

**Die Rolle des anti-apoptischen Proteins
Mcl-1 für die Leber und das
hepatozelluläre Karzinom**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von
Binje Vick geb. Fleischer
Geboren am 28.10.1978 in Cuxhaven
Mainz, den 30.07.2009

Dekan:

Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

23.02.2010

Für Greta

Danksagung

Viele Menschen haben dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit mit Erfolg und mit jeder Menge Spaß dabei durchführen konnte. Ich möchte allen mein herzliches Dankeschön ausdrücken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
I Einleitung.....	5
Apoptose	5
Definition und Charakteristika der Apoptose	5
Induktion von Apoptose	7
Extrinsischer Signalweg und Todesrezeptoren	8
Intrinsischer Signalweg und Mitochondrien	13
Die Bedeutung der Bcl-2-Proteinfamilie	14
Kenntnisstand zu Mcl-1	17
Mcl-1 und Tumorerkrankungen	19
Mcl-1 in der Leber	20
Das hepatozelluläre Karzinom	21
II Material und Methoden	24
1. Mausmodell	24
1.1 Generierung einer Hepatozyten-spezifischen Mcl-1 Knockout Mauslinie.....	24
2. Zellbiologische Methoden	25
2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	25
2.2 Splitten von Zellen.....	25
2.3 Zellzahlbestimmung	26
2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
2.5 Transfektion von Zellen	26
2.6 Behandlung der Zellen	27
2.7 Messung apoptotischer Zellen (Nicoletti).....	28
2.8 Isolierung primärer muriner Hepatozyten	29
3. Proteinbiochemische Methoden.....	30
3.1 Isolierung von Proteinen.....	30
3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach LOWRY	31
3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.4 Western Blot	32
3.5 Caspase-Assay.....	33
3.6 Immunhistochemie	34

3.7	Proliferationsfärbung mittels BrdU-Einlagerung	35
3.8	TUNEL-Färbung.....	36
3.9	Transaminasenmessung	37
4.	Molekularbiologische Methoden.....	38
4.1	Isolierung von RNA	38
4.2	Reverse Transkription	38
4.3	Real Time-PCR.....	39
4.4	Genotypisierung der Mäuse	39
4.5	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	40
5.	Leberschädigungsmodelle	41
5.1	CD95-vermittelte Leberschädigung	41
5.2	Concanavalin A-induzierte Leberschädigung	41
5.3	Tetrachlorkohlenstoff-vermittelte Leberschädigung	41
III	Ergebnisse	42
1.	Bedeutung von Mcl-1 für das hepatozelluläre Karzinom	42
1.1	Expression von Mcl-1 in humanem HCC-Gewebe.....	42
1.2	Ansprechen von HCC-Zellen auf Chemotherapie in vitro.	45
1.3	Verstärkte Resistenz von HCC-Zellen mit erhöhter Mcl-1-Expression.	47
1.4	Verstärkte Apoptosesensitivität von HCC-Zellen nach PI3-Kinase Hemmung. ...	49
1.5	Inhibition der Mcl-1-Expression durch RNA-Interferenz.....	53
1.6	Sensitivierung der HCC-Zellen gegenüber Chemotherapie durch Mcl-1-Silencing.....	57
1.7	Sensitivierung der HCC-Zellen gegenüber PI3K- und Cox-2-Hemmung durch Mcl-1-Silencing.....	60
1.8	Sensitivierung der HCC-Zellen gegenüber einer kombinierten Therapie durch Mcl-1-Silencing.....	62
2.	Bedeutung von Mcl-1 für die Leber	65
2.1	Etablierung einer Mauslinie mit Mcl-1 negativen Hepatozyten.....	65
2.2	Expression pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine in Mcl-1 ^{flox/flox} -AlbCre-Mäusen.....	69
2.3	Basale Leberschädigung in Mcl-1 ^{flox/flox} -AlbCre-Mäusen.	70
2.4	Erhöhte Basalapoptoserate in Mcl-1 ^{flox/flox} -AlbCre-Mäusen.	72
2.5	Erhöhte Proliferationsrate in Mcl-1 ^{flox/flox} -AlbCre-Mäusen.....	74
2.6	Entzündung und Fibrosebildung in Lebern von Mcl-1 ^{flox/flox} -AlbCre-Mäusen.....	76
2.7	Größere Sensitivität von Mcl-1 ^{flox/flox} -AlbCre-Mäusen gegenüber CD95-vermitteltem Leberversagen.	78

2.8	Erhöhte Sensitivität von Mcl-1 ^{flox/flox} -AlbCre-Mäusen gegenüber T-Zell- vermitteltem Leberversagen.	81
2.9	Fehlender Einfluss der Mcl-1-Expression auf chronische Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff.	83
IV	Diskussion	85
	Mcl-1 im hepatozellulären Karzinom	85
	Mcl-1 in der Leber.....	97
	Literaturverzeichnis	103
	Abkürzungsverzeichnis	115
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Publikationen und Abstracts	118
	Erklärung.....	119
	Anhänge.....	120

Zusammenfassung

Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) ist ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie. Als solches ist es in der Lage, die mitochondriale Aktivierung während der Apoptose zu hemmen. Dadurch schützt es Zellen bei zellulärem Stress (wie z.B. Differenzierung, Proliferation oder Virusinfektion) vor Apoptoseinduktion. Aufgrund dieser Eigenschaft ist es unabkömmlich während der Embryogenese und in verschiedenen hämatopoetischen Zellpopulationen. Des Weiteren ist Mcl-1 als Protoonkogen in verschiedenen humanen Tumorentitäten verstärkt exprimiert und kann so zu einer verminderten Apoptosesensitivität von Tumorzellen beitragen. Auch primäre humane Hepatozyten können nach Mcl-1-Induktion durch Wachstumsfaktorbehandlung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose geschützt werden.

Daher sollte untersucht werden, welche Bedeutung Mcl-1 im hepatozellulären Karzinom (HCC) und in der gesunden Leber einnimmt.

Hierzu wurde zunächst humanes HCC-Gewebe hinsichtlich der Expression von Mcl-1 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Mcl-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in HCC-Gewebe verstärkt exprimiert ist im Vergleich zu benachbartem Normalgewebe. Auch in verschiedenen HCC-Zelllinien konnte eine starke Mcl-1-Expression nachgewiesen werden. Diese war vor allem über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert. Eine Hemmung dieses Signalwegs führte zu einer Reduktion der Mcl-1-Expression und so zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika und zielgerichteten Therapien. Des Weiteren wurde die Mcl-1-Expression spezifisch durch RNA-Interferenz gehemmt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass Zellen mit unterdrückter Mcl-1-Expression deutlich sensitiver gegenüber verschiedenen Apoptose-induzierenden Substanzen reagierten. Eine kombinierte Hemmung der Mcl-1-Expression und der PI3-Kinase führte schließlich zu einer nochmals verstärkten Sensitivierung. Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression von Mcl-1 zu einer Hemmung der Apoptoseinduktion.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Mauslinie etabliert, welche spezifisch in Hepatozyten kein Mcl-1 exprimiert, um so die Bedeutung von Mcl-1 für die Leber *in vivo* zu untersuchen. Es zeigte sich, dass Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäuse bereits im Alter von acht Wochen eine verminderte Lebergröße aufweisen. Dies wurde verursacht durch spontane Apoptoseinduktion in den Mcl-1 negativen Hepatozyten. Hierdurch kam es zu einer Leberschädigung, ersichtlich durch erhöhte Transaminasenwerte, erhöhte Caspase-3-

Aktivierung, und Schädigung der Gewebsstruktur. Zudem war als kompensatorischer Effekt die Zellproliferation erhöht, ohne dass sich jedoch das Lebergewicht an das von Kontrolltieren angleich. Interessanterweise kam es in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen als Folge der chronischen Leberschädigung zur Entwicklung einer Leberfibrose, ersichtlich durch eine verstärkte Collageneinlagerung. Weiterhin reagierten Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäuse wesentlich empfindlicher gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose.

Diese Daten zeigen zum einen, dass Mcl-1 zur Apoptoseresistenz von HCC-Zellen beitragen kann. Zielgerichtete Therapien, welche die Expression von Mcl-1 hemmen, könnten folglich für die Therapie des HCCs von Interesse sein. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Mcl-1 ein zentraler anti-apoptotischer Faktor für Hepatozyten *in vivo* ist.

Abstract

Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) is an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family of proteins. It interacts with pro-apoptotic Bcl-2 family members, thereby inhibiting mitochondrial activation and induction of apoptosis. It protects cells from apoptosis induction during cellular stress (i.e. differentiation, proliferation or viral infection). In addition, Mcl-1 is essential for embryonal development and the maintenance of B, T and hematopoietic stem cells. Furthermore, it is highly expressed in human tumors of diverse origins, contributing to a reduced apoptosis sensitivity of tumor cells. It was recently shown that induction of Mcl-1 by growth factors rescues primary human hepatocytes from CD95-mediated apoptosis.

The aim of this thesis was to analyze the role of Mcl-1 for apoptosis sensitivity of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and for homeostasis in the normal liver.

First, human HCC tissue was analyzed for Mcl-1 expression. It could be shown that Mcl-1 expression was enhanced in HCC tissue compared to adjacent liver tissue, both on mRNA and protein level. Different HCC cell lines also showed a strong expression of Mcl-1. This expression of Mcl-1 was mainly regulated via the PI3K/Akt signalling pathway. Inhibition of this pathway caused a reduction in Mcl-1 expression and a sensitization of the cells towards different chemotherapeutic drugs as well as targeted therapies.

Next, Mcl-1 expression was specifically downregulated via RNA interference. Again, cells with a reduced Mcl-1 expression reacted more sensitive towards different apoptosis inducing substrates. A combined inhibition of Mcl-1 expression and PI3-kinase enhanced these apoptosis sensitizing effects. In contrary, cells with an enhanced expression of Mcl-1 were more resistant towards apoptosis induction.

In the second part of this thesis, a hepatocyte-specific *Mcl-1* knockout mouse ($Mcl-1^{\text{flox/flox}}$ -AlbCre) was established. Thereby, the role of Mcl-1 for the normal liver could be analyzed *in vivo*. These $Mcl-1^{\text{flox/flox}}$ -AlbCre mice had a reduced liver size, already at the age of eight weeks. This was the result of a spontaneous apoptosis induction in Mcl-1 negative hepatocytes. This caused severe liver cell damage, apparent by increased serum transaminase values, enhanced caspase-3 activation, and an architectural damage of the liver. As a compensatory mechanism, proliferation of hepatocytes was enhanced in the absence of Mcl-1. Importantly, hepatic fibrosis occurs in Mcl-1 negative livers in response to chronic liver damage, apparent by an increased collagen expression. Furthermore,

Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre mice were more susceptible towards hepatocellular damage induced by agonistic anti-CD95 antibodies or concanavalin A.

The presented data show on the one hand, that Mcl-1 contributes to apoptosis resistance of HCC cells. Thus, targeted therapies inhibiting Mcl-1 expression are a promising approach for the treatment of HCC patients.

Furthermore, this study provides *in vivo* evidence that Mcl-1 is a central anti-apoptotic factor for the liver, contributing to hepatocellular homeostasis and protecting hepatocytes from apoptosis induction.

I Einleitung

Apoptose

Die Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, ist eine physiologische Form des Zelltods und ein zentraler Prozess in multizellulären Organismen. Es handelt sich hierbei um einen genetisch kontrollierten Prozess, dessen Regulation und Ausführung in Metazoen konserviert sind [Danial und Korsmeyer, 2004]. Die Apoptose ist unter anderem für die Gewebshomöostase und dadurch bereits in der Embryonalentwicklung von Bedeutung. Zellen, welche nicht mehr benötigt werden, können durch Apoptose beseitigt werden. Durch Induktion von Apoptose hat der Organismus zudem die Möglichkeit, potentiell gefährliche Zellen, wie z.B. Zellen mit maligner Transformation, virusinfizierte Zellen oder autoreaktive Immunzellen zu beseitigen [Krammer, 2000; Danial und Korsmeyer, 2004].

Entdeckt wurde die Apoptose 1951 von dem Embryologen Glucksmann, der das Absterben embryonalen Gewebes auf den Tod einzelner Zellen zurückführte [Glucksmann, 1951]. Der Begriff der Apoptose wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt, welche bei Toxin-behandelten Leberzellen eine ähnliche morphologische Veränderung wie bei absterbenden Embryonalzellen beobachteten [Kerr *et al.*, 1972]. Apoptosesignalwege sind unter physiologischen Bedingungen streng reguliert. Bei zahlreichen Erkrankungen konnte inzwischen gezeigt werden, dass eine Fehlsteuerung des Apoptoseprogramms zur Pathophysiologie beiträgt.

Definition und Charakteristika der Apoptose

Die Apoptose ist ein energieabhängiger Prozess, der durch zahlreiche biochemische und morphologische Veränderungen definiert ist. Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins, das im Bereich der nukleären Peripherie aggregiert. Bei der Apoptose wird die DNA in den kondensierten Chromosomen durch spezielle Endonukleasen (s. S. 10) abgebaut, so dass sich nach elektrophoretischer Auftrennung eine charakteristische DNA-Leiter bildet [Wyllie *et al.*, 1980]. Darüber hinaus führt ein Verlust der Membranstabilität zu Ausstülpungen der Zelle (Zeiose). Dies mündet schließlich im Abschnüren membranumschlossener Teile der Zelle, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Apoptotische Zellen verändern zudem ihre Oberfläche. Es wird ein Verlust der Membranasymmetrie beobachtet, was zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche führt. Zusätzlich findet sich auf apoptotischen Zellen

ein verändertes Kohlenhydratmuster, und es werden verschiedene Liganden auf der Oberfläche exprimiert. Über diese Merkmale werden die apoptotischen Körperchen von Makrophagen, dendritischen Zellen oder anderen benachbarten Zellen erkannt, aufgenommen und abgebaut [Maderna und Godson, 2003]. In der Leber sind Kupffer-Zellen wesentlich an der Phagozytose von apoptotischen Hepatozyten beteiligt. Normalerweise sind die Apoptoseinduktion und die Phagozytose der apoptotischen Zellen nicht von einer Entzündungsreaktion begleitet. In der Leber kann aber eine verstärkte Apoptose von Hepatozyten unter pathologischen Bedingungen zu einer Entzündungsreaktion führen, die von aktivierten Kupffer-Zellen über die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen unterhalten wird. Dies kann letztlich die Entstehung von Lebertumoren begünstigen [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2006a; Luedde *et al.*, 2007].

Andere Formen des Zelltods

Im Gegensatz zur Apoptose ist die **Nekrose**, die auch als Onkose oder onkotische Nekrose bezeichnet wird [Majno und Joris, 1995], keinem geregelten Mechanismus zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren unterworfen. Sie resultiert meist aus einer metabolischen Störung bei ATP-Depletion. Dies führt zu einem Anschwellen der Zelle und der Mitochondrien, einer Störung des endoplasmatischen Retikulums, einer lysosomalen Degradation, und der Ausstülpung der Plasmamembran (Bildung sog. „blebs“). Schließlich zerreißt die Plasmamembran und der Inhalt der Zelle wird in den interzellulären Raum freigesetzt. Dabei kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion in der Umgebung des nekrotischen Gewebes. Trotz gegensätzlicher Charakteristika von Nekrose und Apoptose gibt es Hinweise dafür, dass beide Prozesse miteinander gekoppelt sein können. So kann die Blockade eines apoptotischen Signalweges zum Zelltod über einen nekrotischen Weg führen [Vercammen *et al.*, 1998]. In der Leber wird Nekrose oft als Ergebnis einer übermäßigen und fehlregulierten Apoptoseinduktion beobachtet. Durch den Verlust von ATP, welcher durch eine mitochondriale Fehlfunktion während der Apoptose bedingt sein kann, kann die Apoptose in eine nekrotische Morphologie übergehen. Ein typischer Stimulus von Nekrose in der Leber, wie er z.B. im Rahmen einer Lebertransplantation regelmäßig auftritt, ist eine kalte Leberischämie mit anschließender Reperfusion [Jaeschke und Lemasters, 2003]. Des Weiteren wird eine medikamentös-toxische Leberschädigung oft durch Nekrose von Hepatozyten verursacht. Dies kann bis hin zu einem fulminanten Leberversagen führen, einer gefürchteten Nebenwirkung verschiedener Pharmaka.

Neben diesen beiden „klassischen“ Formen des Zelltods sind verschiedene weitere bekannt. Dazu zählen Autophagie, Paraptose und die „mitotische Katastrophe“. Sie weisen nicht die bei der Apoptose beschriebenen morphologischen Veränderungen der Zelle und meist keine

Aktivierung von Caspasen auf. Bei der **Autophagie** werden Zellorganellen durch das eigene lysosomale System verdaut; der Abbau der Zelle bedarf nicht der Aktivierung von Phagozyten [Baehrecke, 2003; Gozuacik und Kimchi, 2004]. Die **Paraptose** ist, im Gegensatz zur Nekrose, von Transkription und Translation abhängig und damit genetisch kontrolliert. Es bilden sich zytoplasmatische Vakuolen, es kommt zu einer Schwellung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums, jedoch zu keinen nukleären Veränderungen. Paraptose kann nicht durch Apoptose-Inhibitoren, allerdings durch AIP-1 blockiert werden [Sperandio *et al.*, 2000/2004]. Die **mitotische Katastrophe** resultiert aus einer abnormen Mitose, z.B. durch Defekte an Kontrollpunkten des Zellzyklus. So kann eine Überproduktion der zyklinabhängigen Kinase CDK-1 prämaturre Zellen zur Mitose zwingen [Russell und Nurse 1986]. Ist die DNA dabei jedoch beschädigt bzw. noch nicht repariert, führt dies schließlich zum Tod der Zelle. Morphologisch ist eine mitotische Katastrophe durch die Bildung vielkerniger Riesenzellen mit unkondensierten Chromosomen charakterisiert. Bisher sind diese Formen des Zelltods aber noch wenig untersucht, und es bleibt zu klären, ob es sich hierbei tatsächlich um eigenständige, von den anderen Zelltodformen unabhängige Wege handelt. Des Weiteren bleibt zu klären, ob Paraptose und mitotische Katastrophe eine Relevanz für die Leber haben [Bröker *et al.*, 2005; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2006a].

Induktion von Apoptose

Apoptose kann durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden, wie z.B. ultraviolettes Licht, Wachstumsfaktormangel, Chemotherapeutika oder die Aktivierung von sog. Todesrezeptoren (s. S. 8). Ob ein Stimulus tatsächlich zur Auslösung der Apoptose führt hängt vom Zustand der Zelle, bzw. vom Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Faktoren ab. Generell können zwei Wege zur Auslösung der Apoptose in der Zelle führen, ein extrinsischer und ein intrinsischer Weg. Beide Wege können in drei Phasen unterteilt werden: Initiations-, Exekutions- und Terminierungsphase. Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von Todesliganden an ihre Rezeptoren aktiviert, der intrinsische durch interne Todessignale und die Aktivierung von Mitochondrien. In beiden Fällen werden sog. Caspasen (s. S. 9) aktiviert, welche zur Degradation zellulärer Substrate und schließlich zum Tod der Zelle führen. Beide Wege können in Leberzellen beobachtet werden. Die Apoptose von Hepatozyten, die die zahlenmäßig größte Zellpopulation in der Leber ausmachen, ist ein grundlegender Prozess bei vielen Lebererkrankungen.

Extrinsischer Signalweg und Todesrezeptoren

CD95 (APO-1/Fas) gehört zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie [Trauth *et al.*, 1989; Yonehara *et al.*, 1989; Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992; Bodmer *et al.*, 2002]. Charakteristisch für diese Familie ist das Vorhandensein von zwei bis sechs extrazellulären cysteinreichen Domänen. Die biologischen Effekte, die von den Rezeptoren dieser Familie vermittelt werden, umfassen unterschiedliche Prozesse (wie z.B. Differenzierung, Proliferation oder Apoptose) [Locksley *et al.*, 2001].

Eine Subfamilie der TNF-Rezeptorfamilie bilden die sogenannten Todesrezeptoren. Sie werden als solche bezeichnet, da sie in der Lage sind, Apoptose auszulösen [Wajant, 2003]. Ihnen gemeinsam ist eine ungefähr 80 Aminosäuren lange, homologe intrazelluläre Domäne, die als Todesdomäne bezeichnet wird und für die Apoptoseinduktion essentiell ist [Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia *et al.*, 1993]. Diese Todesdomäne besteht aus sechs α -Helices und stellt eine wichtige Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar [Aravind *et al.*, 1999; Weber und Vincenz, 2001]. Bisher sind sechs Todesrezeptoren beschrieben worden: TNF-R1 (CD120a), CD95 (APO-1/Fas), DR3 (APO-3/LARD/TRAMP/WSL1), TRAIL-R1 (APO-2/DR4), TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2) und DR6 [Schulze-Osthoff *et al.*, 1998]. Auf Hepatozyten sind vor allem die Todesrezeptoren CD95 und TNF-R1 exprimiert.

Unter physiologischen Bedingungen vollzieht sich die Aktivierung der Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie durch die Bindung spezifischer Liganden. Im Gegensatz zum CD95-Rezeptor, welcher in den meisten Säugetiergeweben exprimiert wird, ist die Expression seines Liganden CD95L auf aktivierte T-, B- und NK-Zellen, sowie auf einige nicht-lymphoide Organe beschränkt. Des Weiteren wurde eine Expression von CD95L in neoplastischen Zellen gezeigt [Hahne *et al.*, 1996; O`Connell *et al.*, 1996; Strand *et al.*, 1996]. Neben der membranständigen Form von CD95L kann durch die Aktivität einer Metalloprotease auch eine lösliche Form des Liganden erzeugt werden [Kayagaki *et al.*, 1995; Mariani *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1998]. Todesrezeptoren wie CD95 und TNF-R1 können zudem durch agonistische Antikörper aktiviert werden [Trauth *et al.*, 1989].

Unter den Todesrezeptor-vermittelten Signalkaskaden sind die CD95-abhängigen Signalwege bisher am Besten charakterisiert. Nach Bindung eines spezifischen Liganden kommt es zu einer Trimerisierung des Rezeptors auf der Zelloberfläche. Dieser erste Schritt führt innerhalb von Sekunden zur Bildung eines sog. Tod-induzierenden Signalkomplexes (engl.: death-inducing signaling complex, DISC) [Kischkel *et al.*, 1995]: FADD/Mort (Fas-associated death domain containing protein) bindet homotypisch über seine Todesdomäne an die Todesdomäne von CD95 [Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995]. FADD besitzt zusätzlich zu seiner Todesdomäne noch eine weitere Protein-Protein-Interaktionsdomäne am N-Terminus, die strukturelle Ähnlichkeiten zur Todesdomäne aufweist und

Todeseffektordomäne genannt wird. Diese Domäne ist notwendig für die Rekrutierung von Pro-Caspasen (siehe unten), die ebenfalls Todeseffektordomänen enthalten, an den DISC. Sobald Pro-Caspase-8 bzw. -10 mit dem DISC assoziiert sind, setzt die autoproteolytische Prozessierung und damit Aktivierung der Pro-Caspasen ein. Dies führt schließlich zur Aktivierung einer Caspasenkaskade und zur Auslösung von Apoptose. cFLIP (cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein) kann Todesrezeptor-vermittelter Apoptose entgegenwirken: Die Isoform cFLIP_{short}, die ebenfalls über eine Todeseffektordomäne verfügt, kann an den DISC rekrutiert werden und verhindert dadurch die Anlagerung und damit die Spaltung von Pro-Caspase-8 [Krueger *et al.*, 2001].

Nach Stimulation von CD95 werden in sog. Typ I-Zellen große Mengen von Caspase-8 am DISC gespalten. Die daraufhin aktivierte Caspasenkaskade führt zur Spaltung verschiedener zellulärer Proteine (den sog. Todessubstraten) und somit zur Auslösung von Apoptose [Scaffidi *et al.*, 1998]. In Typ II-Zellen, zu denen auch Hepatozyten gezählt werden [Li *et al.*, 2002], werden nur geringe Mengen von Caspase-8 aktiviert. Nach Spaltung des Bcl-2-Proteins Bid in tBid (truncated Bid) durch Caspase-8 kommt es zu einer Aktivierung von Mitochondrien (s. S. 13), die als Signalverstärker dienen, und schließlich zur Apoptoseinduktion. Auch in den Typ I-Zellen werden die Mitochondrien aktiviert, was aber für die Exekution der Apoptose nicht notwendig ist.

Caspasen sind Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteasen, die Substrate nach einer wenig spezifischen Sequenz von vier Aminosäuren spalten. Voraussetzung ist jedoch ein Aspartat in der Position P1 [Earnshaw *et al.*, 1999]. Ursprünglich wurden Caspasen im Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt [Miura *et al.*, 1993]. Das humane Genom kodiert für 13 unterschiedliche Caspasen. Sie werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) synthetisiert. Ihre Aktivierung geschieht durch (auto-)proteolytische Spaltung nach definierten Aspartatresten, was zur Freisetzung einer großen und einer kleinen Untereinheit führt. Die große Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum. Verschiedene Caspasen erfüllen unterschiedliche Rollen bei der Initiation oder der Exekution der Apoptose. Die Initiator-Caspasen, zu denen Caspase-8, -9 und -10 gehören, übermitteln frühe apoptotische Signale an die sogenannten Effektor-Caspasen, zu denen Caspase-3, -6 und -7 gehören. Diese spalten den Großteil der an der Apoptose beteiligten Proteine, unter anderem auch diejenigen, deren Spaltung die charakteristischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen auslöst [Earnshaw *et al.*, 1999; Slee *et al.*, 1999]. Dieser Effekt kann für den klinischen Nachweis von Apoptose in der Leber genutzt werden: Caspase-3 spaltet Cytokeratin-18 an der Position Asp369 in das Neoantigen M30 [Hetz *et al.*, 2007]. Dieses Epitop kann im Serum von Patienten mit unterschiedlichen chronischen Lebererkrankungen mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) nachgewiesen werden, und stellt u.a.

eine Möglichkeit dar, den Therapieerfolg bei einer Graft-versus-Host-Disease nach Lebertransplantation zu bestimmen [Luft *et al.*, 2007; Yagmur *et al.*, 2007]. Darüberhinaus kann das Epitop auch im Serum von Patienten mit viralen Hepatitiden, z.B. bei einer HCV (Hepatitis C Virus)-Infektion, nachgewiesen werden [Kronenberger *et al.*, 2005; Bantel *et al.*, 2001]. Dabei korreliert das Maß der nachweisbaren Caspasen-Aktivität im Serum mit dem Ausmaß einer Steatose und dem Fortschreiten einer Fibrose [Seidel *et al.*, 2005]. Des Weiteren kann das Ausmaß einer Leberschädigung auch durch einen direkten Nachweis der Caspasen-Aktivität in der Leber bestimmt werden.

Obwohl eine Caspasen-Aktivierung meist mit dem Prozess der Apoptose verbunden wird, gibt es auch Apoptose-unabhängige Caspasen-Aktivierung: Die Caspasen-1, -4 und -5 sind z.B. im Rahmen inflammatorischer Prozesse an der entzündlichen Zytokinproduktion beteiligt, beeinflussen jedoch nicht den Zelltod [Kroemer und Martin, 2005].

Neben Caspasen spielen noch weitere Proteasen eine Rolle bei der Durchführung der Apoptose, wie Cathepsine und Calpaine. **Cathepsine** sind lysosomale Enzyme und damit beim Abbau von Proteinen beteiligt. Die Induktion von Apoptose durch intrazelluläre Stressfaktoren (wie freie Fettsäuren oder reaktive Sauerstoffspezies) oder Aktivierung von Todesrezeptoren führt zu einer Permeabilisierung von Lysosomen, wodurch Cathepsine ins Zytoplasma gelangen. Dies kann zu apoptotischen Veränderungen, abhängig oder unabhängig von einer Caspasen-Aktivierung, führen [Jäättelä *et al.*, 2004]. Cathepsine können Caspasen auch direkt spalten und damit aktivieren, und können so zur Exekution der Apoptose beitragen [Schotte *et al.*, 1998]. Cathepsin-B (eines von 11 humanen Cathepsinen) trägt zur Apoptose in Hepatozyten nach TNF-Behandlung bei, und eine Inhibition von Cathepsin-B verringert die Leberschädigung nach experimenteller Gallengangsligatur [Guicciardi *et al.*, 2001; Werneburg *et al.*, 2002; Canbay *et al.*, 2003a]. Cathepsin-B Knockout Mäuse weisen entsprechend eine verminderte Sensitivität gegenüber TNF-medierter Leberschädigung auf [Guicciardi *et al.*, 2001]. Eine lysosomale Permeabilisierung kann sowohl zur Apoptose als auch zur Nekrose führen: Während ein massiver Ausstrom von Cathepsinen nach totaler lysosomaler Permeabilisierung zum nekrotischen Zelltod führt, verursacht eine selektive lysosomale Permeabilisierung Apoptose.

Calpaine sind Calcium-abhängige, nicht-lysosomale Cystein-Proteasen, die durch Proteolyse vieler verschiedener Substrate zur Apoptose beitragen. Calpaine wurden unter anderem mit einer Apoptoseinduktion in der Leber nach ischämischer Leberschädigung in Verbindung gebracht [Kohli *et al.*, 1999].

Des Weiteren werden während des Apoptose-Prozesses endogene **Endonukleasen** aktiviert, u.a. CAD (caspase-activated DNase) und Endo G (endonuclease G). Diese Endonukleasen greifen das Chromatin an, wodurch zunächst 300 bis 500 Kilobasen-große

Fragmente entstehen. In einem zweiten Schritt entstehen dann Fragmente von 180 bis 200 Basenpaaren (und ganzzahligen Vielfachen davon) durch Spaltung der DNA in der internukleosomalen Verknüpfungsregion [Oberhammer *et al.*, 1993]. Dadurch wird nach elektrophoretischer Auftrennung eine sogenannte DNA-Leiter sichtbar [Wyllie *et al.*, 1980]. CAD ist in gesunden Zellen im Nukleus als Heterodimer mit ICAD (inhibitor of CAD) lokalisiert. Durch die Aktivierung von Caspase-3 und -7 wird ICAD abgebaut, und CAD dadurch aktiviert. Im Gegensatz dazu ist Endo G in gesunden Zellen im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert, wird nach Apoptoseinduktion ins Cytoplasma freigesetzt, und transloziert mit AIF (apoptosis inducing factor) als Cofaktor in den Nukleus [Widlak und Garrard, 2005].

Der Todesrezeptor **CD95** wird auf Hepatozyten konstitutiv exprimiert [Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992; Leithäuser *et al.*, 1993]. Entsprechend ist die Leber sehr empfänglich für CD95L-induzierte Apoptose. Dies wird ersichtlich in Mäusen, die nach Verabreichung von agonistischen CD95-Antikörpern oder Concanavalin A schwere, letale Leberschäden innerhalb weniger Stunden ausbilden [Ogasawara *et al.*, 1993; Song *et al.*, 2003]. Zudem konnte das CD95-System mit verschiedenen humanen Lebererkrankungen in Zusammenhang gebracht werden, wie z.B. viraler Hepatitis [Rivero *et al.*, 2002], Autoimmunhepatitis [Fox *et al.*, 2001], fulminantem Leberversagen [Galle *et al.*, 1995], akuter Lebertransplantat-Abstoßung [Tannapfel *et al.*, 1999], und nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) [Feldstein *et al.*, 2003b]. Bei verschiedenen Lebererkrankungen (z.B. NASH) kommt es zu einer Zunahme der CD95-Expression [Feldstein *et al.*, 2003a]. Somit ist CD95 ein wichtiger Todesrezeptor für akute und chronische Lebererkrankungen. Dagegen ist die Expression von CD95 aber auch wichtig für die Gewebshomöostase in der Leber: CD95-defiziente Mäuse weisen eine hepatische Hyperplasie auf [Adachi *et al.*, 1996].

Ein weiterer Todesrezeptor, der in geringerem Maße auf Hepatozyten exprimiert wird, ist der TNF-Rezeptor 1 (**TNF-R1**). Im Gegensatz zum CD95-System kann eine Aktivierung dieses Rezeptors durch seinen Liganden (TNF- α) sowohl zu Apoptose als auch zur Expression von Überlebensgenen führen, letzteres induziert durch eine Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor- κ B). Nach Bindung des Liganden an TNF-R1 werden Moleküle wie TRADD (TNF-R associated protein with death domain), TRAF2 (TNF-R associated protein 2) und RIP (receptor interacting protein) an den Komplex rekrutiert. Dies führt in einer Signalkaskade zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von IKK- β (I κ B Kinase-beta), dadurch zu einer Phosphorylierung und damit Degradation von I κ B (inhibitor of NF- κ B), und schließlich zu einer Freisetzung von NF- κ B. Freies NF- κ B transloziert in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor für verschiedene anti-apoptotische Gene wirkt (z.B. c-FLIP, IAPs,

Bcl-x_L). Zusätzlich zum anti-apoptotisch wirkenden Komplex I bildet sich mit zeitlicher Verzögerung in der Zelle ein zweiter Komplex. Dieser enthält nicht mehr den Rezeptor, allerdings weiterhin Moleküle, die im Komplex I zu finden sind, wie TRAF2 und TRADD. An diesen Komplex assoziiert über die Todesdomäne von TRADD FADD, und daran ähnlich wie im CD95-DISC Pro-Caspase-8 und -10, die auch hier autoproteolytisch gespalten werden [Barnhart und Peter, 2003a]. Der weitere Signalweg verläuft wie bei der CD95-medierte Apoptose über eine Caspasenkaskade. Ob sich nach TNF- α -Induktion pro- oder anti-apoptotische Signale durchsetzen, ist abhängig vom Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren. Generell kann in experimentellen Modellen die Induktion von Überlebensgenen verhindert werden, indem man Zellen sowohl mit TNF- α als auch mit Substanzen behandelt, die die Transkription oder Translation hemmen (wie z.B. Cycloheximid, Actinomycin D oder D-Galactosamin). Neben seiner Funktion als Entzündungszytokin kann TNF- α außerdem zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod führen, indem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden, was zu einem nekrotischen Zelltod führt [Kim *et al.*, 2007]. In verschiedenen akuten und chronischen Lebererkrankungen kommt es zu einer verstärkten Expression von TNF-R1, und damit zu einer Leberschädigung [Volpes *et al.*, 1992].

Die TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)-Rezeptoren **TRAIL-R1** und **TRAIL-R2** können nach Bindung von TRAIL ebenfalls Apoptose über DISC-Bildung und Caspasen-Aktivierung, wie im CD95-System, auslösen. Sie sind auf gesunden Hepatozyten nur geringfügig oder nicht exprimiert, wodurch TRAIL für die gesunde Leber nur eine geringe Toxizität aufweist [Ganten *et al.*, 2006].

Intrinsischer Signalweg und Mitochondrien

Der intrinsische Signalweg wird auf der Ebene der Mitochondrien initiiert. Die Mitochondrien spielen bei der Apoptose eine bedeutende Rolle [Kroemer *et al.*, 1997]. Die innere Mitochondrienmembran ist unter physiologischen Bedingungen impermeabel, so dass durch die Atmungskette ein elektrochemischer Gradient erzeugt werden kann. Die mitochondriale Membran-Permeabilisierung (MMP) und ein damit verbundener Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials stellt ein zentrales Ereignis während der Apoptose dar [Kroemer *et al.*, 1997; Kroemer, 2003]. Verursacht wird der Abfall des Transmembranpotentials durch das Öffnen von Poren der äußeren Mitochondrienmembran [Bernardi *et al.*, 1994]. Die MMP wird durch eine Aktivierung von Bax und Bak, zweier pro-apoptotischer Bcl-2 Proteine (s. S. 14), verursacht. Dies führt zur Freisetzung verschiedener pro-apoptotischer Faktoren aus dem Raum zwischen innerer und äußerer mitochondrialer Membran in das Zytoplasma, wie AIF und Endo G, den Caspasen-2 und -9, HtrA2/Omi, Smac/DIABLO, sowie Cytochrom *c*. AIF und Endo G translozieren nach MMP in den Nukleus und induzieren dort DNA-Kondensation und -Fragmentierung [Susin *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1999]. Ferner verursacht AIF die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran. Die Serinproteasen HtrA2/Omi sowie Smac/DIABLO wirken beide verstärkend auf die Apoptose, indem sie mit den Caspase-Inhibitoren der IAP (inhibitor of apoptosis)-Familie interagieren [Deveraux und Reed, 1999; Chai *et al.*, 2000]. Eine wichtige Rolle spielt auch Cytochrom *c*. Ins Zytoplasma freigesetzt trägt es zur Caspasenaktivierung bei. Cytochrom *c* bindet an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), welches unter Verbrauch von ATP mit Pro-Caspase-9 über die an beiden Molekülen vorhandenen Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomänen assoziiert [Li *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1999]. Diese Domäne besitzt eine ähnliche Struktur wie die Todesdomäne und die Todeseffektordomäne [Day *et al.*, 1999; Weber und Vincenz, 2001]. Der Komplex aus Apaf-1, Cytochrom *c* und Pro-Caspase-9 wird auch als Apoptosom bezeichnet und führt zur autoproteolytischen Aktivierung von Caspase-9 [Srinivasula *et al.*, 1998]. Dies hat wiederum die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 zur Folge, was letztlich den Tod der Zelle herbeiführt (s. oben).

Die mitochondriale Aktivierung und damit verbundene MMP kann als Folge einer Todesrezeptoraktivierung entstehen, oder aber nach lysosomaler Permeabilisierung, nach Aktivierung von Stress-Signalwegen des endoplasmatischen Retikulums (meist hervorgerufen durch ein Ungleichgewicht zwischen unreifen und fertig gefalteten Proteinen), oder nach Aktivierung intrazellulärer Stress-Kinasen, wie z.B. JNK (c-Jun N-terminal Kinase). Eine Stabilisierung der mitochondrialen Integrität ist ein zentraler Mechanismus für das Überleben bösartig transformierter Zellen und für ihre Resistenz gegenüber Chemotherapie [Kroemer und Reed, 2000; Schulze-Bergkamen und Krammer, 2004].

Die Bedeutung der Bcl-2-Proteinfamilie

Proteine der Bcl-2-Familie spielen eine prominente Rolle bei der Regulation der Apoptose in Typ II-Zellen und im intrinsischen Signalweg, da sie die mitochondriale Aktivierung regulieren. Namensgeber der Familie ist das Onkogen *bcl-2* (B-cell lymphoma-2), welches als Folge einer chromosomalen Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert ist [Tsujiimoto *et al.*, 1985]. Im Gegensatz zu anderen „klassischen“ Onkogenen wie *myc* oder *c-abl* führt eine Überexpression von Bcl-2 nicht zu einer erhöhten Zellproliferation, sondern verhindert den Zelltod [Vaux *et al.*, 1988].

Charakteristisch für die Bcl-2-Familienproteine sind die Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-4). Die Bcl-2-Familie wird in drei Gruppen unterteilt: anti-apoptotische Mitglieder wie Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 und A1, pro-apoptotische Proteine wie Bax und Bak, welchen lediglich die BH4-Domäne fehlt und welche im Apoptoseprozess die äußere mitochondriale Membran permeabilisieren, und pro-apoptotische sog. „BH3-only“-Proteine, welche mit den anti-apoptotischen Mitgliedern interagieren und diese dadurch „neutralisieren“. Die mitochondriale Aktivierung wird folglich über ein Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine und deren Interaktionen reguliert [Baskin-Bey und Gores, 2005; Chen *et al.*, 2005a; Adams und Cory, 2007; Willis *et al.*, 2007].

Die Interaktion der Bcl-2-Proteine erfolgt über die BH-Domänen. Die BH1-, BH2- und BH3-Domänen der anti-apoptotischen Proteine falten sich in eine globuläre Domäne, die eine hydrophobe Grube bildet. Hieran kann die BH3-Domäne eines pro-apoptotischen Proteins binden, die eine amphipatische α -Helix besitzt [Hinds und Day, 2005].

Bax und Bak sind für die Aktivierung der Mitochondrien verantwortlich. Während Bak an der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist, liegt Bax in gesunden Zellen meist zytoplasmatisch vor. Nach zytotoxischen Signalen verändert Bax seine Konformation, wodurch es an die mitochondriale Membran transloziert. Dort bilden Bak und Bax Membran-assoziierte Homodimere. Diese Oligomere bilden Poren in der äußeren mitochondrialen Membran und verursachen damit die MMP. Bisher ist ungeklärt, wie genau diese Poren biochemisch aufgebaut sind, und wie diese durch die anderen Bcl-2-Proteine reguliert werden [Chipuk *et al.*, 2006]. Die Funktion von Bak und Bax scheint zum Großteil redundant zu sein. Während der Verlust eines der beiden Proteine in den meisten Zellen und Geweben keine Auswirkung hat, führt ein Fehlen beider Proteine zu einer Hemmung der Apoptose in den meisten Zellarten und zu einer Beeinträchtigung einer normalen Gewebsentwicklung [Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001].

Bax und Bak sind konstitutiv exprimiert. Sie werden in erster Linie post-transkriptionell reguliert, v.a. durch Interaktionen mit anderen Bcl-2-Proteinen. Bax und Bak können zum Einen durch eine Bindung an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine reguliert werden. Werden Bax und Bak aus ihrer Interaktion mit anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen gelöst, können sie MMP verursachen [Willis *et al.*, 2007]. Andere Daten sprechen dagegen von einer direkten Aktivierung von Bak und Bax durch eine Bindung an BH3-only-Proteine (v.a. Bim, tBid und Puma) [Kuwana *et al.*, 2005; Certo *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006]. Dies ist aber bisher nicht abschließend geklärt [siehe Youle und Strasser, 2008].

Die Expression der BH3-only-Proteine kann durch Transkriptionsfaktoren induziert werden. So werden z.B. nach DNA-Schädigung Noxa und Puma durch p53 induziert [Oda *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2001]. Zudem können BH3-only-Proteine auch post-transkriptionell aktiviert werden: Bid wird durch Caspase-8-Spaltung aktiviert [Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998], Bad durch Dephosphorylierung z.B. nach Wachstumsfaktorentzug [Zha *et al.*, 1996]. BH3-only-Proteine, welche alle anti-apoptotischen Proteine binden können, wie Bim, Puma und tBid, zeigen *in vitro* eine zytotoxische Aktivität, wenn sie überexprimiert werden. Bad und Noxa, welche entweder nur Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w, oder nur Mcl-1 und A1 binden können, zeigen bei alleiniger Überexpression keine zytotoxische Aktivität, bei gemeinsamer Überexpression jedoch schon [Adams und Cory, 2007].

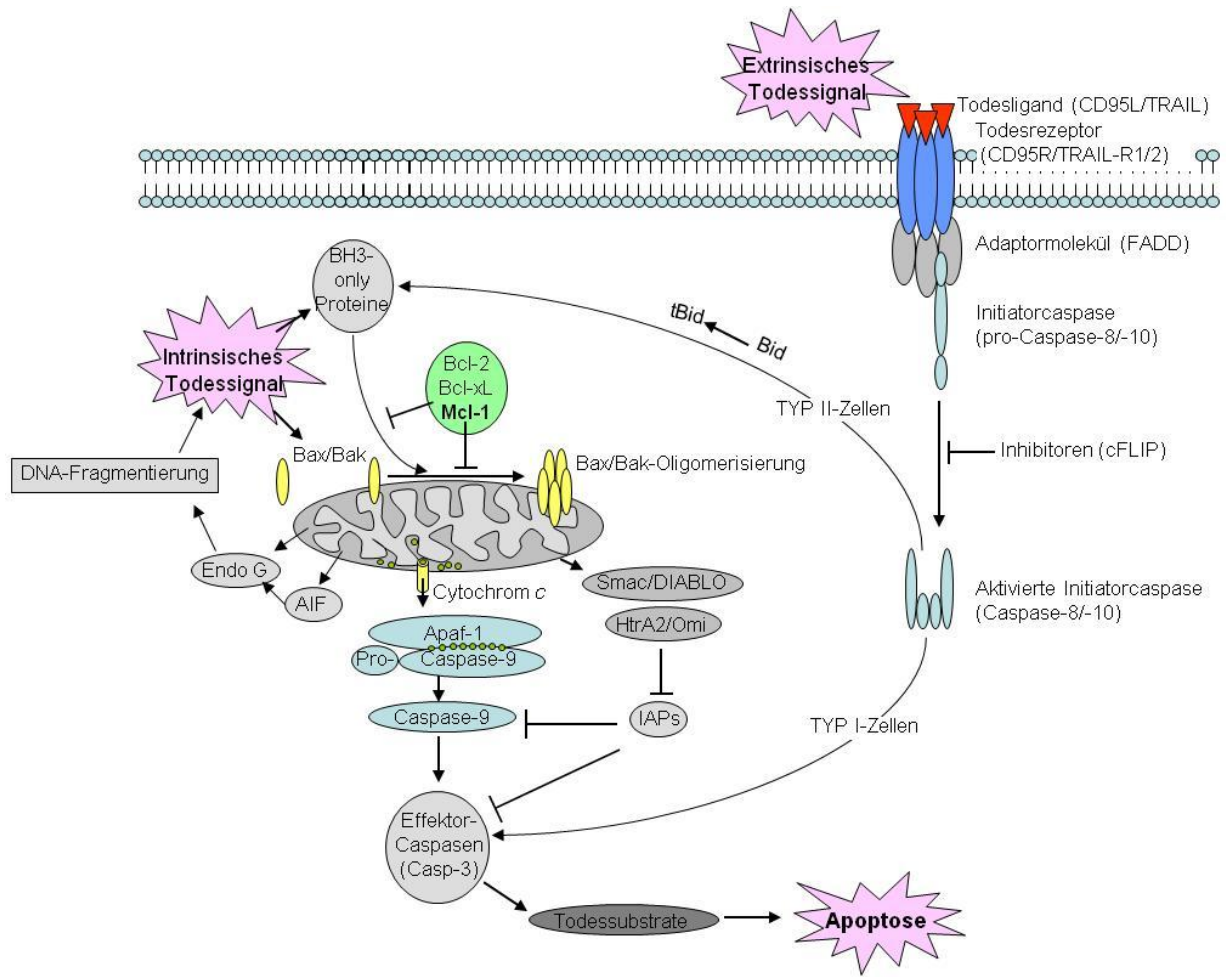


Abbildung 0: Schema extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg
 Erläuterungen siehe Text. Nach Zhang *et al.*, 2005

Kenntnisstand zu Mcl-1

Mcl-1 (Myeloid cell leukemia-1) ist ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie [Reynolds *et al.*, 1994]. Erstmals wurde Mcl-1 aus humanen myeloischen Leukämiezellen nach Phorbol-12-myristat-13-acetat-induzierter Differenzierung isoliert [Kozopas *et al.*, 1993]. Die Expression von Mcl-1 wird in Zellen als Antwort auf Wachstums-, Differenzierungs- und Überlebensfaktoren induziert. Eine Induktion der Mcl-1 Expression fördert die Viabilität von Zellen während der Differenzierung oder Proliferation, nach einer viralen Infektion oder nach Stresssignalen [Craig, 2002]. Mcl-1 ist in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, sowohl im adulten Organismus als auch während der Embryogenese, mit gewebs- und differenzierungsspezifischen Varianzen in der Expressionsstärke [Krajewski *et al.*, 1995]. Während der Embryonalentwicklung besitzt Mcl-1 eine zentrale Bedeutung [Rinkenberger *et al.*, 2000]. In konditionalen Mcl-1 Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass Mcl-1 essentiell für die Entwicklung von frühen T- und B-Zellen, aber auch für das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen ist [Opferman *et al.*, 2003/2005]. Eine Abnahme der Mcl-1-Expression durch Wachstumsfaktorentzug führt zum Zelltod: Zellen, welche IL-3-abhängig sind, sterben nach IL-3-Entzug durch eine damit verbundene Mcl-1-Degradation. Dieser Effekt kann aufgehoben werden, wenn gleichzeitig GSK-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β) gehemmt wird, eine Kinase, welche den Abbau von Mcl-1 hemmt [Maurer *et al.*, 2006]. Auf der anderen Seite verringert eine Induktion der Mcl-1-Expression über Wachstumsfaktorbehandlung die Empfindlichkeit verschiedener Zellen gegenüber Apoptose-Stimuli, wie z.B. Hepatozyten gegenüber anti-APO-1 bei gleichzeitiger HGF (Hepatocyte Growth Factor)-Behandlung, oder Basalzellkarzinom-Zellen gegenüber UV-Bestrahlung bei gleichzeitiger IL-6-Gabe [Jee *et al.*, 2001; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004].

Mcl-1 ist, im Gegensatz zu Bcl-2, nicht nur in mitochondrialen Membranen sondern auch im Zytoplasma lokalisiert [Akgul *et al.*, 2000a; Craig, 2002; Chou *et al.*, 2006]. Es ist mit den pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern Bax, Bak, Bim, Puma, tBid und Noxa assoziiert und verhindert auf diese Weise eine Aktivierung von Mitochondrien [Cuconati *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2005]. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist in der Lage, Mitochondrien zu aktivieren, indem es Mcl-1 aus einer Komplexierung mit Bak löst [Leu *et al.*, 2004]. Durch seine Fähigkeit mit tBid zu interagieren kann Mcl-1 auch direkt den extrinsischen Signalweg hemmen [Clohessy *et al.*, 2006]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Mcl-1 transgene Tiere resistent sind gegenüber CD95-vermittelter Leberschädigung [Baskin-Bey *et al.*, 2006].

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Bcl-2-Familie ist Mcl-1 schnell induzierbar [Moulding *et al.*, 1998; Akgul *et al.*, 2000b], und besitzt in Abhängigkeit vom Zelltyp auch nur eine kurze Halbwertszeit von 0,5 bis 3h [Yang *et al.*, 1995; Schubert und Duronio, 2001; Fleischer *et al.*, 2006]. Dies ist auf eine PEST-Sequenz (Prolin-, Glutamin-, Serin- und

Threonin-reich) zurückzuführen, die oft in schnell regulierten Proteinen zu finden ist. Nach Ubiquitinierung wird Mcl-1 überwiegend über proteasomale Degradation abgebaut [Nijhawan *et al.*, 2003]. So führt die Hemmung der Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Degradation zu einer deutlichen Expressionsverstärkung von Mcl-1 [Liu *et al.*, 2005]. Verantwortlich für die Polyubiquitinierung von Mcl-1 ist die E3 Ligase Mule/ARF-BP1 [Zhong *et al.*, 2005]. Diese katalysiert auch die Ubiquitinierung anderer Proteine wie p53 [Chen *et al.*, 2005b]. Aber auch die Inhibition von Caspasen kann die Mcl-1-Degradation hemmen, da es über eine Caspase-3-Spaltstelle verfügt [Weng *et al.*, 2005]. Dagegen kann durch eine pharmakologische Aktivierung von Caspasen die Mcl-1-Degradation beschleunigt, und dadurch die Apoptoseinduktion erhöht werden [Derouet *et al.*, 2006]. In verschiedenen Apoptosemodellen zeigte sich, dass die Degradation von Mcl-1 Voraussetzung für die Induktion von Apoptose ist, z.B. nach UV-Bestrahlung oder Virusinfektion [Cuconati *et al.*, 2003; Nijhawan *et al.*, 2003]. Neben einer erhöhten Mcl-1-Degradation trägt jedoch auch eine verminderte Transkriptions- und Translationsrate zur Verringerung der Mcl-1-Expression und damit zur Apoptoseinduktion bei [Chao *et al.*, 1998].

Verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) und HGF, bewirken eine transkriptionelle Aktivierung des Mcl-1-Gens über eine Aktivierung verschiedener Überlebenssignalwege wie JAK/STAT, p38/MAPK, MEK/ERK und PI3K/Akt [Yang *et al.*, 1996; Chao *et al.*, 1998; Townsend *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2001; Craig, 2002; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004; Yang-Yen, 2006]. Hierbei ist vor allem die IL-3-induzierte Transkription von Mcl-1 genau untersucht: diese geschieht durch die Aktivierung zweier Transkriptionsfaktor-Komplexe, welche die SIE- bzw. die CRE-2-Bindungsstellen innerhalb des Mcl-1-Promoters erkennen [Wang *et al.*, 1999].

Neben einer transkriptionellen Regulation der Mcl-1-Expression kann die Funktion von Mcl-1 auch über Phosphorylierung reguliert werden: Mcl-1 verfügt über mehrere Phosphorylierungsstellen [Domina *et al.*, 2000]. Hierbei zeigte sich, dass MEK1 in der Lage ist, Mcl-1 direkt an Threonin¹⁶³ zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierungsstelle ist hoch konserviert und liegt in der PEST-Region. Durch die Phosphorylierung von Mcl-1 an dieser Stelle verlängerte sich die Lebensdauer des Proteins [Domina *et al.*, 2004]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte dagegen zeigen, dass eine Phosphorylierung von Mcl-1 an Serin¹⁵⁹ durch GSK-3 β die Ubiquitinierung und damit den Abbau von Mcl-1 erhöht. Eine pharmakologische Hemmung von GSK-3 β , sowie eine Mutation der Phosphorylierungsstelle, verringerten den Abbau von Mcl-1, und damit die Apoptoseinduktion nach Wachstumsfaktorentzug [Maurer *et al.*, 2006]. Eine weitere Phosphorylierungsstelle, welche

keinen Einfluss auf die Lebensdauer des Proteins hat, dagegen aber auf seine Funktion, ist Serin⁶⁴. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle findet sich vor allem in Zellen in der G2/M-Phase. Eine Mutation dieser Phosphorylierungsstelle führte zu einer verminderten Bindung an pro-apoptotische Bcl-2-Proteine, und damit zu einer Sensitivierung gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose [Kobayashi *et al.*, 2007]. Bisher ist ungeklärt, ob diese post-translationelle Modifikation von Mcl-1 *in vivo* von Bedeutung ist und evtl. einen Einfluss auf die Pathogenese verschiedener Erkrankungen hat.

Das humane Mcl-1 Gen ist auf Chromosom 1q21 lokalisiert und ist aus 3 Exons aufgebaut. Durch alternatives Splicing können zwei unterschiedliche Proteine entstehen: das prototypische Mcl-1 (oder auch Mcl-1L; 350 Aminosäuren), und das kürzere Mcl-1S/ Δ TM (271 Aminosäuren), bei welchem Exon 2 fehlt. Mcl-1L enthält die BH-Domänen 1-3, wobei die N-terminale BH4-Domäne fehlt, und eine C-terminale Transmembran (TM)-Domäne. Diese TM-Domäne dient zur Lokalisation des Proteins in verschiedenen intrazellulären Membranen, vor allem der äußeren mitochondrialen Membran. Mcl-1S/ Δ TM gleicht in seinem N-terminalen Bereich Mcl-1L, jedoch fehlen dieser Splicevariante die BH1-, BH2- und TM-Domänen [Bae *et al.*, 2000; Bingle *et al.*, 2000]. Die Struktur dieses verkürzten Proteins gleicht den pro-apoptotischen BH3-only-Proteinen, jedoch muss seine physiologische Funktion noch aufgeklärt werden.

Mcl-1 und Tumorerkrankungen

Mcl-1 ist wie die anderen anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder ein potentielles Protoonkogen [Cory *et al.*, 2003]. Mcl-1 transgene Mäuse weisen vergrößerte Lymphknoten und eine hohe Inzidenz von B-Zell-Lymphomen auf [Zhou *et al.*, 2001]. In verschiedenen humanen Tumorgeweben konnte eine hohe Expression von Mcl-1 nachgewiesen werden. Dazu gehören das multiple Myelom und das Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom [Derenne *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005]. Mcl-1 hat nicht nur Bedeutung für die Tumorentstehung [Craig, 2002], sondern auch für das therapeutische Ansprechen von Tumoren: In Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) oder Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen korreliert eine hohe Mcl-1-Expression mit niedrigen Ansprechraten auf Chemotherapie [Backus *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2004]. Beim CLL korreliert die Mcl-1-Expression in Tumorzellen zudem mit dem Grad der Erkrankung und mit der Resistenz gegenüber Chemotherapie [Pepper *et al.*, 2008]. Chemotherapeutika können nach Aktivierung von Mitochondrien zu einer Induktion von Apoptose führen [Schulze-Bergkamen und Kramer, 2004]. Dementsprechend spielen Bcl-2-Proteine eine besondere Rolle bei der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapie. Es gibt Hinweise dafür, dass eine

Beeinflussung der Mcl-1-Expression therapeutisch genutzt werden kann. Im Mausmodell erwies sich eine Mcl-1-Antisense-Therapie beim malignen Melanom als effiziente, Apoptose-sensitivierende Therapie [Thallinger *et al.*, 2003]. Des Weiteren können verschiedene transformierte Zellen durch einen spezifischen Knockdown von Mcl-1 gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensitiviert werden [Taniai *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2006; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2008].

Mcl-1 in der Leber

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Mcl-1 in primären humanen Hepatozyten (PHH) exprimiert wird, und dass eine Induktion der Mcl-1-Expression die Apoptosesensitivität der Zellen beeinflusst: Eine Behandlung von PHH-Kulturen mit dem Wachstumsfaktor HGF führte zu einer transkriptionellen Induktion der Mcl-1-Expression. Eine Induktion anderer anti-apoptotischer Bcl-2-Familienproteine wurde dagegen nicht beobachtet. Es zeigte sich, dass die Induktion von Mcl-1 abhängig von einer Aktivierung des Signalweges PI3K/Akt war. Darüber hinaus inhibierte HGF die CD95-vermittelte Apoptose von PHH. Auch dieser Effekt war abhängig von einer Aktivierung von PI3K/Akt [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004]. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass Mcl-1 ein wichtiger anti-apoptotischer Faktor für Hepatozyten sein könnte.

Die Bedeutung von Mcl-1 für die Pathogenese verschiedener chronischer und akuter Lebererkrankungen und für das hepatozelluläre Karzinom ist nicht geklärt und war Gegenstand dieser Arbeit.

Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist mit mehr als 1 Million Erkrankungsfällen pro Jahr einer der häufigsten Tumorerkrankungen weltweit [Bosch *et al.*, 1999]. Die meisten HCC-Erkrankungen entwickeln sich auf dem Boden einer Leberzirrhose. Die jährliche Inzidenz liegt bei etwa 50-150/100.000 Einwohnern in Entwicklungsländern, mit der höchsten Inzidenz in Ländern südlich der Sahara und in Südostasien. Hier korreliert das Auftreten von HCC mit der Prävalenz der Hepatitis B Virus (HBV)-Infektion [Beasley *et al.*, 1981]. So konnte ein Rückgang der HCC-Inzidenz in Taiwan nach Einführung eines Hepatitis B-Impfprogramms festgestellt werden [Chang *et al.*, 1997]. In Industrienationen entsteht ein HCC mit einer jährlichen Inzidenz von 3-4/100.000 Einwohnern. Allerdings nimmt die Inzidenz und Mortalität in Industrienationen stetig zu, vor allem durch die große Anzahl HCV-seropositiver Patienten [El-Serag und Mason, 2000]. Weitere Risikofaktoren neben einer (chronischen) HBV- oder HCV-Infektion sind Alkoholmissbrauch, eine Exposition gegenüber Aflatoxin B1 oder Vinylchlorid und die hereditäre Hämochromatose [Donato *et al.*, 2006].

Das Risiko einer HCC-Entwicklung hängt im Wesentlichen von drei Faktoren ab [Blum, 1995]:

- 1.) Ätiologie der Hepatopathie mit dem höchsten Risiko für chronisch HBV- oder HCV-infizierte Personen.
- 2.) Aktivität und Dauer der chronischen Lebererkrankung mit dem höchsten Risiko für Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis und Leberzirrhose.
- 3.) Existenz von Kofaktoren, wie z.B. HBV- oder HCV-Infektion plus Alkoholabusus.

Selten entwickeln sich HCCs dagegen bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose, Morbus Wilson oder Autoimmunhepatitis.

Obwohl HBV-assoziierte HCCs schon bei Kindern beobachtet werden können, liegt die Latenzzeit zwischen Virusinfektion und Auftreten eines HCCs etwa 30-60 Jahre für die chronische HBV- und etwa 20-30 Jahre für die chronische HCV-Infektion.

Die Überlebensrate von HCC-Patienten hängt vor allem vom Stadium des Tumors bei Diagnosestellung ab. Die meisten HCCs werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt, da die Erkrankung in frühen Stadien in der Regel ohne wesentliche Symptome einhergeht. Die chirurgische Entfernung des Tumors oder eine Lebertransplantation, die einzigen Möglichkeiten den Patienten potentiell zu heilen, sind nur in etwa 30-40% der Patienten möglich. In vielen Fällen ist eine Operation aufgrund der Tumorausdehnung (insbesondere bei Metastasen) oder aufgrund von Begleiterkrankungen nicht möglich. Auch nach Leberteileresektion oder Transplantation liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur bei etwa 70%, und nach 3 Jahren wird in 50% der Fälle ein Rückfall beobachtet [Llovet *et al.*, 2003].

Bisher konnte in der palliativen Situation keine Verbesserung der Überlebenszeit durch Chemotherapie festgestellt werden [Thomas und Zhu, 2005]. Lediglich kleinere oder singuläre Tumorknoten können durch lokale Therapien wie z.B. perkutane Ethanolinjektion, Radiofrequenz-Thermoablation oder transarterielle Chemoembolisation behandelt werden. Seit November 2007 ist der Multikinaseinhibitor Sorafenib zur Behandlung des fortgeschrittenen HCC zugelassen. Eine klinische Phase III-Studie in 602 Patienten, in welcher Sorafenib versus Placebo getestet wurde, konnte eine Überlebenszeitverlängerung um 2,7 Monate (von 7,9 auf 10,6 Monate) in Sorafenib-behandelten Patienten aufzeigen [Llovet *et al.*, 2008].

Je nach zugrundeliegender Grunderkrankung können unterschiedliche Faktoren zur Entstehung eines HCCs beitragen. Generell lassen sich Störungen in Signalwegen, welche zu einer Tumorentstehung beitragen können, in sechs Gruppen unterteilen [Hanahan und Weinberg, 2000]: Autarkie bei Wachstumssignalen, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden und apoptoseinduzierenden Signalen, unbegrenztes replikatives Potential, anhaltende Angiogenese und Tumordinvasion sowie Metastasenbildung.

Auch beim HCC können verschiedene dieser Störungen festgestellt werden [Thorgeirsson und Grisham, 2002; Teufel *et al.*, 2007; Villanueva *et al.*, 2007; Llovet und Bruix, 2008], u.a.:

- Störungen der Zellzyklusregulation, die in etwa 50% aller Fälle auftreten, führen zu einer unregulierten DNA-Replikation. Sie resultieren aus *TP53* Punktmutationen, dem Verlust der Heterozygotie, dem Verlust von p16 oder Retinoblastomgenen, oder einer Überexpression von Cyclin D1.
- Eine gestörte Angiogenese, die bereits in einem frühen Stadium der Hepatokarzinogenese festgestellt werden kann, resultiert aus einer auto-/parakrinen Sekretion von VEGF oder PDGF.
- Störungen in extrinsischen oder intrinsischen Apoptosesignalwegen führen zur Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion (durch das Immunsystem oder durch Chemotherapeutika), z.B. über eine verminderte Expression von CD95 [Strand *et al.*, 1996] oder eine vermehrte Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-x_L oder Survivin [Takehara *et al.*, 2001; Ikeguchi *et al.*, 2002], die mit der HCC-Progression korrelieren [Fields *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004].
- Reaktivierung der Telomerase-Reverse Transkriptase (TERT), und damit eine Blockade von Seneszenz-assoziiertem Zelltod.
- Und schließlich die vermehrte Expression von Metalloproteinasen (MMP-14/MMP-9) und damit die Begünstigung der Metastasierung.

- Eine besondere Rolle bei der HCC-Entstehung spielt aber vor allem die unkontrollierte Expression von Wachstums- und Angiogenesefaktoren oder von Komponenten ihrer Signaltransduktionskaskaden. So konnte beim HCC u.a. eine Überexpression von IGF-II (Insulin-like Growth Factor II), IRS-1/-2 (Insulin Receptor Substrate-1/-2), TGF- α (Transforming Growth Factor- α), HGF, dem HGF-Rezeptor cMET, EGFR/Her1 und VEGF nachgewiesen werden [Breuhahn *et al.*, 2006]. Diese Faktoren sind mögliche Angriffspunkte für neue, zielgerichtete Tumorthérapien.

II Material und Methoden

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

1. Mausmodell

1.1 Generierung einer Hepatozyten-spezifischen Mcl-1 Knockout Mauslinie

Mcl-1^{flox/wt}-Mäuse [Opferman *et al.*, 2003] wurden vom Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA, und Albumin-Cre (AlbCre)-Mäuse von Dr. Dr. A. Teufel, Uni-Klinik Mainz, zur Verfügung gestellt. Beide Mauslinien hatten einen C57BL/6-Hintergrund. Sie wurden mehrfach untereinander verpaart, um sowohl weibliche Mcl-1^{flox/flox}- als auch männliche Mcl-1^{flox/wt}-AlbCre-Mäuse zu erhalten. Nach einem weiteren Kreuzungsschritt wurden Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre^{+/-}-Mäuse erhalten (nachstehend bezeichnet als Mcl-1^{-/-}), welche in den Versuchen mit ihren Geschwistertieren mit den Genotypen Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre^{-/-}, Mcl-1^{flox/wt}-AlbCre^{+/-} und Mcl-1^{flox/wt}-AlbCre^{-/-} (nachstehend bezeichnet als Mcl-1^{+/+}) verglichen wurden. Die Tiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz gezüchtet, hatten freien Zugang zu Essen und Trinken und einen 12h Tag-Nacht-Rhythmus. Alle Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission des Landesuntersuchungsamtes genehmigt (Aktenzeichen 23 177-07/G 06-1-020).

2. Zellbiologische Methoden

2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Zelllinie: Huh-7 humane Hepatokarzinom-Zelllinie
Huh7-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) bezogen und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Medium: DMEM, PAA Nr. E15-810

Zusätze: 10% Fötale Kälberserum (FCS), Biochrom Nr. S0113/5
100U/ml Penicillin/Streptomycin, Gibco Nr. 15140-122
2mM L-Glutamin, Gibco Nr. 25030-024
10mM HEPES, Lonza Nr. BE17-737E

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryontischer Zellen erfordern sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden, und wurden daher in Zellkulturlabors an Sterilarbeitsplätzen durchgeführt. Darüber hinaus wurden ausschließlich gamma-bestrahlte Zellkulturmaterialien wie Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen der Firmen Falcon (Becton Dickinson), Greiner und Nunc verwendet. Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2 Splitten von Zellen

PBS: 137mM NaCl; 10mM Na₂HPO₄; 2,7mM KCl; 1,8mM KH₂PO₄; pH = 7,4
Trypsin: PAA Laboratories Nr. L11-003

Um die Zellen in logarithmischer Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen in der Regel alle 3-4 Tage gesplittet. Dazu wurde das alte Medium entfernt, die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen, durch Trypsin (5min, 37°C) vom Flaschenboden gelöst und in neuem Medium aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 450xg, 20°C wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1,5-2x10⁵ Zellen/cm² in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

2.3 Zellzahlbestimmung

Trypanblau: Gibco Nr. 15250-061

Neubauer-Zählkammer

Aus einer frisch resuspendierten Kultur wurde ein Aliquot entnommen und 1:2 mit Trypanblaulösung verdünnt. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Da der saure Farbstoff Trypanblau nur durch permeable Membranen dringen kann und sich dann im Zytoplasma an Proteinstrukturen anlagert, sind tote Zellen durch Blaufärbung leicht von vitalen Zellen unterscheidbar. Die Lebendzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet: $\text{Zellen/ml} = (\text{Anzahl Trypanblau-negativer Zellen je Großquadrat})/2 * 10.000$

2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellsuspensionen wurden 5min bei 450xg, 4°C sedimentiert, in 900µl eiskaltem FCS aufgenommen ($5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen pro 900µl FCS) und in Kryoröhrchen gegeben. Nach Zugabe von 100µl kaltem DMSO wurden die Zellen für 48h bei -80°C eingefroren, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Die tiefgefrorenen Zellen wurden mittels Pasteurpipette in 20ml kaltem Medium aufgenommen, bei 450xg, 4°C sedimentiert um das DMSO zu entfernen, in kaltem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.5 Transfektion von Zellen

Transfektionsreagenz: Transfectin, Biorad Nr. 170-3351

Huh7-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und in antibiotikafreiem Medium kultiviert. Die Transfektion erfolgte bei 90% Konfluenz. Die weiteren Angaben gelten pro Well: 4µg Plasmid-DNA bzw. 40nM siRNA wurden mit 250µl serumfreien Medium vermischt. Parallel wurden 4µl Transfectin mit 250µl serumfreien Medium vermischt. Nach 5min wurden die verdünnte DNA/siRNA mit dem verdünnten Transfectin vermischt und zur Komplexbildung

20min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen 1x mit PBS gewaschen, und 1,5ml frisches antibiotikafreies Medium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das Gemisch tropfenweise unter Schwenken auf die Zellen gegeben. 24h später wurden die Zellen analysiert bzw. behandelt.

Plasmid	Firma/Quelle
pEF4/Myc-His	Invitrogen
pEF4/Myc-His/Mcl-1	ORF von Mcl-1 integriert Prof. Peter H. Krammer, DKFZ Heidelberg, Deutschland
pSSH1/Mcl-1	shRNA gegen Mcl-1 integriert Prof. Gregory J. Gores, Mayo Clinic, Minnesota, USA

Sequenzspezifische siRNAs wurden über die Firma MWG bezogen.

Target	Sequenz
Mcl-1 human	5'-[AAG UAU CAC AGA CGU UCU C] _{RNA} [TT] _{DNA} -3' 5'-[GAG AAC GUC UGU GAU ACU U] _{RNA} [TT] _{DNA} -3'
GFP (Negativkontrolle)	5'-[GGC UAC GUC CAG GAG CGC ACC] _{RNA} [TT] _{DNA} -3' 5'-[GGU GCG CUC CUG GAC GUA GCC] _{RNA} [TT] _{DNA} -3'

2.6 *Behandlung der Zellen*

24h nach Aussaat bzw. nach Transfektion wurden die Zellen behandelt. Hierzu wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen, und neues Medium auf die Zellen gegeben, welches die zu untersuchende Substanz enthielt. Je nach Anwendung wurden die Zellen entweder nach 1-12h zur Protein- oder RNA-Isolierung lysiert, oder für 24-72h inkubiert um die Induktion des Zelltods zu untersuchen. Es wurden folgende Substanzen eingesetzt:

Substanz	Katalognummer	Hersteller / Referenz
AG490	658401	Calbiochem
AG1478	658552	Calbiochem
Celecoxib	SC 58635	Searle Research and Development
Cisplatin	232120	Calbiochem
Epirubicin	2236391	Hexal
5-Fluorouracil	F6627	Sigma
LY294002	440202	Calbiochem
Mitomycin C	47589	Calbiochem
PD98059	513000	Calbiochem
PP2	529573	Calbiochem
Rapamycin	553210	Calbiochem
SP600125	S5567	Calbiochem
SU5614	572632	Calbiochem
TRAIL, soluble hr, Set	ALX-850-018	Alexis Biochemicals
Valproinsäure (Orfiril)	550835	Desitin Arzneimittel GmbH

2.7 Messung apoptotischer Zellen (Nicoletti)

Nicolettipuffer: 0,1% Natriumcitrat; 0,1% Triton X-100; 50µg/ml Propidiumiodid
 FACS-Gerät: FACS Calibur Becton Dickinson
 Software: Cell Quest Pro (2)

Mit Hilfe einer in [Nicoletti *et al.*, 1991] etablierten Methode lassen sich Zellkerne apoptotischer Zellen aufgrund ihres geringeren DNA-Gehaltes von Zellkernen lebender Zellen unterscheiden. Dazu wurden jeweils 5×10^5 Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 100µl eines hypotonischen Fluorochrompuffers über Nacht bei 4°C unter Lichtabschluss lysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff dringt dabei in die Zellkerne ein und interkaliert in die DNA, so dass die Kerne ihrem DNA-Gehalt entsprechend fluoreszieren. Neben den vitalen diploiden und sich gerade teilenden tetraploiden Zellkernen lassen sich daher im Durchflusszytometer die Zellkerne apoptotischer Zellen anhand ihres subdiploiden DNA-Gehaltes quantifizieren.

2.8 Isolierung primärer muriner Hepatozyten

Prä-Collagenase-Puffer (I):	140mM NaCl; 7mM KCl; 10mM HEPES pH 7,4
Collagenase-Puffer (II):	70mM NaCl; 7mM KCl; 5mM CaCl ₂ ; 100mM HEPES pH 7,6. Collagenase NB4G, Serva Nr: 17465
Waschpuffer (III):	140mM NaCl, 7mM KCl, 1mM CaCl; 10mM HEPES pH 7,4
Waschmedium:	DMEM ohne Zusätze
Grundmedium:	DMEM mit 10% bzw. 1% FCS; 1% GlutaMax; 100U/ml Pen/Strep; 20mM HEPES; 0,05% (20IE/L) Insulin
Collagen R:	Serva Nr. 47254; 1:10 in Aqua dest. verdünnt.
Avertin (2,2,2,-Tribromoethanol):	Fluka, Nr. 90710

Es wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet, um eine Kontamination der Hepatozyten zu verhindern. Des Weiteren wurden sämtliche Puffer und Medien auf 37°C vorgewärmt. Die Maus wurde durch intraperitoneale Injektion von ~400µl Avertin (2,5%) betäubt. Die Bauchdecke wurde geöffnet, die Pfortader mit einer Braunüle kanüliert, und die Vena cava inferior (untere Hohlvene) mit einer Schere durchtrennt. Nun wurde die Leber mit Hilfe einer Pumpe und eines Schlauchsystems perfundiert, zunächst mit 100ml Puffer I, im Anschluss mit 50ml Puffer II, dem kurz vor Gebrauch die Collagenase (0,5mg/ml) zugegeben wurde. Nach der Perfusion wurde die Leber in eine Petrischale mit Puffer III überführt, und mit Hilfe von Pinzetten ausgestrichen. Die so gewonnene Leberzellsuspension wurde über eine sterile Mullbinde, die als Filter diente, in ein 50ml Röhrchen überführt, und für 5min abzentrifugiert (50xg, ohne Bremse). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in Puffer III aufgenommen. Auf diese Weise können Hepatozyten, welche sich im Pellet befinden, von anderen Leberzellen getrennt werden. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte mit Waschmedium. Im Anschluss wurden die Zellen in Kulturmedium mit 10% FCS aufgenommen, die Zellzahl und Zellviabilität wurde bestimmt, und die Hepatozyten in Kulturplatten ausgesät ($5,5 \cdot 10^4$ vitale Zellen/cm²), welche zuvor mit Collagen beschichtet worden waren. Nach 3h wurde das Medium abgenommen und mit Grundmedium ersetzt, welches nur 1% FCS enthielt. Zudem wurden für eine Protein- und RNA-Isolierung jeweils $5 \cdot 10^6$ Hepatozyten nach der Isolierung abzentrifugiert, und das Pellet bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3. *Proteinbiochemische Methoden*

3.1 *Isolierung von Proteinen*

Lysepuffer (RIPA): 120mM NaCl; 50mM Tris-HCl pH 8,0; 1% NP-40 (Nonylphenylpolyethylenglycol); 1x Protease Inhibitor (Roche); 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid); 25mM NaF; 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat); 200µM Na₃VO₄; 1mM DTT (Dithiothreitol)

Lysepuffer (nativ): 20mM Tris-HCl pH 8,0; 5mM EDTA; 0,5% (v/v) Triton X-100; 1x Protease Inhibitor

Probenpuffer (5x): 50% Glycerol; 10% SDS; 50mM Tris pH 6,8; 25% β-Mercaptoethanol

A Isolierung von Proteinen aus Zellen

Zur Gewinnung von zytoplasmatischen, nukleären und mitochondrialen Proteinen wurden 5×10^5 Zellen mit PBS gewaschen und in 100µl frisch hergestellten Lysepuffer (RIPA-Puffer oder nativer Puffer) durch 15-minütige Inkubation auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation (20min, 12.000xg, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und 5µl für die Protein-Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Der Rest wurde mit 5x Probenpuffer versetzt, 10min bei 95°C gekocht und weggefroren (SDS-PAGE), oder aber im nativen Zustand direkt bei -80°C weggefroren.

B Isolierung von Proteinen aus Gewebe

Etwa 20mg gefrorenes Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Überführung in 2ml-Reaktionsgefäße wurden 500µl frisch hergestellten Lysepuffers (RIPA-Puffer oder nativer Puffer) zugegeben und das Gewebe durch 30-minütige Inkubation auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation (20min, 12.000xg, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und 5µl für die Protein-Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Der Rest wurde mit 5x Probenpuffer versetzt, 10min bei 95°C gekocht und weggefroren (SDS-PAGE), oder aber im nativen Zustand direkt bei -80°C weggefroren.

3.2 *Proteinkonzentrationsbestimmung nach LOWRY*

Kit:	DC Protein Assay Kit II, Biorad Nr. 500-0112
BSA-Standard:	0; 0,25; 0,5; 1; 1,5 und 2 µg/ml
Appliskan:	Wellenlänge: $\lambda=655\text{nm}$

Das DC Protein Assay Kit ist ein colorimetrischer Test zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Dazu wurden pro Probe bzw. pro BSA-Standard 5µl in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Je nach Anwendung wurden die Proben zuvor 1:2 bis 1:10 in Lysepuffer vorverdünnt. Alle Proben wurden in Doppelwerten bestimmt. Zu jeder Probe wurden 20µl Reagenz A und 150µl Reagenz B zugegeben. Nach einer Inkubation bei RT für 15 min konnte der Farbumschlag durch Messung der Extinktion bei 655nm bestimmt werden. Die Konzentration der Proteinlösungen wurde durch Erstellen einer Eichgeraden mithilfe der BSA-Verdünnungsreihe bestimmt. Der Farbumschlag erfolgt in einem Bereich von 0,1-2mg/ml linear. Bei Messwerten darüber wurde die Messung mit einer stärkeren Verdünnung der Probe wiederholt.

3.3 *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Sammelgel:	125mM Tris pH 6,8; 5% Bisacrylamid; 0,1% SDS (Natrium-dodecylsulfat); 0,1% APS (Adenosin-5'-phosphosulfat); 0,1% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin)
Trenngel:	375 mM Tris pH 8,8; 12% Bisacrylamid; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED
Laufpuffer (1x):	25mM Tris-Base; 0,19M Glycin; 1% SDS

Proteine wurden in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen (nach Laemmli, 1970) aufgetrennt.

Die Polymerisation der Gele wurde durch die Zugabe von TEMED gestartet und die polymerisierende Lösung sofort verwendet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach 15min bei Raumtemperatur wurde der Alkohol durch Spülen mit Wasser entfernt und das Sammelgel gegossen. Nach der Polymerisation wurden die Gele mit 50-100µg Protein pro Tasche beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90-120V für 1-2h.

3.4 Western Blot

Transferpuffer (1x):	25mM Tris; 0,19M Glycin; 20% Methanol; 0,037% SDS
TPBS:	0,05% Tween-20 in PBS
Entwicklerlösung:	Western Lightning Western Blot Chemiluminescence Reagent, PerkinElmer, Nr. NEL100001EA
Röntgenfilme:	Medical X-Ray Super RX 100NIF, Fuji, Nr. 6002
Whatman-Papier:	Roth Nr. N449
Membran:	HYBOND ECL Membran, Amersham-Buchler, Nr. RPN203D

Zum Transfer von Proteinen aus Acrylamidgelen auf Membranen wurde ein "Feucht-Verfahren" eingesetzt. Auf einen mit Transferpuffer befeuchteten Schwamm wurden drei Lagen Whatman-Papier und eine befeuchtete Membran gelegt. Hierauf wurde das PA-Gel gelegt und wiederum mit drei Lagen befeuchtetem Whatman-Papier und einem Schwamm bedeckt. Nach Einspannen in eine Klammer wurde diese in eine Blotapparatur eingehängt und mit Transferpuffer bis zum Rand des Blotgefäßes aufgefüllt. Der Transfer der negativ geladenen Proteine auf die Membran erfolgte im elektrischen Feld für 2h bei 90V, 4°C. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit 5% Milchpulver in TPBS für 1h bei Raumtemperatur abgesättigt. Der Blot wurde unter Schütteln über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (0,1-1,0µg/ml) inkubiert. Danach wurde dreimal je 10min mit TPBS gewaschen. Anschließend wurde ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10.000 in TPBS oder in 5% Milchpulver, je nach Anwendung) für 60min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Der Blot wurde dreimal je 10min mit TPBS gewaschen. Gleiche Teile des Enhanced Luminol Reagents und des Oxidizing Reagents wurden gemischt, der Blot darin eine Minute inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

Die verwendeten Antikörper sind gegen menschliche (α_h) oder murine (α_m) Proteine gerichtet.

Antigen	Spezies	Firma
α h/ α m Actin, smooth muscle AB-1	Mouse	NeoMarkers
α h/ α m Bak	Rabbit	BD Pharmingen
α h/ α m Bax	Rabbit	CellSignaling
α h/ α m Bcl-x _L (H62)	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
α h/ α m Bid	Rabbit	CellSignaling
α h Mcl-1 (S-19)	rabbit	Santa Cruz Biotechnology
α m Mcl-1	rabbit	Rockland
α h/ α m α -Tubulin	Mouse	Sigma
α mouse IgG - HRP (2 nd)	Goat	Santa Cruz Biotechnology
α rabbit IgG - HRP (2 nd)	Goat	Santa Cruz Biotechnology

3.5 Caspase-Assay

Lysepuffer (nativ):	20mM Tris-HCl pH 8,0; 5mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 1x Protease Inhibitor (Roche)
Reaktionspuffer (2x):	50mM HEPES pH 7,5; 100mM NaCl; 20% Glycerol; 0,1% CHAPS
Caspasen-Substrat:	Caspase-3-Substrate (AFC), Biomol Nr. P-409-0005 Caspase-9-Substrate (AFC), Biomol Nr. P-445-0005
Plattenleser:	Thermo Appliskan

Da Apoptose meist Caspasen-abhängig verläuft, stellt die Messung der Caspasen-Aktivierung eine Möglichkeit dar, Apoptoseinduktion zu quantifizieren und gegenüber Nekrose abzugrenzen. Hierzu dienen Fluoreszenz-gekoppelte Caspasen-Substrate, welche in nativem Zustand nicht fluorogen sind, jedoch nach spezifischer Spaltung durch Caspasen fluoreszieren. Die freigesetzte Fluoreszenz ist dabei proportional zur Aktivität der Caspasen in der Probe.

Hierzu wurden Zellen oder Gewebe in nativem Lysepuffer lysiert (s. „Isolierung von Proteinen aus Geweben“, Kapitel 2.8 B). 60 μ g Proteinlösung wurden mit Lysepuffer auf 50 μ l aufgefüllt, und mit 50 μ l Reaktionspuffer + 1M DTT gemischt. Anschließend wurde pro Probe 5 μ l 1mM Caspasen-Substrat in DMSO zugegeben und gemischt. Als Kontrollen dienten Proben, welche nur aus Lysepuffer mit Reaktionspuffer, mit und ohne Substrat, gemischt wurden. Die Proben wurden für 2h im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie in schwarze

96-Well-Platten überführt, und die freigewordene Fluoreszenz bei 405nm (Extinktion) und 505nm (Emission) im Plattenleser gemessen.

3.6 Immunhistochemie

Kits: iView™ DAB Kit, Ventana, Tucson, Arizona, USA
 Puffer: 10mM Na-Citrat-Puffer pH 6,0
 TPBS (0,5% Tween-20 in PBS)
 TNB (1% BSA, 0,5% Protein-Blocking-Reagenz in TPBS)
 Reagenzien: Xylol, H₂O₂, Hämatoxylin, Eosin, EtOH, Siriusrot

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Antigen	Verdünnung	Firma
α h/ α m Actin, smooth muscle AB-1	1:200	NeoMarkers
α h/ α m active Caspase-3	1:300	CellSignaling
α h/ α m Ki67 (SP6)	1:100	NeoMarkers
α h Mcl-1 (S-19)	1:160	Santa Cruz Biotechnology
donkey α rabbit IgG - biotinylated (2 nd)	1:80	Jackson

Formalin-fixiertes Lebergewebe wurde in Paraffin eingebettet und im Anschluss geschnitten. Dieser Arbeitsschritt erfolgte im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz. Die Paraffinschnitte wurden zunächst in Xylol (3x5min) und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Zur Antigendemaskierung folgte eine 20-minütige Behandlung im Dampfgerät in Na-Citrat-Puffer. Anschließend wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Inkubation mit 3,0% H₂O₂ in Aqua dest. blockiert (5min). Zwischen jedem Arbeitsgang wurden die Schnitte zweimal 5min in TPBS gespült. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren, wurden die Schnitte dann 30min bei RT in TNB inkubiert.

Die Primärantikörper (Mcl-1, Ki67, Caspase 3, α -Smooth Muscle Actin) wurden in TNB (1:50 – 1:200) verdünnt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer auf den Objektträgern belassen. Als Negativkontrolle wurden Schnitte ohne Primärantikörper-Behandlung verwendet. Nach der Inkubation wurden die Schnitte 3x5min in einem TPBS-Pufferbad gewaschen. Die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:200 in TNB) erfolgte für 1h bei RT. Danach wurden die Objektträger für 3x5min in das TPBS-Pufferbad gestellt. Es folgte die Applikation der Streptavidinperoxidase (1:50 in TNB), die

20min auf den Schnitten belassen wurde und anschließend erneutes Waschen in TBPS 3x5min. Anschließend wurde der Farbstoff DAB für ca. 7min auf die Schnitte gegeben. Diese wurden danach für 5min in Aqua dest. gestellt, dann mit Hämatoxylin (Mayers, 1:2 Verdünnung) gegengefärbt und schließlich unter Leitungswasser für 5min gebläut. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (EtOH 70% - EtOH 100% - Xylol) wurden die Schnitte entwässert, mit Entelan eingedeckt und über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden anschließend unter einem Zeiss Axiophot Mikroskop analysiert und mit einer Olympus Camedia Kamera fotografiert. Zudem wurden Paraffinschnitte mit Hämatoxylin/Eosin bzw. Siriusrot unter Standardbedingungen gefärbt.

3.7 Proliferationsfärbung mittels BrdU-Einlagerung

Kit: *In Situ* Cell Proliferation Kit, FLUOS, Roche,
Nr. 11 810 740 001

Neutralgepuffertes Formalin: 46mM Na₂HPO₄; 29mM NaH₂PO₄ x H₂O; 4% Formalin

Fixierlösung: 3Vol. Glycerin 50mM pH 2,0; 7Vol. EtOH 100%

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol): Molecular Probes Nr. H3570; 2µg/ml in PBS

Mikroskop: Olympus BX51

Software: Olympus ColorView 2

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde neben einer Ki67-Färbung auch die 5-Bromo-2'-Desoxyuracil (BrdU)-Methode angewandt. Durch diese Methode kann neusynthetisierte DNA sichtbar und damit die Rate proliferierender Zellen bestimmt werden. BrdU, ein Thymidin-Analogon, lagert sich dabei in die DNA ein, und kann später mit einem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht werden.

Mäuse erhielten BrdU (0,8mg/ml) im Trinkwasser. Nach 60h wurden die Tiere getötet, die Leber wurde entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Später wurden in einem Cryotom Gefrierschnitte (5µm) der Lebern angefertigt, und die Schnitte bei -80°C aufbewahrt. Nach Rehydrierung der Schnitte für 5min in PBS wurden sie in Fixierlösung für 45min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS und anschließendem enzymatischem Verdau durch Trypsinlösung (7min, 37°C) wurden die Schnitte in 4M HCl für 15min denaturiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden 50-100µl Inkubationspuffer (Kit) auf die Schnitte gegeben und für 10min die unspezifischen Bindungen blockiert. Anschließend wurden 50-100µl Antikörperlösung auf die Schnitte gegeben, und die Schnitte für 45min im

Dunkeln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 50µl DAPI zugegeben, und die Schnitte für weitere 15min im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte dann im Fluoreszenzmikroskop analysiert, indem mittels entsprechender Filter die FITC- (Fluoresceinisothiocyanat-)Färbung (BrdU) bzw. die DAPI-Färbung der Zellkerne sichtbar gemacht wurde. Pro Schnitt wurden zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder fotografiert, und später bezüglich der positiven Zellkerne pro Gesichtsfeld ausgewertet.

3.8 TUNEL-Färbung

Kit: *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche,
Nr. 11 684 795 910

Permeabilisierungslösung: 0,1% Triton X-100; 0,1% Natriumcitrat; eiskalt

Während der Apoptose wird genomische DNA gespalten. Dabei entstehen sowohl doppelsträngige, niedermolekulare DNA-Fragmente, als auch Einzelstrangbrüche in hochmolekularer DNA. Diese DNA-Strangbrüche können durch eine Markierung der freien 3'-OH Enden mit modifizierten Nukleotiden in einer enzymatischen Reaktion identifiziert werden. Die DNA-Strangbrüche werden mithilfe der Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) markiert, welche die Polymerisation markierter Nukleotide an freie 3'-OH Enden katalysiert. Hierzu wird meist Fluorescein-markiertes dUTP eingesetzt. Diese Fluoreszenz kann dann im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Auf diese Weise können einzelne apoptotische Zellen im Gewebe nachgewiesen werden.

Mauslebern wurden entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Später wurden in einem Cryotom Gefrierschnitte (5µm) der Lebern angefertigt, und die Schnitte sofort in neutralgepuffertes Formalin überführt. Nach 20-minütiger Fixierung wurden die Schnitte in PBS für 30min gewaschen. Um die Schnitte zu lagern, wurden sie für 2min in eiskaltes 100%iges EtOH überführt, und dann bei -20°C aufbewahrt. Nach Rehydrierung der Schnitte für 5min in PBS wurden sie für 2min in Permeabilisierungslösung überführt. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden 50-100µl TUNEL-Reaktionsmix (Kit) auf die Schnitte gegeben, und die Schnitte für 60min im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 50µl DAPI zugegeben, und die Schnitte für weitere 15min im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte dann im Fluoreszenzmikroskop analysiert, indem mittels entsprechender Filter die FITC- (TUNEL) bzw. die DAPI-Färbung der Zellkerne sichtbar gemacht wurde. Pro Schnitt wurden zehn zufällig ausgewählte

Gesichtsfelder fotografiert, und später bezüglich der positiven Zellkerne pro Gesichtsfeld ausgewertet.

3.9 *Transaminasenmessung*

Zur Bestimmung der Serumtransaminasen wurde Mäusen mit einem Skalpell die Schwanzvene angeritzt, und etwa 100µl Blut in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Alternativ wurde bei Mäusen, welchen die Leber entnommen worden war, Blut durch Herzpunktion gewonnen. Das Blut wurde bei 4°C mit 4.000xg über 10min zentrifugiert und das so gewonnene Serum in PBS 1:10 verdünnt. Die Serumtransaminasen GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, =Alaninaminotransferase, ALT) und GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase, =Aspartataminotransferase, AST), welche ein Maß für Leberschädigung sind, wurden im Institut für Klinische Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Mainz mit Standardmethoden bestimmt.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Isolierung von RNA

RNA-Isolierungskit: RNeasy Mini Kit, Qiagen Nr. 74104

TRI-Reagenz: Sigma Nr. T9424

Chloroform: Roth Nr. 6340.4

A Isolierung von RNA aus Zellen

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurde ein RNA-Isolierungskit der Firma Qiagen eingesetzt und die Isolierung entsprechend des Handbuchs durchgeführt.

B Isolierung von RNA aus Gewebe

Etwa 20mg gefrorenes Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Überführung in 2ml-Reaktionsgefäße wurde 1ml TRI-Reagenz zugegeben und die Röhrchen im Vortexgerät kräftig geschüttelt. Nach Inkubation für 5min bei RT wurden 200µl Chloroform zugegeben und der Mix erneut geschüttelt. Nach Inkubation für 10min bei RT wurden die Proben für 10min bei 10.000xg, 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt und mit 500µl Isopropanol durch Inversion gemischt. Nach Inkubation für 5min bei RT wurden die Proben erneut für 30min bei 12.000xg, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet 2x mit 75% EtOH gewaschen. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde es in 50µl TRIS 5mM, pH 8,0 aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst.

Die RNA-Konzentration wurde im NanoDrop (Peqlab) bestimmt, und die Probe anschließend bei -80°C gelagert.

4.2 Reverse Transkription

Kit: Omniscript Reverse Transcription Kit, Qiagen Nr. 205111

Um RNA in cDNA umzuschreiben, wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Hierzu wurden 1µg RNA mit einem Gemisch aus Puffer, dNTPs, einem Oligo-dT-Primer und 4 Units einer Reversen Transkriptase für 1h bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig, da RNA nicht mittels PCR amplifiziert und analysiert werden kann.

4.3 Real Time-PCR

Kit: QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen Nr. 204143
LightCycler: LightCycler 2.0 (Roche)
Primer: QuantiTect Primer Assays, Qiagen, für humanes Mcl-1 und GAPDH, und für murines Mcl-1, GAPDH, IL6, TNF, Collagen-1 und α -Smooth Muscle Actin
Sonstiges: LightCycler Capillaries (20 μ l), Roche Nr. 11 909 339 001

Zur quantitativen Expressionsbestimmung eines Gens wurde eine Real Time-PCR durchgeführt. Hierbei durchlaufen die Proben die gleichen Zyklen wie bei einer normalen PCR, jedoch findet die Reaktion in Gegenwart von SYBR Green statt. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und kann durch Anregung ein Fluoreszenzsignal abgeben. Da sich die zu amplifizierende DNA bei einer PCR im Idealfall in jedem Zyklus verdoppelt, wird auch das Fluoreszenzsignal in jedem Zyklus verdoppelt, bis es schließlich einen Schwellenwert übersteigt und messbar ist. Der Zyklus, in welchem der Schwellenwert überschritten wird, wird als c_T bezeichnet. Hieraus lässt sich die relative Expression eines Gens bestimmen:
$$\text{Relative Expression} = 2^{[c_{T,\text{goi},c} - c_{T,\text{goi},t} + c_{T,\text{hkg},t} - c_{T,\text{hkg},c}]}$$

Hierbei steht goi für „Gene of interest“, hkg für „house keeping gene“, c für Kontrolle/Kontrollgruppe und t für „Treated“ oder Prüfgruppe.

4.4 Genotypisierung der Mäuse

Proteinase K (Calbiochem Nr. 70663-4), gelöst 10mg/ml in 50mM Tris/HCl; 5mM EDTA
Proteinase K-Puffer: 100mM Tris-HCl pH 7,6; 20mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS
Taq-Polymerase-Kit: RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix, Sigma

Um den Genotyp der Mäuse zu untersuchen, wurden diese etwa zwei Wochen nach der Geburt biopsiert. Hierzu wurde mit einer Ohrzange ein etwa 1mm großes Loch in die Ohrmuschel gestanzt. Diese Markierung diente zudem zur Identifikation der Mäuse. Die Stanzbiopsien wurden über Nacht verdaut. Hierzu wurden pro Biopsie 5 μ l Proteinase K und 45 μ l Proteinase K-Puffer zugegeben und die Proben in einen Wärmeschrank (56°C) überführt. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K für 3min bei 95°C inaktiviert, und die Proben auf 500 μ l mit H₂O_{PCR-grade} aufgefüllt. Für die PCR wurde je 1 μ l pro Ansatz eingesetzt.

Die PCR wurde mit einem ReadyMix der Firma Sigma durchgeführt, wobei die $MgCl_2$ -Konzentration auf 2,5mM erhöht wurde. Es wurden 40 Zyklen gefahren, die Annealing-Temperatur lag bei 59°C.

Sequenzspezifische Primer wurden über die Firma MWG bezogen.

Target	Sequenz
β -Actin murin	5'-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA-3' 5'-GAC ATG CAA GGA GTG CAA GA-3'
Cre	5'-GCA CTG ATT TCG ACC AGG TT-3' 5'-CCC GGC AAA ACA GGT AGT TA-3'
Mcl-1 flox murin	5'-CTG AGA GTT GTA CCG GAC AA-3' 5'-GCA GTA CAG GTT CAA GCC GAT G-3'
Mcl-1 null murin	5'-GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC-3' 5'-ACG CTC TTT AAG TGT TTG GCC-3'
Mcl-1 deleted murin	5'-CTG AGA GTT GTA CCG GAC AA-3' 5'-ACG CTC TTT AAG TGT TTG GCC-3'

4.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

TBE (5x): 450mM Tris; 450mM Borsäure; 10mM EDTA pH = 8,3

Agarose: Invitrogen, Nr. 15510-019

Ethidiumbromid (EtBr), 1%: Applichem, Nr. A1152.0025

DNA-Größenmarker: GeneRuler 100bp Plus, Fermentas, Nr. SM0321

Die durch die PCR entstandenen DNA-Amplifikate können in einem analytischen Agarosegel (1x TBE / 2% Agarose / 0,00001% EtBr) mittels Elektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Dazu wurden sie in Geltaschen pipettiert und 40min bei 100V aufgetrennt. Zur Kalibrierung des Gels wurde neben die zu untersuchenden Proben ein DNA-Molekulargewichtsmarker mit definiertem Fragmentgemisch aufgetragen.

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden durch UV-Bestrahlung ($\lambda = 254nm$) sichtbar gemacht und fotografiert. Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA-Moleküle und führt so durch Anregung mit UV-Licht zu violetter Fluoreszenz (Emissionswellenlänge $\lambda = 605nm$).

5. Leberschädigungsmodelle

5.1 CD95-vermittelte Leberschädigung

Jo2 (anti-CD95 armenian hamster IgG2): BD Pharmingen, Nr. 554254

Jo2, ein agonistischer monoklonaler anti-Maus CD95 Antikörper, wurde den Mäusen intraperitoneal (i.p.) mit einer Dosis von 0,5mg/kg gespritzt. Kontrolltieren wurde PBS injiziert. Nach drei Stunden wurden die Mäuse mit 400µl 2,5% Avertin anästhesiert. Das Blut wurde aus dem Herzen entnommen und durch Zentrifugation das Serum gewonnen. Die Leber wurde in kleine Stücke zerteilt, und entweder direkt in 4% neutralgepuffertes Formalin überführt oder in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2 Concanavalin A-induzierte Leberschädigung

Concanavalin A (ConA): Sigma, Nr. C5275

ConA wurde in PBS aufgenommen und den Mäusen in die Schwanzvene intravenös (i.v.) mit einer Dosis von 25mg/kg gespritzt. Kontrolltieren wurde PBS injiziert. Tötung und weiteres Vorgehen s. 5.1.

5.3 Tetrachlorkohlenstoff-vermittelte Leberschädigung

Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄): Fluka Chemie, Nr. Cat.# 87031

Olivenöl: Sigma, Nr. O1514

CCl₄ wurde in einer Konzentration von 10mg/ml in Olivenöl angesetzt. Den Mäusen wurde zweimal wöchentlich, über 5 Wochen hinweg, 100µl/g (entspricht 100mg/kg) CCl₄ i.p. gespritzt. Kontrolltieren wurde das gleiche Volumen an Olivenöl injiziert. Drei Tage nach der letzten CCl₄-Gabe wurden die Tiere getötet, das Herzblut und die Leber wurden entnommen (s. oben).

III Ergebnisse

1. Bedeutung von Mcl-1 für das hepatozelluläre Karzinom

1.1 Expression von Mcl-1 in humanem HCC-Gewebe.

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) weist eine hochgradige Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie auf [Schuchmann und Galle, 2004]. Allerdings ist nicht abschließend geklärt, welche Veränderungen in Apoptosesignalwegen zu dieser Resistenz beitragen.

Mcl-1 ist aufgrund seiner anti-apoptischen Funktion ein potentielles Protoonkogen [Cory *et al.*, 2003]. Eine verstärkte Expression von Mcl-1 konnte bereits in verschiedenen humanen Tumorentitäten nachgewiesen werden [Derenne *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005]. Zudem konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumoren eine erhöhte Mcl-1-Expression mit einem schlechten Ansprechen auf Chemotherapien korreliert [Backus *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2004]. Daher sollte untersucht werden, ob HCC-Gewebe eine verstärkte Mcl-1-Expression aufzeigt, was ein Resistenzfaktor gegenüber Chemotherapien sein könnte.

Um dies zu untersuchen, wurde Gewebe von HCC-Patienten bezüglich der Mcl-1-Expression hin analysiert. Hierzu wurden zum einen Schnitte aus Paraffinblöcken angefertigt, welche dann mit einem spezifischen Antikörper gegen humanes Mcl-1 angefärbt wurden. Weiterhin wurden sowohl Proteine als auch RNA aus schockgefrorenem HCC- und angrenzendem Normalgewebe isoliert, welche dann im Western Blot und in einer Real Time-PCR mit einem spezifischen Antikörper bzw. mit spezifischen Primern untersucht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Mcl-1-Expression im HCC-Gewebe der meisten Patienten im Vergleich zu Normalgewebe erhöht war, sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene. Abbildung 1A zeigt immunhistochemisch eine verstärkte subzelluläre Expression von Mcl-1 im HCC-Gewebe im Vergleich zu benachbartem Normalgewebe. Auch im Western Blot konnte bei den meisten Patienten eine verstärkte Expression von Mcl-1 im HCC-Gewebe im Vergleich zu Normalgewebe nachgewiesen werden (Abbildung 1B). Des Weiteren zeigt sich auch in der Real Time-PCR in den meisten Patienten eine verstärkte Mcl-1-Expression auf mRNA-Ebene (Abbildung 1C).

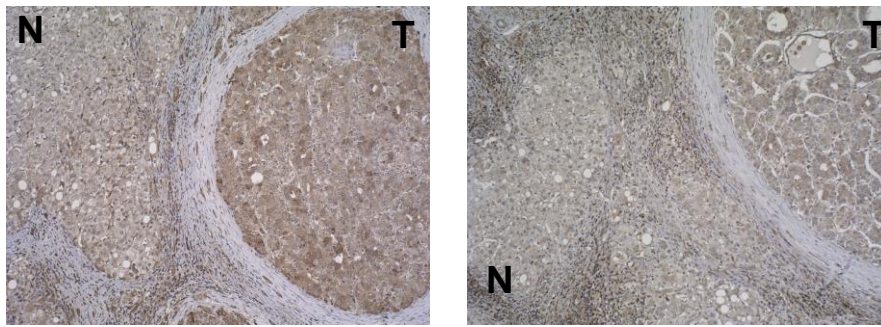
Für weitere Untersuchungen der Relevanz der Mcl-1-Expression für HCC-Zellen sollten nun Zelllinien zum Einsatz für *in vitro*-Analysen kommen. Es wurden primäre humane Hepatozyten (PHH), drei unterschiedliche Hepatomzelllinien (Hep3B, HepG2 und Huh7) sowie als Kontrolle die Leukämie T-Zelllinie Jurkat-16 (J16) im Western Blot auf die Expression von Mcl-1 untersucht. Sowohl PHH als auch alle drei untersuchten

Hepatomzelllinien zeigten eine deutliche Mcl-1-Expression (Abbildung 1D). Da in weiteren Untersuchungen auch Transfektionen geplant waren, und trotz intensiver Optimierungsversuche weder Hep3B- noch HepG2-Zellen eine zufriedenstellende Transfektionseffizienz aufwiesen, wurden für die nachfolgenden Untersuchungen Huh7-Zellen eingesetzt.

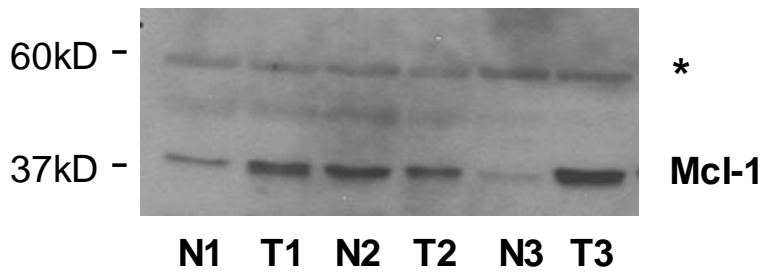
Abbildung 1: Mcl-1 ist in humanem HCC-Gewebe verstärkt exprimiert.

(A) Immunhistochemische Analyse der Mcl-1-Expression. Gezeigt sind zwei repräsentative Präparate eines Immunperoxidase-Nachweises von Mcl-1 in Paraffin-eingebettetem HCC-Gewebe (T) und angrenzendem nicht-malignem Gewebe (N). **(B)** Aus schock-gefrorenem HCC-Gewebe (T) und angrenzendem Normalgewebe (N) wurden Proteine isoliert und mittels Western Blot bezüglich Mcl-1-Expression untersucht. Der Stern markiert eine unspezifische Bande, die als Ladekontrolle dient. **(C)** Aus schock-gefrorenem HCC-Gewebe (dunkle Balken) und angrenzendem Normalgewebe (helle Balken) von fünf Patienten (P1-P5) wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer Primer für Mcl-1 und GAPDH in einer Real Time-PCR die relative Mcl-1-Expression bestimmt. Diese berechnet sich wie folgt: $\text{Relative Mcl-1/GAPDH-Expression} = 1/2^{(\text{ct Mcl-1} - \text{ct GAPDH})} * 100$. **(D)** Die Hepatomzelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 und primäre humane Hepatozyten (PHH) wurden im Western Blot bezüglich ihrer basalen Mcl-1-Expression untersucht. Die Leukämie T-Zelllinie Jurkat16 (J16) diente als Kontrolle.

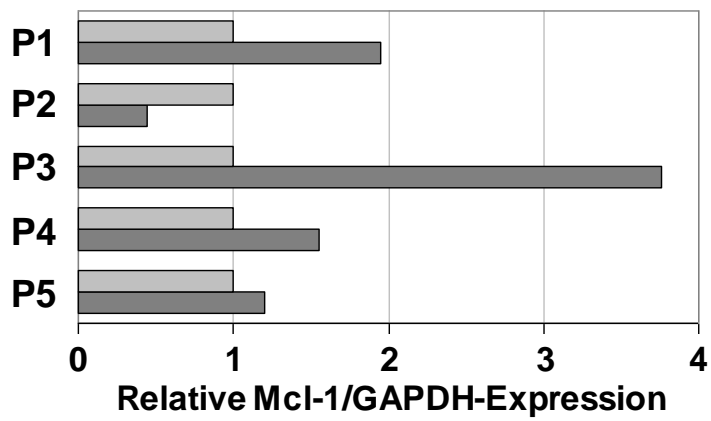
A



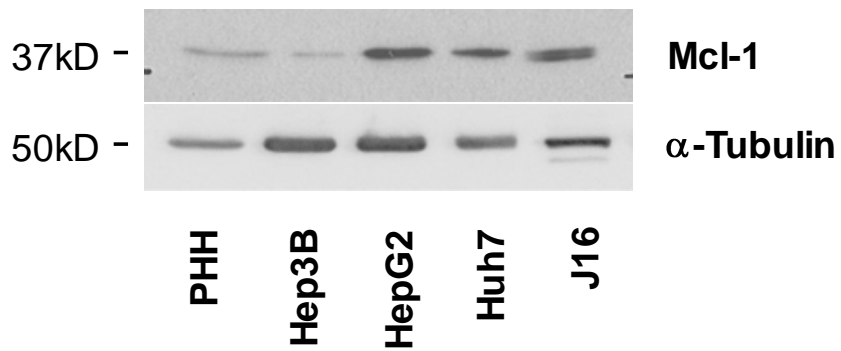
B



C



D



1.2 Ansprechen von HCC-Zellen auf Chemotherapie *in vitro*.

Um zu untersuchen, in welchem Maße bei HCC-Zellen, welche eine basale Mcl-1-Expression aufweisen, nach Chemotherapie *in vitro* Apoptose induziert wird, wurden Huh7-Zellen mit unterschiedlichen Substanzen behandelt, welche in der Therapie bei Patienten mit HCC eingesetzt werden: Mitomycin C und Cisplatin werden bei der transarteriellen Chemoembolisation eingesetzt [Burroughs *et al.*, 2004], Epirubicin und 5-Fluorouracil (5-FU) kommen in der palliativen Chemotherapie zum Einsatz [Pohl *et al.*, 2001].

Huh7-Zellen wurden mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen dieser Substanzen behandelt. Eine Behandlung über 24h mit Mitomycin C, Cisplatin oder 5-FU löste in den Zellen Apoptoseraten kleiner 5% aus. Lediglich die höhere Konzentration Epirubicin (1µg/ml) konnte eine deutliche Apoptoseinduktion von etwa 15% bewirken. Nach einer längeren Behandlung der Zellen über 48h konnten in den Huh7-Zellen sowohl mit Mitomycin C, als auch mit 5-FU und mit Epirubicin Apoptoseraten von mehr als 20% erzielt werden. Eine Behandlung mit Cisplatin hatte nur sehr geringe Auswirkungen auf die Viabilität und Apoptoseinduktion in Huh7-Zellen (Abbildung 2).

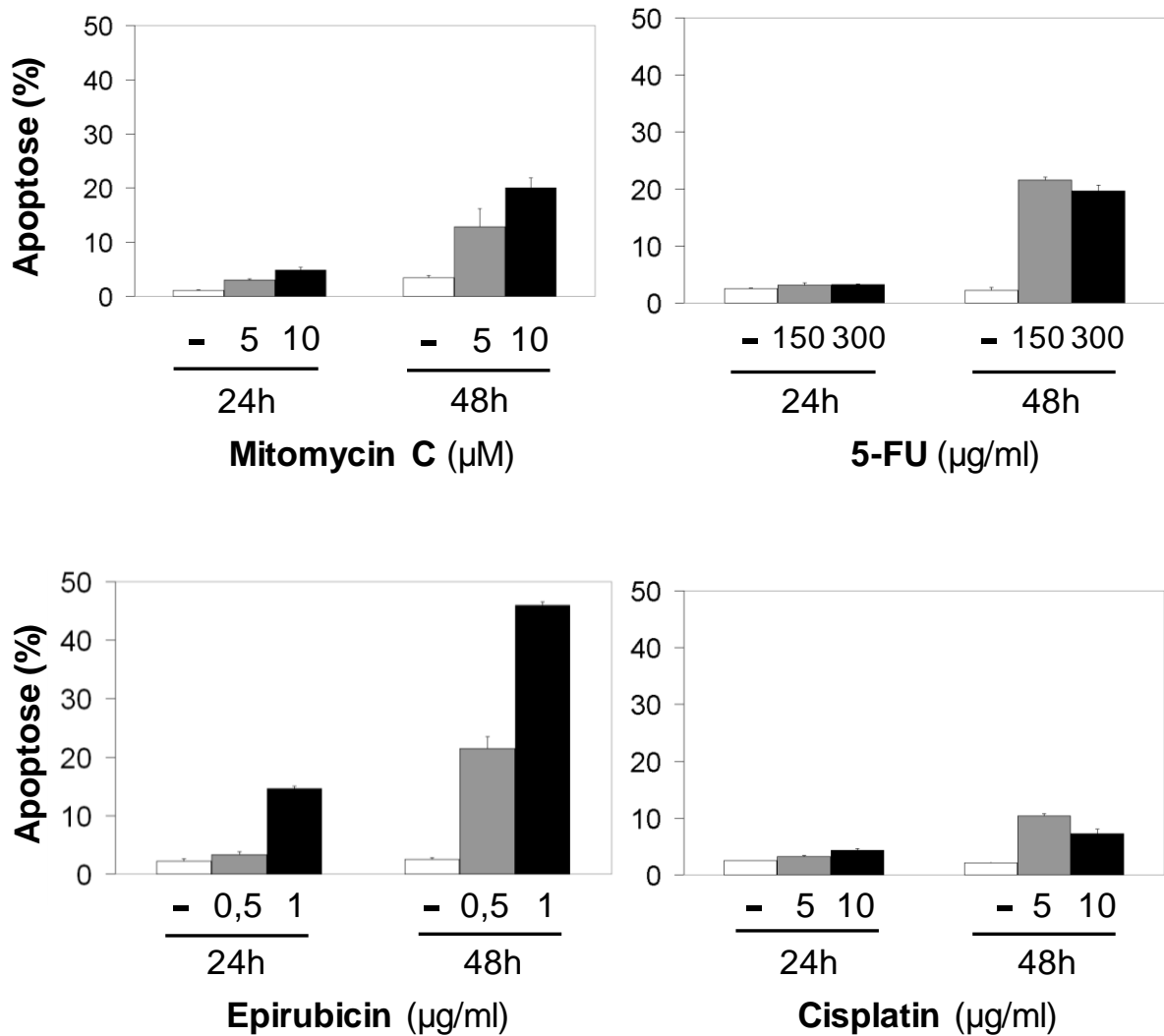


Abbildung 2: Geringe Sensitivität von Huh7-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-Behandlung.

Huh7-Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das alte Medium entfernt, und neues Medium auf die Zellen gegeben, welches unterschiedliche Konzentrationen der Chemotherapeutika Mitomycin C, 5-Fluorouracil (5-FU), Epirubicin oder Cisplatin enthält. Nach weiteren 24h bzw. 48h wurden die Zellen abgelöst, und bezüglich Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch nach der Methode von Nicoletti *et al.* untersucht. Analysen wurden in Dreifachwerten in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Balken zeigen Mittelwerte + Standardabweichung.

1.3 Verstärkte Resistenz von HCC-Zellen mit erhöhter Mcl-1-Expression.

Obwohl HCC-Zellen nur in geringem Maße auf Chemotherapie-Behandlung *in vitro* ansprechen, sollte untersucht werden, ob eine verstärkte Mcl-1-Expression diese Resistenz noch fördern kann. Dazu wurden Huh7-Zellen mit einem Expressionsvektor transfiziert, welcher den offenen Leserahmen für humanes Mcl-1 enthielt (pEF4/Mcl-1). Als Kontrolle dienten Huh7-Zellen, welche mit dem Leervektor (pEF4) transfiziert wurden. Bereits 24h nach Transfektion des Expressionsvektors konnte eine deutliche Verstärkung der Mcl-1-Expression in den Huh7-Zellen auf Proteinebene festgestellt werden, welche nach 48h noch weiter erhöht war (Abbildung 3A). Um zu untersuchen, wie Zellen mit einer verstärkten Mcl-1-Expression auf Chemotherapeutika-Behandlung reagieren, wurden die Zellen 24h nach Transfektion des Expressionsvektors bzw. des Leervektors mit verschiedenen Substanzen behandelt und nach weiteren 48h die Apoptoseinduktion mittels Nicoletti-Färbung bestimmt.

Hierzu wurde zum einen eine Kombinationstherapie aus 5-FU und dem Histondeacetylase-Inhibitor (HDAC-I) Valproinsäure eingesetzt. Es konnte in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Behandlung von HCC-Zellen mit Valproinsäure die Zellen gegenüber einer Chemotherapie-Behandlung sensitiviert, unter anderem durch eine Herunterregulation von c-FLIP [Schuchmann *et al.*, 2006]. Des Weiteren wurde Celecoxib eingesetzt. Celecoxib ist ein Cox-2-Inhibitor, der Apoptose in Krebszellen induziert, unter anderem durch eine Aktivierung von Todesrezeptoren [Kern *et al.*, 2006].

Nach Transfektion der Zellen mit dem Leervektor und einer anschließenden Behandlung mit 5-FU/Valproinsäure bzw. Celecoxib konnten nach 48h Apoptoseraten von nahezu 80% in den Zellen beobachtet werden. Eine Überexpression von Mcl-1 durch Transfektion des Leervektors reduzierte diese Apoptoserate signifikant von 67 auf 46% (5-FU/Valproinsäure) bzw. von 76 auf 39% (Celecoxib). Interessanterweise induzierte bereits die Transfektion des Leervektors Apoptose in den Zellen. Diese Apoptoseinduktion verringerte sich von etwa 32% auf 23% bei der Transfektion des Mcl-1 Expressionsvektors (Abbildung 3B).

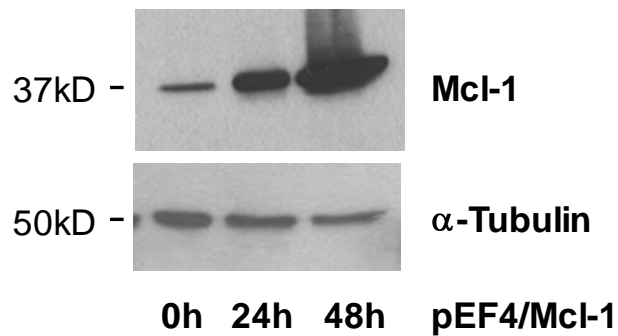
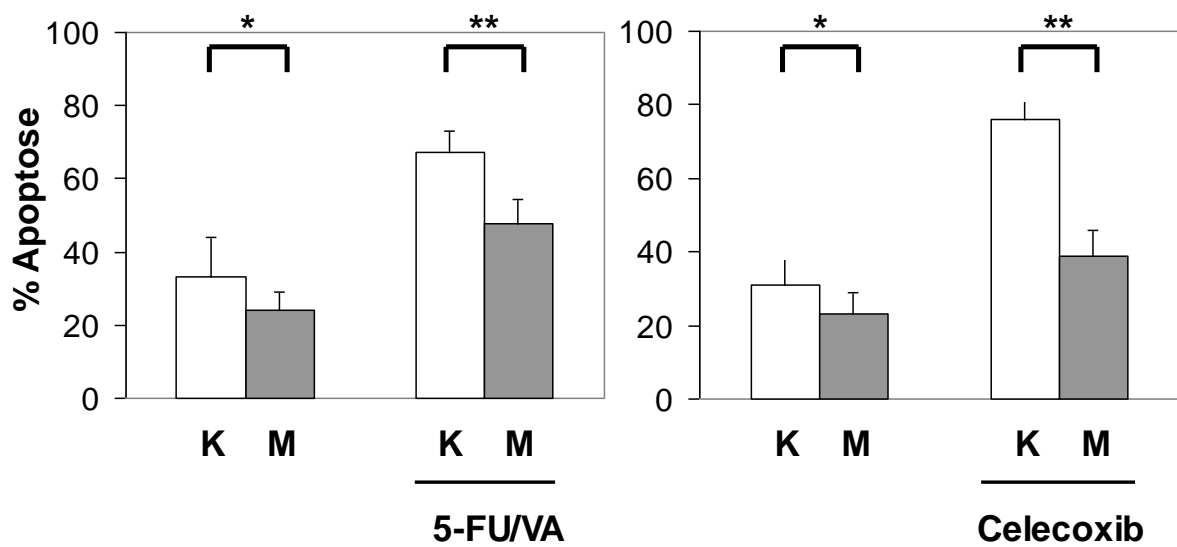
A**B**

Abbildung 3: Überexpression von Mcl-1 schützt HCC-Zellen vor Apoptoseinduktion.

(A) Huh7-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit einem Expressionsvektor, der den offenen Leserahmen für humanes Mcl-1 enthielt (pEF4/Mcl-1) transfiziert. Nach weiteren 24 bzw. 48h wurden die Proteine isoliert, und mittels SDS-PAGE und Western Blot die Expression von Mcl-1 untersucht. (B) Die Zellen wurden entweder mit pEF4/Mcl-1 (M) oder dem Leervektor pEF4 (K) transfiziert. Nach 24h wurde das alte Medium entfernt, und neues Medium auf die Zellen gegeben, welches 5-FU (150 μ g/ml) und Valproinsäure (VA, 3mM), oder Celecoxib (100 μ M) enthält. Nach weiteren 48h wurde die Apoptoseinduktion in den Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Analysen wurden in Dreifachwerten in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Balken zeigen Mittelwerte + Standardabweichung. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

1.4 Verstärkte Apoptosesensitivität von HCC-Zellen nach PI3-Kinase Hemmung.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob durch eine Modulation der endogene Mcl-1-Expression die Apoptosesensitivität von HCC-Zellen verändert werden kann. Dazu sollte zunächst bestimmt werden, durch welche Signalwege die Mcl-1-Expression in HCC-Zellen reguliert wird. Generell werden vor allem folgende drei Signalwege als Mcl-1 Regulatoren diskutiert: der PI3K/Akt-Signalweg [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004], der MEK1/Erk-Signalweg [Huang *et al.*, 2000], und der Jak2/STAT3-Signalweg [Liu *et al.*, 2003]. In PHH konnte durch eine Hemmung der PI3-Kinase die Mcl-1-Expression reduziert, und dadurch die Schutzfunktion von HGF auf Todesrezeptor-vermittelte Apoptoseinduktion in diesen Zellen blockiert werden [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004]. Weiterhin führte eine Hemmung der PI3-Kinase in Hep3B-Zellen zu einer Reduktion der Mcl-1-Expression und zu einer Sensitivierung gegenüber Bleomycin-induzierter Apoptose [Fleischer *et al.*, 2006]. Nun sollte die Regulation der Mcl-1-Expression in Huh7-Zellen analysiert werden.

Huh7-Zellen wurden über unterschiedliche Zeiträume und mit unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen chemischen Inhibitoren behandelt, wie dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002, dem MEK1-Inhibitor PD98059, dem JNK-Inhibitor SP600125, dem EGFR Kinase-Inhibitor AG1487, dem mammalian target of rapamycin (mTOR)-Inhibitor Rapamycin, und dem Cox-2-Inhibitor Celecoxib. Im Gegensatz zu PHH und Hep3B-Zellen führte eine Behandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002, auch über längere Zeiträume bis zu 24h, zu keiner Reduktion der Mcl-1-Expression in Huh7-Zellen. Lediglich nach einer kurzen Inkubationszeit von 1h konnte eine leichte Reduktion in der Mcl-1-Expression beobachtet werden (Abbildung 4). Eine PI3K-Hemmung mit LY294002 führte bereits zu Apoptoseraten von etwa 20% nach 48h. Des Weiteren sensitivierte eine PI3K-Hemmung die Huh7-Zellen gegenüber Chemotherapeutika: So konnte die Epirubicin-induzierte Apoptose von 28 auf 62% (0,2µg/ml, 48h; $p < 0,01$) und die 5-FU-induzierte Apoptose von 20 auf 37% (300µg/ml, 48h; $p < 0,001$) erhöht werden (Abbildung 5). Dieser Effekt einer LY294002-Behandlung konnte auch für Hep3B- und HepG2-Zellen beobachtet werden, welche nach Inhibition eine Reduktion in der Mcl-1-Expression aufweisen, und für PHH nach PI3K-Inhibition und anschließender Behandlung mit dem agonistischem CD95-Antikörper α -APO-1 [Fleischer *et al.*, 2006; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004]. Ob eine Hemmung des PI3K-Signalwegs außer der Expression von Mcl-1 auch dessen Funktion, zum Beispiel durch Veränderung des Phosphorylierungsmusters, beeinflusst, konnte bisher nicht geklärt werden.

Zusätzlich wurden noch weitere Signalwege blockiert, von denen bekannt ist, dass sie sowohl das Überleben von Krebszellen als auch die Expression von Bcl-2-Proteinen beeinflussen. MEK1/2 ist ein wichtiges Enzym im Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg, der eine Relevanz beim Tumorwachstum hat. Eine Hemmung dieses Enzyms durch PD98059 in Hep3B-Zellen veränderte weder die Mcl-1-Expression noch das Ansprechen auf Chemotherapie [Fleischer *et al.*, 2006]. Auch in Huh7-Zellen hatte PD98059 keinen Einfluss auf die Expression von Mcl-1 (Abbildung 4) oder auf die Apoptosesensitivität nach Epirubicin-, 5-FU- und Cisplatin-Behandlung (Abbildung 5 bzw. Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte eine Hemmung des Jak2/STAT3-Signalwegs durch AG490, der Src-Kinase durch PP2, von JNK durch SP600125, der EGFR Kinase durch AG1487, oder von mTOR durch Rapamycin weder die Mcl-1-Expression, noch das Ansprechen von Huh7-Zellen auf verschiedene Chemotherapeutika beeinflussen (Abbildungen 4 und 5, bzw. Daten nicht gezeigt). Lediglich der Cox-2-Inhibitor Celecoxib führte zu einer deutlichen Reduktion der Mcl-1-Expression und zu einer Sensitivierung von Huh7- und HepG2-Zellen gegenüber α -APO-1-, TNF α - und TRAIL-Behandlung (Abbildung 4)/[Kern *et al.*, 2006].

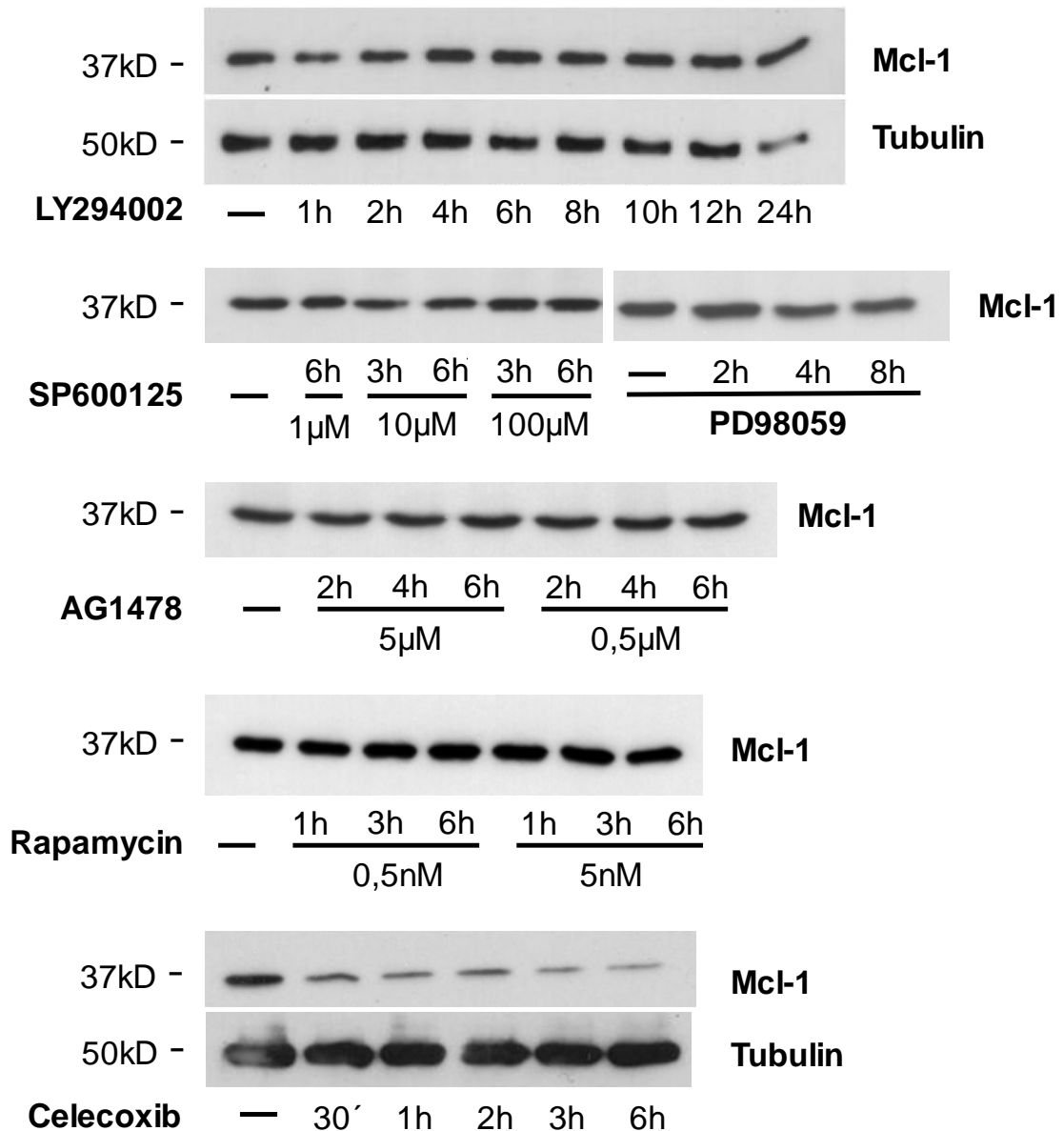


Abbildung 4: Regulation der Mcl-1-Expression in Huh7-Zellen.

Huh7-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit verschiedenen chemischen Kinase-Inhibitoren (PI3K-Inhibitor LY294002 (25 μ M), MEK1-Inhibitor PD98059 (50 μ M), JNK-Inhibitor SP600125, EGFR Kinase-Inhibitor AG1487, mTOR-Inhibitor Rapamycin) oder dem Cox-2-Inhibitor Celecoxib (100 μ M) behandelt. Nach den angegebenen Zeiträumen wurden die Proteine isoliert, und mittels SDS-PAGE und Western Blot die Mcl-1-Expression untersucht. Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

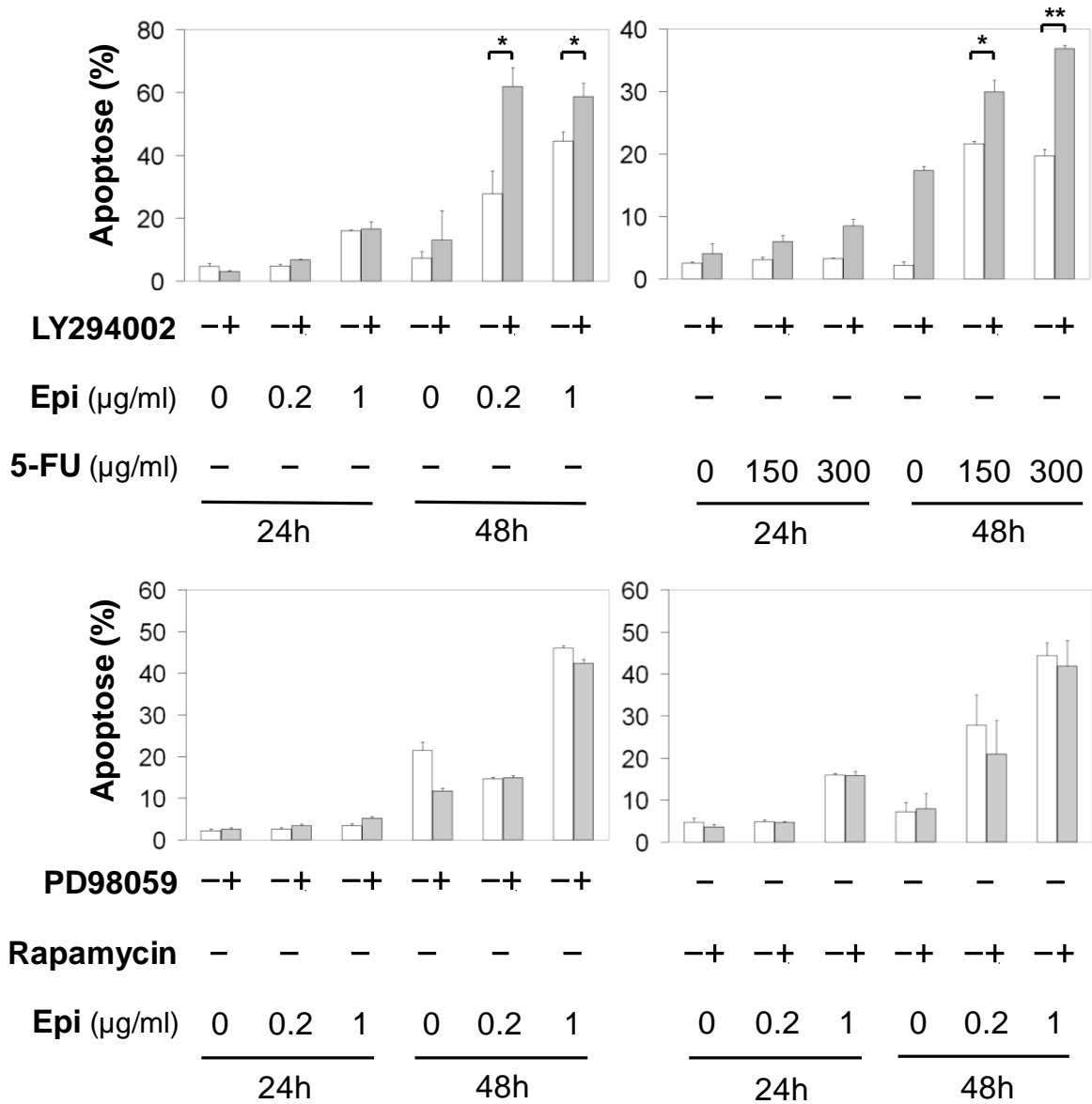


Abbildung 5: PI3K-Hemmung sensitiviert HCC-Zellen gegenüber Chemotherapie.

Huh7-Zellen wurden mit verschiedenen chemischen Kinase-Inhibitoren (PI3K-Inhibitor LY294002 (25µM), MEK1-Inhibitor PD98059 (50µM), mTOR-Inhibitor Rapamycin (50pM)) für 1h vorbehandelt, bevor die Chemotherapeutika 5-FU oder Epirubicin in den angegebenen Konzentrationen zugegeben wurden. Nach weiteren 24 bzw. 48h wurden die Zellen bezüglich Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch untersucht. Analysen wurden in Dreifachwerten in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Balken zeigen Mittelwerte + Standardabweichung. *: p<0,01; **: p<0,001

1.5 Inhibition der Mcl-1-Expression durch RNA-Interferenz.

Um die Mcl-1-Expression spezifisch auszuschalten und so im Weiteren die Relevanz von Mcl-1 für die Apoptoseresistenz von HCC-Zellen zu untersuchen, sollte die Methode der „RNA-Interferenz“ (RNAi) bzw. des „RNA-Silencings“ angewandt werden. Das Prinzip der RNAi beruht auf kleinen RNA-Sequenzen, den „Small interfering RNAs“ (siRNA), welche sich spezifisch an homologe Sequenzen ihrer Ziel-mRNA anlagern, und dadurch zu einem Abbau der mRNA führen. Dies führt dann schließlich zu einem sogenannten „Knockdown“, also einer Herunterregulation, des entsprechenden Proteins. Entdeckt wurde dieser Mechanismus 1998 im Nematoden *Caenorhabditis elegans* von Andrew Fire und Craig Mello [Fire *et al.*, 1998]. 2001 gelang es schließlich, dieses Verfahren in eukaryontischen Zellen zum Einsatz zu bringen, indem 21 Nukleotid-lange, doppelsträngige RNA-Sequenzen in die Zellen transfiziert wurden, welche in den Zellen im Gegensatz zu längeren dsRNA-Sequenzen keine Apoptoseinduktion mehr auslösten [Elbashir *et al.*, 2001]. In der Zwischenzeit ist die Methode der RNAi zu einer etablierten Anwendung geworden, um spezifisch die Expression eines Zielgens auszuschalten. Neben der direkten Transfektion der kurzen siRNA-Sequenzen stehen auch Vektoren zur Auswahl, welche den humanen H1 RNA Promotor für die Expression einer sogenannten „small hairpin RNA“ (shRNA) enthalten. Wird in diese Vektoren eine spezifische DNA-Sequenz kloniert, welche jeweils 16 Nukleotide des Sense- bzw. Antisense-Strangs der Ziel-mRNA-Sequenz enthält, sowie einen „Linker“ für die Haarnadelstruktur, wird nach Transfektion dieses Plasmids in Zellen eine shRNA exprimiert, welche sich spezifisch an die Ziel-mRNA-Sequenz anlagert. Hierdurch kommt es zum Abbau der Ziel-mRNA und damit zum Knockdown des Gens. Die Schwierigkeit liegt in der Auswahl einer Ziel-Sequenz, welche zu einem effektiven Silencing führt.

Um die Mcl-1-Expression in HCC-Zellen auszuschalten wurde zum einen der Vektor pSSH1/Mcl-1 eingesetzt, welcher eine spezifische shRNA gegen die mRNA von Mcl-1 exprimiert [Taniai *et al.*, 2004]. Die Arbeitsgruppe um Gregory Gores konnte in verschiedenen Zelltypen einen Knockdown der Mcl-1-Expression nach Transfektion dieses Plasmids beobachten. Huh7-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Vektors oder mit dem Expressionsvektor für Mcl-1 als Positivkontrolle transfiziert. Nach unterschiedlichen Zeiträumen wurden die Zellen lysiert und die Expression von Mcl-1 untersucht. Es konnte jedoch in den Huh7-Zellen in keinem der durchgeführten Versuche eine Verminderung der Mcl-1-Expression nach Transfektion des Silencing-Plasmids festgestellt werden (Abbildung 6A).

Daraufhin wurden verschiedenen siRNA-Sequenzen ausgetestet. Es wurde ein Programm der Firma Eurofins/MWG eingesetzt, welches in einer mRNA-Sequenz potentielle Zielstellen

für siRNA-Sequenzen berechnet (<http://www.eurofindna.com/de/home.html>). Aus 10 berechneten siRNA-Sequenzen gegen humanes Mcl-1 wurden 3 ausgewählt (siRNA2, siRNA4, siRNA5), und bezüglich ihrer Effizienz getestet. Hierzu wurden Huh7-Zellen mit 40nM der siRNAs transfiziert, und 48h später die Expression von Mcl-1 auf Proteinebene untersucht. Alle drei getesteten Sequenzen führten zu einer Reduktion der Mcl-1-Expression, wobei Sequenz 4 den deutlichsten Knockdown der Mcl-1-Expression bewirkte (Abbildung 6B). Für die weiteren Versuche wurde daher mit dieser siRNA gearbeitet.

Um zu untersuchen wie effektiv die Transfektion der siRNA in Huh7-Zellen funktioniert, wurde eine siRNA eingesetzt, welche mit dem Fluoreszenzmolekül AlexaFluor488 gekoppelt ist. Nach Transfektion dieser siRNA in Zellen können diese dann entweder mikroskopisch oder durchflusszytometrisch untersucht werden. Huh7-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der AlexaFluor488-markierten siRNA transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen abgelöst, gewaschen, in PBS aufgenommen, und der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen stieg mit zunehmender siRNA-Konzentration logarithmisch an (Abbildung 6C).

Im weiteren Verlauf sollte nun bestimmt werden, welche Konzentrationen der siRNA zu einem effektiven Knockdown von Mcl-1 führen, und wie lange dieser Effekt anhält. Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Mcl-1 siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA-Sequenz gegen GFP transfiziert und nach 24h die Mcl-1-Expression im Western Blot bestimmt. Alle drei getesteten Konzentrationen führten zu einem effektiven Mcl-1 Knockdown (Abbildung 7A). Im Anschluss wurde mit dem gleichen Versuchsaufbau getestet, wie lange ein Knockdown von Mcl-1 anhält. Hierzu wurden die Zellen 24 bis 72h nach Transfektion von 40nM siRNA lysiert. Auch 3 Tage nach Transfektion der Mcl-1 siRNA war die Proteinexpression von Mcl-1 noch effektiv unterdrückt (Abbildung 7B). Um den Knockdown von Mcl-1 auch auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde die RNA der Zellen 24h nach Transfektion der Mcl-1 siRNA bzw. der GFP siRNA isoliert und mittels Real Time-PCR die Expression der Mcl-1 mRNA untersucht. Diese lag zwischen 24 und 31% im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (Abbildung 7C). Es war nun also möglich, spezifisch die endogene Mcl-1-Expression effektiv und über einen längeren Zeitraum hinweg in den HCC-Zellen zu hemmen.

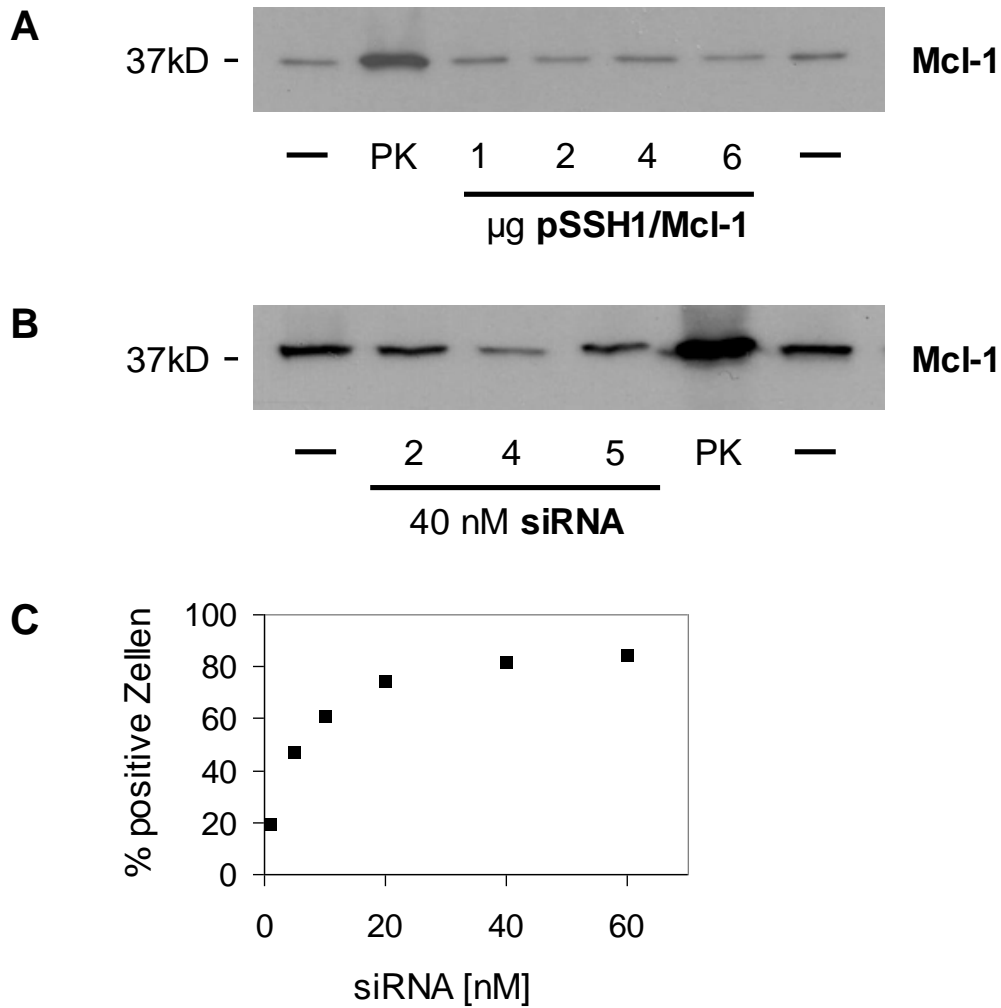


Abbildung 6: Austestung verschiedener Silencing-Ansätze.

Huh7-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen eines Expressionsvektors, der eine shRNA gegen Mcl-1 exprimiert (**A**), oder mit 40nM verschiedener siRNA-Sequenzen (**B**) transfiziert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen und Zellen, welche mit dem Expressionsvektor pEF4/Mcl-1 (Positivkontrolle, PK) transfiziert worden waren. Nach 48h wurden die Proteine isoliert, und mittels SDS-PAGE und Western Blot die Mcl-1-Expression untersucht. (**C**) Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Fluoreszenz (AlexaFluor488)-gekoppelten siRNA transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen abgelöst, in PBS aufgenommen, und durchflusszytometrisch der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen gemessen.

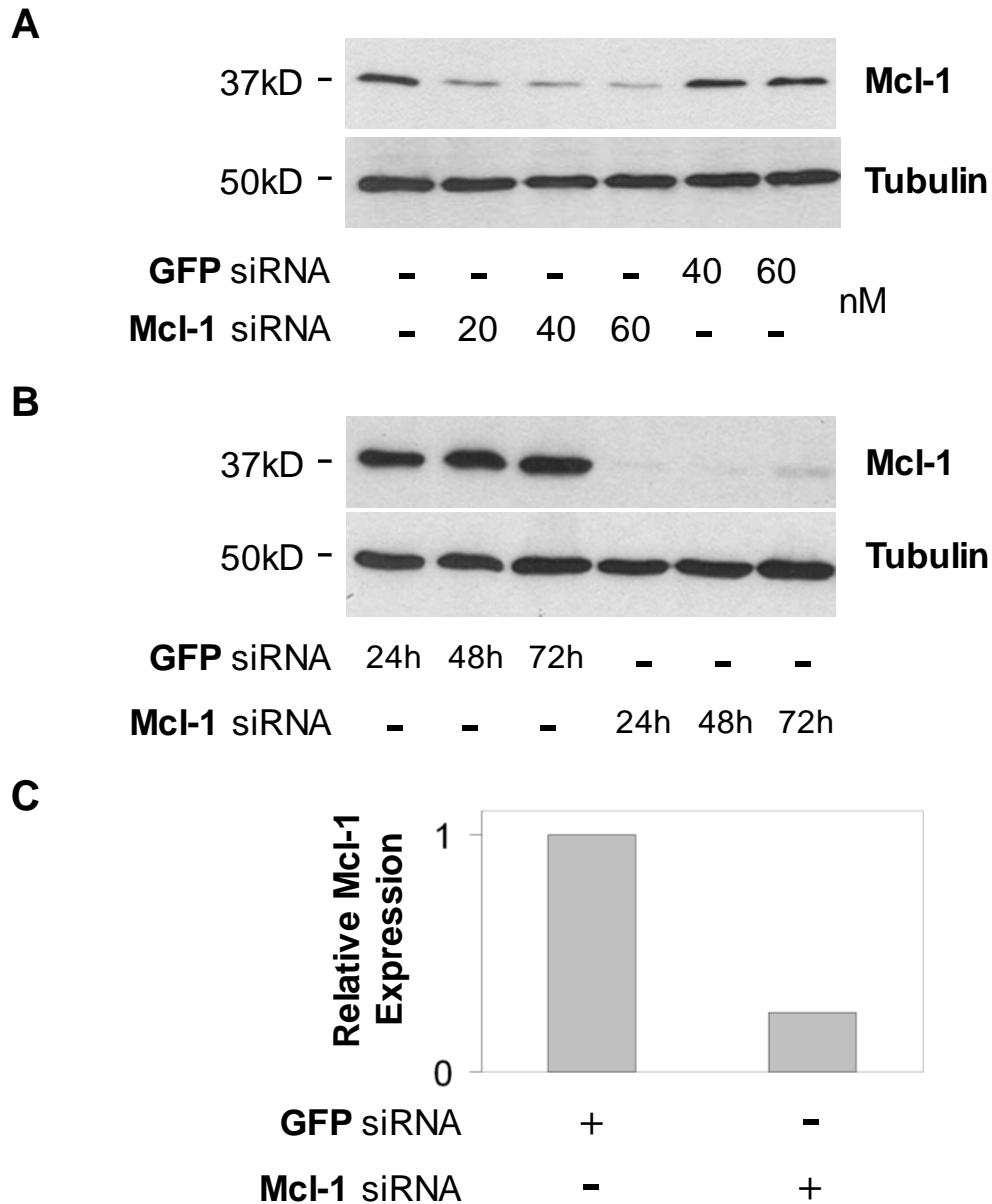


Abbildung 7: Effektivität des Mcl-1 knockdowns.

Huh7-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen **(A)** oder mit 40nM **(B, C)** einer siRNA-Sequenz gegen Mcl-1 bzw. gegen GFP als Negativkontrolle transfiziert. **(A, B)** Nach 24h bzw. unterschiedlichen Zeiträumen wurden Proteine isoliert und mittels Western Blot die Mcl-1-Expression untersucht. **(C)** 24h nach Transfektion wurde die RNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Real Time-PCR die relative Mcl-1-Expression bestimmt.

1.6 Sensitivierung der HCC-Zellen gegenüber Chemotherapie durch Mcl-1-Silencing.

Als nächstes sollte der Effekt eines Knockdowns von Mcl-1 auf das Ansprechen der HCC-Zellen gegenüber einer Chemotherapeutika-Behandlung getestet werden. Hierzu wurden Huh7-Zellen mit Mcl-1 siRNA bzw. GFP siRNA transfiziert, nach 24h mit verschiedenen Chemotherapeutika behandelt, und nach weiteren 24h die Apoptoseinduktion analysiert. Der Knockdown von Mcl-1 in den Zellen allein führte zu keiner erhöhten Apoptoseinduktion (Abbildung 8). Dagegen konnten die Zellen durch einen Knockdown von Mcl-1 deutlich gegenüber einer Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika sensitiviert werden, wie Mitomycin C (10µM; 45,5 vs. 22,0%; $p < 0,001$), 5-FU (150µg/ml; 12,7 vs. 6,3%; $p < 0,01$), 5-FU mit Valproinsäure (VA 100µg/ml; 29,6 vs. 8,6%; $p < 0,001$), und Epirubicin (1µg/ml; 33,5 vs. 22,9%; $p < 0,01$). Allerdings konnte keine Sensitivierung der Zellen gegenüber UV-Bestrahlung nach Mcl-1 Knockdown beobachtet werden (Abbildung 8).

TRAIL-Agonisten werden in verschiedenen klinischen Studien bezüglich Anti-Tumor-Effektivität untersucht und erweisen sich bisher als vielversprechende Substanz [Bellail *et al.*, 2009]. Zudem zeigte sich TRAIL in Monotherapie als nicht toxisch für humane Hepatozyten [Ganten *et al.*, 2006]. Eine Behandlung der Huh7-Zellen mit TRAIL (50 bzw. 100µg/ml, 24h) führte zu keiner Apoptoseinduktion. Weiterhin konnte keine Sensitivierung der Zellen gegenüber TRAIL nach Mcl-1 Knockdown beobachtet werden (Abbildung 8).

Ein zentraler Prozess im Apoptose-Signalweg ist die Spaltung und damit Aktivierung verschiedener Caspasen. Daher sollte neben einer durchflusszytometrischen Auswertung der Apoptoseinduktion auch die Caspasen-Aktivität nach Mcl-1 Knockdown und Chemotherapeutika-Behandlung untersucht werden. Dazu wurden die Zellen erneut mit Mcl-1 siRNA oder GFP siRNA transfiziert, nach 24h mit Chemotherapeutika behandelt, und nach weiteren 24h die Caspasen-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Die Caspase-3- und Caspase-9-Aktivität war in Mcl-1 negativen Zellen nach Chemotherapeutika-Behandlung um das 2,5-fache (Caspase-3) bzw. das 2,6-fache (Caspase-9) erhöht (Abbildung 9).

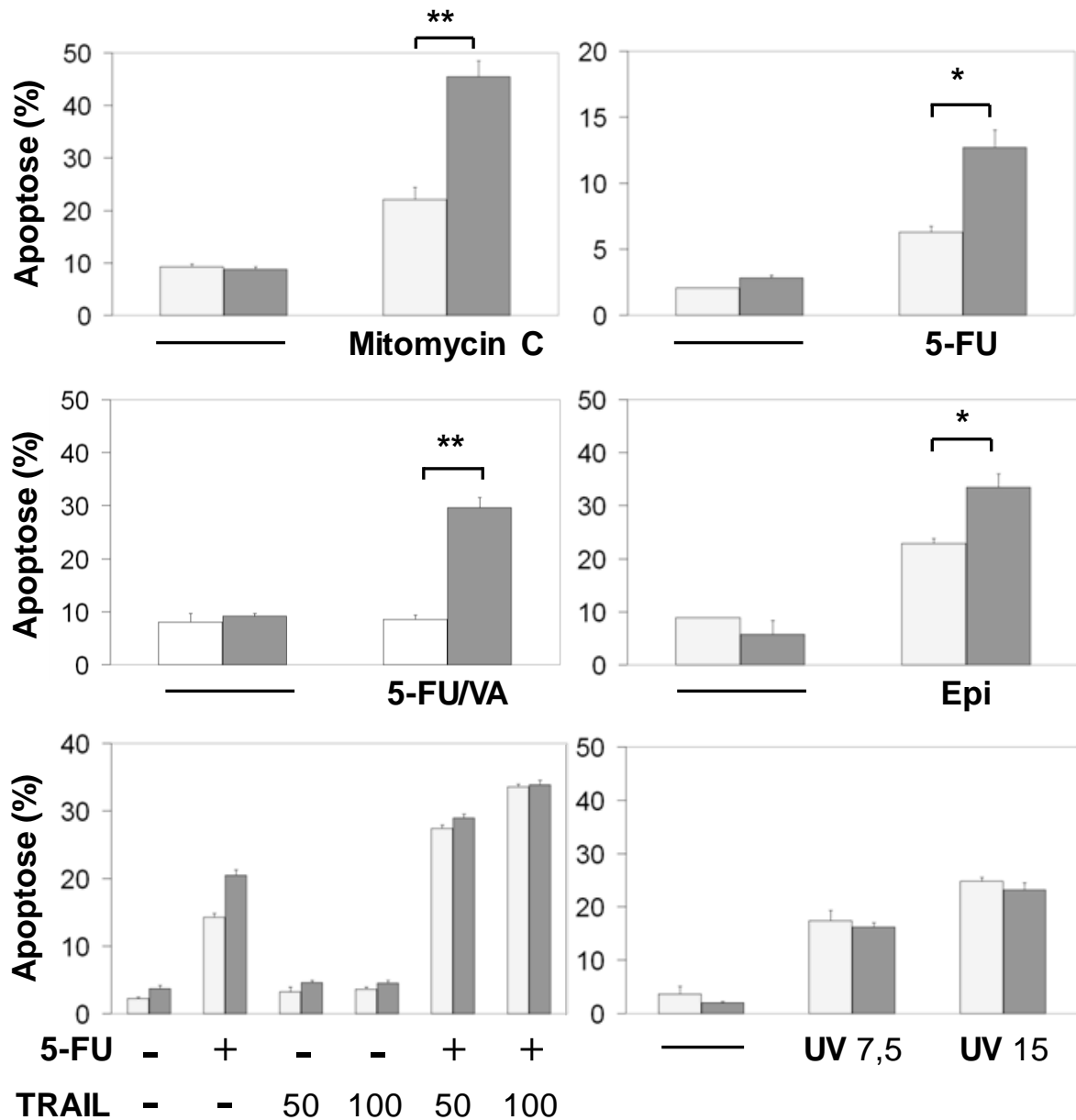


Abbildung 8: Sensitivierung von HCC-Zellen gegenüber Chemotherapie nach Mcl-1 knockdown.

24h nach Aussaat wurden Huh7-Zellen mit 40nM GFP siRNA (helle Balken) oder Mcl-1 siRNA (dunkle Balken) transfiziert. Nach weiteren 24h wurde das alte Medium abgenommen, und neues Medium zu den Zellen gegeben, was die Chemotherapeutika Mitomycin C (10µM), 5-FU (150µg/ml), Valproinsäure (VA, 100µg/ml) oder Epirubicin (1µg/ml), oder den Todesrezeptor TRAIL (50/100ng/ml) enthielt (Boxen 1-5), oder die Zellen wurden mit UV-Licht (7,5 bzw. 15mJ/cm²) bestrahlt (letzte Box). Nach 24h wurden die Zellen geerntet und die Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch gemessen. *: p<0,01, **: p<0,001

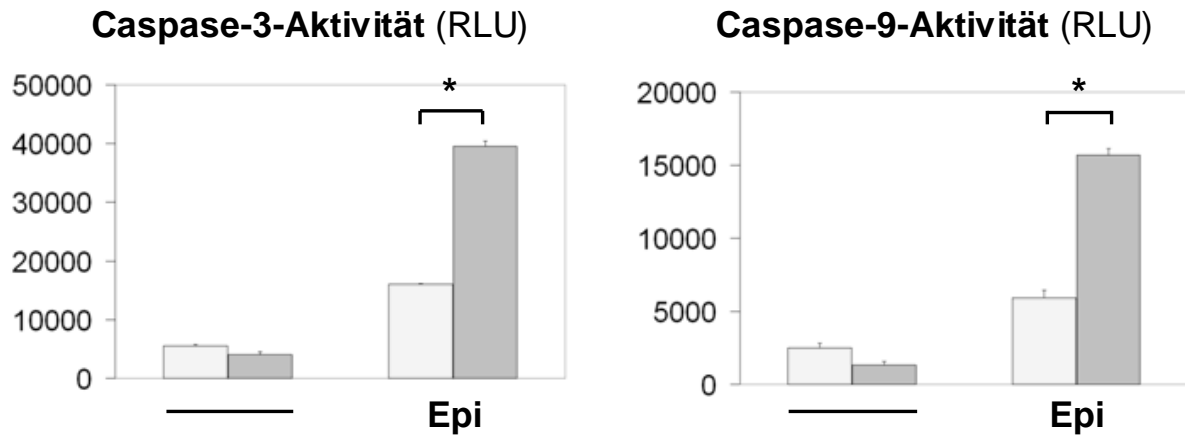


Abbildung 9: Erhöhte Caspasen-Aktivität nach Chemotherapie in Mcl-1 negativen Zellen.

24h nach Aussaat wurden Huh7-Zellen mit 40nM GFP siRNA (helle Balken) oder Mcl-1 siRNA (dunkle Balken) transfiziert. Nach weiteren 24h wurde das alte Medium abgenommen, und neues Medium mit Epirubicin (Epi, 1µg/ml) zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 24h wurden die Zellen lysiert, und die Aktivität der Caspasen-3 und -9 bestimmt (siehe Material und Methoden). *: $p < 0,01$. RLU: Relative Light Units.

1.7 Sensitivierung der HCC-Zellen gegenüber PI3K- und Cox-2-Hemmung durch Mcl-1-Silencing.

Tumorzellen weisen eine erhöhte Teilungsrate auf, was sie empfindlicher für eine Zytostatikabehandlung macht. Bei einer Chemotherapie werden jedoch auch gesunde Zellen mit betroffen, was zu teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen dieser Therapieform führen kann. Zielgerichtete Therapien (sog. „targeted therapies“) dagegen sind Ansätze, die gegen definierte molekulare Strukturen in oder auf Tumorzellen gerichtet sind und dadurch spezifische Signalwege vorwiegend in Tumorzellen blockieren. Ideale Zielstrukturen sind solche, die wichtig für das Überleben der Tumorzelle sind, sich ausschließlich oder zumindest vorwiegend auf Tumorzellen, nicht dagegen in oder auf normalen Zellen befinden, und für normale Zellen von untergeordneter Rolle sind. Beispiele für zielgerichtete Therapien sind (Multi-)Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) oder Antikörper zur Blockade von Wachstumsfaktorrezeptoren [Pang und Poon, 2007; Llovet und Bruix, 2008]. Zur Zeit befinden sich zahlreiche neue Therapieansätze in der klinischen Entwicklung, bzw. haben bereits Einzug in die Therapie bestimmter Tumorentitäten gefunden.

In dieser Arbeit sollte der Effekt einer gleichzeitigen Hemmung der Mcl-1-Expression und von verschiedenen (Rezeptortyrosin-)Kinasen (RTK) auf die Apoptoseinduktion in HCC-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen erneut mit siRNA gegen Mcl-1 bzw. gegen GFP transfiziert, nach 24h mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren behandelt, und nach weiteren 24h die Apoptoseinduktion bestimmt. Die Inhibition der PI3-Kinase und von mTOR durch LY294002 bzw. Rapamycin hatte auf Huh7-Zellen nur einen minimalen Effekt. Allerdings konnte die Apoptoseinduktion deutlich gesteigert werden, wenn die Mcl-1-Expression gehemmt war (LY294002: 19,9 vs. 8,3%; $p < 0,001$; Rapamycin: 17,2 vs. 12,0%; $p < 0,01$). Ebenso konnte eine Steigerung der Apoptoseinduktion nach Mcl-1-Hemmung und Inhibition der VEGF-RTK und der PDGF-RTK durch SU5614 beobachtet werden (12,9 vs. 6,6%; $p < 0,01$) (Abbildung 10). Dagegen konnte eine Hemmung der Mcl-1-Expression keine Sensitivierung gegenüber einer Inhibition von MEK1 durch PD98059, der Src-Kinase durch PP2, von JNK durch SP600125, oder der EGF-RTK durch AG1478 oder AG490 bewirken (Abbildung 10). Demgegenüber steht eine Cox-2-Inhibition durch Celecoxib, die bereits basal in HCC-Zellen Apoptose auslöst, welche durch einen Mcl-1 Knockdown noch weiter verstärkt werden konnte (38,9 vs. 22,8%; $p < 0,001$) (Abbildung 10).

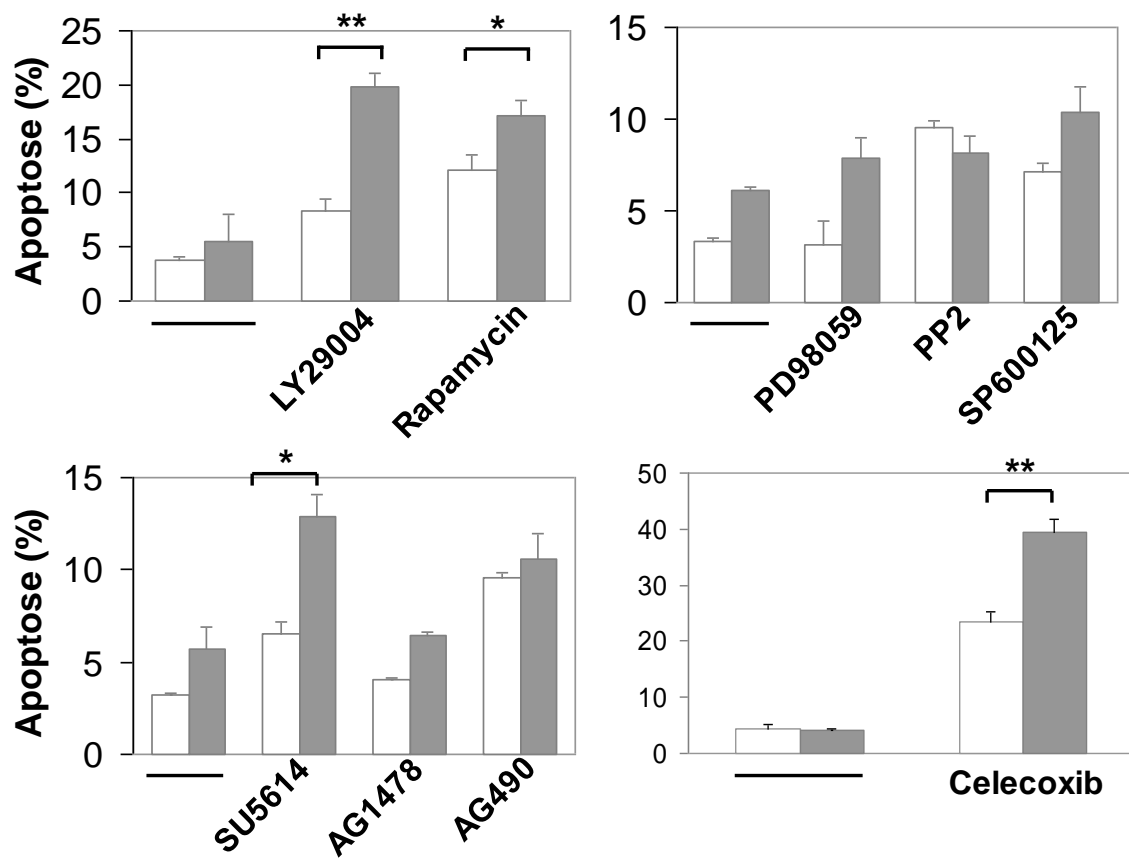


Abbildung 10: Erhöhte Sensitivität gegenüber PI3K-Blockade und Cox2-Hemmung in Mcl-1 negativen Zellen.

24h nach Aussaat wurden Huh7-Zellen mit 40nM GFP siRNA (helle Balken) oder Mcl-1 siRNA (dunkle Balken) transfiziert. Nach weiteren 24h wurde das alte Medium abgenommen, und neues Medium zu den Zellen gegeben, welches folgende Inhibitoren enthielt: LY294002 (PI3K-Inhibitor, 25 μ M), Rapamycin (mTOR-Inhibitor, 50pM), PD98059 (MEK1-Inhibitor, 50 μ M), PP2 (Src-Kinase-Inhibitor, 10nM), SP600125 (JNK-Inhibitor, 500nM), SU5614 (VEGF/PDGF RTK-Inhibitor, 15 μ M), AG1478 (EGF-RTK-Inhibitor, 5 μ M), AG490 (EGF-RTK-Inhibitor, 2 μ M), oder Celecoxib (Cox-2-Inhibitor, 100 μ M). Nach 24h wurden die Zellen geerntet und die Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch gemessen. *: p<0,01, **: p<0,001

1.8 Sensitivierung der HCC-Zellen gegenüber einer kombinierten Therapie durch Mcl-1-Silencing.

In modernen HCC-Therapien kommen zumeist kombinierte Ansätze aus Chemotherapie und zielgerichteten Therapien zum Einsatz [Avila *et al.*, 2006]. Daher sollte hier untersucht werden, ob durch eine Kombination der oben beschriebenen Ansätze die Apoptoseinduktion in HCC-Zellen weiter verstärkt werden kann. Hierzu wurden die Zellen mit siRNA gegen GFP oder gegen Mcl-1 transfiziert, und im Anschluss mit verschiedenen Kombinationstherapien behandelt. Zuerst wurde untersucht, ob eine PI3K-Inhibition, die wie ein Mcl-1 Knockdown HCC-Zellen gegenüber Chemotherapeutika sensitiviert (s. Abbildung 5), den Effekt einer Mcl-1-Hemmung noch verstärken kann. Dazu wurden die transfizierten Zellen für 1h mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 vorinkubiert, und die Zellen im Anschluss für 24h mit verschiedenen Chemotherapeutika behandelt. Eine kombinierte Hemmung von Mcl-1 und der PI3-Kinase konnte in allen Therapieansätzen eine deutliche Sensitivierung der HCC-Zellen gegenüber Apoptoseinduktion bewirken (5-FU + LY294002: 29,9 vs. 18,0%; 5-FU/V + LY294002: 47,3 vs. 19,8%; Epirubicin + LY294002: 35,2 vs. 13,9%; Mitomycin C + LY294002: 39,5 vs. 19,4%; $p < 0,001$) (Abbildung 11 A).

Des Weiteren wurden die Zellen mit den Kinase-Inhibitoren Rapamycin, SU5614 oder PD98059 vorbehandelt, und dann für 24h 5-FU (150µg/ml) zugegeben. Weder eine kombinierte Mcl-1 und mTOR- noch eine kombinierte Mcl-1 und VEGF/PDGF-RTK-Hemmung konnte die HCC-Zellen weiter gegenüber dem Zytostatikum sensitivieren. Dagegen zeigten sich die Zellen anfälliger gegenüber 5-FU-Behandlung nach kombinierter Mcl-1- und MEK1-Hemmung durch PD98059 (22,6 vs. 10,9%; $p < 0,01$) (Abbildung 11 B).

In einem weiteren Ansatz wurden die HCC-Zellen mit den Kinase-Inhibitoren PP2, SP600125, AG1487 oder AG490 vorbehandelt, und dann für 24h 5-FU+Valproinsäure (150µg/ml und 100µg/ml) zugegeben. Keine der untersuchten kombinierten Ansätze konnte die HCC-Zellen weiter gegenüber der Chemotherapie sensitivieren (Abbildung 11 C).

Zudem wurden wiederum die Caspase-3- und -9-Aktivitäten nach kombinierter Therapie als spezifischer Apoptosenachweis bestimmt. Hierzu wurden die Zellen nach siRNA-Transfektion, PI3K-Hemmung und 5-FU/Valproinsäure-Behandlung nach 8h bzw. 24h lysiert, und die aktivierten Caspasen mittels eines fluorometrischen Assays bestimmt. Sowohl die Caspase-3- als auch die Caspase-9-Aktivität war in Mcl-1 negativen Zellen nach PI3K-Inhibition und Chemotherapie deutlich erhöht im Vergleich zu Mcl-1 positiven Zellen, und im Vergleich zu Zellen mit aktiver PI3-Kinase (Abbildung 12).

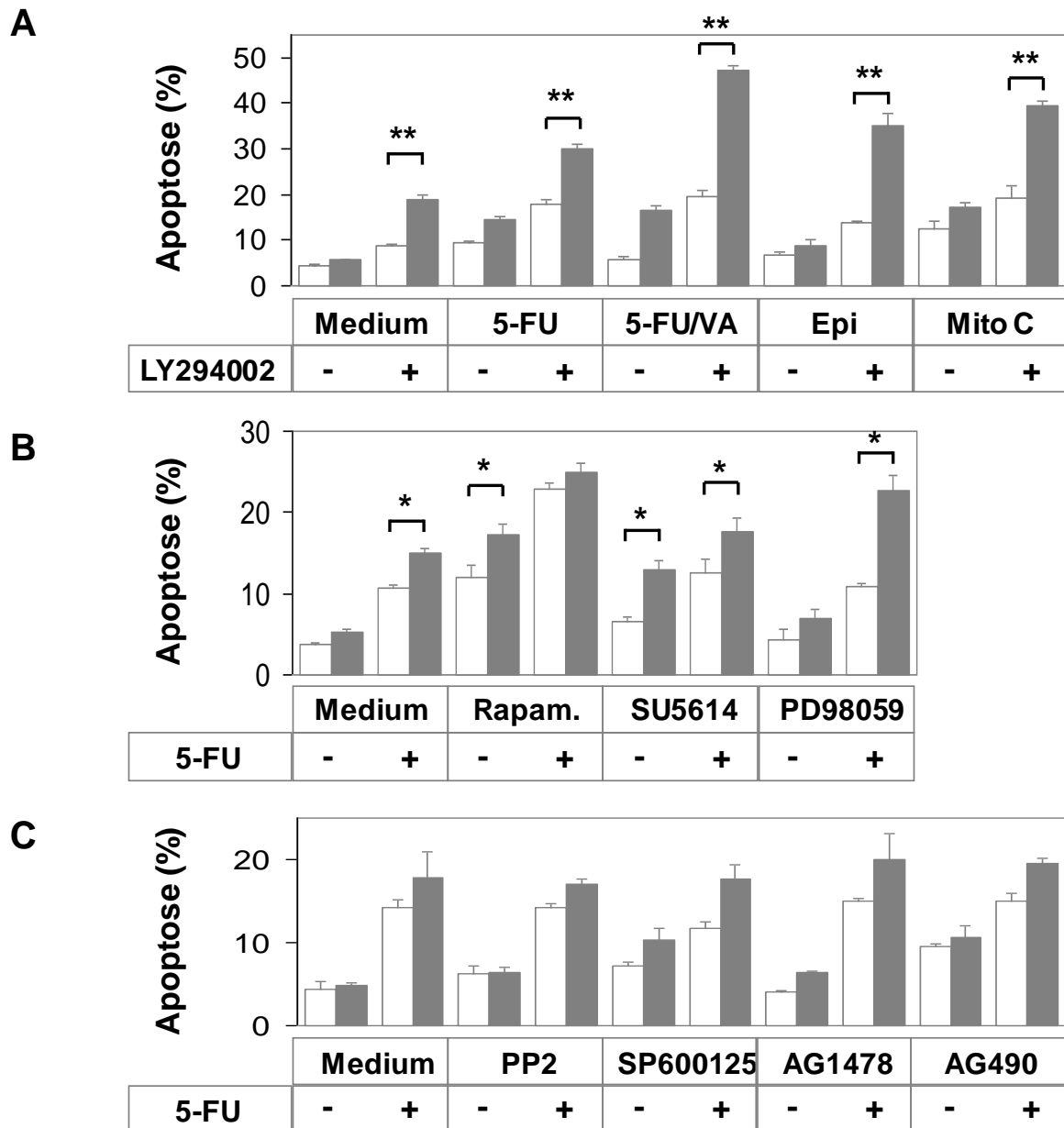


Abbildung 11: Erhöhte Sensitivität gegenüber kombinierter Therapie in Mcl-1 negativen Zellen.

24h nach Aussaat wurden Huh7-Zellen mit 40nM GFP siRNA (helle Balken) oder Mcl-1 siRNA (dunkle Balken) transfiziert. **(A)** Nach 24h wurden die Zellen mit 5-FU (150µg/ml), VA (100µg/ml), Epirubicin (0,2µg/ml) oder Mitomycin C (5µM) behandelt, mit (+) oder ohne (-) einstündiger Vorinkubation mit LY294002 (25µM). **(B)** Die Zellen wurden für eine Stunde mit den Kinaseinhibitoren Rapamycin (50pM), SU5614 (15µM) oder PD98050 (50µM) oder **(C)** mit PP2 (10nM), SP600125 (500nM), AG1478 (5µM) oder AG490 (2µM) vorinkubiert, und dann 5-FU (150µg/ml) zugegeben (+). Nach 24h wurden die Zellen geerntet und die Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch gemessen. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$

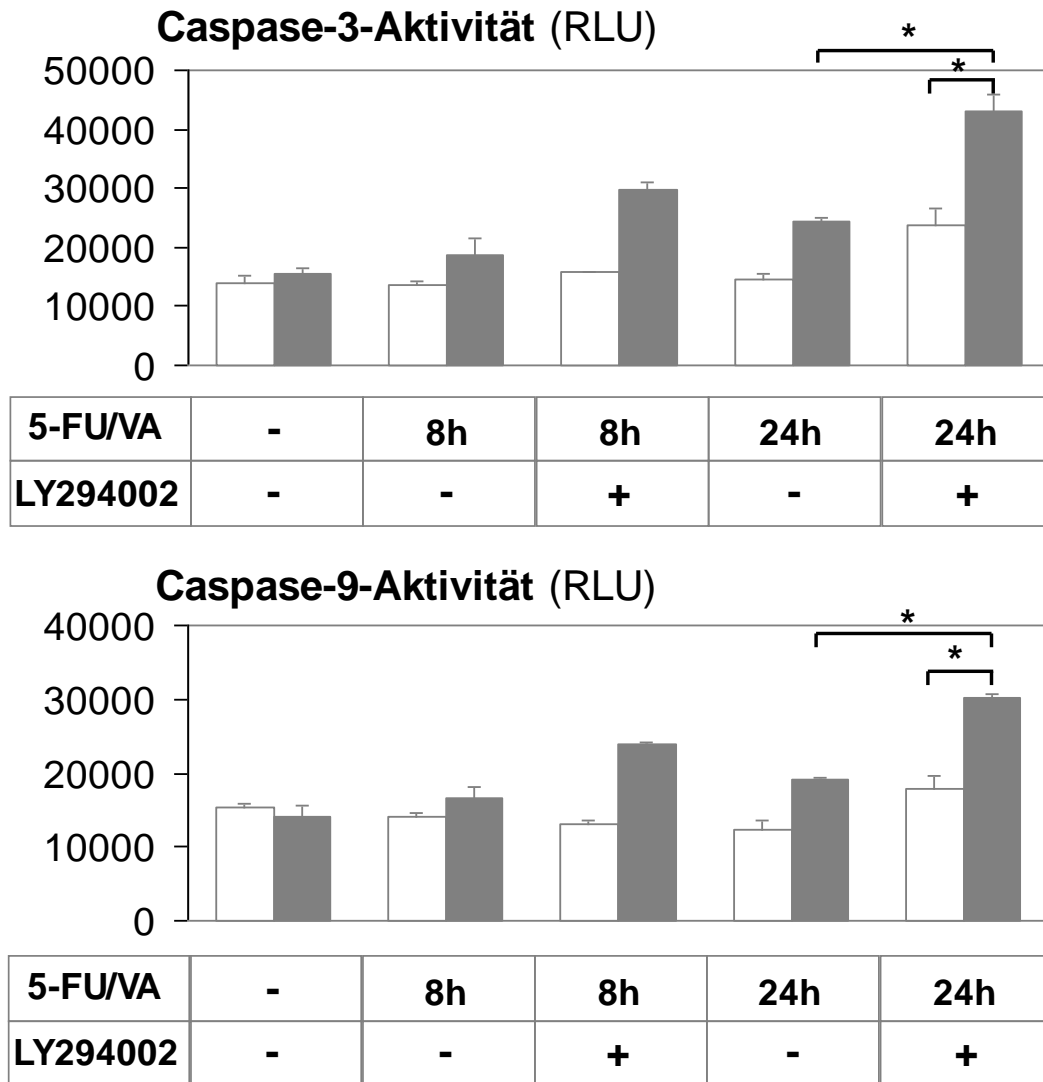


Abbildung 12: Erhöhte Caspasen-Aktivität nach kombinierter Therapie in Mcl-1 negativen Zellen.

24h nach Aussaat wurden Huh7-Zellen mit 40nM GFP siRNA (helle Balken) oder Mcl-1 siRNA (dunkle Balken) transfiziert. Nach weiteren 24h wurde das alte Medium abgenommen, und neues Medium mit LY294002 (25 μ M) zugegeben. Nach 1h Vorinkubation wurde zudem 5-FU+Valproinsäure (150 μ g/ml; 100 μ g/ml) zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 8h bzw. 24h wurden die Zellen lysiert, und die Aktivität der Caspasen-3 und -9 bestimmt (siehe Material und Methoden). *: $p < 0,01$. RLU: Relative Light Units

2. Bedeutung von Mcl-1 für die Leber

2.1 Etablierung einer Mauslinie mit Mcl-1 negativen Hepatozyten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Bedeutung von Mcl-1 für die Leber untersucht werden. Da ein kompletter Knockout von Mcl-1 in einer frühen Phase der Embryogenese letal ist [Rinkenberger *et al.*, 2000], sollte eine Mauslinie generiert werden, welche spezifisch in Hepatozyten kein Mcl-1 exprimiert. Hierzu wurde ein Mausmodell von Joseph T. Opferman verwendet [Opferman *et al.*, 2003/2005]. Das erste Exon des Mcl-1 Gens ist in diesen Mäusen „gefloxt“, es befindet sich also sowohl stromaufwärts also auch stromabwärts des Exons 1 jeweils eine loxP („locus of crossover (x) in P1“-Stelle (siehe Abbildung 13A). Es handelt sich hierbei um Erkennungsstellen der Bakteriophagen P1 Rekombinase Cre („catalyzes recombination“). Bei den loxP-Stellen handelt es sich um 2x13 bp lange palindromische Sequenzen, die durch einen 8 bp langen „Spacer“ getrennt sind:

ATAACTTCGTATA	ATGTATGC	TATACGAAGTTAT
„inverted repeat I“	spacer	“inverted repeat II“

Die Rekombinase bindet an die „inverted repeats“ (umgekehrte Wiederholungen), die Rekombination findet innerhalb des Spacers statt. Da die Spacer asymmetrisch sind, ist eine Rekombination nur möglich, wenn die Zielstellen in der gleichen Orientierung vorliegen.

Das Cre-loxP-System findet Verwendung vor allem für Gen-Deletionen, -Insertionen, -Inversionen oder -Austausch und ist in der modernen Mausgenetik weit verbreitet [Branda und Dymecki, 2004]. Da Cre keine Kofaktoren benötigt und in den meisten Geweben wirksam ist, kann dieses System in unterschiedlichen Zellarten eingesetzt werden. Hierbei werden Mäuse, welche ein gefloxtes Gen enthalten, mit Mäusen gekreuzt, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebs-/ zellspezifischen und/oder eines induzierbaren Promoters exprimieren. Mittlerweile gibt es zahlreiche dieser Mauslinien käuflich zu erwerben, z.B. über „The Jackson Laboratory“ (<http://jaxmice.jax.org>).

Um im Rahmen dieser Arbeit eine Hepatozyten-spezifische Rekombination des Mcl-1-Gens zu erzeugen, wurden Mäuse mit gefloxtem Mcl-1 (Mcl-1^{flox/flox}) mit Albumin-Cre (AlbCre)-Mäusen gekreuzt. AlbCre-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter einem Albumin-Promotor, der nur in Hepatozyten aktiv ist [Postic *et al.*, 1999]. Der Albuminpromotor wird am Tag 9,5 nach Befruchtung in den Mausembryos aktiviert, nachdem sich am Tag 8,5 die Organanlage für die Leber aus dem Entoderm abgegrenzt hat [Kaestner, 2005]. Die Menge an Albumin steigt dann mit zunehmender Leberentwicklung weiter an [Cascio und Zaret,

1991]. Daher kommt es in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen spezifisch in Hepatozyten zu einer Expression der Cre-Rekombinase bereits während der Embryogenese, und dadurch zu einer Deletion des Mcl-1-Gens (s. Abbildung 13A). Der Grad der Rekombination ist altersabhängig; bereits während der Embryogenese (Tag 14 nach Befruchtung) konnte in einzelnen Individuen eine beginnende Rekombination des Mcl-1-Gens beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ab der achten Lebenswoche sind etwa 80% der DNA rekombiniert, wodurch die Proteinexpression unterbunden wird [Postic und Magnuson, 2000].

Mcl-1^{flox/flox} Mäuse wurden mit Mcl-1^{flox/wt}-AlbCre-Mäusen verpaart. Der Nachwuchs wurde mittels DNA-Verdau einer Ohrbiopsie in einer PCR bezüglich Mcl-1-Status (Wildtyp, ein- oder zwei gefloxtete Allele) und bezüglich AlbCre analysiert. Zudem wurde DNA aus Leberlysaten entsprechender Mäuse isoliert, und hier zudem eine PCR für das rekombinierte Genprodukt (Δ Mcl-1) durchgeführt (Abbildung 13B). Alle Tiere, die mindestens ein gefloxtetes Mcl-1-Allel trugen und Cre exprimierten, zeigten in der Leber auch ein PCR-Produkt für Δ Mcl-1, was das Resultat der Cre-Rekombination des gefloxteten Mcl-1-Gens in Hepatozyten ist.

Es zeigte sich, dass männliche Mcl-1^{flox/flox} Mäuse sich nicht vermehren. Der Grund hierfür konnte nicht abschließend geklärt werden. Zudem wurde auch Cre nur heterozygot verpaart. Daher mussten alle Nachkommen genotypisiert werden, bevor sie für Untersuchungen eingesetzt werden konnten.

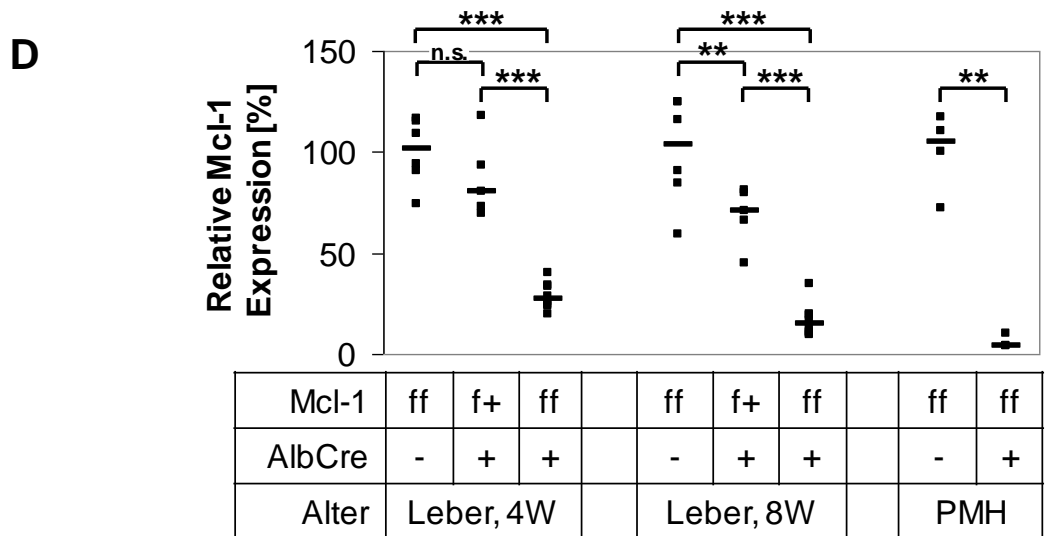
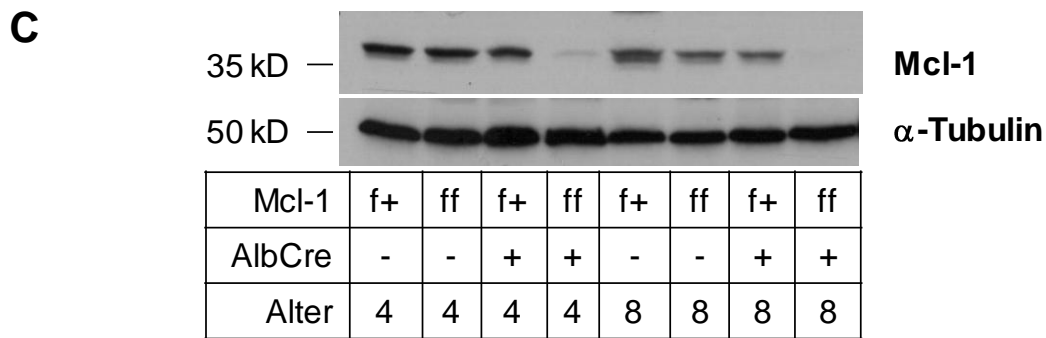
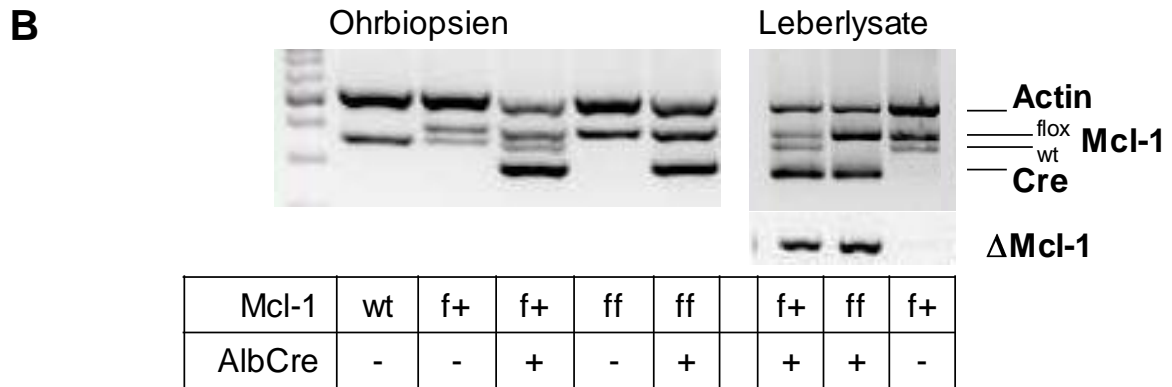
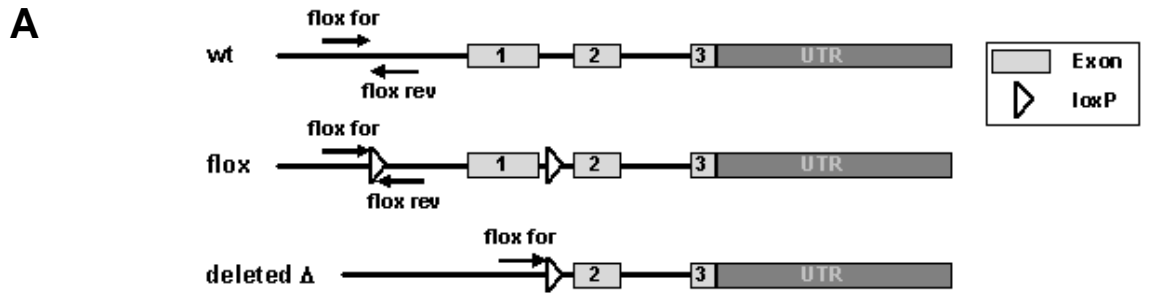
Als erstes sollte die Mcl-1-Expression in der Leber von Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen und Geschwistertieren mit unterschiedlichen Genotypen untersucht werden. Hierzu wurden die Proteine aus Lebern von vier bzw. acht Wochen alten Mcl-1^{flox/wt}-, Mcl-1^{flox/flox}-, Mcl-1^{flox/wt}-AlbCre und Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und nach Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen murines Mcl-1 bzw. gegen α -Tubulin untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression von Mcl-1 auf Proteinebene in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen sowohl im Alter von vier als auch von acht Wochen fast komplett unterbunden war. Dagegen zeigten Mäuse mit nur einem gefloxteten Allel und einer Expression von Cre nur eine minimale Abnahme in der hepatischen Mcl-1-Expression (Abbildung 13C). Im Gegensatz dazu reichte in murinen embryonalen Fibroblasten die Deletion eines Mcl-1-Allels bereits aus, um die Mcl-1-Expression deutlich zu reduzieren [Opferman *et al.*, 2003].

Des Weiteren sollte auch die Expression von Mcl-1 auf mRNA-Ebene in den Lebern untersucht werden. Die mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe spezifischer Primer in einer Real Time-PCR die Expression von Mcl-1 und von GAPDH als Ladekontrolle bestimmt, und die relative Mcl-1-Expression bestimmt. Es konnte eine deutliche Abnahme der Mcl-1 mRNA Expression in Leberlysaten von Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen (4 Wochen: 27%; 8 Wochen: 15%; $p < 0,001$), und eine leichte Abnahme in

Leberlysaten von Mcl-1^{flox/wt}-AlbCre-Mäusen im Vergleich zu Mcl-1^{flox/flox}-Mäusen (4 Wochen: 81%; n.s.; 8 Wochen: 71%; p<0,01) beobachtet werden (Abbildung 13D). Die Effizienz der Rekombination war geschlechtsunabhängig (nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob die nachgewiesene Restexpression aus Hepatozyten oder aus Nichtparenchymzellen der Leber stammt, wurden primäre murine Hepatozyten (PMH) aus acht Wochen alten Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre und Kontrolltieren isoliert, die mRNA gewonnen und per Real Time-PCR analysiert. Die Expression der Mcl-1 mRNA war in den PMH der Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäuse deutlich reduziert im Vergleich zu Kontrollhepatozyten (4%; p<0,01) (Abbildung 13D).

Abbildung 13: Generierung einer Hepatozyten-spezifischen Mcl-1 knockout Maus.

(A) Prinzip des zellspezifischen knockouts von Mcl-1: stromaufwärts und stromabwärts von Exon 1 des Mcl-1 Gens wurden loxP-Stellen eingefügt. Durch entsprechende Primer (Pfeile; „flox forward“ und „flox reverse“) kann zwischen dem Wildtyp-Allel (wt) und dem geflochten Allel (flox) unterschieden werden. In Zellen, welche Cre exprimieren, entsteht durch Rekombination ein Allel ohne Exon 1 (deleted, Δ). Skizze nach [Opferman et al, 2003]. **(B)** Aus Ohrbiopsien oder Leberlysaten von Wildtyp-Mäusen (wt), Mäusen mit einem (f+) oder zwei (ff) geflochten Allelen, mit oder ohne AlbCre (+/-), wurde die DNA isoliert. Es wurde eine PCR mit spezifischen Primern für gefloxtes bzw. wt-Mcl-1, deleted (Δ) Mcl-1, Cre, und Actin als interne Kontrolle durchgeführt, und die Amplifikate auf einem 2% Agarose-Ethidiumbromid-Gel aufgetrennt. **(C)** Leberlysate von 4 bzw. 8 Wochen alten Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre und Kontrollmäusen wurden im Western Blot bezüglich Mcl-1 Expression untersucht. Die α -Tubulin Expression diente als Ladekontrolle. **(D)** Aus den Lebern von 4 bzw. 8 Wochen alten Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre und Kontrollmäusen bzw. aus isolierten primären murinen Hepatozyten (PMH) 8 Wochen alter Tiere wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression von Mcl-1 und GAPDH wurde in einer RealTime-PCR mit Hilfe spezifischer Primer bestimmt, und die relative Mcl-1/GAPDH Expression berechnet. Sowohl Einzelwerte (Quadrate) als auch Mediane (Balken) sind angezeigt.



2.2 Expression pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen.

Die Bcl-2-Proteinfamilie besteht aus verschiedenen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern, die ähnliche Interaktionen aufweisen. Es könnte also vermutet werden, dass der Verlust eines Mitglieds durch eine veränderte Expression eines anderen Mitglieds kompensiert wird. Daher wurde untersucht, ob in der Leber von Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen eine veränderte Expression anderer Bcl-2-Proteine zu beobachten ist. Es wurden erneut Proteine aus Lebern acht Wochen alter Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre und Kontrollgeschwistertiere isoliert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, und mittels spezifischer Antikörper die Expression verschiedener Bcl-2-Proteine analysiert. Es konnte keine Veränderung in der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L, oder der pro-apoptotischen Proteine Bid, Bax oder Bak festgestellt werden (Abbildung 14).

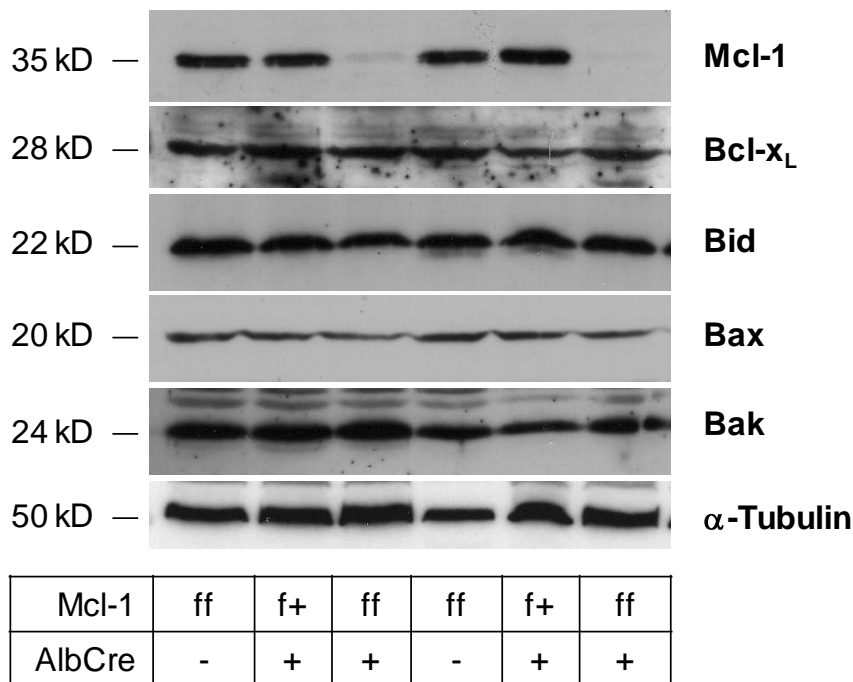


Abbildung 14: Expression von Bcl-2-Proteinen in Leberlysaten von Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen.

In Leberlysaten von Mcl-1^{flox/flox}, Mcl-1^{flox/+}-AlbCre und Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen im Alter von 8 Wochen wurde im Western Blot die Expression der Bcl-2-Proteine Mcl-1, Bcl-x_L, Bid, Bax und Bak und die Expression von α -Tubulin als Ladekontrolle untersucht.

2.3 Basale Leberschädigung in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen.

Es sollte untersucht werden, wie sich eine fehlende *Mcl-1*-Expression auf die Leber auswirkt. Interessanterweise waren die Lebern von *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen deutlich kleiner als die ihrer Geschwistertiere (Abbildung 15A/B). Dieser Effekt war altersabhängig: Während das Lebergewicht in vier Wochen alten *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäuse nur geringfügig geringer war als in Geschwistertieren (0,95 vs. 1,06g, entspricht 90%, n.s.), war der Unterschied in acht Wochen alten Tieren deutlich ausgeprägt (0,84 vs. 1,36g, entspricht 60%; $p < 0,001$), nahm aber mit zunehmendem Alter wieder etwas ab (1,21 vs. 1,74g, entspricht 70%; $p < 0,05$) (Abbildung 15A, rechtes Diagramm). Das Körpergewicht war in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen nur unwesentlich geringer war als das ihrer Geschwistertiere (91%, 90% bzw. 97%; n.s.) (Abbildung 15A, linkes Diagramm).

Des Weiteren wurden die Serumwerte der Alanin-Aminotransferase/Glutamat-Pyruvat-Transaminase (ALT/GPT) und der Aspartat-Aminotransferase/Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (AST/GOT) bestimmt, welche ein Maß für die Leberschädigung sind. Acht Wochen alte *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäuse zeigten 7,6-fach erhöhte GPT-Werte (Median: 280 vs. 40U/L; $p < 0,001$) und 5,7-fach erhöhte GOT-Werte (Median: 340 vs. 60U/L; $p < 0,001$) im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 15C). Der gleiche Effekt konnte in vier Wochen und vier Monate alten Mäusen beobachtet werden, wobei die GOT- und GPT-Serumwerte in den älteren Tieren nicht mehr so deutlich, jedoch immer noch signifikant, erhöht waren im Vergleich zu Geschwistertieren (Abbildung 15C). Um zu untersuchen, ob eine Reduktion der Lebergröße und ein Anstieg der Serumtransaminasen mit einer Verminderung der Leberstoffwechselfunktion einhergehen, wurde im Serum der *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre* und Kontrollmäuse Bilirubin gemessen. Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Blutfarbstoffes Hämoglobin. Erhöhte Bilirubin-Werte im Serum lassen auf eine verminderte Leberfunktion schließen. Allerdings konnten keine erhöhten Bilirubin-Werte im Serum der *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäuse festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

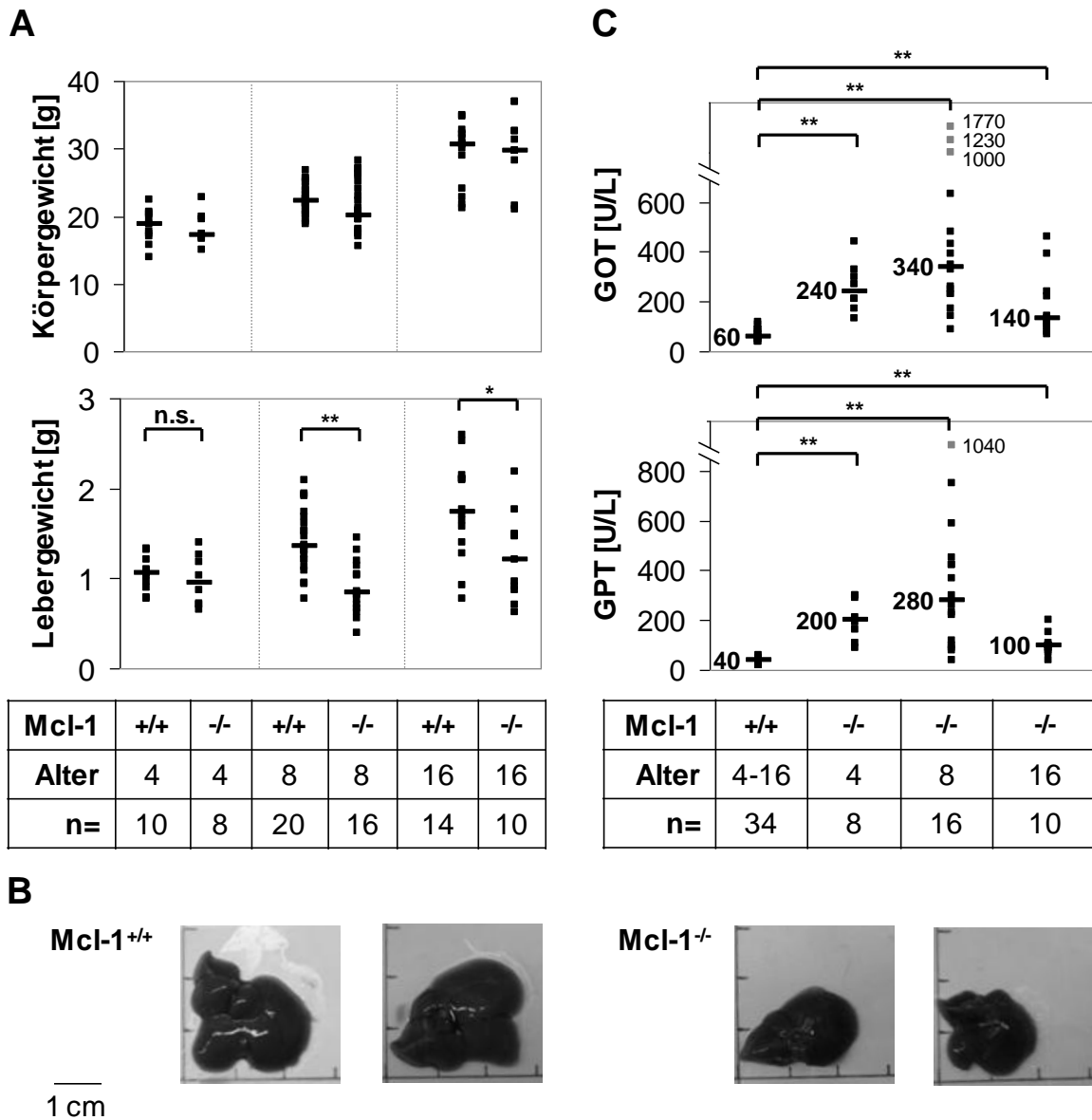


Abbildung 15: Basale Leberschädigung in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen.

(A) 4 bis 16 Wochen alte Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre (Mcl-1^{-/-}) oder Kontrollmäuse (Mcl-1^{+/+}) wurden bezüglich Körper- und Lebergewicht untersucht. (B) Makroskopische Erscheinung repräsentativer Lebern 8 Wochen alter Mcl-1^{+/+} oder Mcl-1^{-/-} Mäuse. (C) Serumwerte der Transaminasen GOT und GPT wurden aus dem Serum 4 bis 16 Wochen alter Mcl-1^{+/+} oder Mcl-1^{-/-} Mäuse bestimmt. Sowohl Einzelwerte (Quadrate) als auch Mediane (Balken) sind angezeigt. Werte außerhalb der Skalierung sind gesondert angegeben. *: p<0,05; **: p<0,001; n.s.: nicht signifikant.

2.4 Erhöhte Basalapoptoserate in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen.

Aufgrund der deutlich reduzierten Lebermasse in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen sollte untersucht werden, ob eine fehlende *Mcl-1*-Expression spontan Apoptose in der Leber induziert und dadurch zum Untergang von Lebergewebe beiträgt. Hierzu wurden Paraffin-Schnitte der Lebern von vier Wochen alten *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre* und Kontrollmäusen mit einem Antikörper gegen aktive Caspase-3 gefärbt, welche ein Marker für die Aktivierung von Apoptose ist. In *Mcl-1* negativen Hepatozyten konnten etwa 1-3% der Zellen positiv für aktive Caspase-3 gefärbt werden. Dagegen konnten in Leberschnitten von Kontrollmäusen nur sehr vereinzelt Caspase-3-positive Zellen beobachtet werden (Abbildung 16A). Es wurde außerdem eine HE-Färbung der Leberschnitte durchgeführt. Hier konnten aber keine Unterschiede in der Leberhistologie ausgemacht werden (Abbildung 16A). Um dieses Ergebnis weiter zu analysieren, wurden Leberlysate vier Wochen alter *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre* oder Kontrollmäuse bezüglich Caspase-3-Aktivität mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Substrats untersucht. Es zeigte sich erneut, dass die Caspase-3-Aktivität in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen deutlich erhöht war im Vergleich zu Geschwistertieren (460 vs. 316 RLU; $p < 0,05$) (Abbildung 16B).

Ein weiteres Charakteristikum für die Induktion von Apoptose ist die Spaltung genomischer DNA. Dabei entstehen sowohl doppelsträngige, niedermolekulare DNA-Fragmente, als auch Einzelstrangbrüche in hochmolekularer DNA. Diese DNA-Strangbrüche können durch eine Markierung der freien 3'-OH Enden mit modifizierten Nukleotiden in einer enzymatischen Reaktion identifiziert werden. Die DNA-Strangbrüche werden mithilfe der terminalen Desoxynukleotid Transferase (TdT) markiert, welche die Polymerisation markierter Nukleotide an freie 3'-OH Enden katalysiert (TUNEL-Technologie). Hierzu wurden Lebergefrierschnitte von vier Wochen alten *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre* und Kontrollmäusen mit Fluorescein-markiertem dUTP gefärbt. Die Fluoreszenz konnte dann im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Grün leuchtende Zellkerne symbolisieren apoptotische Zellen im Gewebe. Um den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen bestimmen zu können, wurden die Schnitte zudem mit dem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI gegengefärbt, mit dem alle Zellkerne, unabhängig von DNA-Strangbrüchen, gefärbt werden. Es zeigte sich, dass in den Lebern von *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen fünfmal mehr Zellkerne positiv für DNA-Strangbrüche waren als in Kontrolllebern (1,31 vs. 0,27%; $p < 0,001$) (Abbildung 16C).

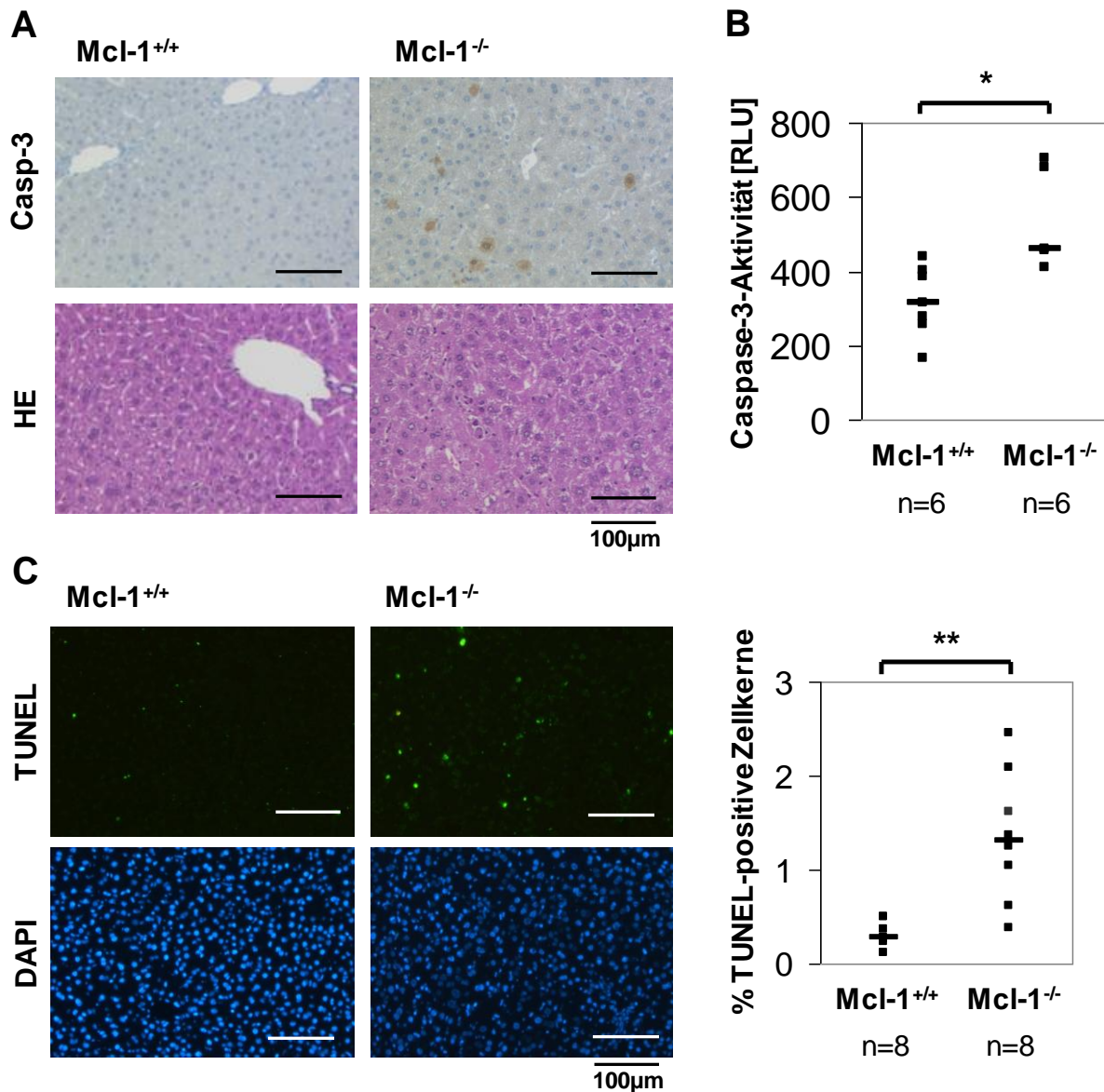


Abbildung 16: Erhöhte Basalapoptoserate in Mcl-1^{fllox/fllox}-AlbCre-Mäusen.

Die Lebern 4 Wochen alter Mcl-1^{fllox/fllox}-AlbCre (Mcl-1^{-/-}) oder Kontrollmäuse (Mcl-1^{+/+}) wurden bezüglich aktiver Caspase-3 (**A/B**) oder bezüglich DNA-Strangbrüchen (**C**) untersucht. (**A**) Paraffinschnitte der Lebern wurden mit einem Antikörper gegen aktive Caspase-3 gefärbt, und zudem eine HE Gegenfärbung durchgeführt. (**B**) In Leberlysaten wurde aktive Caspase-3 fluorometrisch bestimmt (siehe Material und Methoden). (**C**) Gefrierschnitte der Lebern wurden mit Fluorescein-markiertem dUTP gefärbt. Als Gegenfärbung diente eine DAPI-Färbung. Der Anteil TUNEL-positiver Zellkerne wurde bestimmt. Sowohl Einzelwerte (Quadrate) als auch Mediane (Balken) sind angezeigt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$. RLU: relative Light Units. (**A**) Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. A. Weber, Zürich.

2.5 Erhöhte Proliferationsrate in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen.

Das Lebergewicht ist normalerweise streng reguliert. Nimmt man eine Leberteilresektion an Mäusen vor, so erreichen Wildtyp-Tiere bereits nach etwa einer Woche wieder normales Lebergewicht durch erhöhte Proliferationsraten [Schuchmann *et al.*, 2005]. Daher stellte sich die Frage, ob die beobachtete Verminderung des Lebergewichts in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen nur durch die erhöhten Apoptoseraten zu erklären waren – mit normaler oder sogar erhöhter (kompensatorischer) Proliferation – oder ob eine kombinierte Apoptoseinduktion mit einer verminderten Proliferation zum Verlust der Lebermasse führte. Daher wurde die Proliferationsrate in *Mcl-1* negativen Hepatozyten bestimmt. Leberschnitte vier Wochen alter *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre* und Kontrollmäuse wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 gefärbt. Die Expression von Ki67 ist ein spezifischer Marker für Zellproliferation, da es nur während aktiver Zellzyklusphasen (G(1), S, G(2), Mitose) exprimiert wird, in ruhenden Zellen jedoch völlig fehlt. Während der Interphase kann Ki67 im Nukleus detektiert werden, während es in der Mitose an der Oberfläche der Chromosomen lokalisiert ist [Scholzen und Gerdes, 2000]. Die Expression von Ki67 war in *Mcl-1* negativen Hepatozyten deutlich verstärkt im Vergleich zu Kontrollhepatozyten (Abbildung 17A).

Als weiterer Proliferationsnachweis wurde die 5-Bromo-2'-Desoxyuracil- (BrdU-) Methode angewandt. BrdU, ein Thymidin-Analogon, lagert sich in replizierende DNA ein, und kann später mit einem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht werden. Vier Wochen alte Mäuse wurden für 60 Stunden mit BrdU (0,8mg/ml im Trinkwasser) gefüttert. Lebergefrierschnitte wurden dann mit spezifischen, Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen BrdU angefärbt. Die Fluoreszenz konnte anschließend im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Grün leuchtende Zellkerne symbolisieren hierbei proliferierende Zellen im Gewebe. Um den prozentualen Anteil proliferierender Zellen bestimmen zu können, wurden die Zellkerne wiederum mit DAPI gegengefärbt. Es zeigte sich, dass die Proliferationsrate in den Lebern von *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen 2,5-fach erhöht war (17,5 vs. 7,0%; $p < 0,01$) (Abbildung 17B). Daraus ließ sich schließen, dass die Proliferationsrate in *Mcl-1* negativen Hepatozyten erhöht ist, vermutlich um die erhöhte Apoptoserate zu kompensieren. Dieser Effekt reicht jedoch nicht aus, um den Zellverlust auszugleichen; die Lebern sind folglich kleiner.

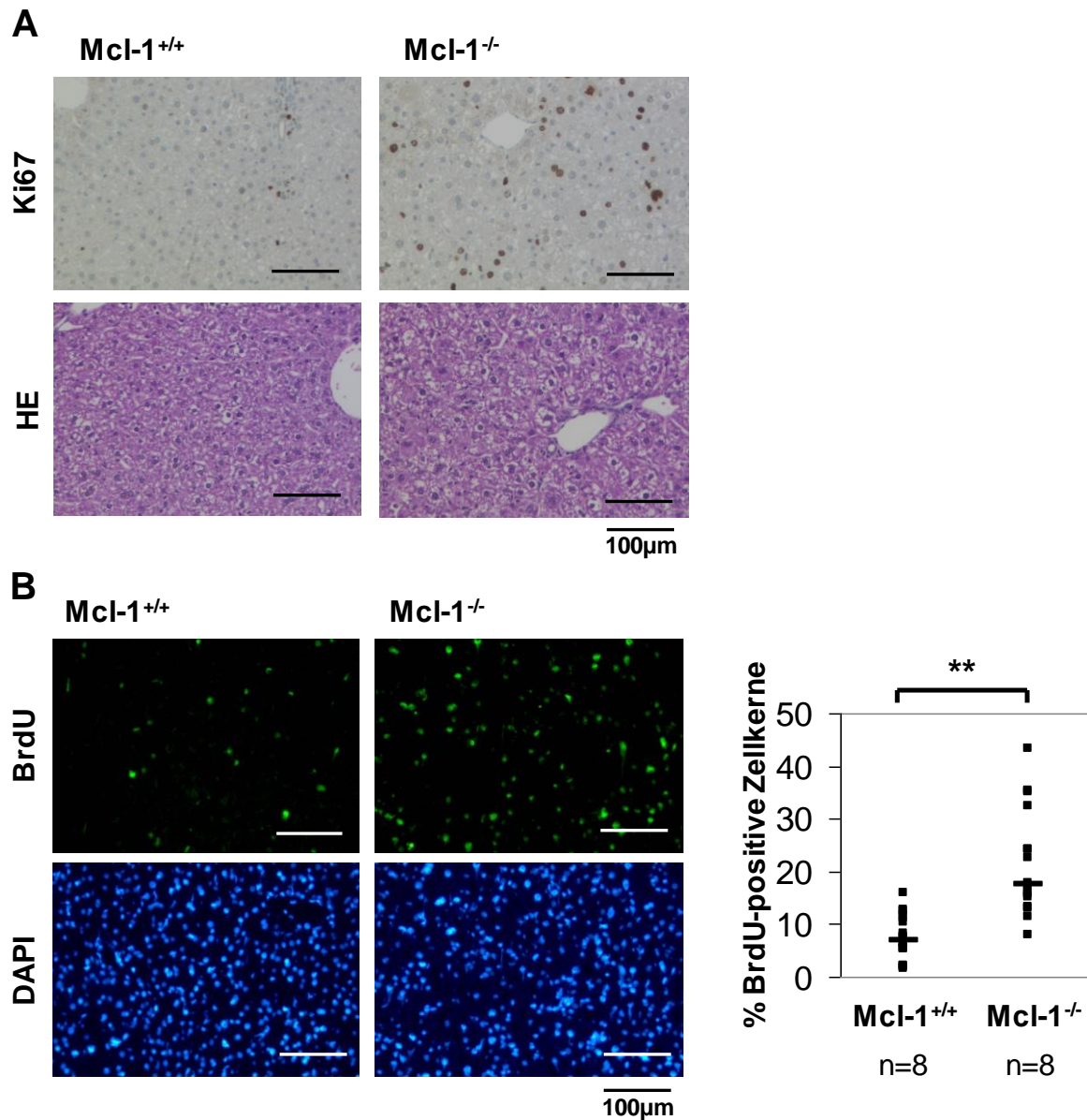


Abbildung 17: Erhöhte Proliferationsrate in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen.

(A) Paraffinschnitte von Lebern 4 Wochen alter Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre (Mcl-1^{-/-}) oder Kontrollmäuse (Mcl-1^{+/+}) wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 gefärbt, und zudem eine HE Gegenfärbung durchgeführt. **(B)** 4 Wochen alte Mcl-1^{+/+} oder Mcl-1^{-/-} Mäuse erhielten BrdU (0,8mg/ml) im Trinkwasser. Nach 60h wurden die Mäuse getötet, und Gefrierschnitte der Lebern wurden mit einem Fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen BrdU gefärbt. Als Gegenfärbung diente eine DAPI-Färbung. Der Anteil BrdU-positiver Zellkerne wurde bestimmt. Sowohl Einzelwerte (Quadrate) als auch Mediane (Balken) sind angezeigt. **: p<0,01. **(A)** Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. A. Weber, Zürich.

2.6 Entzündung und Fibrosebildung in Lebern von $Mcl-1^{flox/flox}$ -AlbCre-Mäusen.

Erhöhte Apoptoseraten in der Leber gehen oft mit einer Entzündungsreaktion einher, vor allem durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine durch aktivierte Kupffer-Zellen. Dies konnte z.B. in konditionalen NEMO/IKK γ Knockout Mäusen beobachtet werden: Ein Knockout von NEMO in Leberparenchymzellen führte zu erhöhten Apoptoseraten, der Ausbildung einer chronischen Hepatitis, und schließlich zur Entwicklung von Lebertumoren [Luedde *et al.*, 2007]. Auch in Patienten mit chronischer Leberschädigung (z.B. durch Alkoholabusus oder einer HBV- oder HCV-Infektion) kann eine Entzündung (Hepatitis) nachgewiesen werden. Verschiedene Entzündungsmediatoren (Zytokine, C-reaktives Protein) im Serum sind erhöht, und Entzündungszellen wie Leukozyten und Makrophagen wandern ins Lebergewebe ein [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2006a].

Daher sollte untersucht werden, ob in $Mcl-1^{flox/flox}$ -AlbCre-Mäusen mit erhöhter Apoptoserate der Hepatozyten die Expression von Entzündungsmediatoren in der Leber verändert ist. Hierzu wurde aus Leberlysaten 16 Wochen alter Mäuse die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, und mittels spezifischer Primer die relative Expression von IL6 und TNF, bezogen auf die GAPDH-Expression, in einer Real Time-PCR untersucht. Es konnten keine Unterschiede in der Expression dieser Entzündungsmarker festgestellt werden (Abb. 18A).

Eine chronische Leberschädigung führt meist zur Ausbildung einer Fibrose. Neben Kupffer-Zellen werden auch hepatische Sternzellen aktiviert, welche dann vermehrt α -Smooth Muscle Actin und TGF- β exprimieren und Collagen-1 einlagern [Canbay *et al.*, 2003b]. Durch diese vermehrte Bildung von Bindegewebe vernarbt die Leber, bis es schließlich zu einer Leberzirrhose mit Einschränkung der Leberfunktion kommen kann. Es sollte untersucht werden, ob in den Lebern von $Mcl-1^{flox/flox}$ -AlbCre-Mäusen eine Fibrose nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde in Leberlysaten 16 Wochen alter Mäuse die Expression von Collagen-1 (dem Hauptbestandteil des Bindegewebes) untersucht. In $Mcl-1^{flox/flox}$ -AlbCre-Mäusen konnte auf mRNA-Ebene eine erhöhte Expression von Collagen-1 (0,068 vs. 0,018%; $p < 0,01$) nachgewiesen werden (Abbildung 18A). Da aber nicht nur eine Änderung der Expression dieses Proteins von Bedeutung ist, sondern vor allem der Ort der Collagenablagerung, wurden Leberschnitte von acht und 16 Wochen alten Mäusen mit Sirius Red zur Anfärbung von Collagen gefärbt. Es zeigte sich, dass in Wildtyp-Mäusen lediglich die Bereiche um die Blutgefäße Collagen enthielten. In acht Wochen alten $Mcl-1^{flox/flox}$ -AlbCre-Mäusen konnte dagegen eine geringe perizelluläre Ablagerung von Collagen beobachtet werden, die in 16 Wochen alten Tieren noch verstärkt war (Abbildung 18B).

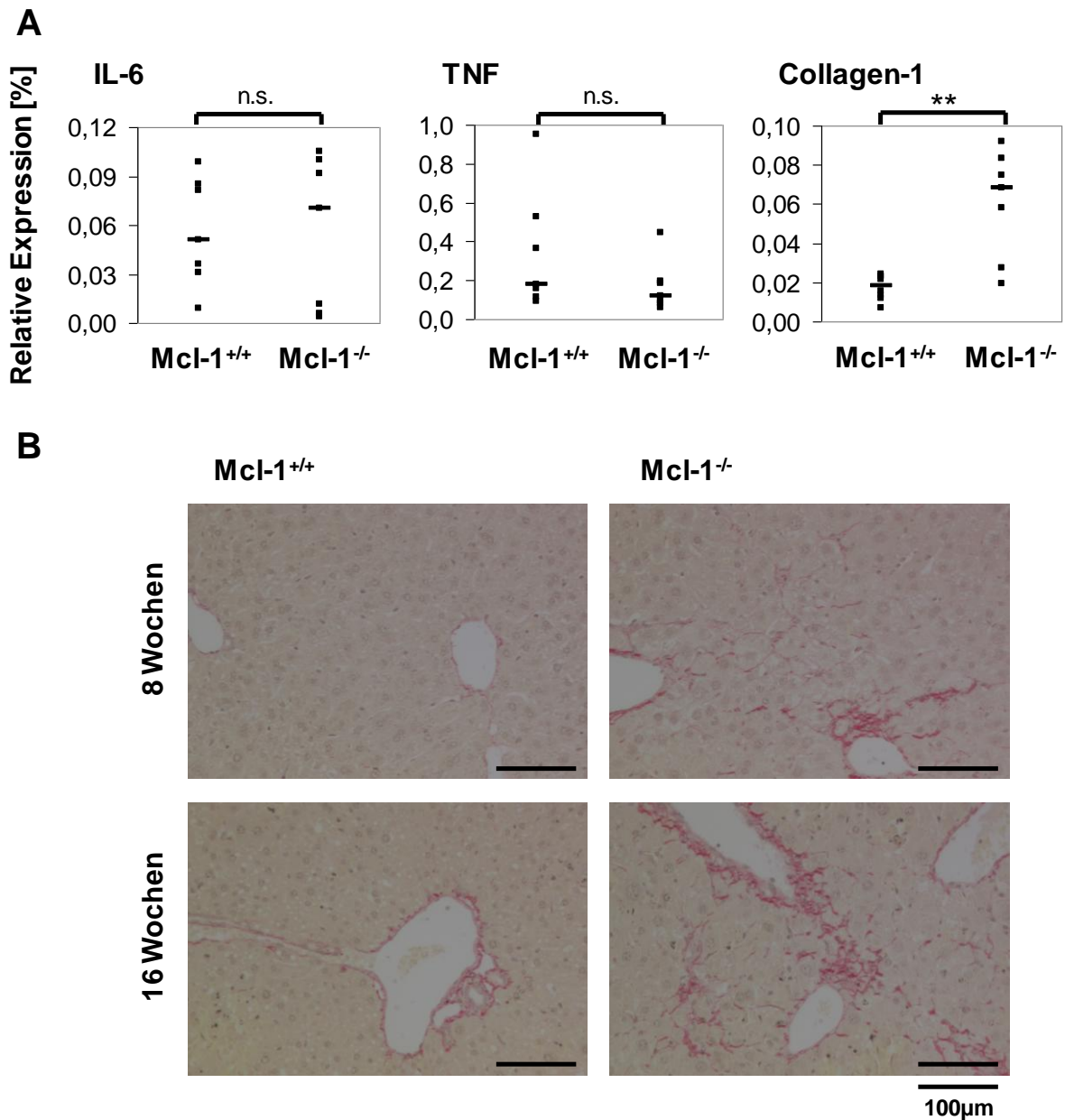


Abbildung 18: Erhöhte Fibrosebildung in Mcl-1^{fllox/fllox}-AlbCre-Mäusen.

(A) Aus Leberlysaten 16 Wochen alter Mcl-1^{fllox/fllox}-AlbCre (Mcl-1^{-/-}) oder Kontrollmäuse (Mcl-1^{+/+}) wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, und mittels spezifischer Primer die relative Expression von IL6, TNF und Collagen-1 im Verhältnis zur GAPDH-Expression in einer Real Time-PCR bestimmt. Sowohl Einzelwerte (Quadrate) als auch Mediane (Balken) sind angezeigt. **: p<0,01; n.s.: nicht signifikant; n=7. (B) Collagen wurde in Leberschnitten von 8 oder 16 Wochen alten Mcl-1^{+/+} oder Mcl-1^{-/-} Mäusen mittels Sirius Red angefärbt. (B) Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. A. Weber, Zürich.

2.7 Größere Sensitivität von *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen gegenüber CD95-vermitteltem Leberversagen.

Der Todesrezeptor CD95 (APO-1/Fas) ist auf Hepatozyten konstitutiv exprimiert [Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992]. Daher ist die Leber sehr empfänglich für CD95L-induzierte Apoptose, was sowohl in Mausmodellen ersichtlich ist [Ogasawara *et al.*, 1993; Song *et al.*, 2003], als auch in verschiedenen chronischen und akuten Lebererkrankungen [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2006a]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine HGF-Behandlung primärer humaner Hepatozyten zu einer erhöhten Mcl-1-Expression und zu einer geringeren Sensitivität gegenüber CD95-mediiertes Apoptose führt [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004]. Daher sollte untersucht werden, ob eine fehlende Mcl-1-Expression die Leber empfänglicher macht gegenüber CD95-mediiertes Apoptose.

Die Verabreichung des agonistischen anti-Maus-CD95-Antikörpers Jo2 ist ein etabliertes Modell für fulminantes Leberversagen. Da Mcl-1 aufgrund seiner geringen Halbwertszeit ein schnell reguliertes Protein ist, könnte es eine wichtige Rolle beim fulminanten Leberversagen spielen. Um dies zu untersuchen wurde Jo2 i.p. in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre* und Kontrollmäuse injiziert. Nach 3h wurden die Mäuse getötet, das Herzblut und die Leber wurden entnommen. Eine Injektion von Jo2 (0,5mg/kg) bewirkte bereits in Kontrollmäusen einen deutlichen Anstieg der Serumtransaminasen GOT und GPT (GOT: 80 → 340U/L, GPT: 20 → 190U/L). Diese waren jedoch in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen nochmals um das vier- bis neunfache erhöht (GOT: 1440 vs. 340U/L; GPT: 900 vs. 190U/L im Vergleich zu Geschwistertieren; $p < 0,001$) (Abbildung 19A). Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch in älteren Tieren beobachtet werden kann, welche geringere Basaltransaminasenwerte zeigen (Abbildung 15C), wurden 20 Wochen alte Mäuse mit der gleichen Konzentration Jo2 behandelt. Auch hier zeigte sich ein Anstieg der Transaminasen nach Jo2-Gabe in Kontrolltieren, der aber wiederum deutlich erhöht war, wenn Mcl-1 in den Hepatozyten fehlte (GOT: 1530 vs. 560U/L; GPT: 1110 vs. 450U/L; $p < 0,05$) (Abbildung 19B).

Des Weiteren wurden Leberschnitte der behandelten Mäuse histologisch untersucht. Es wurde eine HE-Färbung durchgeführt, und der Apoptoseindex und die Gewebsschädigung wurden verblindet in vier Kategorien eingeteilt. Auch hier zeigte sich, dass *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäuse eine erhöhte Apoptoseinduktion aufwiesen, was wiederum zu einer verstärkten Gewebsschädigung führte (Tabelle 1).

Als spezifischer Nachweis für eine Apoptoseinduktion wurde wiederum die Caspase-3-Aktivität untersucht, sowohl quantitativ in einer fluorometrischen Bestimmung der Caspase-3-Aktivität aus Leberlysaten, als auch immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper gegen aktive Caspase-3. Die Caspase-3-Aktivität war in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen nach Jo2-Behandlung deutlich erhöht im Vergleich zu behandelten Kontrollmäusen, sowohl im

histologischen Nachweis (Abbildung 19C), als auch fluorometrisch (18.700 vs. 6.900RLU; $p < 0,001$) (Abbildung 19D).

	Apoptoseindex				Gewebsschädigung			
	0	1	2	3	0	1	2	3
Mcl-1^{+/+}	4	4	1	1	5	3	1	1
Mcl-1^{-/-}	0	3	8	2	3	4	5	1

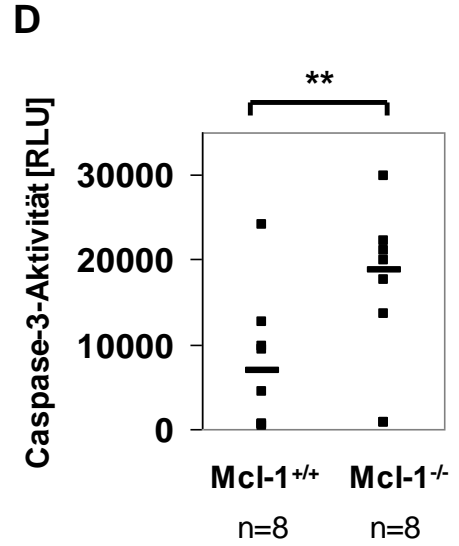
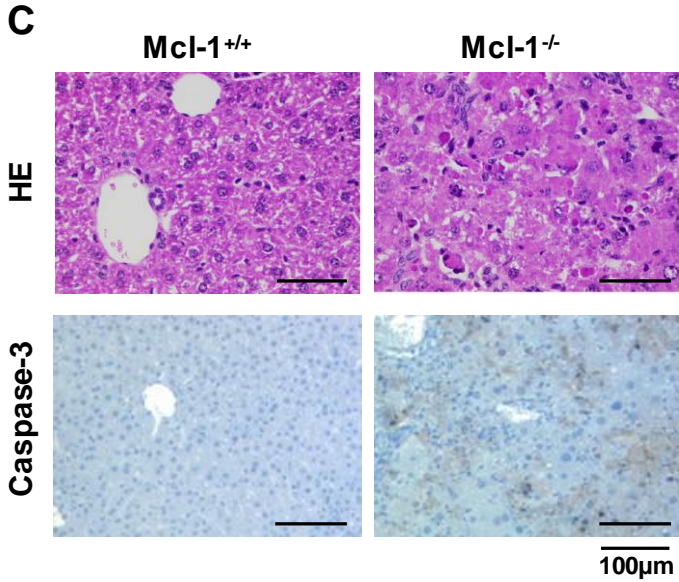
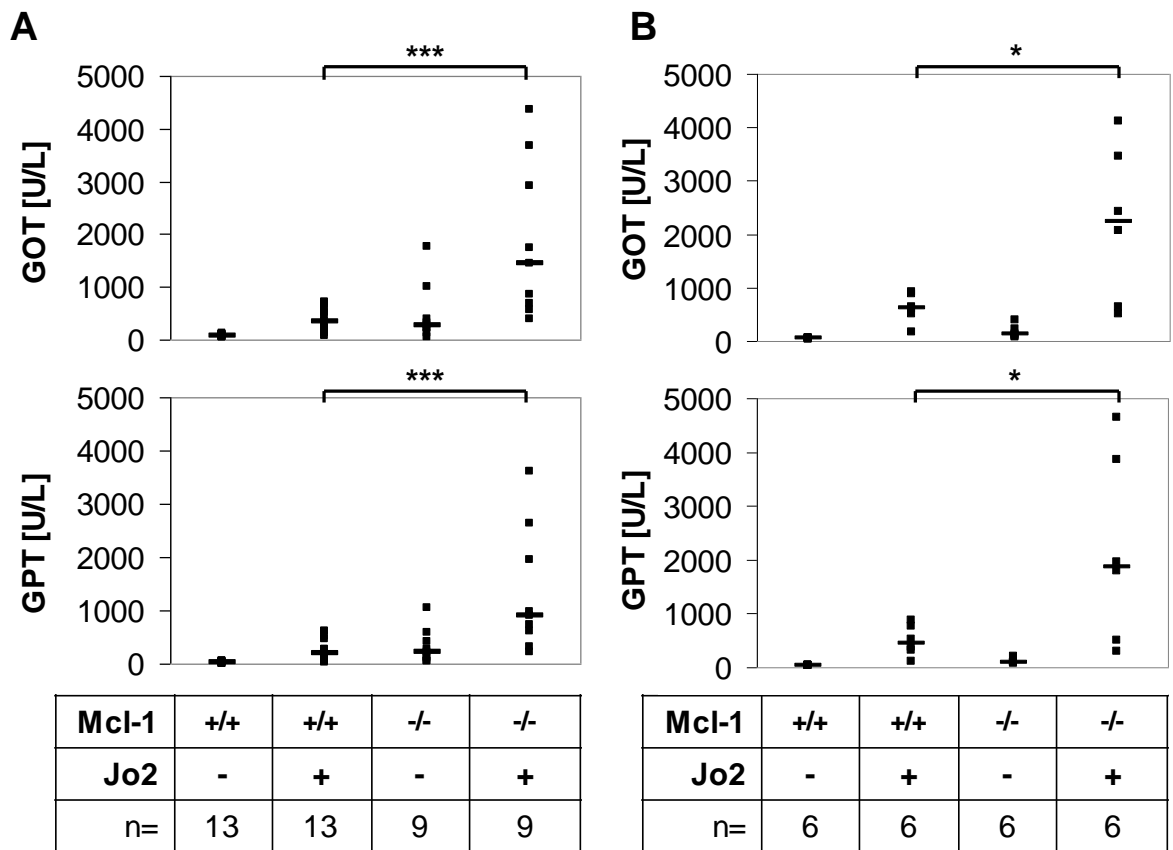
Tabelle 1: Apoptoseindex und Gewebsschädigung nach Stimulation von CD95.

Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre und Kontrollmäusen wurde Jo2 (0,5mg/kg) i.p. injiziert. Nach 3h wurden die Mäuse getötet. Leberschnitte wurden HE-gefärbt, und die Schnitte bezüglich Apoptoseindex und Gewebsschädigung verblindet in vier Kategorien eingeteilt. Hierbei steht 0 für keine, 1 für geringe, 2 für moderate und 3 für hohe Apoptoseinduktion bzw. Gewebsschädigung. Es wurden Schnitte von 13 Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre und 10 Kontrollmäusen ausgewertet.

Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. A. Weber, Zürich.

Abbildung 19: Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäuse reagieren sensibler auf CD95-mediertes Leberversagen.

(A) 8 oder (B) 20 Wochen alten Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre (Mcl-1^{-/-}) oder Kontrollmäusen (Mcl-1^{+/+}) wurde der agonistische CD95-Antikörper Jo2 (0,5mg/kg) i.p. injiziert. Nach 3h wurden die Mäuse getötet, und im Serum die GOT- und GPT-Werte bestimmt. (C) Leberschnitte der behandelten Mäuse wurden zum einen mit HE, zum anderen mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 gefärbt. (D) Aus Leberlysaten der behandelten Mäuse wurden die Proteine isoliert, und die Caspase-3-Aktivität fluorometrisch bestimmt. Sowohl Einzelwerte (Quadrate) als auch Mediane (Balken) sind angezeigt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. RLU: Relative Light Units. (C) Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. A. Weber, Zürich.



2.8 Erhöhte Sensitivität von *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen gegenüber T-Zell-vermitteltem Leberversagen.

T-Zell-medierte Leberschädigung ist ein zentraler pathophysiologischer Vorgang u.a. bei der Autoimmunhepatitis (AIH). Aktivierte zytotoxische T-Zellen exprimieren CD95L, und können dadurch in Hepatozyten, welche CD95 exprimieren, Apoptose induzieren. Concanavalin A (ConA)-induzierte Hepatitis wird häufig als Modell für eine autoimmune Leberschädigung eingesetzt [Tiags *et al.*, 1992]. Die Schädigung der Leber verläuft dabei ebenfalls über aktivierte T-Zellen und eine Aktivierung des CD95-Rezeptors auf Hepatozyten, und ist charakterisiert durch eine massive hepatozelluläre Degeneration und lymphoide Infiltrate in der Leber [Kaneko *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2003]. Eine intravenöse Injektion von ConA induziert eine Anreicherung von T-Zellen in der Leber, sowohl durch eine erhöhte Einwanderung von T-Zellen in das Organ, als auch durch eine lokale Proliferation der T-Zellen [Gantner *et al.*, 1995].

Es wurde untersucht, ob eine *Mcl-1*-Deletion in Hepatozyten das Ansprechen gegenüber einer T-Zell-vermittelten Leberschädigung beeinflusst. *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre* und Kontrollmäusen wurde ConA (25mg/kg) in die Schwanzvene injiziert. Nach 4h wurden die Tiere getötet und das Maß der Leberschädigung durch Messung der Transaminasenwerte im Serum bestimmt. Erneut zeigte sich, dass bereits in Kontrolltieren ein deutlicher Anstieg der Transaminasen beobachtet werden konnte (GOT: 70 → 570U/L, GPT: 40 → 110U/L). Diese waren jedoch in *Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre*-Mäusen nochmals um das drei- bis sechsfache erhöht (GOT: 1140 vs. 570U/L; GPT: 985 vs. 110U/L im Vergleich zu Geschwistertieren; $p < 0,05$) (Abbildung 20).

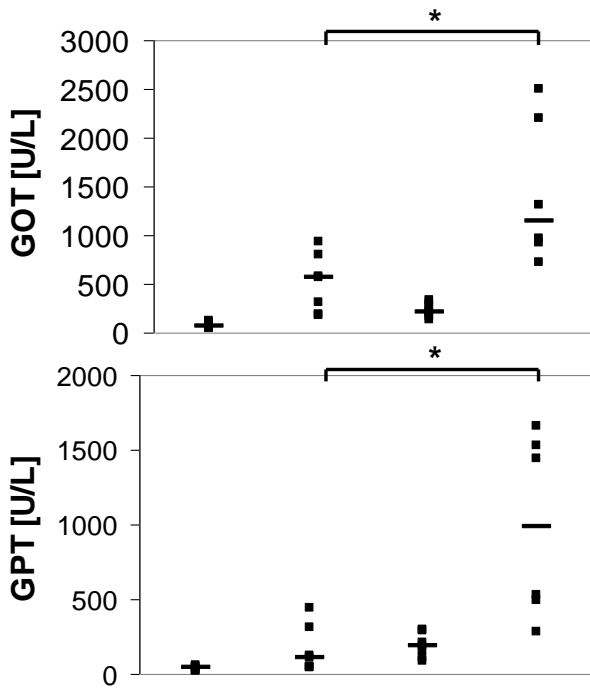


Abbildung 20: Mcl-1^{fllox/fllox}-AlbCre-Mäuse reagieren sensibler auf T Zell-vermitteltes Leberversagen.

8 Wochen alten Mcl-1^{fllox/fllox}-AlbCre (Mcl-1^{-/-}) oder Kontrollmäusen (Mcl-1^{+/+}) wurde Concanavalin A (ConA; 25mg/kg) i.v. injiziert. Nach 4h wurden die Mäuse getötet, und im Serum die GOT- und GPT-Werte bestimmt. *: p<0,05

Mcl-1	+/+	+/+	-/-	-/-
ConA	-	+	-	+
n=	7	7	7	6

2.9 Fehlender Einfluss der Mcl-1-Expression auf chronische Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff.

Es konnte gezeigt werden, dass Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre Mäuse sowohl basal eine Leberschädigung aufweisen, die mit einer Leberfibrose einhergeht, als auch sensibler auf Apoptoseinduktion durch Todesrezeptoraktivierung reagieren. Um die Bedeutung von Mcl-1 für die hepatische Fibrogenese weiter zu analysieren, sollte in einem weiteren chronischen Leberschädigungsmodell der Einfluss einer fehlenden Mcl-1-Expression untersucht werden. Hierzu wurden die Mäuse über einen längeren Zeitraum mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) behandelt. CCl₄ ist hepatotoxisch, wodurch es zu einer chronischen entzündlichen Leberschädigung kommt, was schließlich in einer Leberfibrose, teils mit Verlust der Leberfunktion, endet [Streetz *et al.*, 2003]. Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen und Kontrolltieren wurde zweimal wöchentlich CCl₄ (100mg/kg in Olivenöl) oder Olivenöl als Kontrolle i.p. injiziert. Nach fünf Wochen wurde das Maß der Leberschädigung durch Bestimmung der Transaminasenwerte und durch immunhistochemische Untersuchungen analysiert. Interessanterweise hatte eine Mcl-1-Deletion lediglich geringe Auswirkungen auf eine CCl₄-induzierte chronische Leberschädigung. Zwar waren die GOT-Werte in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen nach CCl₄-Behandlung im Vergleich zu behandelten Geschwistertieren erhöht (390 vs. 190U/L; p<0,05), allerdings zeigten die GPT-Werte keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 21A). Des Weiteren konnte sowohl eine erhöhte Expression von Collagen-1 auf mRNA-Ebene als auch eine verstärkte Collagen-Einlagerung in CCl₄- gegenüber kontrollbehandelten Mäusen beobachtet werden. Es konnten jedoch bezüglich der Collagen-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen und Kontrolltieren festgestellt werden, weder auf mRNA-Ebene (Real Time-PCR, Abbildung 21B) noch auf Proteinebene (Immunhistochemie, Abbildung 21C).

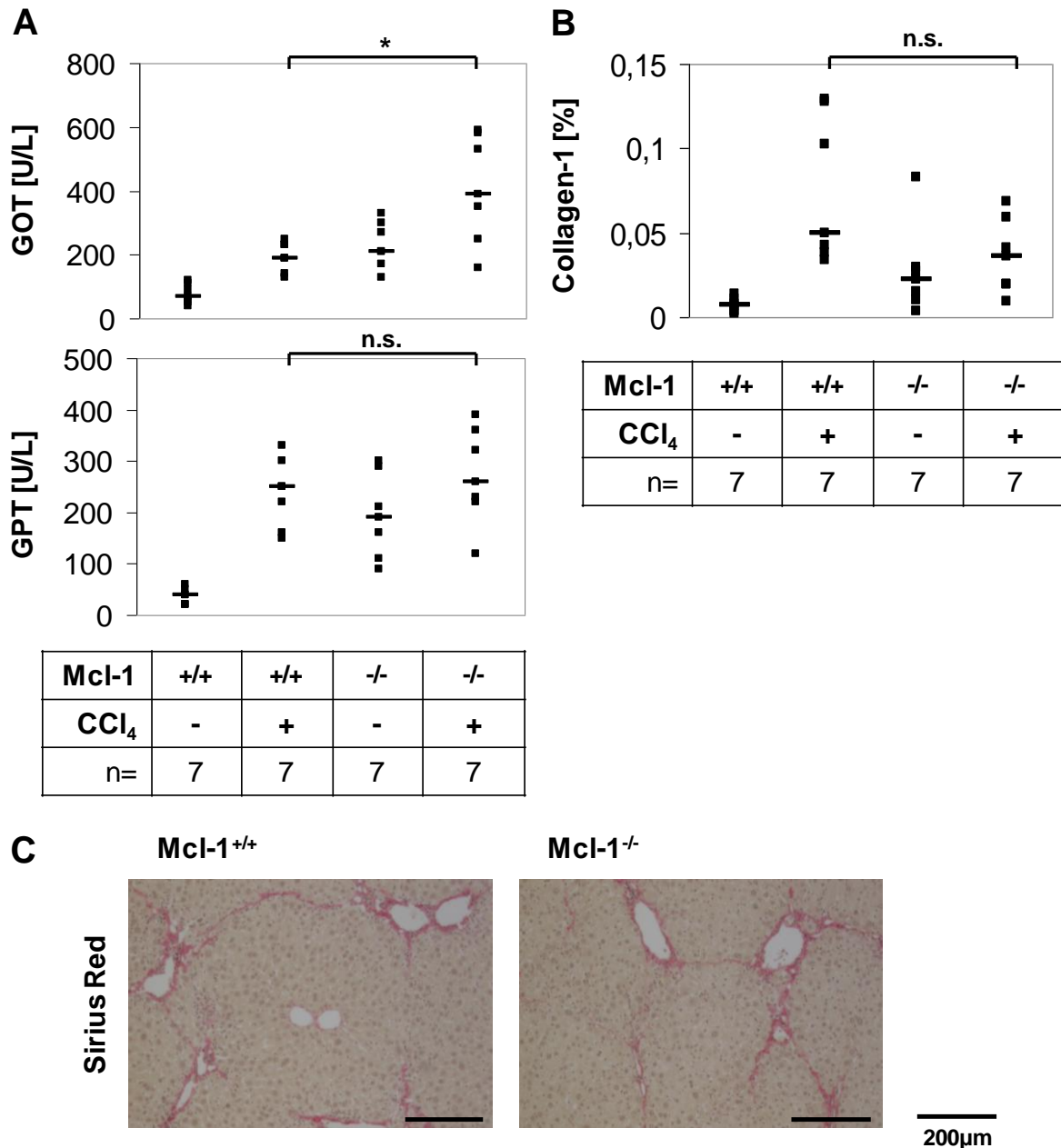


Abbildung 21: Fehlender Einfluss von Mcl-1 auf CCl₄-induzierte chronische Leberschädigung.

8 Wochen alten Mcl-1^{fllox/fllox}-AlbCre (Mcl-1^{-/-}) oder Kontrollmäusen (Mcl-1^{+/+}) wurde zweimal pro Woche, über einen Zeitraum von 5 Wochen, Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄; 100mg/kg in Olivenöl) (+) oder Olivenöl als Kontrolle (-) i.p. injiziert. **(A)** Im Serum wurden GOT- und GPT-Werte bestimmt. **(B)** Aus Leberlysaten wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relative Collagen-1-Expression mittels Real Time-PCR bestimmt. **(C)** In Leberschnitten wurde Collagen mittels Sirius Red angefärbt. *: p<0,05; n.s.: nicht signifikant. **(C)** Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. A. Weber, Zürich.

IV Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 für die Leber und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Mcl-1 in humanem HCC-Gewebe verstärkt exprimiert ist, und dass HCC-Zellen durch einen spezifischen Knockdown von Mcl-1 gegenüber Chemotherapeutika und verschiedenen zielgerichteten Therapien sensitiviert werden können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von Mcl-1 in murinen Hepatozyten zu einer basalen Leberschädigung durch erhöhte Apoptoseinduktion und zur Ausbildung einer Fibrose führt. Zudem reagieren Mcl-1 negative Hepatozyten empfindlicher auf Todesrezeptor-vermittelte Apoptose. Diese Daten deuten auf eine besondere Bedeutung von Mcl-1 für die Leberhomöostase und den Schutz der gesunden Leber gegenüber Apoptosestimuli, aber auch für die Apoptoseresistenz von HCC-Zellen hin.

Mcl-1 im hepatozellulären Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom ist ein häufiger Tumor, welcher sich durch eine hochgradige Resistenz gegenüber konventionellen Therapieansätzen wie Chemo- oder Strahlentherapie auszeichnet [Schuchmann und Galle, 2004]. So ist ein möglicher kurativer Therapieerfolg in der Regel nur nach chirurgischen Maßnahmen wie einer Leberteileresektion oder einer Lebertransplantation zu erzielen. Da aber die meisten HCCs erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt werden, sind operative Massnahmen mit kurativen Ansatz häufig nicht mehr möglich. Daher sind neue Therapieansätze für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem HCC Gegenstand intensiver Forschung. Ein vielversprechender Therapieansatz kann dabei die Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber einer Induktion von Apoptose sein [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2009].

Durch die Induktion von Apoptose über extrinsische oder intrinsische Signale kann sich der Organismus vor potentiell gefährlichen Zellen, wie virusinfizierten oder transformierten Zellen schützen. Werden virusinfizierte Hepatozyten (z.B. im Rahmen einer Hepatitis B oder C-Infektion) nicht durch Apoptose beseitigt, können genetische Defekte in den Zellen akkumulieren, die zur Hepatokarzinogenese beitragen können.

Krebszellen (so auch beim HCC) weisen unter anderem eine Stabilisierung der mitochondrialen Integrität neben anderen Veränderungen in Überlebens- und Apoptosesignalwegen auf, wodurch sie resistent gegenüber Chemotherapiebehandlung und endogener Apoptoseinduktion werden [Strasser *et al.*, 1990; Kroemer und Reed, 2000; Schulze-Bergkamen und Kramer, 2004]. Eine typische Veränderung in malignen Zellen, die zu einer Stabilisierung der Mitochondrien beiträgt, ist die verstärkte Expression anti-

apoptotischer Bcl-2-Proteine [Kirkin *et al.*, 2004]. Da die mitochondriale Membranpermeabilisierung von einem streng regulierten Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen abhängt, führt eine vermehrte Expression anti-apoptotischer Mitglieder zu einem Ungleichgewicht in Richtung Apoptoseresistenz [Garrido und Kroemer, 2004]. Während es sich bei anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen um Protoonkogene handelt, konnte für die pro-apoptotischen Bcl-2-Mitglieder Bim, Noxa, Bak und Bax sowohl in Mausmodellen als auch in Untersuchungen von humanen Tumorentitäten eine Tumorsuppressor-Funktion nachgewiesen werden [Adams und Cory, 2007]. Daher stellt die pharmakologische Manipulation der Bcl-2-Proteine einen interessanten Ansatzpunkt zur Krebstherapie dar [Letai, 2005].

Mcl-1, ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, wurde erstmals in der humanen Leukämiezelllinie ML-1 beschrieben, wo es nach Phorbol-ester-induzierter Differenzierung exprimiert wird [Kozopas *et al.*, 1993]. Weiterführende Studien haben gezeigt, dass Mcl-1 die Viabilität von Zellen steigert. In unterschiedlichen Zellen verschiedenen Ursprungs, sowohl transformiert als auch untransformiert, wird nach Stress- oder Wachstumssignalen die Expression von Mcl-1 schnell induziert und die Zellen dadurch vor Apoptose geschützt [Craig, 2002]. Dagegen ist der Abbau von Mcl-1 in verschiedenen Zellen eine Voraussetzung für die Induktion von Apoptose [Nijhawan *et al.*, 2003]. Daher ist Mcl-1 ein wichtiges Protein während dem Prozess der Differenzierung, oder für Zellen, welche konstantem zellulären Stress ausgesetzt sind (wie z.B. Krebszellen). So konnte gezeigt werden, dass die Mcl-1-Expression in verschiedenen Tumorarten erhöht ist und die Zellen vor Apoptose schützt [Backus *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2004; Véronèse *et al.*, 2008]. Dagegen führt ein Knockdown von Mcl-1 zu einer Sensitivierung von transformierten Zellen gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli [Taniai *et al.*, 2004; Wirth *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2007; Mott und Gores, 2007a].

Auch in primären humanen Hepatozyten (PHH) konnte eine Expression von Mcl-1 nachgewiesen werden, welche durch Wachstumsfaktorbehandlung noch verstärkt werden konnte [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004]. Daher sollte hier untersucht werden, ob auch in HCC-Zellen Mcl-1 nachgewiesen werden kann, und ob die Mcl-1-Expression mit dem Ansprechen der Zellen auf verschiedene Apoptosestimuli korreliert. Daher wurde in einem ersten Schritt die Expression von Mcl-1 in humanem HCC-Gewebe und benachbartem Normalgewebe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Mcl-1 in vier von fünf Patienten (auf mRNA-Ebene) bzw. in zwei von drei Patienten (auf Proteinebene) im HCC-Gewebe verstärkt exprimiert ist im Vergleich zu benachbartem Normalgewebe. Auch immunhistochemisch konnte eine verstärkte Expression von Mcl-1 im HCC-Gewebe nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine zytoplasmatische Lokalisation des Proteins

und ein granuläres Muster, was für eine Assoziation von Mcl-1 mit verschiedenen Zellorganellen spricht. Diese subzelluläre Verteilung konnte auch in anderen humanen Tumorgeweben mit erhöhter Mcl-1-Expression beobachtet werden [Cho-Vega *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005]. Durch seine Transmembrandomäne ist Mcl-1 zwar vor allem an der mitochondrialen Membran assoziiert, es kann aber auch im Zytoplasma nachgewiesen werden [Yang *et al.*, 1995; Nijhawan *et al.*, 2003]. Da Mcl-1 eine kurze Halbwertszeit hat, ist die Synthese- und Abbaurate hoch. Daher können auch die Synthese an den Ribosomen, der Abbau an den Proteasomen und der Transport zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten zu dem beobachteten subzellulären Verteilungsmuster beitragen.

Aufgrund der sehr geringen Anzahl an Patientenproben, welche für die Analysen zur Verfügung standen, war es nicht möglich, statistische Aussagen über die Häufigkeit einer verstärkten Mcl-1-Expression im HCC-Gewebe treffen zu können. Weiterhin konnten weder verschiedene Tumorstadien analysiert noch Aussagen über eine Korrelation zwischen Mcl-1-Expression und Therapieansprechen getroffen werden. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass Mcl-1 in den meisten der untersuchten Patientenproben im HCC-Gewebe verstärkt exprimiert ist. Weiterhin bleibt zu klären, in welchem Stadium der Kanzerogenese die Expression von Mcl-1 induziert wird.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte 2006 zeigen, dass in 51% der 149 untersuchten HCC-Gewebe eine signifikante Expression von Mcl-1 nachgewiesen werden kann. Allerdings wurde nur das jeweilige HCC-Gewebe, nicht jedoch benachbartes Normalgewebe als Vergleich untersucht. Die Autoren fanden keine Korrelation zwischen Mcl-1-Expression und Tumorgröße, Tumorstadium oder Ki67-Expression, einem Marker für Proliferation. Des Weiteren fand sich in dieser Studie keine Korrelation zwischen Mcl-1-Expression und zugrundeliegender Lebererkrankung oder Vorbehandlung [Sieghart *et al.*, 2006]. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Mcl-1-Expression und einem Ansprechen auf eine Therapie wurde in dieser Studie nicht untersucht. Es konnte jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen Mcl-1- und Bcl-x_L-Expression festgestellt werden.

Interessanterweise konnten Sieghart und Kollegen in normalem Lebergewebe keine signifikante Expression von Mcl-1 nachweisen. Dieser Widerspruch lässt sich möglicherweise mit der Effektivität des für die Immunhistochemie verwendeten Antikörpers erklären, der evtl. bei der vorgelegten Studie nicht optimal färbte. Zudem führte diese Arbeitsgruppe lediglich immunhistochemische Untersuchungen durch, wohingegen in dieser Arbeit zusätzlich Western Blot- und Real Time-PCR-Untersuchungen durchgeführt wurden. Auch in isolierten PHH konnte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene eine Expression von Mcl-1 nachgewiesen werden [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004].

Es bleibt zu klären, über welche Signalwege die Expression von Mcl-1 in HCC-Gewebe induziert wird, bzw. ob neben einer verstärkten Induktion auch eine verminderte Degradation von Mcl-1 zur vermehrten Expression beiträgt. Die Mcl-1-Expression kann durch eine Aktivierung verschiedener Signalwege, wie dem MEK/ERK- oder dem PI3K/Akt-Signalweg, induziert werden [Craig, 2002; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004; Fleischer *et al.*, 2006]. Eine Aktivierung dieser Signalwege kann zum einen durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre entsprechenden Rezeptoren ausgelöst werden, aber auch durch Mutationen innerhalb der Signalkaskaden, so dass es zu einer dauerhaften Aktivität dieser Signalwege kommt [Breuhahn *et al.*, 2006]. Im HCC kann neben einer vermehrten Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren c-Met und EGFR und der Wachstumsfaktoren HGF, EGF und IGF-II auch Mutationen in k-Ras, IGFR-II und PIK3CA nachgewiesen werden [Llovet und Bruix, 2008]. Hierbei korreliert z.B. der HGF-Spiegel im Serum von HCC-Patienten mit der Überlebenszeit [Vejchapipat *et al.*, 2004]. HGF wird nicht von den Tumorzellen selber, sondern von hepatischen Sternzellen und Myofibroblasten exprimiert, die durch Tumorzellprodukte zu einer erhöhten HGF-Expression angeregt werden. HGF fördert dann wiederum das Tumorzellwachstum und die Invasivität. HGF bindet mit hoher Affinität an cMET. Diese Rezeptortyrosinkinase reguliert Proliferation, Migration, Viabilität, Morphogenese, Angiogenese und Gewebsregeneration [Breuhahn *et al.*, 2006]. Eine Bindung von HGF an den Rezeptor führt zur Multimerisierung und Auto- bzw. Paraphosphorylierung des Rezeptors, was schließlich zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege wie PI3K/Akt, MEK/ERK und STAT führt [Stuart *et al.*, 2000]. Sowohl in primären humanen Hepatozyten als auch in den humanen Hepatomzelllinien HepG2 und Hep3B konnte nach HGF-Behandlung eine Aktivierung des PI3K/Akt- und des MEK/ERK-Signalwegs sowie eine Induktion der Mcl-1-Expression beobachtet werden. Eine chemische Hemmung dieser Signalwege hob den Mcl-1-induzierenden Effekt von HGF auf [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004; Fleischer *et al.*, 2006]. Daher kann vermutet werden, dass auch pathophysiologisch die erhöhte HGF-Konzentration bzw. cMET-Expression, zumindest anteilig, zur Expressionssteigerung von Mcl-1 im HCC-Gewebe beitragen.

Eine Überexpression von anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen trägt zur Chemoresistenz von Tumoren bei. So korreliert in 60 verschiedenen Krebszelllinien die Expression von Bcl-x_L mit der *in vitro*-Resistenz gegenüber verschiedenen chemotherapeutischen Substanzen [Amundson *et al.*, 2000]. Zudem kann in verschiedenen humanen Tumorentitäten eine vermehrte Expression von anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen beobachtet werden, wie von Bcl-x_L im kolorektalen Karzinom [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2008]. Daher sollte untersucht werden, ob eine Expression von Mcl-1 im HCC zur Apoptoseresistenz des HCCs beiträgt. In anderen Tumorentitäten konnte bereits eine Korrelation zwischen Mcl-1-Expression und

Therapieansprechen beobachtet werden [Backus *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2004]. Die anti-apoptotische Funktion von Mcl-1 beruht in erster Linie auf seiner Fähigkeit, die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak zu binden, und so die mitochondriale Aktivierung und damit Apoptoseinduktion zu hemmen. Je mehr Mcl-1 in der Zelle exprimiert wird, desto weiter verschiebt sich folglich das sensible Gleichgewicht der Bcl-2-Proteine in Richtung Überleben der Zelle. Dieser Effekt konnte in der HCC-Zelllinie Huh7 beobachtet werden: Eine verstärkte Expression von Mcl-1 durch Transfektion eines Mcl-1-Expressionsvektors erhöhte die Resistenz der Zellen gegenüber verschiedenen Therapieansätzen (siehe Abbildung 2/3). Allerdings zeigten sich Huh7-Zellen generell als resistent gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika, wie Mitomycin C, 5FU, Cisplatin und Bleomycin. Dies ist evtl. durch die bereits basal stark ausgeprägte Expression von Mcl-1 in diesen Zellen zu erklären. Lediglich Epirubicin, ein Anthracyclin-Derivat, führte zur stärkeren Apoptoseinduktion in den Zellen. Anthracycline sind bislang die am häufigsten als monosystemische Therapie beim fortgeschrittenen HCC eingesetzten Chemotherapeutika [Nerenstone *et al.*, 1988, Pohl *et al.*, 2001]. Allerdings kann mit dieser Therapie keine Überlebenszeitverlängerung erzielt werden [Choi *et al.*, 1984].

In unterschiedlichen *in vitro*-Modellen konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Mcl-1-Expression zu einer Sensitivierung gegenüber verschiedenen Apoptose-Stimuli führt. Hierbei kann die Mcl-1-Expression zum einen über eine Inhibition von Signalwegen, welche endogen für die Regulation der Mcl-1-Expression verantwortlich sind, gehemmt werden. So starben z.B. IL-3-abhängige Zellen nach IL-3-Entzug und damit verbundener Mcl-1-Degradation [Maurer *et al.*, 2006]. Daher sollte untersucht werden, welche Signalwege in der Hepatomzelllinie Huh7 für die endogene Mcl-1-Regulation verantwortlich sind.

Exogene Überlebenssignale werden v.a. über Rezeptortyrosin-Kinasen (RTK) in die Zelle geleitet. RTKs besitzen eine extrazelluläre Bindungsdomäne für ihren jeweiligen Liganden, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre katalytische Domäne. Die Kinase wird durch die Bindung des Liganden (zumeist Wachstumsfaktoren) an die extrazelluläre Domäne aktiviert, indem der Rezeptor dimerisiert und Tyrosinreste der intrazellulären Domäne dann autophosphorylieren. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors in seine aktive Form, und der Weiterleitung des Signals über entsprechende Adaptormoleküle in die Zelle. RTKs spielen bei vielen verschiedenen Signalwegen eine besondere Rolle und regulieren zelluläre Schlüsselfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und das Auswachsen neuronaler Zellen [Schlessinger, 2000]. Verschiedene dieser Signalwege konnten mit der Mcl-1-Expression in Verbindung gebracht werden, wie der PI3K/Akt-, MEK/ERK- und der Jak2/STAT3-Signalweg [Craig, 2002]. Zentrale Kinasen dieser Signalwege wurden mit Hilfe chemischer Inhibitoren gehemmt, und anschließend die

Expression von Mcl-1 untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression von Mcl-1 in Huh7-Zellen durch Hemmung von MEK1, JNK, mTOR und EGFR nicht verändert werden konnte. Lediglich eine Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 führte zu einer kurzfristigen Abnahme der Mcl-1-Expression. Dieser Signalweg trägt in verschiedenen Tumorarten zu einer Apoptoseresistenz bei. Aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert Inositolbiphosphat zu Inositoltriphosphat, woraufhin Akt (Proteinkinase B) an die Plasmamembran rekrutiert und dort durch Phosphorylierung an Threonin³⁰⁸ und Serin⁴⁷³ aktiviert wird. Aktiviertes Akt induziert dann verschiedene Überlebenssignalwege in der Zelle. Bereits in Hep3B-Zellen und PHH konnte gezeigt werden, dass durch eine Hemmung dieses Signalwegs die Expression von Mcl-1 reduziert werden kann, bzw. dass eine Induktion des Signalwegs durch Wachstumsfaktoren die Mcl-1-Expression gesteigert werden kann [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004; Fleischer *et al.*, 2006]. Allerdings erwies sich die Mcl-1-Expression in Huh7-Zellen wesentlich weniger anfällig für eine PI3K-Hemmung, und konnte nach bereits vier Stunden wieder ausgeglichen werden. Dennoch konnten die Huh7-Zellen durch eine PI3K-Hemmung, im Gegensatz zu einer MEK1- oder mTOR-Hemmung, gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika sensitiviert werden. Dieser Effekt konnte auch in Hep3B-Zellen beobachtet werden [Fleischer *et al.*, 2006]. In den Hepatomzelllinien ist also vor allem der PI3K/Akt-Signalweg von zentraler Bedeutung für das Überleben bzw. die Apoptoseresistenz der Zellen. Des Weiteren konnte die Mcl-1-Expression in Huh7-Zellen durch eine Inhibition von Cox-2 dauerhaft reduziert werden. Durch Behandlung mit dem Cox-2-Inhibitor Celecoxib konnten Huh7- und HepG2-Zellen gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli sensitiviert werden [Kern *et al.*, 2006]. Diese Daten deuten darauf hin, dass Substanzen, welche die Mcl-1-Expression reduzieren, die Zellen gegenüber Apoptoseinduktion sensitivieren. Da aber eine Hemmung verschiedener Signalwege verschiedene zelluläre Zielmoleküle hat, wurde die Relevanz der Mcl-1-Expression auf die Anfälligkeit der Zellen gegenüber Apoptoseinduktion genauer untersucht, indem die Expression von Mcl-1 spezifisch gehemmt wurde.

Hierzu wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNA-I) angewandt. RNA-I ist ein in eukaryontischen Zellen natürlich vorkommender Mechanismus, bei welchem die Genexpression einzelner Zielgene spezifisch gehemmt wird, indem die Ziel-mRNA gespalten, und somit die Produktion des entsprechenden Proteins reduziert wird. Als zielerkennende RNA kann micro-RNA (miRNA) oder short interfering-RNA (siRNA) dienen. Die miRNA wird hierbei auf entsprechenden Genen codiert, wohingegen die siRNA aus längeren doppelsträngigen RNA-Stücken, welche im sog. RNA-induced silencing complex (RISC) in 21-23 nt-kurze Stücke gespalten werden, entsteht. Physiologisch dienen miRNAs zumeist der endogenen Genregulation, wohingegen siRNAs z.B. in der Abwehr von Viren

zum Einsatz kommen. Für die Entdeckung des Mechanismus der RNA-I erhielten Andrew Z. Fire und Craig C. Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin [Fire *et al.*, 1998]. Seit die unspezifische Interferon-Antwort nach Transfektion langer, doppelsträngiger RNA-Moleküle in Zellen höherer Eukaryonten umgangen werden kann, indem direkt die 21nt-langen siRNA-Moleküle eingesetzt werden [Elbashir *et al.*, 2001], ist die RNA-I ein weit verbreitetes Werkzeug in der molekularbiologischen Forschung geworden [Boutros und Ahringer, 2008]. Allerdings wirken siRNAs nur über einen begrenzten Zeitraum von einigen Tagen. Für ein längerfristiges Silencing werden daher Plasmide verwendet, von denen kontinuierlich eine short hairpin-RNA (shRNA) in der Zelle transkribiert wird. In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze genutzt, um die Expression von Mcl-1 über die Transfektion eines entsprechenden Vektors, der für eine shRNA gegen Mcl-1 codiert, in Huh7-Zellen zu hemmen. Zunächst sollte der sog. pSUPER-Vektor (OligoEngine) zum Einsatz kommen. Es wurden unterschiedliche Zielsequenzen, welche in anderen Zellarten zu einem effektiven Knockdown von Mcl-1 geführt hatten [Moulding *et al.*, 2000; Cuconati *et al.*, 2003; Henson *et al.*, 2003; Nijhawan *et al.*, 2003; Sly *et al.*, 2003; Taniai *et al.*, 2004], in den Vektor kloniert. Allerdings führte in den Huh7-Zellen keiner der so generierten Vektoren zu einer Expressionshemmung von Mcl-1 (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss wurde der Vektor pSSH1/Mcl-1 eingesetzt, welcher ebenfalls eine shRNA gegen Mcl-1 exprimiert [Taniai *et al.*, 2004]. Auch mit diesem Vektor konnte die Mcl-1-Expression in Huh7-Zellen nicht verändert werden. Diese Ergebnisse zeigen die Problematik der Generierung effektiver siRNA/shRNA-Sequenzen auf. Auch wenn mittlerweile verschiedene Ansätze zur Berechnung der Sequenzen zur Verfügung stehen, kann die tatsächliche Effektivität nur durch Austesten im jeweiligen Zelltyp festgestellt werden. Weshalb es in den Huh7-Zellen zu keinem Knockdown der Mcl-1-Expression mit den getesteten Vektoren kam, konnte nicht geklärt werden. Die Transfektionseffizienz, die mit Hilfe von GFP-exprimierenden Kontrollvektoren durchflusszytometrisch bestimmt wurde, lag bei etwa 70%.

Daher wurden in einem nächsten Ansatz direkt siRNAs in Huh7-Zellen transfiziert. Es wurden verschiedene Sequenzen ausgetestet, welche mit Hilfe einer frei zugänglichen Software (<http://www.euofinsdna.com/de/home.html>) berechnet und ausgewählt worden waren. Zudem wurde wiederum die Transfektionseffizienz mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter siRNAs bestimmt, und lag bei über 80% Fluoreszenz-positiver Zellen nach Transfektion von 40nM siRNA. In Mcl-1-Expressionsuntersuchungen nach siRNA-Transfektion erwies sich vor allem die berechnete Sequenz 4 als besonders effizient. So konnte die Expression von Mcl-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene nach Transfektion der Mcl-1-siRNA signifikant reduziert werden im Vergleich zu Zellen, welche mit einer Kontroll-siRNA gegen GFP transfiziert worden waren. Dieser Effekt dauerte mindestens 72 Stunden an. Da alle

folgenden Versuche über maximal drei Tage durchgeführt wurden, war die Dauer der Mcl-1-Expressionshemmung für die weiteren Experimente ausreichend.

Um nun die Bedeutung von Mcl-1 für die Apoptoseresistenz in diesen Zellen zu untersuchen, wurden sie mit der spezifischen siRNA oder der Kontroll-siRNA transfiziert, anschließend mit unterschiedlichen Chemotherapeutika oder Kinase-Inhibitoren behandelt und die Apoptoseinduktion untersucht. Die Hemmung von Mcl-1 allein hatte keinen bzw. nur einen marginalen Effekt auf die Viabilität der Huh7-Zellen. Im Gegensatz dazu induzierte ein alleiniger Knockdown von Mcl-1 in HepG2-Zellen durch Antisense-Oligonukleotide (ASO) bereits Apoptose [Sieghart *et al.*, 2006]. ASOs sind chemisch modifizierte, einzelsträngige DNA-Moleküle, welche ebenso wie siRNAs spezifisch an eine Ziel-mRNA-Sequenz binden, wodurch die mRNA abgebaut wird.

Es zeigte sich, dass Huh7-Zellen mit verminderter Mcl-1-Expression wesentlich empfindlicher auf Chemotherapie-induzierte Apoptose reagieren. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass Chemotherapeutika über eine Aktivierung der Mitochondrien wirken und somit abhängig sind von Bcl-2-Proteinen. Zum anderen machen diese Ergebnisse deutlich, dass sich Hepatomzellen, zumindest teilweise, aufgrund ihrer hohen Mcl-1-Expression resistent zeigen gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose, und durch eine Hemmung der Mcl-1-Expression sensitiviert werden können. Auch in anderen Tumormodellen konnte durch eine spezifische Hemmung der Mcl-1-Expression eine Sensitivierung gegenüber Chemotherapeutika erzielt werden [Thallinger *et al.*, 2003/2004].

Interessanterweise konnten die Huh7-Zellen durch Mcl-1-Silencing nicht gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensitiviert werden. In unterschiedlichen *in vitro*-Modellen zeigten sich TRAIL-resistente Tumorzellen anfällig für TRAIL-induzierte Apoptose, nachdem die Mcl-1-Expression spezifisch gehemmt worden war [Taniai *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2006; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2008]. Allerdings sind die TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf Huh7-Zellen eher gering exprimiert [Kern *et al.*, 2006], wodurch evtl. trotz Mcl-1-Blockade die Rezeptor-Expression nicht ausreicht, um das Apoptose-Signal effektiv in die Zelle zu leiten.

Des Weiteren zeigten sich Mcl-1-negative Huh7-Zellen deutlich empfindlicher gegenüber einer Hemmung der PI3-Kinase, von mTOR, der VEGF- bzw. PDGF-RTK, und von Cox-2. Hierbei zeigten vor allem die kombinierte Hemmung der Mcl-1-Expression und von PI3K bzw. Cox-2 die größten Effekte. Interessanterweise führte eine Hemmung gerade dieser beiden Zielstrukturen auch zu einer Reduktion der Mcl-1-Expression. Folglich liegt der Schluss nahe, dass eine Kombinationstherapie aus zweierlei Ansätzen, welche beide zu einer Hemmung der Mcl-1-Expression führen, die Zellen besonders stark schädigt und Apoptose auslöst.

Durch diesen Effekt konnte die Sensitivierung der Zellen gegenüber Chemotherapeutika nochmals verstärkt werden: Eine doppelte Mcl-1-Hemmung durch siRNA-Transfektion und PI3K-Inhibition führte zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoseinduktion nach Chemotherapie-Behandlung. Dagegen führte eine Kombination aus Mcl-1-Knockdown und Inhibition anderer Kinasen, welche die Mcl-1-Expression nicht beeinflussen, zu keiner Sensitivitätssteigerung gegenüber Chemotherapeutika. Eine Ausnahme stellte die Inhibition von MEK1 dar. Der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg ist im HCC ebenfalls von besonderer Bedeutung [Coleman, 2003; Calvisi *et al.*, 2006], und stellt ein Ziel für neue, zielgerichtete Therapien dar. So wirkt der 2007 für die Therapie des fortgeschrittenen HCCs zugelassene Multikinaseinhibitor Sorafenib unter anderem über eine Hemmung von Raf. Zudem hemmt Sorafenib VEGFR und PDGFR. Da das HCC ein stark vaskularisierter Tumor mit einer verstärkten VEGF-Expression ist, stellt die Blockade des VEGFR ein vielversprechendes Ziel in der Therapie dar. Hier konnte gezeigt werden, dass HCC-Zellen mit reduzierter Mcl-1-Expression sensitiver auf eine VEGFR/PDGFR-Inhibition durch SU5614 reagierten. Allerdings führte eine kombinierte Mcl-1- und VEGFR/PDGFR-Hemmung zu keiner weiteren Sensitivierung gegenüber Chemotherapie.

Diese Ergebnisse lassen folglich vermuten, dass eine Kombination aus Mcl-1-Blockade und zielgerichteter Therapie, mit oder ohne gleichzeitige Chemotherapie, zu einem Therapieerfolg beim HCC führen könnte. Tatsächlich befinden sich verschiedene dieser Ansätze bereits in der klinischen Erprobung.

In dieser Arbeit wurde die Methode der **RNA-Interferenz** angewandt, um die Mcl-1-Expression spezifisch zu hemmen. Diese Methode kann auch *in vivo* in Tiermodellen angewandt werden durch intravenöse oder lokale Injektion von siRNAs. Es konnten bereits vielversprechende präklinische Ergebnisse in der HCC-Prophylaxe und -Therapie mithilfe von siRNAs erzielt werden [Romano *et al.*, 2006]. Des Weiteren konnte die intravenöse Gabe einer siRNA gegen CD59-R Mäuse gegenüber CD95-vermitteltem Leberversagen schützen [Song *et al.*, 2003]. Allerdings stellt der Transfer der siRNAs zu den entsprechenden Zielzellen und die Lebensdauer dieser Moleküle eine große Hürde für den *in vivo*-Gebrauch dar. Eine weitere Möglichkeit einer spezifischen Mcl-1-Hemmung ist der Einsatz von **ASOs**. ASOs befinden sich bereits in klinischen Phase III-Studien, um Resistenzen maligner Zellen gegenüber Chemotherapie zu modulieren [Reed, 2002]. Auch Antisense-Strategien gegenüber anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen einschließlich Mcl-1 wurden bereits erfolgreich in verschiedenen humanen Tumoren *in vitro* und *in vivo* eingesetzt [Heere-Ress *et al.*, 2002; Thallinger *et al.*, 2004; Wacheck und Zangemeister-Wittke, 2006]. Ein Einsatz von ASOs würde sich vor allem bei der Therapie von Lebertumoren anbieten, da

eine systemische Verabreichung zu einer Anreicherung von ASOs in der Leber führt [Geary *et al.*, 1997].

Verschiedene onkologische Therapeutika wie Imatinib (Gleevec), Paclitaxel, Etoposid oder Histondeacetylaseinhibitoren wirken u.a. über eine Aktivierung von BH3-only-Proteinen [Adams und Cory, 2007]. Da Krebszellen, die *in vivo* vermehrt zellulärem Stress ausgesetzt sind, von einer erhöhten Expression von Bcl-2-Proteinen abhängig sind, sind sie sehr sensitiv gegenüber einer Hemmung dieser Proteine durch entsprechende Inhibitoren, wie z.B. durch den Einsatz sog. „BH-3-only mimetics“. Verschiedene **Bcl-2-Inhibitoren** werden bereits in klinischen Studien bei unterschiedlichen Tumorentitäten eingesetzt, wie z.B. GX015-070 (GeminX) und ABT-737 (Abbott), sog. small-molecule Bcl-2-Inhibitoren, oder Oblimersen (Genasense; Genta), eine anti-Bcl-2-Antisense Struktur. Diese werden vor allem bei hämatologischen, aber auch bei soliden Tumoren, klinisch getestet [Fesik *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2006; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2009; Vogler *et al.*, 2009]. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass anti-apoptotische Bcl-2-Proteine ein sinnvolles Ziel bei der Krebstherapie darstellen. Klinische Studien müssen jedoch erst zutage bringen, in wie weit Bcl-2-Inhibitoren oder BH3-only-mimetics auch gesunde (Leber-) Zellen, evtl. auch nach einer Kombination verschiedener Präparate, schädigen können.

Des Weiteren befinden sich zahlreiche Substanzen, welche intrazelluläre Überlebenssignalwege hemmen, in der klinischen Anwendung bzw. Erprobung. Hierbei kommen vor allem chemische **Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren** (RTK-I) und monoklonale Antikörper (mAb) zum Einsatz, welche direkt die Wachstumsfaktorrezeptoren, welche den intrazellulären Signalwegen vorgeschaltet sind, hemmen. Zu diesen Wachstumsfaktorrezeptoren zählen u.a. der EGFR (*Hemmung durch Gefitinib, Erlotinib, Cetuximab oder Panitumumab*), HER2 (*Trastuzumab*), PDGFR (*Imatinib, Sunitinib, Sorafenib*), VEGFR (*Sorafenib, Sunitinib*) oder c-MET (*SU11274*). Zudem gibt es chemische Inhibitoren gegen intrazelluläre Signalmoleküle wie Raf (*Sorafenib*), MEK (*Vandetanib*) oder mTOR (*Rapamycin, Everolimus*). Diese Substanzen stellen eine vielversprechende moderne Klasse zielgerichteter Tumorthapeutika dar. In der Therapie des fortgeschrittenen HCCs ist seit November 2007 der Multikinaseinhibitor Sorafenib in Deutschland zugelassen. Sorafenib ist die erste und bislang einzige zugelassene Substanz, die in der palliativen Therapie des HCCs zu einer Überlebenszeitverlängerung führt [Llovet *et al.*, 2008].

Ein weiterer vielversprechender Ansatz, um gezielt Tumorzellen zu töten, ist die **Aktivierung von TRAIL-Rezeptoren**. Diese sind vorwiegend auf Tumorzellen exprimiert, wodurch dieser

Ansatz kaum off-target-Effekte aufweist. So zeigte eine Behandlung mit TRAIL alleine oder in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika (mit Ausnahme von Cisplatin in hohen Dosen) gegenüber PHH keine zytotoxischen Effekte [Ganten *et al.*, 2006]. Neuere Daten deuten allerdings darauf hin, dass vorgeschädigte Hepatozyten, z.B. bei Patienten mit chronischer viraler Hepatitis oder NASH, oder auch nach Vorschädigung durch Chemotherapeutika, sensitiv gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose werden könnten [Ganten *et al.*, 2006; Dunn *et al.*, 2007; Koschny *et al.*, 2007a/b; Malhi *et al.*, 2007; Volkmann *et al.*, 2007]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da sich rekombinantes humanes TRAIL und agonistische monoklonale Antikörper, welche die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 aktivieren, mittlerweile in klinischen Studien für verschiedene humane Tumorentitäten befinden, wie z.B. dem metastasierten kolorektalen Karzinom, Non-Hodgkin-Lymphom oder Nicht-Kleinzelligem Bronchialkarzinom [siehe www.clinicaltrials.gov]. Phase I-Studien haben bereits die Sicherheit und Verträglichkeit dieser Substanzen aufgezeigt, die derzeit laufenden Phase II-Studien untersuchen die therapeutische Effektivität der TRAIL-Agonisten als Mono- oder Kombinationstherapie mit etablierten Chemotherapeutika [Tolcher *et al.*, 2007; Greco *et al.*, 2008; Hotte *et al.*, 2008; Bellail *et al.*, 2009]. Allerdings weisen viele Tumorzelllinien *in vitro* eine Resistenz gegenüber einer Behandlung mit TRAIL auf, wodurch davon ausgegangen werden muss, dass es auch *in vivo* nur limitierte Ansprechraten geben könnte. Die Möglichkeit der Resistenzausbildung gegenüber TRAIL sind zahlreich, wie z.B. eine verminderte Expression von DR4 und DR5, eine erhöhte Expression der Decoy-Rezeptoren [LeBlanc und Ashkenazi, 2003], eine verminderte Caspasen-Expression [Stupack *et al.*, 2006], eine erhöhte Expression von cFLIP [Ricci *et al.*, 2004], oder eine erhöhte Expression anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine [van Loo *et al.*, 2002]. Hierbei spielt vor allem Mcl-1 eine entscheidende Rolle, was in zahlreichen Studien belegt werden konnte. Zum einen können Krebszellen durch einen spezifischen Knockdown von Mcl-1 durch siRNAs oder durch die micro-RNA miR-29b gegenüber TRAIL sensitiviert werden [Wirth *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Mott *et al.*, 2007b]. Des Weiteren erwies sich Sorafenib als TRAIL-sensitivierende Substanz: durch die Blockierung des Raf-Signalwegs durch Sorafenib kommt es zu einer verminderten Expression von Mcl-1, unter anderem durch eine verringerte CREB (cAMP-responsive element binding protein)-Aktivität [Rahmani *et al.*, 2005; Ricci *et al.*, 2007]. Durch diese verminderte Mcl-1-Expression liegt mehr freies, aktives Bak in den Zellen vor, und die Zellen werden sensitiv für eine TRAIL-Behandlung [Meng *et al.*, 2007; Rosato *et al.*, 2007]. Bisher ist aber unklar, ob eine Reduktion der Mcl-1-Expression durch Sorafenib auch zu einer Sensitivierung nicht maligner Zellen gegenüber TRAIL-Behandlung führt (sog. „second hit“). Es konnte bereits für verschiedene gesunde Zellen, z.B. für primäre Hepatozyten, Keratinozyten oder Osteoblasten gezeigt werden, dass eine Co-Behandlung *in vitro* mit

TRAIL und Chemotherapeutika oder Proteasominhibitoren zytotoxisch auf diese Zellen wirkt [Koschny *et al.*, 2007b].

Die hier vorgestellten Daten deuten zusammenfassend darauf hin, dass eine Kombination verschiedener Apoptose-induzierender Ansätze, u.a. eine Hemmung des anti-apoptischen Proteins Mcl-1, den Therapieerfolg beim (fortgeschrittenen) HCC verbessern könnte.

Mcl-1 in der Leber

Eine etablierte Methode, um die Bedeutung eines Proteins *in vivo* nachzuweisen, ist ein Knockout des entsprechenden Gens in einem Mausmodell und die Analyse des so entstehenden Phänotyps [Capecchi, 2005]. So konnte auch die Bedeutung der Bcl-2-Proteine weiter untersucht werden: Ein Knockout von Bcl-2 in Mäusen verursacht eine Wachstumsverzögerung, eine Abnahme der Lymphozytenzahl, zystische Veränderungen der Nieren und Abnormalitäten in der Haarfarbe. Da Bcl-2 jedoch nicht in Hepatozyten exprimiert wird, hat ein Knockout von Bcl-2 keine Auswirkungen auf die Leber [Veis *et al.*, 1993; Nakayama *et al.*, 1994]. Auch Knockout-Mäuse für Bcl-w und Bfl-1, zwei weiteren anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen, sind überlebensfähig und zeigen keine Auswirkungen auf die Leberfunktion und -morphologie [Hamasaki *et al.*, 1998; Print *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1998]. Ein kompletter Knockout von Mcl-1 oder Bcl-x_L dagegen hat drastische Folgen: Eine Deletion von Bcl-x_L verursacht eine gestörte neuronale und hämatopoetische Entwicklung, was zu einem Absterben Bcl-x_L negativer Embryos führt [Motoyama *et al.*, 1995]. Mcl-1 negative Blastozysten können nicht in den Uterus implantieren [Rinkenberger *et al.*, 2000]. Konditionale Knockout-Modelle zeigten, dass Bcl-x_L unter anderem für das Überleben von Erythroblasten und Hepatozyten [Wagner *et al.*, 2000; Takehara *et al.*, 2004], Mcl-1 dagegen für das Überleben von T-Zellen, B-Zellen, Neutrophilen und hämatopoetischen Stammzellen wichtig ist [Opferman *et al.*, 2003/2005; Dzhagalov *et al.*, 2007].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mcl-1 im HCC verstärkt exprimiert wird und so zur Apoptoseresistenz beitragen kann. Des Weiteren schützt eine Induktion von Mcl-1 durch Wachstumsfaktor-Behandlung primäre humane Hepatozyten vor CD95-mediierter Apoptose [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004]. Daher sollte untersucht werden, welche Rolle Mcl-1 für das Überleben von Hepatozyten *in vivo* hat.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit eine Mauslinie etabliert, die spezifisch in Hepatozyten kein Mcl-1 exprimiert. Hierzu wurden zwei Mauslinien miteinander verpaart: Die Mcl-1^{flox/flox} Mauslinie trägt innerhalb des Mcl-1-Gens zwei loxP-Stellen [Opferman *et al.*, 2003]. Die Albumin-Cre (AlbCre)-Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Albumin-Promotors, der nur in Hepatozyten aktiv ist [Postic *et al.*, 1999]. Dadurch kommt es in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen zu einer Expression der Cre-Rekombinase und damit zu einer Rekombination des Mcl-1-Gens spezifisch in Hepatozyten. Diese Mäuse exprimierten zum Zeitpunkt ihrer Geburt immer noch Mcl-1 in der Leber, allerdings konnte bereits während der Embryogenese in einzelnen Individuen eine beginnende Rekombination des Mcl-1-Gens beobachtet werden. Eine komplette Rekombination des geflochtenen Gens in diesem System dauert etwa acht Wochen [Postic *et al.*, 2000]. In vier Wochen alten

Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Tieren konnte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene eine im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich verminderte Expression von Mcl-1 beobachtet werden. In acht Wochen alten Mäusen war die Mcl-1-Expression in der Leber dagegen fast vollständig unterbunden. Da Endothelzellen und Kupffer-Zellen der Leber in diesem System immer noch Mcl-1 exprimieren, kann davon ausgegangen werden, dass die detektierbare Restexpression von Mcl-1 in den Leberlysaten von diesen Zellpopulationen herrührte. Diese Vermutung kann durch die Beobachtung untermauert werden, dass Mcl-1 in isolierten Hepatozyten aus acht Wochen alten Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Tieren nahezu vollständig fehlte. Somit wurde im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit eine Mauslinie generiert, mit welcher die Bedeutung von Mcl-1 für die gesunde Leber untersucht werden konnte.

Eine wichtige Beobachtung war, dass die Deletion von Mcl-1 in Hepatozyten zu einer Induktion hepatozellulärer Apoptose und parallel zu einer verminderten Lebergröße führte. Unter physiologischen Bedingungen ist die Lebergröße streng reguliert; ein Verlust an Lebergewebe wird durch Proliferation von Hepatozyten ausgeglichen. So kann zum Beispiel in Wildtyp-Mäusen bereits zehn Tage nach Zweidrittel-Hepatektomie wieder ein normales Lebergewicht festgestellt werden [Schuchmann *et al.*, 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine deutlich erhöhte Proliferationsrate in Mcl-1 negativen Lebern beobachtet werden. Diese Induktion der Proliferation ist vermutlich auf die erhöhte Apoptoserate in Mcl-1 negativen Hepatozyten zurückzuführen. Allerdings reichte die erhöhte Proliferationsrate nicht aus, um das vermehrte Absterben der Leberzellen zu kompensieren. So betrug das Lebergewicht in acht Wochen alten Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen nur etwa 60% im Vergleich zu den Geschwistertieren.

Das vermehrte Absterben von Hepatozyten in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen fand auch seinen Ausdruck in einem Anstieg der Serumtransaminasen GOT und GPT um das 6- bis 8-fache in acht Wochen alten Tieren. Interessanterweise waren die Transaminasenwerte in älteren Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen niedriger als in den vier bis acht Wochen alten Tieren, jedoch immer noch signifikant erhöht gegenüber den gleichaltrigen Kontrolltieren. Ein Fehlen von Mcl-1 hat also vermutlich in jüngeren Tieren einen stärkeren gewebsschädigenden Effekt. Ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren konnte nicht festgestellt werden.

Unter pathophysiologischen Bedingungen kann ein vermehrtes, chronisches Absterben von Leberzellen eine Leberentzündung hervorrufen, hervorgerufen durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine durch aktivierte Kupffer-Zellen [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2006a]. Auch in konditionalen NEMO/IKK γ Knockout Mäusen, in denen eine erhöhte Apoptoserate in Hepatozyten beobachtet werden konnte, kam es zu einer chronischen Leberentzündung [Luedde *et al.*, 2007]. In dem hier untersuchten Modell konnte jedoch keine

vermehrte Expression der Entzündungsmediatoren IL6 oder TNF in Mcl-1 negativen Lebern beobachtet werden.

Eine chronische Leberschädigung beim Menschen kann zur Ausbildung einer Leberfibrose führen. Dies ist für den weiteren Krankheitsverlauf entscheidend, da eine progressive Leberfibrose in der Ausbildung einer Leberzirrhose mit eingeschränkter Leberfunktion münden kann. In den Lebern von Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen konnte bereits im Alter von acht Wochen eine vermehrte perizelluläre Collagen-Ablagerung als Anzeichen für eine beginnende Leberfibrose festgestellt werden. In dem hier untersuchten Zeitraum zeigte sich jedoch keine Einschränkung der Leberstoffwechselfunktion in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen, was ersichtlich war in unveränderten Bilirubin-Werten. Des Weiteren kann die langfristige Induktion von Apoptose in Hepatozyten im Mausmodell zur Entstehung eines HCCs beitragen [Luedde *et al.*, 2007]. Ob Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre Mäuse jedoch zu einem vermehrten Auftreten von HCCs tendieren, konnte bisher nicht abschließend untersucht werden.

Diese Daten untermauern frühere Untersuchungen, welche Mcl-1 als wichtigen Faktor für das Zellüberleben und die Zellentwicklung, nicht jedoch für Zellproliferation beschreiben [Yang *et al.*, 1996]. Die Viabilität Mcl-1 negativer Hepatozyten war aufgrund vermehrter Apoptoseinduktion reduziert. Als kompensatorischer Effekt war die Proliferationsrate in Mcl-1 negativen Hepatozyten verstärkt. Mcl-1 ist folglich ein kritisches Protein für das Überleben von Hepatozyten.

Neben seiner Relevanz für das Überleben von Zellen während Wachstums- und Differenzierungsphasen, wird Mcl-1 auch eine große Bedeutung als Überlebensfaktor nach Stress- oder Apoptosesignalen zugesprochen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt einer Mcl-1-Deletion in Hepatozyten auf deren Überleben nach Todesrezeptor-Aktivierung untersucht. Der Todesrezeptor CD95 ist konstitutiv auf Hepatozyten exprimiert. Daher ist die Leber sehr empfindlich gegenüber CD95-Aktivierung [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2003]. Dies wird ersichtlich in Mäusen, denen ein agonistischer CD95-Antikörper injiziert wird, und die daraufhin innerhalb weniger Stunden an Leberversagen sterben [Ogasawara *et al.*, 1993]. Auch im Menschen spielt das CD95-Rezeptorsystem eine bedeutende Rolle für die Leber: Bei verschiedenen akuten und chronischen Lebererkrankungen ist die hepatozelluläre CD95-Expression verstärkt [Galle *et al.*, 1995]. Unter anderem ist die CD95-induzierte Apoptose der Schlüsselmechanismus in der Pathophysiologie des akuten Leberversagens [Ryo *et al.*, 2000]. In dieser Arbeit konnte eine verstärkte hepatozelluläre Schädigung in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen nach Injektion des agonistischen CD95-Antikörpers Jo2 beobachtet werden. Dies war ersichtlich durch erhöhte GOT- und GPT-Werte, verstärkte Caspase-3-Aktivierung, und eine vermehrte Zerstörung des Lebergewebes. Diese erhöhte Empfindlichkeit von Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen gegenüber

CD95-Aktivierung konnte auch in älteren Tieren beobachtet werden, welche basal keine so stark erhöhten Transaminasenwerte aufwiesen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass ältere Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäuse aufgrund der Mcl-1-Deletion empfindlicher gegenüber CD95-Aktivierung reagieren, und nicht (oder zumindest nur teilweise) aufgrund vorangehender Leberschädigung. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass Mcl-1 transgene Tiere unempfindlicher gegenüber Jo2-induziertem Leberversagen als Wildtyp-Tiere sind [Baskin-Bey *et al.*, 2006]. Des Weiteren schützt HGF, ein Wachstumsfaktor der die Mcl-1-Expression in Hepatozyten induziert [Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004], Mäuse vor Jo2-induzierter Leberschädigung [Kosai *et al.*, 1998].

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäuse auch empfindlicher gegenüber T-Zell-vermittelter Leberschädigung reagieren. Die Gabe von ConA ist ein etabliertes *in vivo* Mausmodell für T-Zell-medierte Hepatitis [Tiegs *et al.*, 1992]. Hierbei kommt es nach intravenöser Gabe von ConA zu einer Anhäufung von aktivierten T-Zellen in der Leber [Gantner *et al.*, 1995]. Dies führt zu einer massiven hepatozellulären Degeneration, unter anderem durch eine Aktivierung des CD95-Todessignalwegs in den Hepatozyten durch die aktivierten T-Zellen [Kaneko *et al.*, 2000]. Da Mcl-1 negative Hepatozyten empfindlicher gegenüber CD95-Aktivierung reagieren, kann hierin ein Grund dafür liegen, dass sie auch anfälliger sind gegenüber T-Zell-mediierter Hepatitis.

Dagegen hatte eine Deletion von Mcl-1 in Hepatozyten keinen Einfluss auf das Ausmaß der Leberschädigung, welche durch Gabe von Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) verursacht wurde. CCl₄ ist hepatotoxisch und führt nach andauernder Verabreichung zu einer chronischen Leberschädigung und zur Ausbildung einer Leberfibrose [Streez *et al.*, 2003]. Das Ausmaß der Fibrosebildung in der Leber war jedoch in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen nicht verändert im Vergleich zu Kontrolltieren. Allerdings wurde lediglich ein Zeitwert (5 Wochen) untersucht. Unklar bleibt, ob eine CCl₄-Gabe über einen längeren Zeitraum in Mcl-1^{flox/flox}-AlbCre-Mäusen zu einer verstärkten Leberschädigung führt.

Ein Verlust der Mcl-1-Expression in Hepatozyten wurde nicht durch eine verminderte Expression pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine oder durch eine vermehrte Expression von Bcl-x_L kompensiert. Bcl-x_L ist ein weiteres anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, welches in Hepatozyten exprimiert wird. Ein konditionaler Knockout von Bcl-x_L in Hepatozyten durch ein vergleichbares System führte zu einem ähnlichen Phänotyp wie eine Deletion von Mcl-1: Es konnte eine spontane Apoptoseinduktion in Hepatozyten, die Ausbildung einer Leberfibrose aber keine Entzündungsreaktion beobachtet werden. Allerdings zeigten diese Mäuse keine veränderte Sensitivität gegenüber Todesrezeptoraktivierung [Takehara *et al.*, 2004]. In diesem Modell führte eine Deletion des

Bcl-x_L-Gens ebenfalls zu keiner Induktion von Mcl-1. Obwohl diese beiden Proteine also sehr ähnliche Funktionsweisen haben und eine Deletion zu einem ähnlichen Phänotyp führt, wird der Verlust des einen Proteins in Hepatozyten nicht durch eine Induktion des anderen ausgeglichen. Wie sich ein konditionaler Knockout beider Proteine in Hepatozyten auf die Leber auswirkt, bleibt zu klären.

In früheren Studien konnte interessanterweise kein Effekt auf die Lebermorphologie beobachtet werden, wenn postnatal Mcl-1 deletiert wurde [Opferman *et al.*, 2005]. In diesem System wurden Mcl-1^{flox/null} Mäuse mit MxCre-Mäusen verpaart, was zu einer schnellen Deletion von Mcl-1 in Zellen des Knochenmarks und in Hepatozyten nach Injektion von Poly-Inosin-Poly-Cytidyl-Säure in adulte Mäuse führte. In diesen Mäusen war 14 Tage nach Induktion der Mcl-1-Deletion histologisch keine Leberschädigung erkennbar. Die Deletion von Mcl-1 war jedoch in diesem System induziert, und wurde erst in adulten Mäusen mit bis dahin normal entwickelten Lebern vollzogen. In dem im Rahmen dieser Arbeit generierten Modell dagegen setzte die Deletion von Mcl-1 bereits während der Embryogenese ein. Somit war in den Hepatozyten bereits während der normalen Entwicklung die Mcl-1-Expression vermindert. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Mcl-1 vor allem für Hepatozyten in Lebern junger Mäuse von Bedeutung ist. Diese Schlussfolgerung bestätigt frühere Studien, die gezeigt haben, dass Mcl-1 für Zellen in der Differenzierungsphase von Bedeutung ist [Craig, 2002]. Dagegen spielt Mcl-1 in der adulten Leber, in der die Hepatozyten nur eine geringe Proliferations- und Differenzierungsrate aufweisen, nur eine untergeordnete Rolle, zumindest unter physiologischen Bedingungen. Nach Stimulation von Apoptose dagegen verstärkt ein Knockout von Mcl-1 in Hepatozyten die Leberschädigung in adulten Mäusen.

Es bleibt zu klären, ob gesundes Lebergewebe durch HCC-Therapien geschädigt werden kann, welche mit einer Hemmung der Mcl-1-Expression einhergehen. Zwar führt ein Knockout von Mcl-1 in adultem Lebergewebe zu keiner Beeinträchtigung der Leber [Opferman *et al.*, 2005], allerdings ist unklar, in wie weit ein Knockdown von Mcl-1 die adulte Leber gegenüber einer Behandlung mit Chemotherapie oder anderen Apoptose-induzierenden Agenzien sensitiviert. Hierzu könnte ein weiteres Mausmodell zum Einsatz kommen, in welchem Mcl-1 erst in der adulten Leber durch Tamoxifen-Gabe deletiert wird [Tannour-Louet *et al.*, 2002], und im Anschluss die Auswirkung verschiedener Substanzen bezüglich ihrer lebertoxischen Wirkung getestet werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass Mcl-1 ein zentraler Faktor für das Überleben von Hepatozyten *in vivo* ist. Eine Deletion von Mcl-1 in Hepatozyten während der Wachstumsphase der Leber führt zu einer Aktivierung von

Apoptose und dadurch zu einer Leberschädigung. Die daran beteiligten Signalwege sind nicht abschließend identifiziert. Des Weiteren reagieren Mcl-1 negative Hepatozyten sensibler auf eine Aktivierung des Todesrezeptors CD95. Es kann folglich geschlossen werden, dass Mcl-1 ein wichtiger Überlebensfaktor für Hepatozyten ist, vor allem während Stressphasen wie Wachstum, Differenzierung oder bei externen Apoptosestimuli.

Literaturverzeichnis

- Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2131-6 (1996).
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-37 (2007).
- Akgul C, Moulding DA, White MR, Edwards SW. *In vivo* localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Lett* 478, 72-6 (2000a).
- Akgul C, Turner PC, White MR, Edwards SW. Functional analysis of the human MCL-1 gene. *Cell Mol Life Sci* 57, 684-91 (2000b).
- Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ Jr. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 60, 6101-10 (2000).
- Aravind L, Dixit VM, Koonin EV. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 24, 47-53 (1999).
- Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25, 3866-84 (2006).
- Backus HH, van Riel JM, van Groeningen CJ, Vos W, Dukers DF, Bloemena E, Wouters D, Pinedo HM, Peters GJ. Rb, mcl-1 and p53 expression correlate with clinical outcome in patients with liver metastases from colorectal cancer. *Ann Oncol* 12, 779-85 (2001).
- Bae J, Leo CP, Hsu SY, Hsueh AJ. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* 275, 25255-61 (2000).
- Baehrecke EH. Autophagic programmed cell death in Drosophila. *Cell Death Differ* 10, 940-5 (2003).
- Bantel H, Lügering A, Poremba C, Lügering N, Held J, Domschke W, Schulze-Osthoff K. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 34, 758-67 (2001).
- Barnhart BC, Peter ME. The TNF receptor 1: a split personality complex. *Cell* 114, 148-50 (2003a).
- Barnhart BC, Lee JC, Alappat EC, Peter ME. The death effector domain protein family. *Oncogene* 22, 8634-44 (2003b).
- Baskin-Bey ES, Gores GJ. Death by association: BH3 domain-only proteins and liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G987-90 (2005).
- Baskin-Bey ES, Huang W, Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Braley K, Craig RW, Moore DD, Gores GJ. Constitutive androstane receptor (CAR) ligand, TCPOBOP, attenuates Fas-induced murine liver injury by altering Bcl-2 proteins. *Hepatology* 44, 252-62 (2006).
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2, 1129-33 (1981).
- Bellail AC, Qi L, Mulligan P, Chhabra V, Hao C. TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges. *Rev Recent Clin Trials* 4, 34-41 (2009).
- Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 26, 509-17 (1994).
- Bingle CD, Craig RW, Swales BM, Singleton V, Zhou P, Whyte MK. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem* 275, 22136-46 (2000).
- Blum HE (1995) Tumoren der Leber und des biliären Systems. In: Blum HE, Gerok W (Hrsg). *Hepatology*. 2. Auflage. Urban-Schwarzenberg, München. S. 635-50.
- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27, 19-26 (2002).
- Bosch FX, Ribes J, Borràs J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 19, 271-85 (1999).
- Boutros M, Ahringer J. The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet* 9, 554-66 (2008).
- Branda CS, Dymecki SM. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6, 7-28 (2004).
- Breuhahn K, Longrich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25, 3787-800 (2006).
- Bröker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11, 3155-62 (2005).
- Burroughs A, Hochhauser D, Meyer T. Systemic treatment and liver transplantation for hepatocellular

- carcinoma: two ends of the therapeutic spectrum. *Lancet Oncol* 5, 409-18 (2004).
- Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, Factor VM, Thorgeirsson SS. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 130, 1117-28 (2006).
- Canbay A, Gucciardi ME, Higuchi H, Feldstein A, Bronk SF, Rydzewski R, Taniai M, Gores GJ. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *J Clin Invest* 112, 152-9 (2003).
- Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 83, 655-63 (2003b).
- Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 6, 507-12 (2005).
- Cascio S, Zaret KS. Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development* 113, 217-25 (1991).
- Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, Letai A. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351-65 (2006).
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-62 (2000).
- Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med* 336, 1855-9 (1997).
- Chao JR, Wang JM, Lee SF, Peng HW, Lin YH, Chou CH, Li JC, Huang HM, Chou CK, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. Mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol Cell Biol* 18, 4883-98 (1998).
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393-403 (2005a).
- Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W. ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121, 1071-83 (2005b).
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-12 (1995).
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13, 1396-1402 (2006).
- Choi TK, Lee NW, Wong J. Chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. Adriamycin versus quadruple chemotherapy. *Cancer* 53, 401-5 (1984).
- Chou CH, Lee RS, Yang-Yen HF. An internal EELD domain facilitates mitochondrial targeting of Mcl-1 via a Tom70-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 17, 3952-63 (2006).
- Cho-Vega JH, Rassidakis GZ, Admirand JH, Oyarzo M, Ramalingam P, Paraguya A, McDonnell TJ, Amin HM, Medeiros LJ. MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 35, 1095-100 (2004).
- Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, Gil-Gómez G, Brady HJ. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 281, 5750-9 (2006).
- Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 3, 573-88 (2003).
- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-607 (2003).
- Craig RW. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 16, 444-54 (2002).
- Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev* 17, 2922-32 (2003).
- Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-19 (2004).
- Day CL, Dupont C, Lackmann M, Vaux DL, Hinds MG. Solution structure and mutagenesis of the caspase recruitment domain (CARD) from Apaf-1. *Cell Death Differ* 6, 1125-32 (1999).
- Day CL, Chen L, Richardson SJ, Harrison PJ, Huang DC, Hinds MG. Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J Biol Chem* 280, 4738-44 (2005).
- Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-

- x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 100, 194-9 (2002).
- Derouet M, Thomas L, Moulding DA, Akgul C, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. Sodium salicylate promotes neutrophil apoptosis by stimulating caspase-dependent turnover of Mcl-1. *J Immunol* 176, 957-65 (2006).
- Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-52 (1999).
- Domina AM, Smith JH, Craig RW. Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition. *J Biol Chem* 275, 21688-94 (2000).
- Domina AM, Vrana JA, Gregory MA, Hann SR, Craig RW. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23, 5301-15 (2004).
- Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G. Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Oncogene* 25, 3756-70 (2006).
- Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, Christophides T, Kennedy PT, Lampertico P, Das A, Lopes AR, Borrow P, Williams K, Humphreys E, Afford S, Adams DH, Bertolotti A, Maini MK. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 204, 667-80 (2007).
- Dzhagalov I, St John A, He YW. The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* 109, 1620-6 (2007).
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424 (1999).
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8 (2001).
- El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 160, 3227-30 (2000).
- Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125, 437-43 (2003a).
- Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 39, 978-83 (2003b).
- Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 5, 876-85 (2005).
- Fields AC, Cotsonis G, Sexton D, Santoianni R, Cohen C. Survivin expression in hepatocellular carcinoma: correlation with proliferation, prognostic parameters, and outcome. *Mod Pathol* 17, 1378-85 (2004).
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11 (1998).
- Fleischer B**, Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Weber A, Biesterfeld S, Müller M, Krammer PH, Galle PR. Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 28, 25-32 (2006).
- Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, Martinez OM, Krams SM. Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Liver* 21, 272-9 (2001).
- Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 182, 1223-30 (1995).
- Ganten TM, Koschny R, Sykora J, Schulze-Bergkamen H, Büchler P, Haas TL, Schader MB, Untergasser A, Stremmel W, Walczak H. Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res* 12, 2640-6 (2006).
- Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 21, 190-8 (1995).
- Garrido C, Kroemer G. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 16, 639-46 (2004).
- Geary RS, Leeds JM, Henry SP, Monteith DK, Levin AA. Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer: 1. Pharmacokinetic properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Anticancer Drug Des* 12, 383-93 (1997).
- Glucksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26, 59-81 (1951).
- Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891-906 (2004).

- Greco FA, Bonomi P, Crawford J, Kelly K, Oh Y, Halpern W, Lo L, Gallant G, Klein J. Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 61, 82-90 (2008).
- Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Gores GJ. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor-alpha-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. *Am J Pathol* 159, 2045-54 (2001).
- Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-6 (1996).
- Hamasaki A, Sendo F, Nakayama K, Ishida N, Negishi I, Nakayama K, Hatakeyama S. Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med* 188, 1985-92 (1998).
- Han J, Goldstein LA, Gastman BR, Rabinowich H. Interrelated roles for Mcl-1 and BIM in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* 281, 10153-63 (2006).
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).
- Heere-Ress E, Thallinger C, Lucas T, Schlagbauer-Wadl H, Wacheck V, Monia BP, Wolff K, Pehamberger H, Jansen B. Bcl-X(L) is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy. *Int J Cancer* 99, 29-34 (2002).
- Henson ES, Gibson EM, Villanueva J, Bristow NA, Haney N, Gibson SB. Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *J Cell Biochem* 89, 1177-92 (2003).
- Hetz H, Hoetzenecker K, Hacker S, Faybik P, Pollreis A, Moser B, Roth G, Hoetzenecker W, Lichtenauer M, Klinger M, Krenn CG, Ankersmit HJ. Caspase-cleaved cytokeratin 18 and 20 S proteasome in liver degeneration. *J Clin Lab Anal* 21, 277-81 (2007).
- Hinds MG, Day CL. Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants. *Curr Opin Struct Biol* 15, 690-9 (2005).
- Hotte SJ, Hirte HW, Chen EX, Siu LL, Le LH, Corey A, Iacobucci A, MacLean M, Lo L, Fox NL, Oza AM. A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 14, 3450-5 (2008).
- Huang HM, Huang CJ, Yen JJ. Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood* 96, 1764-71 (2000).
- Ikeguchi M, Ueta T, Yamane Y, Hirooka Y, Kaibara N. Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 8, 3131-6 (2002).
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-43 (1991).
- Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268, 10932-7 (1993).
- Jäättelä M, Candé C, Kroemer G. Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF. *Cell Death Differ* 11, 135-6 (2004).
- Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125, 1246-57 (2003).
- Jee SH, Shen SC, Chiu HC, Tsai WL, Kuo ML. Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. *Oncogene* 20, 198-208 (2001).
- Kaestner KH. The making of the liver: developmental competence in foregut endoderm and induction of the hepatogenic program. *Cell Cycle* 4, 1146-8 (2005).
- Kaneko Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, Nakayama T, Taniguchi M. Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med* 191, 105-14 (2000).
- Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 182, 1777-83 (1995).
- Kern MA, Haugg AM, Koch AF, Schilling T, Breuhahn K, Walczak H, **Fleischer B**, Trautwein C, Michalski C, Schulze-Bergkamen H, Friess H, Stremmel W, Krammer PH, Schirmacher P, Müller M. Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 66, 7059-66 (2006).
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging

- implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57 (1972).
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8, 1348-58 (2006).
- Kim YS, Morgan MJ, Choksi S, Liu ZG. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell* 26, 675-87 (2007).
- Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1644, 229-49 (2004).
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14, 5579-88 (1995).
- Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 128, 2054-65 (2005).
- Kobayashi S, Lee SH, Meng XW, Mott JL, Bronk SF, Werneburg NW, Craig RW, Kaufmann SH, Gores GJ. Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *J Biol Chem* 282, 18407-17 (2007).
- Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 116, 168-78 (1999).
- Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 683-90 (1998).
- Koschny R, Ganten TM, Sykora J, Haas TL, Sprick MR, Kolb A, Stremmel W, Walczak H. TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis within a therapeutic window. *Hepatology* 45, 649-58 (2007a).
- Koschny R, Walczak H, Ganten TM. The promise of TRAIL--potential and risks of a novel anticancer therapy. *J Mol Med* 85, 923-35 (2007b).
- Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3516-20 (1993).
- Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Berean K, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death *in vivo*. *Am J Pathol* 146, 1309-19 (1995).
- Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-95 (2000).
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51 (1997).
- Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-9 (2000).
- Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 433-5 (2003).
- Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11, 725-30 (2005).
- Kronenberger B, Wagner M, Herrmann E, Mihm U, Piiper A, Sarrazin C, Zeuzem S. Apoptotic cytokeratin 18 neopeptides in serum of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 12, 307-14 (2005).
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276, 20633-40 (2001).
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17, 525-35 (2005).
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5 (1970).
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10, 66-75 (2003).
- Leithäuser F, Dhein J, Mechttersheimer G, Koretz K, Brüderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Möller P. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 69, 415-29 (1993).
- Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J Clin Invest* 115, 2648-55 (2005).
- Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6, 443-50 (2004).
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and

- dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89 (1997).
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501 (1998).
- Li S, Zhao Y, He X, Kim TH, Kuharsky DK, Rabinowich H, Chen J, Du C, Yin XM. Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 277, 26912-20 (2002).
- Lin MT, Juan CY, Chang KJ, Chen WJ, Kuo ML. IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1. *Carcinogenesis* 22, 1947-53 (2001).
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-99 (2000).
- Liu H, Ma Y, Cole SM, Zander C, Chen KH, Karras J, Pope RM. Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood* 102, 344-52 (2003).
- Liu H, Peng HW, Cheng YS, Yuan HS, Yang-Yen HF. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol* 25, 3117-26 (2005).
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362, 1907-17 (2003).
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359, 378-90 (2008).
- Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48, 1312-27 (2008).
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501 (2001).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75 (1951).
- Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A, De Vos R, Roskams T, Trautwein C, Pasparakis M. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 11, 119-32 (2007).
- Luft T, Conzelmann M, Benner A, Rieger M, Hess M, Strohhaecker U, Görner M, Hegenbart U, Ho AD, Dreger P. Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease. *Blood* 110, 4535-42 (2007).
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490 (1998).
- Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1639, 141-51 (2003).
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15 (1995).
- Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut* 56, 1124-31 (2007).
- Mariani SM, Matiba B, Bäumlner C, Krammer PH. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol* 25, 2303-7 (1995).
- Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21, 749-60 (2006).
- Meng XW, Lee SH, Dai H, Loegering D, Yu C, Flatten K, Schneider P, Dai NT, Kumar SK, Smith BD, Karp JE, Adjei AA, Kaufmann SH. Mcl-1 as a buffer for proapoptotic Bcl-2 family members during TRAIL-induced apoptosis: a mechanistic basis for sorafenib (Bay 43-9006)-induced TRAIL sensitization. *J Biol Chem* 282, 29831-46 (2007).
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75, 653-60 (1993).
- Moreira JN, Santos A, Simões S. Bcl-2-targeted antisense therapy (Oblimersen sodium): towards clinical reality. *Rev Recent Clin Trials* 1, 217-35 (2006).
- Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, Loh DY. Massive cell death of

- immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267, 1506-10 (1995).
- Mott JL, Gores GJ. Piercing the armor of hepatobiliary cancer: Bcl-2 homology domain 3 (BH3) mimetics and cell death. *Hepatology* 46, 906-11 (2007a).
- Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26, 6133-40 (2007b).
- Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* 92, 2495-502 (1998).
- Moulding DA, Giles RV, Spiller DG, White MR, Tidd DM, Edwards SW. Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells. *Blood* 96, 1756-63 (2000).
- Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694 (2001).
- Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H, Loh DY. Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3700-4 (1994).
- Nerenstone SR, Ihde DC, Friedman MA. Clinical trials in primary hepatocellular carcinoma: current status and future directions. *Cancer Treat Rev* 15, 1-31 (1988).
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-9 (1991).
- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17, 1475-86 (2003).
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 12, 3679-84 (1993).
- O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184, 1075-82 (1996).
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-8 (2000).
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Ponstingl H, Krammer PH. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267, 10709-15 (1992).
- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806-9 (1993).
- Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671-6 (2003).
- Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, Korsmeyer SJ. Obligate role of antiapoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 307, 1101-4 (2005).
- Pang RW, Poon RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology* 72, 30-44 (2007).
- Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, Hills R, Ward R, Starczynski J, Austen B, Hooper L, Stankovic T, Fegan C. Mcl-1 expression has *in vitro* and *in vivo* significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 112, 3807-17 (2008).
- Pohl J, Zuna I, Stremmel W, Rudi J. Systemic chemotherapy with epirubicin for treatment of advanced or multifocal hepatocellular carcinoma. *Chemotherapy* 47, 359-65 (2001).
- Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, Shelton KD, Lindner J, Cherrington AD, Magnuson MA. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem* 274, 305-15 (1999).
- Postic C, Magnuson MA. DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genesis* 26, 149-50 (2000).
- Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser D, Metcalf D, Köntgen F, Adams JM, Cory S. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12424-31 (1998).
- Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Shi Y. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399, 549-57 (1999).
- Rahmani M, Davis EM, Bauer C, Dent P, Grant S. Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-

- regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. *J Biol Chem* 280, 35217-27 (2005).
- Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 1, 111-21 (2002).
- Reynolds JE, Yang T, Qian L, Jenkinson JD, Zhou P, Eastman A, Craig RW. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 54, 6348-52 (1994).
- Ricci MS, Jin Z, Dews M, Yu D, Thomas-Tikhonenko A, Dicker DT, El-Deiry WS. Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* 24, 8541-55 (2004).
- Ricci MS, Kim SH, Ogi K, Plataras JP, Ling J, Wang W, Jin Z, Liu YY, Dicker DT, Chiao PJ, Flaherty KT, Smith CD, El-Deiry WS. Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death. *Cancer Cell* 12, 66-80 (2007).
- Rinkenberger JL, Horning S, Klocke B, Roth K, Korsmeyer SJ. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 23-7 (2000).
- Rivero M, Crespo J, Fábrega E, Casafont F, Mayorga M, Gomez-Fleitas M, Pons-Romero F. Apoptosis mediated by the Fas system in the fulminant hepatitis by hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 9, 107-13 (2002).
- Romano PR, McCallus DE, Pachuk CJ. RNA interference-mediated prevention and therapy for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25, 3857-65 (2006).
- Rosato RR, Almenara JA, Coe S, Grant S. The multikinase inhibitor sorafenib potentiates TRAIL lethality in human leukemia cells in association with Mcl-1 and cFLIPL down-regulation. *Cancer Res* 67, 9490-500 (2007).
- Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, Parlow AF, Skinner MK, Russell LD, MacGregor GR. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat Genet* 18, 251-6 (1998).
- Russell P, Nurse P. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145-53 (1986).
- Ryo K, Kamogawa Y, Ikeda I, Yamauchi K, Yonehara S, Nagata S, Hayashi N. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 95, 2047-55 (2000).
- Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 75, 22-33 (2004).
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-87 (1998).
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-25 (2000).
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-22 (2000).
- Schotte P, Van Crieckinge W, Van de Craen M, Van Loo G, Desmedt M, Grooten J, Cornelissen M, De Ridder L, Vandekerckhove J, Fiers W, Vandenamee P, Beyaert R. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 379-87 (1998).
- Schubert KM, Duronio V. Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. *Biochem J* 356, 473-80 (2001).
- Schuchmann M, Galle PR. Sensitizing to apoptosis-sharpening the medical sword. *J Hepatol* 40, 335-6 (2004).
- Schuchmann M, Ruckert F, Garcia-Lazaro JF, Karg A, Burg J, Knorr N, Siebler J, Varfolomeev EE, Wallach D, Schreiber W, Lohse AW, Galle PR. MORT1/FADD is involved in liver regeneration. *World J Gastroenterol* 11, 7248-53 (2005).
- Schuchmann M, Schulze-Bergkamen H, **Fleischer B**, Schattenberg JM, Siebler J, Weinmann A, Teufel A, Wörns M, Fischer T, Strand S, Lohse AW, Galle PR. Histone deacetylase inhibition by valproic acid down-regulates c-FLIP/CASH and sensitizes hepatoma cells towards CD95- and TRAIL receptor-mediated apoptosis and chemotherapy. *Oncol Rep* 15, 227-30 (2006).
- Schulze-Bergkamen H, Untergasser A, Dax A, Vogel H, Büchler P, Klar E, Lehnert T, Friess H, Büchler MW, Kirschfink M, Stremmel W, Krammer PH, Müller M, Protzer U. Primary human hepatocytes--a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 38, 736-44 (2003).
- Schulze-Bergkamen H, Krammer PH. Apoptosis in cancer--implications for therapy. *Semin Oncol* 31, 90-119 (2004).
- Schulze-Bergkamen H, Brenner D, Krueger A, Suess D, Fas SC, Frey CR, Dax A, Zink D, Büchler P, Müller M, Krammer PH. Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt. *Hepatology* 39, 645-54 (2004).

- Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, **Fleischer B**, Galle PR. The role of apoptosis versus oncotic necrosis in liver injury: facts or faith? *J Hepatol* 44, 984-93 (2006a).
- Schulze-Bergkamen H, **Fleischer B**, Schuchmann M, Weber A, Weinmann A, Krammer PH, Galle PR. Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards apoptosis induction. *BMC Cancer* 6, 232 (2006b).
- Schulze-Bergkamen H, Ehrenberg R, Hickmann L, **Vick B**, Urbanik T, Schimanski CC, Berger MR, Schad A, Weber A, Heeger S, Galle PR, Moehler M. Bcl-x(L) and Myeloid cell leukaemia-1 contribute to apoptosis resistance of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* 14, 3829-40 (2008).
- Schulze-Bergkamen H, Weinmann A, Moehler M, Siebler J, Galle PR. Novel ways to sensitise gastrointestinal cancer to apoptosis. *Gut* 58, 1010-24 (2009).
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254, 439-59 (1998).
- Seidel N, Volkmann X, Länger F, Flemming P, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. The extent of liver steatosis in chronic hepatitis C virus infection is mirrored by caspase activity in serum. *Hepatology* 42, 113-20 (2005).
- Sieghart W, Losert D, Strommer S, Cejka D, Schmid K, Rasoul-Rockenschaub S, Bodingbauer M, Crevenna R, Monia BP, Peck-Radosavljevic M, Wacheck V. Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy. *J Hepatol* 44, 151-7 (2006).
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 1067-74 (1999).
- Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, McMaster WR. Survival of Mycobacterium tuberculosis in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol* 170, 430-7 (2003).
- Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9, 347-51 (2003).
- Song L, Coppola D, Livingston S, Cress D, Haura EB. Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 4, 267-76 (2005).
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14376-81 (2000).
- Sperandio S, Poksay K, de Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, Bredesen DE. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ* 11, 1066-75 (2004).
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1, 949-57 (1998).
- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Müller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2, 1361-6 (1996).
- Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-3 (1990).
- Streetz KL, Tacke F, Leifeld L, Wüstefeld T, Graw A, Klein C, Kamino K, Spengler U, Kreipe H, Kubicka S, Müller W, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* 38, 218-29 (2003).
- Stuart KA, Riordan SM, Lidder S, Crostella L, Williams R, Skouteris GG. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling. *Int J Exp Pathol* 81, 17-30 (2000).
- Stupack DG, Teitz T, Potter MD, Mikolon D, Houghton PJ, Kidd VJ, Lahti JM, Cheresch DA. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 439, 95-9 (2006).
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 186, 25-37 (1997).
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-6 (1999).
- Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 34, 55-61 (2001).
- Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker EB 3rd, Hennighausen L, Jinushi M, Miyagi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 127, 1189-97 (2004).

- Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4, 31-6 (1998).
- Taniai M, Grambihler A, Higuchi H, Werneburg N, Bronk SF, Farrugia DJ, Kaufmann SH, Gores GJ. Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* 64, 3517-24 (2004).
- Tannapfel A, Kohlhaw K, Ebelt J, Hauss J, Liebert U, Berr F, Wittekind C. Apoptosis and the expression of Fas and Fas ligand (FasL) antigen in rejection and reinfection in liver allograft specimens. *Transplantation* 67, 1079-83 (1999).
- Tannour-Louet M, Porteu A, Vaulont S, Kahn A, Vasseur-Cognet M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. *Hepatology* 35, 1072-81 (2002).
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-53 (1993).
- Teufel A, Staib F, Kanzler S, Weinmann A, Schulze-Bergkamen H, Galle PR. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 13, 2271-82 (2007).
- Thallinger C, Wolschek MF, Wacheck V, Maierhofer H, Günsberg P, Polterauer P, Pehamberger H, Monia BP, Selzer E, Wolff K, Jansen B. Mcl-1 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in a SCID mouse xenotransplantation model. *J Invest Dermatol* 120, 1081-6 (2003).
- Thallinger C, Wolschek MF, Maierhofer H, Skvara H, Pehamberger H, Monia BP, Jansen B, Wacheck V, Selzer E. Mcl-1 is a novel therapeutic target for human sarcoma: synergistic inhibition of human sarcoma xenotransplants by a combination of mcl-1 antisense oligonucleotides with low-dose cyclophosphamide. *Clin Cancer Res* 10, 4185-91 (2004).
- Thomas MB, Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol* 23, 2892-9 (2005).
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 31, 339-46 (2002).
- Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 90, 196-203 (1992).
- Tolcher AW, Mita M, Meropol NJ, von Mehren M, Patnaik A, Padavic K, Hill M, Mays T, McCoy T, Fox NL, Halpern W, Corey A, Cohen RB. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J Clin Oncol* 25, 1390-5 (2007).
- Townsend KJ, Zhou P, Qian L, Bieszczad CK, Lowrey CH, Yen A, Craig RW. Regulation of MCL1 through a serum response factor/Elk-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the BCL2 family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J Biol Chem* 274, 1801-13 (1999).
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-5 (1989).
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-3 (1985).
- van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9, 1031-42 (2002).
- Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442 (1988).
- Weis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-40 (1993).
- Vejchapipat P, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Chittmittrapap S, Poovorawan Y. Association between serum hepatocyte growth factor and survival in untreated hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 39, 1182-8 (2004).
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187, 1477-85 (1998).
- Véronèse L, Tournilhac O, Verrelle P, Davi F, Dighiero G, Chautard E, Veyrat-Masson R, Kwiatkowski F, Goumy C, Vago P, Travade P, Tchirkov A. Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 22, 1291-3 (2008).
- Vick B**, Weber A, Urbanik T, Maass T, Teufel A, Krammer PH, Opferman JT, Schuchmann M, Galle PR, Schulze-Bergkamen H. Knockout of myeloid cell leukemia-1 induces liver damage and increases apoptosis susceptibility of murine hepatocytes. *Hepatology* 49, 627-36 (2009).
- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27, 55-76 (2007).

- Vogler M, Dinsdale D, Dyer MJ, Cohen GM. Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death Differ* 16, 360-7 (2009).
- Volkman X, Fischer U, Bahr MJ, Ott M, Lehner F, Macfarlane M, Cohen GM, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology* 46, 1498-508 (2007).
- Volpes R, van den Oord JJ, De Vos R, Desmet VJ. Hepatic expression of type A and type B receptors for tumor necrosis factor. *J Hepatol* 14, 361-9 (1992).
- Wacheck V, Zangemeister-Wittke U. Antisense molecules for targeted cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 59, 65-73 (2006).
- Wagner KU, Claudio E, Rucker EB 3rd, Riedlinger G, Broussard C, Schwartzberg PL, Siebenlist U, Hennighausen L. Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development* 127, 4949-58 (2000).
- Wajant H. Death receptors. *Essays Biochem* 39, 53-71 (2003).
- Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 19, 6195-206 (1999).
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 148, 1274-9 (1992).
- Watanabe J, Kushihata F, Honda K, Sugita A, Tateishi N, Mominoki K, Matsuda S, Kobayashi N. Prognostic significance of Bcl-xL in human hepatocellular carcinoma. *Surgery* 135, 604-12 (2004).
- Weber CH, Vincenz C. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci* 26, 475-81 (2001).
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-30 (2001).
- Weng C, Li Y, Xu D, Shi Y, Tang H. Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. *J Biol Chem* 280, 10491-500 (2005).
- Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Gores GJ. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G947-56 (2002).
- Widlak P, Garrard WT. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 94, 1078-87 (2005).
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-9 (2007).
- Wirth T, Kühnel F, Fleischmann-Mundt B, Woller N, Djojusbrotto M, Rudolph KL, Manns M, Zender L, Kubicka S. Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1. *Cancer Res* 65, 7393-402 (2005).
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306 (1980).
- Yagmur E, Trautwein C, Leers MP, Gressner AM, Tacke F. Elevated apoptosis-associated cytokeratin 18 fragments (CK18Asp386) in serum of patients with chronic liver diseases indicate hepatic and biliary inflammation. *Clin Biochem* 40, 651-5 (2007).
- Yang T, Kozopas KM, Craig RW. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol* 128, 1173-84 (1995).
- Yang T, Buchan HL, Townsend KJ, Craig RW. MCL-1, a member of the BCL-2 family, is induced rapidly in response to signals for cell differentiation or death, but not to signals for cell proliferation. *J Cell Physiol* 166, 523-36 (1996).
- Yang-Yen HF. Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. *J Biomed Sci* 13, 201-4 (2006).
- Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169, 1747-56 (1989).
- Youle R, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59 (2008).
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628 (1996).

Zhang N, Hartig H, Dzhagalov I, Draper D, He YW. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res* 15, 749-69 (2005).

Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the

polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121, 1085-95 (2005).

Zhou P, Levy NB, Xie H, Qian L, Lee CY, Gascoyne RD, Craig RW. MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* 97, 3902-9 (2001).

Abkürzungsverzeichnis

α h/ α m	anti-human / anti-Maus
AIF	apoptosis inducing factor
AIH	Autoimmunhepatitis
AlbCre	Albumin-Cre
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ASO	Antisense-Oligonukleotide
ATP	Adenosintri-phosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma-leukemia-2
BH	Bcl-2-Homologie-Domäne
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuracil
BSA	bovine serum albumin
CAD	caspase-activated DNase
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
cDNA	complementary DNA
ConA	Concanavalin A
c _T	Schwellenwert-Zyklus (engl. Cycle Threshold)
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Endo G	endonuclease G
Epi	Epirubicin
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FADD	Fas-associated death domain containing protein
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLIP	cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein
5-FU	5-Fluorouracil
g	Gramm

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
goi	Gene of interest
GOT / AST	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase / Aspartat-Aminotransferase
GPT / ALT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase / Alanin-Aminotransferase
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase-3 beta
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDAC-I	Histondeacetylase-Inhibitor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
hkg	house keeping gene
hr	human recombinant
IAP	inhibitor of apoptosis
IGF-II	Insulin-like Growth Factor II
I κ B	inhibitor of NF- κ B
IKK- β	I κ B Kinase-beta
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRS-1/-2	Insulin Receptor Substrate-1/-2
i.v.	intravenös
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
l	Liter
loxP	locus of crossover in P1
M	molar
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1
Δ Mcl-1	rekombiniertes Mcl-1
min	Minute(n)
Mio	Million(en)
miRNA	micro-RNA
MMP	mitochondriale Membran-Permeabilisierung
MMP	Metalloproteinasen
mTOR	mammalian target of rapamycin
NASH	nicht-alkoholischer Steatohepatitis

NF- κ B	nuclear factor-kappaB
n.s.	nicht signifikant
ORF	offenes Leseraster (engl.: open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PHH	primäre humane Hepatozyten
PI3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
PMH	primäre murine Hepatozyten
RIP	receptor interacting protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodiumdodecylsulfate)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
TdT	Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TERT	Telomerase-Reverse Transkriptase
TGF- α	Transforming Growth Factor-alpha
TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF-R associated protein with death domain
TRAF2	TNF-R associated protein 2
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
UV	Ultraviolett
V	Volt
VA	Valproinsäure
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
wt	Wildtyp

Publikationen

- Weber A, Boger R, Vick B, Urbanik T, Haybaeck J, Zoller S, Teufel A, Krammer PH, Opferman JT, Galle PR, Schuchmann M, Schulze-Bergkamen H. Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 51, 1226-36 (2010).
- Koehler BC, Urbanik T, Vick B, Boger RJ, Heeger S, Galle PR, Schuchmann M, Schulze-Bergkamen H. TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells is augmented by targeted therapies. *World J Gastroenterol* 15, 5924-35 (2009).
- Vick B, Weber A, Urbanik T, Maass T, Teufel A, Krammer PH, Opferman JT, Schuchmann M, Galle PR, Schulze-Bergkamen H. Knock-out of Myeloid cell leukemia 1 induces liver damage and increases apoptosis susceptibility of murine hepatocytes. *Hepatology* 49, 627-36 (2009).
- Schulze-Bergkamen H, Ehrenberg R, Hickmann L, Vick B, Urbanik T, Schimanski CC, Berger MR, Schad A, Weber A, Heeger S, Galle PR, Möhler M. Specific modulation of Bcl-xL versus Mcl-1 and its impact on the apoptosis sensitivity of colorectal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 14, 3829-40 (2008).
- Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, Schuchmann M, Weber A, Weinmann A, Krammer PH, Galle PR. Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards apoptosis induction. *BMC Cancer* 6, 232 (2006).
- Kern MA, Haugg AM, Koch AF, Schilling T, Breuhahn K, Walczak H, Fleischer B, Trautwein C, Michalski C, Schulze-Bergkamen H, Friess H, Stremmel W, Krammer PH, Schirmacher P, Müller M. Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 66, 7059-66 (2006).
- Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Fleischer B, Galle PR. The role of apoptosis versus oncotic necrosis in liver injury: facts or faith? *J Hepatol* 44, 984-93 (2006).
- Schuchmann M, Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, Schattenberg JM, Siebler J, Weinmann A, Teufel A, Wörns M, Fischer T, Strand S, Lohse AW, Galle PR. Histone deacetylase inhibition by valproic acid down-regulates c-FLIP/CASH and sensitizes hepatoma cells towards CD95- and TRAIL receptor-mediated apoptosis and chemotherapy. *Oncol Rep* 15, 227-30 (2006).
- Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Weber A, Biesterfeld S, Müller M, Krammer PH, Galle PR. Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 28, 25-32 (2006).

Abstracts

- Vick B, Weber A, Urbanik T, Galle PR, Schulze-Bergkamen H. Mcl-1 – a critical factor for the survival of hepatocytes. Digestive Disease Week 2008, San Diego. “Top10-Abstracts”.
- Fleischer B, Schuchmann M, Krammer PH, Galle PR, Schulze-Bergkamen H. Downregulation of Mcl-1 by siRNA sensitizes HCC cells towards apoptosis induction – a novel therapeutic approach. 41th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL).
- Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Suess D, Galle PR, Krammer PH. Regulation of Mcl-1 in primary human hepatocytes and hepatoma cells. 2nd International PhD Student Symposium “Horizons in Molecular Biology”.
- Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Suess D, Büchler P, Krammer PH. Regulation der Mcl-1-Expression in humanen Leberzellen 59. Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS).

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

Mainz, im Juli 2009

Anhänge