusion and ARAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun*, *6*, 6087. doi:10.1038/ncomms7087
- Solberg, N. T., Melheim, M., Strand, M. F., Olsen, P. A., & Krauss, S. (2019). MEK Inhibition Induces Canonical WNT Signaling through YAP in KRAS Mutated HCT-15 Cells, and a Cancer Preventive FOXO3/FOXO1 Ratio in Combination with TNKS Inhibition. *Cancers (Basel)*, *11*(2). doi:10.3390/cancers11020164
- Soriano, O., Alcón-Pérez, M., Vicente-Manzanares, M., & Castellano, E. (2021). The Crossroads between RAS and RHO Signaling Pathways in Cellular Transformation, Motility and Contraction. *Genes (Basel)*, *12*(6). doi:10.3390/genes12060819
- Spangenberg, H. C., Thimme, R., & Blum, H. E. (2009). Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *6*(7), 423-432. doi:10.1038/nrgastro.2009.86
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L., & Dang, C. V. (2015). MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov*, *5*(10), 1024-1039. doi:10.1158/2159-8290.Cd-15-0507

- Subbiah, V., Lassen, U., Élez, E., Italiano, A., Curigliano, G., Javle, M., . . . Wainberg, Z. A. (2020). Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF(V600E)-mutated biliary tract cancer (ROAR): a phase 2, open-label, single-arm, multicentre basket trial. *Lancet Oncol*, 21(9), 1234-1243. doi:10.1016/s1470-2045(20)30321-1
- Sun, E. J., Wankell, M., Palamuthusingam, P., McFarlane, C., & Hebbard, L. (2021). Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*, 9(11). doi:10.3390/biomedicines9111639
- Taniguchi, K., Roberts, L. R., Aderca, I. N., Dong, X., Qian, C., Murphy, L. M., . . . Liu, W. (2002). Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, 21(31), 4863-4871. doi:10.1038/sj.onc.1205591
- Thamavit, W., Bhamarapavati, N., Sahaphong, S., Vajrasthira, S., & Angsubhakorn, S. (1978). Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res*, 38(12), 4634-4639.
- Thermo Fisher Scientific. (2021). Wichtige Informationen zur Real-Time PCR. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
- Tong, C., Huang, G., Ashton, C., Li, P., & Ying, Q. L. (2011). Generating gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nat Protoc*, 6(6), 827-844. doi:10.1038/nprot.2011.338
- Torry, D. S., & Cooper, G. M. (1991). Proto-oncogenes in development and cancer. *Am J Reprod Immunol*, 25(3), 129-132. doi:10.1111/j.1600-0897.1991.tb01080.x
- Totoki, Y., Tatsuno, K., Yamamoto, S., Arai, Y., Hosoda, F., Ishikawa, S., . . . Shibata, T. (2011). High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet*, 43(5), 464-469. doi:10.1038/ng.804
- Tremblay, I., Paré, E., Arsenault, D., Douziech, M., & Boucher, M. J. (2013). The MEK/ERK pathway promotes NOTCH signalling in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 8(12), e85502. doi:10.1371/journal.pone.0085502
- van Zijl, F., Zulehner, G., Petz, M., Schneller, D., Kornauth, C., Hau, M., . . . Mikulits, W. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol*, 5(8), 1169-1179. doi:10.2217/fon.09.91
- Vetmeduni, W. (2016). Was Sie über Tierversuche wissen sollten. Retrieved from https://www.vetmeduni.ac.at/fileadmin/v/z/forschung/infobroschuere_terversuche_06-2016.pdf
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545), 1299-1304. doi:10.1126/science.1062023
- Wang, P., Dong, Q., Zhang, C., Kuan, P. F., Liu, Y., Jeck, W. R., . . . Chiang, D. Y. (2013). Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene*, 32(25), 3091-3100. doi:10.1038/onc.2012.315
- Wen, Y., Jeong, S., Xia, Q., & Kong, X. (2016). Role of Osteopontin in Liver Diseases. *Int J Biol Sci*, 12(9), 1121-1128. doi:10.7150/ijbs.16445
- Yamada, D., Rizvi, S., Razumilava, N., Bronk, S. F., Davila, J. I., Champion, M. D., . . . Gores, G. J. (2015). IL-33 facilitates oncogene-induced cholangiocarcinoma in mice by an interleukin-6-sensitive mechanism. *Hepatology*, 61(5), 1627-1642. doi:10.1002/hep.27687
- Yamamoto, M., Xin, B., Watanabe, K., Ooshio, T., Fujii, K., Chen, X., . . . Nishikawa, Y. (2017). Oncogenic Determination of a Broad Spectrum of Phenotypes of Hepatocyte-Derived

- Mouse Liver Tumors. *Am J Pathol*, 187(12), 2711-2725. doi:10.1016/j.ajpath.2017.07.022
- Yang, J. D., Kim, W. R., Coelho, R., Mettler, T. A., Benson, J. T., Sanderson, S. O., . . . Roberts, L. R. (2011). Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9(1), 64-70. doi:10.1016/j.cgh.2010.08.019
- Yang, S., & Liu, G. (2017). Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 13(3), 1041-1047. doi:10.3892/ol.2017.5557
- Yeh, M. M. (2010). Pathology of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 25(9), 1485-1492. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06430.x
- Zender, S., Nিকেleit, I., Wuestefeld, T., Sørensen, I., Dauch, D., Bozko, P., . . . Malek, N. P. (2013). A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. *Cancer Cell*, 23(6), 784-795. doi:10.1016/j.ccr.2013.04.019
- Zhan, T., Ambrosi, G., Wandmacher, A. M., Rauscher, B., Betge, J., Rindtorff, N., . . . Boutros, M. (2019). MEK inhibitors activate Wnt signalling and induce stem cell plasticity in colorectal cancer. *Nature Communications*, 10(1), 2197. doi:10.1038/s41467-019-09898-0
- Zhang, L., Jiang, B., Zhu, N., Tao, M., Jun, Y., Chen, X., . . . Luo, C. (2019). Mitotic checkpoint kinase Mps1/TTK predicts prognosis of colon cancer patients and regulates tumor proliferation and differentiation via PKC α /ERK1/2 and PI3K/Akt pathway. *Med Oncol*, 37(1), 5. doi:10.1007/s12032-019-1320-y
- Zhu, A. X., Macarulla, T., Javle, M. M., Kelley, R. K., Lubner, S. J., Adeva, J., . . . Abou-Alfa, G. K. (2021). Final Overall Survival Efficacy Results of Ivosidenib for Patients With Advanced Cholangiocarcinoma With IDH1 Mutation: The Phase 3 Randomized Clinical ClarIDHy Trial. *JAMA Oncol*, 7(11), 1669-1677. doi:10.1001/jamaoncol.2021.3836
- Zhu, Y., & Kwong, L. N. (2020). Insights Into the Origin of Intrahepatic Cholangiocarcinoma From Mouse Models. *Hepatology*, 72(1), 305-314. doi:10.1002/hep.31200
- Zinatizadeh, M. R., Miri, S. R., Zarandi, P. K., Chalbatani, G. M., Rapôso, C., Mirzaei, H. R., . . . Mahmoodzadeh, H. (2021). The Hippo Tumor Suppressor Pathway (YAP/TAZ/TEAD/MST/LATS) and EGFR-RAS-RAF-MEK in cancer metastasis. *Genes Dis*, 8(1), 48-60. doi:10.1016/j.gendis.2019.11.003
- Zong, Y., Panikkar, A., Xu, J., Antoniou, A., Raynaud, P., Lemaigre, F., & Stanger, B. Z. (2009). Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*, 136(10), 1727-1739. doi:10.1242/dev.029140
- Zou, S., Li, J., Zhou, H., Frech, C., Jiang, X., Chu, J. S., . . . Hu, H. (2014). Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun*, 5, 5696. doi:10.1038/ncomms6696

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung TUM Graduate School, Fakultät für Medizin, TUM Graduate School, Fakultät für Medizin, der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

„Relevanz des MEK/ERK-Signalweges in der hepatischen Karzinogenese“

in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

unter der Anleitung und Betreuung durch Frau PD Dr. med. Ursula Ehmer und Herrn PD Dr. med. Fabian Geisler ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Ab. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vollständige Dissertation wurde in _____ veröffentlicht. Die promotionsführende Einrichtung _____

hat der Veröffentlichung zugestimmt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bereits am _____ bei der Fakultät für _____

_____ der Hochschule _____ unter

Vorlage einer Dissertation mit dem Thema _____

_____ die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis: _____

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

einverstanden, nicht einverstanden.

9 Publikationsliste

Eine Auswahl der in dieser Ausarbeitung analysierten Ergebnisse wurden in Form eines Abstracts und einer wissenschaftlichen Posterpräsentation nach erfolgtem peer-review Verfahren auf dem International Liver Congress™ 2021 präsentiert:

Rupp, C., Rösner, T., Lechler, C., Manmadhan, S., Kohnke-Ertel, B., Schwenke, J., . . . Ehmer, U. (2021). Differential requirement of RAS-dependent signaling pathways in tumor development and differentiation in murine liver cancer. *Journal of Hepatology*; , 498-499. doi:10.1016/S0168-8278(21)01843-2

Rupp, C., Rösner, T., Bauer, U., Kohnke-Ertel, B., Lechler, C., Steiger, K., Mogler, C., Becker, D., Marquardt, JU., Rad, R., Saur, D., Schmid, RM., Ehmer, U.; MEK/ERK signaling downstream of mutant Kras drives biliary differentiation in murin cholangiocarcinoma. *Z Gastroenterol* (2021); 59(08): e212-e213 DOI: 10.1055/s-0041-1733626

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich PD Dr. Ursula Ehmer für das herausragende Mentoring und die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe diese experimentelle Forschungsarbeit durchzuführen. Des Weiteren bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die kontinuierliche Unterstützung während der Versuchsarbeiten.

Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Fabian Geisler für die Betreuung und das stets konstruktive Feedback während der Versuchsdurchführungen und den Auswertungen bedanken.

Ein Dank geht auch an Prof. Dr. Dieter Saur für die Bereitstellung der Mauslinien *Mek1^{lox/lox}*, *Map2k2^{-/-}* und *Pdk1^{lox/lox}* sowie an die Arbeitsgemeinschaft Rad (TU München, Klinikum rechts der Isar) für die Durchführung der RNA-Sequenzierung.

Meiner Familie und Freunden danke ich für die Geduld und die Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.