

Kupferto­xi­zi­tät, Re­ge­ne­ra­tion und Lipid­me­ta­bo­li­smus in der $Atp7b^{-/-}$ -Maus, einem Tier­mo­dell des Morbus Wilson

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl. biol. Wiebke Schirrmeister, geb. Scherbatzki

geboren am 16.07.1982 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr. med. Dominik Huster

Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John

eingereicht am: 29.01.2013

verteidigt am: 18.10.2013

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	<i>Kupfer.....</i>	8
1.2	<i>Rolle des ATP7B-Proteins im Kupfertransport.....</i>	10
1.3	<i>Erkrankungen bei gestörter Kupferbalance.....</i>	11
1.3.1	Morbus Menkes.....	11
1.3.2	Morbus Wilson.....	12
1.3.3	Tiermodelle des Morbus Wilson.....	13
1.4	<i>Chronische Entzündung und Tumorgenese.....</i>	16
1.5	<i>Lipidmetabolismus.....</i>	19
1.5.1	Cholesterolfstoffwechsel.....	19
1.5.2	LDL-Rezeptor.....	20
1.6	<i>Atherosklerose.....</i>	22
1.7	<i>Tiermodelle der Atherosklerose.....</i>	25
2	Zielstellung der Arbeit.....	27
3	Material und Methoden.....	28
3.1	<i>Material.....</i>	28
3.1.1	Mausstämme.....	28
3.1.2	Primer.....	28
3.1.3	Geräte, Chemikalien und Software.....	30
3.2	<i>Methoden.....</i>	30
3.2.1	Tierhaltung.....	30
3.2.2	Generierung der Doppel- <i>knockout</i> -Mäuse.....	30
3.2.3	Probengewinnung.....	31
3.2.4	Präparation genomischer DNA und RNA aus Geweben.....	33

3.2.5	Genexpressionsanalysen	34
3.2.6	Bestimmung der Lipid- und Proteinparameter im Serum	42
3.2.7	Histologie.....	42
3.2.8	Statistische Auswertung	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	<i>Tumorentstehung/Regeneration in der Leber der Atp7b^{-/-}-Maus</i>	<i>45</i>
4.1.1	Herkunft der Lebertumore	45
4.1.2	Mechanismus der Tumorentstehung	47
4.2	<i>Lipidstoffwechsel im Mausmodell.....</i>	<i>55</i>
4.2.1	LDLR ^{-/-} Atp7b ^{-/-} -Maus	55
4.2.2	Atherosklerose.....	70
4.3	<i>Morbus-Wilson-Patienten.....</i>	<i>74</i>
4.3.1	Expression tumorassoziierter Gene in der Leber von Morbus-Wilson-Patienten	74
4.3.2	Lipidmetabolismus in Morbus-Wilson-Patienten	75
5	Diskussion	78
5.1	<i>Tumorentstehung.....</i>	<i>79</i>
5.1.1	Tumorcharakterisierung	79
5.1.2	Mechanismen der kupferinduzierten Tumorentstehung	82
5.2	<i>Auswirkungen der Kupferakkumulation auf den Lipidstoffwechsel.....</i>	<i>87</i>
5.2.1	Charakterisierung der LDLR ^{-/-} Atp7b ^{-/-} -Maus	88
5.2.2	Serumcholesterolgehalt der LDLR ^{-/-} Atp7b ^{-/-} -Maus	89
5.2.3	Entstehung atherosklerotischer Läsionen in LDLR ^{-/-} Atp7b ^{-/-} -Mäusen	90
5.2.4	Situation im Morbus-Wilson-Patienten.....	92
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	94
7	Anhang.....	97

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
A	Adenin
AFP	α -Fetoprotein
Ag	Silber
AMV	„avian myeloblastosis virus“
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
AT	„annealing“ Temperatur
ATOX1	„anti-oxidant protein 1“
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Brachiocephalarterie (<i>Truncus brachiocephalicus</i>)
Bcl	„B-cell CCL/lymphoma“
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	centi-
JUN	„JUN proto-oncogene“
C/EBP- α	„CCAAT/enhancer binding protein α “
CC	„cholangiocellular carcinoma“/Cholangiokarzinom
CCS	„copper chaperone for superoxide dismutase“
Cd	Cadmium
Cdc42	„cell division cycle 42“
cDNA	„complementary“ DNA
CEACAM	„carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule“
Chol	Cholesterol
CK1	„Casein kinase 1“
COMMD1	„copper metabolism (<i>Murr1</i>) containing domain1“
COX17	„cytochrome c oxidase assembly homolog“
CTR1	„copper transporter 1“
Cu	Kupfer

Abkürzungsverzeichnis

d.h.	das heißt
DA	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DKK3	Dickkopf 3
DKO	Doppel-„knock-out“
DNA	„ <i>deoxyribonucleic acid</i> “/ Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
dsDNA	„ <i>double strand</i> “ DNA
EPCAM	„ <i>epithelial cell adhesion molecule</i> “
ER	<i>endoplasmatisches Reticulum</i>
et al.	<i>et alii</i> / und andere
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
G	Guanin
x g	Erdbeschleunigung
H ₂ O	Wasser
HCC	„ <i>hepatocellular carcinoma</i> “/ Leberzellkarzinom
HDL	„ <i>high density lipoprotein</i> “
HE	Hämatoxylin(Hämalaun)/Eosin
HMGCR	HMG-CoA Reduktase
HMGCS	HMG-CoA Synthetase
HPC	„ <i>hepatic precursor cell</i> “ / hepatische Vorläuferzelle
ICAM 1	„ <i>intercellular adhesion molecule</i> “
Idi1	Isopentenyl-diphosphat-delta-Isomerase 1
IFN- γ	Interferon γ
IPA	„ <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> “
k	kilo-
KO	„ <i>knockout</i> “
l	Liter
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	„ <i>low density lipoprotein</i> “
m	Meter
m	milli-

Abkürzungsverzeichnis

MCP-1	„ <i>monocyte chemotactic protein 1</i> “
MCS-F	„ <i>Macrophage colony stimulating factor</i> “
MBD	Metallbindungsdomäne
min	Minute
MMP7	Matrixmetallopeptidase 7
mRNA	„ <i>messenger</i> “ RNA
MTF-1	„ <i>metal-regulatory transcription factor 1</i> “
n	nano-
NFκB	„ <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i> “
Ni	Nickel
OD	optische Dichte
Pb	Blei
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “/ Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “/ Polymerasekettenreaktion
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PTEN	„ <i>phosphatase and tensin homolog</i> “
RIN	„ <i>RNA integrity number</i> “
RMA	„ <i>Robust Multi-Array Average</i> “
RNA	„ <i>ribonucleic acid</i> “/ Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SMAD4	„ <i>SMAD family member 4</i> “
SOD	Superoxiddismutase
sog.	sogenannt
SOX4	„ <i>SRY (sex determining region Y)-box 4</i> “
SPP-1	„ <i>secreted phosphoprotein 1</i> “
Sqle	Squalen Epoxidase
ssDNA	„ <i>single strand</i> “/ Einzelstrang-DNA
T	Tyrosin
TAE	Tris-Acetat-Laufpuffer
TG	Triglyceride
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk

Abkürzungsverzeichnis

TM	Transmembrandomäne
TMEM45	Transmembranprotein 45
TU	Tumor
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
V-CAM 1	<i>„vascular cell adhesion molecule 1“</i>
VEGFc	<i>„vascular endothelial growth factor c“</i>
VLDL	<i>„very low density lipoprotein“</i>
WD	<i>„Wilson disease“</i> / Morbus Wilson
WNT	<i>„wingless-type MMTV integration site family“</i>
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink
β -TrCP	<i>„β-transducin repeat containing protein“</i>
μ	-mikro

1 Einleitung

1.1 Kupfer

Kupfer ist ein essentieller Nahrungsbestandteil und nach Eisen und Zink das dritthäufigste Spurenelement im menschlichen Körper.[1] Der adulte menschliche Organismus enthält 80-100mg Kupfer, im Vergleich dazu jedoch ca. 4g Eisen.[2], [3] Kupfer (Cu) ist ein wichtiger Cofaktor vieler Enzyme und Transkriptionsfaktoren. Es spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, im Bindegewebsaufbau, bei der Blutbildung, in den Blutgefäßen und im Nervensystem. Oxidoreduktasen sind Enzyme, in welchen Kupfer allein, oder zusammen mit anderen Metallen, wie z.B. Zink, Bestandteil des katalytischen Zentrums ist. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Zellatmung (Cytochrom-Oxidase), Detoxifikation freier Radikale (Cu/Zn-Superoxiddismutase), der Melaninsynthese (Tyrosinase), zellulären Eisenaufnahme (Ceruloplasmin/ Ferrooxidase) und der Bildung von Bindegewebe (Lysin-Oxidase). All diese Funktionen basieren auf der wichtigen Eigenschaft von Kupfer in zwei Redoxzuständen vorzukommen: als Cu^{1+} und als Cu^{2+} . [1], [4] Wie andere Metallionen, welche verschiedene Oxidationszustände besitzen, kann auch Kupfer an Transkriptionsfaktoren (z.B. *metal-regulatory transcription factor 1*, MTF-1) binden, und beeinflusst so die Expression verschiedener Gene.[5], [6] Die Kupferbalance muss in sehr engen Grenzen reguliert werden, denn schon in geringem Überschuss wirkt Kupfer zytotoxisch. Dennoch muss eine ausreichende Kupferversorgung für die Aufrechterhaltung der enzymatischen Funktionen gewährleistet sein. Kupfer wird in geringen Mengen im Magen, aber vor allem im Duodenum und oberen Jejunum aus der Nahrung resorbiert. Pro Tag werden etwa 1 - 2mg Kupfer aufgenommen, welches in vergleichbarer Menge über die biliäre Ausscheidung wieder abgegeben wird.[1] Die Kupferaufnahme erfolgt zum Teil durch Diffusion, aber auch durch aktiven Transport (durch das Transportprotein *copper transporter 1*, CTR1) in die Enterozyten. Von dort aus erfolgt die Distribution des Kupfers im Blutkreislauf über verschiedene *carrier*, wie z. B. Albumin, Transcuprein und zum Teil auch Aminosäuren.[7] Die Leberzelle spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Kupferbalance. CTR1 vermittelt auch in Hepatozyten den Kupfertransport aus dem Blut in die Zelle. Dort bindet Kupfer an spezifische Chaperone, welche die Zelle vor der schädlichen Redoxwirkung freien

Kupfers schützen. Die Chaperone transportieren Kupfer in die verschiedenen Zellkompartimente, wo es in Enzyme eingebaut wird. Das Chaperon Cox17 (*cytochrome c oxidase assembly homolog*) leitet Kupfer in die Mitochondrien (Cytochrom-C-Oxidase), CCS (*copper chaperone for superoxid dismutase*) vermittelt den Cu-Einbau in die Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD) und das Chaperon Atox1 (*anti-oxidant protein 1*) transportiert Cu zur Kupfertransport-ATPase ATP7B. ATP7B wiederum spielt eine entscheidende Rolle in der Einhaltung der Kupferbalance. Es ist im Golgi-Apparat (trans-Golgi-Netzwerk - TGN) lokalisiert und vermittelt dort die Bindung von Kupfer an Apo-Ceruloplasmin. Das Kupfer enthaltende Holo-Ceruloplasmin wird über Vesikel in das Blutplasma sezerniert. Eine weitere wichtige Funktion des Proteins liegt darin, überschüssiges Kupfer der biliären Ausscheidung zuzuführen. Dazu findet ein sog. intrazelluläres Protein-*trafficking* statt, während dessen ATP7B in Kupfer-beladenen sekretorischen Vesikeln vom TGN zu den Gallenkapillaren migriert. ATP7B ist gebunden an COMMD1 (*copper metabolism (Murr1) containing domain1*), welches an der Regulation von Funktion und Degradation des Proteins beteiligt ist (Abbildung 1).[8]

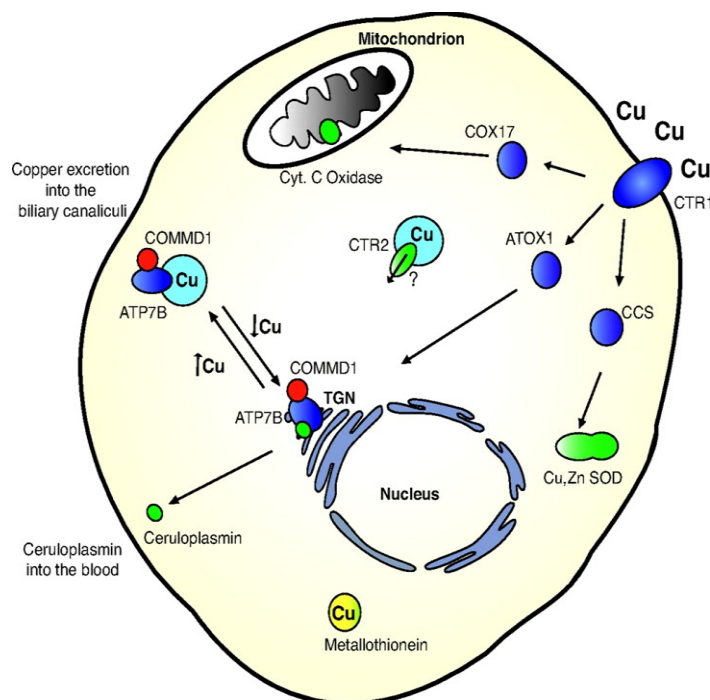


Abbildung 1 Kupfer-Homöostase in Hepatozyten. Die Aufnahme von Kupfer erfolgt über das Transportprotein CTR1. In der Zelle wird Kupfer durch Chaperone (COX17, ATOX1, CCS) an die Bestimmungskompartimente verteilt. ATP7B ist im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert und transportiert Kupfer in das TGN-Lumen, dort wird es in Ceruloplasmin eingebaut, welches ins Blutplasma abgegeben wird. Bei hohen Kupferkonzentrationen kommt es zu einem ATP7B-*trafficking* in zytoplasmatischen Vesikeln zu den Gallenkapillaren, welches von COMMD1 vermittelt wird. Auf diese Weise wird Kupfer in die Galle abgegeben und aus dem Körper ausgeschieden.[9]

1.2 Rolle des ATP7B-Proteins im Kupfertransport

ATP7B wird von einem 79kb großen Gen auf Chromosom 13 kodiert und gehört zu den P₁-Typ-ATPasen.[10] P₁-Typ-ATPasen transportieren Übergangsmetalle (Cu⁺, Ag²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺) und können noch einmal nach ihrer Spezifität unterteilt werden. ATPasen, welche monovalentes Kupfer transportieren sind sehr selektiv für ihr Substrat. Zu diesen ATPasen gehört auch ATP7B, ein 165 kDa großes intrazelluläres Membranprotein.[11] P₁-Typ-ATPasen besitzen 8 Transmembrandomänen (TM), wobei TM6 ein hoch konserviertes CPC-Motiv beinhaltet. TM7 beinhaltet ein YN-Motiv, welches typisch für Kupfertransporter ist. Am N-Terminus befinden sich 6 zytoplasmatische Metallbindungsdomänen (MBD), jede besteht aus ca. 70 Aminosäuren und besitzt das hoch konservierte GMxCxxC-Motiv. Zwischen TM6 und TM7 befindet sich ein großer intrazellulärer Loop, der die ATP-Bindungsdomäne enthält. Dieser Loop unterteilt sich in die N (Nukleotid)-Domäne und die P (Phosphorylierungs)-Domäne (Abbildung 2A).[12], [13] Die erforderliche Energie für den Transport des Kupfers durch die Membran wird aus der ATP-Hydrolyse gewonnen. Nach Bindung von Cu¹⁺ an die MBD und ATP an der N-Domäne wird das γ-Phosphat des ATP auf den Aspartatrest des DKTG-Motivs in der P-Domäne übertragen. Mit Dephosphorylierung des Aspartats wird Cu⁺ auf der anderen Seite der Membran freigesetzt und das Protein kehrt in seine anfängliche Konformation zurück (Abbildung 2B).[14–16]

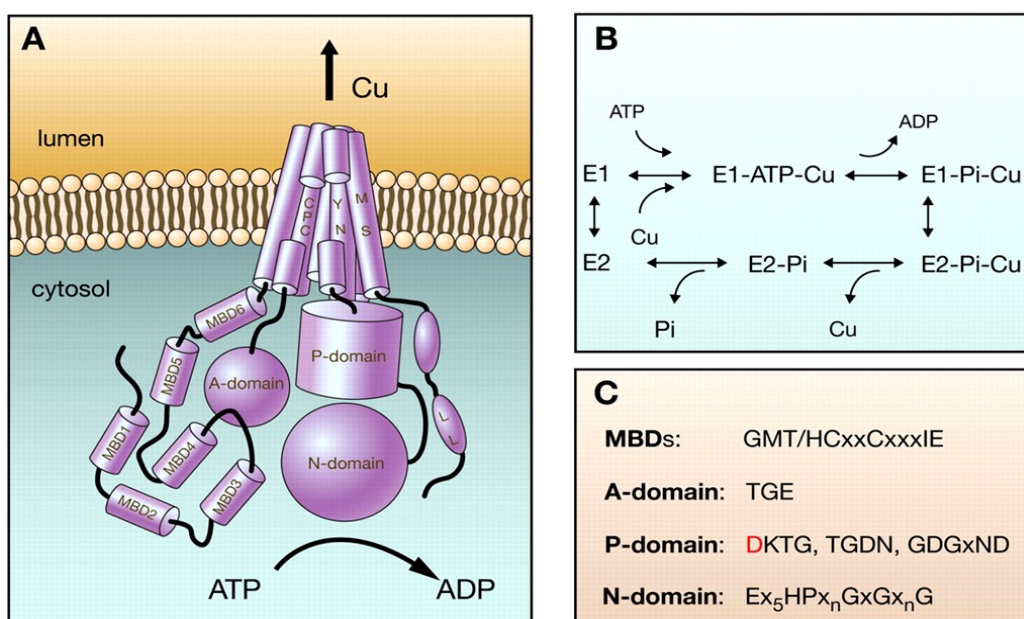


Abbildung 2 ATP7B. A – Struktur des Proteins; B – der katalytische Zyklus des Kupfertransports; C – wichtige konservierte Motive in den zytoplasmatischen Domänen.[14]

ATP7B wird fast ausschließlich in der Leber, im Gehirn und der Plazenta exprimiert. Auf subzellulärer Ebene ist ATP7B im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert.[14] Die Aktivität und Lokalisation des Proteins wird u. a. maßgeblich durch die Bindung von Cu^+ kontrolliert. Mit steigenden Kupferspiegeln kommt es zum Protein-*trafficking* in Vesikeln zur Zellperipherie.[17], [18] Die Hauptaufgaben des Proteins sind der Transport von Kupfer über Zellmembranen zur Sekretion über Ceruloplasmin in das Blut und Transport in periphere Organe, bzw. die Ausscheidung überschüssigen Kupfers über die Galle. In der Embryonalentwicklung nimmt ATP7B wahrscheinlich eine protektive Rolle ein, indem es überschüssiges Kupfer über die apikale Oberfläche der Plazenta zurück in die maternale Zirkulation transportiert.[19], [20] Es existiert ein alternatives Spleißprodukt des *ATP7B*-Gens, die *pineal night specific ATPase* (PINA). Die Transkription dieser ATPase wird von einem *downstream*-Promotor im *ATP7B*-Gen kontrolliert. PINA wird in der Epiphyse und Retina exprimiert und unterliegt einer diurnalen Expressionsänderung.[21] In allen anderen Geweben (außer der Leber) wird die Kupfersekretion aus der Zelle über ATP7A vermittelt. ATP7A ist ATP7B in seiner Struktur sehr ähnlich, es zeigt aber während des Cu-abhängigen *trafficking* ein anderes Verhalten. ATP7A wandert in polarisierten Zellen (z.B. in Enterozyten) unter erhöhten Kupferkonzentrationen an die basolaterale Membran.[22] Diese spezifische Migration des ATP7A wird durch ein PDZ-Bindungsmotiv am C-Terminus vermittelt.[23]

1.3 Erkrankungen bei gestörter Kupferbalance

Wie bereits erwähnt, ist es für den Organismus von größter Bedeutung, den Kupferhaushalt im Gleichgewicht zu halten. Ein Mangel oder Überschuss an Kupfer kann beträchtliche Folgen haben. Morbus Menkes und Morbus Wilson sind zwei Erkrankungen, welche diese wichtige Bedeutung widerspiegeln.

1.3.1 Morbus Menkes

Morbus Menkes ist eine X-Chromosom gekoppelte letale hereditäre Erkrankung, welche mit Kupfermangel einhergeht. Ursache sind Mutationen des Kupfer-Transportproteins ATP7A. Dieses Protein wird in allen Zellen des Organismus mit Ausnahme der Leber exprimiert und ist für die Kupferdistribution im Körper

verantwortlich.[24] Die Krankheit manifestiert sich in progressiver Neurodegeneration, pathologischen Veränderungen des Bindegewebes und abnormem Haar, dem sog. *kinky hair*.

1.3.2 Morbus Wilson

Der aus Kupferüberladung resultierende Morbus Wilson manifestiert sich in hepatischen und neurologischen Störungen, daher auch das Synonym „hepatolentikuläre Degeneration“. Die Symptome dieser autosomal-rezessiv vererbten Krankheit wurden 1912 von Samuel Alexander Kinnier Wilson beschrieben.[25] Die Kupferakkumulation als Ursache für diese Erkrankung, wurde 1948 entdeckt.[26] Den autosomal-rezessiven Erbgang beschrieb Bearn 1953 und das mit Morbus Wilson assoziierte Gen wurde 1993 identifiziert und kloniert.[27–30] Inzwischen sind mehr als 500 verschiedene Genmutationen als Ursache für Morbus Wilson bekannt (www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp). Bisher wurde nur bei wenigen dieser Mutationen die Wirkweise aufgedeckt. In Europa ist die häufigste Mutation die H1069Q Punktmutation in Exon 14 (ein Histidin ist im Protein an der Stelle 1069 gegen ein Glutamin ausgetauscht). Dieser Austausch führt zu Defekten in der katalytischen Phosphorylierung und das Protein ist nicht korrekt lokalisiert (es verbleibt im endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird nicht in das TGN transportiert).[31], [32] Die Kupfertransportfunktion des Proteins ist aufgehoben.[33] Die Manifestation der Erkrankung variiert sehr stark. Epigenetische Faktoren (z.B. Kupferaufnahme aus der Umwelt) spielen bei der Ausprägung der Symptome außerdem eine wichtige Rolle. Generell lassen sich zwei Formen des Morbus Wilson unterscheiden: eine hepatische und eine neurologische Form. In beiden Fällen setzen die Symptome nach einigen Lebensjahren ein, wobei die hepatische Form meist früher beginnt (Erstvorstellung i. d. R. im Alter von 8 bis 18 Jahren) als die neurologische Form und Mischformen (Erstvorstellung meist im Alter von 20 bis 29 Jahren).[34], [35] Die hepatischen Symptome umfassen ein breites Spektrum, von erhöhten Leberwerten, Vergrößerung der Leber, chronischer Hepatitis mit Steatose und Fibrose bis hin zu Leberzirrhose und (akutem) Leberversagen. Die Entstehung von Lebertumoren ist bei Morbus Wilson Patienten ebenfalls beschrieben.[36] Die Symptome der neurologischen Form betreffen vor allem motorische Funktionen. Tremor, Steifheit, Dystonie und Bradykinesie werden beobachtet. Auch psychiatrische

Symptome, wie Aufmerksamkeitsdefizite, Depressionen und Psychosen treten auf. In 95% aller neurologischen Ausprägungen, jedoch nur in 50 - 60% der hepatischen Verlaufsfälle tritt zudem der Kayser-Fleischer-Ring in der Cornea auf. Granuläre Kupferablagerungen sind verantwortlich für das Erscheinen dieses rötlich-braunen Rings am äußeren Rand der Cornea.[37] Die Diagnose des Morbus Wilson wird häufig sehr spät gestellt (vor allem bei neurologischen Verlaufsformen), was die Behandlung erschwert. Früh erkannt (möglichst in der asymptomatischen Phase, z.B. durch Geschwister-Screening) ist der Morbus Wilson sehr gut behandelbar. Die bereits vorhandenen Symptome bleiben jedoch irreversibel bestehen. Die Diagnose kann bei Auftreten des Kayser-Fleischer-Rings, niedrigen Serum-Ceruloplasminwerten und hohen Kupferkonzentrationen im Urin gestellt werden. Auch ein Radiokupfertest oder die genetische Analyse spielen besonders beim Geschwister-Screening oder unklaren Fällen eine wichtige Rolle.[38–40] Eine Heilung der Krankheit kann nur bei der hepatischen Form durch eine Lebertransplantation erreicht werden, doch diese ist meist nur in Fällen, in denen es zu einem akuten Leberversagen oder einer Leberzirrhose im Endstadium kommt, nötig. Bei der neurologischen Verlaufsform ist der Nutzen einer Lebertransplantation umstritten. Durch Medikamente (Kupferchelatoren und Zinksalze) können sehr gute Therapieerfolge erzielt werden. In Zukunft könnten Gen- und Stammzelltherapien eine bedeutende Rolle spielen. In Tiermodellen wurden diese beiden Strategien effektiv zur Reduktion der klinischen Zeichen eingesetzt.[35], [41], [42] Im Allgemeinen haben Patienten mit hepatischen Verlaufsformen eine bessere Prognose, da die Diagnose in diesen Fällen oft früher gestellt wird.[43], [44]

1.3.3 Tiermodelle des Morbus Wilson

Gegenwärtig sind vier Tiermodelle zur hepatischen Kupferakkumulation in Verbindung mit einem defekten *Atp7b*-Gen bekannt. Drei Modellorganismen sind auf spontane Mutationen [*toxic-milk*-Maus, *txl*-Maus, *Long-Evans Cinnamon* (LEC)-Ratte] zurückzuführen und sind genetisch nicht komplett charakterisiert, während ein genetisch modifiziertes Modell, die *Atp7b*^{-/-}-Maus auf einem definierten Hintergrund basiert. Allen vier Modellen ist ein *Atp7b*-Gendefekt, verbunden mit hepatischen Schädigungen, gemeinsam.

1.3.3.1 *Toxic-milk-/ txⁱ-Maus und Long-Evans Cinnamon (LEC)-Ratte*

Bei der *toxic-milk*-Maus ist im *Atp7b*-Gen an der Stelle 4066 ein Basenaustausch identifiziert worden (A4066G). Diese spontane Punktmutation führt zu einem Austausch der Aminosäuren im Protein an der Stelle 1356, Valin wird statt Methionin eingebaut (met1356val). Dies führt zu einem Funktionsverlust des *Atp7b*-Proteins bei korrekter Lokalisation im Golgi Apparat.[45] Unabhängig von dieser Maus trat im „*Jackson Laboratory*“ ebenfalls eine zufällige *missense*-Mutation auf, welche sich jedoch von der *toxic-milk* Maus unterscheidet (DNA-Variation: G2135A; Protein: gly712asp). Daher die Bezeichnung *txⁱ*-Maus. Der Name *toxic milk* basiert auf der Beobachtung, dass viele Jungtiere versterben. Durch die fehlerhafte Lokalisation des ATP7B in den Azinuszellen der Milchdrüsen, ist die Kupferkonzentration der Milch zu gering. Die Jungtiere sterben also durch Kupfermangel.[46] Die *Long-Evans Cinnamon (LEC)*-Ratte hat eine 300bp lange Deletion am 3' Ende des *Atp7b*-Gens, welche in der Fehllokalisierung des Proteins im ER resultiert.[10] LEC-Ratten weisen eine Kupferakkumulation besonders im ER auf, woraus sich schließen lässt, dass *Atp7b* in LEC-Ratten exprimiert wird, jedoch durch das Fehlen des Translokationsignals im ER verbleibt.[47]

Überleben die Jungtiere die ersten Wochen (z.B. durch Säugung eines Ammentiers), kommt es in allen drei Modellen zu einer Akkumulation von freiem Kupfer in der Leber und daraus resultierenden Leberschäden. Neurologische Morbus-Wilson-Manifestationen, wie sie häufig in Patienten beobachtet werden, wurden bisher nur in *toxic-milk*-Mäusen beschrieben. Kupfer akkumuliert im Striatum und Hippocampus. Im Vergleich zum Wildtyp weist die *toxic-milk*-Maus schlechtere Leistungen im Rotarod- und Zylinder-Test auf. Außerdem war sie nicht in der Lage ein räumliches Gedächtnis im „*Morris-Water-Maze*“ aufzubauen.[48] Die *Atp7b* mRNA ist in normalen Mengen in den Zellen vorhanden.[49] Da in diesen Tieren das 3'-Ende von der Mutation betroffen ist, kann das alternative Spleißprodukt des *Atp7b*-Gens, PINA, ebenfalls vom Funktionsverlust betroffen sein.[50]

1.3.3.2 *Atp7b^{-/-}-Maus*

Buiakova *et al.* generierten 1999 einen Mausstamm, welcher eine homozygote Mutation im *Atp7b*-Gen besitzt. Die Mutation der *Atp7b^{-/-}*-Maus führt zu einem

alternativen Spleißen und einhergehender Deletion des Exons 2, welches den N-Terminus und einige Metallbindungsstellen des Gens kodiert. In dieser Maus kann das vollständige Protein nicht mehr nachgewiesen werden. PINA, das physiologische, alternative Spleißprodukt des *Atp7b*-Gens in Retina und Epiphyse hingegen ist nicht von der Mutation betroffen. Analog zu den *tx*- und *tx'*-Mäusen erzeugen homozygote *Atp7b*^{-/-}-Mäuse in der Regel weniger Nachkommen. Die *knockout* (KO)-Jungen sind kleiner und leichter als Nachkommen des Wildtyps (WT). Außerdem haben die KO-Jungen bei der Geburt sehr viel geringere Kupfergehalte in der Leber als WT-Junge. Bis zu einem Alter von ca. 2 Monaten steigt die Kupferserumkonzentration der KO-Mäuse jedoch dramatisch an und sinkt danach wieder etwas ab, verbleibt aber immer noch 20x höher als im WT.[51], [52] Die Serumkupfer-Konzentration ist in den KO-Mäusen im Alter von 6 Wochen vergleichbar der des WT, mit steigendem Alter nimmt jedoch auch diese um mehr als das Doppelte, verglichen mit dem WT, zu. Die Kupferakkumulation, besonders in der Leber, führt zur Progression von Leberschäden. Im Alter von 6 Wochen ist lichtmikroskopisch noch keine bzw. nur eine milde Ausprägung der Schäden zu erkennen. Im elektronenmikroskopischen Bild hingegen zeigen sich erweiterte Gallengänge, deformierte Mitochondrien und Mikrosteatosen der Hepatozyten. Mit 20 Wochen sind die kupferbedingten Schädigungen des Lebergewebes sowohl makroskopisch als auch lichtmikroskopisch sehr gut zu erkennen. Die Hepatozyten sind vergrößert, pleiomorphe Nuklei und nekrotische Zellen sind sichtbar. Im weiteren Verlauf kommt es zu zwei gegensätzlichen Prozessen, zum Einen bilden sich regenerative Knoten, in welchen das normale Parenchym wiederhergestellt ist. Zum anderen kommt es zu einer neoplastischen Proliferation. Die Zellen zeigen eindeutige Anzeichen einer Tumorentstehung, wie zum Beispiel einer hohen Kern-zu-Plasma-Relation, Depolarisierung und Dysplasie (Abbildung 3).[52]

Die Kupferakkumulation hat einen Einfluss auf die Genexpression in der *Atp7b*^{-/-}-Maus. Insbesondere die Expression von Genen, welche mit dem mitotischen Zellzyklus und dem Lipidstoffwechsel, besonders der Cholesterolsynthese, assoziiert sind, ist verändert. Die mRNA von 9 Genen der Cholesterolsynthese ist signifikant herunterreguliert, darunter regulatorische Proteine und wichtige Enzyme, wie z.B. die HMG-CoA-Reduktase, das Enzym, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolsynthese katalysiert. Dies schlägt sich im Cholesterolgehalt der

Leber und des Serums dieser Mäuse nieder, 6 Wochen alte *Atp7b*^{-/-}-Mäuse haben signifikant weniger Cholesterol in der Leber und im Serum als WT-Mäuse.[53]

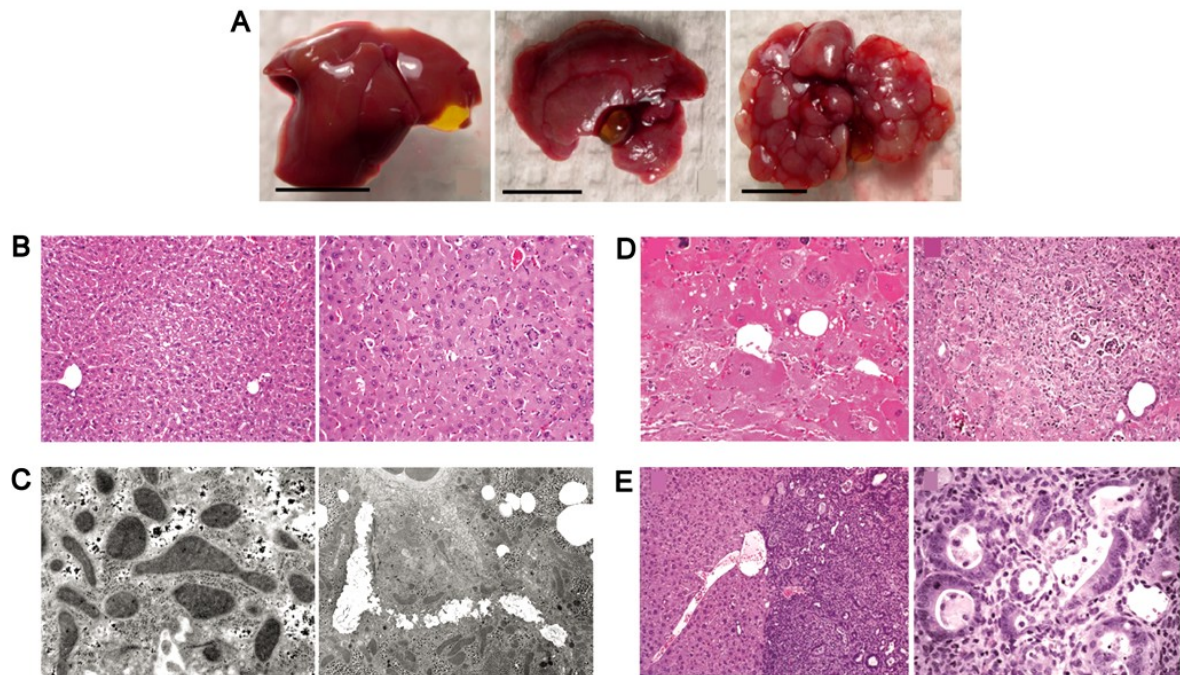


Abbildung 3 Folgen der Kupferakkumulation in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus. A – Leber einer WT-Maus (links) im Vergleich zu einer 20 (Mitte) und 40 Wochen (rechts) alten *Atp7b*^{-/-}-Maus. B – HE-Färbung, Lichtmikroskopische Darstellung der Leber 6 Wochen alter Mäuse: 4 von 8 Mäusen zeigten keine auffälligen Veränderungen (links), die anderen 4 Tiere hatten vergrößerte Hepatozyten, Anzeichen von Nekrose und Entzündungszeichen (rechts). C – Elektronenmikroskopische Aufnahme der Leber von 6 Wochen alten Tieren: vergrößerte, abnormal geformte Mitochondrien (links) und proliferierende Gallengänge (rechts). D – Lichtmikroskopische Aufnahmen der HE-gefärbten Leber von 12-20 Wochen alten Tieren zeigten Entzündung und Nekrose von stark vergrößerten Hepatozyten mit deformierten Zellkernen (links) sowie Gallengangserweiterungen und chronische Entzündungsherde (rechts). E – 2 Prozesse werden in den lichtmikroskopischen Aufnahmen der Leber von 28 - 44 Wochen alten Tieren sichtbar: Regeneration des normalen Parenchyms und neoplastische Proliferation (links). Starke lokale Proliferation der Gallengänge und akute Entzündungen sind charakteristisch für die Herde mit neoplastischer Proliferation (rechts).(modifiziert nach [52])

1.4 Chronische Entzündung und Tumorgenese

Bereits 1863 stellte Virchow die Hypothese auf, dass Orte chronischer Entzündung besonders anfällig für die Entstehung von Karzinomen sind. Dies basiert auf der Beobachtung, dass chronische Entzündung ausgelöst durch Schadstoffe eine erhöhte Zellproliferation bedingen.[54] Dvorak beschrieb Tumore als „Wunden, welche nicht heilen“, da er bedeutende Ähnlichkeiten im proliferierenden Gewebe heilender Hautwunden und dem Stroma von Tumoren fand.[55] Neuere Erkenntnisse bestätigen jedoch, dass proliferierende Zellen allein, nicht die Ursache der Karzinogenese sind, vielmehr ist es die Umgebung, welche durch pro-inflammatorische Mediatoren, DNA-

schädigende Komponenten und Wachstumsfaktoren das Risiko für neoplastische Vorgänge erhöht.[56] Der Einfluss chronischer Entzündung auf die Karzinogenese ist zweiseitig: Zum einen werden an Orten chronischer Entzündung vermehrt *reactive oxygen species* (ROS) gebildet, während gleichzeitig das zelleigene Redox-System, welches diese ROS unschädlich machen soll, gehemmt wird. Zum anderen werden vermehrt pro-inflammatorische Mediatoren, wie z.B. Zytokine und Chemokine gebildet. Diese stören das Gleichgewicht der zellulären Signalwege, sodass es zur Aktivierung von Wachstumsprozessen und Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition kommt. Gleichzeitig werden Tumorzellen so modifiziert, dass sie der allgemeinen Immunantwort „entkommen“ können (Abbildung 4).[57]

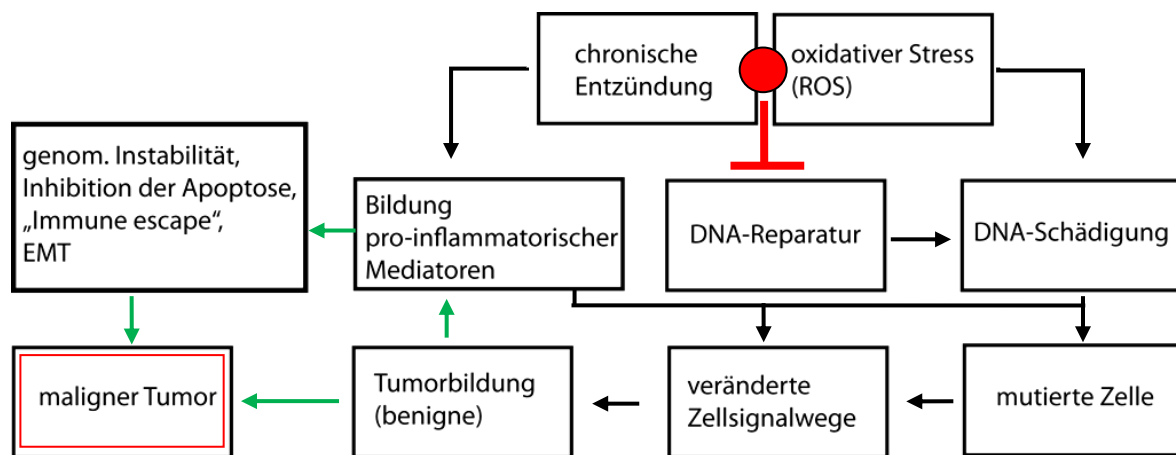


Abbildung 4 Zusammenfassung der Vorgänge zur Tumorentstehung aus chronischer Entzündung. Schwarze Pfeile markieren extrinsische Prozesse, grüne intrinsische Prozesse der Zelle.(modifiziert nach[57])

Auch die Entstehung hepatozellulärer Karzinome (HCC) aus einer chronischen Hepatitis ist belegt. Mehr als 90% aller HCC entstehen aus dieser Situation heraus. Auslöser für ein HCC ist hauptsächlich die virale Hepatitis aufgrund einer Hepatitis B- oder Hepatitis C-Virus-Infektion. Aber auch eine Hämochromatose, alkoholische Steatohepatitis (ASH) oder die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) sind Auslöser der Karzinogenese. Durch die Regeneration des Leberparenchyms während einer Hepatitis kann es zu mutagenetischen Prozessen kommen, welche durch die Bildung von ROS in den Entzündungsherden erleichtert wird.[58] Die genauen Mechanismen der Tumorentstehung in der Leber sind noch immer nicht aufgeklärt. Eine besondere Rolle in der Entstehung hepatozellulärer Karzinome kommt den Signalwegen der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor κ B*) und STAT3 (*signal transducer and activator of transcription, family member 3*) zu. Obwohl der NF- κ B-

Signalweg eine zweiseitige Rolle zu spielen scheint, ist die Wirkung im Zusammenspiel mit dem STAT3-Signalweg und der daraus resultierenden IL6-Expression ein wichtiger Bestandteil der hepatozellulären Karzinogenese.[59] Die stressinduzierte Aktivierung der Familie der MAPK (*mitogen activated kinases*) spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der hepatozellulären Karzinogenese. Von besonderer Bedeutung sind hier die durch Stress-Stimuli aktivierten Signalwege JNK und p38. Die JNK-Kaskade wirkt fördernd auf die Progression des Tumors durch Aktivierung der Cyclin D1 und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) Expression. Das p38-Signaling ist ein antiproliferativer Mediator der hepatozellulären Karzinogenese. Ist dieser Signalweg aktiviert kommt es zur Expression verschiedener Tumorsuppressorgene, wie z. B. p53.[58]

Der Wnt-Signalweg spielt in der hepatischen Tumorgenese eine entscheidende Rolle. Ungefähr 60% aller hepatozellulären Karzinome weisen eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs auf. Die physiologische Bedeutung des Wnt-Signalwegs liegt vor allem in embryonalen Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Im adulten Organismus spielt er eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebs-Homöostase. Die Schlüsselkomponenten dieses Signalwegs sind die Genfamilie der Wnt-Liganden und deren Rezeptoren, die *Frizzled* (FZD)-Transmembranproteine. Im kanonischen Wnt-Signalweg wird das Signal intrazellulär über β -catenin vermittelt. Nach Bindung eines Wnt-Liganden an den Rezeptor wird β -catenin stabilisiert und akkumuliert im Zytoplasma. Nach Translokation in den Zellkern vermittelt β -catenin die Aktivierung der Transkription durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Genfamilie, und damit die Expression von Genen der Zellzykluskontrolle (z. B. Cyclin D1) aber auch der Onkogene cMyc und JUN.[60], [61]

1.5 Lipidmetabolismus

1.5.1 Cholesterolfstoffwechsel

Cholesterolf ist wichtiger Bestandteil biologischer Membranen, außerdem ist es Vorläufer für die Produktion von Gallensalzen und Steroidhormonen. Fast 50% des mit der Nahrung aufgenommenen Cholesterols wird im Dünndarm absorbiert und in den Enterozyten in Lipoproteine, v. a. Chylomikronen verpackt. Von dort wird es zur Leber transportiert. Cholesterolf wird jedoch auch zu großen Mengen *de novo* synthetisiert, wobei in der Leber ca. 10% und in den Zellen des Darms ca. 15% des Gesamtcholesterols synthetisiert wird. Die Cholesterolsynthese findet im Zytoplasma und im endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Mevalonat-Syntheseweg statt. Das Ausgangsprodukt ist Acetyl-CoA. Insgesamt sind 30 Schritte zur Cholesterolsynthese nötig. Die 5 wesentlichen Schritte sind in Abbildung 5 dargestellt: Acetyl-CoA wird zu HMG-CoA und weiter in Mevalonat umgewandelt. Die Reaktion der HMG-CoA-Reduktase ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesterolsynthese. Mevalonat wird zu Isopentenyl-Pyrophosphat und weiter zu Squalen umgewandelt. Aus Squalen wird Lanosterol und schließlich Cholesterolf gebildet. Überschüssiges Cholesterolf wird verestert und v. a. in Hepatozyten gespeichert oder über die Galle ausgeschieden.[62], [63]

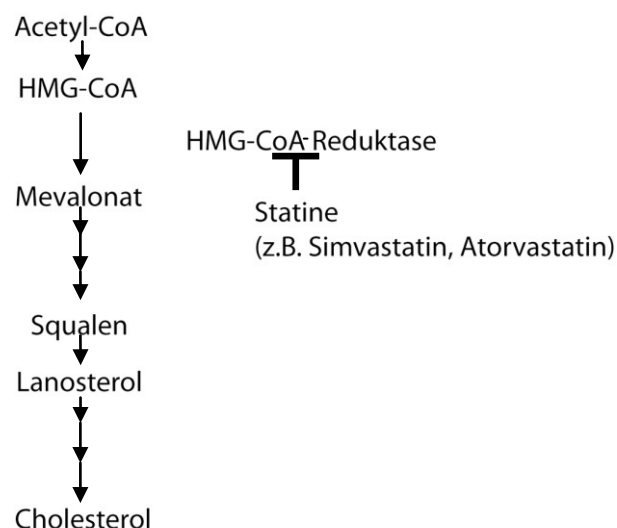


Abbildung 5 De-novo Cholesterolsynthese über den Mevalonat-Weg. Cholesterolf wird ausgehend von Acetyl-CoA über den Mevalonat-Weg synthetisiert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktion ist die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat durch die HMG-CoA-Reduktase. An diesem Punkt greift eine Klasse von Serumcholesterolf-senkenden Therapeutika, die Statine, wie z.B. Simvastatin, Atorvastatin, an.(modifiziert und vereinfacht nach [63])

Der Transport von Cholesterol aus der Leber zu peripheren Organen findet in Lipid-Protein-Komplexen, sog. Lipoproteinen, statt. In der Leber werden *very-low-density*-Lipoproteine (VLDL) gebildet, welche durch die endothelassoziierte Lipo-protein-Lipase in *low-density*-Lipoproteine (LDL) umgewandelt werden. LDL kann aus dem Plasma durch den LDL-Rezeptor in die Zellen aufgenommen werden. Dort wird LDL hydrolisiert, die Proteine abgebaut und die Cholesterolester verwendet.[64] Erhöhte Serumcholesterolspiegel in Form von VLDL und LDL sind ein Risikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose, der Ursache vieler kardiovaskulärer Erkrankungen. Durch den reversen Cholesteroltransport kann peripheres Cholesterol in die Leber (zur Ausscheidung bzw. Wiederverwertung) zurückgeführt werden. Dies wird durch das *high-density*-Lipoprotein (HDL) vermittelt. HDL kann Cholesterol aus Membranen extrahieren und für den Transport durch die HDL-assoziierte LCAT verestern. HDL ist ein sehr komplexes Molekül. Es besteht aus mehr als 50 einzelnen Proteinen, nur 1/3 davon wird zum Cholesteroltransport benötigt. Der reverse Cholesteroltransport wird v. a. über das Apolipoprotein (apo) A-1 vermittelt. Die restlichen Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Inhibition von Proteasen, Regulation von Komplementproteinen und der Akute-Phase-Immunantwort. Außerdem besitzt HDL eine wichtige anti-inflammatorische Funktion, welche u. a. in der Inhibition der Chemokinproduktion, wie z. B. MCP-1, besteht. Weiterhin beschränkt HDL das Ausmaß, in dem Endothelzellen durch proinflammatorische Zytokine aktiviert werden können.[65–67] HDL kann außerdem durch die Serum-Paroxonase die Oxidation von LDL verhindern.[68]

1.5.2 LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor (LDL-R) wurde das erste Mal 1973 von Brown & Goldstein beschrieben.[69] Das Glycoprotein wird von einem 45kb großen Gen auf Chromosom 19 kodiert. Der LDL-Rezeptor wird an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert und vermittelt die Aufnahme von Lipoproteinen aus dem Serum. LDL-R ist aus fünf Regionen aufgebaut, die verschiedene Funktionen besitzen. Die Ligandenbindungsdomäne befindet sich am N-Terminus. Hier binden Lipoproteine, die das Apolipoprotein B-100 (apoB-100) (LDL) und Apolipoprotein E (apoE) (VLDL) enthalten. Die zweite extrazelluläre Domäne ist eine EGFR-Vorläufer-homologe Region. Ist diese Region nicht vorhanden, können die Liganden noch immer binden, jedoch in den

Endosomen nicht mehr vom Rezeptor dissoziieren. Es folgen die *O-linked glykan*-Domäne und die Transmembrandomäne. Der C-Terminus bildet die letzte, intrazelluläre, Region. Dies ist der Angriffspunkt für Moleküle, welche die Endozytose und den intrazellulären Transport des Proteins regulieren.[70], [71] Bindet der Ligand an den Rezeptor, wird der LDL-LDLR-Komplex mittels Clathrin-vermittelter Endozytose aufgenommen. In den Endosomen wird der pH-Wert durch Protonenpumpen verringert, dies bedingt die Dissoziation des Liganden vom Rezeptor, welcher über Vesikel wieder an die Zelloberfläche *recycled* wird. In Lysosomen werden die Cholesterolester hydrolysiert und die Proteinbestandteile des LDL abgebaut. Cholesterolester kann nun von der Zelle weiterverarbeitet werden (Abbildung 6).[72]

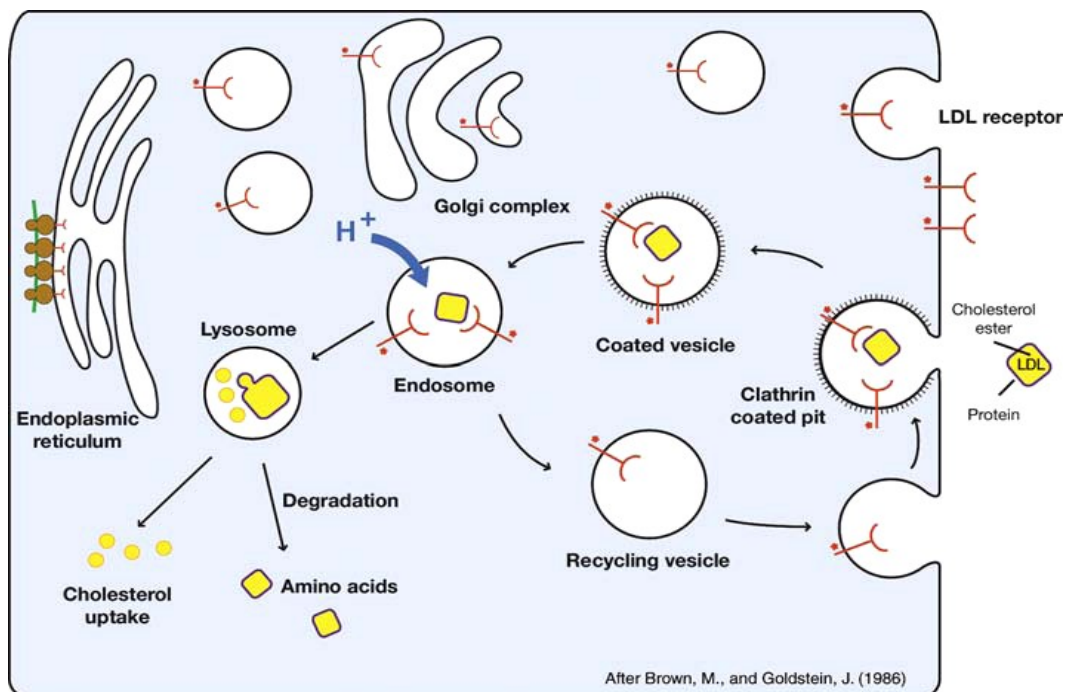


Abbildung 6 Aufnahme des LDL in die Zelle und LDL-Rezeptor *recycling*. [72]

Mutationen, die zum Verlust des LDL-Rezeptors führen, sind der Grund für die Ausprägung der familiären Hypercholesterinämie (FH), einer der häufigsten hereditären Erkrankungen des Menschen. Über 1.100 Varianten des Gens, welche durch Funktionsverlust des Proteins zu FH führen, wurden bisher identifiziert (www.ucl.ac.uk/ldlr/LOVDv.1.1.0). [73]

1.6 Atherosklerose

Die häufigsten Todesursachen in westlichen Industrieländern sind Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. Laut Statistischem Bundesamt starben 2011 etwa 342.000 Patienten an Erkrankungen des Kreislaufsystems.[74] Höheres Alter, männliches Geschlecht, Übergewicht, Bluthochdruck, Rauchen, ein erhöhter LDL-Cholesterinspiegel, aber auch Diabetes und Stress zählen zu den wichtigsten Risikofaktoren. Grundlage für die Entstehung vieler Herz-Kreislaferkrankungen ist die Atherosklerose. Hier werden Lipide und fibröse Elemente in den Arterien akkumuliert, dies führt zur Ausbildung sog. Plaques in der Gefäßwand. Atherosklerose kann als eine chronische Entzündungsreaktion angesehen werden, welche durch Thrombose der Gefäße und Ablösung der Plaques schwerwiegende Folgen haben kann. Klinisch am Bedeutendsten sind Myokardinfarkte und Hirninfarkte. [65] Der Zusammenhang zwischen Cholesterolgehalt im Serum und dem Auftreten von Atherosklerose wurde 1913 von Anitschkow und Chaladow aufgedeckt.[75] In den 1960er Jahren wurde durch epidemiologische Studien ein Schlüsselfaktor für die Entstehung der Atherosklerose identifiziert, das LDL-Cholesterin. Atherosklerotische Läsionen entstehen vor allem an Biegungen und Verzweigungen der Gefäße, da der dort herrschende turbulente Blutfluss und die damit verbundenen Scherkräfte die Permeabilität des Endothels erhöhen. Makromoleküle, wie LDL können an diesen Stellen verstärkt passiv durch benachbarte Endothelzellen in die Gefäßwand diffundieren. Die Permeabilität des Endotheliums kann auch durch andere Faktoren, wie Entzündungen, Bluthochdruck und Verletzungen des Endothels beeinflusst werden. Durch die Interaktion des apoB-Proteins des LDL und der Matrixproteoglykane wird LDL in der *Intima* zurückgehalten und akkumuliert. Die Akkumulation steigt durch erhöhte LDL-Spiegel im Blut weiter an. In der *Intima* wird LDL durch Oxidation, Lipolyse und Aggregation modifiziert. Besonders minimal oxidiertes LDL ist ein proinflammatorischer Mediator, dessen Wirkung Endothelzellen zur Produktion von chemotaktischen Proteinen, wie *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) und Wachstumsfaktoren, z. B. *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) sowie Adhäsionsmolekülen stimuliert. Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, P- und E-Selektin führt zur Rekrutierung von Lymphozyten. ICAM-1 und β 2-Integrin hingegen sind verantwortlich für die Bindung von Monozyten. In die *Intima* eingewanderte Monozyten werden unter dem Einfluss von M-CSF zu Makrophagen

transformiert. M-CSF stimuliert die Makrophagen zur Expression von *Scavenger*-Rezeptoren über welche stark oxidiertes LDL aufgenommen wird. Es kommt zur Bildung von Schaumzellen (*foam cells*), die sich ebenfalls in der *Intima* ablagern. Durch Nekrose dieser Schaumzellen kommt es zur Freisetzung der Lipide und anderen Zellbestandteilen in die *Intima*. Im nächsten Schritt proliferieren glatte Muskelzellen und wandern aus der *Lamina media* in die *Intima* ein. Dies wird durch die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren der Makrophagen vermittelt. Die glatten Muskelzellen in der *Intima* sezernieren extrazelluläre Matrixproteine, was zur Bildung einer fibrotischen Kappe über dem nekrotischen Kern aus Lipiden und Zellresten führt (Abbildung 7).

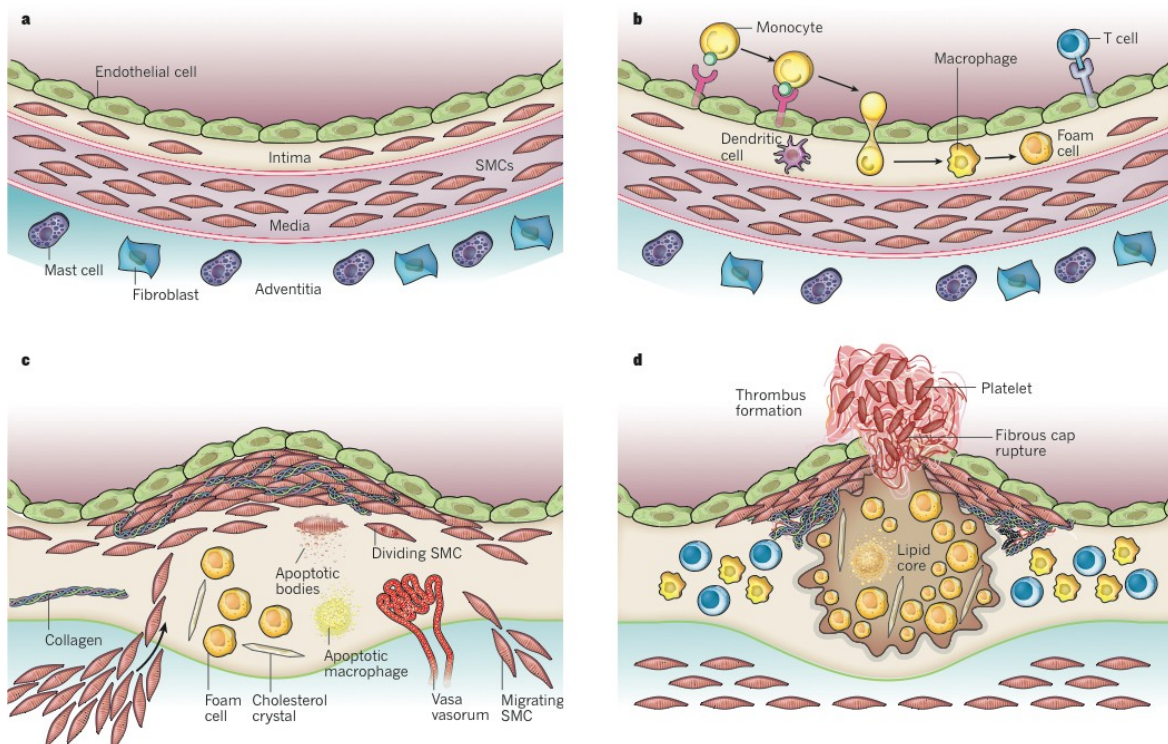


Abbildung 7 Entstehung atherosklerotischer Plaques. a) physiologischer Zustand der Gefäßwand b) Einwanderung von Monozyten und Bildung der Schaumzellen c) klinisch unauffälliges atherosklerotisches Plaque mit fibröser Kappe d) komplexe Läsion mit Plaque-Rupture und Thrombusbildung.[76]

Die frühen fibrotischen Plaques sind klinisch unauffällig solange sie stabil sind, d.h. wenn eine dicke fibröse Kappe aus Kollagen und Muskelzellen einen relativ kleinen Lipidkern einschließt. Gefährlich werden erst komplexe Plaques, welche durch weitere Einwanderung von Immunzellen, v. a. Makrophagen und T-Zellen entstehen. T-Zellen sezernieren unter anderem Interferon- γ (IFN- γ), welches die Produktion von Matrixbestandteilen durch die glatten Muskelzellen inhibiert. Makrophagen

produzieren Proteasen, die die vorhandene extrazelluläre Matrix aufspalten. Auf diese Weise kommt es besonders in den peripheren Regionen der Plaques zu einer Ausdünnung der fibrösen Kappe. Wird das Endothel durch Apoptose beschädigt oder die fibröse Kappe durch hämodynamische Scherkräfte aufgerissen, so kann es zu Plaque-Erosionen beziehungsweise zu Plaque-Rupturen kommen. Dies sind die initialen Vorgänge zur Thrombosebildung, welche zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führen können.

Eine besondere Rolle im Schutz gegen die Bildung atherosklerotischer Plaques nimmt das HDL, zum Einen als wichtiger anti-oxidativer Faktor und zum anderen durch den reversen Cholesteroltransport ein. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entfernung von LDL und VLDL aus dem Serum ist der LDL-Rezeptor, welcher die Aufnahme des LDL/VLDL in Endothelzellen vermittelt.[55], [66] Therapeutische Maßnahmen zur Verhinderung der Entstehung atherosklerotischer Läsionen umfassen v.a. Substanzen zur Verringerung des VLDL/LDL-Gehalts im Serum und die Bekämpfung wichtiger Risikofaktoren, wie Bluthochdruck und Diabetes Mellitus. Die Hemmung der Cholesterolsynthese durch Inhibition der HMG-CoA-Reduktase über Statine ist eine klinisch etablierte Möglichkeit Hypercholesterinämie zu behandeln (Abbildung 4). Weitere Therapeutika sind beispielsweise Niacin, welches den HDL-Gehalt im Blut erhöht, Acetylsalicylsäure, welches die Thrombozytenaggregation verhindert und verschiedene Medikamente gegen Bluthochdruck, Diabetes Mellitus u. a.[77], [78]

Der Einfluss von Kupfer auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen wurde oft untersucht. Kupfer scheint in diesem Prozess eine uneinheitliche Bedeutung, welche noch nicht vollständig aufgeklärt ist, zu haben. Zum einen haben epidemiologische Studien vermehrt einen Zusammenhang zwischen der Serumkupferkonzentration und dem Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen nachgewiesen.[79] Außerdem ist der Kupfergehalt in atherosklerotischen Arterienwänden und Plaques erhöht.[80], [81] In der Entstehung atherosklerotischer Läsionen spielt die Oxidation von LDL eine entscheidende Rolle. Kupfer kann unabhängig vom Vorhandensein der *reactive oxygen species* (ROS) LDL oxidieren.[82] Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine Kupfer-Chelatorentherapie (Tetrathiomolibdat, TTM) vaskuläre Inflammation und die Bildung atherosklerotischer Plaques in apoE^{-/-}-Mäusen verhindern kann.[83]

Dennoch wurden auch Studien veröffentlicht, welche negative Beweise zur Rolle von Kupfer in der Atheroskleroseentstehung lieferten. In Patienten mit moderater koronarer Herzkrankheit wurde keine erhöhte Kupferkonzentration gemessen.[84] Lamb *et al.* zeigten 1999, dass das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen im Kaninchenmodell durch eine zusätzliche Kupfergabe verringert werden kann.[85] Die bereits beschriebenen hohen Kupferkonzentrationen, welche immunhistochemisch in den Plaques nachgewiesen wurden, konnten massenspektrometrisch in oxidiertem LDL, welches aus atherosklerotischen Plaques isoliert wurde, nicht bestätigt werden.[86]

1.7 Tiermodelle der Atherosklerose

Zur Untersuchung der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen existieren verschiedene Tiermodelle, die am häufigsten genutzten basieren auf Maus, Ratte, Kaninchen und Schwein. Für die Analyse der Entstehung von Atherosklerose stellen *knockout* und transgene Mausmodelle ein wesentliches Instrument dar. Die wichtigsten Mausmodelle sind dabei die Apolipoprotein-E-*knockout*-Maus (*apoE^{-/-}*-Maus) und die *low-density-lipoprotein-receptor-knockout*-(*LDLR^{-/-}*)-Maus).[87]

a) *apoE^{-/-}*-Maus

1992 wurde die *apoE^{-/-}*-Maus von 2 unabhängigen Arbeitsgruppen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen hergestellt.[88], [89] Apolipoprotein E (ApoE) ist ein wichtiger Bestandteil von Triglycerid-reichen Lipoproteinkomplexen. Es wird in vielen Geweben exprimiert. Die Leber produziert ca. $\frac{3}{4}$ des gesamten Plasma-*apoE*-Gehaltes. ApoE bindet an die Lipoproteinrezeptoren, v. a. an den LDL-Rezeptor und vermittelt so die Aufnahme von LDL in die Zelle.[90] Aus der *apoE*-Mutation resultieren erhöhte VLDL und LDL Serumspiegel, da diese Moleküle dann nicht mehr aus dem Serum in die Endothelzellen aufgenommen werden. Schon unter normalen Umständen haben diese Mäuse extrem erhöhte Serumcholesterolkonzentrationen und entwickeln große atherosklerotische Läsionen. Diese Entwicklung kann durch weitere Faktoren, wie z.B. cholesterolreiche Diät und Einkreuzung weiterer Gendefekte, welche die Entstehung von Atherosklerose begünstigen noch intensiviert werden.[87]

b) LDLR^{-/-}-Maus

Ishibashi *et al.*, stellten 1993 dieses *knockout*-Mausmodell der familiären Hypercholesterinämie her. Durch eine *neo*-Insertion in Exon 4 des *Ldlr*-Gens wird ein verkürztes Protein exprimiert, welchem die Liganden-Bindungsdomäne und die Transmembranregion fehlen. Durch die Mutation des LDL-Rezeptors wird die Bindung von VLDL und LDL an den Rezeptor verhindert. Daraus resultiert ein erhöhter Plasma-Cholesterolgehalt, welcher besonders von erhöhten LDL-Konzentrationen herrührt, da LDL und VLDL nicht mehr im gleichen Maße in die Zellen aufgenommen werden. Der HDL Gehalt verändert sich im Vergleich zum WT nicht.[91] LDLR^{-/-}-Mäuse entwickeln unter Standarddiät langsam Atherosklerose. Diese Entwicklung nimmt einen rasanteren Verlauf, wenn die Diät einen hohen Cholesterol- oder Fettanteil besitzt.[92], [93] Der Plasma-VLDL-Gehalt korreliert dabei mit dem Schweregrad der atherosklerotischen Läsionen.[94]

2 Zielstellung der Arbeit

Kupfer ist ein essentieller Nahrungsbestandteil und wichtiger Kofaktor vieler Enzyme. Die Aufrechterhaltung der Kupferbalance ist streng reguliert. Kupfermangel, wie auch Kupferakkumulation können letale Folgen haben. Freies Kupfer führt zu Gewebsschäden. Ein wichtiges Protein für die Ausscheidung von Kupfer ist ATP7B. Kommt es zu einem Funktionsverlust dieses Proteins, z. B. im Morbus Wilson, akkumuliert Kupfer in der Leber und es kommt zu Gewebsschädigungen, die zu akuter und chronischer Leberschädigung bis hin zum Leberversagen und Neurodegeneration führen können. Ein anerkanntes Modell für den Morbus Wilson ist die *Atp7b*^{-/-}-Maus. Der Verlust von *Atp7b* führt, neben den, für den Morbus Wilson typischen Symptomen, zu Tumorentstehung und Veränderungen des Lipidstoffwechsels in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus. Die genauen Mechanismen der Kupfertoxizität in der *Atp7b*^{-/-}-Maus waren bisher nicht näher untersucht.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf folgenden Punkten:

- 1) *Untersuchung der Tumorentstehung und des Tumorursprungs der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus.*

Hierzu wurden Genexpressionsstudien in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus durchgeführt. Mittels Software-basierter Analyse von Daten aus Genchip-Hybridisierungsexperimenten (*Microarray*-Technologie) sollten Gene und Signalwege identifiziert werden, welche in der Entstehung der intrahepatischen Tumore eine Rolle spielen.

- 2) *Untersuchung der Serumlipidparameter und der Entstehung atherosklerotischer Läsionen in der *Atp7b*^{-/-}-Maus bei gleichzeitigem Vorliegen einer LDL-Rezeptor Defizienz.*

Um den Einfluss der *Atp7b*-Defizienz in der Maus und der daraus resultierenden Kupferakkumulation auf die Entstehung der Atherosklerose zu untersuchen, wurden zwei Mausstämme untereinander verkreuzt um eine *LDLR*^{-/-}*Atp7b*^{-/-}-Maus zu erzeugen. Diese Doppel-*knockout*-Maus wurde in einem Fütterungsexperiment für 16 Wochen unter cholesterolreicher Diät gehalten und mit Hilfe von Genexpressionsstudien, proteinchemischen und histochemischen Methoden analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mausstämme

Es wurden drei verschiedene transgene Mausstämme verwendet:

Tabelle 1 Spezifikationen der verwendeten Mausstämme.

Mausstamm	genetischer Hintergrund	erhalten von
Atp7b ^{-/-}	C57Blx129S6/SvEv	Kolonie Prof.Dr.med.habil. D. Huster
B6.129S7-LDLR ^{tm1Her/J}	C57Bl/6	Kolonie Prof.Dr.med.habil. D.Teupser
LDLR ^{-/-} Atp7b ^{-/-}	C57Bl/6	eigene Zucht

3.1.2 Primer

Folgende Primer wurden für die verschiedenen Anwendungen benutzt:

Tabelle 2 Primer zur Genotypisierung (qualitative PCR).

Gen	UniGene ID	Name	Sequenz (5' -> 3')	AT°C	Produktgröße
Atp7b	Mm.87854	A	GGCATTGTGAACATCAAGGTG	58	A+B WT 700bp A+C MUT 200bp
		B	ATGGCTGTCTGCAGGAACA	58	
		C	TCGAGATCCACTAGTTCTAGC	58	
Ldl-r	Mm.3213	A	AATCCATCTTGTTC AATGGCCGAT	65	A+B WT 167bp B+C MUT 350bp
		B	CCATATGCATCCCCAGTCTT	65	
		C	GCGATGGATACTCACTGC	65	

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogen.

Tabelle 3 Primer für die Quantitative *real-time* RT-PCR.

Gen	UniGene ID	Sequenz (forward-reward)	AT°C	Produktgröße
Cd44	Mm.423621	ACGAAGATGCCTGGTACGGAGTC	56	209bp
		TGGTTTGGCTTCCACTGGGCT		
Ceacam 1	Mm.322502	CGAATCCAGTCAGCGTCAGGAG	58	239bp
		AGAAGGAGCCAGATTGTGGTTGG		
Cebpa	Mm.349667	CCCCTTGCAGTTCAGATCGC	65	255bp
		CGTTGCTGTTCTTGCCACCGAC		
Gpx3	Mm.200916	AAACAGGAGCCAGGCGAGAAC	55,4	156bp
		AGGGCAGGAGTTCTTCAGGAAAG		
Hnf4 α	Mm.15378	CTCCTTCTGGATGACCAGGTGG	59	244bp
		TGGCTTTGAGGCAGGCATATTC		
Mt1	Mm.192991	TCACCAGATCTCGGAATGGACC	58	152bp
		GCAGGAGCAGCAGCTCTTCTTG		
Mt2	Mm.147226	TGTGCCTCCGATGGATCCTG	58	123bp
		CACTTGTGCGGAAGCCTCTTTGC		
Vldl-r	Mm.4141	CGCCACTGCAAGCGGGAAGA	58	262bp
		TCCCCGTCACACTGCCATCTGT		
Vim	Mm.268000	CCGCACCAACGAGAAGGTAGAAC	61	281bp
		TCTCCTCTGCAATTTCTCTCGC		
Bcl2a2	Mm.257460	GAGCAGATTGCCCTGGATGTATG	54	150bp
		CAGCCAGCCAGATTTGGGTTC		
Bcl6	Mm.347398	CCCACAGCATAACAGAGATGTGCC	60	273bp
		GGTTTCTCACCCGTGTGGACAG		
Krt7	Mm.486285	GAAGGATGTGATGCCGCCTAC	60	284bp
		GGGCCTGGAGTGTCTCAAACCTTG		
Krt19	Mm.439699	AATCTGCATCTCCAGGTCAGTCC	60	204bp
		TTGCGCGACAAGATTCTTGG		
Jun	Mm.275071	CCTGATCATCCAGTCCAGCAATG	60	296bp
		TGAAGTTGCTGAGGTTGGCGTAG		
Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen				
Gen	UniGene ID	Qiagen Bestellnr.	AT°C	Produktgröße
Acot3	Mm.171281	Mm_MGI:2159619_1_SG	58	138bp
Egr1	Mm.181959	Mm_Egr1_1_SG	58	119bp
Gapdh	Mm.304088	Mm_Gapdh_3_SG	58	144bp
Hmgcr	Mm.485394	Mm_Hmgcr_2_SG	58	84bp
Hmgcs1	Mm.289131	Mm_Hmgcs1_1_SG	58	95bp
Idi1	Mm.29847	Mm_Idi1_1_SG	58	90bp
Lpl	Mm.1514	Mm_Lpl_2_SG	58	108bp
Mogat1	Mm.41325	Mm_Mogat1_1_SG	58	91bp
Spp1	Mm.288474	Mm_Spp1_1_SG	58	92bp
Sqle	Mm.296169	Mm_Sqle_1_SG	58	80bp
Primer wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen.				

3.1.3 Geräte, Chemikalien und Software

Die verwendeten Geräte und Chemikalien sowie deren Hersteller sind im Text angegeben. Die Datenbankrecherche erfolgte mit „Pubmed“: www.ncbi.nlm.nih.gov. Die Analyse der *Microarray*-Daten erfolgte mit Hilfe der „GeneSifter® Analysis Edition“ (Geospiza/Perkin Elmer, Seattle, USA) und „Ingenuity Pathways Analysis Software - IPA“ (Ingenuity Systems, Redwood City, USA). Zur Darstellung der experimentellen Daten wurden „Adobe CS3 Photoshop“ und „Adobe CS3 Illustrator“ (Adobe, San Jose, USA) verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Tierhaltung

Die Mäuse waren im Zentralen Tierlabor der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg untergebracht und durch Tierpfleger betreut. Die Tiere wurden in einem konstanten 12h Licht-Dunkelrhythmus mit unbegrenztem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 49%, es herrschte eine Temperatur von 21°C. Zur Stammhaltung und Zucht erhielten die Mäuse eine Standarddiät (R/M-H V1534-300, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Zur Atherosklerose-Induktion erfolgte die Fütterung der Mäuse mit einer semisynthetischen Diät mit klar formulierten Bestandteilen (AIN-76A – *American Institute of Nutrition*) welche leicht modifiziert wurde (0,02% Cholesterol) (S8619-E010, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Dies trägt zur Reduktion der Variabilität des Atherosklerose-phänotyps bei. Die für das Experiment bestimmten Tiere wurden im Alter von 28 Tagen abgesetzt und von diesem Zeitpunkt an mit der Spezialdiät für insgesamt 16 Wochen ernährt. Im Alter von 12 Wochen erfolgte eine Blutentnahme unter Betäubung aus dem retrobulbären Venenplexus. Im Alter von 20 Wochen wurden die Tiere getötet und die Organentnahme durchgeführt.

3.2.2 Generierung der Doppel-*knockout*-Mäuse

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Herstellung einer Doppel-*knockout*-Mauslinie durch Verkreuzung der vorhandenen Mausstämme. *Atp7b*^{-/-}-Männchen wurden jeweils mit *LDLR*^{-/-}-Weibchen verpaart. Die folgenden Gene-

rationen (N1 – LDLR^{+/-}Atp7b^{+/-} und N2 – LDLR^{-/-}Atp7b^{+/-}) wurden wiederum mit LDLR^{-/-}-Mäusen rückgekreuzt. Die LDLR^{-/-}Atp7b^{+/-}-Nachkommen der N3-Generation wurden untereinander verpaart. Deren Nachkommen (F1 - LDLR^{-/-}Atp7b^{+/-}, Atp7b^{-/-}, Atp7b^{+/+}) wurden in den Experimenten verwendet (Abbildung 8). Die LDLR^{-/-}Atp7b^{+/+}-und LDLR^{-/-}Atp7b^{+/-}-Wurfgeschwister fungierten dabei als Kontrolltiere für die LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Mäuse.

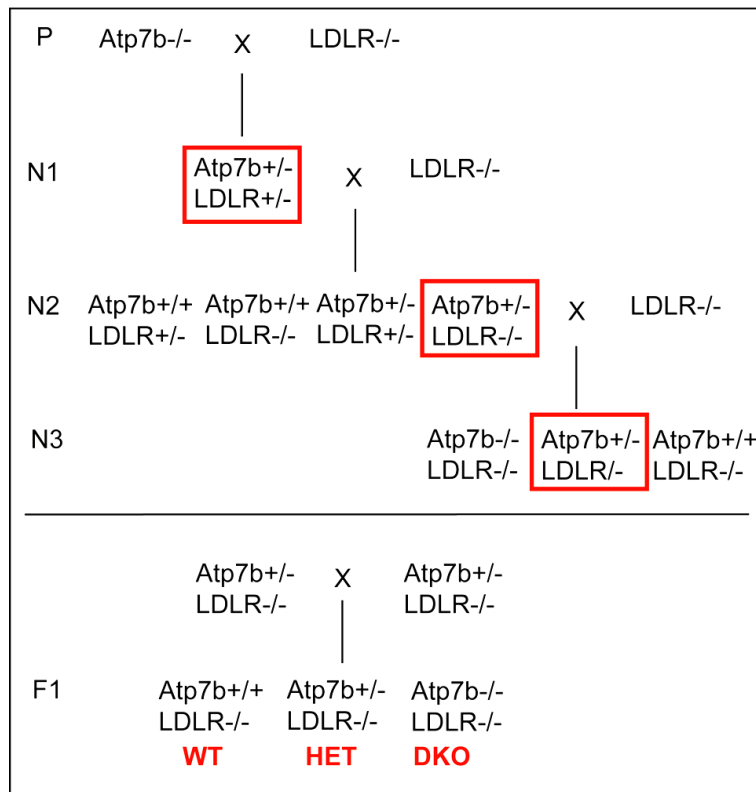


Abbildung 8 Kreuzungsschema zur Erzeugung der Doppel-knockout-Maus. Durch die Rückkreuzung der Atp7b^{-/-}-Maus auf LDLR^{-/-}-Mäuse wurden LDLR/Atp7b-Doppel-knockout-Mäuse erzeugt. Die Männchen der heterozygoten N1- und N2-Generation wurde jeweils mit LDLR^{-/-}-Weibchen verpaart. Die LDLR-knockout und Atp7b-heterozygoten Nachkommen der N3-Generation wurden untereinander verpaart. Die daraus resultierenden Nachkommen der F1-Generation waren homozygot für die LDLR-Mutation und jeweils entweder homozygot für den Atp7b WT (WT), heterozygot für Atp7b (HE) oder homozygot für die Atp7b Mutation (DKO). Entsprechende Tiere der F1-Generation wurden im Fütterungsexperiment eingesetzt.

3.2.3 Probengewinnung

3.2.3.1 Entnahme von humanen Gewebe und Blut

Die Entnahme des humanen Lebergewebes bzw. peripherer Blutproben erfolgte durch medizinisches Fachpersonal im Rahmen der klinischen Betreuung der Patienten. Die Patienten wurden über zusätzliche Studien informiert und stimmten mittels *informed consent* zu. Die Verwendung humanen Materials wurde von der

Ethikkommission der Universität Leipzig geprüft und genehmigt. Für den Vergleich der Serumparameter gegenüber Morbus Wilson wurden die entsprechenden Daten anonymisierter Patienten ohne klinische Charakterisierung aus einem niedergelassenen Labor (MVZ Prof. Schenk/ Dr. Ansorge&Kollegen, Magdeburg) verwandt.

3.2.3.2 Entnahme von murinem Gewebe und Blut

Lebergewebe aus Atp7b^{-/-}-Mäusen

Die Leberentnahme fand im Alter von 6, 20, 46 und 60 Wochen statt. Die Tiere wurden mit CO₂ betäubt und mittels Durchtrennung des Zwerchfells getötet. Es folgte die Blutentnahme aus dem linken Ventrikel. Im Anschluss erfolgte die Perfusion mit PBS+5.000U/l Heparin. Die Leber wurde entnommen, in Tumorgewebe, Regenerat und Normalgewebe mikroseziert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80°C zur molekularen Analyse oder in Einbettkassetten in 4% Formalinlösung zur histochemischen Aufarbeitung.

Präparation der LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Mäuse zur Bestimmung der Atherosklerose

Zur Organentnahme wurden die Tiere mit CO₂ betäubt und mittels Durchtrennung des Zwerchfells getötet. Aus dem linken Ventrikel wurde Blut entnommen und mind. 1h bei RT inkubiert und im Anschluss 8min bei 8.000xg zentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig abgenommen und bis zur Analyse max. eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt. Im nächsten Schritt erfolgte eine Perfusion der Tiere mit PBS+5.000U/l Heparin, um das restliche Blut auszuspülen. Nun wurde die Leber entnommen, in ca. 0,5cm x 0,5cm große Stücke zerteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert oder in Einbettkassetten in 4% Formalinlösung inkubiert und bis zur histochemischen Aufarbeitung gelagert. Im Anschluss erfolgte die Freilegung und Entnahme der BCA (*Arteria brachiocephalica*), des Herzens und der Aorta. Die BCA wurde am Abzweig vom Aortenbogen und 1mm distal ihrer Bifurkation in die *Arteria subclavia* und *Arteria carotis communis* abgetrennt. Das Herz wurde unterhalb des Aortenbogens abgetrennt. Als letztes erfolgte die Freilegung und Entnahme der *Aorta thoracica* (Abbildung 9).

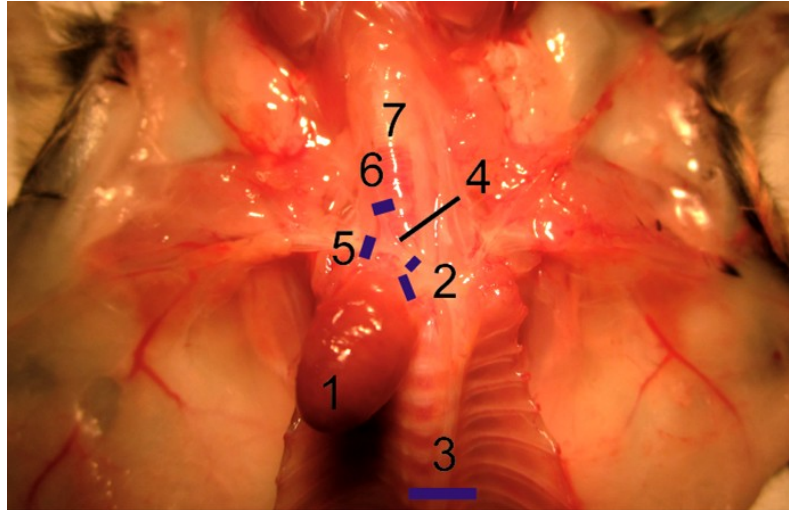


Abbildung 9 Lokalisation der BCA, Aorta und des Herzens in der Maus. 1 - Herz; 2 - Aortenbogen; 3 - *A. thoracica*; 4 - *A. brachiocephalica*; 5 - *A. subclavia dextra*; 6 - *A. carotis communis dextra*; 7 - Ösophagus. Die blauen Striche markieren die Stellen, an denen Schnitte zur Entnahme der Organe gesetzt wurden.

BCA und Herz wurden in Ausgusschälchen mit Cryo-Einbettmedium (Tissue-Tek®, OCT™ Compound, Sakura Finetek Europe, Leiden, Niederlande) überschichtet und bei -80°C eingefroren und aufbewahrt. Die Aorta wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.4 Präparation genomischer DNA und RNA aus Geweben

3.2.4.1 DNA

Die genomische DNA zur Genotypisierung der Mäuse wurde aus Schwanzspitzen präpariert. Dazu wurden zu den Schwanzspitzen $500\mu\text{l}$ „QuickExtract™“ (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA) gegeben, die Proben wurden 15s gemischt, 6min bei 60°C geschüttelt, wiederum 15s gemischt und im Anschluss wurde die Reaktion bei 90°C , 2min gestoppt. Der Überstand (enthält die DNA) wurde abgenommen und bei -20°C bis zu weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4.2 RNA

Die Präparation von RNA aus Lebergewebe erfolgte mit Hilfe des „RNeasy MiniKits“ (Qiagen, Hilden, Deutschland). Pro Extraktion wurden ca. 30mg Gewebe eingesetzt, dieses wurde mit RLT-Puffer versetzt und der Gewebsaufbruch erfolgte durch Ultraschall. Die Proben wurden bei 8.000xg 5min zentrifugiert und der Überstand auf

die Extraktionssäule gegeben. Die RNA bindet an der Säule. Im Anschluss folgte eine Reihe von Waschschritten, bis die RNA schließlich mit reinem Nuclease-freien Wasser im letzten Zentrifugationsschritt (2min, 8000xg) eluiert wurde. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte spektrophotometrisch mittels Extinktionsmessung am „*NanoDrop*“ (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 260nm. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz kann über die Absorption die Konzentration der RNA in der Probe bestimmt werden. Die Extinktion bei 260nm wird durch die Optische Dichte (OD) widergespiegelt. Eine OD₂₆₀ Einheit entspricht dabei 40µg/ml RNA. Die Reinheit wurde durch den Quotienten aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ bestimmt. Dieser sollte einen Wert zwischen 1,8 - 2,1 aufweisen. Ist der Quotient kleiner spricht dies für eine Verschmutzung der Probe mit Proteinen, höhere Werte hingegen kommen durch eine Verschmutzung der Probe mit Phenolen zustande. Die Integrität der RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese geprüft. Dazu wurde die RNA in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt. Wenn unter UV-Licht dann die 18S- sowie die 28S-RNA Bande sichtbar waren, galt die RNA als intakt. Die extrahierte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.2.5 Genexpressionsanalysen

3.2.5.1 *Microarray/Chip Performance-Analyse*

Für die *Microarray*-Expressionsanalysen wurde die RNA wie oben beschrieben präpariert. Außerdem wurde die RNA Qualität mit Hilfe des „*Bioanalyzer*“ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) noch einmal überprüft. Bei dieser Methode wird die *RNA Integrity Number* (RIN) bestimmt. Diese sagt aus, ob die RNA vollständig intakt ist (RIN=10) oder bereits degradiert (RIN=1). Die für die *Microarrays* verwendeten RNA-Proben wiesen eine RIN ≥ 8 auf (Abbildung 10).

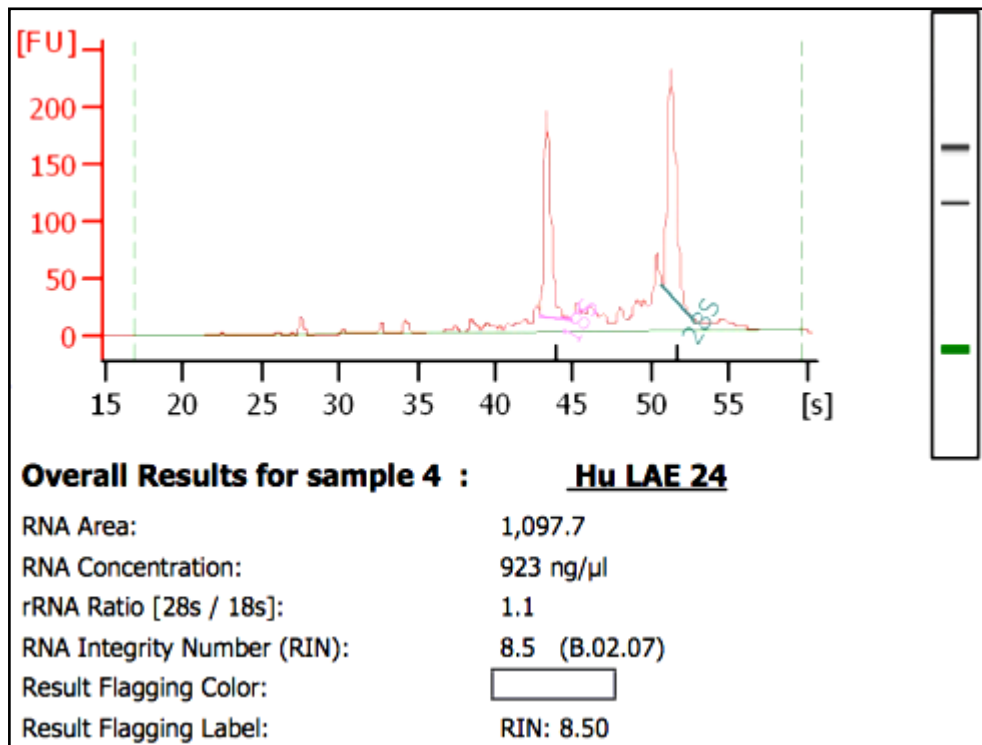


Abbildung 10 Auswertung der RNA-Qualität mit Hilfe des „*Bioanalyzer*“. Am Beispiel einer Probe, die auch in den *Microarrays* verwendet wurde ist hier die Bewertung der RNA Qualität mit Hilfe des „*Bioanalyzer*“ gezeigt.

Die RNA-Proben wurden je auf zwei verschiedene MOE430A „*Affymetrix GeneChip Arrays*“ hybridisiert (Duplikate, *technical replicates*). Jeder „*Affymetrix Chip*“ bestand aus 22.691 Punkten (*spots*), dies entspricht 13.016 einzelnen Genen (*Unigene IDs/clusters*). Die *Microarray*-Hybridisierung wurde am Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) der Universität Leipzig durchgeführt.

Die Analyse der *Microarray*-Ergebnisse erfolgte mittels der „*Affymetrix MAS 5.0 Software*“. Diese Daten wurden in „*GeneSifter.net*“, einer *Microarray*-Datenanalyse-Software importiert und RMA normalisiert.[95] Nun konnten in ihrer Expression veränderte Gene identifiziert sowie das Ausmaß der Expressionsänderung (*n*-fach; *fold change*) und die statistische Signifikanz dieser Änderungen bestimmt werden. Gene, die different zu den Kontrollen exprimiert waren, wurden nun mit den Genen verschiedener Signalwege mit Hilfe der „*Ingenuity Pathways Analysis Software*“ - *IPA* (Ingenuity Systems, Redwood City, USA) abgeglichen. Die Gene (*Affymetrix Gene IDs*) und deren korrespondierende Expressionswerte ($\geq 1,5$ *fold change*) wurden in *IPA* importiert. Die Software gleicht die importierten Expressionsdaten mit den Genen der internen *IPA*-Datenbank („*Ingenuity Pathways Knowledge Base*“) ab. In dieser Datenbank sind biologische und chemische Interaktionen sowie physiologische

Funktionen erfasst, die aus der mathematischen Modellierung von Beziehungen zwischen Proteinen und Genen erstellt wurden. Die Basis, aus der die Informationen für die Erstellung der *IPA*-Datenbank gezogen werden, bildet u. a. Primärliteratur, wie *Peer-Review*-Publikationen, Reviews und Lehrbücher. Die einzelnen Schritte der Datenanalyse sind schematisch in Abbildung 11 skizziert.

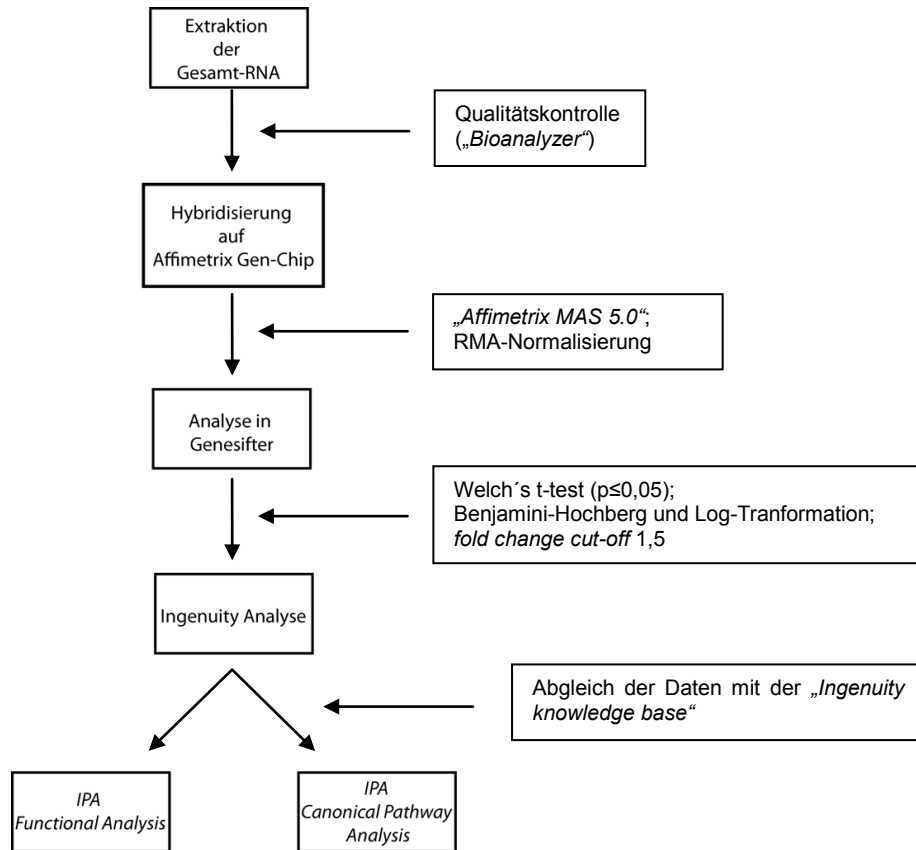


Abbildung 11 Vorgehen zur Analyse der Daten aus den *Chip Performance/Microarray-Experimenten*.

Die „*IPA Functional Analysis*“ identifiziert jene biologischen Funktionen, die im untersuchten Gewebe besonders stark verändert sind. In die Analyse wurden die Gene einbezogen, die eine Expressionsänderung höher als 1,5fach aufwiesen und in der *IPA*-Datenbank vertreten waren. Der Fisher-Yates-Test wurde genutzt, um den p-Wert zu errechnen, der die Signifikanz angibt, mit welcher die jeweilige biologische Funktion tatsächlich im untersuchten Gewebe verändert war. Ein Wert über $-\log(\text{p-wert}) \geq 1,3$ wurde als statistisch signifikant ($\text{p-Wert} \leq 0,05$) angesehen. Je größer der $-\log(\text{p-Wert})$ desto höher ist die Übereinstimmung zwischen Genen, deren Expression im untersuchten Gewebe verändert war und den Genen aus der *IPA*-Datenbank (der jeweiligen biologischen Funktion).

Die "IPA Canonical Pathways Analysis" identifiziert jene Signalwege der "IPA library of canonical pathways", die im untersuchten Gewebe verändert sind. Wie bereits beschrieben, wurden Gene in die Analyse einbezogen, die eine Expressionsänderung höher als 1,5fach aufwiesen und in der "IPA library of canonical pathways" vertreten waren. Die Signifikanz der Übereinstimmung zwischen dem Datensatz des untersuchten Gewebes und dem Signalweg aus der IPA-Datenbank wurde auf zwei Wegen bestimmt:

- 1) Der Anteil der Gene des Signalwegs aus dem untersuchten Datensatzes, welche eine signifikante Expressionsänderung aufwiesen, wurde durch die Gesamtanzahl der bekannten Gene im Signalweg dividiert (Bestimmung der *Ratio*).
- 2) Analog zum bereits beschriebenen Vorgehen wurde mit Hilfe des Fisher-Yates-Tests der p-Wert bestimmt, welcher die Signifikanz der Übereinstimmung zwischen dem Datensatz des untersuchten Gewebes und den Referenzgenen des Signalwegs aus der IPA-Datenbank angibt.

3.2.5.2 Polymerasekettenreaktion

Die von Mullis 1985 entwickelte Polymerasekettenreaktion beruht auf dem Prinzip der Duplizierung von Nukleinsäuren durch DNA-Polymerasen, wie sie auch in biologischen Zellen zur Vervielfachung der DNA (z. B. bei Zellteilung) stattfindet. Voraussetzung dafür sind dsDNA-Bereiche, an welche die DNA-Polymerase binden kann. *In vitro* werden dazu Oligonukleotide (*Primer*) verwendet, welche an eine zu amplifizierende Stelle der DNA binden (*annealing*), an diese nun doppelsträngigen Bereiche bindet die DNA-Polymerase und verlängert den Einzelstrang. Durch Aufbrechen dieser Doppelstränge und anschließende weitere Syntheseschritte lässt sich die Menge von bestimmten DNA-Abschnitten erhöhen, jeder Syntheseschritt führt bei optimalen Bedingungen zu einer Verdopplung der DNA-Menge. Dieses Verfahren lässt sich für verschiedene Applikationen anwenden. Zum einen kann auf diese Weise das Vorkommen eines bestimmten Gens nachgewiesen werden (qualitative PCR), indem die genomische DNA isoliert wird und auf das gewünschte Gen analysiert (vorausgesetzt die Sequenz ist bekannt, um spezifische Nukleotidprimer zu synthetisieren). Zum anderen kann die Menge eines Genprodukts bestimmt werden, indem mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben (RT, Reverse Transkription) und dann mittels quantitativer PCR analysiert wird.

Qualitative PCR

Die genomische DNA der Mäuse wurde bezüglich der Allele für das *Atp7b*-Gen und das *Ldlr*-Gen analysiert um den Genotyp festzustellen. Zur Genotypisierung werden in der Regel 3 Primer pro Gen benötigt. Ein Primerpaar erkennt den WT, und ein Primerpaar die defekte Genversion. Für homozygote Tiere (beide Allele sind gleich) wird ein Produkt gebildet, bei heterozygoten Tieren (ein Allel WT, das andere Allel defekt) werden zwei PCR Produkte gebildet. Die Ansätze und das Programm zur qualitativen PCR sahen folgendermaßen aus:

Reagenz	Atp7b	Ldlr
HotStartTaq MasterMix (Qiagen, Hilden, Deutschland)/ AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), 2x konzentriert	15µl	15µl
Primer A	1µM	1µM
Primer B	1µM	1µM
Primer C (Primersequenz siehe Tabelle 2/Seite 30)	1µM	0,5µM
DNA	2 µl	2 µl
<i>Aqua dest.</i>	ad 30µl	ad 30µl

Programm	Zeit	Temp.
1) Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase	15min	94°C
2) Denaturierung der Nukleinsäuren	1min	94°C
3) <i>Annealing</i>	1min	58°C
4) Elongation	1min	72°C
5) Elongation	10min	72°C

Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription dient der Umschreibung von RNA in cDNA (*complementary-DNA*), welche dann in der PCR analysiert werden kann. Hier macht man sich das Prinzip, welches z. B. Retroviren verwenden, um sich in der Wirtszelle zu vermehren, zunutze. Die reverse Transkriptase ist in der Lage, RNA in cDNA umzuschreiben. Pro Ansatz wurde 1µg RNA umgeschrieben.

Reagenz	Menge/ Volumen
AMV-RT 5x <i>Reaction Buffer</i> (Promega, Mannheim, Deutschland, 250mM Tris-HCl, 250mM KCl, 50mM DTT, 50mM MgCl ₂ , 2,5mM Spermidin)	8µl
dNTP 10mM je Nucleotid (Fermentas, Burlington, Kanada)	1,6µl
<i>Random Primer</i> p (dN ₆) 25 A ₂₆₀ U/mg (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)	2,0µl
AMV Reverse Transkriptase	10U
<i>Recombinant-RNasin Ribonuclease Inhibitor</i>	20U
RNA	1000ng
<i>Aqua dest.</i>	ad 30µl

Programm	Zeit	Temp.
1) Inkubation	10min	25°C
2) Reaktion	45min	42°C
3) Denaturierung	5min	95°C
4) Kühlung	∞	4°C

Die reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler. Die cDNA wurde 1:3 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Quantitative real time-PCR

Die Bestimmung der Kopienzahl bzw. der relativen Menge eines spezifischen Genprodukts erfolgt mittels *two-step*-RT-PCR mit vorheriger cDNA-Synthese oder als *one-step* RT-PCR, bei welcher der cDNA-Syntheseschritt der PCR direkt vorgeschaltet ist. Ein typischer Reaktionsansatz (30µl) und das Programm für eine *two-step*-PCR setzten sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Menge/ Volumen
2x <i>QuantiTect SYBRGreen PCR MasterMix</i> (Qiagen, Hilden, Deutschland)	15µl
Primer A	0,3µM
Primer B	0,3µM
(Primersequenz siehe Tabelle 3/Seite 31)	
cDNA, 1:3 verdünnt	1,2µl
<i>Aqua dest.</i>	ad 30µl

Programm	Zeit	Temp.
1) Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase	10min	95°C
2) Denaturierung der Nukleinsäuren	15s	95°C
3) <i>Annealing</i> (Bindung der Primer)	30s	54-62°C
4) Elongation des DNA-Stranges (Schritt 2-4 40x)	30s	72°C
5) Schmelzkurve	10min	50°C → 95°C

Die Amplifikation der Probe mittels *two-step*-PCR erfolgte am „*iCycler*“ (Biorad, München, Deutschland).

Das verwendete Programm für diese *real-time*-PCR begann mit einer Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95°C für 10min. Es folgten 40 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95°C für 15s, dem *Annealing* zur Bindung der Primer an die cDNA bei einer Primer-abhängigen Temperatur (54-62°C) für 30s und der Elongation des neu synthetisierten DNA-Strangs bei 72°C für 30s.

Zur Charakterisierung des PCR-Produkts wird in der sich anschließenden Schmelzkurvenanalyse der exakte Schmelzpunkt des PCR-Produkts bestimmt. Für die *one-step*-PCR wurde folgender Ansatz (25µl) und folgendes Programm benutzt:

Reagenz	Menge/ Volumen	
2x <i>QuantiTect SYBR-Green PCR Master Mix</i> (Qiagen, Hilden, Deutschland)	15µl	
Primer A	0,3µM	
Primer B	0,3µM	
(Primersequenz siehe Tabelle 3/Seite 31)		
QuantiTect dNTP Mix je 10mM	400µM	
RNA	500ng	
<i>Aqua dest.</i>	ad 25µl	

Programm	Zeit	Temp.
1) Reverse Transkription	30min	50°C
2) Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase	15min	95°C
3) Denaturierung der Nukleinsäuren	15s	94°C
4) <i>Annealing</i> (Bindung der Primer)	30s	54-62°C
5) Elongation des DNA-Stranges	30s	72°C
(Schritt 3-5 40x)		
6) Schmelzkurve		50°C → 95°C

Die Reaktion wurde am „*LightCycler 480*“ (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. Das Programm für die *one-step*-RT-PCR gleicht dem der *two-step*-RT-PCR. Hinzu kommt der Schritt der reversen Transkription, welcher der Polymerasekettenreaktion vorgeschaltet ist.

Während der Kettenreaktion lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff „*SybrGreen*“ spezifisch in doppelsträngige DNA ein. „*SybrGreen*“ emittiert Licht der Wellenlänge 521nm wenn es mit Licht der Wellenlänge 494nm angeregt wird. Die Fluoreszenz-

intensität korreliert mit der Menge der gebildeten dsDNA. Nach jedem Elongations-schritt wurde auf diese Weise die Menge des PCR-Produkts gemessen. Die Menge des amplifizierten Produkts korreliert mit der Menge der cDNA des jeweiligen Gens und wurde durch die Bestimmung der cDNA-Menge eines *housekeeping*-Gens (hier: *Gapdh*, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), dessen Expression durch äußere Einflüsse nicht wesentlich verändert wird, normalisiert. Die Amplifikation der cDNA erfolgt exponentiell, d.h. ab einem bestimmten Punkt nimmt die Fluoreszenzintensität der Probe sprunghaft zu und durchschneidet eine Basislinie. Dieser Punkt wird als CP-Wert (auch: C_t -Wert) definiert. Der CP-Wert entspricht daher dem Zyklus, in welchem die Basislinie durchbrochen wird und gibt Aufschluss über die relative Konzentration des gesuchten Genprodukts in der Probe. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels „*Relative Expression Software Tool 384*“ (REST-384) Version 2. Dieses Programm benutzt den „*pairwise fixed reallocation randomisation test*“ zur Bestimmung der relativen Genexpression einer Probe (*target*) im Vergleich zur Kontrolle (*reference*). Die Auswertung basiert auf der $\Delta\Delta C_t$ -Methode in welcher zuerst der ΔC_t -Wert bestimmt wird ($C_{t(\text{Probe})} - C_{t(\text{housekeeping})}$). Im zweiten Schritt werden die $\Delta\Delta C_t$ -Werte bestimmt ($\Delta C_{t(\text{Probe})} - \Delta C_{t(\text{Referenz})}$). Die relative Expression des Zielgens wurde durch die Software mit folgender Formel berechnet: [96]

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{Pt}(\text{MEANcontrol}-\text{MEANsample})}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta C_{Pr}(\text{MEANcontrol}-\text{MEANsample})}}$$

Ratio = relatives Expressionsverhältnis des Zielgens

E = PCR-Effizienz = 2

CP = *crossing point* (auch: C_t)

3.2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größe des PCR-Produktes wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das PCR-Produkt wurde mit 4 μ l Ladepuffer versetzt und auf ein 1,8% (w/v) Agarose/TAE Gel aufgetragen. Die Elektrophorese basiert auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren negativ geladen sind und sich daher im elektrischen Feld bewegen. Die Laufgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe der Fragmente ab. Kleine Fragmente bewegen sich schneller im Gel als große. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente wurde das Gel in Ethidiumbromid (EtBr) oder „*SybrGreen*“ gefärbt.

Beide Substanzen lagern sich spezifisch in dsDNA-Moleküle ein und fluoreszieren bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm. Die Dokumentation erfolgte mittels eines Transilluminators. Anhand eines mitgeführten DNA-Größenstandards (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) kann nun die Größe der Fragmente bestimmt werden. Zusätzlich wurde die Qualität der PCR-Produkte anhand der oben bereits erwähnten Schmelzkurve bestimmt. Für die Auswertung wurden ausschließlich Messdaten einwandfreier PCR-Produkte verwendet.

3.2.6 Bestimmung der Lipid- und Proteinparameter im Serum

Die Lipidbestimmung (Cholesterol, HDL, LDL, Triglyceride) und Bestimmung des Gehalts an Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT) erfolgte spektrophotometrisch mittels Extinktionsmessung in enzymatischen Farbreaktionen. Der Gesamtproteingehalt wurde mittels Biuret-Reaktion bestimmt. Diese Messungen erfolgten automatisiert mittels Analysekits (Roche, Basel, Schweiz) am MVZ Prof.Schenk/Dr.Ansorge&Kollegen, Magdeburg, durchgeführt von Dr. Heike Wex.

3.2.7 Histologie

3.2.7.1 Herstellung von Parafinschnitten

Nachdem die Leberproben mindestens 24 Stunden in 4% Formalin fixiert wurden, wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Parafin inkubiert und in Parafinblöcke gegossen. Die Gewebsschnitte aus den Parafinblöcken wurden am Mikrotom mit einer Dicke von 4µm angefertigt und auf Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgezogen. Die Schnitte wurden bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2.7.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Die Herstellung der Gefrierschnitte erfolgte im Kryo-Mikrotom mit einer Schnittdicke von 10µm. 3 Schnitte der BCA (200µm, 400µm und 600µm von der Bifurkation in *Arteria subclavia* und *Arteria carotis* entfernt) und 5 aufeinanderfolgende Schnitte der Aortenwurzel (10, 30, 50, 70, 90µm ab erstem Erscheinen der Aortenklappen)

wurden auf „SuperFrost Plus“ Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gezogen und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.7.3 Übersichtsfärbungen (HE/Ölrot)

HE (Hämalaun-Eosin)-Färbung

Die HE-Färbung dient der Übersichtsfärbung von Gewebeschnitten. Durch das Hämalaun werden saure Strukturen blau gefärbt (v.a. Zellkerne und das *endoplasmatische Retikulum*). Eosin hingegen färbt alle basische Strukturen rot (Proteine des Zytoplasmas). Die Parafinschnitte wurden vor der Färbung entwässert, die Kryoschnitte wurden in *Aqua dest.* gespült. Es folgte ein 5 minütiger Färbeschritt in Hämatoxylinlösung (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). Nach erneutem Spülen in dH₂O wurden die Schnitte 10min in fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte ein Spülgang in *Aqua dest.* bevor sich der 10min 1%ige Eosin-Färbeschritt anschloss. Nach nochmaligem Spülen in *Aqua dest.* wurden die gefärbten Schnittpräparate mit DEPEX (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckelt.

Ölrot-Färbung

Die Ölrot-Färbung dient dem Nachweis von Lipiden. Mindestens 24h vor der Färbung wurden die Objektträger mit den Schnitten in einer feuchten Kammer mit 10% Formalinlösung, neutral (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) aufbewahrt. Im ersten Schritt wurden die Schnitte 2x in *Aqua dest.* gespült, mit 60% Isopropanol entwässert und 18min in Ölrotlösung (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) gefärbt. Nach einem weiteren Spülschritt und Entwässerung wurden die Schnitte 2min in Hämatoxylinlösung („*Hematoxylin Solution GILL No.3*“, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) gefärbt und 1min gebläut (20g MgSO₄, 2g NaHCO₃, *Aqua dest.* ad 1l). Zur Darstellung des Bindegewebes erfolgte nach einem weiteren Spülschritt eine 30s Färbung in Lichtgrün mit anschließendem Spülen in *Aqua dest.* Die gefärbten Schnitte wurden mit Glycerol-Gelantine (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) und einem Deckglässchen bedeckt.

3.2.7.4 Quantifikation der atherosklerotischen Läsionen

Um das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen zu bestimmen, wurden die HE/Ölrot gefärbten Schnitte der BCA und Aortenwurzel fotografiert („*AxioCam*“, Carl-

Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „AxioVison 4.4“ (Carl-Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Die Läsionsfläche wurde luminal zur *Lamina Interna* planimetrisch vermessen und der Mittelwert aus drei (BCA) und fünf (Aortenwurzel) Schnitten einer Probe berechnet. Die Größe der Läsionen wurde in μm^2 angegeben.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als relativer Anteil, absolute Zahlen, Median und Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der Messwerte n ist unter der jeweiligen Abbildung angegeben. Die Daten wurden durch den Kolmogorov-Smirnov-Test und deskriptiv mittels Q-Q-Plot auf Normalverteilung geprüft. Zur statistischen Analyse erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei normalverteilten Daten eine ANOVA/Student's t-test-Analyse. In Fällen, in welchen die Normalverteilung nicht vorlag, erfolgte ein Kruskal-Wallis/Mann-Whitney-U-Test. Gruppen galten ab einem zweiseitigem $p \leq 0,05$ als signifikant unterschiedlich. Die Auswertungen erfolgten mit „Microcal OriginPro 8.0G“ (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Tumorentstehung/Regeneration in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus

4.1.1 Herkunft der Lebertumore

In *Atp7b*^{-/-}-Mäusen wird ab einem Alter von ca. 40 Wochen häufig die Entstehung von Tumoren in der Leber beobachtet.[52] Die Herkunft dieser Tumore ist jedoch nicht geklärt. Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Entstehung dieser Tumore aufzuklären und ihren Ursprung zu identifizieren. Eine *Microarray*-Expressionsanalyse des Gesamtgenoms auf eine Auswahl tumorassoziierter Gene ergab eine differenzielle Regulation der Expression von 169 verschiedenen Genen in den Lebertumoren der *Atp7b*^{-/-}-Maus verglichen zum Wildtyp (WT). In Tabelle 4 sind 17 besonders stark veränderte tumorassozierte Gene dargestellt.

Gen	Atp7b ^{-/-} Maus
	n-fach
AFP	15.2↑
C/EBP α	2.4↓
CD44	3.8↑
CDH17	5.0↑
CEACAM	3.3↓
Keratin 19	13.3↑
Keratin 7	5.7↑
CLDN7	10.1↑
EPCAM	11↑
Glypican1	2.1↑
GSN	7.7↑
HNF-4 α	3.5↓
MMP2	5.2↑
MMP7	17.0↑
SFTPD	13.6↑
SPP1	56.4↑
TMEM45A	17.0↑

Tabelle 4 Expressionsänderung ausgewählter Gene in intrahepatischen Tumoren der *Atp7b*^{-/-}-Maus. Verglichen wurden 60 Wochen alte *Atp7b*^{-/-}-Mäusen zu WT-Maus-Lebergewebe. Die Werte geben das Ausmaß der Expressionsänderung an, der Pfeil beschreibt die Richtung dieser Änderung (↑ verstärkte Expression; ↓ verminderte Expression). Die Werte sind auf der Ebene $p < 0,05$ signifikant (Wilcoxon Test), $n=3$. Fett gedruckte Gene sind im Sinne der Fragestellung von besonderem Interesse. Eine Auflistung aller 169 different exprimierten Gene befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

In intrahepatischen Tumoren der *Atp7b*^{-/-}-Maus wurden folgende Gene verstärkt exprimiert (Signifikanzniveau $p < 0,05$): CD44 (3,8fach), SPP1 (56fach), Keratin 7 (6fach) und Keratin 19 (13fach), Claudin7 (10fach), EPCAM (11fach), MMP7 (17fach), TMEM45 (17fach) und α -Fetoprotein (AFP; 15fach). In den *Atp7b*^{-/-}-Mauslebern

vermindert regulierte Gene sind C/EBP- α (2,4fach vermindert), HNF-4 (2,2fach vermindert) und CEACAM (3,3fach vermindert) (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Die signifikante Überexpression von Keratin 7 und Keratin 19 aus den *Microarray*-Ergebnissen konnte für die Lebertumore der *Atp7b*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zum umliegenden tumorfreien *knockout* (KO)-Lebergewebe und WT-Lebergewebe in der RT-PCR tendenziell bestätigt werden (Abbildung 12). Durch hohe individuelle Unterschiede der Expression der Gene in den einzelnen Mäusen ergaben sich hohe Variabilitäten, sodass die Ergebnisse nicht signifikant sind.

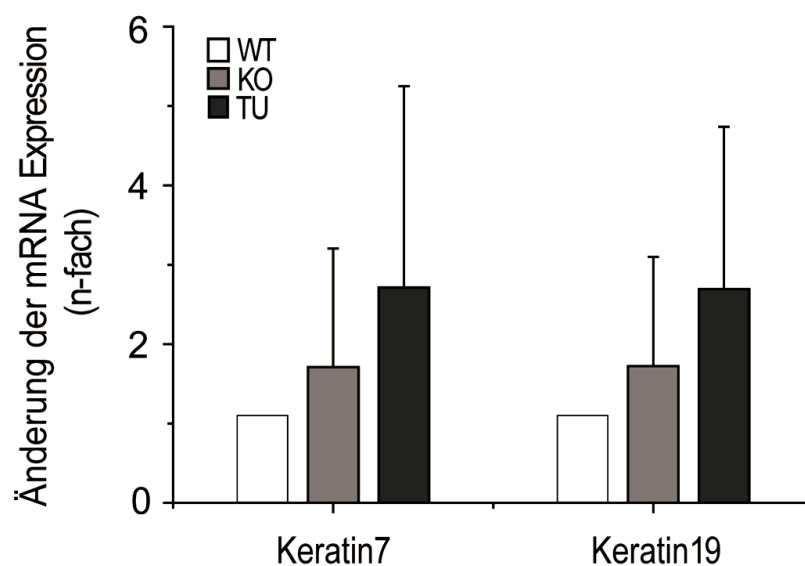


Abbildung 12 RT-PCR Analyse der Expression von Keratin 7 und 19. Die Keratine 7 und 19 waren im *Atp7b*^{-/-}-Lebergewebe (KO) und im Tumorgewebe (TU) auf mRNA-Ebene verglichen zu WT-Lebergewebe verstärkt exprimiert. Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=5$.

Fazit: In der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus wurden 169 different exprimierte Gene identifiziert, die mit der Karzinogenese assoziiert sind. Darunter sind bekannte Marker für Leberkarzinome (z.B. AFP, Keratin 7 und 19).

4.1.2 Mechanismus der Tumorentstehung

Der genaue Mechanismus der hepatischen Tumorentstehung in der *Atp7b*^{-/-}-Maus ist derzeit unklar. Die zentrale Frage ist, wie es zur Tumorgenese kommt – hat Kupfer einen direkten Einfluss auf die Expression von Onkogenen oder ist vielmehr die chronische Entzündung der Auslöser für die Tumorbildung? Um beteiligte Gene und Signalwege zu identifizieren wurde in *Microarray*-Analysen die Expression von Genen, welche im Zellzyklus, in der Karzinogenese und der Immunantwort eine Rolle spielen, untersucht.

In Lebergewebe aus 6, 20, 46 und 60 Wochen alten *Atp7b*^{-/-}-Mäusen (verglichen zum jeweiligen altersgleichen WT) und Leber-Tumorgewebe von 60 Wochen alten *Atp7b*^{-/-}-Mäusen (verglichen zum umliegenden tumorfreien Gewebe) wurden *Microarray*-Analysen durchgeführt und mit Hilfe der „*Ingenuity Pathway*“ Analyse ausgewertet. Die *IPA*-Analyse zeigt, dass die Anzahl der verändert exprimierten Gene, welche in Zellzyklus, Tumorentstehung und Entzündung eine Rolle spielen, sehr hoch war (Abbildung 13).

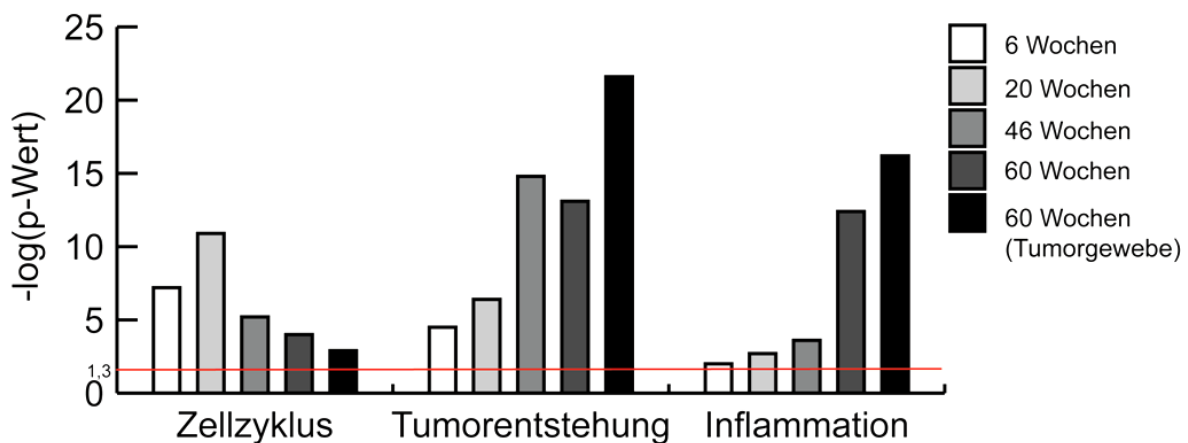


Abbildung 13 Genexpressionsänderung zellulärer Funktionen bzw. pathophysiologischer Prozesse. Angegeben ist der Anteil der verstärkt exprimierten Gene, beteiligt an den Prozessen Zellzyklus, Tumorentstehung und Inflammation (*IPA*) in der *Atp7b*^{-/-}-Leber im Zeitverlauf 6, 20, 46, 60 Wochen. Zellzyklus-assoziierte Gene waren bis zu einem Alter von 20 Wochen verstärkt exprimiert, wohingegen Gene der Karzinogenese und der Entzündungsreaktion ab einem Alter von 46 Wochen verstärkt exprimiert wurden. Angegeben ist der negative Logarithmus des p-Werts. War der p-Wert sehr klein ($\leq 0,05$; $-\log(\text{p-wert}) \geq 1,3$), so war die Funktion (hier: Zellzyklus, Immunantwort, Tumorentstehung) im untersuchten Datensatz signifikant verändert. Dies wurde als starkes Indiz gewertet, dass die Funktion vermutlich den beobachteten Phänotyp bedingt. („*Ingenuity Pathway Analysis*“; $n=3$)

Mit Progression der Kupferakkumulation von 6 - 60 Wochen nahm die Hochregulation der Zellzyklus-Gene im Lebergewebe der *Atp7b*^{-/-}-Mäuse ab (6 Wochen: 27 verändert exprimierte Gene; $-\log(\text{p-wert})=7,2$; 60 Wochen: 32 Gene; $-\log(\text{p-wert})=3,9$), und die der karzinomassoziierten Gene zu (6 Wochen: 44 Gene; $-\log(\text{p-wert})=4,5$, 60 Wochen 125 Gene; $-\log(\text{p-wert})=13$). Die Expression von Genen, welche an der Karzinogenese beteiligt sind, war im Tumorgewebe der 60 Wochen alten Tiere am höchsten (169 verändert exprimierte Gene; $-\log(\text{p-Wert})=21,6$). Ebenso verhielt es sich mit Genen, welche in die Immunantwort eingebunden sind (6 Wochen: 6 Gene; $-\log(\text{p-wert})=2,0$; 60 Wochen: 72 Gene; $-\log(\text{p-wert})=12,4$).

Um in den Lebern der *Atp7b*^{-/-}-Mäuse Signalwege zu identifizieren, welche an der Tumorentstehung beteiligt sind, wurde eine IPA-Analyse hinsichtlich bekannter Signalwege durchgeführt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde der negative Logarithmus des p-Werts angegeben.

Die Regulation der Signalwege im Lebergewebe der *Atp7b*^{-/-}-Mäuse im Alter von 6, 20, 46, und 60 Wochen wurde mit jener im WT-Lebergewebe verglichen. Außerdem erfolgte in den 60 Wochen alten Mäusen ein Vergleich zwischen Tumorgewebe und umliegendem tumorfreien Gewebe der *Atp7b*^{-/-}-Maus (Abbildung 14A und 14B).

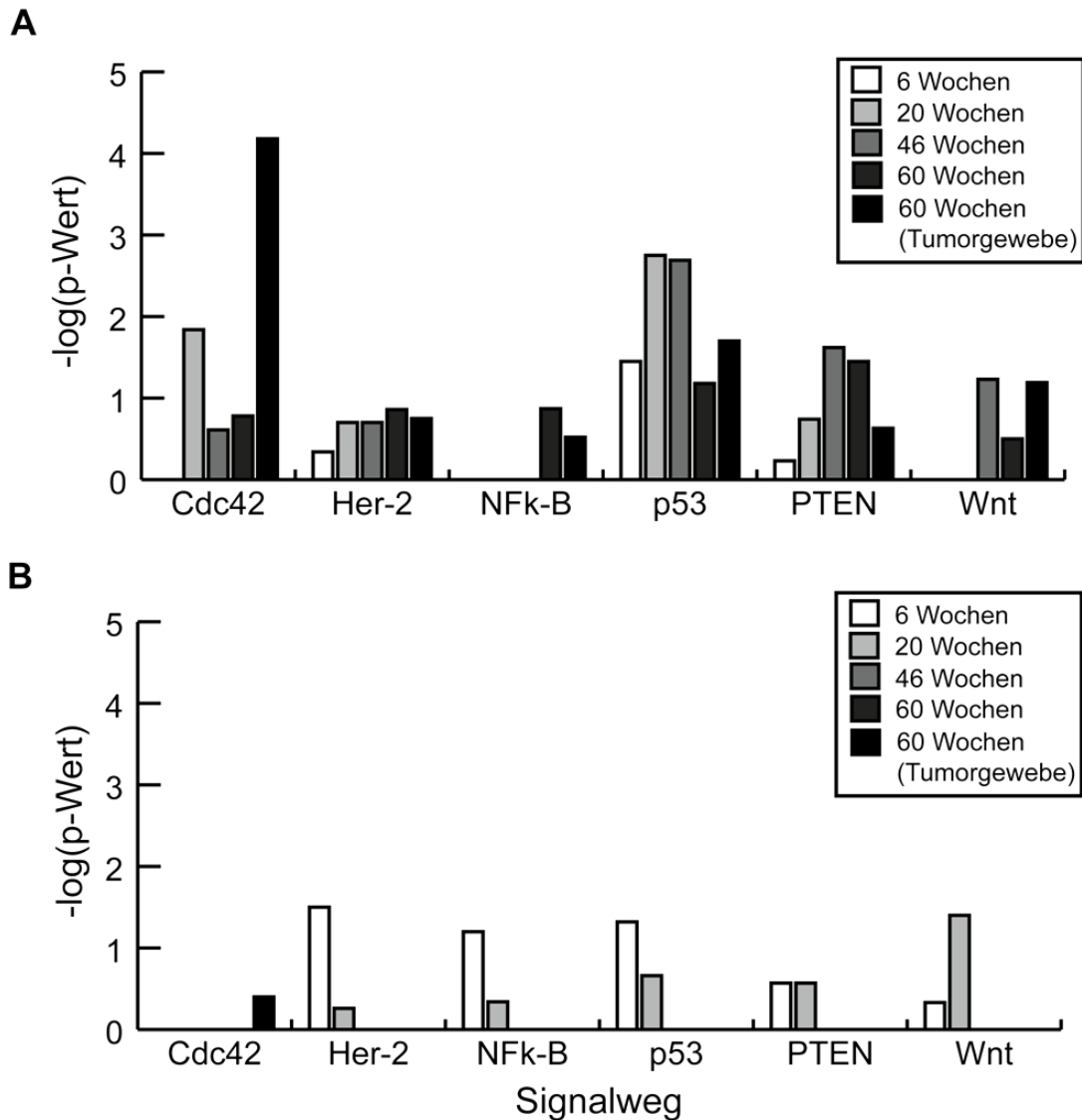


Abbildung 14 Besonders stark betroffene Signalwege der Karzinogenese. Anteil der A - verstärkt und B - vermindert exprimierten Gene aus Signalwegen, welche an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind, im Zeitverlauf 6, 20, 46 und 60 Wochen. Verglichen wurde die Expression der Gene in der *Atp7b*^{-/-}-Leber zu WT-Leber gleichen Alters. Bei den 60 Wochen alten Tieren erfolgte außerdem der Vergleich zwischen umliegendem, tumorfreiem Gewebe und Tumorgewebe. Bei 6 und 20 Wochen alten Tieren war die Mehrheit der Gene der betroffenen Signalwege herunterreguliert. Ab einem Alter von 46 Wochen hingegen konnte eine verstärkte Expression der tumorgenese-fördernden Gene nachgewiesen werden. Angegeben ist der negative Logarithmus des p-Werts. War der p-Wert sehr klein ($\leq 0,05$), so war der Signalweg im Datensatz signifikant verändert. Dies wurde als starkes Indiz gewertet, dass die Funktion wahrscheinlich den beobachteten Phänotyp bedingt. („Ingenuity Pathway Analysis“; n = 3)

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, wurden sechs Signalwege der Tumorentstehung, für die signifikante Expressionsänderungen jeweils wesentlicher Gene nachgewiesen wurden, identifiziert.

Folgende tumorfördernde Signalwege waren vor allem in den älteren Tieren (60 Wochen) und im Tumorgewebe verstärkt aktiviert: Cdc42-Signalweg ($-\log(\text{p-Wert})=4,18$), HER-2-Signalweg ($-\log(\text{p-Wert})=0,75$), NFκB-Signalweg ($-\log(\text{p-}$

Wert)=0,9), p53-Signalweg (-log(p-Wert)=1,7), PTEN-Signalweg (-log(p-Wert)=1,62) und der Wnt/ β -catenin-Signalweg (-log(p-Wert)=1,2) (Abbildung 14A).

In den jüngeren Tieren (6 und 20 Wochen) hingegen sind viele Gene dieser Signalwege vermindert exprimiert (Cdc42-Signalweg -log(p-Wert)=0,4, HER-2-Signalweg -log(p-Wert)=1,5, NF κ B-Signalweg -log(p-Wert)=1,21, p53-Signalweg -log(p-Wert)=1,32; PTEN-Signalweg -log(p-Wert)=0,57 und Wnt/ β -catenin-Signalweg -log(p-Wert)=0,33) (Abbildung 14B).

4.1.2.1 Wnt/ β -catenin-Signalweg

Die weitere Analyse des Atp7b^{-/-}-Lebertumorgewebes hinsichtlich der Beteiligung des kanonischen Wnt-Signalweges an der Tumorentstehung zeigte, dass sowohl in den *Microarray*-Analysen, als auch in ausgewählten *real-time*-RT-PCR-Experimenten aktivierende Wnt-Signalwegsgene und Zielgene des Wnt-Signalwegs signifikant hochreguliert waren.

Die *Microarray*-Ergebnisse der „GeneSifter“-Analyse sind in einer sog. *heat-map* dargestellt (Abbildung 15A). Die Farbkodierung bezieht sich auf die Höhe der Regulation der Gene, wobei grün eine verminderte Expression (\leq -2fach), schwarz keine Änderung der Expression und rot eine verstärkte Expression (\geq 2fach) illustriert. Alle dargestellten Änderungen waren auf einem Niveau von $p < 0,05$ signifikant. Die Abbildungen 15B und 15C zeigen Daten aus RT-PCR-Analysen in welchen die Ergebnisse aus den „*Microarray*“-Experimenten bestätigt wurden.

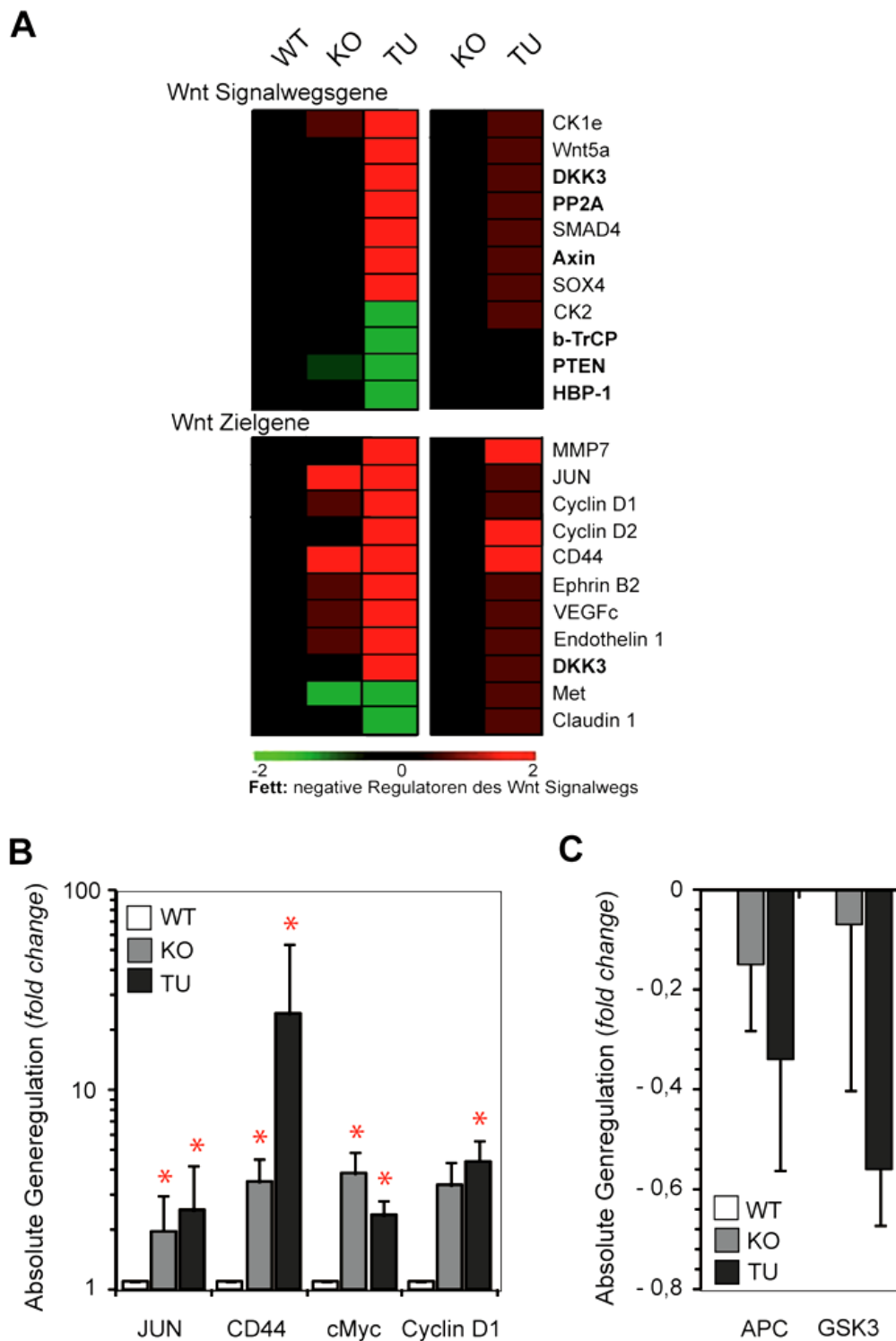


Abbildung 15 Expression Wnt-Signalwegs-assoziiertes Gene. **A** - "heat map" veränderter Gene des Wnt-Signalweges und dessen Zielgene. Der Vergleich erfolgte zum einen zwischen Wildtyp-Lebergewebe (WT) und tumorfreiem *Atp7b*^{-/-}-Lebergewebe (KO) sowie WT-Gewebe zu *Atp7b*^{-/-}-Tumorgewebe (TU) im Alter von 60 Wochen (linke *heat map*). Zum anderen wurde die Expression zwischen tumorfreiem *Atp7b*^{-/-}-Lebergewebe (KO) und Tumorgewebe aus dem murinen *Atp7b*^{-/-}-Lebergewebe (TU) im Alter von 60 Wochen verglichen (rechte *heat map*). *n*=3. Alle Werte mit *p*≤0,05 signifikant (Wilcoxon-Test). **B** - RT-PCR zur Bestätigung der *Microarray*-Ergebnisse für das JUN Onkogen, das Zelladhäsionsmolekül CD44, cMyc und den Zellzyklus-Regulator CyclinD1 und **C** - die Inhibitoren APC und GSK3 β exemplarisch in Tumorgewebe (TU) und umliegendem tumorfreiem Gewebe (KO) der 60 Wochen alten *Atp7b*^{-/-}-Tiere, verglichen zum Lebergewebe des Wildtyps (WT). Mittelwert \pm Standardabweichung, *n*=5, **p*≤0,05 (Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test)

Insgesamt wurden 22 Gene gefunden, welche am Wnt-Signalweg beteiligt sind und im Tumorgewebe eine veränderte Expression, im Vergleich zum umliegenden tumorfreien Gewebe, aufwiesen (Abbildung 15A). Zum Beispiel waren die im Wnt-Signalweg integrierten Gene, wie SMAD4 (2,5fach), SOX4 (3,3fach), Wnt5a (3,1fach) im Tumorgewebe verstärkt exprimiert.

Negative Modulatoren des Wnt-Signalweges, wie β -TrCP (1,6fach) und HBP-1 (2,9fach) wurden im Tumorgewebe im Vergleich zum umliegenden tumorfreien Gewebe vermindert exprimiert.

Die Expression zahlreicher Wnt-Zielgene, welche eine Rolle in der Proliferation, in Entzündungsreaktionen oder bei der Metastasierung spielen, war verstärkt. Von besonderer Bedeutung sind hier JUN (Onkogen, 4,4fach verstärkte Expression), die Cyclin D1 und D2 (Zellzykluskontrolle, 2,3fach bzw. 1,7fach verstärkte Expression) und die Matrixmetallopeptidase 7 (MMP7) (Metastasierung, 12fache Verstärkung). Abbildung 15 macht ebenfalls deutlich, dass die Mehrzahl der Gene im tumorfreien *Atp7b*^{-/-}-Gewebe verglichen zum WT-Lebergewebe keine veränderte Expression aufwiesen. Eine Ausnahme bilden dabei JUN und CD44, die auch im tumorfreien Lebergewebe schon ≥ 2 fach verstärkt exprimiert wurden.

Die Aktivierung der mRNA-Expression wurde auch in der bestätigenden RT-PCR exemplarisch für die Wnt-Zielgene JUN (4fach), CD44 (30fach), cMyc (4fach) und CyclinD1 im Tumorgewebe (TU) und im umliegenden tumorfreien Gewebe nachgewiesen (Abbildung 15B). Ebenso konnte tendenziell eine verminderte Expression der negativen Modulatoren APC und GSK3 β im tumorfreien und TU-Gewebe beobachtet werden (Abbildung 15C).

4.1.2.2 Kupferinduzierte Tumorpromotoren- und Onkogenexpression

Die Expression wichtiger Tumorpromotorgene im tumorfreien *Atp7b*^{-/-}-Lebergewebe (KO) im Vergleich zu Wildtyp-Lebergewebe (WT) ist in zeitlicher Abhängigkeit (6, 20, 60 Wochen alte Mäuse) in Abbildung 16A dargestellt. Abbildung 16B beschreibt die Expressionsunterschiede der Tumorpromotorgene in hepatischem Tumorgewebe (TU), verglichen mit dem umliegenden Lebergewebe (KO) der 60 Wochen alten *Atp7b*^{-/-}-Maus.

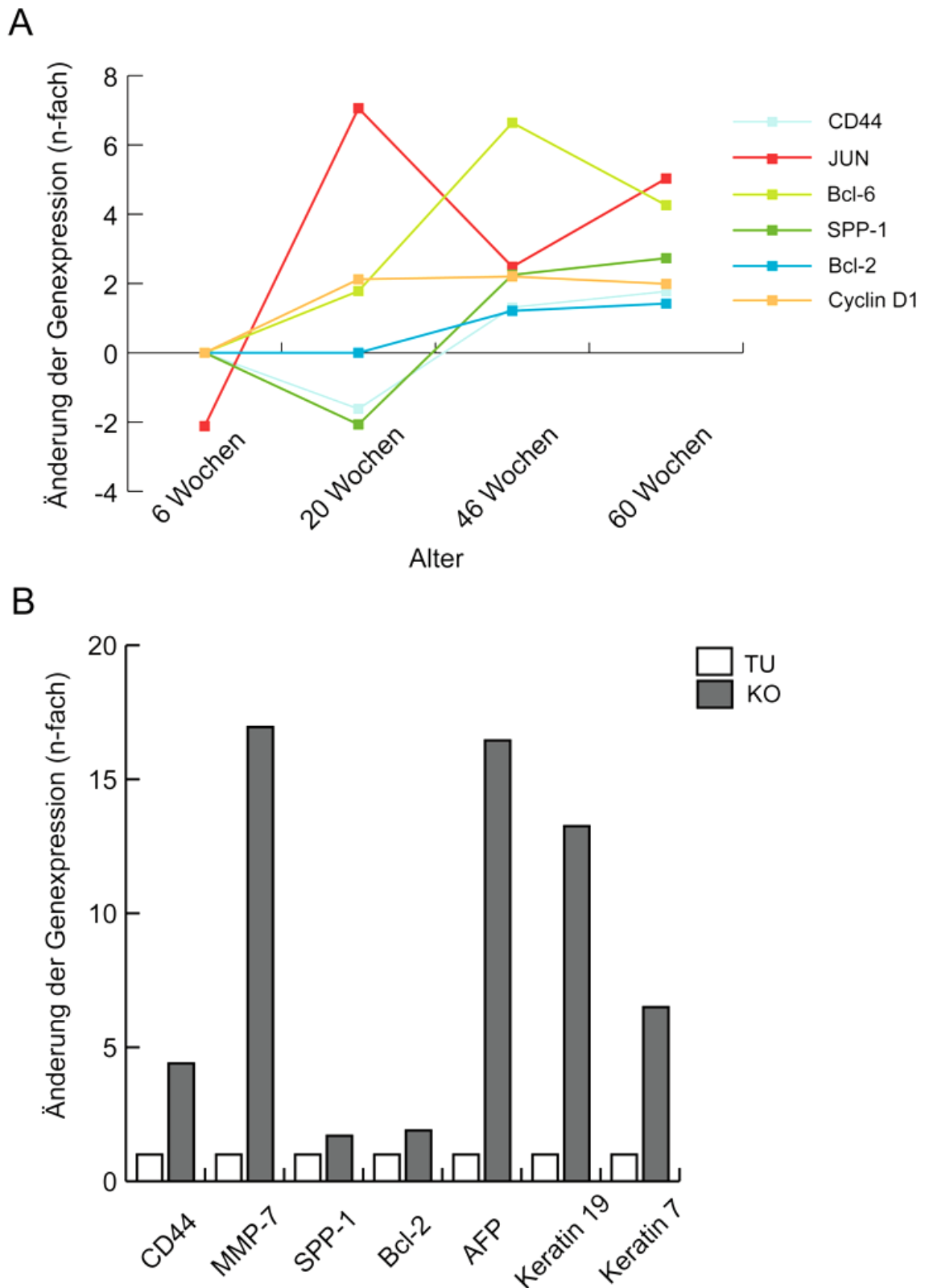


Abbildung 16 Microarray-Expressionsanalyse von Onkogenen in der *Atp7b*^{-/-}-Mausleber. A - Zeitliche Regulation der Tumorpromotorgene CD44, JUN, Bcl-6, SPP-1, Bcl-2, Cyclin D1. Angegeben ist die n-fache Verstärkung der Expression im *Atp7b*^{-/-}-Lebergewebe im Vergleich zum WT-Lebergewebe. B - Verstärkte Expression der Gene aus (A) zusätzlich MMP7, AFP, Keratin7 und Keratin19 in den Lebertumoren der *Atp7b*^{-/-}-Mäuse (TU) im Vergleich zum umliegenden tumorfreen *Atp7b*^{-/-}-Gewebe (KO). Angegeben sind die Mittelwerte; auf die Angabe der Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet, diese werden von „Genesifter“ für die Intensitäten angegeben und sind in Tabelle 10 im Anhang ersichtlich. n = 3, p ≤ 0,05 (Welch's t-test, „Genesifter“)

Mit anhaltender Inflammation und fortschreitender Regeneration und Proliferation stieg auch die Expression der Onkogene an und verblieb auf hohem Niveau. Die Expression der Gene CD44, JUN, Bcl-6, SPP-1, Bcl-2, und Cyclin D1 war in tumorfreiem Lebergewebe im Alter von 6-20 Wochen im Vergleich zum WT-Gewebe nicht verändert, im Alter von 60 Wochen wiesen diese Gene jedoch eine 2 bis 6fach verstärkte Expression auf. [CD44 (2fach), Cyclin D1 (2fach) nicht signifikant; JUN (5fach), Bcl6 (2,7fach), Bcl2 (1,5fach), SPP1 (4,3fach) signifikant mit $p < 0,05$] (Abbildung 16A).

Im Vergleich zwischen dem umliegenden tumorfreien Lebergewebe 60 Wochen alter *Atp7b*^{-/-}-Mäuse zum Leber-Tumorgewebe dieser Tiere wurden die Gene noch einmal um ein vielfaches verstärkt exprimiert. Am stärksten verändert war die Expression von AFP (15,2fach), CK7 (5,7fach), CK19 (10,6fach) und MMP7(12,0fach). Auch CD44 und Bcl-2 waren 4,4fach bzw. 2fach überexprimiert. Das Signifikanzniveau wurde in „*Genesifter*“ mit Welch´s t-test berechnet ($p < 0,05$) (Abbildung 16B).

Fazit: Durch die Kupferakkumulation wurde die Genexpression in der Leber der 46 - 60 Wochen alten *Atp7b*^{-/-}-Maus beeinflusst. Die Expression von Genen, welche mit der Karzinogenese und Inflammation assoziiert sind, war erhöht. Sechs Signalwege waren an der Karzinogenese beteiligt. Von besonderer Bedeutung war die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -catenin-Signalwegs, da zahlreiche Gene des Signalweges, sowie Zielgene verstärkt exprimiert wurden. Die kupferinduzierte Onkogenexpression und Pathologie unterlagen einer zeitlichen Abhängigkeit, sie stiegen mit zunehmendem Alter und waren im Tumorgewebe am höchsten.

4.2 Lipidstoffwechsel im Mausmodell

Huster *et al.* beschrieben 2007 frühe Auswirkungen der Kupferakkumulation auf die Genexpression in der jungen (6 Wochen) *Atp7b*^{-/-}-Maus. Besonders betroffen war der Lipidmetabolismus, 9 Gene der Cholesterolsynthese waren vermindert exprimiert. Ausgehend von diesen Ergebnissen wird angenommen, dass in der *Atp7b*-defizienten Maus Veränderungen in der Serumlipidzusammensetzung und der Bildung von Atherosklerose auftreten.[53], [97]

Die Auswirkungen der Kupferakkumulation auf den Lipidstoffwechsel und die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen sollte durch die Generierung einer *Atp7b*^{-/-}-Maus auf *LDLR*^{-/-}-Hintergrund weiter aufgeklärt werden.

4.2.1 *LDLR*^{-/-}*Atp7b*^{-/-}-Maus

4.2.1.1 Generierung und Charakterisierung der *LDLR*^{-/-}*Atp7b*^{-/-}-Maus

Durch Rückkreuzung der *Atp7b*^{-/-}-Maus auf den *LDLR*^{-/-}-Hintergrund wurde eine *LDLR*^{-/-}*Atp7b*^{-/-}-Maus generiert. Das Kreuzungsschema ist unter Punkt 3.2.2, Abbildung 8 gezeigt. Alle Tiere wurden durch qualitative PCR auf ihren Genotyp für *Ldlr* und *Atp7b* geprüft. In Abbildung 17 sind die Größen der PCR-Produkte für die verschiedenen Genotypen für *Atp7b* und *LDLR* gezeigt.

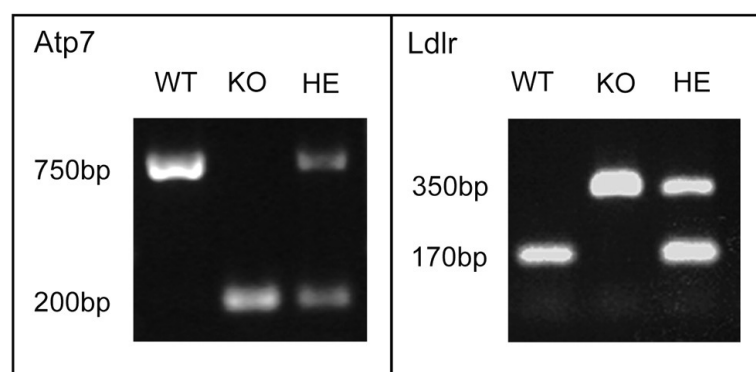


Abbildung 17 PCR-Produkte der Genotypisierung für *Atp7b* und *Ldlr*. Das *Atp7b*-WT-Fragment hat eine Größe von 750bp, das KO-Fragment ist 200bp groß und bei Tieren, welche heterozygot (HE) für *Atp7b* sind, werden beide Produkte in der PCR gebildet (oben). Für das Gen des LDL-R-Wildtyps (WT) wird in der Genotypisierung ein 170bp großes Produkt gebildet, das KO-Fragment hat eine Größe von 350bp und liegt der heterozygote (HE) Genotyp vor, werden beide Produkte gebildet (unten).

Im Fall von *Atp7b* hatte das PCR-Produkt für den Wildtyp (*Atp7b*^{+/+}) eine Größe von 750bp, das Produkt des *knockout*-Fragments von *Atp7b* (*Atp7b*^{-/-}) hatte eine Größe von 200bp und heterozygote (*Atp7b*^{+/-}) Tiere wiesen beide PCR-Produkte auf. Das PCR-Produkt für den *Ldlr*-Wildtyp (*LDLR*^{+/+}) hatte eine Größe von 170bp, für *Ldlr-knockout* (*LDLR*^{-/-}) 350bp und bei *Ldlr*-heterozygoten Mäusen (*LDLR*^{+/-}) wurden beide PCR-Produkte nachgewiesen.

Ein Wurf aus homozygoten *LDLR*^{-/-}*Atp7b*^{-/-} Verpaarungen bestand typischerweise aus 3 - 4 Jungen. Oft verstarben die Nachkommen früh (durch Kupfermangel in der Frühentwicklung [51]). Daher wurden die F1-Nachkommen (*LDLR*^{-/-}*Atp7b*^{+/-}) untereinander verpaart. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Jungen keinem Kupfermangel in der Entwicklung unterlagen. Der Genotyp dieser Nachkommen hinsichtlich des *Atp7b* war mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% *Atp7b*^{+/+} oder *Atp7b*^{-/-} und mit 50%iger Wahrscheinlichkeit *Atp7b*^{+/-}. Die Nachkommen wurden im Alter von 4 Wochen abgesetzt, genotypisiert und ausschließlich mit der semi-synthetischen cholesterolreichen Diät gefüttert. Im Alter von 12 Wochen wurde den Tieren Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen und im Alter von 20 Wochen wurden die Tiere gewogen, getötet, die Organe entnommen und noch einmal genotypisiert. Die Auswertung aller Daten erfolgte nach den 3 Genotypen (für *Atp7b*) und nach Geschlechtern getrennt. Es ergaben sich folgende Gruppen:

Genotyp	Kurzbezeichnung
<i>LDLR</i> ^{-/-} <i>Atp7b</i> ^{+/+}	WT
<i>LDLR</i> ^{-/-} <i>Atp7b</i> ^{+/-}	HE
<i>LDLR</i> ^{-/-} <i>Atp7b</i> ^{-/-}	DKO

Abbildung 18 zeigt das Gewicht der männlichen und weiblichen Mäuse der drei Versuchsgruppen am Tag der Tötung im Alter von 20 Wochen.

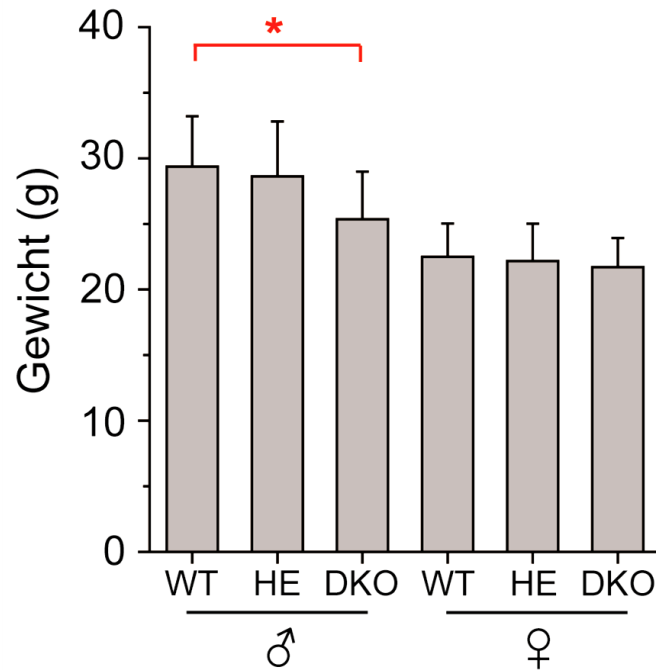


Abbildung 18 Gewicht der Mäuse aus dem Fütterungsexperiment im Alter von 20 Wochen. Das Gewicht der weiblichen und männlichen Mäuse der 3 Versuchsgruppen nach Fütterung der cholesterolreichen Diät über einen Zeitraum von 16 Wochen. n=15; Mittelwert±Standardabweichung, $p \leq 0,05$ (Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-U-Test)

Im Alter von 20 Wochen waren die Weibchen aller 3 Gruppen leichter als die männlichen Tiere (WT weiblich $22,5 \pm 2,54$ g WT männlich $29,4 \pm 3,83$ g; HE weiblich $22,2 \pm 2,85$ g HE männlich $28,6 \pm 4,18$; DKO weiblich $21,7 \pm 2,23$ g DKO männlich $25,4 \pm 3,64$ g). Außerdem waren die männlichen DKO-Tiere ($25,4 \pm 3,64$ g) signifikant leichter als die männlichen WT-Tiere ($29,4 \pm 3,83$ g).

Bei Leberentnahme wurde ein Teil des Gewebes in 4% Formalin zur späteren histologischen Aufarbeitung fixiert. Die Gewebsschnitte wurden HE-gefärbt, um den Aufbau des Gewebes zu untersuchen.

Die Unterschiede in der Leberhistologie zwischen den Genotypen sind in Abbildung 19 dargestellt.

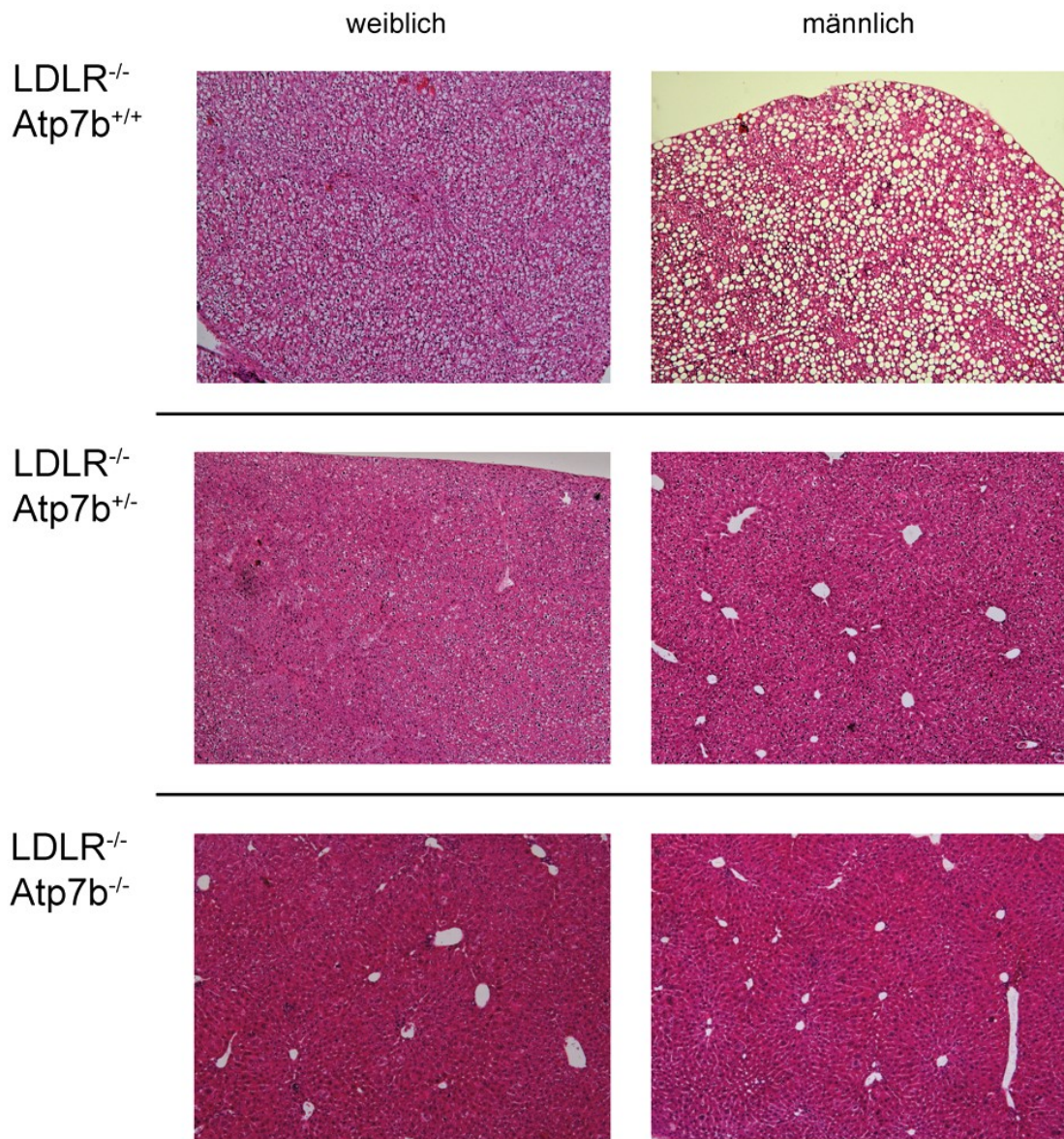


Abbildung 19 Leberhistologie von Atp7b WT-, HE- und DKO-Mäusen auf LDLR^{-/-}-Hintergrund. Repräsentative Darstellung des Lebergewebes nach 16 Wochen cholesterreicher Diät. WT: massive Lipideinlagerungen und stark vergrößerte Hepatozyten. HE: vereinzelte Lipideinlagerungen, vergrößerte Hepatozyten. DKO: selten Lipideinlagerungen, leicht vergrößerte Hepatozyten. Vergrößerung: 50x

Vor allem die LDLR^{-/-}Atp7b^{+/+}-Mäuse wiesen häufiger eine ausgeprägte Fettleber auf als die LDLR^{-/-}Atp7b^{+/-}-Tiere. Die Leber der Doppel-*knockout*-Maus war makroskopisch zumeist unauffällig. Im lichtmikroskopischen Bild zeigte sich jedoch eine milde Entzündung und vergrößerte Hepatozyten.

Um eine quantitative Aussage zu treffen, wieviele der WT-Tiere eine Fettleber aufwiesen, wurde eine Einteilung der Leber in 4 verschiedene Stadien der Verfettung vorgenommen (nach Brunt *et al.*[98]): Grad 0: keine Fetteinlagerungen sichtbar,

Grad I: 0 - 33%, Grad II: 33 - 66 und Grad III: >66% der Hepatozyten weisen Fetteinlagerungen auf.

In Abbildung 20 ist dargestellt, in welchem Ausmaß die Leber der Mäuse verfettet war.

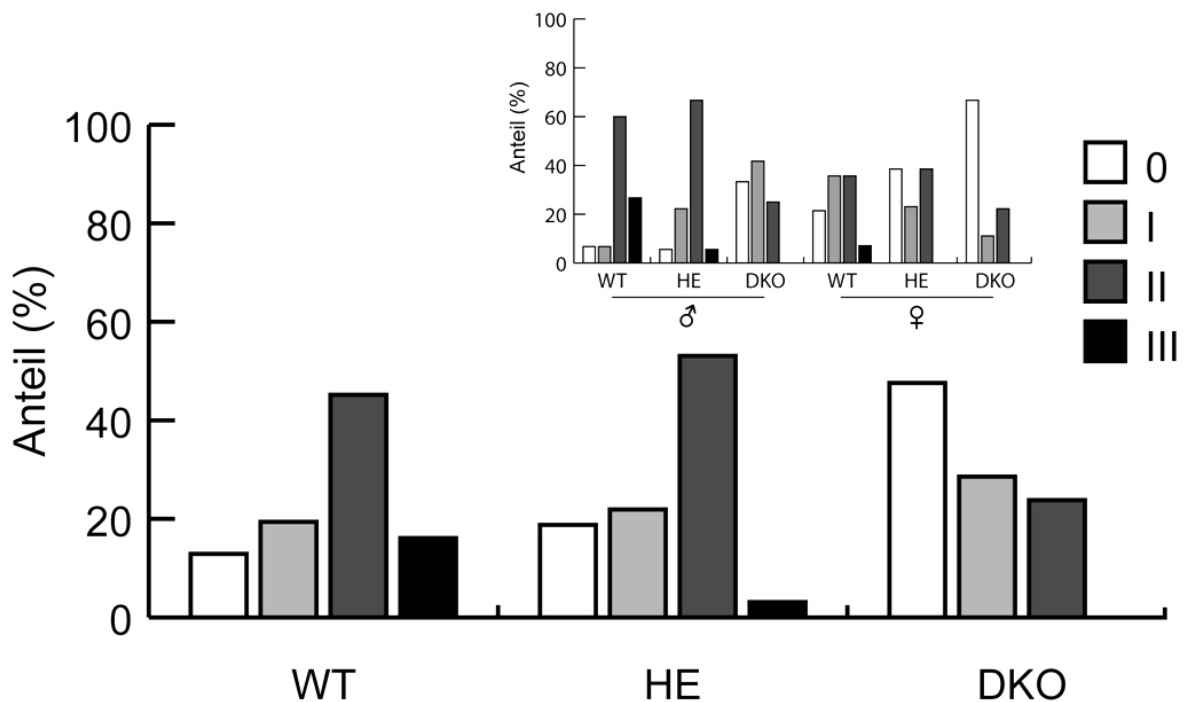


Abbildung 20 Staging der Leberzellverfettung. A – Anteil der Mäuse der jeweiligen Genotypen an Grad 0 bis III. n=30 B – Getrennte Auswertung von weiblichen und männlichen Mäusen der 3 Gruppen hinsichtlich des Grades der Leberzellverfettung. n=15, (p<0,0001, Fisher-Yates-Test)

Die WT-Mäuse wiesen nach 16 Wochen cholesterolreicher Diät häufiger stark eine Leberverfettung auf als DKO-Mäuse (WT 61,3% Grad II + III; DKO 76,2% Grad 0 + I). Die heterozygoten Mäuse zeigten ein ähnliches Bild, wie die WT-Tiere, jedoch mit abgeschwächter Ausprägung. Das Ausmaß der Verfettung bei männlichen Mäusen war generell wesentlich ausgeprägter als bei den Weibchen der gleichen Gruppe. Der Anteil der weiblichen WT-Mäuse (7,1%) an Grad III Verfettung ist wesentlich geringer als der der männlichen WT-Mäuse (26,7%). Im Gegenzug wiesen die weiblichen DKO-Mäuse einen höheren Anteil an Grad 0 auf (66,7%) als die männlichen (33,3%).

Durch Atomabsorptionsspektroskopie wurde der Gehalt von Kupfer, Eisen und Zink in der Leber der drei Versuchsgruppen bestimmt (Abbildung 21).

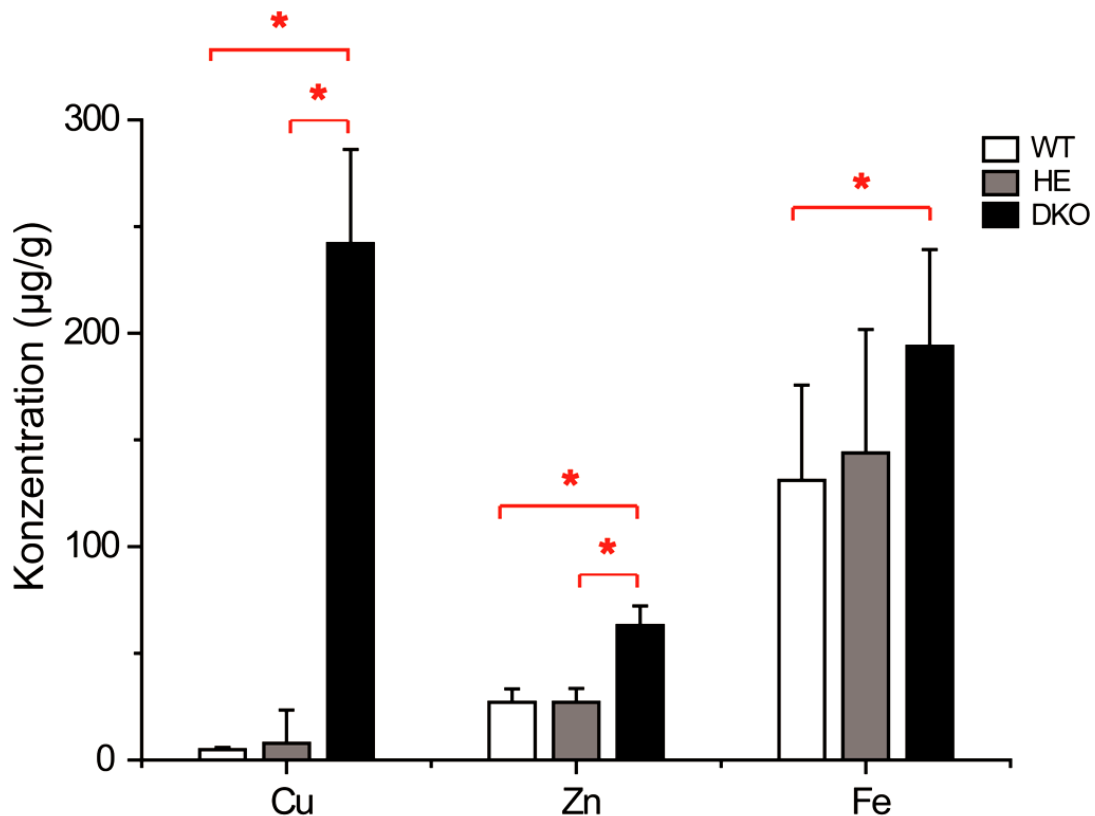


Abbildung 21 Kupfer-, Zink-, und Eisengehalt in der Leber der Mäuse. 20 Wochen alte WT-, HE- und DKO-Mäuse. Mittelwert±Standardabweichung * $p < 0,05$, $n=30$

DKO-Mäuse wiesen einen 40mal höheren Kupfergehalt in der Leber auf als WT-Mäuse. Außerdem ist die Zink- und Eisenkonzentration in den Doppel-*knockout*-Mäusen erhöht.

Fazit: LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Mäuse wiegen weniger als WT-Mäuse, dieser Unterschied ist bei männlichen Tieren signifikant. WT-Mäuse weisen eine ausgeprägte Steatose (Leberpathologie) auf, während DKO-Mäuse selten eine Fettleber ausbilden. Außerdem wurde bei den DKO-Mäusen ein erhöhter Kupfer-, Zink-, und Eisengehalt in der Leber festgestellt. Der Kupfergehalt ist 40x höher als im WT. Die erhöhten Kupferwerte im Lebergewebe der DKO-Mäuse sind mit den histopathologischen Veränderungen der Leberarchitektur assoziiert.

4.2.1.2 Genexpression in der Leber

Huster *et al.* haben 2008 in *Microarray*-Analysen gezeigt, dass durch die Kupferakkumulation die Genexpression in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus beeinflusst wird. Besonders Gene der Cholesterolsynthese waren betroffen. In weiblichen 6 Wochen alten *Atp7b*^{-/-}-Mäusen wurden 9 Gene dieses Syntheseweges vermindert exprimiert, darunter das geschwindigkeitsbestimmende Enzym, die HMG-CoA-Reduktase (HMGCR).

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der *Microarray*-Analysen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, dargestellt. Die Expression der 9 Gene des Cholesterolsyntheseweges wurde in *Atp7b*-defizienten Mäusen verglichen zu WT-Mäusen (C57/Bl6), *LDLR/Atp7b* Doppel-*knockout* verglichen zu *LDLR*-defizienten Mäusen und *LDLR/Atp7b* Doppel-*knockout*-Mäuse verglichen zum WT (C57/Bl6) untersucht.

Tabelle 5 Verminderte Expression von Enzymen beteiligt an der Cholesterolsynthese. In der Leber von 20 Wochen alten *Atp7b*^{-/-}-Mäusen und 20 Wochen alten weiblichen *LDLR*^{-/-}*Atp7b*^{-/-}-Mäusen, welche mit cholesterolreicher Diät gefüttert wurden. *p≤0,05

Gen	LDLR ^{+/+} <i>Atp7b</i> ^{-/-}	LDLR ^{-/-} <i>Atp7b</i> ^{-/-}	LDLR ^{-/-} <i>Atp7b</i> ^{-/-}
	vs. LDLR ^{+/+} <i>Atp7b</i> ^{+/+}	vs. LDLR ^{-/-} <i>Atp7b</i> ^{+/+}	vs. LDLR ^{+/+} <i>Atp7b</i> ^{+/+}
HMG-CoA-Reduktase (HMGCR)	1,9↓*	3,6↓*	1,3↓
Acetoacetyl-CoA-Synthase	3,1↓*	2,8↓	2,2↑
Isopentenyl-diphosphat-delta-Isomerase (Idi1)	2,9↓*	3,2↓	2,0↓
Mevalonat(diphospho)-Decarboxylase (MvD)	3,2↓*	3,1↓	1,17↓
Farnesyldiphosphat-Synthetase (FdS)	3,0↓*	3,0↓	1,1↑
Lanosterolsynthase	2,7↓*	2,9↓	1,2↓
HMG-CoA-Synthase (HMGCS)	3,4↓*	2,6↓	1,7↓
Farnesyl-diphosphat-farnesyl-Transferase	2,9↓*	2,2↓	1,0
Squalen-Epoxidase (Sqle)	2,7↓*	2,9↓	1,8↓

In den hier durchgeführten Analysen konnte die signifikant verminderte Expression aller 9 Cholesterolsynthesewegsgene in der *Atp7b*^{-/-}-Maus bestätigt werden. Diese Verminderung setzt sich ebenfalls in den *Atp7b*^{-/-}-Mäusen auf *LDLR*^{-/-}-Hintergrund durch. Hinsichtlich der Doppel-*knockout*-Tiere war das Ergebnis der *Microarray*-

Analyse jedoch nur im Fall der HMG-CoA-Reduktase auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant. Die HMGCR war in den DKO-Tieren verglichen zum WT 3,6fach vermindert exprimiert. Vergleicht man die LDLR^{-/-}Atp7b^{+/+} zur LDLR^{+/+}Atp7b^{+/+} so zeigt sich ein uneinheitliches Bild mit nicht signifikanter verminderter und erhöhter Expression der untersuchten Gene.

Um die Ergebnisse der *Microarray*-Analysen der Mausleber zu bestätigen, wurde für vier ausgewählte Gene der Cholesterolsynthese (HMGCR, HMGCS, Sqle, Idi1) eine RT-PCR mit Lebermaterial von DKO- und WT-Mäusen durchgeführt (Abbildung 22).

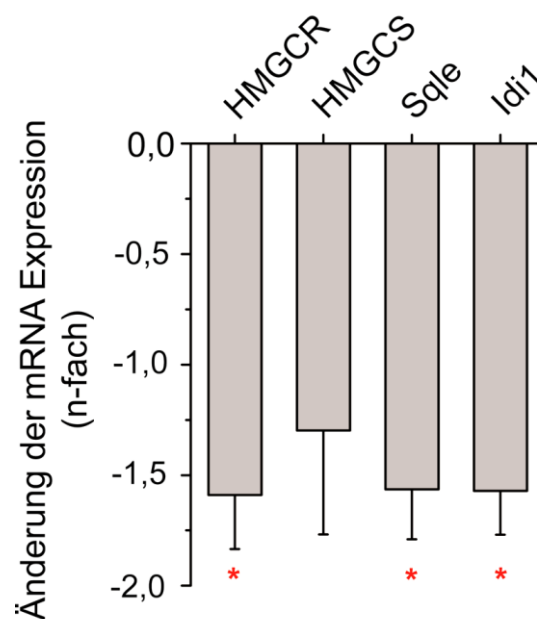


Abbildung 22 RT-PCR zur Expression von Enzymen der Cholesterolsynthese. Expression von HMG-CoA-Reduktase (HMGCR), HMG-CoA-Synthetase (HMGCS), Squalen-Epoxidase (Sqle) und Isopentenyl-diphosphat-Isomerase 1 (Idi1) in der LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Mausleber (DKO) im Vergleich zur LDLR^{-/-}Atp7b^{+/+}-Mausleber (WT). Mittelwert \pm Standardabweichung, $p \leq 0,05$, $n=15$

Für 3 dieser Gene (HMGCR, Sqle, Idi1) konnte die signifikant verringerte Expression auch hier bestätigt werden, nicht jedoch für das vierte getestete Gen, die HMG-CoA-Synthetase (HMGCS). Das Ausmaß der Verminderung in der RT-PCR war mit -1,6facher relativer Expressionsminderung jedoch nicht so hoch wie jene der *Microarray*-Analysen (2,6 – 3,6fach verminderte Expression).

4.2.1.3 Serumlipide in der LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Maus

Wie in Punkt 4.2.1.2 gezeigt, waren mehrere Gene des Cholesterolfstoffwechsels in der Leber der LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Mäuse vermindert exprimiert. Es wurde angenommen, dass dies Auswirkungen auf den Serum-Cholesterolspiegel hat. Um dies zu untersuchen, wurden die Serumlipide [Gesamt-Cholesterol, Triglyceride, *High-Density-Lipoprotein* (HDL), *Low-Density-Lipoprotein* (LDL) und *Very-Low-Density-Lipoprotein* (VLDL)] in den Seren der Mäuse bestimmt.

Die Bestimmung der Serumlipide der Mäuse erfolgte im Alter von 12 Wochen und am Ende des Experiments im Alter von 20 Wochen. In Abbildung 23 sind die Cholesterol- und Triglyceridgehalte der WT-/HE-/DKO-Mäuse je für Weibchen und Männchen unter der Standard-Haltungsdiät gezeigt.

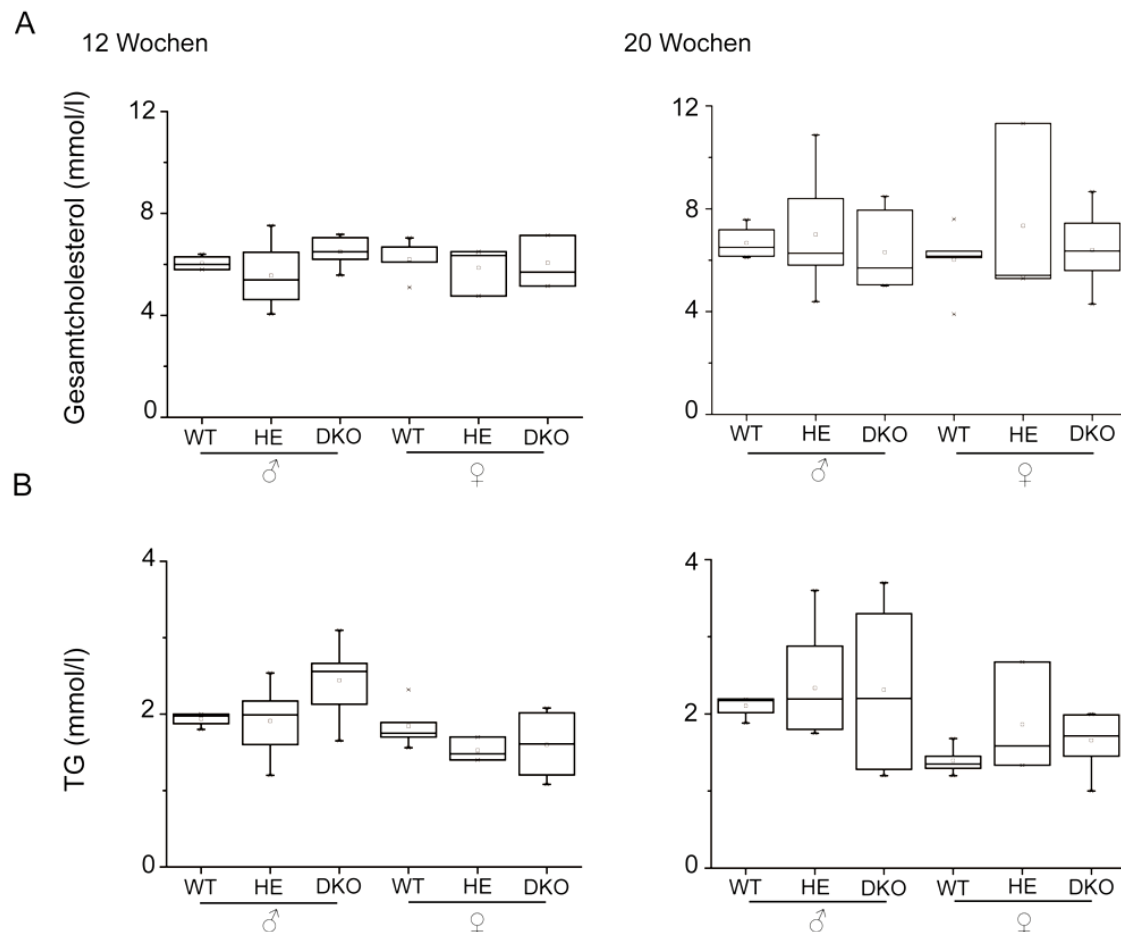


Abbildung 23 Gesamtcholesterol und Triglyceride im Serum unter Standard-Haltungsdiät. A – Gesamtcholesterol; B – Triglycerid (TG)-Gehalte der Seren männlicher und weiblicher Mäuse der verschiedenen Genotypgruppen im Alter von 12 und 20 Wochen. Darstellungsweise *boxplot*: die untere und obere Begrenzung einer Box entsprechen der 25% bzw. 75% Perzentile, 1% und 99% Perzentile sind durch die kleinen schwarzen Sterne repräsentiert. Die Linie und das kleine Quadrat innerhalb der Box stellen den Median bzw. den Mittelwert dar.

Der Gehalt an Cholesterol im Serum der drei Versuchsgruppen beträgt im Median $5,96 \pm 2,07$ mmol/l. Die Triglyceridwerte betragen im Median $1,87 \pm 0,07$ mmol/l. In weiblichen und männlichen Tieren einer Gruppe sind die Cholesterolwerte ähnlich. Nur bei den WT-Weibchen ist der Cholesterolgehalt im Alter von 12 Wochen und 20 Wochen geringer als bei den WT-Männchen. Der Triglyceridgehalt hingegen ist in den weiblichen Tieren aller Gruppen tendenziell geringer als in den männlichen Tieren.

Das Gesamtcholesterol weist im Alter von 12 und 20 Wochen keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3 Gruppen auf. Werden die Tiere der 3 Gruppen miteinander verglichen, zeigte sich jedoch ein Trend zu einem niedrigeren Triglyceridgehalt des Serums. Die 12 Wochen alten weiblichen HE- ($1,48 \pm 0,13$ mmol/l) und DKO-Tiere ($1,61 \pm 0,36$ mmol/l) wiesen einen geringeren TG-Gehalt im Vergleich zum WT ($1,75 \pm 0,26$ mmol/l) auf. Der TG-Wert der männlichen DKO-Tiere ($2,56 \pm 0,45$ mmol/l) ist hingegen im Vergleich zum WT ($1,98 \pm 0,08$ mmol/l) höher. Dieser Trend blieb auch im Alter von 20 Wochen erhalten, auffällig sind jedoch die großen Varianzen innerhalb der Gruppen.

Die Konzentrationen der einzelnen Lipoproteine HDL, LDL und VLDL im Serum von 12 und 20 Wochen alten Mäusen bei Standardhaltungsdiät ist in Abbildung 24 dargestellt. Auch hier zeigte sich im Alter von 20 Wochen eine beachtliche Varianz innerhalb der Gruppen.

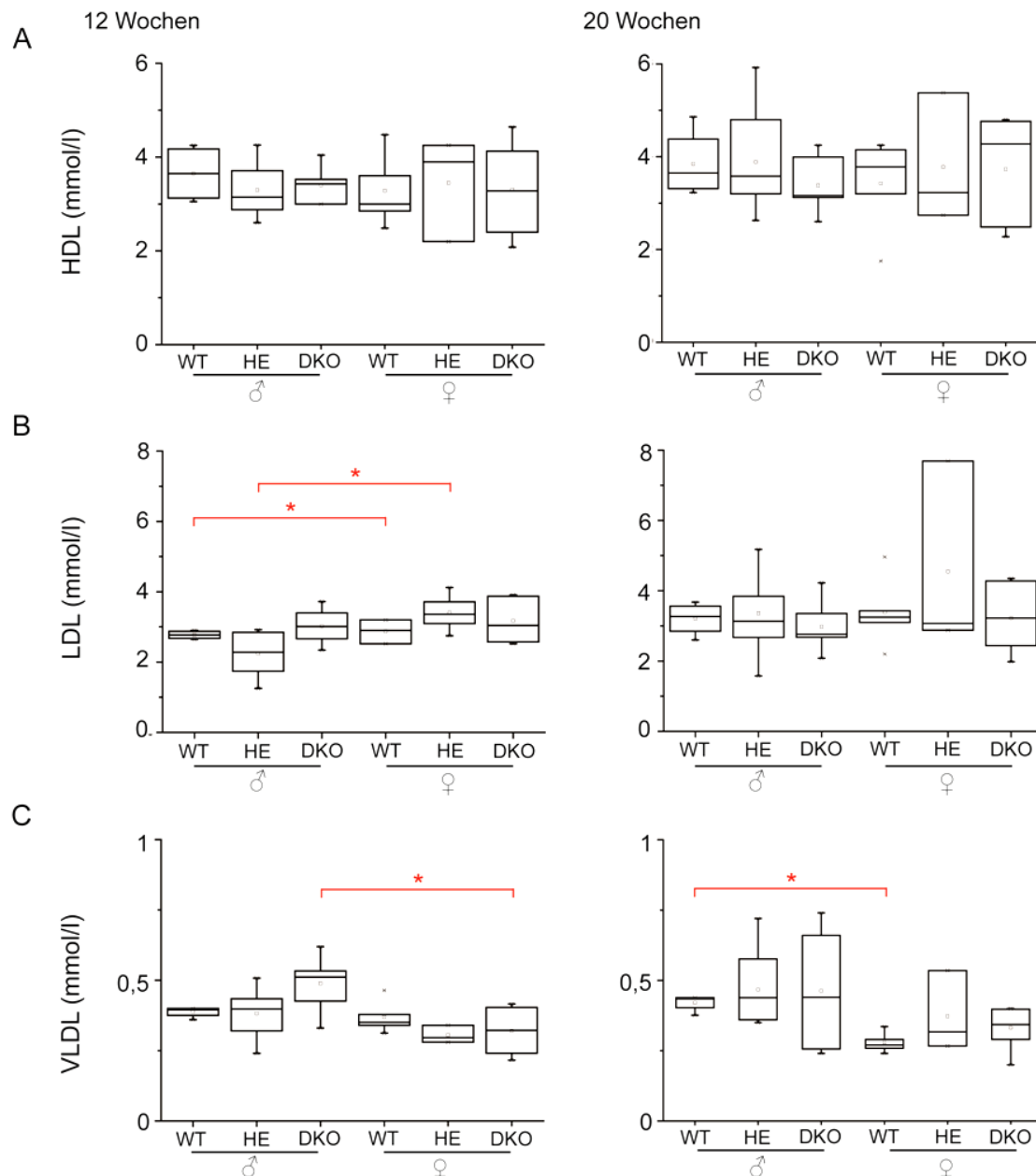


Abbildung 24 HDL-, LDL- und VLDL-Cholesterol im Serum unter Standard-Haltungsdiät. A – HDL-; B – LDL- und C – VLDL-Gehalt im Serum männlicher und weiblicher Mäuse nach 12 und 20 Wochen Standardhaltungsdiät. Darstellungsweise *boxplot*: die untere und obere Begrenzung einer Box entsprechen der 25% bzw. 75% Perzentile, 1% und 99% Perzentile sind durch die kleinen schwarzen Sterne repräsentiert. Die Linie und das kleine Quadrat innerhalb der Box stellen den Median bzw. den Mittelwert dar. * $p < 0,05$

In 12 Wochen alten Mäusen waren die Konzentrationen für HDL ($3,25 \pm 0,05 \text{ mmol/l}$), LDL ($2,82 \pm 0,34 \text{ mmol/l}$) und VLDL ($0,37 \pm 0,01 \text{ mmol/l}$) mit denen der 20 Wochen alten Tieren vergleichbar (HDL: $3,51 \pm 0,13 \text{ mmol/l}$, LDL: $3,09 \pm 0,22 \text{ mmol/l}$, VLDL: $0,36 \pm 0,04 \text{ mmol/l}$). Der HDL-Gehalt zeigte zudem keine Differenzen zwischen den Gruppen. Die LDL-Konzentration war in 12 Wochen alten WT- ($3,36 \pm 0,48 \text{ mmol/l}$) und HE- ($2,90 \pm 0,28 \text{ mmol/l}$) Weibchen höher als in WT- ($2,78 \pm 0,1 \text{ mmol/l}$) bzw. HE-

($2,28 \pm 0,56 \text{ mmol/l}$) Männchen ($p < 0,02$). DKO-Weibchen ($0,32 \pm 0,07 \text{ mmol/l}$) hatten im Alter von 12 Wochen geringere VLDL-Spiegel als die Männchen ($0,51 \pm 0,09 \text{ mmol/l}$, $p < 0,01$). Im Alter von 20 Wochen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den HDL- und LDL-Konzentrationen der Gruppen. Der VLDL-Gehalt war in 20 Wochen alten WT-Weibchen ($0,27 \pm 0,03 \text{ mmol/l}$) jedoch signifikant ($p \leq 0,05$) geringer als in den WT-Männchen ($0,43 \pm 0,03 \text{ mmol/l}$).

Um die Entwicklung der Atherosklerose in den LDLR-defizienten Mäusen zu beschleunigen, wurden je 30 Mäusen pro Gruppe nach dem Absetzen im Alter von 4 Wochen für 16 Wochen ausschließlich eine cholesterolreiche, semisynthetische Diät verabreicht. Der Cholesterolgehalt der Nahrung betrug 0,02%. Im Alter von 12 und 20 Wochen wurden die Lipide im Blutplasma bestimmt. Abbildung 25 zeigt die Gesamtcholesterol- und Triglyzeridkonzentration im Blutplasma der drei Versuchsgruppen.

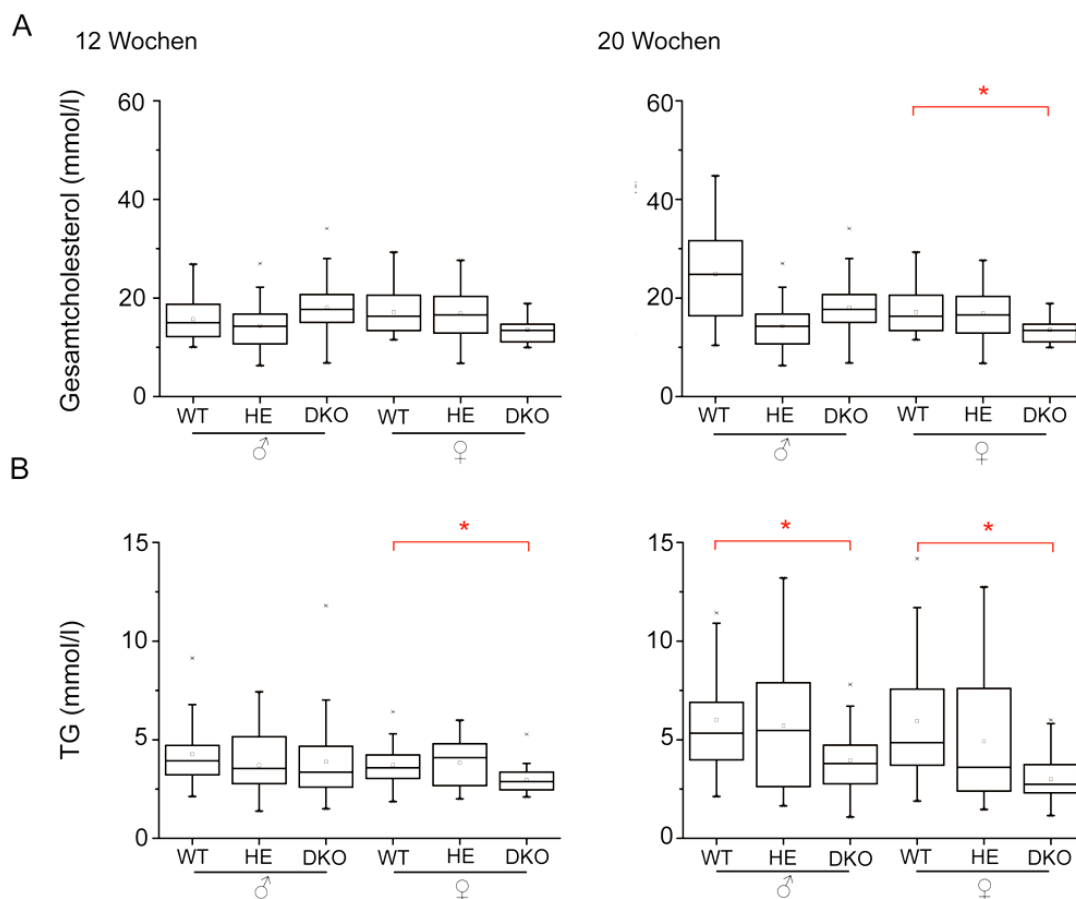


Abbildung 25 Gesamtcholesterol und Triglyzeride im Serum unter cholesterolreicher Diät. A – Gesamtcholesterol und B – Triglyzeridgehalt im Serum der WT-, HE-, DKO-Mäuse nach 12 und 20 Wochen. Darstellungsweise *boxplot*: die untere und obere Begrenzung einer Box entsprechen der 25% bzw. 75% Perzentile, 1% und 99% Perzentile sind durch die kleinen schwarzen Sterne repräsentiert. Die Linie und das kleine Quadrat innerhalb der Box stellen den Median bzw. den Mittelwert dar. * $p \leq 0,01$

Alle drei Genotypen hatten nach 12 Wochen einen mehr als doppelt so hohen Cholesterolverwert (Median aller 12 Wochen alten Mäuse: $15,94 \pm 4,49$ mmol/l) als die Mäuse unter Standard-Haltungsdiät ($5,96 \pm 0,27$ mmol/l). Im Alter von 20 Wochen stieg der mittlere Cholesterolverwert noch einmal stark auf $22,72 \pm 8,76$ mmol/l (Median aller 20 Wochen alten Tiere) an. Zu diesem Zeitpunkt hatten weibliche DKO-Mäuse ($19,38 \pm 4,8$ mmol/l) einen signifikant geringeren Cholesterolgehalt als weibliche WT-Mäuse ($27,38 \pm 6,91$ mmol/l). Der Triglyceridgehalt war unter cholesterolreicher Diät ebenfalls erhöht (von $1,87 \pm 0,07$ mmol/l unter Haltungsdiät auf $3,42 \pm 1,3$ mmol/l bei cholesterolreicher Diät in den 12 Wochen alten Mäusen). Hier wiesen die weiblichen DKO-Mäuse ($2,65 \pm 0,55$ mmol/l) schon im Alter von 12 Wochen signifikant geringere TG-Gehalte als der WT ($3,44 \pm 1,06$ mmol/l) auf. Mit 20 Wochen war der TG-Gehalt für männliche und weibliche DKO-Mäuse ($3,79 \pm 1,56$ mmol/l und $2,74 \pm 1,23$ mmol/l) signifikant geringer als in den WT-Mäusen ($5,33 \pm 2,6$ mmol/l bzw. $4,85 \pm 3,15$ mmol/l). Die Unterschiede waren nach Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test auf dem Niveau $p < 0,01$ signifikant. Auch bei der Fütterung der cholesterolreichen Diät waren die Varianzen innerhalb der Gruppen bei den 20 Wochen alten Mäusen sehr groß.

Die Konzentration der Fraktionen des Cholesterols in den Versuchsgruppen unter cholesterolreicher Diät ist in Abbildung 26 dargestellt.

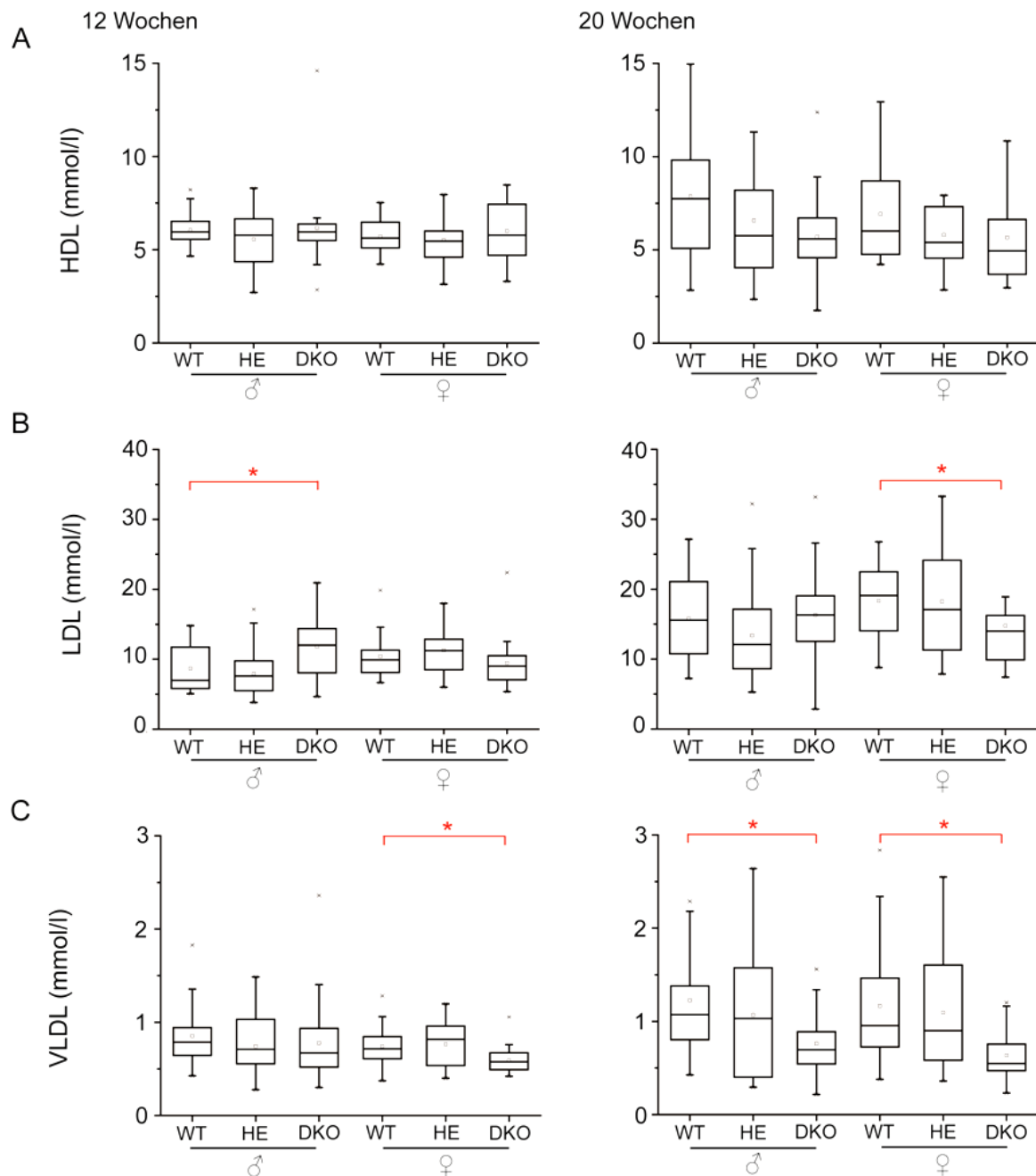


Abbildung 26 HDL-, LDL- und VLDL-Cholesterol im Serum unter cholesterreicher Diät. A – HDL-, B – LDL- und C – VLDL-Gehalt von 12 und 20 Wochen alten männlichen und weiblichen Mäusen der 3 Genotypgruppen. Darstellungsweise *boxplot*: die untere und obere Begrenzung einer Box entsprechen der 25% bzw. 75% Perzentile, 1% und 99% Perzentile sind durch die kleinen schwarzen Sterne repräsentiert. Die Linie und das kleine Quadrat innerhalb der Box stellen den Median bzw. den Mittelwert dar. * $p < 0,05$

Die Konzentration der Fraktionen des Cholesterols war in den mit der cholesterolreichen Diät gefütterten Mäusen höher (12 Wochen HDL: $5,69 \pm 1,37 \text{ mmol/l}$, LDL: $9,37 \pm 3,21 \text{ mmol/l}$, VLDL: $0,68 \pm 0,26 \text{ mmol/l}$) als bei jenen unter Haltdiät. Die Werte der Cholesterolfractionen der Mäuse im Alter von 20 Wochen waren wiederum höher (HDL: $5,84 \pm 2,58 \text{ mmol/l}$, LDL: $15,61 \pm 6,15 \text{ mmol/l}$,

VLDL: $0,86 \pm 0,5 \text{ mmol/l}$) als in 12 Wochen alten Mäusen, schwankten dafür aber innerhalb der Gruppen stärker. Für HDL konnten weder in 12 Wochen noch in 20 Wochen alten Mäusen signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen verzeichnet werden. Männliche DKO-Mäuse ($13,15 \pm 4,43 \text{ mmol/l}$) wiesen nach 12 Wochen höhere LDL-Spiegel als der WT ($7,00 \pm 3,15 \text{ mmol/l}$) auf. Dieser Unterschied konnte mit 20 Wochen nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu hatten die weiblichen DKO-Mäuse ($14,55 \pm 3,54 \text{ mmol/l}$) in diesem Alter weniger LDL als der WT ($19,29 \pm 5,01 \text{ mmol/l}$). Im Alter von 20 Wochen sind die VLDL-Konzentrationen höher als im Alter von 12 Wochen und weisen für WT und HE sehr starke Schwankungen auf. In den DKO-Mäusen blieben sie jedoch auf dem niedrigen Niveau der 12 Wochen alten Mäuse. Sie sind in weiblichen 20 Wochen alten DKO-Mäusen (männlich: $0,76 \pm 0,31 \text{ mmol/l}$, weiblich: $0,55 \pm 0,25 \text{ mmol/l}$) signifikant geringer als im WT (männlich: $1,07 \pm 0,52 \text{ mmol/l}$, weiblich: $0,97 \pm 0,63 \text{ mmol/l}$). Die Unterschiede sind nach Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test auf dem Niveau $p < 0,01$ signifikant.

Fazit: Die zusätzliche Deletion des *Atp7b*-Gens in weiblichen *LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}*-Mäusen, welche mit cholesterolreicher Diät gefüttert wurden, bewirkt eine Verringerung des Gesamtcholesterols, des LDL und VLDL. Die verringerte Expression der 9 Cholesterolsynthese-Gene ist in den weiblichen Tieren mit der Reduktion des Cholesterolgehalts im Serum assoziiert.

4.2.2 Atherosklerose

LDLR^{-/-}-Mäuse bilden bei Fütterung mit cholesterolreicher Diät vermehrt atherosklerotische Plaques in BCA und Aortenwurzel.[92] Der Einfluss der Atp7b-Deletion, der Kupferakkumulation und der daraus resultierenden verringerten Cholesterolsynthese auf die Ausbildung atherosklerotischer Plaques sollte im nächsten Schritt untersucht werden. Die Größe der atherosklerotischen Läsionen wurde histochemisch in Transversalschnitten der Brachiocephalarterie (BCA) und der Aortenwurzel bestimmt. Die individuelle Ausprägung der Läsionen innerhalb einer Gruppe variierte sowohl in BCA als auch in der Aortenwurzel stark.

Abbildung 27 stellt die Situation der atherosklerotischen Plaquebildung in der BCA von 20 Wochen alten Mäusen, welche mit der semisynthetischen cholesterolreichen Diät gefüttert wurden, dar.

Die Läsionsfläche in der BCA schwankt für alle Gruppen von $0\mu\text{m}^2$ bis $18.000\mu\text{m}^2$. Es trat keine Verringerung der Läsionsfläche in den DKO Mäusen auf, in männlichen DKO-Tieren ($7200\pm 5900\mu\text{m}^2$) kam es zu einer Zunahme der Läsionsfläche (Abbildung 26A) gegenüber des WT ($1900\pm 3300\mu\text{m}^2$). Die Läsionsfläche der weiblichen WT-Mäuse betrug im Median $3200\pm 4500\mu\text{m}^2$, die der weiblichen DKO-Mäuse war mit $2300\pm 2700\mu\text{m}^2$ tendenziell geringer, jedoch mit hohen Abweichungen behaftet.

In Abbildung 26B sind für WT und DKO exemplarisch je 2 BCA Schnitte (männlich/weiblich) gezeigt. In jeder Gruppe gab es mehrere Mäuse die keine Läsionen aufwiesen, jedoch auch Mäuse, bei welchen die Läsionen stark ausgeprägt waren (Abbildung 27).

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Größe der atherosklerotischen Läsionen in der Aortenwurzel (Abbildung 28).

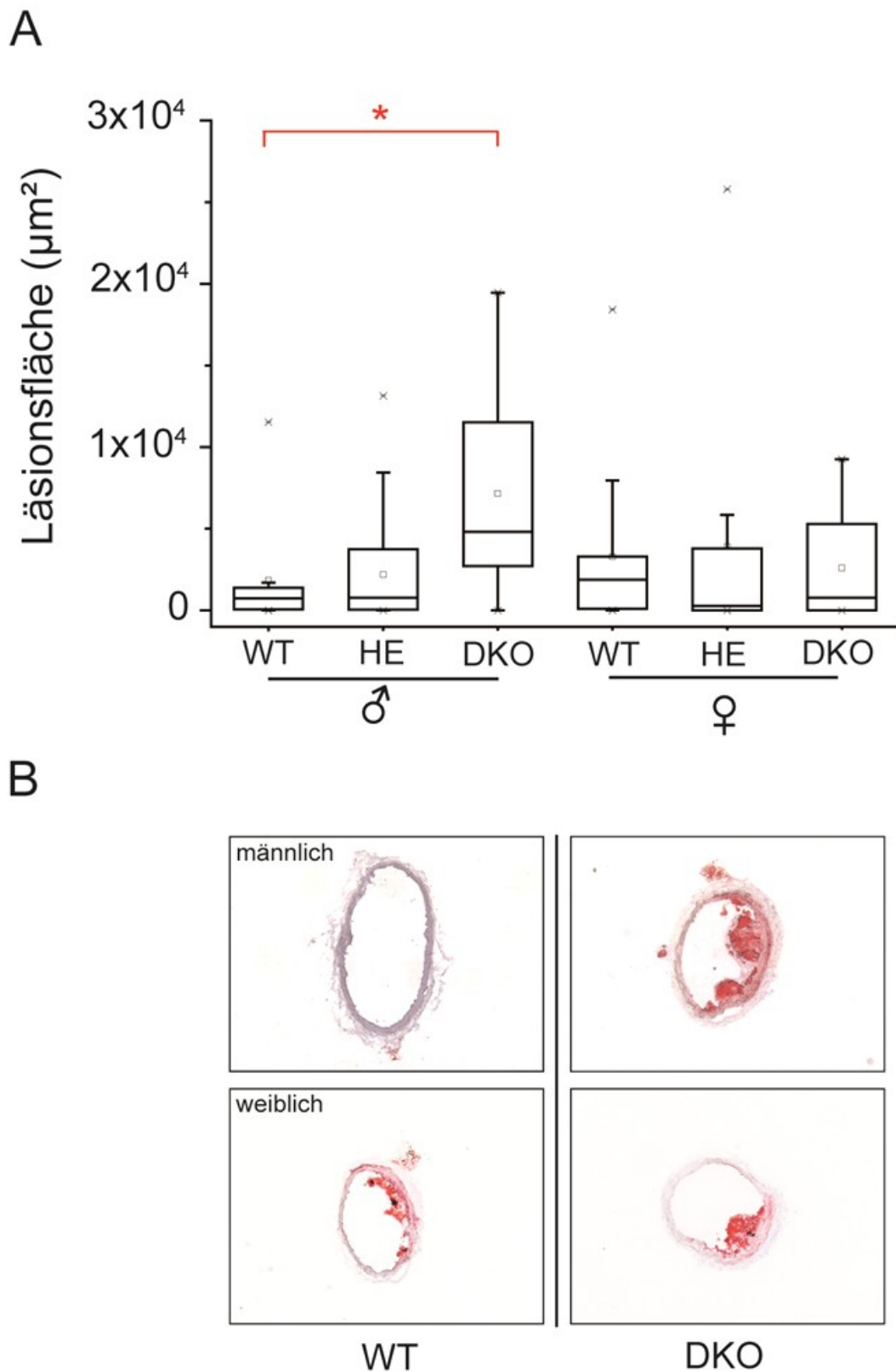
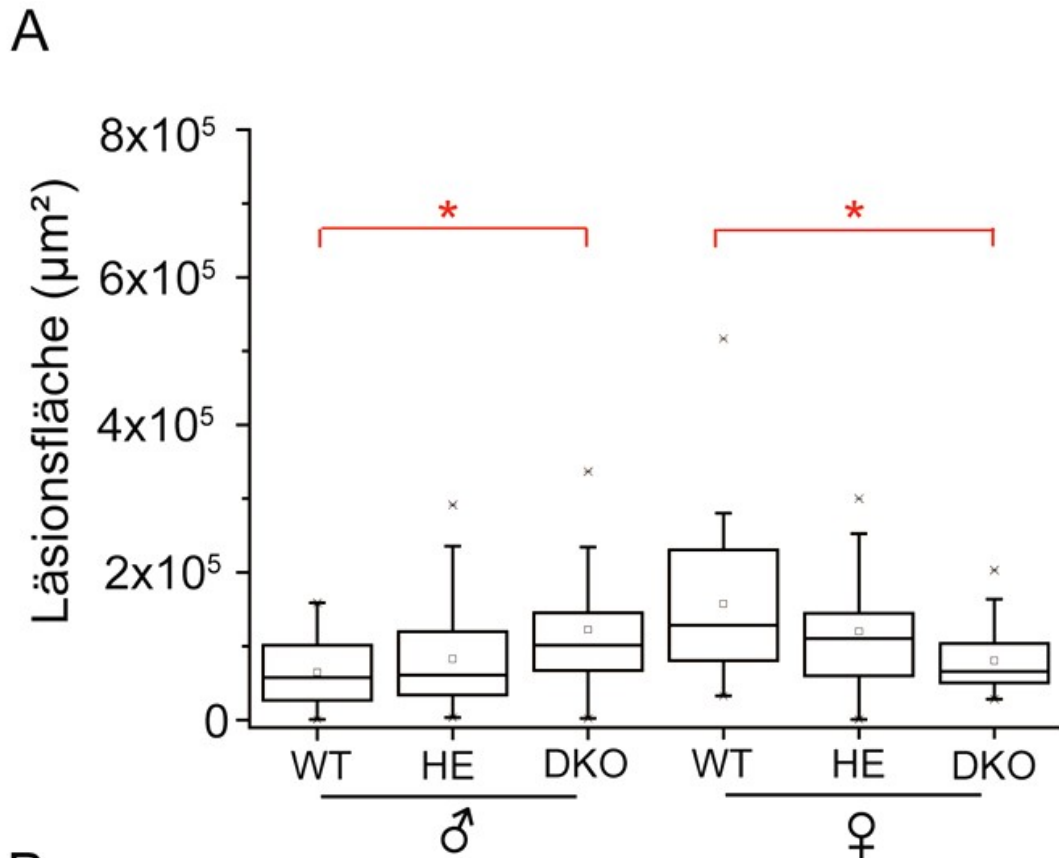


Abbildung 27 Atherosklerotische Läsionen der BCA. A – quantitative Auswertung der Läsionsfläche. Darstellungsweise *boxplot*: die untere und obere Begrenzung einer Box entsprechen der 25% bzw. 75% Perzentile, 1% und 99% Perzentile sind durch die kleinen schwarzen Sterne repräsentiert. Die Linie und das kleine Quadrat innerhalb der Box stellen den Median bzw. den Mittelwert dar. Angegeben ist die Fläche des BCA-Lumens, welche mit atherosklerotischen Läsionen gefüllt war. Kruskal-Wallis-, Mann-Whitney-U-Test. $*p \leq 0,05$ B – Je ein Beispiel der Läsionsfläche der Aortenwurzel aus einer männlichen und einer weiblichen WT- bzw. DKO-Maus, Ölrot, Vergrößerung 400x, $*p < 0,05$



B

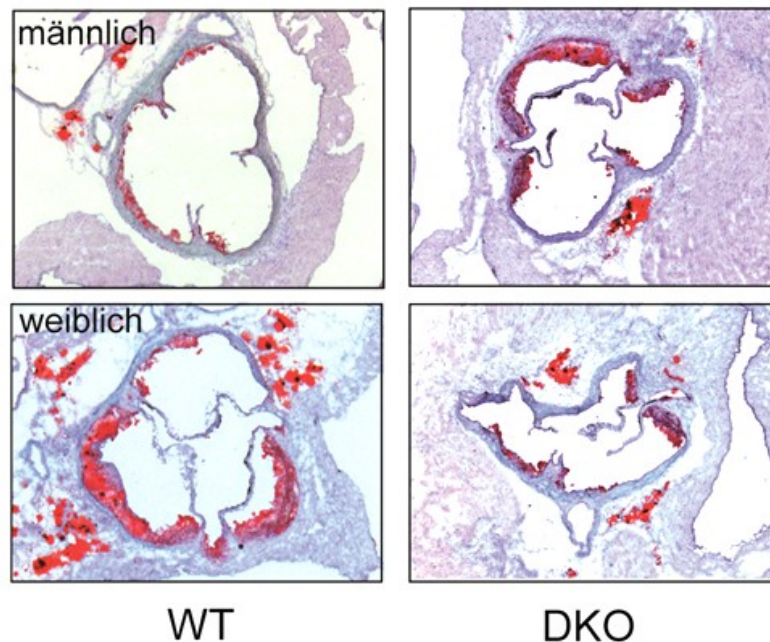


Abbildung 28 Atherosklerotische Läsionen in der Aortenwurzel. A – Quantitative Auswertung der Läsionsfläche. Darstellungsweise *boxplot*: die untere und obere Begrenzung einer Box entsprechen der 25% bzw. 75% Perzentile, 1% und 99% Perzentile sind durch die kleinen schwarzen Sterne repräsentiert. Die Linie und das kleine Quadrat innerhalb der Box stellen den Median bzw. den Mittelwert dar. Angegeben ist die Fläche des Aortenwurzellumens, welche mit atherosklerotischen Läsionen gefüllt war. Kruskal-Wallis-, Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0,05$. B – Je ein Beispiel der Läsionsfläche der Aortenwurzel aus einer männlichen und einer weiblichen WT bzw. DKO Maus, Ölrot, Vergrößerung 200x, $*p < 0,05$

Die Läsionsflächen der Aortenwurzel waren generell größer als in der BCA (20.000 μm^2 bis 300.000 μm^2). Es wurde eine signifikante Reduktion (*Kruskal-Wallis, Mann-Whitney-U*, $p \leq 0,05$) der Läsionsfläche in den weiblichen DKO-Mäusen (71400 \pm 36500 μm^2), verglichen mit dem weiblichen WT (143300 \pm 79000 μm^2), gemessen. Die männlichen DKO-Mäuse (125600 \pm 80800 μm^2) wiesen jedoch, wie schon in der BCA, signifikant größere Läsionen (*Kruskal-Wallis, Mann-Whitney-U-Test*, $p \leq 0,05$) im Vergleich zu den männlichen WT-Tieren (72300 \pm 45900 μm^2) auf (Abbildung 28A). Auch hier gab es individuelle Varianzen hinsichtlich der Läsionsgröße innerhalb einer Gruppe, diese waren aber nicht so stark ausgeprägt wie im Fall der BCA. Exemplarisch sind in Abbildung 28B Schnitte der Aortenwurzel mit ölotgefärbter Läsionsfläche männlicher und weiblicher WT- bzw. DKO-Mäuse dargestellt.

Fazit: Die atherosklerotischen Läsionsflächen in der BCA und der Aortenwurzel wiesen starke individuelle Unterschiede auf. In der BCA der weiblichen LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Mäuse konnte keine Verringerung der Läsionsfläche im Vergleich zum Atp7b-WT nachgewiesen werden. Männliche Doppel-*knockout*-Tiere zeigten eine Zunahme der Läsionsgröße. In der Aortenwurzel hingegen wiesen weibliche LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Mäuse signifikant kleinere Läsionen auf als der Atp7b-WT. Männliche Doppel-*knockout*-Tiere besaßen, wie in der BCA, größere Läsionen.

4.3 Morbus-Wilson-Patienten

Morbus Wilson ist eine rezessiv vererbte Stoffwechselstörung, die mit einer Inzidenz von 1:30.000 angegeben wird. Die primären Symptome betreffen die Leber und das Gehirn. Für die in dieser Arbeit untersuchten Prozesse – Tumorentstehung und Störung des Lipidstoffwechsels – sind Beobachtungen und zum Teil auch erste Studien am Patienten bekannt.[36], [99] Die Inzidenz für intrahepatische Tumore scheint in Morbus-Wilson-Patienten etwas höher zu sein als in gesunden Kontrollen. In einer *Follow-up*-Studie (>10 Jahre) von Walshe *et al.* entwickelten 5,7% der beobachteten Morbus-Wilson-Patienten Tumore in der Leber.[36] Durch frühe Therapie oder Lebertransplantationen sind die Patienten jedoch selten einer andauernden, hohen Kupferkonzentration ausgesetzt. In Hinblick auf die Herz-Kreislaufkrankungen existiert die auf Beobachtungen basierende Hypothese, dass Morbus-Wilson-Patienten im Vergleich zu Normalpersonen (nicht-Morbus Wilson) nur selten an Atherosklerose und deren Folgeerscheinungen erkranken. Daher sollte abschließend untersucht werden, ob die Ergebnisse aus der Untersuchung der *Atp7b*^{-/-}-Maus auch auf Morbus-Wilson-Patienten übertragen werden können.

4.3.1 Expression tumorassoziierter Gene in der Leber von Morbus-Wilson-Patienten

Lebergewebe von Morbus-Wilson-Patienten wurde zur Untersuchung der Expression bekannter tumorassoziierter Gene einer *Microarray*-Expressionsanalyse unterzogen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Expression der Gene im Gewebe von Morbus-Wilson-Patienten wurde verglichen zu Kontroll-Lebergewebe¹.

Tabelle 6 Expressionsänderung ausgewählter Gene in Morbus-Wilson-Patienten. Im Vergleich zu Kontroll-Lebergewebe¹. Die Werte geben das Ausmaß der Expressionsänderung an, der Pfeil beschreibt die Richtung dieser Änderung (↑ verstärkte Expression; ↓ verminderte Expression). Die Werte sind auf der Ebene $p < 0,05$ signifikant (Wilcoxon Test). $n=3$.

Gen	n-fach
CD44	5.7↑
Keratin 19	4.32↑
Keratin 7	6.5↑
CLDN7	1.9↑
COL1A1	10.7↑
COL1A2	17.2↑
EPCAM	16.9↑
LGALS3	11.8↑
MMP2	2.4↑
MMP7	12.3↑

Auch in den Hepatozyten der Morbus-Wilson-Patienten wurden einige der in den Lebertumoren der Mäuse gefundenen Gene verändert exprimiert. Unter anderem war die Expression von Keratin 7 (6,5fach) und Keratin 19 (4,32fach), EPCAM (16,9fach), Claudin 7 (1,9fach) und MMP7 (12,3fach) auf mRNA-Ebene signifikant verstärkt verglichen mit humanem Lebergewebe von Nicht-Morbus-Wilson-Kontrollen (Signifikanzniveau $p < 0,05$) (Tabelle 6).

4.3.2 Lipidmetabolismus in Morbus-Wilson-Patienten

Aufgrund klinischer Beobachtung der Morbus-Wilson-Patienten wird vermutet, dass diese weniger oft an Atherosklerose und deren Folgeerscheinungen leiden als Individuen, welche den Defekt des *ATP7B*-Gens nicht tragen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde zunächst die Expression der Cholesterolsynthesegene im Lebergewebe der Patienten untersucht und außerdem das Lipidprofil des Serums dieser Patienten bestimmt.

¹ Leberproben aus intaktem Gewebe, welches im Zuge der Entfernung von Lebermetastasen als „Sicherheitsabstand“ entnommen wurde. Für die Verwendung dieses Materials lag ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Leipzig vor.

4.3.2.1 Expression von Genen der Cholesterolsynthese in der Leber

Die *Microarray*-Analyse des humanen Morbus-Wilson-Lebergewebes hinsichtlich der Cholesterolsynthesewegsgene ergab für fünf der neun in den *Atp7b*^{-/-}-Mäusen untersuchten Gene ebenfalls eine verminderte Expression (HMGCR 2,3fach, *Idi1* 3,0fach, *FdS* 1,8fach, HMGCS 7,1fach und *Sqle* 1,2fach), verglichen mit den Nicht-Morbus-Wilson-Kontrollen (Tabelle 7).

Tabelle 7 Verminderte Expression von Enzymen beteiligt an der Cholesterolsynthese. In der Leber von Morbus-Wilson-Patienten, verglichen zur Kontrolle. n=3, *p≤0,05, /-keine Expressionsänderung.

Gen	n-fach
HMG-CoA-Reduktase (HMGCR)	2,3↓
Acetoacetyl-CoA-Synthase	/
Isopentenyl-diphosphat-delta-Isomerase (<i>Idi1</i>)	3,0↓*
Mevalonat(diphospho)-Decarboxylase (MvD)	/
Farnesyldiphosphat-Synthetase (<i>FdS</i>)	1,8↓
Lanosterolsynthase	/
HMG-CoA-Synthase (HMGCS)	7,1↓*
Farnesyl-diphosphat-farnesyl-Transferase	/
Squalen-Epoxidase (<i>Sqle</i>)	1,2↓

4.3.2.2 Serumlipidzusammensetzung bei Morbus-Wilson-Patienten

Die Serumlipidwerte (Gesamt-Cholesterol, Triglyzeride, HDL, LDL) der Morbus-Wilson-Patienten wurden mit einer alters- und geschlechtsangepassten Kontrollgruppe, ohne *ATP7B*-Gendefekt, verglichen. Sowohl die weiblichen als auch die männlichen Morbus-Wilson-Patienten wiesen ein signifikant geringeres Gesamt-Cholesterol auf als die Kontrollen. LDL war nur bei weiblichen Patienten signifikant verringert (Tabelle 8 und Abbildung 29).

Tabelle 8 Serumlipidgehalte von weiblichen und männlichen Morbus Wilson Patienten. Serumlipidgehalte der Patienten, verglichen mit alters – und geschlechtsangepassten Kontrollen (C). Angegeben ist der Median±Standardabweichung. Weiblich jeweils n=30 pro Gruppe, männlich jeweils n=24 pro Gruppe, *p<0,05

	Cholesterol (mmol/l)	Triglyzeride (mmol/l)	HDL (mmol/l)	LDL (mmol/l)
C weiblich	5,91±1,35	1,32±1,35	1,53±0,63	3,16±1,06
C männlich	6,34±1,33	2,51±3,30	1,14±0,26	3,95±1,36
WD weiblich	4,92±1,16 *	1,22±0,57 *	1,62±0,95	2,77±0,98 *
WD männlich	5,24±1,01 *	1,63±0,75 *	1,24±0,26 *	3,31±0,95

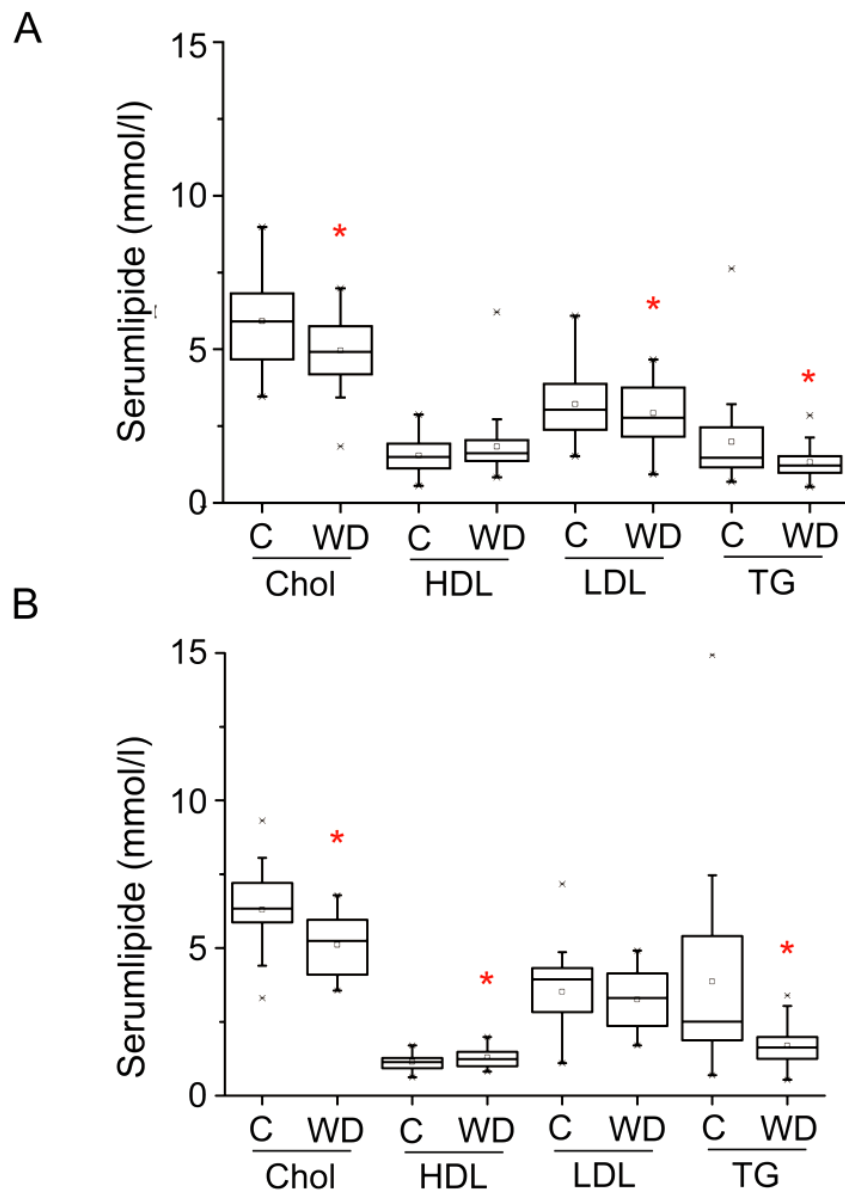


Abbildung 29 Serumlipide in Morbus-Wilson-Patienten. A – Frauen; B – Männer. C=Kontrolle, WD=Morbus-Wilson-Patient/in, Chol=Cholesterol, HDL=*high density lipoprotein*, LDL=*low density lipoprotein*, TG=Triglyceride. Weiblich jeweils n=30 pro Gruppe, männlich jeweils n=24 pro Gruppe, * $p \leq 0,05$

Fazit: Die Expression tumorassoziiertes Gene war in der Leber der Morbus-Wilson-Patienten erhöht. Hinsichtlich des Lipidmetabolismus waren zwei der neun im Mausmodell gefundenen Gene bei den Morbus-Wilson-Patienten ebenfalls signifikant vermindert exprimiert. Sowohl weibliche als auch männliche Patienten wiesen einen geringeren Gesamtcholesterol- und Triglyzeridgehalt des Serums als normale Kontrollpersonen auf.

5 Diskussion

Kupfer ist ein essentielles Spurenelement und ein funktionell bedeutender Bestandteil vieler Enzyme. In zu hohen Konzentrationen ist es jedoch toxisch für den Organismus.[4] Eine Erkrankung, die mit Kupferakkumulation und -toxizität assoziiert wird, ist der Morbus Wilson. Diese hereditäre Krankheit folgt einem autosomal rezessiven Erbgang.[37] Ursache des Morbus Wilson sind Mutationen des *ATP7B*-Gens, welche in einem Funktionsverlust der ATPase ATP7B resultieren. ATP7B wird vor allem in Leber und Gehirn exprimiert, wo es für die Kupfersekretion und -exkretion aus der Zelle verantwortlich ist. Durch den Funktionsverlust steigt der Kupfergehalt in den Zellen an und diese Kupferakkumulation in Leber und Gehirn verursacht Symptome wie Hepatitis, Leberzirrhose, Leberversagen und neurologisch-neuropsychiatrische Symptome.[100] Ein Modell des Morbus Wilson ist die *Atp7b*^{-/-}-Maus. In dieser Maus ist das korrespondierende Gen deletiert, was zu einem Verlust des *Atp7b*-Proteins führt. Es kommt zu erhöhten Kupferkonzentrationen in den Hepatozyten.[51] Valide Daten zu zerebralen Kupferkonzentrationen fehlen. Während neurologische Störungen nur minimal ausgeprägt sind (vgl. Einleitung), kommt es zu hepatischen Störungen, mit ausgeprägter chronischer Entzündung in der Leber, aber auch Regeneration normalen Lebergewebes und neoplastischer Proliferation.[52] Der weiteren Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Prozesse widmete sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit.

Kupfer verändert außerdem die Genexpression in der Leber dieser Mäuse. Vor allem Gene des Cholesterolfstoffwechsels sind betroffen. Besonders Gene von wichtigen Enzymen des Cholesterolf-Biosyntheseweges werden vermindert exprimiert.[53] Dies führt zu einer Deregulation der Serumcholesterolf- und Triglyzeridkonzentrationen. Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit den Auswirkungen der verminderten Expression der Cholesterolsynthese-Gene auf die Serumlipidkonzentrationen und die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in der *Atp7b*^{-/-}-Maus auf einem LDLR-defizienten Hintergrund. Die LDLR^{-/-}-Maus ist ein Tiermodell der Atheroskleroseentstehung. In diesen Mäusen entwickeln sich unter normaler Diät langsam atherosklerotische Läsionen vor allem in der Aorta, der Aortenwurzel und der Brachiocephalararterie. Diese Entwicklung kann durch die Fütterung cholesterolfreicher Nahrung beschleunigt werden.[92] Ferner wurden Analysen der Genexpression in der

Leber und Lipidzusammensetzung des Blutplasmas von Morbus-Wilson-Patienten durchgeführt, um die Analogie der Ergebnisse des Mausmodells auf den Menschen zu prüfen.

5.1 Tumorentstehung

5.1.1 Tumorcharakterisierung

Ein wichtiges Tiermodell für den Morbus Wilson und die damit verbundene Kupfer-toxizität ist die *Atp7b*^{-/-}-Maus. Es wurde beobachtet, dass diese Mäuse ab einem Alter von ca. 40 Wochen Lebertumore entwickeln.[51], [52] Aus welchem Zelltyp diese Tumoren entstehen war bis jetzt allerdings unklar. Zur Klärung dieser Frage wurde die Genexpression in den Hepatozyten hinsichtlich bekannter Gene, welche in der Karzinogenese eine Rolle spielen, untersucht. Durch den Vergleich von Expressionsprofilen in Lebertumoren der *Atp7b*^{-/-}-Mäuse mit Lebergewebe aus Wildtyp-Mäusen wurden 169 different exprimierte Gene identifiziert. Darunter befinden sich auch bekannte Biomarker des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) und Cholangiokarzinoms (CC).

Die mRNA-Gehalte der Transmembranproteine Claudin7[101] und TMEM45[102] sowie die mRNA des MMP7, welches in der epithelialen-mesenchymalen Transition eine Rolle spielt, waren deutlich erhöht.[103], [104] Die verstärkte Expression von MMP7 wurde in Tumoren, auch im HCC, bereits mehrmals beschrieben.[105], [106] Der Verlust der Claudin7-Expression wurde in Karzinomen epitheliären Ursprungs berichtet.[107] In neueren Studien wurde auch die Überexpression des Proteins in Zusammenhang mit der Tumorprogression gebracht.[108–110]

Außerdem ist in den *Atp7b*-defizienten Hepatozyten der Maus die mRNA-Menge von EPCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) 11fach erhöht. EPCAM ist ein Glykoprotein, welches in Epithelzellen exprimiert wird, wo es homophile Interaktionen zwischen Epithelzellen vermittelt. In vielen Karzinomen wurde eine Überexpression beschrieben.[111] Es spielt in der Progression verschiedener Karzinome eine gegensätzliche Rolle. Zum einen kann es der Metastasierung entgegenwirken, indem es die bereits erwähnten homophilen Interaktionen bildet, zum anderen ist EPCAM jedoch auch für die Zerstörung der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zellbindung verantwortlich

und fördert auf diese Weise Metastasierung. Hinzu kommt, dass eine Koexpression von EPCAM und Claudin7 die homophile EPCAM-Interaktion behindert und auf diese Weise ebenfalls die Bildung von Metastasen begünstigt.[110] Außerdem wirkt der intrazelluläre Anteil des Proteins fördernd auf die positive Regulation des cMyc-Signalwegs, was eine positive Rolle in der Entstehung und Progression eines Karzinoms nahelegt.[111] Besonders die Beteiligung von EPCAM an Tumorfördernden Signalkaskaden macht dieses Molekül interessant für Therapiekonzepte. In EPCAM-überexprimierenden Karzinomen kann eine Hemmung der EPCAM-Expression hilfreich sein. Epigenetische Einflüsse (z.B. DNA-Methylierung, Histonmodifikationen) haben großen Einfluss auf die Expression von EPCAM. Hier könnte ein Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen liegen. So kann zum Beispiel die DNA-Methylierung des *EPCAM*-Gens die Expression von EPCAM herunterregulieren.[112] Methylierungsorte sind meist Guanin-Cytosin-Dinukleotide (CpGs), welche selten im Genom vorkommen, dafür aber dazu neigen in der 5'-regulatorischen Region (=Promotorregion) vieler Gene zu *clustern*. Werden diese CpG-Cluster methyliert, wird die Transkription dieses Gens unterbunden. Im Falle des *EPCAM*-Gens wird die Methylierung von p53 aufrechterhalten. Wird p53 inaktiviert, so geht die Methylierung des *EPCAM*-Promotors verloren und das *EPCAM*-Gen wird transkribiert. Der Methylierungsstatus kann medikamentös beeinflusst werden.[113–115]

Auch in der Entstehung und Progression von hepatozellulären Karzinomen spielt EPCAM eine Rolle.[116] Yamashita *et al.* definierten 2008 aufgrund des Expressionsmusters von EPCAM neue Subtypen des HCC, welche Aufschluss über die zelluläre Herkunft des HCC und darin aktivierte Signalwege geben. Dies spielt wiederum eine wichtige Rolle in der therapeutischen Strategie und hat prognostischen Wert.[117] EPCAM wird in der adulten Leber nur von Cholangiozyten exprimiert. Während der Embryogenese wird es auch von Hepatozyten exprimiert. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass in der zirrhotischen Leber proliferierende Gallengangszellen, welche aus hepatischen Vorläuferzellen (HPC) entstehen, EPCAM exprimieren.[118] Sowohl hepatische Stammzellen, als auch HPC sind EPCAM-positiv.[119] Yamashita *et al.* konnten EPCAM-positive und -negative HCC Subtypen unterscheiden. EPCAM⁺-HCC haben ein bestimmtes Genexpressionsmuster, welches u. a. die verstärkte Expression des HPC-spezifischen Markers CK19 und von β -catenin beinhaltet. Außerdem wurde

eine Aktivierung des Wnt-Signalweges, besonders die cMyc-Aktivierung, beschrieben. Dieses Expressionsmuster führt zu der Vermutung, dass EPCAM⁺-HCC aus hepatischen Progenitorzellen entstanden sind, da sich der Phänotyp sehr ähnelt.[117]

Außerdem spielt die Expression des α -Fetoproteins (AFP) eine wichtige Rolle. AFP wird unter physiologischen Bedingungen nicht von Cholangiozyten exprimiert und ist daher als HCC-Marker bekannt.[120] 60% aller HCCs exprimieren AFP.[121] Maligne Zellen, welche ihren Ursprung in Cholangiozyten haben, sind nach Yamashita *et al.* EPCAM-positiv und AFP-negativ. EPCAM-positive und AFP-positive Zellen hingegen sprechen wieder für einen Vorläufer-/Stammzellursprung (HPC) der Tumoren.[117] Das α -Fetoprotein (AFP) ist in der Leber der Atp7b^{-/-}-Maus 15fach verstärkt exprimiert. Diese Ergebnisse decken sich mit denen, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden. Nach Yamashita *et al.* könnten die Lebertumoren der Atp7b^{-/-}-Maus also als *hepatic stem cell like* HCC (EPCAM⁺-AFP⁺-HCC) klassifiziert werden.

Von besonderem Interesse ist auch die verstärkte Expression der Cytokeratine CK7 (6fach hochreguliert) und CK19 (13fach hochreguliert). Beide Proteine gelten ebenfalls als biliäre/hepatische Progenitorzellmarker (HPC).[122] CK7 und CK19 werden im adulten Organismus nur von HPC und Cholangiozyten exprimiert.[123] Dabei ist, wie bisher angenommenen, die Expression der Cytokeratine nicht nur auf CC begrenzt – auch HCC exprimieren CK7 und CK19. Ramalho *et al.* beschreiben die Expression von CK19 in CC und HCC.[124]

Weitere wichtige, an der Karzinogenese beteiligte Proteine, die verstärkt exprimiert werden, sind CD44 und SPP1. CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches Zell-Zell- und Zell-Matrixadhäsion vermittelt.[125] Es wird in vielen Tumoren, auch im HCC und CC, verstärkt exprimiert.[126] CD44 ist außerdem beteiligt am bereits beschriebenen EPCAM-Claudin7-Komplex, welcher die Migration von Krebszellen fördert. [109] SPP1 spielt ebenfalls eine Rolle in der Pathophysiologie des HCC. Es aktiviert die Expression der Matrixmetallopeptidase 2 (MMP-2) über den Chemokinrezeptor CXCR4 (*chemokine receptor 4*).[127] SPP1 (oder Osteopontin, OPN) ist ein Cytokin, welches mit Integrinen und CD44 interagiert. Es ist für die Aktivierung verschiedener Signalwege verantwortlich, welche Prozesse wie Inflammation, Zelladhäsion, Migration und Tumorstadium fördern.[128]

Neben den bisher erwähnten Biomarkern, die durch erhöhte Expression Subtypen von Leberkarzinomen identifizieren oder generell in Tumoren verstärkt exprimiert werden, sind weitere Gene in den *Atp7b*^{-/-}-Mauslebern herabreguliert, welche bereits als im HCC vermindert exprimiert beschrieben wurden. Dazu zählen das *CAAT/enhancer protein α* (C/EBP-α (2,4fach vermindert exprimiert), der *hepatocyte-nuclear-factor 4* (HNF-4 (2,2fach vermindert) und das *CEA-cell adhesion molecule* (CEACAM (3,3fach vermindert)).[129–131]

Die Analyse der Expressionsdaten legt bereits einen Ursprung der Tumore aus hepatischen Vorläuferzellen (HPC) nahe. Weitere unveröffentlichte Ergebnisse an Lebern der *Atp7b*^{-/-}-Maus weisen auf eine verstärkte Proliferation von Gallengängen und Ovalzellen in 6 und 60 Wochen alten Mäusen hin (persönliche Mitteilung Craig Dorell, Ph.D., OHSU, Portland, OR, USA). Dies stützt die eigenen Expressionsdaten. Für eine sichere Aussage zum Ursprung der Tumore sind jedoch weiterführende histologische und proteinchemische Untersuchungen der Tumore in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus erforderlich.

5.1.2 Mechanismen der kupferinduzierten Tumorentstehung

Die Kupferakkumulation in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus führt zu chronischer Entzündung und neoplastischer Proliferation.[52] Welche Signalwege an dieser neoplastischen Proliferation beteiligt sind, war bisher jedoch unklar. Zudem war nicht näher untersucht, ob die Kupferakkumulation oder die, durch die erhöhte Kupferkonzentration ausgelöste, chronische Entzündung das Tumorstadium bedingt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen der Tumorentstehung in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus auf Ebene der Expressionsmuster verschiedener Signalwege näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde RNA aus dem Tumorgewebe isoliert und die Genexpression in *Microarray*-Analysen und „*Ingenuity-Pathway*“-Analysen (*IPA*) näher untersucht.

Die *IPA*-Analyse der *Microarray*-Daten hinsichtlich der Expression von Genen, welche an den drei wichtigen Prozessen Zellzyklus, Tumorentstehung und Inflammation beteiligt sind, ergab, dass Zellzyklus-Gene besonders in den jungen Tieren (6 und 20 Wochen) verstärkt exprimiert werden, dann jedoch in ihrer Expression abfallen. Die

Expression von Genen, welche mit Tumorentstehung und Entzündung assoziiert sind, hingegen steigt mit zunehmendem Alter der *Atp7b*^{-/-}-Mäuse an.

Bekannte Signalwege der Tumorentstehung wurden daraufhin genauer untersucht. Die *IPA*-Analyse ergab in den *Atp7b*^{-/-}-Mäusen insgesamt sechs regulierte Signalwege, welche bekanntermaßen an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind. Gene von vier dieser Signalwege sind verstärkt exprimiert: der *Cdc42*-Signalweg, welcher eine Rolle bei der Organisation des Actin-Zytoskeletts spielt und in humanen Tumoren aktiviert ist, die Tumorpromoter-Signalwege HER-2, NFκB, und Wnt/β-catenin.[132–137] Das *NFκB-Signaling* ist in HepG2-Zellen mit anhaltender Kupferüberladung aktiviert.[138], [139] Eine verstärkte Expression NFκB-regulierter Gene konnte auch in dieser Studie in den älteren Tieren (30 - 60 Wochen) gezeigt werden. Die beiden Signalwege, p53 und PTEN waren ebenfalls verändert. Besonders in 6 - 20 Wochen alten KO-Mäusen waren Gene des p53-Signalwegs verstärkt exprimiert, der Anteil nahm jedoch in den 60 Wochen alten Tieren und im Tumorgewebe ab. Der aktivierte p53-Signalweg induziert Apoptose in entarteten Zellen. In vielen Karzinomen ist die Expression des p53 vermindert oder aber die Expression der p53 Inhibitoren MDMX erhöht.[140], [141] p53 induziert unter anderem auch die Expression des Wnt-Antagonisten DKK1.[142] Gene des PTEN-Signalweg waren vor allem in den älteren Mäusen verstärkt exprimiert. PTEN ist ebenfalls ein Tumorsuppressor, welcher apoptotische Prozesse induziert.[143]

Eine Studie von He *et al.* hat mittels „*Gene set enrichment analysis*“ (GSEA) die Auswirkung der Kupferakkumulation in der Leber 6 Wochen alter weiblicher *Atp7b*^{-/-}-Mäuse auf die Expression von >20.000 Genen untersucht. Dabei wurde ein *Microarray*-Datenset von Prof. Dr. Svetlana Lutsenko (Johns-Hopkins-University Baltimore, MA, USA) benutzt, welches auch in dieser Studie zu Vergleichszwecken verwendet wurde. GSEA wird zur Analyse von Genexpressionsprofilen benutzt, indem vorher definierte Gensets auf ihre Expressionsänderung hin in 2 Gruppen (*Atp7b*^{-/-} vs. *Atp7b*^{+/+}) untersucht werden. He *et al.* konnten so ebenfalls die Deregulation einiger der oben genannten Signalwege zeigen. Signalwege, welche in der Karzinogenese von Bedeutung sind, waren in den jungen Mäusen herabreguliert. Mit dem Zellzyklus und dem Tumorsuppressor p53 assoziierte Signalwege waren hingegen aktiviert. He *et al.* identifizierten als verantwortliche Transkriptionsfaktoren vor allem zwei Protein-

familien, die SREBP (*sterol regulatory element binding proteins*) und PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*). [144] PPARs sind mit verschiedenen chronischen Erkrankungen (z. B. Diabetes und Atherosklerose) und der Karzinogenese assoziiert.[145]

Muller *et al.* stellten einen zeitlichen Vergleich der Genexpression in HepG2-Zellen und 129Sv/Ev-(Atp7b^{+/+})-Mäusen, welche erhöhten Kupferkonzentrationen ausgesetzt waren, an. Dabei wurden 2 *gene cluster* identifiziert. In der frühen Phase des Kupferüberschusses waren vor allem Metallothioneingene aktiviert und im späten *cluster* waren es vor allem Gene, welche mit der proteosomalen Degradation und der Antwort auf oxidativen Stress assoziiert waren. Doch auch hier wurden die Zellen maximal 24h hohen Kupferkonzentrationen ausgesetzt. Die Mäuse wurden ab einem Alter von 6 Wochen für einen Monat durch Trinkwasser mit einer erhöhten Kupferkonzentration versorgt. Im Vergleich zu den in der vorliegenden Studie verwendeten 40 - 60 Wochen alten Mäusen waren die Zeiträume wieder sehr kurz gewählt.[139] In 60 Wochen alten (und älteren) Mäusen existieren keine vergleichbaren Studien, die Regulation der Signalwege auf Genexpressionsebene in diesem späten Stadium der Kupferakkumulation wurde in dieser Dissertation zum ersten Mal gezeigt.

Es konnte bisher nachgewiesen werden, dass in der Leber der Atp7b^{-/-}-Maus verschiedene Signalwege aktiviert waren, die einerseits fördernd auf die Entstehung von Tumoren wirken oder andererseits Tumorsuppressorfunktionen vermitteln. Um die Einflüsse der Signalwege näher zu identifizieren, wurde die Regulation eines für die Tumorentstehung wichtigen Signalwegs genauer untersucht: das kanonische *Wnt-Signaling*. In Abbildung 30 ist der kanonische Wnt-Signalweg, wie in der „*Ingenuity knowledge base*“ hinterlegt, schematisch dargestellt. Die in dieser Abbildung farbig unterlegten Gene wiesen eine Expressionsänderung in der Atp7b^{-/-}-Maus auf.

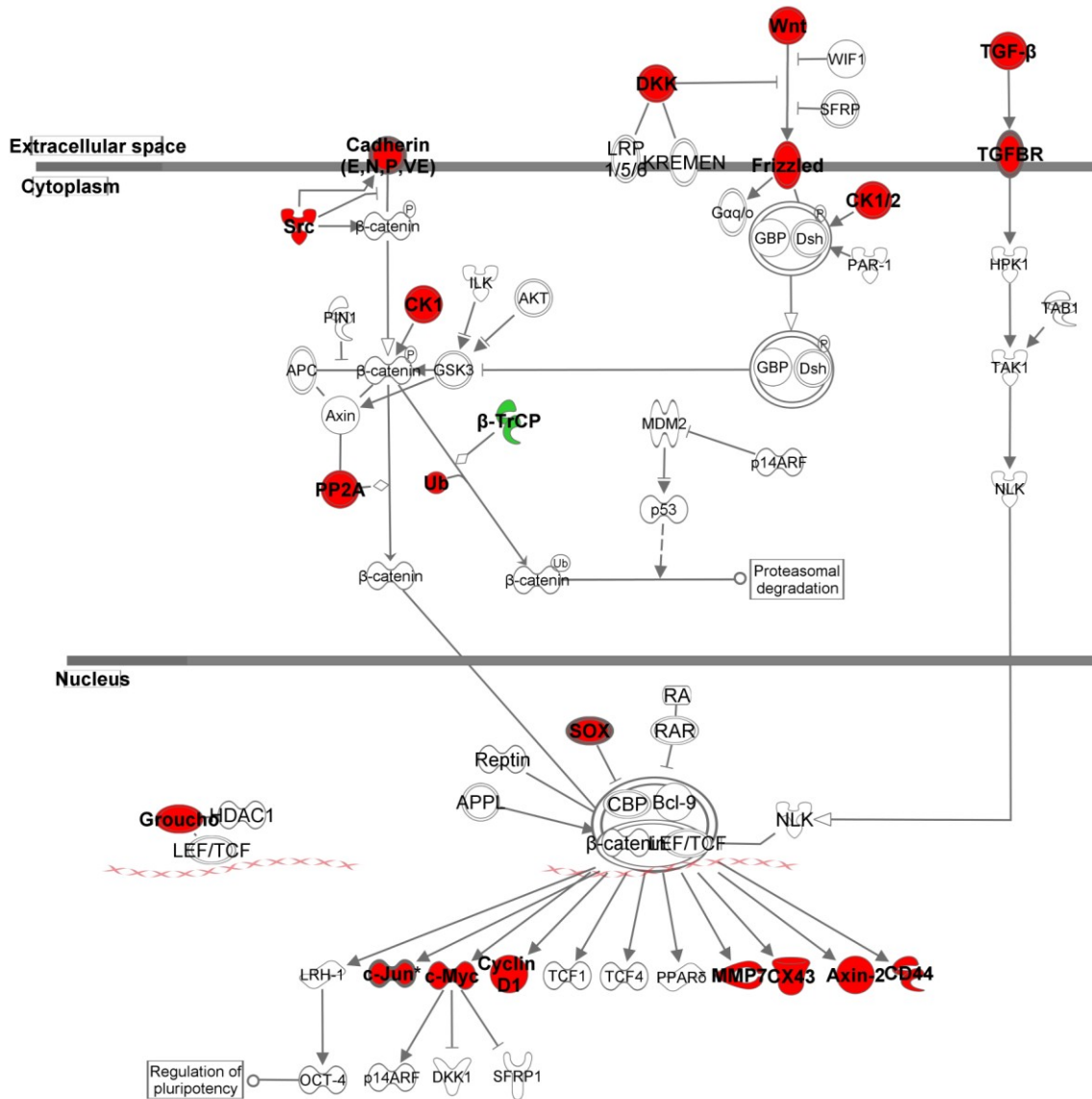


Abbildung 30 Wnt-Signalweg. Ergebnis und Zusammenfassung der wichtigsten Expressionsänderungen der Gene des Wnt-Signalwegs in der Leber der *Atp7b^{-/-}*-Maus. Diese Abbildung wurde anhand der im Projekt generierten Daten, welche in die *IPA*-Software eingepflegt wurden, erstellt. Weiß hinterlegte Gene – keine Expressionsänderung; rot hinterlegte Gene – verstärkte Expression; grün hinterlegte Gene – verminderte Expression. $p \leq 0,05$.

Aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Herkunft der Tumore war die Aktivierung von Genen des kanonischen Wnt-Signalwegs auf mRNA-Ebene bereits aufgefallen (z.B. CD44, EPCAM). Der Wnt-Signalweg hat eine herausragende Bedeutung für physiologische Prozesse, wie der Embryogenese und Differenzierung. Während der Leberentwicklung ist dieser Signalweg aktiviert, spielt aber auch eine wichtige Rolle in der Karzinogenese.[137], [146] Viele Studien belegen einen Zusammenhang zwischen der Deregulation des Wnt-Signalwegs und der Entstehung intrahepatischer Tumore.[60] Die Analyse einzelner Gene, welche mit dem Wnt-Signalweg assoziiert sind, ergab ein spezifisches Muster. So waren positive

Regulatoren tendenziell aktiviert. Darunter sind z. B. die Transkriptionsfaktoren SOX4 und SMAD4. Negative Regulatoren des Signalwegs waren hingegen eher vermindert exprimiert, z. B. PTEN, β TrCP und GSK3 β . Besonders gut sichtbar wurde die Aktivierung allerdings durch die verstärkte Expression vieler Wnt-Zielgene, darunter sind auch das bereits erwähnte EPCAM, welches eine Rolle bei der Klassifizierung von Tumoren in der Leber spielt, sowie das Zelladhäsionsmolekül CD44.[117] Die Ergebnisse der *Microarray*-Analysen konnten beispielhaft für Gene des Wnt-Signalwegs und deren Zielgene JUN, CD44, cMyc, CyclinD in der RT-PCR signifikant validiert werden. Die verminderte Expression der negativen Regulatoren des Signalwegs APC und GSK3 β wurde in der RT-PCR tendenziell bestätigt.

Die gewonnenen Ergebnisse implizieren, dass eine chronische Entzündung, ausgelöst durch die Kupferakkumulation, maßgeblich an der Tumorentstehung beteiligt ist. Die neoplastische Proliferation in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus ist keine direkte Folge der Kupferakkumulation, vielmehr kommt es zu einer Gewebsreaktion und chronischen Entzündung, welche die Karzinogenese begünstigt (Abbildung 31).

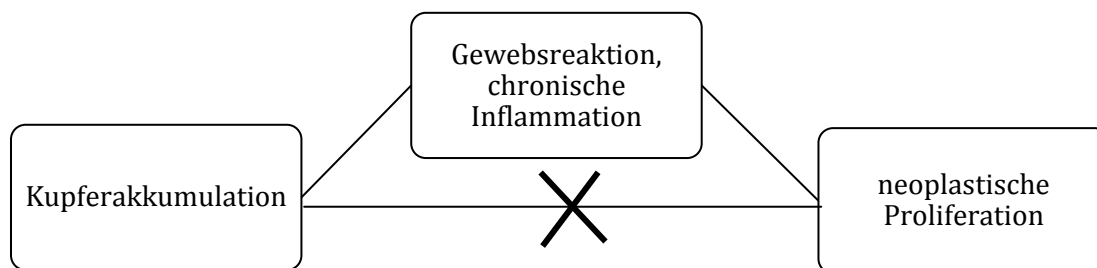


Abbildung 31 Postuliertes Konzept zur Karzinogenese in der *Atp7b*^{-/-}-Maus.

Die Entstehung von Tumoren in der *Atp7b*^{-/-}-Maus kann also ebenfalls als ein typisches Beispiel, für das Konzept, dass die chronische Entzündung ein prämaligener Zustand für gastrointestinale Tumore ist, angesehen werden. Dabei spielen wenige Signalwege eine entscheidende Rolle, allen voran das kanonische *Wnt-Signaling*.

Einschränkend auf die präsentierten Ergebnisse wirkt der Umstand, dass in dieser Studie bisher ausschließlich die transkriptionelle Ebene der Genexpression untersucht wurde. Weitere Untersuchungen zu posttranskriptionellen Veränderungen und den Auswirkungen der Unterschiede in den Transkriptgehalten auf die Proteinmengen und -funktionen sind für ein tieferes Verständnis der Vorgänge, welche zur

Tumorentstehung führen, unerlässlich. Eine Unschärfe stellt außerdem die Komplexität des Lebergewebes dar. Zwar wurden für diese Dissertation die Lebern der *Atp7b*^{-/-}-Mäuse in Tumorgewebe und tumorfreies Gewebe disseziert, dennoch zeigen histologische Aufnahmen eine starke Einwanderung von Immunzellen. Tumorfreies Lebergewebe wurde außerdem nicht nach Hepatozyten und Cholangiozyten getrennt. In zukünftigen Studien zu den Änderungen der Genexpression erscheint also eine noch genauere Mikrodissektion in die einzelnen Zelltypen angeraten.

Dennoch leisten die Ergebnisse dieser Dissertation einen Beitrag dazu, die *Atp7b*^{-/-}-Maus nicht nur als geeignetes Modell des Morbus Wilson, sondern auch zur Untersuchung der Kupfertoxizität und der Tumorentstehung aus chronischer Inflammation anzusehen. Die Expression tumorassoziierter Gene wurde in dieser Studie mittels *Microarray*-Analyse auch in humanem Lebermaterial untersucht. Bereits in der Analyse der Lebertumore aus der *Atp7b*^{-/-}-Maus erwähnte, an der Karzinogenese beteiligte Proteine, wie die Keratine 7 und 19, Claudin7, EPCAM und MMP7, waren auch im Lebermaterial der Morbus-Wilson-Patienten verstärkt exprimiert. Dies untermauert die wichtige Rolle der *Atp7b*^{-/-}-Maus als Modell der kupferinduzierten chronischen Inflammation und Karzinogenese.

5.2 Auswirkungen der Kupferakkumulation auf den Lipidstoffwechsel

In weiblichen 6 Wochen alten *Atp7b*^{-/-}-Mäusen wiesen Huster *et al.* 2007 nach, dass die Kupferakkumulation selektiv die Expression von Genen, welche mit dem Lipidstoffwechsel und dem Zellzyklus assoziiert sind, verändert. Dabei ist die verringerte Expression von 9 Genen der Cholesterolsynthese besonders aufgefallen. In den *Atp7b*^{-/-}-Mäusen wurde eine Verminderung des Serumcholesterolgehalts nachgewiesen.[53] Die Frage war nun, wie sich die *Atp7b*-Defizienz auf den Cholesterolaushalt und die Entstehung von Atherosklerose auswirkt. *Atp7b*^{-/-}-Mäuse wurden zu diesem Zweck mit *LDLR*^{-/-}-Mäusen verpaart um eine Doppel-*knockout*-Maus zu erzeugen. Diese wurde 16 Wochen mit einer cholesterolreichen Diät gefüttert, um die Entstehung von Atherosklerose zu begünstigen. Die Genexpression, der Schweregrad der Steatose und der Kupfergehalt in der Leber, die Serumlipide sowie das Ausmaß

der atherosklerotischen Läsionen in Brachiocephalarterie (BCA) und Aortenwurzel wurden bestimmt.

5.2.1 Charakterisierung der LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Maus

In 20 Wochen alten DKO-Mäusen konnte die verminderte Expression von ausgewählten Genen des Cholesterolsynthesewegs verglichen zu LDLR^{-/-}Atp7b^{+/+}-Tieren und WT-Kontrollen, welche von Huster *et al.* in Atp7b^{-/-}-Mäusen beschrieben wurde, in *Microarray*-Analysen bestätigt werden. Der Atp7b-*knockout* hat auch auf LDLR-defizienten Hintergrund starken Einfluss auf die Genexpression, welcher sich in der Ausbildung eines Phänotyps widerspiegelt. In einer nachfolgenden RT-PCR-Analyse wurde die signifikante Verminderung der Expression von HMGCR, Sqle und Idi1 verifiziert. In einem weiteren Tiermodell des Morbus Wilson, den LEC-Ratten, wurde zu einem früheren Zeitpunkt bereits eine um 30% verminderte Expression der HMGCR und weiterer wichtiger Schlüsselenzyme des Cholesterolfstoffwechsels beschrieben.[147]

Die Leber der Mäuse wurde bezüglich des Ausmaßes der Steatose und des Fettgehalts analysiert. Atp7b-defiziente Mäuse auf LDLR^{-/-}-Hintergrund zeigten eine deutlich verringerte Steatose im Gegensatz zu LDLR^{-/-}Atp7b^{+/+}-Mäusen. Das Geschlecht spielt eine wesentliche Rolle für das Ausmaß der Leberzellverfettung. Weibliche Mäuse zeigten generell geringere Steatose-Grade als männliche Tiere des gleichen Genotyps. Doch der Unterschied zwischen dem Grad der Verfettung von weiblichen LDLR/Atp7b-DKO-Mäusen zu weiblichen LDLR^{-/-}Atp7b^{+/+}-Mäusen war geringer als dies bei den männlichen Tieren der Fall war. Dort war der Unterschied zwischen LDLR-KO/Atp7b-WT-Männchen und LDLR/Atp7b-DKO-Männchen nicht sehr groß. Dieser Punkt ist für die Entstehung der atherosklerotischen Plaques von Bedeutung (siehe Punkt 5.2.3).

LDLR^{-/-}-Mäuse werden seit kurzem neben dem Modell zur Atherosklerose ebenfalls als gutes Modell zur Untersuchung der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) angesehen, denn sie bilden nach dreimonatiger Fütterung mit einer fettreichen Diät eine ausgeprägte Steatose-Pathologie mit schweren Entzündungszeichen aus.[148]

5.2.2 Serumcholesterolgehalt der LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Maus

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Auswirkungen die verminderte Expression der Gene der Cholesterolsynthese auf den Serumcholesterolgehalt hat. Teupser *et al.* haben die Auswirkungen cholesterolreicher Diät auf LDLR-defiziente Mäuse bereits detaillierter beschrieben.[92] Hier sollte nun geklärt werden, ob eine Atp7b-Defizienz zusätzlich zum LDLR-*knockout* diese Effekte beeinflusst und zu einem geringeren Cholesterolgehalt im Plasma der Doppel-*knockout*-Mäuse führt.

Alle Mäuse aus dem Fütterungsexperiment mit cholesterolreicher Diät wiesen fast 4fach erhöhte Serumcholesterolwerte im Vergleich zu Mäusen, die unter Standarddiät gehalten wurden, auf. Ebenso verhielt es sich mit den Triglyzeridkonzentrationen und den Konzentrationen der Fraktionen des Cholesterols – HDL, LDL und VLDL. Weibliche DKO-Mäuse zeigten unter der cholesterolreichen Diät zudem signifikant geringere Cholesterol-, Triglyzerid-, LDL- und VLDL-Werte als der WT. Bei männlichen DKO-Mäusen war diese Verringerung nur für die Triglyzeride und das VLDL zu beobachten. Die vermutete Reduktion der Serumlipide durch die Atp7b-Defizienz und die daraus resultierende verminderte Cholesterolsynthese trat nur im Fall der weiblichen Mäuse ein.

Die Unterschiede zwischen den Geschlechtern bezüglich verschiedener Erkrankungen, besonders Herz-Kreislauf-Erkrankungen, sind hinlänglich bekannt. Weibliche Individuen scheinen grundsätzlich weniger anfällig für hypercholesterinämie-abhängige Erkrankungen zu sein als männliche Individuen. Grund dafür ist die östrogenabhängige Regulation der 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR).[149]

Sauer *et al.* wiesen 2011 verminderte Gehalte von Sterolmetaboliten im Gehirn von 6 Wochen alten Atp7b^{-/-}-Mäusen und erhöhte Gehalte in 47 Wochen alten Mäusen nach.[150] Außerdem wurden verringerte VLDL-Gehalte in der Leber von 6 und 30 Wochen alten Atp7b^{-/-}-Mäusen bereits beschrieben. [53], [151] Im Plasma der LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Maus konnten in dieser Studie unter Standarddiät keine Unterschiede in der Serumcholesterolkonzentration zu den LDLR^{-/-}Atp7b^{+/+}-Mäusen gefunden werden. Die Gesamtcholesterolwerte der Atp7b-defizienten Tiere gleichen im Mittel denen der Kontrolltiere. Unterschiede traten vor allem bei den Triglyzeridwerten und den

Subfraktionen des Cholesterols auf. Weibliche LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Mäuse wiesen im Alter von 12 und 20 Wochen geringere TG- und LDL-Gehalte auf als LDLR^{-/-}Atp7b^{+/-}-Tiere.

Aus den vorliegenden Daten kann man schlussfolgern, dass die veränderte Expression von Genen des Lipidstoffwechsels, insbesondere der Cholesterolsynthese Einflüsse auf den Lipidmetabolismus und den Grad der Leberverfettung haben. Wie einzelne molekulare Mechanismen aussehen, ist ungeklärt und sollte Gegenstand weiterer intensiver Forschung sein.

5.2.3 Entstehung atherosklerotischer Läsionen in LDLR^{-/-}Atp7b^{-/-}-Mäusen

Im nächsten Schritt wurde die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in den Doppel-*knockout*-Mäusen untersucht. LDLR^{-/-}-Mäuse weisen unter der Fütterung von cholesterolreicher Nahrung erhebliche atherosklerotische Läsionen in BCA und Aortenwurzel auf.[92] Hier wurde gezeigt, dass in Atp7b^{-/-}- und Doppel-*knockout*-Mäusen die Expression der Gene der Cholesterolsynthese vermindert ist. Da diese Tiere zudem ein verändertes Serumlipidmuster aufwiesen als der WT, stellte sich nun die Frage, ob sich die Atp7b-Defizienz auch auf die Bildung atherosklerotischer Plaques auswirkt. Männliche Doppel-*knockout*-Mäuse wiesen wider Erwarten größere atherosklerotische Läsionen in der Brachiocephalarterie und Aortenwurzel als der LDLR^{-/-}Atp7b-WT auf. Während männliche DKO-Mäuse einen signifikant größeren Läsionsfläche in der BCA und der Aortenwurzel aufwiesen als der männliche WT, verhielt es sich in weiblichen DKO-Mäusen verglichen zum weiblichen WT entgegengesetzt. In der BCA weiblicher DKO-Mäuse war die Läsionsfläche tendenziell geringer als im korrespondierenden WT. In der Aortenwurzel bestand dieser Unterschied ebenso, hier waren die Läsionsflächen signifikant kleiner als im WT. Dies korreliert mit den Ergebnissen aus den durchgeführten Genexpressionsanalysen und Serumlipidmessungen. Aktuell können für die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen DKO-Mäusen bzgl. der Ausprägung der atherosklerotischen Plaques nur Geschlechtsparameter verantwortlich gemacht werden, da alle anderen relevanten Bedingungen (z. B. Haltung, Diät) identisch waren.

Unterschiede in der Ausprägung der Serumlipidkonzentrationen und der atherosklerotischen Plaques zwischen den Geschlechtern wurden in LDLR- und apoE-defizienten Mäusen bereits beobachtet. Männliches Geschlecht geht dabei mit

eindeutiger Pathologie einher. [152] Van Craeyveld fand in einem aktuellen Vergleich der bisherigen Ergebnisse zu Tiermodellen der Atherosklerose hingegen eine höhere bzw. gleiche Anfälligkeit für die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen in weiblichen Mäusen im Vergleich zum männlichen Geschlecht. Im Kaninchen-Modell konnte der Geschlechtsunterschied nicht nachgewiesen werden.[153]

Bisher haben epidemiologische Studien hohe Kupferserumkonzentrationen im Blutplasma meist als Risikofaktor für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen beschrieben, da Kupfer in der Lage ist, LDL zu oxidieren.[154] Da die *Atp7b*-defizienten Mäuse verringerte Serumkupferkonzentrationen aufweisen (das Kupfer enthaltende Holoceruloplasmin wird nicht aus der Leber sezerniert [52]), scheint das niedrige Serumkupfer (wie auch beim Morbus-Wilson-Patienten [37]) eine eher protektive Rolle zu spielen.

Die hepatische Lipoproteinsekretion als Angriffspunkt für die Modulation der Bildung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta, wurde bereits in *LDLR^{-/-}apoB^{100/100}*-Mäusen untersucht. Diese Mäuse sind *LDLR*-defizient, exprimieren nur ApoB100 und tragen ein induzierbares Cre-Transgen. Über diesen Schalter (Cre) kann die Expression des Gens für den microsomalen Triglyzerid-Transfer (*Mttp*) ausgeschaltet werden. Auf diese Weise wurde die Sekretion der Lipoproteine aus der Leber unterbunden. LDL wurde so aus dem Serum eliminiert. Dies verhinderte die Atherosklerose-Entstehung und die damit verbundenen Änderungen in der Genexpression.[155]

Eine Limitation der Studie zur Auswirkung der Kupferakkumulation auf den Lipidstoffwechsel ist die Verwendung von ausschließlich weiblichen Mäusen für die *Microarray*- und PCR-Analyse der Genexpression. Die Analysen der Steatose, der Serumlipidgehalte und atherosklerotischen Läsionen wurden hingegen in weiblichen und männlichen Tieren durchgeführt. Verringerungen des Serumcholesterols und LDLs, als auch der atherosklerotischen Läsionen wurden nur in den weiblichen Tieren gemessen. Eine Untersuchung der Genexpression in männlichen Mäusen und damit einhergehend weitere Untersuchungen hinsichtlich einer Involvierung des Hormonhaushalts sind daher interessant. Eine weitere Limitation der Studie könnte sein, dass die Fütterungszeit der Mäuse zu kurz gewählt wurde, und daher die Bildung der atherosklerotischen Plaques noch nicht ausreichend stattgefunden hatte. Die

Verlängerung der Fütterungszeit von 16 auf mindestens 26 Wochen wäre für zukünftige Studien anzuraten. Eine mögliche Erklärung für die geringen Unterschiede im Serumlipidgehalt zwischen den Genotypen wäre, dass das Synthesedefizit durch vermehrte Cholesterolaufnahme ausgeglichen wird, da 50% des Gesamtcholesterols in diesem Modell noch immer aus der Nahrung aufgenommen werden. Die Untersuchung des Einflusses der Atp7b-Defizienz und des daraus resultierenden Kupferüberschusses in der Leber in anderen Mausmodellen der Atherosklerose, wie z.B. der apoE^{-/-}-Maus, könnte ebenfalls von Nutzen sein. In bisherigen Studien zur Entstehung und zum Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen in den einzelnen Tiermodellen wurden diesbezüglich auch gegensätzliche Ergebnisse beschrieben.

5.2.4 Situation im Morbus-Wilson-Patienten

Es wird aufgrund klinischer Beobachtungen an historischen Patientenkollektiven vermutet, dass Morbus-Wilson-Patienten seltener an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere Atherosklerose und deren Folgen leiden (valide publizierte Daten existieren dazu nicht). Diese Arbeit befasste sich mit einer tiefergehenden Analyse der Auswirkungen der Atp7b-Deletion *in vivo* im Tiermodell, ergänzt um experimentelle Untersuchungen beim Menschen (Genexpression in Leber und Serumlipidanalysen). Dabei zeigten sich sowohl in der Leber Unterschiede in der Genexpression, vergleichbar zum Tiermodell, als auch signifikante Veränderungen der Serumlipide. Dies sind wichtige Beobachtungen, doch die oben genannte Hypothese kann mit Hilfe der durchgeführten Analysen weder hinreichend gestützt noch widerlegt werden. Zu diesem Zweck sollten detaillierte Datenbankerhebungen und Langzeitbeobachtungen der Patienten durchgeführt werden.

In *Microarray*-Analysen von humanem Lebermaterial der Patienten konnte eine Tendenz zur verminderten Expression von Genen, welche an der Cholesterolsynthese beteiligt sind, nachgewiesen werden. Die wichtigen Gene HMGCS, HMGCRC, Idi1 sind 7,1fach, 2,3fach bzw. 3fach vermindert exprimiert. Außerdem wurden die Serumcholesterolvere von Morbus-Wilson-Patienten bei Erstvorstellung (keine Therapie erhalten) mit denen gesunder Kontrollen verglichen. Der Gesamtcholesterol- und Triglyceridgehalt in den Patienten ist signifikant geringer als in den gesunden Kontrollen. Bei weiblichen Patienten gibt es zudem eine klare Reduktion des LDL-Gehalts.

Diese Ergebnisse stehen im klaren Kontrast zu jenen von Seessle *et al.*[99] Dort wurden initial verringerte Gesamtcholesterolgehalte in den Patienten beobachtet, die jedoch unter Chelattherapie verschwanden. Die Subfraktionen des Cholesterols wiesen keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen auf. Jedoch handelt es sich, im Gegensatz zu dieser Studie, in der Arbeit von Seessle *et al.* um ein wesentlich kleineres Kollektiv, das in die komplette Datenauswertung einbezogen wurde. So wurde bei Seessle *et al.* der HDL- und LDL-Gehalt für je nur 7 weibliche und 7 männliche Patienten bestimmt, in der vorliegenden Studie hingegen wurde das Blutplasma von 30 weiblichen und 24 männlichen Patienten untersucht.

Liggi *et al.* untersuchten die Ausbildung einer Steatose in 35 Morbus-Wilson-Patienten, mit dem Ziel, eventuelle Ähnlichkeiten mit Patienten mit Nicht-alkoholischer-Steatohepatitis (NASH) aufzuklären. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Steatose mit der Kupferakkumulation assoziiert ist, und die Änderungen im Lipid-Metabolismus wahrscheinlich eine Erscheinung der Steatose-Pathologie sind.[156] Dies würde sich mit den Ergebnissen von Seessle *et al.* decken. Unter Chelattherapie sollten die kupferinduzierten Änderungen (Steatose) der Leberhistologie verschwinden, da sich die Leber regeneriert. Im Zuge dessen normalisiert sich die Genexpression, auch die Cholesterolsynthese erhöht sich. Dies bedeutet nicht, dass die verminderte Genexpression auf die Verminderung des Leberparenchyms durch die Steatose zurückgeht, denn der Effekt der verminderten Expression von Genen ist nach den hier gezeigten *Microarray*-Analysen und der Analyse von Huster *et al.* 2007 auf den Lipidstoffwechsel begrenzt.[53]

6 Zusammenfassung und Ausblick

Kupfer ist ein essentielles Spurenelement, welches für die Funktion einiger Schlüsselenzyme von zentraler Bedeutung ist. Die Überladung des Organismus mit Kupfer hat jedoch schwerwiegende Folgen. Eine hereditäre Erkrankung, welche mit Kupferakkumulation assoziiert wird, ist der Morbus Wilson. Die Symptome des Morbus Wilson umfassen neurologisch-psychiatrische Störungen und/oder Leberschäden, mit chronischer Hepatitis bis hin zu akutem Leberversagen. Epigenetische Faktoren scheinen bei der Ausprägung der Symptome eine wichtige, jedoch unvollständig erforschte, Rolle zu spielen. Ein Modell zur Untersuchung der Kupfertoxizität im Morbus Wilson ist die *Atp7b*^{-/-}-Maus. Diese Maus zeigt die hepatischen Symptome des Morbus Wilson, wobei auch hier, wie bei den Patienten, die Schwere der Pathologie individuell sehr verschieden ist. Eine Beobachtung war, dass diese Mäuse mit zunehmendem Alter eine Regeneration normalen Lebergewebes und neoplastische Proliferation zeigen. Der Prozess der Tumorentstehung wurde im ersten Teil dieser Arbeit näher untersucht. Dazu wurden in hepatischen Tumorgeweben 6, 20, 46 und 60 Wochen alter *Atp7b*^{-/-}-Mäuse eine Genexpressionsanalyse des Gesamtgenoms mittels *Microarray*-Experimenten und anschließender Auswertung in „*Genesifter*“- und „*Ingenuity-Pathway*“-Analysen durchgeführt. Auf diese Weise konnte die verstärkte Expression einer Reihe von Genen identifiziert werden, welche an der Karzinogenese beteiligt sind. Darunter sind bekannte Tumorpromotergene, wie z.B. das JUN-Onkogen, das α -Fetoprotein (AFP) und das „*secreted phosphoprotein 1*“ (SPP-1). Bekannte Signalwege, welche in der Karzinogenese dereguliert sind, wurden auch in den intra-hepatischen Tumoren dieser Mäuse verändert reguliert gefunden. Der kanonische Wnt-Signalweg ist von den Expressionsänderungen derart betroffen, dass einige seiner Zielgene (z. B. JUN, Cyclin D1, MMP7) verstärkt exprimiert wurden. Weiterhin waren Gene der karzinogeneseassoziierten Signalwege Cdc42, Her2 und NF κ B aktiviert. Tumorsuppressor-Signalwege, wie der PTEN-Signalweg und der p53-Signalweg, waren herabreguliert. Das aus den gewonnenen Ergebnissen postulierte Konzept beschreibt die neoplastische Proliferation nicht als direkte Folge der Kupferakkumulation, vielmehr kommt es zu einer Gewebsreaktion und chronischer Entzündung, welche die Karzinogenese begünstigt. Diese Ergebnisse, machen die *Atp7b*^{-/-}-Maus nicht nur zu einem geeigneten Modell des Morbus Wilson, sondern auch zur

Untersuchung der Kupfertoxizität und der Tumorentstehung aus chronischer Inflammation. Des Weiteren sollte die zelluläre Herkunft der Lebertumore dieser Maus aufgeklärt werden. Dazu wurde das Tumorgewebe hinsichtlich der Expression zellulärer Markerproteine untersucht. Diese Analysen zeigten ein uneinheitliches Bild. Zum einen war der Hepatozytenmarker AFP verstärkt exprimiert, dennoch wurden auch epithelzellspezifische Proteine in den Tumorzellen verstärkt exprimiert. Dazu zählten EPCAM, CK7 und CK19. Die Genexpressionsanalysen und histologischen Untersuchungen legen somit als Ursprung der Tumore hepatische Vorläuferzellen (HPC), die sich unter physiologischen Bedingungen in der weiteren Entwicklung in Hepatozyten oder Cholangiozyten differenzieren, nahe. Mit diesen Ergebnissen könnte in weiteren Studien an der *Atp7b*^{-/-}-Maus untersucht werden, wie eine chronische Entzündung terminiert werden könnte. Auch die Grundlagenforschung zum Verhalten der intrahepatischen Tumore in diesem Mausmodell ist von großem Interesse, um weitere Erkenntnisse zur Tumorentstehung aus chronischer Entzündung zu erlangen und innovative Therapiekonzepte zu entwickeln. Die Untersuchung zur Wirkung von Antagonisten des Wnt-Signalwegs, welche gegenwärtig entwickelt werden, auf die Entstehung intrahepatischer Tumore im *Atp7b*^{-/-}-Mausmodell wäre in diesem Kontext von Interesse. Des Weiteren wäre es möglich die *Atp7b*^{-/-}-Maus für Serum-*proteomics*-basierte Studien zu verwenden, um Biomarker für intrahepatische Tumore zu identifizieren und diagnostische Hilfsmittel zu entwickeln.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit den Auswirkungen der Kupferakkumulation auf den Lipidstoffwechsel. In *Atp7b*-defizienten Mäusen ist die Expression von wichtigen Genen der Cholesterolsynthese vermindert. Dies resultiert in einer Deregulation des Serumlipidgehalts. In einem Mausmodell der Atheroskleroseentstehung – der *LDLR*^{-/-}-Maus sollte die Auswirkung der *Atp7b*-Defizienz auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen untersucht werden. Eine *LDLR*^{-/-}*Atp7b*^{-/-}-Maus wurde generiert, charakterisiert und für 16 Wochen mit cholesterolreicher Diät gefüttert und das Ausmaß der Atherosklerose in der Brachiocephalararterie und der Aortenwurzel bestimmt. Eine signifikante Reduktion des Serumcholesterolgehalts und der atherosklerotischen Läsionen in der Aortenwurzel wurde in weiblichen Doppel-*knockout*-Mäusen gefunden. Die Kupferakkumulation hat also in der *LDLR*^{-/-}*Atp7b*^{-/-}-Maus direkte Auswirkungen auf den

Lipidstoffwechsel und die Entstehung von Atherosklerose. Weibliches Geschlecht ist dabei von wesentlicher Bedeutung. Bezüglich geschlechtsspezifischer Einflüsse müssen weiterführende Studien durchgeführt werden. Die Kreuzung der *Atp7b*^{-/-}-Maus auf ein *apoE*^{-/-}-Mausmodell wäre eine sinnvolle Ergänzung zur weiteren Untersuchung des Einflusses der Kupferakkumulation auf die Serumcholesterolkonzentration und die Entstehung atherosklerotischer Läsionen. Von Interesse wäre des Weiteren, die Untersuchung der Auswirkungen einer medikamentösen Beeinflussung des Fettstoffwechsels auf den Phänotyp der *Atp7b*^{-/-}-Mäuse.

Die präsentierten Ergebnisse aus der Analyse der Serumlipidkonzentrationen der Morbus-Wilson-Patienten geben einen Hinweis auf eine ähnliche Tendenz im Menschen. Auch hier scheint es geschlechtsspezifische Unterschiede zu geben, sie sind aufgrund der geringen Fallzahlen jedoch nur als Ausblick auf weitere mögliche Studien anzusehen.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Anfangshypothesen bestätigt werden: Die Kupferakkumulation in der Leber der *Atp7b*^{-/-}-Maus führt zu phänotypischen Veränderungen. Dennoch bestand eine Limitierung dieser Studie darin, dass sie generell auf die Analyse des Transkriptom ausgelegt war. Weitere Untersuchungen zum Proteom in Form von z. B. immunhistochemischen Methoden sind nötig, um die veränderte Genexpression und deren Rolle in der Entstehung der Tumoren und Atherosklerose aufzuklären. Auch die Analyse epigenetischer Einflüsse ist von größter Bedeutung, da die Ausprägung der Symptome des Morbus Wilson stark von äußeren Faktoren abhängig ist. In Zwillingsstudien wurde mehrmals die Bedeutung der Umwelteinflüsse auf die Pathologie der Erkrankung gezeigt.[157], [158]

Für eine erfolgreiche Behandlung spielt die Früherkennung des Morbus Wilson eine wichtige Rolle. Betroffene haben unter einer geeigneten Therapie, welche vor allem auf die Eliminierung des Kupfers, z. B. durch Chelatoren oder Zink-Substitution, aufbaut, eine sehr gute Prognose.[44] Neuere Ansätze, welche im Moment im Mausmodell erforscht werden, sind gentherapeutischer Art. So wurde in LEC-Ratten bereits erfolgreich von einem Adenovirus- und Lentivirus-vermittelten Gentransfer des *Atp7b*-Proteins berichtet.[42], [159] Auch die Hepatozytentransplantation ist Gegenstand intensiver Forschung im Tiermodell.[160] Diese neuartigen Therapieoptionen lassen auf eine noch bessere Behandlung der Morbus-Wilson-Patienten, mit Heilungschancen ohne eine Lebertransplantation, hoffen.

7 Anhang

Tabelle 9 Expressionsänderung tumorassoziierter Gene in intrahepatischen Tumoren. In der Leber von 60 Wochen alten Atp7b^{-/-}-Mäusen verglichen zum 60 Wochen alten WT. p≤0,05

Symbol	Entrez Genbezeichnung	nfach
ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	2,480
ABCC6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	-2,210
ABCC6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	-2,210
AFP	alpha-fetoprotein	15,200
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	2,640
ANPEP	alanyl (membrane) aminopeptidase	-2,090
ANXA1	annexin A1	2,190
ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	2,450
C/EBPA	CAAT enhancer binding protein alpha	-2,4
CA2	carbonic anhydrase II	2,840
CA9	carbonic anhydrase IX	2,000
CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	3,770
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	2,420
CCND2	cyclin D2	3,110
CD34	CD34 molecule	4,800
CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)	2,550
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	3,770
CD79A	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	2,370
CDH17	cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)	5,010
CEACAM	CEA cell adhesion molecule	-3,3
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)	2,730
CLDN1	claudin 1	-2,420
CLDN4	claudin 4	3,420
CLDN7	claudin 7	10,080
CLSTN1	calyntenin 1	2,180
COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	-2,210
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	2,880
CRYAB	crystallin, alpha B	3,020
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	2,010
CXCL13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	3,930
CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	2,370
CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	2,170
CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	2,020
CYP17A1	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	-5,070
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	2,800
CYP2C8	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	2,900
DHFR	dihydrofolate reductase	-2,110
DOCK11	dedicator of cytokinesis 11	3,490
DPYD	dihydropyrimidine dehydrogenase	-2,820
DPYS	dihydropyrimidinase	-3,300
EGFR	epidermal growth factor receptor	-2,290
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule	11,000

ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	2,020
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	-3,070
EZR	ezrin	6,270
F2R	coagulation factor II (thrombin) receptor	2,180
F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	2,260
FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	-3,260
FASN	fatty acid synthase	-3,390
FGL1	fibrinogen-like 1	-2,610
FHL2	four and a half LIM domains 2	2,240
FOXA1	forkhead box A1	3,070
FOXA3	forkhead box A3	-2,680
FSCN1	fascin homolog 1, actin-bundling protein (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)	2,650
GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	3,100
GCAT	glycine C-acetyltransferase	-2,470
GDF10	growth differentiation factor 10	4,790
GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	3,990
GJB1	gap junction protein, beta 1, 32kDa	-4,070
GPX2	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	2,710
GSN	gelsolin	7,650
GSTM2	glutathione S-transferase mu 2 (muscle)	-2,540
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	2,130
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	-5,570
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	-2,030
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	-3,540
HPN	hepsin	-2,020
HPSE	heparanase	2,260
HSD17B6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog (mouse)	-2,010
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	2,110
HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	2,600
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	2,080
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	-2,200
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	2,020
IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1	-2,250
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	-2,320
IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	-3,250
IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma	2,580
IRS1	insulin receptor substrate 1	-2,070
ITGA4	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	2,070
ITGA6	integrin, alpha 6	2,670
ITGB4	integrin, beta 4	2,160
JAG1	jagged 1	2,830
KITLG	KIT ligand	5,260
KRT20	keratin 20	3,380
LAMA3	laminin, alpha 3	2,530
LAMC2	laminin, gamma 2	2,170
LASS5	LAG1 homolog, ceramide synthase 5	2,130
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	2,900
LGALS4	lectin, galactoside-binding, soluble, 4	4,980

LOXL1	lysyl oxidase-like 1	3,940
LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	4,090
LTF	lactotransferrin	2,120
LYVE1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	-2,910
MAL	mal, T-cell differentiation protein	5,240
MASP2	mannan-binding lectin serine peptidase 2	-2,270
MBP	myelin basic protein	2,590
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus	2,150
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	2,230
MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	5,200
MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	16,950
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	3,600
MSLN	mesothelin	3,200
NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	-2,450
NTRK2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	-3,030
ORM1/ORM2	orosomucoid 1	-2,240
OSMR	oncostatin M receptor	2,260
PGLYRP1	peptidoglycan recognition protein 1	7,320
PLAT	plasminogen activator, tissue	2,690
PLG	plasminogen	-2,000
PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	-2,200
PRKCB	protein kinase C, beta	2,390
PROM1	prominin 1	3,590
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	2,410
PYCARD	PYD and CARD domain containing	4,430
RARRES1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	-2,110
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	2,300
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	2,270
RHOC	ras homolog gene family, member C	2,070
RXRA	retinoid X receptor, alpha	-2,210
S100A6	S100 calcium binding protein A6	6,730
SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	-3,070
SELL	selectin L	2,290
SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	-4,370
SERPIND1	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1	-2,230
SFTPD	surfactant protein D	13,620
SLC22A9	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 9	-2,740
SLC29A1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters)	-2,120
SLC47A1	solute carrier family 47, member 1	-3,020
SOAT2	sterol O-acyltransferase 2	-2,110
SPARCL1	SPARC-like 1 (hevin)	3,890
SPIB	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	2,710
SPRR2A	small proline-rich protein 2A	6,500
SRD5A1	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 1)	-2,140
TCF21	transcription factor 21	4,540
TGFBR3	transforming growth factor, beta receptor III	2,430

THBS1	thrombospondin 1	3,830
THPO	thrombopoietin	-2,250
THY1	Thy-1 cell surface antigen	3,350
TIMP1	TIMP metallopeptidase inhibitor 1	2,090
TIMP2	TIMP metallopeptidase inhibitor 2	4,460
TIMP3	TIMP metallopeptidase inhibitor 3	2,530
TLE3	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)	2,060
TMEM45A	transmembrane protein 45A	16,890
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2	3,980
TMPRSS4	transmembrane protease, serine 4	2,390
TMSB10	thymosin beta 4, X-linked	3,180
TNFRSF13B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B	2,170
TPD52	tumor protein D52	2,510
TUBA1A	tubulin, alpha 1a	2,240
VDR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	2,300
VIM	vimentin	2,860
WFDC2	WAP four-disulfide core domain 2	3,190
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa	-2,550

Tabelle 10 Expressionsänderung tumorassoziierter Gene. In der Leber von 6, 20, 46 und 60 Wochen alten Atp7b^{-/-}-Mäusen verglichen zum 60 Wochen alten WT. p≤0,05; *p≤0,1

Alter	<i>fold change/mean intensity</i>	CD44	JUN	Bcl2	Bcl6	SPP1	Cyclin D1
6 Wochen	nfach	0,00	2,12↓	0,00	0,00	0,00	0,00
	Int WT	1,00	7,05±0,19	1,00	1,00	1,00	1,00
	Int KO	1,00	5,97±0,09	1,00	1,00	1,00	1,00
20 Wochen	nfach	1,65*↓	4,19↑	1,08*↑	2,08*↑	1,76↑	2,2↑
	Int WT	9,19±0,16	8,11±0,11	6,73±0,31	6,18±0,72	11,58±0,08	10,64±0,28
	Int KO	8,47±0,23	10,18±0,06	6,83±0,17	7,23±0,21	12,39±0,16	11,78±0,06
46 Wochen	nfach	1,31*↑	2,49↑	1,21*↑	2,25*↑	6,64↑	2,20↑
	Int WT	7,96±0,34	7,02±0,18	7,95±0,13	8,53±0,18	10,69±0,24	9,72±0,26
	Int KO	8,34±0,66	8,34±0,41	8,23±0,19	9,69±0,55	13,42±0,39	10,86±0,18
60 Wochen	nfach	1,77*↑	5,03↑	1,42↑	2,73↑	4,26↑	1,99*↑
	Int WT	8,67±0,28	7,78±0,12	6,88±0,08	8,07±0,16	11,15±0,12	11,99±0,03
	Int KO	9,49±0,16	10,11±0,37	7,38±0,06	9,53±0,21	13,24±0,42	12,98±0,33

Tabelle 11 Expressionsänderung tumorassoziierter Gene in intrahepatischen Tumoren. In Tumoren der Leber von 60 Wochen alten Atp7b^{-/-}-Mäusen verglichen zum umliegenden tumorfreien Atp7b^{-/-}-Lebergewebe dieser Maus. p≤0,05; *p≤0,1

<i>fold change/mean intensity</i>	MMP7	CD44	SPP1	Bcl2	AFP	Keratin 7	Keratin 19
nfach	12,0↑	4,4↑	1,7*↑	1,9↑	15,2↑	5,7↑	10,6↑
Int WT	8,38±0,17	8,59±0,12	13,24±0,43	7,38±0,06	8,02±1,5	6,77±0,11	8,03±0,24
Int KO	12,46±1,61	10,51±1,36	14,00±0,73	8,28±0,58	11,07±1,23	9,46±1,37	11,76±1,53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Kupfer-Homöostase in Hepatozyten.	9
Abbildung 2 ATP7B.	10
Abbildung 3 Folgen der Kupferakkumulation in der Leber der <i>Atp7b</i> ^{-/-} -Maus.	16
Abbildung 4 Zusammenfassung der Vorgänge zur Tumorentstehung aus chronischer Entzündung.	17
Abbildung 5 <i>De-novo</i> Cholesterolsynthese über den Mevalonat-Weg.	19
Abbildung 6 Aufnahme des LDL in die Zelle und LDL-Rezeptor <i>recycling</i> .	21
Abbildung 7 Entstehung atherosklerotischer Plaques.	23
Abbildung 8 Kreuzungsschema zur Erzeugung der Doppel- <i>knockout</i> -Maus.	31
Abbildung 9 Lokalisation der BCA, Aorta und des Herzens in der Maus.	33
Abbildung 10 Auswertung der RNA-Qualität mit Hilfe des „ <i>Bioanalyzer</i> “.	35
Abbildung 11 Vorgehen zur Analyse der Daten aus den <i>Chip Performance/Microarray</i> -Experimenten.	36
Abbildung 12 RT-PCR Analyse der Expression von Keratin 7 und 19.	46
Abbildung 13 Genexpressionsänderung zellulärer Funktionen bzw. pathophysiologischer Prozesse.	47
Abbildung 14 Besonders stark betroffene Signalwege der Karzinogenese.	49
Abbildung 15 Expression Wnt-Signalwegs-assoziierter Gene.	51
Abbildung 16 <i>Microarray</i> -Expressionsanalyse von Onkogenen in der <i>Atp7b</i> ^{-/-} -Mausleber.	53
Abbildung 17 PCR-Produkte der Genotypisierung für <i>Atp7b</i> und <i>Ldlr</i> .	55
Abbildung 18 Gewicht der Mäuse aus dem Fütterungsexperiment im Alter von 20 Wochen.	57
Abbildung 19 Leberhistologie von <i>Atp7b</i> WT-, HE- und DKO-Mäusen auf <i>LDLR</i> ^{-/-} -Hintergrund.	58
Abbildung 20 Staging der Leberzellverfettung.	59
Abbildung 21 Kupfer-, Zink-, und Eisengehalt in der Leber der Mäuse.	60

Abbildung 22 RT-PCR zur Expression von Enzymen der Cholesterolsynthese.	62
Abbildung 23 Gesamtcholesterol und Triglyceride im Serum unter Standard-Haltungsdiät.	63
Abbildung 24 HDL-, LDL- und VLDL-Cholesterol im Serum unter Standard-Haltungsdiät.	65
Abbildung 25 Gesamtcholesterol und Triglyceride im Serum unter cholesterreicher Diät.	66
Abbildung 26 HDL-, LDL- und VLDL-Cholesterol im Serum unter cholesterreicher Diät.	68
Abbildung 27 Atherosklerotische Läsionen der BCA.	71
Abbildung 28 Atherosklerotische Läsionen in der Aortenwurzel.	72
Abbildung 29 Serumlipide in Morbus-Wilson-Patienten.	77
Abbildung 30 Wnt-Signalweg.	85
Abbildung 31 Postuliertes Konzept zur Karzinogenese in der $Atp7b^{-/-}$ -Maus.	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Spezifikationen der verwendeten Mausstämme.	28
Tabelle 2 Primer zur Genotypisierung (qualitative PCR).	28
Tabelle 3 Primer für die Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR.	29
Tabelle 4 Expressionsänderung ausgewählter Gene in intrahepatischen Tumoren der <i>Atp7b</i> ^{-/-} -Maus.	45
Tabelle 5 Verminderte Expression von Enzymen beteiligt an der Cholesterolsynthese.	61
Tabelle 6 Expressionsänderung ausgewählter Gene in Morbus-Wilson-Patienten.	75
Tabelle 7 Verminderte Expression von Enzymen beteiligt an der Cholesterolsynthese.	76
Tabelle 8 Serumlipidgehalte von weiblichen und männlichen Morbus Wilson Patienten.	76
Tabelle 9 Expressionsänderung tumorassoziierter Gene in intrahepatischen Tumoren.	97
Tabelle 10 Expressionsänderung tumorassoziierter Gene.	100
Tabelle 11 Expressionsänderung tumorassoziierter Gene in intrahepatischen Tumore.	100

Literaturverzeichnis

- [1] K. Schumann, H. G. Classen, H. H. Dieter, J. König, G. Multhaupt, M. Rukgauer, K. H. Summer, J. Bernhardt, and H. K. Biesalski, "Hohenheim consensus workshop: copper," *Eur J Clin Nutr*, vol. 56, no. 6, pp. 469–483, 2002.
- [2] B. Halliwell and J. M. Gutteridge, "The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases," *Mol Aspects Med*, vol. 8, no. 2, pp. 89–193, 1985.
- [3] E. D. Harris, "Copper transport: an overview.," *Proc Soc Exp Biol Med.*, vol. 196, no. 2, pp. 130–140, 1991.
- [4] T. D. M. Tapiero H Tew KD., "Trace elements in human physiology and pathology. Copper.," *Biomed Pharmacother.*, vol. 57, no. 9, pp. 386–398, 2003.
- [5] G. Westin and W. Schaffner, "A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene," *Embo J*, vol. 7, no. 12, pp. 3763–3770, 1988.
- [6] K. M. Ehrensberger and A. J. Bird, "Hammering out details: regulating metal levels in eukaryotes," *Trends Biochem Sci*, vol. 36, no. 10, pp. 524–531, 2011.
- [7] S. C. Luza and H. C. Speisky, "Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity.," *The American journal of clinical nutrition*, vol. 63, no. 5, p. 812S–20S, 1996.
- [8] S. Materia, M. A. Cater, L. W. Klomp, J. F. Mercer, and S. La Fontaine, "Clusterin and COMMD1 independently regulate degradation of the mammalian copper ATPases ATP7A and ATP7B," *J Biol Chem*, vol. 287, no. 4, pp. 2485–2499, 2012.
- [9] W. I. Vonk, C. Wijmenga, and B. van de Sluis, "Relevance of animal models for understanding mammalian copper homeostasis," *Am J Clin Nutr*, vol. 88, no. 3, p. 840S–5S, 2008.
- [10] M. J. Bingham, T. J. Ong, K. H. Summer, R. B. Middleton, and H. J. McArdle, "Physiologic function of the Wilson disease gene product, ATP7B," *Am J Clin Nutr*, vol. 67, no. 5 Suppl, p. 982S–987S, 1998.
- [11] K. Terada, M. L. Schilsky, N. Miura, and T. Sugiyama, "ATP7B (WND) protein," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 30, no. 10, pp. 1063–1067, 1998.
- [12] S. La Fontaine and J. F. Mercer, "Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis," *Arch Biochem Biophys*, vol. 463, no. 2, pp. 149–167, 2007.
- [13] S. Lutsenko, E. S. LeShane, and U. Shinde, "Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases," *Arch Biochem Biophys*, vol. 463, no. 2, pp. 134–148, 2007.

-
- [14] S. Lutsenko, N. L. Barnes, M. Y. Bartee, and O. Y. Dmitriev, "Function and regulation of human copper-transporting ATPases," *Physiol Rev*, vol. 87, no. 3, pp. 1011–1046, 2007.
- [15] S. Lutsenko, R. G. Efremov, R. Tsivkovskii, and J. M. Walker, "Human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein): biochemical properties and regulation," *J Bioenerg Biomembr*, vol. 34, no. 5, pp. 351–362, 2002.
- [16] S. La Fontaine Ackland, M.L., Mercer, J.F., "Mammalian copper-transporting ATPases, ATP7A and ATP7B: emerging roles.," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 42, no. 2, pp. 206–209, 2010.
- [17] J. F. Mercer, N. Barnes, J. Stevenson, D. Strausak, and R. M. Llanos, "Copper-induced trafficking of the cU-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis," *Biometals*, vol. 16, no. 1, pp. 175–184, 2003.
- [18] H. Roelofsen, H. Wolters, M. J. Van Luyn, N. Miura, F. Kuipers, and R. J. Vonk, "Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion," *Gastroenterology*, vol. 119, no. 3, pp. 782–793, 2000.
- [19] S. La Fontaine, M. L. Ackland, and J. F. Mercer, "Mammalian copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B: emerging roles," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 42, no. 2, pp. 206–209, 2010.
- [20] B. Hardman, U. Manuelpillai, E. M. Wallace, S. van de Waasenburg, M. Cater, J. F. B. Mercer, and M. L. Ackland, "Expression and localization of menkes and Wilson copper transporting ATPases in human placenta.," *Placenta*, vol. 25, no. 6, pp. 512–7, 2004.
- [21] J. Borjigin, A. S. Payne, J. Deng, X. Li, M. M. Wang, B. Ovodenko, J. D. Gitlin, and S. H. Snyder, "A novel pineal night-specific ATPase encoded by the Wilson disease gene," *J Neurosci*, vol. 19, no. 3, pp. 1018–1026, 1999.
- [22] L. Nyasae, R. Bustos, L. Braiterman, B. Eipper, and A. Hubbard, "Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper-dependent redistribution between two intracellular sites.," *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 292, no. 4, pp. G1181–94, 2007.
- [23] P. de Bie, P. Muller, C. Wijmenga, and L. W. Klomp, "Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes," *J Med Genet*, vol. 44, no. 11, pp. 673–688, 2007.
- [24] A. Gupta and S. Lutsenko, "Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential," *Future Med Chem*, vol. 1, no. 6, pp. 1125–1142, 2009.

-
- [25] A. Compston, "Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver, by S. A. Kinnier Wilson, (From the National Hospital, and the Laboratory of the National Hospital, Queen Square, London) *Brain* 1912: 34; 295-509," *Brain*, vol. 132, no. Pt 8, pp. 1997–2001, 2009.
- [26] J. N. Cumings, "The copper and iron content of brain and liver in the normal and in hepato-lenticular degeneration," *Brain*, vol. 71, no. Pt. 4, pp. 410–415, 1948.
- [27] A. G. Bearn, "Genetic and biochemical aspects of Wilson's disease," *Am J Med*, vol. 15, no. 4, pp. 442–449, 1953.
- [28] R. E. Tanzi, K. Petrukhin, I. Chernov, J. L. Pellequer, W. Wasco, B. Ross, D. M. Romano, E. Parano, L. Pavone, L. M. Brzustowicz, and et al., "The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene," *Nat Genet*, vol. 5, no. 4, pp. 344–350, 1993.
- [29] P. C. Bull, G. R. Thomas, J. M. Rommens, J. R. Forbes, and D. W. Cox, "The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene.," *Nature genetics*, vol. 5, no. 4, pp. 327–37, 1993.
- [30] K. Petrukhin, S. Lutsenko, I. Chernov, B. M. Ross, J. H. Kaplan, and T. C. Gilliam, "Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions.," *Human molecular genetics*, vol. 3, no. 9, pp. 1647–56, 1994.
- [31] R. Tsivkovskii, R. G. Efremov, and S. Lutsenko, "The role of the invariant His-1069 in folding and function of the Wilson's disease protein, the human copper-transporting ATPase ATP7B," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 15, pp. 13302–13308, 2003.
- [32] D. Huster, M. Hoppert, S. Lutsenko, J. Zinke, C. Lehmann, J. Mossner, F. Berr, and K. Caca, "Defective cellular localization of mutant ATP7B in Wilson's disease patients and hepatoma cell lines," *Gastroenterology*, vol. 124, no. 2, pp. 335–345, 2003.
- [33] D. Huster, A. Kühne, A. Bhattacharjee, L. Raines, V. Jantsch, J. Noe, W. Schirrmeister, I. Sommerer, O. Sabri, F. Berr, J. Mössner, B. Stieger, K. Caca, and S. Lutsenko, "Diverse functional properties of Wilson disease ATP7B variants.," *Gastroenterology*, vol. 142, no. 4, pp. 947–956.e5, 2012.
- [34] K. Caca, P. Ferenci, H. J. Kuhn, C. Polli, H. Willgerodt, B. Kunath, W. Hermann, J. Mossner, and F. Berr, "High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis," *J Hepatol*, vol. 35, no. 5, pp. 575–581, 2001.

-
- [35] U. Merle, M. Schaefer, P. Ferenci, and W. Stremmel, "Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study," *Gut*, vol. 56, no. 1, pp. 115–120, 2007.
- [36] J. M. Walshe, E. Waldenström, V. Sams, H. Nordlinder, and K. Westermarck, "Abdominal malignancies in patients with Wilson's disease.," *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, vol. 96, no. 9, pp. 657–62, 2003.
- [37] P. Ferenci, "Pathophysiology and clinical features of Wilson disease," *Metab Brain Dis*, vol. 19, no. 3–4, pp. 229–239, 2004.
- [38] T. U. Hoogenraad, C. J. Van den Hamer, and J. Van Hattum, "Effective treatment of Wilson's disease with oral zinc sulphate: two case reports.," *British medical journal (Clinical research ed.)*, vol. 289, no. 6440, pp. 273–6, 1984.
- [39] E. A. Roberts and M. L. Schilsky, "Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update," *Hepatology*, vol. 47, no. 6, pp. 2089–2111, 2008.
- [40] L. M. Cullen, L. Prat, and D. W. Cox, "Genetic variation in the promoter and 5' UTR of the copper transporter, ATP7B, in patients with Wilson disease.," *Clinical genetics*, vol. 64, no. 5, pp. 429–32, 2003.
- [41] A. N. Irani, H. Malhi, S. Slehria, G. R. Gorla, I. Volenberg, M. L. Schilsky, and S. Gupta, "Correction of liver disease following transplantation of normal rat hepatocytes into Long-Evans Cinnamon rats modeling Wilson's disease," *Mol Ther*, vol. 3, no. 3, pp. 302–309, 2001.
- [42] D. Ha-Hao, U. Merle, C. Hofmann, H. Wesch, J. Doll, G. Auburger, S. Tuma, M. Strauss, and W. Stremmel, "Chances and shortcomings of adenovirus-mediated ATP7B gene transfer in Wilson disease: proof of principle demonstrated in a pilot study with LEC rats," *Z Gastroenterol*, vol. 40, no. 4, pp. 209–216, 2002.
- [43] D. Huster, H. J. Kuhn, J. Mossner, and K. Caca, "[Wilson disease]," *Internist (Berl)*, vol. 46, no. 7, pp. 731–732, 734–736, 738–740, 2005.
- [44] D. Huster, "Wilson disease," *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, vol. 24, no. 5, pp. 531–539, 2010.
- [45] H. Rauch, "Toxic milk, a new mutation affecting copper metabolism in the mouse," *J Hered*, vol. 74, no. 3, pp. 141–144, 1983.
- [46] V. Coronado, M. Nanji, and D. W. Cox, "The Jackson toxic milk mouse as a model for copper loading," *Mamm Genome*, vol. 12, no. 10, pp. 793–795, 2001.
- [47] K. Terada, Y. Kawarada, N. Miura, O. Yasui, K. Koyama, and T. Sugiyama, "Copper incorporation into ceruloplasmin in rat livers.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1270, no. 1, pp. 58–62, 1995.
- [48] D. Terwel, Y.-N. Löschmann, H. H.-J. Schmidt, H. R. Schöler, T. Cantz, and M. T. Heneka, "Neuroinflammatory and behavioural changes in the Atp7B mutant

- mouse model of Wilson's disease.," *Journal of neurochemistry*, vol. 118, no. 1, pp. 105–12, 2011.
- [49] M. B. Theophilos, D. W. Cox, and J. F. Mercer, "The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease," *Hum Mol Genet*, vol. 5, no. 10, pp. 1619–1624, 1996.
- [50] X. Li, S. Chen, Q. Wang, D. J. Zack, S. H. Snyder, and J. Borjigin, "A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 4, pp. 1876–1881, 1998.
- [51] O. I. Buiakova, J. Xu, S. Lutsenko, S. Zeitlin, K. Das, S. Das, B. M. Ross, C. Mekios, I. H. Scheinberg, and T. C. Gilliam, "Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation," *Hum Mol Genet*, vol. 8, no. 9, pp. 1665–1671, 1999.
- [52] D. Huster, M. J. Finegold, C. T. Morgan, J. L. Burkhead, R. Nixon, S. M. Vanderwerf, C. T. Gilliam, and S. Lutsenko, "Consequences of copper accumulation in the livers of the *Atp7b*^{-/-} (Wilson disease gene) knockout mice," *Am J Pathol*, vol. 168, no. 2, pp. 423–434, 2006.
- [53] D. Huster, T. D. Purnat, J. L. Burkhead, M. Ralle, O. Fiehn, F. Stuckert, N. E. Olson, D. Teupser, and S. Lutsenko, "High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease," *J Biol Chem*, vol. 282, no. 11, pp. 8343–8355, 2007.
- [54] F. Balkwill and A. Mantovani, "Inflammation and cancer: back to Virchow?," *Lancet*, vol. 357, no. 9255, pp. 539–45, 2001.
- [55] H. F. Dvorak, "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing," *The New England journal of medicine*, vol. 315, no. 26, pp. 1650–9, 1986.
- [56] L. M. Coussens and Z. Werb, "Inflammation and cancer.," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 860–7, 2002.
- [57] J. K. Kundu and Y.-J. Surh, "Emerging avenues linking inflammation and cancer.," *Free radical biology & medicine*, vol. 52, no. 9, pp. 2013–37, 2012.
- [58] H. Nakagawa and S. Maeda, "Inflammation- and stress-related signaling pathways in hepatocarcinogenesis.," *World journal of gastroenterology : WJG*, vol. 18, no. 31, pp. 4071–81, 2012.
- [59] G. He and M. Karin, "NF- κ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer.," *Cell research*, vol. 21, no. 1, pp. 159–68, 2011.
- [60] H. C. Lee, M. Kim, and J. R. Wands, "Wnt/Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma.," *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, vol. 11, pp. 1901–15, 2006.

-
- [61] S. P. S. Monga, "Role of Wnt/ β -catenin signaling in liver metabolism and cancer.," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 43, no. 7, pp. 1021–9, 2011.
- [62] J. L. Goldstein and M. S. Brown, "Regulation of the mevalonate pathway.," *Nature*, vol. 343, no. 6257, pp. 425–30, 1990.
- [63] Y. Jo and R. A. Debose-Boyd, "Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase.," *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 45, no. 3, pp. 185–98, 2010.
- [64] F. R. Maxfield and G. van Meer, "Cholesterol, the central lipid of mammalian cells.," *Current opinion in cell biology*, vol. 22, no. 4, pp. 422–9, 2010.
- [65] A. J. Lusis, "Atherosclerosis," *Nature*, vol. 407, no. 6801, pp. 233–241, 2000.
- [66] P. Libby, "Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization," *Am J Cardiol*, vol. 86, no. 8B, p. 3J–8J; discussion 8J–9J, 2000.
- [67] S. M. Gordon, S. Hofmann, D. S. Askew, and W. S. Davidson, "High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore," *Trends Endocrinol Metab*, vol. 22, no. 1, pp. 9–15, 2011.
- [68] G. D. Norata, A. Pirillo, and A. L. Catapano, "HDLs, immunity, and atherosclerosis," *Curr Opin Lipidol*, vol. 22, no. 5, pp. 410–416, 2011.
- [69] M. S. Brown and J. L. Goldstein, "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis," *Science*, vol. 232, no. 4746, pp. 34–47, 1986.
- [70] J. Gent and I. Braakman, "Low-density lipoprotein receptor structure and folding," *Cell Mol Life Sci*, vol. 61, no. 19–20, pp. 2461–2470, 2004.
- [71] J. L. Goldstein and M. S. Brown, "The LDL receptor.," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 29, no. 4, pp. 431–8, 2009.
- [72] H. Jeon and S. C. Blacklow, "Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor," *Annu Rev Biochem*, vol. 74, pp. 535–562, 2005.
- [73] S. E. Leigh, A. H. Foster, R. A. Whittall, C. S. Hubbart, and S. E. Humphries, "Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database," *Ann Hum Genet*, vol. 72, no. Pt 4, pp. 485–498, 2008.
- [74] Statistisches Bundesamt (Destatis). www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen, Stand: 28.01.2013
- [75] "Classics in arteriosclerosis research: On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological processes by N.

- Anitschkow and S. Chaladow, translated by Mary Z. Pelias, 1913," *Arteriosclerosis*, vol. 3, no. 2, pp. 178–182, 1983.
- [76] P. Libby, P. M. Ridker, and G. K. Hansson, "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis.," *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 317–25, 2011.
- [77] C. Weber and H. Noels, "Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options.," *Nature medicine*, vol. 17, no. 11, pp. 1410–22, 2011.
- [78] I. Buhaescu and H. Izzedine, "Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications.," *Clinical biochemistry*, vol. 40, no. 9–10, pp. 575–84, 2007.
- [79] J. T. Salonen, R. Salonen, H. Korpela, S. Suntuinen, and J. Tuomilehto, "Serum copper and the risk of acute myocardial infarction: a prospective population study in men in eastern Finland.," *American journal of epidemiology*, vol. 134, no. 3, pp. 268–76, 1991.
- [80] M. A. Dubick, G. C. Hunter, S. M. Casey, and C. L. Keen, "Aortic ascorbic acid, trace elements, and superoxide dismutase activity in human aneurysmal and occlusive disease.," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, vol. 184, no. 2, pp. 138–43, 1987.
- [81] C. Smith, M. J. Mitchinson, O. I. Aruoma, and B. Halliwell, "Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions.," *The Biochemical journal*, vol. 286 (Pt 3, pp. 901–5, 1992.
- [82] S. M. Lynch and B. Frei, "Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein.," *Journal of lipid research*, vol. 34, no. 10, pp. 1745–53, 1993.
- [83] H. Wei, W.-J. Zhang, T. S. McMillen, R. C. Leboeuf, and B. Frei, "Copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits vascular inflammation and atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice.," *Atherosclerosis*, vol. 223, no. 2, pp. 306–13, 2012.
- [84] J. Manthey, M. Stoeppler, W. Morgenstern, E. Nüssel, D. Opherk, A. Weintraut, H. Wesch, and W. Kübler, "Magnesium and trace metals: risk factors for coronary heart disease? Association between blood levels and angiographic findings.," *Circulation*, vol. 64, no. 4, pp. 722–9, 1981.
- [85] D. J. Lamb, G. L. Reeves, A. Taylor, and G. A. Ferns, "Dietary copper supplementation reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit.," *Atherosclerosis*, vol. 146, no. 1, pp. 33–43, 1999.
- [86] C. Leeuwenburgh, J. E. Rasmussen, F. F. Hsu, D. M. Mueller, S. Pennathur, and J. W. Heinecke, "Mass spectrometric quantification of markers for protein

- oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 6, pp. 3520–6, 1997.
- [87] C. Zaragoza, C. Gomez-Guerrero, J. L. Martin-Ventura, L. Blanco-Colio, B. Lavin, B. Mallavia, C. Tarin, S. Mas, A. Ortiz, and J. Egido, "Animal models of cardiovascular diseases," *J Biomed Biotechnol*, vol. 2011, p. 497841, 2011.
- [88] S. H. Zhang, R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, and N. Maeda, "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E," *Science*, vol. 258, no. 5081, pp. 468–471, 1992.
- [89] A. S. Plump, J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin, and J. L. Breslow, "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells," *Cell*, vol. 71, no. 2, pp. 343–353, 1992.
- [90] H. Zhang, L. M. Wu, and J. Wu, "Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines," *Mediators Inflamm*, vol. 2011, p. 949072, 2011.
- [91] S. Ishibashi, M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. D. Gerard, R. E. Hammer, and J. Herz, "Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery," *J Clin Invest*, vol. 92, no. 2, pp. 883–893, 1993.
- [92] D. Teupser, A. D. Persky, and J. L. Breslow, "Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement)," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 23, no. 10, pp. 1907–1913, 2003.
- [93] S. Ishibashi, J. L. Goldstein, M. S. Brown, J. Herz, and D. K. Burns, "Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 93, no. 5, pp. 1885–93, 1994.
- [94] P. A. VanderLaan, C. A. Reardon, R. A. Thisted, and G. S. Getz, "VLDL best predicts aortic root atherosclerosis in LDL receptor deficient mice.," *Journal of lipid research*, vol. 50, no. 3, pp. 376–85, 2009.
- [95] R. A. Irizarry, B. M. Bolstad, F. Collin, L. M. Cope, B. Hobbs, and T. P. Speed, "Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data," *Nucleic Acids Res*, vol. 31, no. 4, p. e15, 2003.
- [96] M. W. Pfaffl, G. W. Horgan, and L. Dempfle, "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR," *Nucleic Acids Res*, vol. 30, no. 9, p. e36, 2002.

- [97] D. Huster and S. Lutsenko, "Wilson disease: not just a copper disorder. Analysis of a Wilson disease model demonstrates the link between copper and lipid metabolism," *Mol Biosyst*, vol. 3, no. 12, pp. 816–824, 2007.
- [98] E. M. Brunt, C. G. Janney, A. M. Di Bisceglie, B. A. Neuschwander-Tetri, and B. R. Bacon, "Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions.," *The American journal of gastroenterology*, vol. 94, no. 9, pp. 2467–74, 1999.
- [99] J. Seessle, A. Gohdes, D. N. Gotthardt, J. Pfeiffenberger, N. Eckert, W. Stremmel, U. Reuner, and K. H. Weiss, "Alterations of lipid metabolism in Wilson disease.," *Lipids in health and disease*, vol. 10, p. 83, 2011.
- [100] M. Y. Bartee and S. Lutsenko, "Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level," *Biometals*, vol. 20, no. 3–4, pp. 627–637, 2007.
- [101] K. Morita, M. Furuse, K. Fujimoto, and S. Tsukita, "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 2, pp. 511–6, 1999.
- [102] C. L. MacLeod, A. M. Fong, B. S. Seal, L. Walls, and M. F. Wilkinson, "Isolation of novel complementary DNA clones from T lymphoma cells: one encodes a putative multiple membrane-spanning protein.," *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 1, no. 6, pp. 271–9, 1990.
- [103] H. Nagase and J. F. Woessner, "Matrix metalloproteinases.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 31, pp. 21491–4, 1999.
- [104] K. Yamashita, I. Azumano, M. Mai, and Y. Okada, "Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis.," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 79, no. 2, pp. 187–94, 1998.
- [105] C. Resende, A. Thiel, J. C. Machado, and A. Ristimäki, "Gastric cancer: basic aspects.," *Helicobacter*, vol. 16 Suppl 1, pp. 38–44, 2011.
- [106] I. Ozaki, T. Mizuta, G. Zhao, H. Yotsumoto, T. Hara, S. Kajihara, A. Hisatomi, T. Sakai, and K. Yamamoto, "Involvement of the Ets-1 Gene in Overexpression of Matrilysin in Human Hepatocellular Carcinoma," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 22, pp. 6519–6525, 2000.
- [107] Y. Usami, H. Chiba, F. Nakayama, J. Ueda, Y. Matsuda, N. Sawada, T. Komori, A. Ito, and H. Yokozaki, "Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus.," *Human pathology*, vol. 37, no. 5, pp. 569–77, 2006.

- [108] A. H. Johnson, H. F. Frierson, A. Zaika, S. M. Powell, J. Roche, S. Crowe, C. A. Moskaluk, and W. El-Rifai, "Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis," *The American journal of pathology*, vol. 167, no. 2, pp. 577–84, 2005.
- [109] S. Kuhn, M. Koch, T. Nübel, M. Ladwein, D. Antolovic, P. Klingbeil, D. Hildebrand, G. Moldenhauer, L. Langbein, W. W. Franke, J. Weitz, and M. Zöller, "A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression," *Molecular cancer research : MCR*, vol. 5, no. 6, pp. 553–67, 2007.
- [110] M. Ladwein, U.-F. Pape, D.-S. Schmidt, M. Schnölzer, S. Fiedler, L. Langbein, W. W. Franke, G. Moldenhauer, and M. Zöller, "The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7," *Experimental cell research*, vol. 309, no. 2, pp. 345–57, 2005.
- [111] M. Balzar, M. J. Winter, C. J. de Boer, and S. V. Litvinov, "The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)." *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, vol. 77, no. 10, pp. 699–712, 1999.
- [112] B. T. F. van der Gun, L. J. Melchers, M. H. J. Ruiters, L. F. M. H. de Leij, P. M. J. McLaughlin, and M. G. Rots, "EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 11, pp. 1913–21, 2010.
- [113] G. Yu, X. Zhang, H. Wang, D. Rui, A. Yin, G. Qiu, and Y. He, "CpG island methylation status in the EpCAM promoter region and gene expression," *Oncology reports*, vol. 20, no. 5, pp. 1061–7, 2008.
- [114] K.-Y. Tai, S.-G. Shiah, Y.-S. Shieh, Y.-R. Kao, C.-Y. Chi, E. Huang, H.-S. Lee, L.-C. Chang, P.-C. Yang, and C.-W. Wu, "DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression," *Oncogene*, vol. 26, no. 27, pp. 3989–97, 2007.
- [115] B. T. F. van der Gun, R. Wasserkort, A. Monami, A. Jeltsch, T. Raskó, K. Slaska-Kiss, R. Cortese, M. G. Rots, L. F. M. H. de Leij, M. H. J. Ruiters, A. Kiss, E. Weinhold, and P. M. J. McLaughlin, "Persistent downregulation of the pancarcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule via active intranuclear methylation," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 123, no. 2, pp. 484–9, 2008.
- [116] J. W. Kim, Q. Ye, M. Forgues, Y. Chen, A. Budhu, J. Sime, L. J. Hofseth, R. Kaul, and X. W. Wang, "Cancer-associated molecular signature in the tissue samples of patients with cirrhosis," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 39, no. 2, pp. 518–27, 2004.
- [117] T. Yamashita, M. Forgues, W. Wang, J. W. Kim, Q. Ye, H. Jia, A. Budhu, K. A. Zanetti, Y. Chen, L.-X. Qin, Z.-Y. Tang, and X. W. Wang, "EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma," *Cancer research*, vol. 68, no. 5, pp. 1451–61, 2008.

- [118] C. J. de Boer, J. H. van Krieken, C. M. Janssen-van Rhijn, and S. V. Litvinov, "Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver," *The Journal of pathology*, vol. 188, no. 2, pp. 201–6, 1999.
- [119] E. Schmelzer, E. Wauthier, and L. M. Reid, "The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors.," *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 24, no. 8, pp. 1852–8, 2006.
- [120] S.-Y. Peng, W. J. Chen, P.-L. Lai, Y.-M. Jeng, J.-C. Sheu, and H.-C. Hsu, "High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations.," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 112, no. 1, pp. 44–50, 2004.
- [121] K. Taketa, "Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 12, no. 6, pp. 1420–32, 1990.
- [122] T. Uenishi, S. Kubo, T. Yamamoto, T. Shuto, M. Ogawa, H. Tanaka, S. Tanaka, K. Kaneda, and K. Hirohashi, "Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence.," *Cancer science*, vol. 94, no. 10, pp. 851–7, 2003.
- [123] A. Durnez, C. Verslype, F. Nevens, J. Fevery, R. Aerts, J. Pirenne, E. Lesaffre, L. Libbrecht, V. Desmet, and T. Roskams, "The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin.," *Histopathology*, vol. 49, no. 2, pp. 138–51, 2006.
- [124] F. S. Ramalho, L. N. Z. Ramalho, L. Della Porta, and S. Zucoloto, "Comparative immunohistochemical expression of p63 in human cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma.," *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 21, no. 8, pp. 1276–80, 2006.
- [125] D. Naor, R. V. Sionov, and D. Ish-Shalom, "CD44: structure, function, and association with the malignant process.," *Advances in cancer research*, vol. 71, pp. 241–319, 1997.
- [126] K. Endo and T. Terada, "Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival.," *Journal of hepatology*, vol. 32, no. 1, pp. 78–84, 2000.
- [127] R. Zhang, X. Pan, Z. Huang, G. F. Weber, and G. Zhang, "Osteopontin Enhances the Expression and Activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 Axis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 8, p. e23831, 2011.
- [128] M. Scatena, L. Liaw, and C. M. Giachelli, "Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease.," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 27, no. 11, pp. 2302–9, 2007.

- [129] K. Tanaka, Y. Hinoda, H. Takahashi, H. Sakamoto, Y. Nakajima, and K. Imai, "Decreased expression of biliary glycoprotein in hepatocellular carcinomas.," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 74, no. 1, pp. 15–9, 1997.
- [130] J. Datta, S. Majumder, H. Kutay, T. Motiwala, W. Frankel, R. Costa, H. C. Cha, O. A. MacDougald, S. T. Jacob, and K. Ghoshal, "Metallothionein expression is suppressed in primary human hepatocellular carcinomas and is mediated through inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha by phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade.," *Cancer research*, vol. 67, no. 6, pp. 2736–46, 2007.
- [131] N. L. Lazarevich, O. A. Cheremnova, E. V. Varga, D. A. Ovchinnikov, E. I. Kudrjavitseva, O. V. Morozova, D. I. Fleishman, N. V. Engelhardt, and S. A. Duncan, "Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 39, no. 4, pp. 1038–47, 2004.
- [132] D. I. Johnson, "Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity.," *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 63, no. 1, pp. 54–105, 1999.
- [133] G. Fritz, I. Just, and B. Kaina, "Rho GTPases are over-expressed in human tumors.," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 81, no. 5, pp. 682–7, 1999.
- [134] E. Sahai and C. J. Marshall, "RHO-GTPases and cancer." *Nature reviews. Cancer*, vol. 2, no. 2, pp. 133–42, 2002.
- [135] D. J. Slamon, W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, and A. Ullrich, "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 244, no. 4905, pp. 707–12, 1989.
- [136] M. S. Hayden and S. Ghosh, "Signaling to NF-kappaB.," *Genes & development*, vol. 18, no. 18, pp. 2195–224, 2004.
- [137] T. Reya and H. Clevers, "Wnt signalling in stem cells and cancer.," *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 843–50, 2005.
- [138] M. K. McElwee, M. O. Song, and J. H. Freedman, "Copper activation of NF-kappaB signaling in HepG2 cells.," *Journal of molecular biology*, vol. 393, no. 5, pp. 1013–21, 2009.
- [139] P. Muller, H. van Bakel, B. van de Sluis, F. Holstege, C. Wijmenga, and L. W. J. Klomp, "Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes.," *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 12, no. 4, pp. 495–507, 2007.

- [140] F. Toledo and G. M. Wahl, "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas.," *Nature reviews. Cancer*, vol. 6, no. 12, pp. 909–23, 2006.
- [141] P. Wang, T. Lushnikova, J. Odvody, T. C. Greiner, S. N. Jones, and C. M. Eischen, "Elevated Mdm2 expression induces chromosomal instability and confers a survival and growth advantage to B cells.," *Oncogene*, vol. 27, no. 11, pp. 1590–8, 2008.
- [142] J. Wang, J. Shou, and X. Chen, "Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53.," *Oncogene*, vol. 19, no. 14, pp. 1843–8, 2000.
- [143] L. C. Cantley, "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no. 8, pp. 4240–4245, 1999.
- [144] P. Y. He K, Chen Z, Ma Y, "Identification of high-copper-responsive target pathways in *Atp7b* knockout mouse liver by GSEA on microarray data sets.," *Mamm Genome.*, vol. 11–12, pp. 703–703, 2011.
- [145] S. Kersten, B. Desvergne, and W. Wahli, "Roles of PPARs in health and disease.," *Nature*, vol. 405, no. 6785, pp. 421–4, 2000.
- [146] A. Micsenyi, X. Tan, T. Sneddon, J.-H. Luo, G. K. Michalopoulos, and S. P. S. Monga, "Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development.," *Gastroenterology*, vol. 126, no. 4, pp. 1134–46, 2004.
- [147] E. Levy, S. Brunet, F. Alvarez, E. Seidman, G. Bouchard, E. Escobar, and S. Martin, "Abnormal hepatobiliary and circulating lipid metabolism in the Long-Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease.," *Life sciences*, vol. 80, no. 16, pp. 1472–83, 2007.
- [148] V. Bieghs, P. J. Van Gorp, K. Wouters, T. Hendriks, M. J. Gijbels, M. van Bilsen, J. Bakker, C. J. Binder, D. Lütjohann, B. Staels, M. H. Hofker, and R. Shiri-Sverdlov, "LDL receptor knock-out mice are a physiological model particularly vulnerable to study the onset of inflammation in non-alcoholic fatty liver disease.," *PLoS one*, vol. 7, no. 1, p. e30668, 2012.
- [149] E. De Marinis, C. Martini, A. Trentalance, and V. Pallottini, "Sex differences in hepatic regulation of cholesterol homeostasis.," *The Journal of endocrinology*, vol. 198, no. 3, pp. 635–43, 2008.
- [150] S. W. Sauer, U. Merle, S. Opp, D. Haas, G. F. Hoffmann, W. Stremmel, and J. G. Okun, "Severe dysfunction of respiratory chain and cholesterol metabolism in *Atp7b*(-/-) mice as a model for Wilson disease.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1812, no. 12, pp. 1607–15, 2011.
- [151] M. Ralle, D. Huster, S. Vogt, W. Schirrmeister, J. L. Burkhead, T. R. Capps, L. Gray, B. Lai, E. Maryon, and S. Lutsenko, "Wilson disease at a single cell level: intracellular copper trafficking activates compartment-specific responses in

- hepatocytes,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 40, pp. 30875–83, 2010.
- [152] R. K. Tangirala, E. M. Rubin, and W. Palinski, “Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice,” *Journal of lipid research*, vol. 36, no. 11, pp. 2320–8, 1995.
- [153] E. Van Craeyveld, S. C. Gordts, N. Singh, F. Jacobs, and B. De Geest, “A critical reassessment of murine and rabbit models of atherosclerosis: focus on lesion progression and remodelling,” *Acta cardiologica*, vol. 67, no. 1, pp. 11–21, 2012.
- [154] G. J. Brewer, “Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer’s disease,” *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, vol. 232, no. 2, pp. 323–35, 2007.
- [155] H. D. Lieu, S. K. Withycombe, Q. Walker, J. X. Rong, R. L. Walzem, J. S. Wong, R. L. Hamilton, E. A. Fisher, and S. G. Young, “Eliminating atherogenesis in mice by switching off hepatic lipoprotein secretion,” *Circulation*, vol. 107, no. 9, pp. 1315–21, 2003.
- [156] M. Liggi, D. Murgia, A. Civolani, E. Demelia, O. Sorbello, and L. Demelia, “The relationship between copper and steatosis in Wilson’s disease,” *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 2012.
- [157] K. M. Kegley, M. A. Sellers, M. J. Ferber, M. W. Johnson, D. W. Joelson, and R. Shrestha, “Fulminant Wilson’s disease requiring liver transplantation in one monozygotic twin despite identical genetic mutation,” *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, vol. 10, no. 5, pp. 1325–9, 2010.
- [158] A. Członkowska, G. Gromadzka, and G. Chabik, “Monozygotic female twins discordant for phenotype of Wilson’s disease,” *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, vol. 24, no. 7, pp. 1066–9, 2009.
- [159] U. Merle, J. Encke, S. Tuma, M. Volkmann, L. Naldini, and W. Stremmel, “Lentiviral gene transfer ameliorates disease progression in Long-Evans cinnamon rats: an animal model for Wilson disease,” *Scandinavian journal of gastroenterology*, vol. 41, no. 8, pp. 974–82, 2006.
- [160] S. M. Park, K. Vo, M. Lallier, A.-S. Cloutier, P. Brochu, F. Alvarez, and S. R. Martin, “Hepatocyte transplantation in the Long Evans Cinnamon rat model of Wilson’s disease,” *Cell transplantation*, vol. 15, no. 1, pp. 13–22, 2006.

Wiebke Schirrmeister

Diplom-Biologin

Tel. 0391-59099767 / 0177-5644143

Weinbergstraße 30a

39106 Magdeburg

Email. w.schirrmeister@gmail.com

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema:

Kupfertoizität, Regeneration und Lipidmetabolismus in der *Atp7b*^{-/-}-Maus,

einem Tiermodell des Morbus Wilson

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 29.01.2013

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. habil. Dominik Huster, der mir im Rahmen seines DFG-Forschungsprojektes die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglichte. Vor allem danke ich herzlichst für die vielfältige Unterstützung während der experimentellen Phase und der Phase der Verfassung dieser Dissertation durch immerwährende Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie wertvollen wissenschaftlichen Rat und Weitergabe seiner umfangreichen klinischen Kenntnisse, die bei dem translationalen Ansatz dieser Arbeit von höchstem Wert waren.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. habil. Peter Malfertheiner für die Möglichkeit, dieses Thema an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie (KGHI) am Universitätsklinikum Magdeburg bearbeiten zu können, sowie für die Schaffung einer angenehmen wissenschaftlichen Arbeitsatmosphäre an der Klinik.

Den Mitarbeitern der KGHI sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt. Allen voran und stellvertretend danke ich insbesondere Herrn Professor Dr. rer. nat. habil. Thomas Wex für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Planung und der Durchführung der Experimente sowie der Analyse und Interpretation der Ergebnisse. Außerdem danke ich herzlich für die fachliche und moralische Unterstützung bei der Niederschrift dieser Dissertation.

Frau Simone Philipsen gilt mein besonderer Dank für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und für das „wachsamer Auge“ auf die Organisation der Mauslisten.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Heike Wex für die Bestimmung der Serumlipidkonzentrationen und Frau Dr. rer. nat. Martina Ralle (OHSU, Portland, Oregon) für die Messung der Metallgehalte in der Mausleber. Frau Professor Dr. Svetlana Lutsenko (Johns-Hopkins-University, Baltimore, Maryland) danke ich vielmals für die wertvollen Hinweise zur Auswertung der Daten der Tumorcharakterisierung und -entstehung, sowie für den Zugang zur „*Genesifter*“- und „*Ingenuity Pathway*“-Analysesoftware.

Mein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter der Klinischen Chemie der Universitätsmedizin Leipzig, allen voran an Herrn Professor Dr. med. habil. Daniel Teupser (jetzt Ludwig-Maximilian-Universität München) für die Anregung zum Teilprojekt Atherosklerose und die Überlassung der LDLR^{-/-}-Maus-Zuchtpaare. Herrn Wolfgang Wilfert danke ich für Anregungen und Diskussionsbereitschaft besonders hinsichtlich der Genotypisierung und Lipidbestimmung. Frau Franziska Jeromin und Frau Oehlert für die Unterstützung bei den Färbungen und der Auswertung der atherosklerotischen Läsionen in BCA und Aortenwurzel.

Ich danke Herrn Professor Dr. rer. nat. habil. Daniel Huster des Instituts für medizinische Physik und Biophysik der Universitätsmedizin Leipzig für die freundliche Aufnahme in Leipzig und Überlassung der Arbeitsplätze sowie die vielfältige Unterstützung.

Vielen Dank an Herrn Professor Dr. rer. nat. habil. Rolf Gebhardt und Dr. rer. nat. Jan Böttger und Frau Susanne Aleithe des Instituts für Biochemie der Universität Leipzig für die hilfreiche Unterstützung bei der Analyse des Wnt-Signalweges.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meiner Familie und Freunden, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Meinem Mann danke ich für die unendliche Geduld besonders während der letzten Phase der Verfassung der Dissertation.

Lebenslauf

**Dipl.-biol. Wiebke Schirrmeister,
geb. Scherbatzki**

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	16. Juli 1982
Geburtsort	Magdeburg
Familienstand	verheiratet, 1 Sohn
Geschlecht	weiblich
Nationalität	deutsch
Adresse	Weinbergstraße 30a 39106 Magdeburg
Email	w.schirrmeister@gmail.com

Ausbildung

11/2013	Promotion zur Dr. rer. nat. Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Fakultät für Naturwissenschaften <u>Betreuer:</u> Prof. Dr. med. Dominik Huster
11/2008 bis 10/2013	Otto-von-Guericke Universität Magdeburg Fakultät für Naturwissenschaften, Promotionsstudentin
10/2008	Abschluss als Diplom Biologin (Dipl.-biol.) Note: 1,2 „sehr gut“ Otto-von-Guericke Universität Magdeburg <u>Titel der Diplomarbeit:</u> Selektives <i>shedding</i> von Oberflächenproteinen nach <i>Helicobacter pylori</i> Infektion. Note: 1,2 „sehr gut“
10/2005 bis 10/2008	Otto-von-Guericke Universität Magdeburg Fachrichtung: Neurobiologie/Neurowissenschaften
10/2003 bis 09/2005	Universität Potsdam Fachrichtung: Biologie Vordiplom, Note: 1,3 „sehr gut“
10/2002 bis 09/2003	Friedrich-Schiller-Universität Jena Fachrichtung: Zahnmedizin
06/2002	Humboldt Gymnasium, Magdeburg Abitur, Abschlussnote: 1,5 „sehr gut“

06/2001 bis 09/2001	Höerskool Pietersburg, Polokwane, South Africa
09/1993 bis 06/2002	Humboldt Gymnasium, Magdeburg

Beruflicher Werdegang

Seit 07/2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Medizinische Fakultät, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
02/2013 bis 06/2013	Mitarbeiterin Kundenservice Lipocalyx GmbH, Halle/Saale
01/2012 bis 05/2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Promotionsstudentin , Universitätsmedizin Leipzig, Institut für medizinische Physik und Biophysik
11/2008 bis 12/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Promotionsstudentin , Uniklinikum Magdeburg A.ö.R, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
01/2007 bis 10/2008	Wissenschaftliche Hilfskraft , Universitätsklinikum Magdeburg , A.ö.R., Klinik für Neurologie II
10/2006 bis 03/2007	Tutor/Lehrtätigkeit Universität Magdeburg, Fakultät für Naturwissenschaften

Praktika und Weiterbildungen

04/2010	Good Clinical Practice-Schulung , Clinrex GmbH/ Tumorzentrum Magdeburg/Sachsen-Anhalt e.V.
02/2009	Kursus zum tierexperimentellen Arbeiten , Universität Magdeburg, Medizinische Fakultät
09/2007 bis 10/2007	Visiting Research Assistant , <i>Institute of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds, Professor Nigel Hooper</i>
06/2003 bis 09/2003	Praktikum , Institut für Experimentelle Innere Medizin, OvGU Magdeburg, Prof. Dr. Uwe Lendeckel

Publikationen

Ectodomain shedding of E-cadherin and c-Met is induced by Helicobacter pylori infection. **Schirrmeister W**, Gnad T, Wex T, Higashiyama S, Wolke C, Naumann M, Lendeckel U. Exp Cell Res. 315(20):3500-8; 2009

Wilson's disease at a single cell level: intracellular copper trafficking activates compartment-specific responses in hepatocytes. Ralle M, Huster D, Vogt S, **Schirrmeister W**, Burkhead JL, Capps TR, Gray L, Lai B, Maryon E, Lutsenko S. *J Biol Chem.* 285(40):30875-83; 2010

Diverse Functional Properties of Wilson Disease ATP7B Variants. Huster D, Kühne A, Bhattacharjee A, Raines L, Jantsch V, Noe J, **Schirrmeister W**, Sommerer I, Sabri O, Berr F, Mossner J, Stieger B, Caca K, Lutsenko S. *Gastroenterology.* 142(947); 2012

Auszeichnungen

- | | |
|---------|---|
| 09/2013 | <i>Abstractpreis und Vortragspreis der DGVS anlässlich der 68. Jahrestagung 2013, Nürnberg</i> |
| 10/2013 | <i>Abstractpreis Travel Grant der UEG Week 2013, Berlin</i> |
| 11/2013 | <i>Vortragspreis, European GI Bridging Meeting 2013, Berlin</i> |