

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Gesamtfakultät
für Mathematik, Ingenieur- und Naturwissenschaften
der
Ruprecht–Karls–Universität
Heidelberg

Vorgelegt von

Johannes Gerold Hoffmann

aus: Heidelberg, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2024

Der Einfluss einer pathologisch veränderten
vaskulärer Nische auf die Lebermetastasierung
des malignen Melanoms

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Wieland

Prof. Dr. Philipp-Sebastian Reiners-Koch

Für meine Großeltern

*“If we knew what it was we were doing,
it would not be called research, would it?”*

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	IV
Zusammenfassung.....	V
Publikationen.....	VI
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Lage und Gefäßstruktur der Leber	- 1 -
1.1.1 Leberanatomie	- 1 -
1.1.2 Histologischer Aufbau der Leber.....	- 2 -
1.2 Die hepatische vaskuläre Nische	- 8 -
1.3 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung	- 9 -
1.3.1 Epidemiologie.....	- 9 -
1.3.2 Pathogenese	- 11 -
1.3.3 Lebersinusendothelzellen in NASH	- 12 -
1.3.4 Fibrosemodelle.....	- 13 -
1.4 Veränderungen der hepatischen vaskulären Nische im metastatischen Kontext....	- 17 -
1.5 Das maligne Melanom	- 18 -
2. Zielsetzung der Arbeit.....	- 21 -
2.1 Spezifische Ziele.....	- 21 -
3. Materialien und Methoden	- 23 -
3.1 Materialien	- 23 -
3.1.1 Primer und Plasmide	- 23 -
3.1.2 Antikörper, Sonden, Kits und Medikamente	- 24 -
3.1.3 Zelllinien	- 26 -
3.1.4 Chemikalien, Lösungsmittel und Reagenzien	- 27 -
3.1.5 Puffer und Medien	- 30 -
3.1.6 Diäten.....	- 31 -
3.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	- 31 -

Inhaltsverzeichnis

3.1.8 Geräte	- 34 -
3.1.9 Software	- 37 -
3.1.10 Mauslinien	- 38 -
3.2 Methoden.....	- 39 -
3.2.1 Tierexperimente	- 39 -
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	- 43 -
3.2.3 Histologische Methoden	- 46 -
3.2.4 Zellkultur.....	- 50 -
3.2.5 Statistische Auswertung	- 54 -
4. Ergebnisse	- 55 -
4.1 Metastasierung des Melanoms in der NASH-assoziierten Leberfibrose	- 55 -
Metastasierung von B16F10 <i>Luc2</i> in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	- 55 -
Metastasierung von Wt31 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	- 59 -
Metastasierung von Mc38 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen.....	- 62 -
4.2 Charakterisierung der steatotischen Leber nach kurzer CDAA-Fütterung	- 64 -
4.3 Metastasierung des Melanoms in die steatotische vaskuläre Nische nach kurzer CDAA-Fütterung	- 68 -
Metastasierung von B16F10 <i>Luc2</i> in die Leber nach kurzer CDAA-Fütterung	- 68 -
Metastasierung von Wt31 in die Leber nach kurzer CDAA-Fütterung	- 71 -
Metastasierung von Mc38 in die Leber nach kurzer CDAA-Fütterung.....	- 74 -
4.4 Einfluss einer fettreichen Diät auf die Leber und Metastasierung des Melanoms ...	- 75 -
Metastasierung von B16F10 <i>Luc2</i> in der Leber nach kurzer fettreicher Diät.....	- 75 -
Charakterisierung der Leber nach kurzer fettreicher Diät.....	- 77 -
4.5 Melanommetastasierung in der genetisch veränderten hepatischen vaskulären Nische	- 81 -
4.6 Identifizierung endothelialer Genveränderungen in der steatotischen Leber nach kurzer CDAA-Fütterung	- 83 -

Inhaltsverzeichnis

4.7 CDAA-induzierte Steatose fördert die hepatische Retention von Melanom- und Kolonkarzinomzellen.....	- 95 -
Erhöhte B16F10 <i>Luc2</i> -Retention in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	- 95 -
Erhöhte Mc38 <i>Luc</i> -Retention in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	- 97 -
5. Diskussion.....	- 99 -
5.1 Der Einfluss einer fibrotisch veränderten hepatischen vaskulären Nische auf die Metastasierung des malignen Melanoms	- 99 -
5.2 Charakterisierung der pathologischen Leberveränderungen in den Anfangsstadien der Lebersteatose	- 102 -
5.3 Frühe Lebersteatose unter CDAA-Diät fördert die Metastasierung von B16F10 <i>Luc2</i> -Melanomzellen.....	- 103 -
5.4 Endotheliale Genveränderungen bei früher Lebersteatose unter CDAA-Diät	- 105 -
5.5 Identifizierung hochregulierter endothelialer Adhäsionsmoleküle bei früher Lebersteatose unter CDAA-Diät.....	- 106 -
5.6 Verstärktes Auftreten von Makrophagen bei früher Lebersteatose unter CDAA-Diät.....	- 109 -
6. Zusammenfassung und Ausblick	- 111 -
7. Quellenverzeichnis	- 113 -
8. Anhang.....	- 127 -
8.1 Abbildungsverzeichnis	- 127 -
8.2 Tabellenverzeichnis	- 137 -
8.3 Abkürzungsverzeichnis	- 139 -
Danksagung	- 145 -

Abstract

Patients with liver metastases from malignant melanoma (MM) have a significantly lower overall survival despite recent therapeutic advances. This research project investigates the role of hepatic metabolic diseases such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-associated liver fibrosis in malignant melanoma metastasis.

To induce NASH-associated liver fibrosis, C57BL/6NRj mice were fed a choline-deficient L-amino acid diet (CDAA) for ten weeks. Injection of B16F10*Luc2* and Wt31 melanoma cells resulted in a significant increase in liver metastasis. It was shown that even one week of CDAA feeding, i. e. before the onset of liver fibrosis, leads to increased metastasis of B16F10*Luc2* cells, whereas it has no effect on metastasis of the Mc38 colon carcinoma cell line. In contrast, liver steatosis induced by a short-term high-fat diet did not lead to increased metastasis of the B16F10*Luc2* melanoma cell line. Furthermore, increased hepatic melanoma metastasis was also observed in a genetic mouse model using *Gata4*^{LSEC-KO/BL} mice with dedifferentiation of liver sinusoidal endothelial cells (LSECs), resulting in NASH-like perisinusoidal liver fibrosis without steatosis.

After one week of CDAA feeding, LSECs showed continuous endothelial dedifferentiation. These early profibrotic and steatotic changes in the hepatic vascular niche were analysed in detail and several relevant factors were identified such as an upregulation of the adhesion molecules VCAM1, ICAM1 and E-selectin, as detected by RNA-Seq, FISH and immunofluorescence. Macrophages, which are inflammation-induced and important for tumour cell adhesion and formation of metastasis, were also strongly increased in the CDAA-altered vascular niche. Functionally, a significantly increased retention of B16F10*Luc2* cells in the hepatic vascular niche was observed after all periods of CDAA feeding.

In conclusion, the hepatic vascular niche rapidly transitions to a pro-melanoma state in response to metabolic changes. These results suggest possible avenues for targeted therapies to prevent hepatic melanoma metastasis.

Zusammenfassung

Patienten mit Lebermetastasen eines malignen Melanoms (MM) haben trotz jüngster therapeutischer Fortschritte eine signifikant schlechtere Gesamtüberlebensrate. Dieses Forschungsprojekt untersucht die Rolle hepatischer Stoffwechselerkrankungen, wie die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) und die NASH-assoziierte Leberfibrose bei der Metastasierung des malignen Melanoms.

Um eine NASH-assoziierte Leberfibrose zu induzieren, wurden C57BL/6NRj-Mäuse zehn Wochen lang mit einer Cholin-defizienten L-Aminosäure-definierten (CDAA) Diät gefüttert. Die Injektion von B16F10*Luc2*- und Wt31-Melanomzellen führte zu einer signifikanten Zunahme von Lebermetastasen. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Woche CDAA-Fütterung, d. h. vor dem Einsetzen der Leberfibrose, zu einer erhöhten Metastasierung der B16F10*Luc2*-Zellen führte, während dies keinen Einfluss auf die Metastasierung der Mc38-Kolonkarzinom-Zelllinie hatte. Im Gegensatz dazu führte eine durch eine kurzzeitige fettreiche Diät induzierte Fettleber nicht zu einer erhöhten Metastasierung der B16F10*Luc2*-Melanomzelllinie. Darüber hinaus wurde eine erhöhte hepatische Melanom-Metastasierung auch in einem genetischen Mausmodell unter Verwendung von *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Mäusen mit Dedifferenzierung der hepatischen sinusoidalen Endothelzellen (LSECs) beobachtet, was zu einer NASH-ähnlichen perisinusoidalen Leberfibrose ohne Steatose führt.

Nach einwöchiger Fütterung mit CDAA zeigten die LSECs eine kontinuierliche endotheliale Dedifferenzierung. Diese frühen präfibrotischen und steatotischen Veränderungen in der hepatischen Gefäßnische wurden detailliert analysiert und mehrere relevante Faktoren identifiziert wie beispielsweise die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle VCAM1, ICAM1 und E-Selektin, die durch RNA-Seq, FISH- und Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen wurden. Entzündungsinduzierte Makrophagen, die ebenfalls für die Tumorzelladhäsion und Bildung von Metastasen wichtig sind, waren in der CDAA-veränderten Gefäßnische ebenfalls stark erhöht. Funktionell wurde eine signifikant erhöhte Retention von B16F10*Luc2*-Zellen in der hepatischen Gefäßnische nach allen CDAA-Fütterungsperioden beobachtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hepatische Gefäßnische als Reaktion auf metabolische Veränderungen schnell in einen Zustand übergeht, der die Metastasierung des Melanoms begünstigt. Diese Ergebnisse weisen auf mögliche Wege für gezielte Therapien zur Verhinderung von Lebermetastasen hin.

Publikationen

Schmid CD, Olsavszky V, Reinhart M, Weyer V, Trogisch FA, Sticht C, Winkler M, Kürschner SW, **Hoffmann J**, Ola R, Staniczek T, Heineke J, Straub BK, Mittler J, Schledzewski K, Ten Dijke P, Richter K, Dooley S, Géraud C, Goerdts S, Koch PS. ALK1 controls hepatic vessel formation, angiogenesis, and angiocrine functions in hereditary hemorrhagic telangiectasia of the liver. *Hepatology*. 2023 Apr 1;77(4):1211-1227.

Heil J, Olsavszky V, Busch K, Klapproth K, de la Torre C, Sticht C, Sandorski K, **Hoffmann J**, Schönhaber H, Zierow J, Winkler M, Schmid CD, Staniczek T, Daniels DE, Frayne J, Metzgeroth G, Nowak D, Schneider S, Neumaier M, Weyer V, Groden C, Gröne HJ, Richter K, Mogler C, Taketo MM, Schledzewski K, Géraud C, Goerdts S, Koch PS. Bone marrow sinusoidal endothelium controls terminal erythroid differentiation and reticulocyte maturation. *Nat Commun*. 2021 Nov 29;12(1):6963.

Koch PS, Sandorski K, Heil J, Schmid CD, Kürschner SW, **Hoffmann J**, Winkler M, Staniczek T, de la Torre C, Sticht C, Schledzewski K, Taketo MM, Trogisch FA, Heineke J, Géraud C, Goerdts S, Olsavszky V. Imbalanced Activation of Wnt- β -Catenin-Signaling in Liver Endothelium Alters Normal Sinusoidal Differentiation. *Front Physiol*. 2021 Sep 29;12:722394.

1. Einleitung

1.1 Lage und Gefäßstruktur der Leber

Die Leber ist ein lebenswichtiges Stoffwechselorgan mit einer Vielzahl an Funktionen und stellt die größte Drüse im menschlichen Körper dar. Sie wiegt ca. 1,5 bis 1,8 kg beim erwachsenen Menschen und liegt im rechten Oberbauch direkt am Zwerchfell [1, 2]. Sie ist ein Schlüsselorgan für wichtige Stoffwechselfvorgänge und besitzt ein einzigartiges Gefäßsystem. Die Leber wird über zwei große Gefäße mit Blut und Nährstoffen versorgt. Von der Hauptschlagader (*Aorta*) zweigt die Leberarterie (*Arteria hepatica propria*) ab, die die Leber mit sauerstoffreichem, aber nährstoffarmem Blut versorgt. Über die Pfortader (*Vena portae*), gelangt sauerstoffarmes, aber nährstoffreiches Blut aus den Mesenterialgefäßen der Bauchorgane direkt aus dem Verdauungstrakt in die Leber [3, 4]. In die Pfortader mündet auch das ableitende Gefäß der Milz, die Milzvene (*Vena splenica*). In der Leber wird das Blut dann gemischt und in die zentralen Venen geleitet. Über die Zentralvenen sammelt sich das Blut in der Lebervene (*Vena hepatica*), die das Blut in die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*), und damit zurück in den Blutkreislauf leitet. Da das Blut aus dem Verdauungstrakt direkt in die Leber geleitet wird, kann sie Giftstoffe oder Krankheitserreger direkt eliminieren und Stoffwechselfvorgänge wie die Bereitstellung von Glykogen [5], die Oxidation, Speicherung und Sekretion von Lipiden zur Energiegewinnung [6] und die Koordination des Protein- und Aminosäurestoffwechsels [7] steuern. Darüber hinaus hat es überlebenswichtige Aufgaben wie den Abbau von Stoffwechselfprodukten wie Bilirubin [8], Ammoniak [9] und Laktat [10] sowie von toxischen Substanzen wie Alkohol [11] und Xenobiotika [12].

1.1.1 Leberanatomie

Anatomisch wird die humane Leber in vier miteinander verwachsene Lappen unterteilt: Dem *Lobus dexter* und *sinister*, welche durch das *Ligamentum falciforme* vertikal getrennt werden [13], sowie die beiden kleinen Lappen *Lobus caudatus* und *quadratus*. Man spricht hierbei von einer nicht-gelappten Leber, da alle Lappen miteinander verwachsen sind. Von vorne zeigt sie ein sehr glattes Erscheinungsbild, während man von hinten die beiden kleinen Lappen, die Gallenblase und Eindellungen von anderen Organen erkennen kann [14]. Bei der Maus besteht die Leber aus fünf Lappen, welche nur an einem zentralen Punkt miteinander verwachsen sind [2], also eine gelappte Leber. Beide Arten, also die gelappte und nicht-gelappte Leber, besitzen dabei dieselbe innere Architektur. Über verschiedene Verzweigungen gelangt das Blut über die *Vena portae* und *Arteria hepatica propria* zu den kleinen funktionellen Einheiten der Leber, den so genannten Leberläppchen. Diese können als Sechsecke wahrgenommen

1. Einleitung

werden, bei welchen an jeder Ecke ein Portalfeld liegt, das aus einer *Arteria hepatica*, einer *Vena portae* und einem Gallengang (*Ductus biliferus*) besteht (Abbildung 1). Vom Portalfeld zweigen die Sinusoide ab, die zur Zentralvene (*Vena centralis hepatis*) in der Mitte des Sechsecks führen [15]. In diesen Sinusoiden vermischen sich arterielles und venöses Blut, das an verschiedenen hochspezialisierten Zelltypen vorbeigeleitet wird, bevor es in den Zentralvenen gesammelt und in die untere Hohlvene abgeleitet wird (Abbildung 1) [16]. Die periportalen Gallengänge verlaufen in entgegengesetzter Richtung zum Blutstrom, d. h. von der Zentralvene in Richtung des Portalfeldes, und leiten die in den Hepatozyten gebildete Galle in die größeren Gallengänge ab, die dann in die Gallenblase münden [17].

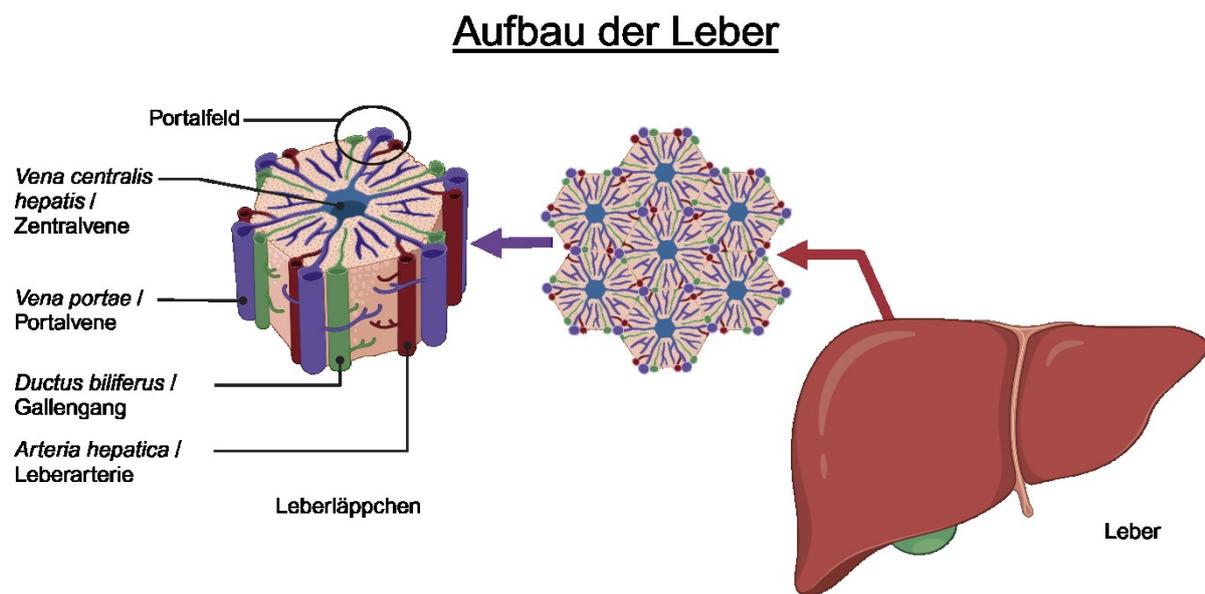


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der menschlichen Leber. Die Leber ist in kleine Leberläppchen unterteilt, welche als sechseckige Struktur interpretiert werden können. Das Blut stammt aus den im Portalfeld gelegenen Leberarterien und Portalvenen, welches sich im Lebersinus mischt und in der Zentralvene abfließt. Angepasst von „Structure of Liver Lobule“ von BioRender.com (2024). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.1.2 Histologischer Aufbau der Leber

Histologisch gibt es in der Leber fünf Zellpopulationen, die hauptsächlich im Lebergewebe vorkommen und in parenchymale und nicht-parenchymale Zellen unterschieden werden. Zu den Parenchymzellen gehören die Hepatozyten, die ca. 70 % der Leberzellen ausmachen sowie die Zellen der Gallengänge, auch Cholangiozyten genannt [18]. Die Nicht-Parenchymzellen unterteilen sich in Endothelzellen, welche ca. 50 % ausmachen, Kupfferzellen (ca. 20 %) und Sternzellen (< 1 %) (Abbildung 2). Weitere vorkommende, aber nicht organspezifische Zellen sind die Lymphozyten, die in T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen unterteilt werden [19]. Die Lage und Aufgaben dieser einzelnen Zellpopulationen werden im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

1. Einleitung

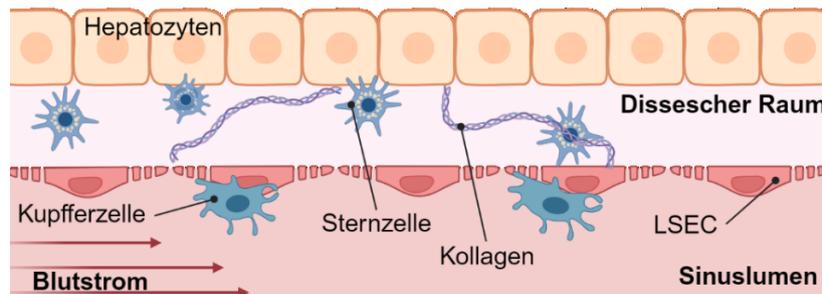


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Lebersinus mit Darstellung der verschiedenen Zellpopulationen. Im Sinuslumen sitzen die Kupferzellen direkt auf den Lebersinusendothelzellen (LSEC). Die LSEC bilden eine fenestrierte Barriere, hinter der der Dissesche Raum beginnt. In diesem befinden sich die Sternzellen und die Hepatozyten. Erstellt mit BioRender.com.

1.1.2.1 Hepatozyten

Histologisch liegen die Hepatozyten hinter den LSEC und bilden die Gegenseite im sog. Disseschen Raum. Zu ihnen gelangen Stoffe, die aktiv oder passiv die LSEC-Barriere durchqueren, wo sie dann metabolisiert werden. Durch ihre hohe Stoffwechselaktivität besitzen sie eine hohe Anzahl an Mitochondrien [20], Golgi-Apparaten und Peroxisomen [21]. Um ihre Stoffwechselfunktion effektiv ausüben zu können, besitzen Hepatozyten zum Teil zwei oder mehr Zellkerne [22]. Des Weiteren speichern sie Glukose in Form von Glykogen oder Fette in Form von Triglyzeriden. Dafür nehmen sie Insulin-vermittelt überschüssige Glukose über den *integrated membran glucose transporter* (GLUT) aus dem Pfortaderkreislauf auf und speichern es als Glykogen [23]. Bei sinkendem Blutzuckerspiegel und fehlender Nahrungsaufnahme wird aus den α -Zellen des Pankreas das Peptidhormon Glucagon ausgeschüttet, welches den Abbau von Glykogen zu Glucose in den Hepatozyten stimuliert, die dann ins Blut abgegeben wird [23]. Bei hohen Blutzuckerspiegeln wandelt die Leber überschüssige Glukose in Fettsäuren um, die anschließend in Triglyceride umgesetzt und sowohl in der Leber als auch im Fettgewebe in Lipidtröpfchen gespeichert werden. Die dafür verwendeten Fettsäuren stammen aus dem Blut, dem Verdauungstrakt, der *de novo* Lipogenese in den Hepatozyten sowie aus der Aufnahme unveresterter Fettsäuren aus der Blutbahn [24]. Generell sezerniert die Leber Lipide, die von entfernten Organen aufgenommen und als Energiequelle genutzt werden. Zu diesem Zweck werden die in den Lipidtröpfchen gespeicherten Triglyceride und Cholesterinester in Lipoproteinpartikel mit sehr geringer Dichte (VLDL, engl. *very low density lipoprotein*) verpackt und in das Blut abgegeben [25].

1.1.2.2 Dissescher Raum und Sternzellen

Im perisinusoidalen Raum zwischen den LSEC und den Hepatozyten liegt der Dissesche Raum, in welchem die hepatischen Sternzellen (HSC, engl. *hepatic stellate cells*) angesiedelt sind. Diese sind die wichtigsten fibrinogenen Akteure in der Leber und speichern im ruhenden

1. Einleitung

Zustand Retinol [26]. Kommt es zu einer Leberschädigung, so induzieren verschiedene Entzündungsmediatoren wie PDGF [27], EGF [28] oder TGF β [28] die Aktivierung der Sternzellen. Die nun aktivierten HSCs (aHSCs) verlieren ihren Retinolspeicher, differenzieren teilweise zu Myofibroblasten aus [29] und exprimieren verstärkt α SMA [30], Desmin und Kollagen I [31, 32] und sind somit für die Sekretion der extrazellulären Matrix (ECM) im Disseche Raum verantwortlich [33]. Aktivierte HSC und Myofibroblasten sezernieren große Mengen verschiedener extrazellulärer Matrixproteine, Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sowie Inhibitoren von Metalloproteinasen, die einen progressiven Effekt auf den Umbau der Leberarchitektur haben [31, 32]. Physiologisch gesehen ist eine HSC-Aktivierung wichtig, da es nach einer Verletzung die Proliferation der Hepatozyten stimuliert. So führt eine Depletion der HSC nach einer durch Paracetamol induzierten Leberschädigung zu einer reduzierten Proliferation von Hepatozyten, zu einer reduzierten Genexpression von Wachstumsfaktoren und zu einer verstärkten Nekrose der Leber [34].

1.1.2.3 Kupfferzellen

Kupfferzellen sind residente Gewebemakrophagen in der Leber, die im Sinus auf den LSEC aufliegen. Aufgrund ihrer exponierten Lage im Sinuslumen sind sie die ersten Zellen der Leber, die mit den vom Darm kommenden Nährstoffen und Noxen in Kontakt kommen [35]. Sie fungieren als wichtige Regulatoren für Entzündungen und sind zusammen mit LSEC an der Steuerung des Portaldrucks über Prostaglandin F₂ und Thromboxan A beteiligt [36]. Ebenso haben sie eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Bakterien, Viren und anderen körperfremden Stoffen, indem sie diese phagozytieren. Daher enthalten sie eine große Anzahl an Lysosomen und Phagosomen [37]. Untersuchungen haben gezeigt, dass Kupfferzellen eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Lebererkrankungen spielen. Die fast vollständige Verhinderung alkoholbedingter Leberschäden durch Inaktivierung der Kupfferzellen mit Gadoliniumchlorid deutet darauf hin, dass diese Zellen an den initialen Prozessen beteiligt sind, die zu alkoholbedingten Lebererkrankungen führen [38]. In weiteren Studien wurden Kupfferzellen durch Clodronat-Liposomen stark reduziert, wodurch etwa 90 % der Zellen in der Leber eliminiert wurden. Eine anschließende nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD, engl. *nonalcoholic fatty liver disease*), die durch eine Methionin- und Cholinmangel-Diät induziert wurde, verlief nach Depletion der Kupfferzellen milder, was die relevante Rolle der Kupfferzell-Aktivierung in der Pathogenese der NAFLD bestätigt [39].

1.1.2.4 Lebersinusoidale Endothelzellen

Lebersinusoidale Endothelzellen (LSEC) sind hochspezialisierte Endothelzellen, die die Sinusoide der Leber auskleiden und eine einzigartige Morphologie aufweisen. LSEC machen

1. Einleitung

etwa 20 % der Leberzellen aus, obwohl ihr Anteil am gesamten Lebervolumen lediglich 3 % beträgt [40]. Sie fungieren als Trennschicht zwischen den Hepatozyten und hepatische Sternzellen auf der einen, und dem Blut und den Kupfferzellen auf der anderen Seite und sind in vielen wichtigen physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. Physiologische Aufgaben sind die passive Clearance durch ihre Fenestrations [41], der aktive Stofftransport durch die Expression zahlreicher Scavenger-Rezeptoren [42], die Steuerung der Immunregulation [43] und die Angiogenese. Sie reagieren auf Scherstress im Lumen und passen den Gefäßtonus im Sinus an. Diese hochspezialisierten Zellen besitzen keine Basalmembran, dafür aber Fenestrations, welche in Siebplatten angeordnet sind (Abbildung 3). Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Aufgaben der LSEC genauer erklärt.

Passive Clearance

Die Fenestrations der LSEC ermöglichen einen offenen Durchgang zum Disseschen Raum (Abbildung 3), wodurch ein passiver Stoffaustausch durch diese möglich ist (Abbildung 4A) [41]. Dieser umfasst Lipoproteine [44], Chylomikronreste [41, 45] und vielen anderen Makromoleküle und Nanopartikel, die sich zwischen dem Blut und dem Dissesche Raum, wo sie von Hepatozyten aufgenommen werden, frei bewegen können [41, 46]. Unter physiologischen Bedingungen haben sie einen Durchmesser von 100 – 200 nm und die Anzahl der Fenestrations steigt von periportal nach perizentral um bis zu 10 % [47]. Im Alter oder durch Erkrankungen kann es zu einer Verdickung des Endothels, der Ausbildung einer Basalmembran und zu einem Verlust der Fenestrations von bis zu 50 % kommen. Eine Störung des bidirektionalen Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten hat zum Beispiel eine Insulinresistenz im Alter [48] oder eine Dyslipidämie [49] zur Folge.

1. Einleitung

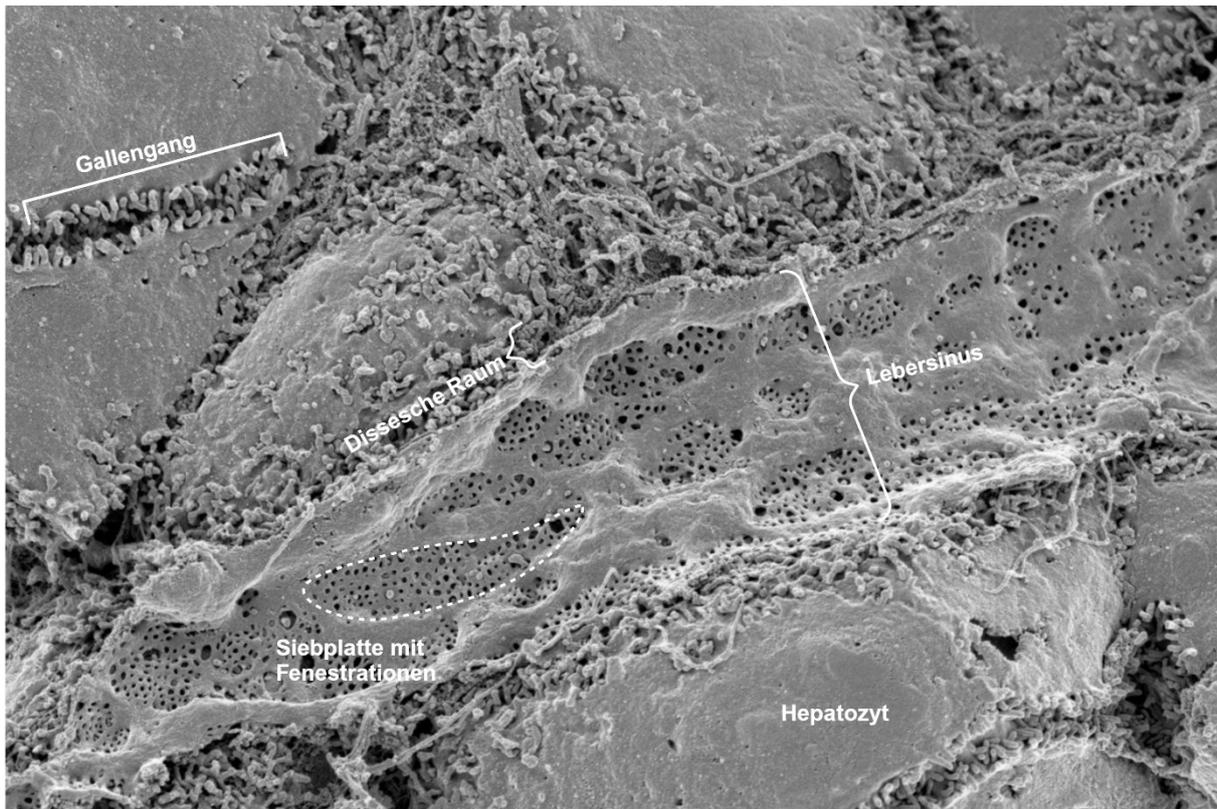


Abbildung 3: Rasterelektronenaufnahme des Lebersinus mit den angrenzenden Strukturen. Zu erkennen ist der Lebersinus mittig im Bild mit seinen charakteristischen Fenestrationsen, welche in Siebplatten angeordnet sind. An den Lebersinus grenzt der Dissesche Raum an, hinter dem die Hepatozyten mit den Gallengängen liegen. [Das Bild wurde freundlicherweise von Frau Julia Schöler, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt].

Aktive Clearance

LSEC besitzen eine hocheffektive endozytische Kapazität, die sie mit einem breiten Repertoire an Rezeptoren erfüllen und dadurch Stoffwechselendprodukte wie lösliche Makromoleküle und Kolloide aus dem Blut entfernen (Abbildung 4B) [50]. Zur Endozytose nutzen LSEC einen Clathrin-abhängigen Prozess [51], wobei Clathrin-beschichtete Einbuchtungen auf der Oberfläche der LSEC entstehen, die eine Abknospung der Vesikel nach innen begünstigen [52]. Darüber hinaus besitzen LSEC auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren, die die aktive Clearance zusätzlich unterstützen. Funktionell lassen sich die Rezeptoren auf LSEC in verschiedene Rezeptorklassen unterscheiden: Der Mannose-Rezeptor, der Fc γ Rezeptor und die Scavenger Rezeptoren wie Stabilin-1 und -2 [42, 53, 54]. Der Mannose-Rezeptor besitzt verschiedene Untereinheiten und bindet neben Zuckern wie Fruktose und Acetylglucosamin [55], Kollagene I bis IV [56] auch Chondroitinsulfat mit den Unterklassen Chondroitinsulfat-A und -B [57]. Fc-Rezeptoren werden von vielen Zellen im Körper exprimiert. LSEC exprimieren den Subtyp Fc γ -Rezeptor IIb (CD32B), welcher für die Beseitigung von kleinen Immunkomplexen verantwortlich ist [58, 59]. Die Stabiline zählen zu den Klasse-H

1. Einleitung

Scavenger-Rezeptoren und lassen sich in Stabilin-1 und -2 einteilen. Sinusoidale Endothelzellen der Milz, Leber, Gewebemakrophagen und die Rinde der Nebennieren exprimieren Stabilin-1 [60, 61], während die sinusoidalen Endothelzellen von Milz, Leber, Knochenmark [62] und Lymphknoten Stabilin-2 exprimieren [63, 64]. Stabilin-1 und -2 zählen zu den am stärksten exprimierten Genen in LSEC [65] und sind damit für die Aufnahme und Beseitigung vieler Liganden verantwortlich. Sie binden Hyaluronan [63, 66], Chondroitinsulfate [67], AEG-modifiziertes Albumin [68] und Heparin [69]. Zusätzlich ist Stabilin-2 bei der Beseitigung des von Willebrand-Faktor-Faktor-VIII-Komplexes beteiligt, was einen immunregulatorischen Effekt bewirkt [70]. Auch nehmen Stabilin-1 und -2 oxidiertes LDL [71] und extrazelluläres Matrixmaterial auf [72]. Neben diesen Hauptklassen, besitzen LSEC noch weitere Rezeptor-Arten wie Toll-like-Rezeptoren [73], L-SIGN/CLEC4M oder LSECtin/CLEC4G [74, 75], den endothelialen Lymphgefäß-Hyaluronrezeptor 1 (engl. *LYVE1*) [76] sowie Adhäsionsmoleküle wie VCAM1 und ICAM1 [77-80].

Steuerung der Immunregulation

Über den Blutstrom erreichen viele Pathogene aus dem Verdauungstrakt die Leber. Als primäre Bestandteile der angeborenen Immunabwehr verfügen LSEC über Toll-like Rezeptoren (TLRs, engl. *toll like receptors*), die zur Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, engl. *pattern-recognition receptors*) gehören und pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, engl. *pathogen-associated molecular patterns*) identifizieren (Abbildung 4C) [81]. TLR4 reagiert auf Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien und aktiviert Immunzellen wie Makrophagen während Monozyten und Neutrophile entsprechende Zytokine sezernieren, um eine Immunantwort zu starten [82, 83]. Als Trennschicht zwischen Blut und Dissektionsraum steuern sie den Eintritt von Leukozyten und Immunkomplexen in die Leber. Dies ist bei entzündlichen Erkrankungen der Leber relevant, da LSEC über Adhäsionsmoleküle wie Stabilin-1, ICAM1 [78] oder VCAM1 [78] Leukozyten binden und deren Einwanderung unterstützen. Zur Immunregulierung sind in der Lage, das Blut von Signalmolekülen des Immunsystems und von Antigenen zu reinigen [58]. LSEC können aber auch selbst die Aktivität der Lymphozyten beeinflussen und als antigenpräsentierende Zellen agieren [84]. Für diesen Zweck nutzen die LSEC ihre ausgeprägte Scavenger-Funktion [50] und präsentieren das exogene Antigen auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex I (engl. *MHC I*) für CD8⁺ T-Zellen [43] oder auf dem MHC II für CD4⁺ T-Zellen [85].

1. Einleitung

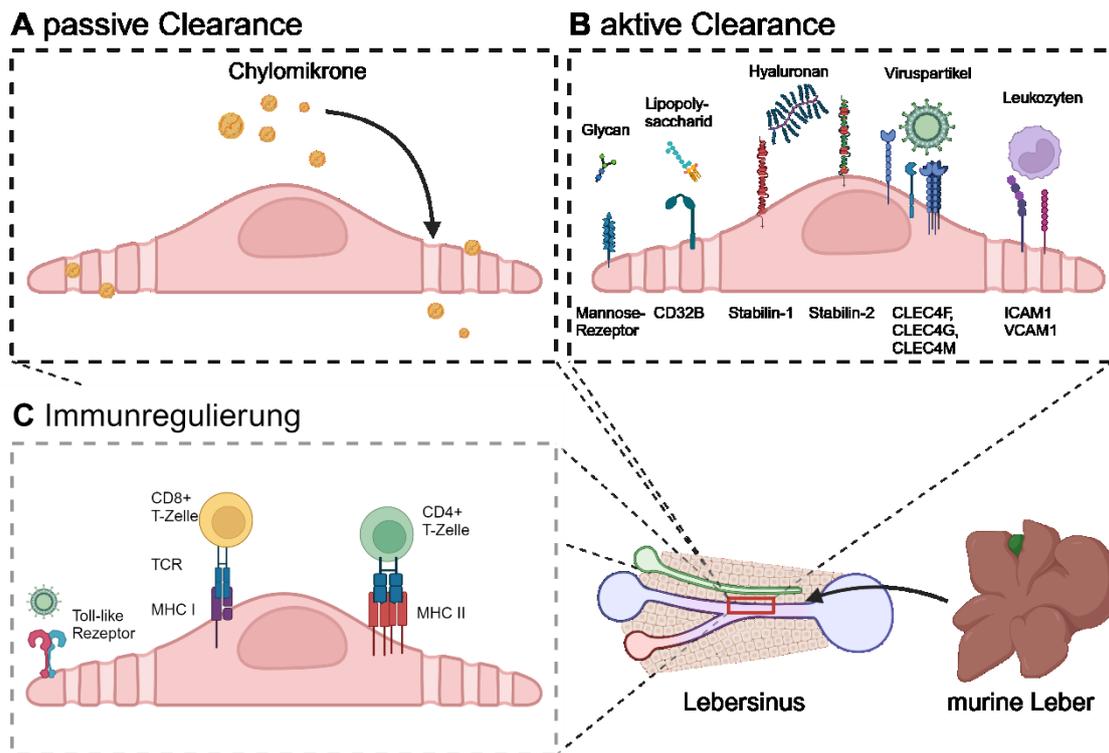


Abbildung 4: Clearance-Funktionen und Immunregulation der LSEC (A) Chylomikrone können über die Fenestrationsöffnungen die LSEC passiv passieren. (B) Über Oberflächenrezeptoren wie Mannose-Rezeptoren, den Fc-Rezeptor CD32B, die Scavenger-Rezeptoren Stabilin-1 und -2, C-Typ-Lectin-Rezeptoren wie CLEC4F, CLEC4G und CLEC4M sowie Adhäsionsmoleküle wie ICAM1 und VCAM1 können LSEC verschiedene Substanzen aktiv aus dem Blutstrom entfernen. (C) LSEC exprimieren Toll-like Rezeptoren, welche an der angeborenen Immunität beteiligt sind, sowie MHC I und II Rezeptoren, die ebenfalls an der angeborenen Immunität beteiligt sind. Die Grafik wurde adaptiert und lizenziert unter CC BY 4.0 aus Koch, Philipp-Sebastian et al. "Angiodiversity and organotypic functions of sinusoidal endothelial cells." *Angiogenesis* vol. 24,2 (2021): 289-310. doi:10.1007/s10456-021-09780-y [86].

1.2 Die hepatische vaskuläre Nische

Allein die Tatsache, dass LSEC die Immunregulation direkt steuern können, beweist, dass sie auch benachbarte Zellen und deren Funktionen beeinflussen können. Diese Interaktion mit anderen Zellen ihrer Mikroumgebung, d. h. ihrer vaskulären Nische, ist jedoch nicht auf Immunzellen beschränkt, sondern betrifft auch alle anderen residenten Zellen der Leber. Durch die LSEC-spezifische Sekretion von parakrinen und autokrinen Faktoren, auch Angiokrine genannt, können LSEC die Leberhomöostase aufrechterhalten und direkt auf Verletzungen und Störungen reagieren. Zum Beispiel können LSEC *Wingless (Wnt)* Liganden sezernieren, die die kontinuierliche Erneuerung und funktionelle Zonierung von Hepatozyten und damit die Aufrechterhaltung der Hepatozyten-Homöostase fördern [87]. Auch die Endothelzellen der Zentralvene exprimieren die Liganden WNT2, WNT9b und RSPO3, die über die Induktion des Wnt/ β -Catenin-Signalweges die metabolische Zonierung der Hepatozyten während der Leberentwicklung beeinflussen [88]. In diesem Sinne führt ein pränataler *Rspo3*-Knockout zum Verlust des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und der metabolischen Zonierung [89]. Umgekehrt

1. Einleitung

zeigte eine LSEC-spezifische Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs eine sinusoidalen Transdifferenzierung mit gestörter endothelialer Zonierung. Dies führte zu einem Verlust des midzonalen LSEC-Markers LYVE1 und zu einer Anreicherung von kontinuierlichen EC-Genen wie *CD34* und *ApIn* [90]. Durch partielle Hepatektomie konnte gezeigt werden, dass LSEC das Wachstum und die Regeneration von Hepatozyten nach einer Verletzung stimulieren [91]. Dazu setzen sie vermehrt die HGF (engl. *hepatocyte growth factor*) frei, was zu einer verstärkten Proliferation der Hepatozyten führen [92].

Ein Verlust dieser angiokrinen Faktoren kann zu schweren Entwicklungs- und Funktionsstörungen sowie zu Lebererkrankungen führen. Das von den LSEC sezernierte BMP2 wirkt auf die Hepatozyten und reguliert dort den lokalen und systemischen Eisenstoffwechsel, da das von den Hepatozyten produzierte Hormon Hcpidin auf die Stimulation der BMP2 sezernierenden LSEC angewiesen ist. Daher führt der Ausfall von LSEC-spezifischem BMP2 zu einer Eisenüberladung in der Leber und im gesamten Körper, dem Krankheitsbild der sogenannten Hämochromatose [65]. LSEC können aber auch von anderen in der Leber ansässigen Zellen beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass der Knockout von BMP9, das hauptsächlich von den Sternzellen produziert wird, zum Verlust des Transkriptionsfaktors GATA4 und damit zum Verlust differenzierter Marker in den LSEC und zur Pseudokapillarisation dieser Zellen führt [93]. Der von LSEC exprimierte Transkriptionsfaktor GATA4 wirkt als Schutzfaktor gegen die perisinusoidale Leberfibrose. Er unterdrückt die Aktivierung von MYC und das profibrotische angiokrine Signal auf Chromatinebene [94]. Beispielsweise führt eine frühe LSEC-spezifische Deletion von *Gata4* zu einer vollständigen Kapillarisation, Leberfibrose und -hypoplasie und damit zu einer gestörten embryonalen hepatischen Hämatopoese [95].

Zusammenfassend können Dysregulationen der hepatischen Gefäßnische, seien es einzelne Leberzelltypen oder gestörte Interaktionsmechanismen dieser Zelltypen untereinander, zu erheblichen Lebererkrankungen führen.

1.3 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung

1.3.1 Epidemiologie

Die „nichtalkoholische Fettlebererkrankung“ ist der Überbegriff für eine Reihe von Erkrankungen, die von der Steatose über die „nichtalkoholische Steatohepatitis“ (NASH) und die NASH-assoziierte Fibrose bis hin zur Leberzirrhose und zum Leberzellkarzinom reichen [96]. Sie ist die häufigste chronische Lebererkrankung hat weltweit eine Prävalenz von 75 % aller chronischen Lebererkrankungen [97], während die Prävalenz in Europa im Mittel bei 25 – 26 % liegt. Die Prävalenz variiert jedoch stark zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen. In Europa

1. Einleitung

reichen sie von 20 % in Rumänien bis 31 % in Griechenland, während sie in Deutschland bei 30 % liegt [98]. Durch die Zirrhose, als Spätfolge der NASH, starben an ihrer Folgen im Jahr 2017 mehr als 1,32 Millionen Menschen, was ca. 2,4 % der weltweiten Todesfälle ausmacht. Männer sind mit 67 % häufiger betroffen als Frauen mit 33 %. Entscheidend ist bei alledem, dass die NASH-assoziierte Leberfibrose eine reversible Erkrankung ist. Wird die Erkrankung früh genug erkannt und die Noxe eliminiert, so kann das Fortschreiten der Fibrose verhindert werden. Ist die Leber so stark geschädigt, dass sie sich irreversibel zu einer Leberzirrhose entwickelt, wird zwischen einer kompensierten (= vernarbte Leber mit ausreichend Leberfunktion) und einer dekompenzierten (= vernarbte Leber und keine ausreichende Funktion mehr) Leberzirrhose unterschieden [99]. Erstere ist beschwerdefrei, letztere sorgt für eine komplikationsreiche portalen Hypertension mit Aszites [100], viszerale Blutungen [101], Splenomegalie [102] bis hin zum kompletten Leberversagen, was in der Notwendigkeit einer Lebertransplantation endet (Abbildung 5) [103]. 2017 gab es weltweit 10,6 Millionen Fälle einer dekompenzierten Zirrhose und 112 Millionen Fälle einer kompensierten Zirrhose [104].

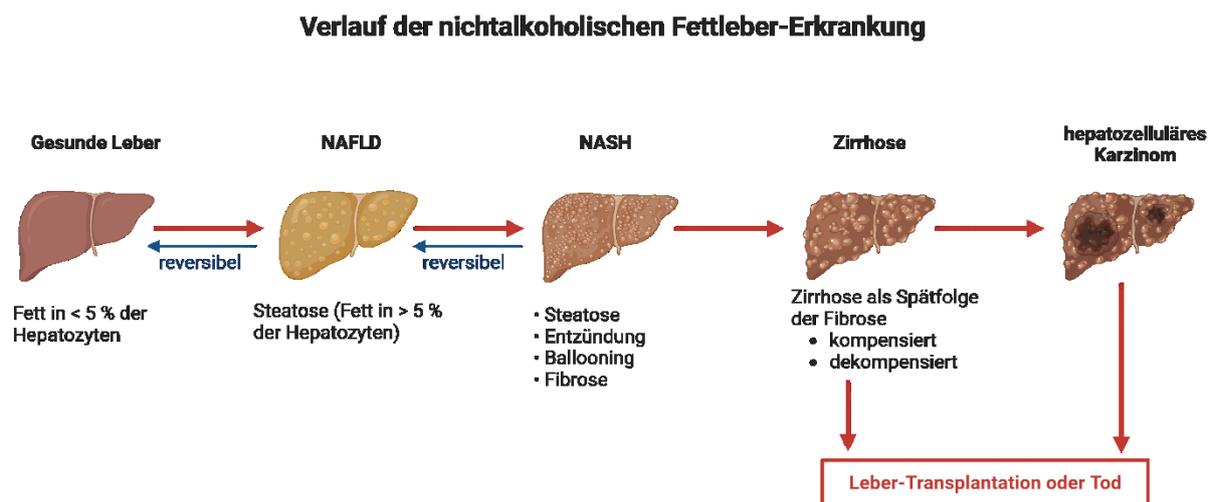


Abbildung 5: Schematischer Krankheitsverlauf der nichtalkoholischen Fettleber-Erkrankung. Zu Beginn kommt es zu einer „nichtalkoholischen Fettleber“ (NAFLD), welche sich durch Entzündungen zu einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) entwickeln kann. Bis zu diesem Stadium ist die Erkrankung reversibel. Wird die chronische Schädigung der Leber nicht unterbrochen, so kann es zu einer irreversiblen Zirrhose und/oder hepatozellulärem Karzinom kommen. Bei der Zirrhose ist die kompensierte Form komplikationslos. Eine dekompenzierte Zirrhose bringt gravierende Folgeerkrankungen mit sich und bedarf einer Lebertransplantation. Angepasst von „Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Spectrum“ von BioRender.com (2024). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

Die Risikofaktoren für eine NAFLD sind die gleichen wie für das metabolische Syndrom [105]. Dazu gehört ein höheres Lebensalter, was in einer Studie mit Probanden ≥ 65 Jahre gezeigt wurde [106]. Diese zeigten eine höhere Prävalenz für NASH gegenüber 18 – 64 Jahre alten Probanden (56 % gegen 72 %, $p = 0,02$) und eine fortgeschrittenere Fibrose (25 % gegen

1. Einleitung

44 %, $p = 0,002$). Auch Diabetes mellitus konnte als Faktor nachgewiesen werden [107]. Eine Senkung des HbA1C konnte langfristig den Verlauf einer Fibrose verbessern. Adipositas ist ebenfalls ein wichtiger Risikofaktor für NAFLD. Die Prävalenz der NAFLD nimmt mit steigendem Body-Mass-Index zu. Bei adipösen Patienten liegt die Prävalenz der NAFLD bei 50 – 90 % [108], umgekehrt liegt die Prävalenz der Adipositas bei der NAFLD bei ca. 51 % [109]. Da Adipositas häufig mit einem metabolischen Syndrom einhergeht, das sich wiederum auf die Leber auswirkt, ist diese Koinzidenz naheliegend. Patienten mit metabolischem Syndrom weisen häufig Fettstoffwechselstörungen auf, die mit erhöhten Werten von Triglyceriden, freien Fettsäuren, Gallensäuren und Cholesterin im Blut einhergehen [110]. Diese erhöhten Blutfette lagern sich schließlich in der Leber ab.

1.3.2 Pathogenese

Die Steatose (Fettleber) stellt das erste Stadium der NAFLD dar und zeichnet sich durch eine Fettansammlung in den Hepatozyten aufgrund einer ungesunden Lebensweise oder einer Stoffwechselerkrankung aus. Definitionsgemäß liegt eine Steatose vor, wenn mindestens 5 % des Lebergewichts oder 5 % der Hepatozyten intrahepatische Triglyceride aufweisen, ohne dass sekundäre Faktoren wie übermäßiger Alkoholkonsum, Virusinfektion oder medikamentöse Therapie vorliegen [111]. Bei einer solchen NAFLD kann es zu einer hepatozellulären Dysfunktion und lipidabhängigen Apoptose kommen [112], die durch eine Fettüberladung der Leber verstärkt wird. Diese Fettüberladung bewirkt einen Nährstoffmangel in den Hepatozyten, was zu deren Abbau führt und die Entzündung weiter stimuliert [113]. Wird die Steatose nicht adäquat behandelt, verstärkt sich die Entzündung der Leber und es kommt zum Aufblähen der Hepatozyten (engl. *ballooning*) [114], zur sog. Kapillarisation und Dedifferenzierung der LSEC [115] und zur Entwicklung einer NASH. Als Reaktion auf diese schädigenden Prozesse bilden aktivierte Sternzellen und proliferierende Myofibroblasten im Disseschen Raum ein Narbengewebe mit Neusynthese von extrazellulären Matrixbestandteilen wie Kollagenen, Elastin, Fibronectin und Glykoproteinen [116, 117]. Durch die starke Vernarbung der Leber und Kapillarisation der LSEC gelangen noch weniger Nährstoffe und Sauerstoff zu den Hepatozyten, was deren Apoptose verstärkt und langfristig zu Leberversagen oder hepatozellulärem Karzinom (HCC) führt.

Studien an Patienten und Forschungsarbeiten an Mäusen konnten bei der Lebersteatose und NASH-assoziiierter Fibrose gemeinsame molekulare Mechanismen identifizieren, die zur Pathogenese beitragen [118]. Die chronische Schädigung von Hepatozyten und der endothelialen Barriere resultiert in einer Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen und der Rekrutierung von Immunzellen aus dem Knochenmark [116], wobei aktivierte hepatische Stern-

1. Einleitung

zellen im Fokus stehen [32]. In einer Arbeit konnte nach einer CCl₄-Injektion, einem chemischen Fibrosemodell, gezeigt werden, dass der Ursprung der induzierten Fibrose über die Expression von α SMA auf die hepatischen Sternzellen zurückgeführt werden kann [119]. Zeitgleich beginnen HSC nach ihrer Aktivierung mit der verstärkten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie PDGF [120]. Hier liegt auch ein möglicher therapeutischer Ansatz. Eine *in vivo* Behandlung von Mäusen mit Sorafenib, einem Tyrosinkinaseinhibitor, der unter anderem auf PDGF-Rezeptoren abzielt, zeigte einen signifikanten Rückgang der intrahepatischen Fibrose [121]. Neben PDGF werden auch die Signalwege um TGF α und β [122], EGF [123] und VEGF [124] aktiviert, die das Fortschreiten der Fibrose begünstigen. Auch die Kollagenstruktur im Disseschen Raum ändert sich von Kollagen IV und VI in hin zu Kollagen I, II und Fibronectin [125].

1.3.3 Lebersinusendothelzellen in NASH

Chronische Leberschäden führen zu einer Funktionsstörung der LSEC, die ihre Fenestratio-
nen verlieren und eine Basalmembran ausbilden. Dieser Effekt wird als „Defenestration“ oder „Kapillarisation“ bezeichnet. Die Folge ist ein Verlust des bidirektionalen Stoffaustausches zwischen Blut und Hepatozyten, eine Versteifung der Endothelschicht und ein Verlust der Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) an den LSEC [126]. Unter physiologischen Bedingungen hemmt NO die *de novo* Lipogenese und fördert die β -Oxidation von Fettsäuren in den Hepatozyten. Beim metabolischen Syndrom kommt es ebenfalls zu einem NO-Mangel durch eine verminderte Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) [127]. Dieser NO-Mangel der Endothelzellen führt neben einer endothelialen Dysfunktion zu einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM1 [128-130] und VCAM1 [131]. Dadurch gehen die LSEC im Verlauf der NAFLD in einen aktivierten Zustand über und beginnen übermäßig weitere Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin und VAP-1 zu produzieren, die wiederum Immunzellen in die Leber rekrutieren [132]. Die genauen Auslöser der endothelialen Dysfunktion und der nachfolgenden Pseudokapillarisation sind jedoch noch nicht vollständig geklärt [115].

Miyao et al. konnten zeigen, dass LSEC sehr schnell auf pathologische Einflüsse reagieren können. Nach einer einwöchigen Cholin-defizienten L-Aminosäure-definierten (CDAA) Diät verlieren LSEC signifikant an Fenestratio-
nen und zeigen Anzeichen einer beginnenden Pseudokapillarisation [44]. Es folgt die Aktivierung von Kupferzellen [133], die Reduktion der NO-Konzentration und die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges mit Hochregulation der Entzündungsmediatoren TNF α , IL-6 und ICAM1 [79]. Das CDAA-Fütterungsmodell hat sich in diesem Zusammenhang als Fibrosemodell der Leber etabliert, um den pathophysiologischen Prozess der NASH genauer untersuchen zu können [134, 135].

1. Einleitung

1.3.4 Fibrosemodelle

Bei der Untersuchung biomedizinischer Hypothesen verwendet die Wissenschaft verschiedene Tiermodelle, um die Entwicklung vieler komplexer menschlicher Krankheiten erklären zu können. Der Grund dafür ist, dass viele Krankheiten so komplex sind, dass sie am besten an *in vivo* Modellen studiert werden können. Die Gewinnung menschlicher Zellen in kleinen Mengen und ihre Verwendung in Organoiden ist zwar möglich [136], kann aber sehr kostenintensiv sein, und es besteht immer die Gefahr, dass sich die Zellpopulationen differenzieren und nicht mehr den ursprünglichen Eigenschaften entsprechen. All dies sind nur einige Gründe, weshalb Tiermodelle zum jetzigen Zeitpunkt für die Wissenschaft unersetzlich sind. Zur Untersuchung von fibrotischen Veränderungen *in vivo* gibt es verschiedene Arten eine Leberfibrose auszulösen. Diese unterscheiden sich sowohl in Mechanismus, Anwendung und Intensität.

1.3.4.1 Chemische Modelle

Chemische Modelle eignen sich gut, um eine dem Menschen ähnliche Leberfibrose auszulösen. Vor allem durch die hohe Reproduzierbarkeit und eine einfache sowie schnelle Anwendung sind diese beliebt. Dabei finden Lebertoxine wie Ethanol [137], Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) [94], Dimethylnitrosamin (DMN) [138], Diethylnitrosamin (DEN) [139] und Thioacetamid (TAA) [140] Anwendung. Kurz- und langfristig kommt es bei diesen Modellen zum Absterben von Hepatozyten, zu einer Entzündungsreaktion und zur Bildung von extrazellulärer Matrix (EZM). Eine häufige und einfache Anwendung dieser Substanzen ist die intraperitoneale (i. p.) Injektion sowie durch eine Magensonde und bei Alkohol eine *ad libidum* Fütterung. Mit der Applikationsmethode kann die Geschwindigkeit und Intensität der Modelle gut gesteuert werden, nach einer i. p.-Injektion entwickelt sich die Leberfibrose am schnellsten. Der Nachteil dieser chemischen Modelle ist jedoch, dass sie bei Mäusen zu erheblicher Morbidität und Mortalität führen können, wenn sie nicht sorgfältig dosiert werden. Außerdem können sie die chronische und progressive Natur der menschlichen Lebererkrankung nicht genau nachahmen und es kommt zu keinen Stoffwechselstörungen [141].

1.3.4.2 Diätbasierte Modelle

Die mit dem metabolischen Syndrom assoziierten Lebererkrankungen NAFLD und NASH sind hauptsächlich auf übermäßige, inadäquate Ernährung zurückzuführen. Daher werden bei Versuchstieren verschiedene Diäten eingesetzt, um eine NALFD mit der Entwicklung einer NASH, ähnlich der Erkrankung beim Menschen, zu imitieren. Die wichtigsten Vertreter dieser Diäten werden im folgenden Abschnitt im Hinblick auf ihre unterschiedliche Zusammensetzung und

1. Einleitung

ihre pathologischen Auswirkungen näher beschrieben. Es handelt sich dabei um die Methionin- und Cholin-defiziente Diät (MCD), die Cholin-defiziente L-Aminosäure-definierte Diät (CDAA), die fettreiche Diät (HFD) und die Western Diät (WD).

Methionin- und Cholin-defiziente Diät (MCD)

Zusammengesetzt ist die MCD-Diät aus ca. 45 % Zucker, 15 % Proteinen, 10 % Fett und einer Nährstoff-Mischung, bei welcher die beiden essenziellen Bausteine Methionin und Cholin fehlen. Dies führt zu einer Störung der β -Oxidation und zu einer beeinträchtigten Produktion von VLDL-Partikeln [142], da Cholin und Methionin für die Sekretion von VLDL notwendig sind [143]. Eine Fütterung über acht bis zehn Wochen führt zu oxidativem Stress in der Leber, dem Absterben von Hepatozyten, erhöhten TNF α -, Zytokin- und Lipidwerten [144]. Sie stellt die bevorzugte Methode zur Nachahmung der humanen NASH dar, da es im Verlauf zu Steatose, erhöhten ALT- und AST-Werten, lobulärer Entzündung und perizellulärer Fibrose kommt [145]. Nachteilig an dieser Diät ist, dass typische Effekte des metabolischen Syndroms, in diesem Fall Adipositas und Insulinresistenz, fehlen [146, 147].

Cholin-defiziente L-Aminosäure-definierte Diät (CDAA)

Eine Weiterentwicklung der MCD ist die CDAA-Diät. Sie ist ebenfalls eine Cholinmangeldiät mit geringen Mengen an Methionin [148]. Sie besteht aus 15 % Fett, 40 % Zucker, 12 % Protein, 1 % Cholesterin und einer definierten Mischung von L-Aminosäuren. Durch diese Zusammensetzung kommt es zu einer Anreicherung der hepatischen Triglyceride, da in diesem Fall auch die Bildung von VLDL-Partikeln und die β -Oxidation der Fettsäuren in den Hepatozyten gehemmt wird. Die gleichzeitig gesteigerte *de novo* Lipidsynthese führt zu Stress im endoplasmatischen Retikulum und zur Aktivierung der hepatischen Sternzellen [149]. Die Diät hat keine Auswirkungen auf den Glukosestoffwechsel und die Tiere entwickeln keine Fettleibigkeit [142, 148]. Sie führt zu ähnlichen Effekten wie bei NASH beim Menschen, d. h. Steatohepatitis, NASH-assoziierte Leberfibrose (nach zehn Wochen Fütterung) [94], Zirrhose und HCC (bis zu 8vier Wochen Fütterung) [150]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Entzündungsreaktionen während der CDAA-Diät auch durch Kupferzellen vermittelt werden. [151]. Hierbei ist anzumerken, dass die CDAA-Diät zunehmend als geeignetes Modell für die Untersuchung von NAFLD und NASH-assoziiierter Fibrose anerkannt wird [134, 135].

Fettreiche Diät (HFD)

Fettreiche Diäten (HFD, engl. *high fat diet*) bestehen aus ca. 35 % Fett und ca. 10 % Zucker und führen über den Weg der Adipositas zur natürlichen Entwicklung der NAFLD. Dies be-

1. Einleitung

günstigt den Warburg-Effekt, wobei die Energiegewinnung hauptsächlich durch Glykolyse erfolgt. Dadurch entsteht oxidativer Stress, was die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigt. Es kommt erst nach ca. 20 Wochen zu einer Entzündung der Leber, die die Fibrose verstärkt [134, 152]. Da es sich um eine milde Diät handelt, entwickeln die Mäuse zwar leichte Symptome einer NAFLD, aber keine NASH, Fibrose oder Zirrhose [153]. Durch die Diät kommt es bei Mäusen zu einer Gewichtszunahme mit Insulinresistenz und Lebersteatose, was metabolisch mit der menschlichen NASH-Erkrankung mit Insulinresistenz und Hyperglykämie übereinstimmt [154].

Western Diät (WD)

Eine Western Diät ist reich an gesättigten Fetten, Transfetten und raffiniertem Zucker, da diese Ernährungsbestandteile mit der Entwicklung von NASH beim Menschen in Verbindung gebracht werden und dem Ernährungsbild der westlichen Welt entsprechen [155]. Sie besteht zu 20 % aus Butterfett, 35 % Zucker, 17 % Protein und 0,2 % Cholesterol. Mäuse entwickeln nach zehn Monaten Fütterung eine massive Gewichtszunahme von bis zu 200 %. Ebenso kommt es zu einem erhöhten Blutzuckerspiegel, einer Insulinresistenz, Fettleibigkeit und einem metabolischen Syndrom sowie hepatische Steatose, jedoch keine NASH-assoziierte Leberfibrose [156, 157].

1.3.4.3 Genetische Modelle

Genetische Modelle ermöglichen eine gezielte Untersuchung von Krankheitsmechanismen und liefern konsistente und reproduzierbare Ergebnisse im Vergleich zu variablen Fütterungsmodellen. Allerdings sind sie nicht in der Lage, die komplexen Interaktionen und den multifaktoriellen Charakter von Lebererkrankungen vollständig abzubilden. Aus diesem Grund werden genetische Modelle häufig mit diätetischen Modellen kombiniert [142]. Das bekannteste genetische Modell zur Untersuchung der NAFLD sind sogenannte ob/ob-Mäuse, denen funktionelles Leptin fehlt [158]. Dieses Peptidhormon wird unter physiologischen Bedingungen vom weißen Fettgewebe ausgeschüttet und verstärkt das Sättigungsgefühl bei gleichzeitiger Erhöhung des basalen Energieverbrauchs. Die Mäuse entwickeln daher eine ausgeprägte Adipositas, Hyperlipidämie, Hyperinsulinämie sowie Hyperglykämie [159, 160]. Ein weiteres, ähnliches Modell sind db/db-Mäuse mit einer Mutation im Leptin-Rezeptor. Obwohl eine Ausschüttung von Leptin erfolgt, ist dessen Signalwirkung aufgrund der defekten Rezeptoren nicht adäquat [161].

Db/db-Mäuse entwickeln die gleichen Symptome wie ob/ob-Mäuse, allerdings benötigen beide Modelle einen zusätzlichen Stimulus, um eine dem Menschen ähnliche NASH und Leberfibrose zu entwickeln. Zum Beispiel werden diese genetischen Mausmodelle mit einer MCD-

1. Einleitung

Diät gefüttert, um hepatische Steatose, fokale Leberzellnekrose und Entzündung in den ob/ob-Mäusen zu induzieren [162] und um eine ausgeprägte Steatose, erhöhte ALT-Werte und eine erhöhte Expression von Kollagen I in den Lebern der db/db-Mäuse zu erhalten [161]. Interessanterweise muss Leptin bei ob/ob-Mäusen, die mit einer MCD-Diät gefüttert werden, supplementiert werden, um eine Leberfibrose zu erzeugen [162].

Um eine NASH-assoziierte Fibrose ohne metabolische Effekte zu untersuchen, eignet sich die adulte *Gata4*^{LSEC-KO}-Maus mit einem LSEC-spezifischen *Gata4*-Knockout. Durch diesen bilden die Mäuse eine perisinusoidale Leberfibrose mit einer Pseudokapillarisation der LSEC. GATA4 als Transkriptionsfaktor bewirkt die endotheliale, MYC-vermittelte *de novo* Expression von PDGFB, einem Sternzell-aktivierendem Zytokin [94].

1.3.4.4 Weitere Modelle

Neben den oben beschriebenen chemischen und diätbasierten Modellen gibt es noch chirurgischen und infektionsbasierte Modelle.

Beim chirurgischen Modell ist die Ligatur der Gallengänge (BDL, engl. *bile duct ligation*) eine Standardmethode mit hoher Reproduzierbarkeit und bewirkt über eine Cholestase eine Schädigung der Leber. Dafür wird der Gallengang entweder total (tBDL) oder partiell (pBDL) ligiert [163]. Im Verlauf kommt es zu einem Anstieg der Serumwerte, Veränderungen der Gallenstruktur mit einer Entzündungsreaktion und Fibrose. Residenten Kupfferzellen der Leber werden aktiviert, welche im Verlauf weitere Immunzellen rekrutieren. Es kommt zu einer Induktion des NF- κ B-Signalwegs [164] und zu einer verstärkten Expression von α SMA, Kollagen I und TGF β 1 sowie zur Freisetzung von ROS [165].

Infektionsmodelle verwenden entweder Hepatitis-B-Viren (HBV) oder die Leber befallende Parasiten. HBV sind für Nagetieren nicht infektiös, weshalb chimäre Mäuse verwendet werden, damit die Infektion der Lebern suffizient funktioniert. Allerdings ist zu beachten, dass die chimären Stämme häufig Immundefizite aufweisen [166]. In parasitären Fibrosemodellen werden die Gattungen *Schistosoma mansoni*, *haematobium* und *japonicum* verwendet [167]. Während der Reifung der injizierten Eier kommt es zu einer Abwehrreaktion der Leber und im weiteren Verlauf zu einer Entzündung, Aktivierung von HSC und Produktion von EZM und verschiedenen Zytokinen [168].

1.4 Veränderungen der hepatischen vaskulären Nische im metastatischen Kontext

Lebererkrankungen wie NAFLD und NASH gehen mit einer Schädigung der hepatischen Gefäßnische einher. Neben dem Risiko, dass die Lebererkrankungen selbst in eine Leberzirrhose oder ein hepatozelluläres Karzinom übergehen, besteht die Gefahr, dass diese pathologischen Veränderungen der hepatischen vaskulären Nische auch andere, nicht-hepatische Erkrankungen begünstigen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf zirkulierende Tumorzellen relevant. Die Leber ist auch im physiologisch gesunden Zustand ein hochgradig metastasierungsförderndes Organ, insbesondere aufgrund der Vermischung von arteriellem und venösem Blutkreislauf und der hohen Permeabilität ihrer Gefäßarchitektur.

Stephen Paget postulierte 1889, dass zirkulierende Tumorzellen (Samen, engl. *seed*) bevorzugt in Organe metastasieren, die eine geeignete Mikroumgebung (Boden, engl. *soil*) bieten. Daraus entstand seine berühmte „*seed and soil*“-Theorie [169]. Nach dieser Theorie kann ein Primärtumor mit verschiedenen Wachstumssignalen, Entzündungsmediatoren oder anderen Signal- und Botenstoffen eine vaskuläre Nische in einer „prämetastatischen Nische“ konditionieren, was von Kaplan und Mitarbeitern bestätigt wurde [170]. Diese die Metastasierung beeinflussenden Organveränderungen können auch durch Lebererkrankungen hervorgerufen werden.

So können etwa hochregulierte Adhäsionsmoleküle der LSEC wie ICAM1, VCAM1 und E-Selektin [171-173] nicht nur die Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten fördern [174, 175] sondern tatsächlich auch die Einwanderung und Metastasierung von Tumorzellen in die Leber erleichtern [79, 176]. Es konnte gezeigt werden, dass die hepatische Hochregulation dieser Adhäsionsmoleküle durch CCl₄-induzierte Leberzirrhose bei Mäusen signifikant erhöht wird. Infolgedessen zeigten B16F1-Melanommetastasen eine signifikant stärkere Lebermetastasierung als die Kontrollgruppe [177]. Andererseits konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Reduktion der LSEC-spezifischen ICAM1-Expression im Rahmen einer endothelialen Überaktivierung des Notch-Signalweges die Adhäsion, Migration und Metastasierung von Melanomzellen reduziert [178].

Auch aktivierte hepatische Sternzellen, die Kollagene und ECM produzieren, können die mechanischen Eigenschaften der Leber so verändern, dass das Tumorwachstum positiv beeinflusst wird [179]. Auch die von den Sternzellen sezernierten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die die EZM abbauen und umwandeln sollen, können die Tumorzellmigration erleichtern und ein günstiges Milieu für das Tumorwachstum schaffen [180, 181]. Tumorzellen scheinen auch in der Lage zu sein, Kupfferzellen direkt zu binden, da die Depletion von Kupfferzellen bei Ratten die Retention von Kolonkarzinomzellen in der Leber signifikant reduzierte [182].

1. Einleitung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lebergefäßnische die Metastasierung von Krebs bei NAFLD und NASH begünstigen kann. Die häufigsten Tumoren, die in die Leber metastasieren, sind beispielsweise das kolorektale Karzinom, das maligne Melanom oder das Lungenkarzinom [183]. Insbesondere beim malignen Melanom treten Lebermetastasen bei etwa 10 – 20 % der Patienten im fortgeschrittensten Stadium auf [184, 185], und es ist gut dokumentiert, dass Lebermetastasen bei Melanompatienten mit einer schlechten Prognose assoziiert sind [186].

1.5 Das maligne Melanom

Seit einigen Jahrzehnten gibt es weltweit eine stetig steigende Inzidenz des malignen Melanoms [187]. In Australien tritt die höchste Inzidenz mit 50 – 60 neuen Melanom-Fällen pro 100.000 Einwohner auf, danach kommen die USA mit 20 – 30 und Europa mit 10 – 25 pro 100.000 Einwohner [188]. In Deutschland sind etwas mehr Männer als Frauen betroffen, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei Männern bei 69 und bei Frauen bei 63 Jahren liegt. Seit 2008 ist die Erkrankungsrate sprunghaft angestiegen, was auf das in Deutschland eingeführte und von den gesetzlichen Krankenkassen finanzierte Hautkrebsscreening zurückzuführen ist [189].

Bei malignen Melanom wird zwischen dem mukosalen und kutanen Melanom (KM) unterschieden, wobei das kutane Melanom der häufigste Subtyp bei hellhäutigen Personen ist und in der Basalzellschicht der Oberhaut – genauer in den Melanozyten – entsteht [190]. Dies sind die pigmentbildenden Zellen der Haut, welche durch die Produktion von Melanin der Haut ihre charakteristische Farbe verleihen. Die vier wichtigsten Subtypen haben sehr unterschiedliche Erscheinungsbilder [191]. Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) ist mit ca. 60 % aller Melanome der häufigste Subtyp. Es tritt häufig an Stellen auf mit hoher UV-Exposition genau wie das noduläre Melanom welches eine knotige Struktur aufweist. Es wächst sehr rasch in die Tiefe, was mit einer schlechteren Prognose verbunden ist. Das lentigo maligna Melanom tritt bei ca. 10 % auf und wächst langsam und horizontal. Das akral-lentiginöse Melanom (AM) ist mit 4 % das seltenste der kutanen Melanome und kommt auf den „Akren“ vor (Fußsohlen, Nagelbetten, Handflächen).

In 20 – 40 % der Fälle entsteht das kutane Melanom in der Nachbarschaft bereits bestehender Nävi, während die restlichen 60 – 80 % neu, d. h. *de novo*, auftreten [192]. Melanome, die auf chronisch sonnengeschädigten Hautarealen (CSD) entstehen, weisen eine deutlich höhere Mutationsrate auf als Melanome ohne CSD. Dies ist eine direkte Folge der UV-induzierten C > T-Übergänge der Pyrimidine, welche die meisten kutanen Melanome aufweisen. Diese

1. Einleitung

Übergänge bewirken eine Überaktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK (MAPK)-Signalwegs und betreffen am häufigsten das *BRAF*-, *NF-1*- und *NRAS*-Gen [193, 194]. Bei kutanen Melanomen konnten signifikante Mutationen in den Genen *BRAF*, *CDKN2A*, *NRAS* und *TP53* nachgewiesen werden. Dabei ist *BRAF* mit einer Prävalenz von 50 % die am häufigsten betroffene Genmutation [195]. Mutationen in *BRAF* und *NRAS* sind beim Melanom mit einer schlechten Prognose im Stadium IV des Melanoms verbunden. Vor allem sind die Downstream-Prozesse dieser Gene für eine negative Entwicklung des Melanoms entscheidend, was sich in stark invasivem Wachstum und einer verstärkten Metastasierung widerspiegelt [196].

Auch wenn Melanome nur ein Prozent der Hautkrebserkrankungen ausmachen, sind sie dennoch für 90 % der Hautkrebs-assoziierten Todesfälle auf Grund der Metastasierung verantwortlich [188]. Metastasen-Forschung ist daher für den Fortschritt in der Krebstherapie von großer Bedeutung, da die krebsbedingte Sterblichkeit fast ausschließlich auf die Metastasierung zurückzuführen ist. Patienten mit fern metastasiertem Melanom haben die niedrigsten Gesamtüberlebensraten. Treten Melanommetastasen im Verdauungstrakt auf, haben diese Patientinnen und Patienten ein medianes Gesamtüberleben von 5,5 Monaten (95 % CI = 3,3 – 7,6 Monate) [186]. Besonders brisant ist die Tatsache, dass das maligne Melanom zu den Krebsarten gehört, die am häufigsten in den Gastrointestinaltrakt metastasieren [197]. Zwar hat sich in den letzten Jahren viel in der Behandlung von Krebspatienten getan, aber gerade die vielversprechenden Immun-Checkpoint-Inhibitoren und zielgerichteten Therapien zeigen immer wieder Therapieresistenzen bei Lebermetastasen im Stadium IV [198]. Um die Mortalität von Melanommetastasen in der Leber zu senken und effektive Behandlungsmethoden zu entwickeln, ist es von elementarer Bedeutung, die Mikroumgebung der Leber und die Mechanismen der Metastasierung in dieses Gewebe weiter zu erforschen und neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

2. Zielsetzung der Arbeit

Das maligne Melanom der Haut hat eine der höchsten Metastasierungsraten, wobei die Leber besonders häufig betroffen ist. Ziel dieser Arbeit ist es, die Mechanismen der Lebermetastasierung des malignen Melanoms in einer pathologisch veränderten vaskulären Nische zu untersuchen. Dazu wird die Metastasierung in verschiedenen Leberschadensmodellen und einer Knockout-Mauslinie untersucht, um den Einfluss des veränderten LSEC-spezifischen Angiokrin- und Transkriptionsfaktor-Milieus im Rahmen der Steatose und NASH-assoziierten Fibrose auf die Metastasierung zu untersuchen.

2.1 Spezifische Ziele

Metastasierung des Melanoms in der NASH-assoziierten fibrotischen hepatischen Gefäßnische:

Um den Effekt der NASH-assoziierten fibrotischen hepatischen Gefäßnische auf die Metastasierung zu untersuchen, wurden weibliche Mäuse für zehn Wochen mit CDAA-Diät gefüttert und die murinen Melanomzell-Linien B16F10*Luc2* und Wt31 sowie als Kontrolle die murine Kolonkarzinom-Zelllinie Mc38 intrasplenisch oder intravenös injiziert. Anschließend wurden die Anzahl und Fläche der Leber- und Lungenmetastasen ausgewertet.

Charakterisierung und Metastasierung des Melanoms in der steatotischen vaskulären Nische:

Zur Untersuchung der Veränderungen in der steatotisch veränderten hepatischen Gefäßnische wurden Mäuse über kurze Zeiträume mit einer CDAA-Diät gefüttert und die pathologischen Veränderungen analysiert. Gleichzeitig wurden Metastasierungsexperimente mit den Melanomzelllinien B16F10*Luc2* und Wt31 sowie mit der Kolonkarzinomzelllinie Mc38 durchgeführt. In einem weiteren Versuchsteil wurde der Einfluss einer kurzen fettreichen Diät auf das Metastasierungsverhalten der murinen Melanomzelllinie B16F10*Luc2* untersucht.

Metastasierung des Melanoms in der genetisch veränderten fibrotischen vaskulären Nische:

In diesem Versuchsteil wurde der Einfluss einer NASH-ähnlichen fibrotisch veränderten hepatischen Gefäßnische mittels eines genetischen Mausmodells, also ohne diätetische Einflüsse, untersucht. Dazu wurde die genetische Mauslinie *Gata4*^{LSEC-KO/BI} verwendet und die Metastasierung von B16F10*Luc2*-Zellen nach intrasplenaler Injektion untersucht.

2. Zielsetzung der Arbeit

Identifizierung von LSEC-spezifischen veränderten Angiokrinen, Transkriptionsfaktoren oder Markern während der hepatischen Steatose:

Mittels LSEC-spezifischer RNA-Sequenzierung wurden verschiedene dysregulierte Kandidatengene als potenzielle Akteure in der Melanom-Metastasierung identifiziert und mittels Immunfluoreszenz-Färbung und FISH bestätigt. Im nächsten Schritt wurde die primäre Retention der Tumorzellen *B16F10Luc2* sowie *Mc38Luc* in der Leber durch einen Retentions-Assay nach verschiedenen Fütterungszeiträumen untersucht, um die Relevanz dieser Akteure zu untersuchen.

3. Materialien und Methoden

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Primer und Plasmide

Plasmide

Zur Transduktion der Melanom Zellen wurde ein kommerziell erhältliches Plasmid verwendet, welches Luciferase, tdTomato sowie drei Resistenzgene zur Selektion enthält (Abbildung 6).

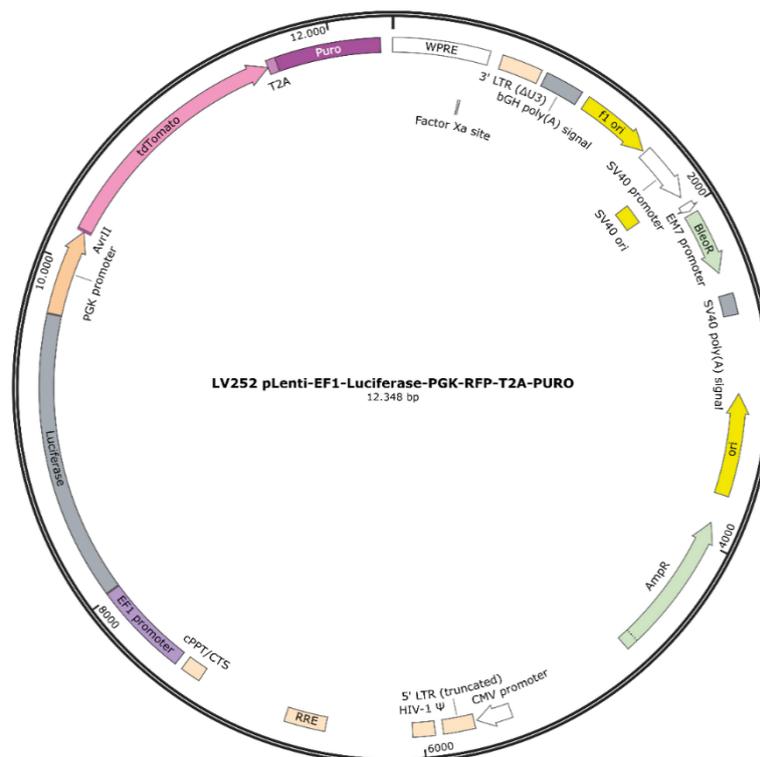


Abbildung 6: LV252 Plasmid mit einem Luciferase-Gen mit EF1-Promotor und tdTomato mit PGK-Promotor. Als Selektionsmarker besitzt das Plasmid ein Ampicillin-, Bleomycin- und ein Puromycin-Resistenz-Gen.

Tabelle 1: Kommerziell erworbene Plasmide

Bezeichnung	Hersteller
LV252 pLenti-EF1-luciferase-PGK-RFP-T2A-puro	Alstem

3. Materialien und Methoden

Primer

Tabelle 2: Primer-Sequenzen zur Bestimmung der Genotypen

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
Mm Cre_iCre_Fw	AAGAACCTGATGGACATGTTTCAGG
Mm Cre_iCre_Rv	TCTGTCAGAGTTCTCCATCAGGGA
Mm GATA4_Fw	CCCAGTAAAGAAGTCAGCACAAGGAAAC
Mm GATA4_Rv	AGACTATTGATCCCGGAGTGAACATT

3.1.2 Antikörper, Sonden, Kits und Medikamente

Unkonjugierte Antikörper

Tabelle 3: Unkonjugierte Antikörper

Spezifität	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
CD31	Dianova	DIA-310	1:50
CD44	Abcam	ab157107	1:750
CD169	Abcam	Ab53443	1:100
CLEC4F	R&D Systems	MAB2784	1:250
Endomucin	Life Technologies	14-5851-85	1:100
F4/80	Abcam	Ab111101	1:100
ICAM1	R&D Systems	AF796	1:200
LYVE1	R&D Systems	AF2125	1:100
Stab-2 c-Term Pep 15	In unserem Labor produziert		1:500
VCAM1	R&D Systems	AF643	1:250
Podocalyxin	R&D Systems	AF1556	1:100

3. Materialien und Methoden

Konjugierte Antikörper

Tabelle 4: Konjugierte Antikörper

Spezifität	Konjugate	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Goat IgG	AF488	Dianova	705-545-147	1:400
Goat IgG	AF647	Dianova	705-605-147	1:400
Goat IgG	Cy3	Dianova	705-165-147	1:400
Rabbit IgG	AF488	Dianova	711-545-152	1:400
Rabbit IgG	AF647	Dianova	711-605-152	1:400
Rabbit IgG	Cy3	Dianova	711-165-152	1:400
Rat IgG	AF488	Dianova	712-545-153	1:400
Rat IgG	AF647	Dianova	712-605-153	1:400
Rat IgG	Cy3	Dianova	712-165-153	1:400

FISH-Sonden

Tabelle 5: RNA-Sonden zur Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Bezeichnung	Hersteller
<i>Ppib</i> (Cyclophilin B) (pos. Kontrolle)	ACD Bio
Maus <i>Cdh5</i> -Channel 2 (312531-C2 – NM_009868.4)	ACD Bio
Maus <i>Gpnmb</i> -Channel 1 (489511 – NM_053110.4)	ACD Bio
Maus <i>Sele</i> -Channel 1 (438621 – NM_011345.2)	ACD Bio

3. Materialien und Methoden

Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Triglyceride Quantification Colorimetric Kit	BioVision
innuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena
innuPREP RNA Mini Kit 2.0	Analytik Jena
KAPA HotStart Mouse Genotyping Kit	Sigma-Aldrich
RNAscope 2.5 HD Duplex kit	Advanced Cell Diagnostics

Medikamente

Tabelle 7: Verwendete Medikamente

Bezeichnung	Hersteller	Wirkstoff	Dosierung
Buprenovet®	BAYER	Buprenorphin 0,3 mg/ml	0,1 mg/kg KG
IsoFlo®	zoetis	Isofluran	2 – 3 % (v/v) bei 2 l/min O ₂
Rimadyl®	Pfizer	Carprofen 50 mg/ml	5 mg/kg KG

3.1.3 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

Name	Spezies	Beschreibung	RRID/Quelle
HEK293T/17	Mensch	Menschliche embryonale Nierenzellen, optimiert für die transiente Transfektion und Proteinexpression	CVCL 1926
B16F10Luc2	Maus	Melanomzellen aus der C57BL/6 Maus mit Luciferase-Aktivität [199]	CVCL_A4CJ

3. Materialien und Methoden

Wt31	Maus	Melanomzellen aus der Tyr::Nras ^{Q61K/s} ; INK4a ^{-/-} [200] Maus
Mc38	Maus	Zellen aus dem kolonkarzinom der C57BL/6 VCL_B288,[201] Maus
Mc38Luc	Maus	Kolonadenokarinomzellen der C57BL/6 Maus mit Luciferase-Aktivität. In unserem Labor herge- stellt.

3.1.4 Chemikalien, Lösungsmittel und Reagenzien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien, Lösungsmittel und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
2-Propanol	Sigma-Aldrich
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES)	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific
Aceton	Sigma-Aldrich
Agarose	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	VWR
Cell Dissociation Puffer	Millipore
cOmplete EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail	Sigma-Aldrich
CD146 MACS MicroBeads	Miltenyi Biotech
Kollagenase A	Sigma-Aldrich
Dako 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrat	Agilent Technologies
Dako antibody diluent	Agilent Technologies
Dako aqueous mounting medium	Agilent Technologies
Dako fluorescencence mounting medium	Agilent Technologies
Dako peroxidase solution	Agilent Technologies

3. Materialien und Methoden

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung $-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$ (DPBS $-/-$)	Life Technologies
Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung $+Ca^{2+}/+Mg^{2+}$ (DPBS $+/+$)	Life Technologies
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) Mix, 10 mM	Invitrogen
Ethanol	Carl Roth
Ethanol, denaturiert	Carl Roth
EDTA	Invitrogen
Fetales Kälberserum (FKS, engl. FCS)	Life Technologies
Fruktose	Sigma-Aldrich
Gene Ruler Desoxyribonukleinsäure (DNS) Ladder mix, 100 – 10000 bp	Thermo Fisher Scientific
D(+)-Glucose	Gibco
Glycin	Carl Roth
Grey's balanced salt solution (GBSS)	Sigma-Aldrich
Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) Citrat Puffer pH 6,0, 10 X	Zytomed Systems
Histofix ROTI 4 % phosphatgepuffert, pH 7	Carl Roth
Puromycin	InvitroGene
DNA-Gel-Ladefarbstoff, 6 X	Thermo Fisher Scientific
Lysogeny broth (LB) Agar	Thermo Fisher Scientific
LB-Medium	Carl Roth
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Carl Roth
Maxima Reverse Transkriptase, 200 U/ μ l	Thermo Fisher Scientific
Mayers Hämalaunlösung	Merck
Nancy 520	Sigma-Aldrich
Nonidet-P40-Ersatz (NP – 40)	Fluka

3. Materialien und Methoden

Normales Eselserum (engl. <i>NDS</i>)	Dianova
Nycodenz	Axis Shield
Penicillin-Streptomycin, 10.000 U/ml	Thermo Fisher Scientific
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Life Technologies
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka
Proteinase K aus <i>Engyodontium album</i>	Sigma-Aldrich
Oligo (dT)18 Primer	Life Technologies
Ölrot O (engl. <i>Oil Red O</i>)	Sigma-Aldrich
RiboLock RNase Inhibitor	Life Technologies
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX Supplement	Life Technologies
Super Optimal Broth mit Kataboliturdrückung (engl. <i>S.O.C.</i>) Medium	Invitrogen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Sigma-Aldrich
Natriumbutyrat ($\text{Na}(\text{C}_3\text{H}_7\text{COO})$)	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
D(+)-Saccharose	Sigma-Aldrich
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific
Tris-Acetate-EDTA (TAE) – Puffer, 50 X	Carl Roth
TRIS HCl Ultra-Pure, 1 M, pH 8	Life Technologies
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA, 10 X	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Ultra-Pure Wasser DNase/RNase frei	Life Technologies
X-tremeGENE 9 DNA-Transfektionsreagenz	Sigma-Aldrich
Xylol	Carl Roth

3. Materialien und Methoden

3.1.5 Puffer und Medien

Tabelle 10: Puffer und Medien

Puffer/Medium	Zusammensetzung
30 % Glucose-Lösung	3 g D(+)-Glucose 10 ml 1 X PBS
10 X Ca ²⁺ -depriviertes Medium (pH 7,4)	0,1 mM L-Asparaginsäure 0,2 mM L-Threonin 0,3mM L-Serin 0,5 mM Glycin 0,6 mM L-Alanin 0,9 mM L-Glutaminsäure 0,9mM L-Glutamin 20 mM D (+) Glukose 120 mM Fruktose 197 mM Saccharose 3 mM KCl 0,7 mM NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O 0,5 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES 24 mM NaHCO ₃
MACS-Puffer	1 X PBS 1 % FKS 2 mM EDTA
35 % Nycodenz	3,5 g Nycodenz auf 10 ml GBSS
RPMI-Medium	500 ml RPMI medium + GlutaMAX 10 % FKS 1 % P/S
DMEM-Medium	500 ml DMEM + GlutaMAX 10 % FKS 1 % P/S

3. Materialien und Methoden

3.1.6 Diäten

Tabelle 11: Liste der verwendeten Diäten

Diät	Hersteller
Cholindefiziente L-Aminosäure definierte (CDAA) Diät	Ssniff
DIO – 60 kJ % Fett (Schweineschmalz) Diät	Ssniff
Ratte/Maus-Haltungsfutter („Normalfutter“)	Ssniff

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 12: Liste der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
15 ml Zentrifugenröhrchen, konisch	Greiner Bio-One
50 ml Zentrifugenröhrchen, konisch	Greiner Bio-One
Augen- und Nasensalbe	Bepanthen
Dako Pen	Agilent Technologies
Deckgläser 24 x 60 mm	VWR
Eindeckkassetten	neoLab Migge
Einwegskalpell	Carl Roth
Erlenmeyerkolben	Carl Roth
Filterspitze, 10 µl	Biozym
Filterspitze, 100 µl	Biozym
Filterspitze, 1250 µl	Biozym
Filterspitze, 200 µl	Biozym

3. Materialien und Methoden

Hautdesinfektionsmittel Softasept N, 250 ml	B. Braun
Injektionskanüle, 26 G x ½"	B. Braun
Injektionskanüle, 30 G x ½"	B. Braun
Kochsalzlösung 0,9 %, 5 ml	B. Braun
Kryoeinbettformen, 10 x 10 x 5 mm	Weckert
Kryoeinbettformen, 15 x 15 x 5 mm	Weckert
Kryoeinbettformen, 25 x 20 x 5 mm	Weckert
Kryo-Röhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One
D-Luciferin, K ⁺ Salz	Bio Cat
MACS LS-Säulen	Miltenyi Biotec
Mikrotomklinge, A35	pfm medical
Mikrotomklinge, C35	pfm medical
Mikrotomklinge, R35	pfm medical
Mikrotomklinge, S35	pfm medical
Mullkompressen 5 x 5 cm, steril, 12fach	Henry Schein medical
Nahtmaterial Vicryl coated® Polyglactin 910, 6 – 0, 70 cm	Ethicon
Objektträger Super Frost Plus	Langenbrinck
Octenisept Wund-Desinfektionsspray, 50 ml	Schülke
Parafilm M	Merck
PCR 8er-Streifen, 0,2 ml	Sarstedt
Pipettenspitze, 10 µl	Biozym
Pipettenspitze, 1250 µl	Biozym

3. Materialien und Methoden

Pipettenspitze, 200 µl	Biozym
Reaktionsgefäß Biopur Safe-Lock, 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß Safe-Lock, 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß Safe-Lock, 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß Safe-Lock, 5 ml	Eppendorf
Serologische Pipetten, 10 ml	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten, 25 ml	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten, 5 ml	Greiner Bio-One
Siebgewebe aus Polyester, Maschenweite 250 µm	neoLab Migge
Spritze, 20 ml	B.Braun
Spritze, Omnifix-F, 1 ml	B.Braun
Spritzenfilter ROTILABO PVDF, 0,45 µm	Carl Roth
Tissue-Tek O.C.T. Compound Einbettmedium	Weckert
Vivaspin 20, 100 000 MWCO	Buddeberg
Volumenkapillaren, end-to-end, 20 µl	Marienfeld
Wattestäbchen, kleiner Kopf, steril	neoLab Migge
Zellkulturflasche, T175	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche, T75	Greiner Bio-One
Zellkultur-Platten Cellstar, 10 x 2 cm	Greiner Bio-One
Zellsieb, 100 µm	neoLab Migge

3. Materialien und Methoden

3.1.8 Geräte

Tabelle 13: Liste der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese System Mupid-One	Advance
Analysenwaage Entris II Advance	Sartorius
Autoklav Systec VX-95	Microbiology International
Bunsenbrenner Campingaz Labogaz 206	Coleman Company
CO ₂ -Inkubator HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific
Eclipse Ni-E vollmotorisiertes aufrechtes Mikroskop	Nikon Instruments
DS-Qi2 hochauflösende Monochrom-Kamera	
DS-Ri2 hochauflösende Farbkamera	
Filterset AHF F36-513 DAPI HC	
Filterset AHF F36-720 Sp. Green HC mFISH	
Filterset AHF F36-740 Sp. Orange HC mFISH	
Filterset Semrock BrightLine Cy5-4040C single-band	
Einhängethermostat CORIO C	Julabo
Flockeneisbereiter AF 100	Scotsman Ice Systems
Flüssigkeitsabsaugsystem BVC 21	Vacuubrand
Fluoreszenzlampe SOLA Light Engine	Lumencor
Gasnarkosegerät XGI-8	Caliper Life Sciences
Gefrierbehälter Nalgene Mr.Frosty	Thermo Fisher Scientific
Gefriergeräte -20 °C, Mediline	Liebherr
Gefriergeräte V.I.P. -86 °C MDF-U50V	Sanyo Denki

3. Materialien und Methoden

GelStick Imager	Intas
Handdispenser Multipette plus	Eppendorf
Inkubationshaube TH 30	Edmund Bühler
Inverses Phasenkontrastmikroskop DM IL	Leica Microsystems
IVIS Lumina III	PerkinElmer
Kleintier-OP Tisch	MEDAX
Kryokonservierungssystem CS 160 SK	Chart Industries
Kryostat CM 3050 S	Leica Biosystems
Kühlplatte 4100	pfm medical
Kühlschränke, 4 °C, MediLine	Liebherr
MACS Quadro Seperator	Miltenyi Biotec
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
Microplate-Reader	Tecan
Mikropipetten Eppendorf Research plus	Eppendorf
Mikropipetten Gilson Pipetman	Gilson
Mikrowellenherd R-332	Sharp
Mikrozentrifugen 5415R, 5417R und 5424	Eppendorf
NanoPhotometer NP80	Implen
Nikon D5600 Spiegelreflexkamera	Nikon
Nikon AF-S Micro NIKKOR 40 mm 1:2,8 G	Nikon
Operationsbesteck	F S T
Peristaltikpumpe	Ismatec

3. Materialien und Methoden

Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand
Plan Apo λ 10x NA 0.45	Nikon Instruments
Plan Apo λ 20x NA 0.75	Nikon Instruments
Plan Apo λ 40x NA 0.95	Nikon Instruments
Plan Apo λ 4x NA 0.2	Nikon Instruments
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments
Präzisionswaage Entris II Essential Line	Sartorius
Reinigungs- und Desinfektionsautomat G 7883	Miele
Rotationsmikrotom 3006EM	pfm medical
Schüttler Analog Vortex Mixer	VWR International
Schüttler Reax 1 und Reax Control	Heidolph Instruments
Schüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Sicherheitsschrank Typ 90	Asecos
Sicherheitswerkbänke HERAsafe KS 12/18	Thermo Fisher Scientific
Spektrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Sterilisator Hot Bead	FST
Thermomixer C	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischnarkosegerät	Dr. Wilfried Müller GmbH
Trimmer Isis GT420 Aesculap	B. Braun
Wärmeschrank Heraeus K1253	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad 1000	pfm medical

3. Materialien und Methoden

Wasserbad Pura 4	Julabo
Wasserbad TW8	Julabo
Zählkammer, Neubauer improved	Brand
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf

3.1.9 Software

Tabelle 14: Verwendete Programme mit Entwickler und der verwendeten Version

Programmname und -version	Entwickler
BioRender (Premium)	BioRender
Fiji ImageJ 1.54f	National Institutes of Health
FlowJo V 10.1	FlowJo
GraphPad Prism 8 V8.4.3	GraphPad Software
LabImage 4.2.3	Kapelan Bio-Imaging
LivingImage V4.7.3	PerkinElmer
NIS-Elements Advanced Research (AR) V5.30.6	Nikon Instruments
R Version 4.3.0	R Core Team
RStudio 2023.03.0+386	Posit PBC
SnapGene 5.3.2	GSL Biotech LLC

3. Materialien und Methoden

3.1.10 Mauslinien

Tabelle 15: Verwendete Mauslinien mit Lieferanten und Literaturangaben

Name	Offizieller Name	Lieferant	Literatur
B6N Wildtype	C57BL/6NRj	Janvier Labs	
Clec4g-iCre	C57BL/6N-Tg(Clec4gicre)1.1 ^{Sgoe}	Unser Labor	[90, 94, 178]
GATA4 flox	B6.129 Gata4 ^{tm1.1Sad/J}	The Jackson Laboratory (JAX: 008194)	[202]
<i>Gata4</i> ^{LSEC-KO/BL}	B6N-Tg(clec4g-icre)tm1.1 ^{Sgoe} x B6.129-Gata4 ^{tm1Sad}	Unser Labor	[94]

3. Materialien und Methoden

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimente

Tierhaltung und Zucht

Die verwendeten Mäuse wurden unter spezifischen pathogen freien Bedingungen in einzeln belüfteten Kunststoffkäfigen mit Holzeinstreu sowie Beschäftigungsmaterial gehalten und hatten *ad libitum* Zugang zu Haltungsfutter und Wasser. Im Haltungsraum war ein vollautomatischer 12/12 h Tag-Nacht-Rhythmus eingestellt bei 21 °C Raumtemperatur und 50 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Zur Erzeugung von lebersinusendothelzellspezifischen *Gata4*-Knockout Mäusen (*Gata4*^{LSEC-KO/BL}) wurde die GATA4 flox Linie (B6.129 *Gata4*^{tm1.1^{Sad}/J}) mit *Clec4g-iCre* (C57BL/6N-Tg(*Clec4gicre*)1.1^{Sgoe}) verpaart. Im ersten Schritt wurden *Gata4*^{fl/fl} Mütter mit *Clec4g-iCre*^{tg/wt} Vätern verpaart, um Versuchsterväter mit dem Genotyp *Clec4g-iCre*^{tg/wt} x *Gata4*^{fl/wt} zu halten. Diese wurden dann erneut mit *Gata4*^{fl/fl} Müttern verpaart, um Versuchstiere mit dem Genotyp *Clec4g-iCre*^{tg/wt} x *Gata4*^{fl/fl} (B6N-Tg(*clec4g-icre*)*tm1.1^{Sgoe}* x B6.129-*Gata4*^{tm1^{Sad}}) zu erhalten. Cre-negative Geschwister (*Clec4g-iCre*^{wt/wt} x *Gata4*^{fl/fl}) wurden dabei als Kontrollen verwendet. Im Alter von zwei Wochen wurden die Tiere im Versuch verwendet. Diese Linie wurde im Rahmen einer Dissertation von Frau Tinja Baljkas (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg) einer gründlichen Analyse unterzogen, um die biologische Identität mit *Gata4*^{LSEC-KO}-Mäusen zu bestätigen.

Alle verwendeten Wildtypmäuse vom Typ C57BL/6NRj wurden mit einem Alter von neun Wochen bei Janvier Labs käuflich erworben und nach einer Woche im Tierstall zur Akklimatisierung im Alter von zehn Wochen in den Versuch genommen.

Alle durchgeführten Experimente wurden durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Karlsruhe genehmigt.

Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH)-Modell

Um bei den Versuchstieren eine Steatose oder eine NASH-assoziierte Leberfibrose hervorzurufen, wurde eine Diät-induzierte Methode verwendet. C57BL/6NRj Wildtypmäuse bekamen jeweils im Alter von zehn Wochen für einen Tag, eine, zwei, vier oder zehn Wochen eine CDAA-Diät, wobei die Zeitpunkte bis vier Wochen einer frühen Steatose und ab zehn Wochen einer NASH-assoziierten Leberfibrose entsprechen. Das Futter wurde gemäß Herstellerempfehlung alle sieben Tage gewechselt. Nach den Fütterungsperioden wurden die Tiere entweder zur Charakterisierung der Organveränderungen euthanasiert oder es fand eine Tumorzell-

3. Materialien und Methoden

Injektion statt (vgl. B16F10Luc2- und Mc38-Metastasierungsmodell, Wt31-Metastasierungsmodell oder B16F10Luc2- und Mc38Luc-Tumorzellretentions-Assay). Als weitere Diät wurde eine Fett-Diät (HFD) verwendet, welche zu 35 % aus Fett besteht. Diese Diät wurde wie die CDAA-Diät angewendet und die Versuchsgruppen wurden für einen Tag, sowie ein, zwei oder vier Wochen gefüttert.

B16F10Luc2- und Mc38-Metastasierungsmodell

Operation: Um B16F10Luc2- und Mc38-Metastasen in der Leber zu erzeugen, wurden die Mäuse mittels Carprofen analgesiert und durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran narkotisiert. An der lateral linken Flanke wurde das Fell auf einer Fläche von ca. 5 cm² mittels Trockenrasur entfernt, auf einer Wärmeplatte bei 37 °C fixiert und die Augen mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Haut wurde auf der lateral linken Seite desinfiziert und durch einen horizontalen Schnitt, das Peritoneum durch einen vertikalen Schnitt eröffnet. Nach Herauspräparation der Milz und Positionierung auf einer sterilen Kompresse, wurden $1,5 \times 10^5$ B16F10Luc2- oder Mc38-Zellen in 60 µl 1 X DPBS +/- suspendiert mit einer 1 ml Spritze und einer 30 G Injektionsnadel in die Milz injiziert. Zwei Minuten nach der Injektion wurde die Nadel aus der Milz gezogen und nach insgesamt 15 Minuten begann die Ligatur der Milzgefäße um diese vollständig zu entfernen. Um Blutungen und Infektionen zu vermeiden, wurden die Milzgefäße mit sterilem chirurgischem Nahtmaterial ligiert. Am Peritoneum erfolgte zum Verschluss eine fortlaufende Naht und an der Haut eine retrograde Naht nach Donati und McMillen. Nach Reinigung der Wunde mit Octenisept bekamen die Mäusen 250 µl 37 °C warme isotone Kochsalzlösung als Flüssigkeitsbolus subkutan in den Nacken injiziert. Postoperative Kontrollen, Haltung und Versorgung erfolgten gemäß dem genehmigten Antrag.

Organentnahme: Um die Tumorlast 14 Tage postoperativ für B16F10Luc2 zu bestimmen, wurde den Mäusen 150 µl D-Luciferin 30 mg/ml intraperitoneal mit einer 1 ml Spritze und einer 26 G Nadel injiziert. Nach 10 Minuten wurde die Maus narkotisiert und mittels IVIS Lumina III die Biolumineszenz im gesamten Körper mit folgenden Parametern gemessen: Belichtungszeit 45 Sekunden, Binning 4, Bildfeld 12,5, Blende 1, offener Filter. Anschließend wurden Leber und Lunge entnommen und die Ober- und Unterseite von Leber und Lunge mit denselben Parametern gemessen. Bei der Mc38-Zelllinie entfiel dieser Schritt, die Metastasenlast wurde nach 21 Tagen bestimmt. Im Anschluss wurde die Ober- und Unterseite beider Organe neben einem Maßstab fotografiert. Zur Quantifizierung der Metastasen wurden die einzelnen Leberlappen getrennt und alle sichtbaren Metastasen auf der Ober- und Unterseite gezählt, ebenso bei der Lunge. Nach den Messungen wurden die Organe gemäß Blut- und Organentnahme behandelt, jedoch ohne Blutentnahme.

3. Materialien und Methoden

B16F10Luc2- und Mc38Luc-Tumorzellretentions-Assay

Zur Bestimmung der primären Tumorzellretention nach 90 Minuten in der Leber, wurden 3×10^5 B16F10Luc2- oder Mc38Luc- Zellen in die Milz injiziert. Zwei Minuten nach der Injektion wurde die Nadel aus der Milz gezogen. Die Milz verblieb in der Maus und alle weiteren Schritte erfolgten gemäß B16F10Luc2- und Mc38-Metastasierungsmodell. 80 Minuten nach Injektion der Tumorzellen wurde der Maus intraperitoneal 150 μ l D-Luciferin 30 mg/ml injiziert und für weitere zehn Minuten inkubiert. Nach 90 Minuten nach der Tumorzellinjektion wurde die Maus anästhesiert und die Biolumineszenz der ganzen Maus im IVIS Lumina III gemessen. Anschließend wurde das Biolumineszenzsignal in Leber und Lunge, jeweils auf der Ober- und Unterseite nach den bekannten Parametern gemessen. Nach den Messungen wurden die Organe gemäß Blut- und Organentnahme prozessiert, jedoch ohne Blutentnahme.

Wt31-Metastasierungsmodell

Für die Metastasierungsexperimente mit Wt31 wurden die Mäuse vor der Injektion für 15 Minuten im Inkubator bei 37 °C erwärmt, um eine periphere Gefäßdilatation zu erreichen. Anschließend wurde die Maus mit Isofluran inhalativ anästhesiert und $1,25 \times 10^6$ Zellen, suspendiert in 100 μ l 1 X DPBS +/+, mit einer 1 ml Spritze und einer 30 G Injektionsnadel in die Schwanzvene injiziert. Alle zehn Sekunden wurden ca. 10 μ l Zellsuspension injiziert. Kontrollen, Haltung und Versorgung nach der Injektion erfolgten gemäß dem genehmigten Antrag. Diese Versuche erfolgten durch freundliche Unterstützung von Bianca Dietsch. Nach 19 Tagen Tumorstadium erfolgte die Organentnahme und Verarbeitung wie unter B16F10Luc2- und Mc38-Metastasierungsmodell beschrieben, jedoch ohne BLI-Messung.

Metastasen-Quantifizierung

Die Anzahl der Metastasen auf der Oberfläche von Leber und Lunge wurde für alle verwendeten Zelllinien visuell und manuell bestimmt. Die Zählung der Lebermetastasen erfolgte an den einzelnen Lappen, während die Lungen als Ganzes belassen wurden. Ein Bild der Ober- und Unterseite jeder Leber und Lunge wurde zur Berechnung der metastatischen Fläche verwendet. Die metastatische Fläche wurde mittels Threshold in ImageJ bestimmt und durch die Gesamtfläche des Organs geteilt, die ebenfalls mittels Threshold in ImageJ bestimmt wurde. Das Ergebnis wurde als Prozentsatz der metastatischen Fläche im Verhältnis zur gesamten Leber- oder Lungenfläche berechnet.

3. Materialien und Methoden

Isolation von murinen Lebersinusendothelzellen (mLSEC)

Um das Transkriptom zu sequenzieren, erfolgte die Isolation der LSEC nach eintägiger und einwöchiger CDAA-Diät aus Mauslebern. zehnte Wochen alte weibliche Mäuse bekamen einen Tag oder eine Woche eine CDAA-Diät gefüttert und zur Isolation jeweils drei Lebern zu einer Probe gepoolt. Die Lebern wurden mit einer 30 G Nadel und mit Ca^{2+} -depriviertem Medium mit 0,05 % Kollagenase über die Portalvene perfundiert (Pumpgeschwindigkeit 2 ml/min). Nach Entfernung der Gallenblase wurde die Leber in einer Petrischale mit einer Schere grob zerschnitten und mittels kaltem GBSS in ein 50 ml Falcon überführt. Dort wurden alle Proben auf Eis gelagert, bis der Verdau bei allen gleichzeitig gestartet wurde. Zum Verdau der Lebern wurden 100 μl Kollagenase und 30 $\mu\text{l/ml}$ DNase I zu den Proben gegeben und für 25 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation wurde die Zellsuspension alle 5 Minuten auf und ab pipettiert und nach 10 Minuten Inkubation erneut 50 μl Kollagenase zugegeben. Nach Filtration der Zellsuspension durch ein 250 μm -Sieb, wurden die Zellen mit GBSS bei 300 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen durch ein 100 μm -Sieb gesiebt. Nach erneutem Waschen der Zellen mit GBSS bei 300 x g für 10 min bei 4 °C wurde das Pellet in 1 ml GBSS resuspendiert. Zur Abtrennung der nichtparenchymalen Zellen wurde ein 19,3 %iger Nycodenz-Gradient verwendet, d. h. die Zellen wurden bei 1400 x g für 25 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Zentrifuge lief ohne Bremse aus. Nach der Zentrifugation wurde die oberste Zellschicht gesammelt und in 4 ml vorgekühltem MACS-Puffer resuspendiert. mLSEC wurden durch magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) unter Verwendung von CD146^+ (LSEC)-Mikrobeads von Miltenyi Biotec für die Positivselektion gemäß den Herstelleranweisungen isoliert. Die isolierten mLSEC wurden bei 300 x g für 10 Minuten bei 4 °C pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Zur Überprüfung der Reinheit der mLSEC nach der Isolierung wurden die Zellen freundlicherweise von Dr. Sina Kürschner durchflusszytometrisch analysiert.

Blut- und Organentnahme

Blutentnahme: Die verwendeten Mäuse wurden während des Tageszyklus durch Inhalationsanästhesie mit Isofluran betäubt und es wurde retrobulbär mittels einer Glaskapillare Blut entnommen. Ca. 500 μl Vollblut wurden in einer Lithium-Heparin Monovette LH500 gesammelt, die Röhrchen geschwenkt und anschließend bei 2000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde in roten 1,5 ml Eppis gesammelt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Analyse erfolgte im Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät Mannheim. Als Analysegerät wurde ein Cobas c311 der Firma Roche verwendet. Folgende Blutparameter wurden dabei bestimmt: Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase

3. Materialien und Methoden

(AST), Cholesterin, Cholinesterase, Triglyceride. Das restliche Plasma wurde bei -20 °C eingelagert.

Organentnahme: Nach der Blutentnahme wurden die noch betäubten Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet und Leber und Lunge herausgenommen. Diese wurden dann kurz in kaltem PBS gewaschen, gewogen, fotografiert und anschließend wie folgt fixiert:

Kryo-Fixierung: Für die molekularbiologische, biochemische und histologische Analyse wurden die Organe in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Ultrafreezer bei -80 °C gelagert.

Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe: Die Organe wurden in Stücke geschnitten, in entsprechend beschriftete Einbettkassetten gegeben und für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur in 4 %igem pH 7 gepuffertem PFA fixiert. Anschließend wurden die Gewebe nach Standardprotokollen entwässert und in Paraffin eingebettet.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

DNA-Extraktion

Zur Bestimmung des Genotyps der gezüchteten Mauslinien wurde eine PCR-Genotypisierung mit anschließender Gelelektrophorese an den bei der Markierung gewonnenen Gewebeproben (Ohrmarken) durchgeführt. Die Proben wurden mit dem KAPA Maus Genotypisierungskit gemäß den Herstellerangaben verdaut. Das Gewebe wurde bei 75 °C in 1 X KAPA Express Extract Buffer und $1\text{ U}/\mu\text{l}$ KAPA Express Extract Enzyme für zehn Minuten bei 300 rpm^{-1} auf dem Thermoshaker lysiert, um die DNA zu extrahieren. Zur Denaturierung wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C bei 300 rpm^{-1} auf dem Thermoshaker inkubiert. Die extrahierte DNA wurde 10-fach in 10 mM Tris-HCl pH 8 verdünnt und für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde $1\text{ }\mu\text{l}$ DNA verwendet.

3. Materialien und Methoden

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die bei der DNA-Extraktion gewonnene DNA wurde mittels PCR und genspezifischen Primern amplifiziert und anschließend durch eine Gelelektrophorese visualisiert. Für die PCR wurde das KAPA2G Kit Fast mit folgender Zusammensetzung verwendet:

KAPA2G Polymerase

	<i>Bestandteile pro 10 µl</i>
PCR-Wasser	3 µl
2 X KAPA2G Mix	5 µl
10 µM Vorwärts Primer	0,5 µl
10 µM Rückwärts Primer	0,5 µl
DNA-Template	1 µl

Die folgenden Parameter wurden für den PCR-Thermocycler verwendet:

95 °C	3 min	
95 °C	15 sec	35 x
60 °C	15 sec	
72 °C	15 sec	
72 °C	1 min	
10 °C	∞	

Nach der PCR wurden die DNA-Proben mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt.

Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung der DNA-Fragmente wurden 10 µl der PCR-Proben in einem 2 % Agarosegel mit 0,01 % Nancy-520 bei 100 V für ca. 35 Minuten zusammen mit dem GeneRuler DNA-Leiter-Mix aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden im Intas GelSticker IMA-GER unter UV-Licht bei 200 ms Belichtungszeit visualisiert.

RNA-Isolation

Zur Extraktion der RNA aus den isolierten LSEC wurde der innuPREP RNA Mini Kit 2.0 gemäß Herstellerangaben verwendet. Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration am NanoPhotometer NP80 bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3. Materialien und Methoden

RNA-Sequenzierung

Nach der Isolierung von mLSEC aus Mäusen (vgl. Isolation von murinen Lebersinusendothelzellen (mLSEC)), wurde die RNA wie beschrieben isoliert (RNA-Isolation). Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoPhotometer NP80 bestimmt und anschließend zur Qualitätsanalyse der RIN-Wert am 2100 Bioanalyzer in der Affymetrix Core Facility der UMM bestimmt. 16 μ l mit einer RNA-Konzentration von 100 ng/ μ l wurden an BGI (Shenzhen, China) eingeschickt und für die RNA-Sequenzierung nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Verarbeitung der Sequenzierungs-Daten

Die Verarbeitung der RNA-seq-Daten erfolgte mit R (Version 4.3.0) und Bioconductor (Version 3.9) in RStudio 2023.03.0+386. Die Qualitätskontrolle der sauberen Sequenzierungs-Reads wurde mit FastQC (Babraham Bioinformatics) durchgeführt. Reads geringer Qualität wurden mit trim_galore (Version 0.6.4) entfernt. Die resultierenden Reads wurden an das Mausgenom, Version GRM38.p6, angeglichen und mit kallisto, Version 0.46.1 (39), gezählt. Die Zählraten wurden mit der voom-Funktion aus dem limma-Paket in log₂-Zählungen pro Million (logCPM) transformiert. Die differentielle Expressionsanalyse wurde mit dem limma-Paket in R durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde eine Falsch-Positiv-Rate von $\alpha = 0,05$ mit FDR-Korrektur angenommen. Vulkandiagramme wurden mit GraphPad Prism (Version 8.4.3) und Heatmaps mit dem ggplot2-Paket (Version 2.2.1) und dem complexHeatmap-Paket (Version 2.0.0) erstellt. Für die Anreicherungsanalyse verwendete ich die Pakete fgsea, enrichmentbrowser und Enrichr.

Die Pfadanalyse wurde mit dem fgsea-Paket und dem enrichmentbrowser-Paket in R unter Verwendung der Pfadinformationen aus der KEGG-Datenbank (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) durchgeführt.

Die statistische Analyse in R und die Erstellung von Diagrammen der RNA-Sequenzierungsdaten erfolgte freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Dr. Carsten Sticht aus der NGS Core Facility der Medizinischen Fakultät Mannheim sowie teilweise von Dr. Manuel Winkler und Dr. Christian David Schmid.

3. Materialien und Methoden

3.2.3 Histologische Methoden

Histologische Standardfärbungen

Hämatoxylin und Eosin- und Pikro-Sirius Rot-Färbung

Die histologischen Standardfärbungen wie Hämatoxylin und Eosin (H&E) sowie Pikro-Sirius Rot (PSR) wurden an Paraffinschnitten im Zentrum für Medizinische Forschung mit einem Färbautomat nach Standardprotokollen durchgeführt.

Tabelle 16: Stufen der Hämatoxylin & Eosin- und Pikro-Sirius Rot-Färbungen

Hämatoxylin und Eosin		Pikro-Sirius Rot	
100 % Xylol	3 x 2 Min	100 % Xylol	3 x 2 Min
100 % Ethanol	1 Min	99 % Ethanol	1 Min
96 % Ethanol	1 Min	96 % Ethanol	1 Min
80 % Ethanol	1 Min	80 % Ethanol	1 Min
70 % Ethanol	1 Min	70 % Ethanol	1 Min
Fließendes Leitungswasser	1 Min	Leitungswasser	1 Min
Hämatoxylin	4 Min	Destilliertes Wasser	30 Sek
Fließendes Leitungswasser	10 Min	Pikro-Sirius Rot	60 Min
Eosin	2 Min	0,5 % Essigsäure	30 Sek
Leitungswasser	30 Sek	80 % Ethanol	30 Sek
80 % Ethanol	30 Sek	96 % Ethanol	1 Min
96 % Ethanol	1 Min	99 % Ethanol	2 x 1 Min
100 % Ethanol	2 x 1 Min	100 % Xylol	2 x 1 Min
100 % Xylol	2 x 1 Min		

Alle Schnitte wurden nach der Färbung mit Eukitt Eindeckmedium und 24 x 60 mm Deckgläsern eingedeckt und über Nacht bei RT unter dem Abzug getrocknet.

3. Materialien und Methoden

Oil-Red O Färbung

Zur Färbung der neutralen Lipide wurde eine Oil-Red O (ORO) Färbung mit frischen Kryoschnitten (8 µm) durchgeführt. Am Tag vor der Färbung wurde eine Stammlösung mit 750 mg Oil-Red O in 150 ml 99 %igem Isopropanol hergestellt. Nachdem das Ölrot eine Stunde lang im Dunkeln unter Rühren gemischt worden war, wurden 100 ml deionisiertes Wasser hinzugefügt und eine weitere Stunde lang gemischt, um die Gebrauchslösung zu erhalten. Die Lagerung erfolgte über Nacht an einem dunklen Platz bei Raumtemperatur. Die Gebrauchslösung wurde am nächsten Tag filtriert und frisch verwendet. Die Kryoschnitte wurden fünf Minuten in deionisiertem Wasser gespült und anschließend für fünf Minuten in 60 %igem (v/v) Isopropanol inkubiert. Danach wurden die Schnitte für zehn Minuten in der Gebrauchslösung inkubiert und im nächsten Schritt für zehn Sekunden in 60 % (v/v) Isopropanol differenziert. Zurückbleibendes Ölrot wurde eine Minute lang in deionisiertem Wasser abgewaschen. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit der Hämalaunlösung nach Mayer, die im Verhältnis 1:1 mit deionisiertem Wasser gemischt wurde, für die Dauer von sieben Minuten. Die Schnitte wurden dann in Leitungswasser gewaschen und weiter 15 Minuten gewässert. Das Eindecken erfolgte mit wässrigem Eindeckmedium und das Trocknen bei Raumtemperatur über Nacht.

Immunofluoreszenz-Färbungen von Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

Das in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe wurde auf dem Mikrotom in 3 µm dicke Schnitte geschnitten und im Wasserbad bei 42 °C auf einen Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte getrocknet und in einer Objektträgerbox aufbewahrt. Vor der Färbung wurden die Schnitte für mindestens 60 Minuten bei 60 °C gebacken, damit das Gewebe auf dem Objektträger gut haftet. Die Entparaffinierung und Hydrophilierung der Gewebe erfolgte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe. Dazu wurden die Objektträger 3 x 3 Minuten in 100 % Xylol gespült, gefolgt von 2 x je fünf Minuten in 100 % Ethanol, 90 %, 80 % und 70 % Ethanol (jeweils v/v). Nach der Alkoholreihe wurden die Objektträger kurz in destilliertem Wasser gewaschen und dann für mindestens fünf Minuten in 1 X PBS gelagert. Für die anschließende Antigendemaskierung wurden die Objektträger in 1 X HIER Citrat Puffer, vorgewärmt auf 95 °C, pH 6, für 30 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach 30 Minuten kühlten die Schnitte in HIER Zitrat Puffer für weitere 20 Minuten ab, bevor mit einem DAKO Pen eine hydrophobe Barriere um die jeweiligen Proben auf dem Objektträger aufgetragen wurde. Übriger Puffer wurde mit 1 X PBS für drei Minuten abgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit den in Dako Antibody Diluent verdünnten primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten in 1 X PBS gewaschen. Die in Dako Antibody Diluent verdünnten und mit einem

3. Materialien und Methoden

Fluoreszenzfarbstoff markierten sekundären Antikörper wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut dreimal für fünf Minuten in 1 X PBS gewaschen und anschließend in dH₂O geschwenkt. Als geeignetes Eindeckmedium wurde Dako Fluoreszenz Eindeckmedium mit 24 x 60 mm Deckgläsern verwendet und die Schnitte über Nacht bei RT getrocknet. Die Bilder der Färbungen wurden binnen einer Woche mit dem Nikon Eclipse NI-Mikroskop und der NIS-Elements Advanced Research (AR) Version 5.30.6 aufgenommen. Das Mikroskop ist mit einer Lumencor Sola Lichtmaschine und Nikon CFI Plan Achromat Lambda Serie Objektiven von 4-fach bis 60-fach ausgestattet. Für die Mikroskopie wurden DAPI, SpGreen, SpOrange, Cy5 und Cy7 Filter verwendet. Die Bilder wurden mit der Software Fiji ImageJ 1.54f bearbeitet und ausgewertet.

Immunofluoreszenz-Färbungen von kryofixiertem Gewebe

Die schockgefrorenen Gewebestücke wurden am Kryostat bei –23 °C Kammertemperatur und –15 °C Objektträgertemperatur in 8 µm dicke Schnitte geschnitten und mit einem Objektträger aufgenommen. Die Schnitte wurden für eine Stunde bei RT getrocknet und anschließend mit einem Dako Pen eine hydrophobe Barriere um die Proben herum aufgetragen. Zur Konservierung wurden die Schnitte für zehn Minuten in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Schnitte für fünf Minuten in 1 X PBS gewaschen, bevor sie für 30 Minuten in 5 % NDS, verdünnt in 1 X PBS, blockiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte mit den in Dako Antibody Diluent verdünnten primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten in 1 X PBS gewaschen. Die in Dako Antibody Diluent verdünnten und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten sekundären Antikörper wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut dreimal für fünf Minuten in 1 X PBS gewaschen und anschließend in dH₂O geschwenkt. Als geeignetes Eindeckmedium wurde Dako Fluoreszenz Eindeckmedium mit 24 x 60 mm Deckgläsern verwendet und die Schnitte über Nacht bei RT getrocknet. Die Bilder der Färbungen wurden binnen einer Woche mit dem Nikon Eclipse NI-Mikroskop und der NIS-Elements Advanced Research (AR) Version 5.30.6 aufgenommen. Das Mikroskop ist mit einer Lumencor Sola Lichtmaschine und Nikon CFI Plan Achromat Lambda Serie Objektiven von 4-fach bis 60-fach ausgestattet. Für die Mikroskopie wurden DAPI, SpGreen, SpOrange, Cy5 und Cy7 Filter verwendet. Die Bilder wurden mit der Software Fiji ImageJ 1.54f bearbeitet und ausgewertet.

3. Materialien und Methoden

RNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die RNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurde an FFPE-Gewebeschnitten (3 µm) gemäß den Herstellerprotokollen durchgeführt. Das RNAscope 2.5 HD Duplex-Kit (322430, Advanced Cell Diagnostics) wurde mit mausspezifischen Sonden gegen das Maus-*Ppib* (Cyclophilin B)-Gen als Positivkontrolle, Maus-*Cdh5*-Kanal 2 (312531-C2 - NM_009868.4), Maus-*Gpnmb*-Kanal 1 (489511 - NM_053110.4) und Maus-*Sele*-Kanal 1 (438621 - NM_011345.2) verwendet.

Bildbearbeitung und Quantifizierungen

Pro Schnitt und Tier wurden mindestens drei Bilder aufgenommen, welche technische Replikate darstellten. Von diesen Bildern wurde jeweils der Mittelwert berechnet und biologische Replikate verwendet. Bei allen IF-Bildern wurde der Hintergrund mit Hilfe des Rolling-Ball-Subtraktionswerkzeugs der NIS Elements Advanced Research (AR) Software reduziert. Anschließend wurden die Bilder mit derselben Software fokussiert. Die Quantifizierung der Bilder erfolgte mit der Software Fiji ImageJ Version 1.54f. Für die Quantifizierung wurde ein geeigneter vorprogrammierter Schwellenwert verwendet und der prozentuale Flächenanteil sowie die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen und anschließend mit GraphPad Prism statistisch ausgewertet.

Die Hellfeldaufnahmen von H&E, PSR und ORO wurden separat bearbeitet. Dazu wurde ebenfalls ImageJ verwendet. Zunächst wurden die RGB-Kanäle umsortiert. Anschließend wurde ein zusammengesetztes Bild erstellt und der Bildmodus auf RGB-Bild umgestellt. Für die Quantifizierung der PSR- und ORO-Aufnahmen wurde eine Farbdekonvolution durchgeführt und der rote Kanal für die Flächenquantifizierung mittels Schwellenwertbestimmung verwendet.

Hepatischer-Triglycerid-Assay

Zur Analyse der hepatischen Triglycerid-Konzentration in der Leber von Mäusen wurde das Triglycerid-Quantifizierungs-Kit (kolorimetrisch/fluorometrisch) gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Etwa 100 mg gefrorenes Lebergewebe wurden in 1 ml 5 %igem NP-40 durch Erhitzen auf 95 °C für fünf Minuten in einem Thermomixer homogenisiert, dann auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde der Überstand nach 2-minütiger Zentrifugation bei höchster Drehzahl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und vor dem Test 10-fach in PBS verdünnt. Zur Bestimmung des Gehalts an Triglycerid wurde von jeder Probe ein Volumen von 10 µl verwendet. Die Absorption wurde bei 570 nm mit dem

3. Materialien und Methoden

Tecan Infinite M200 Pro Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Die Triglyzerid-Konzentration wurde anhand einer Standardkurve berechnet.

3.2.4 Zellkultur

Kultivierung von B16F10*Luc2*-Zellen

Ein Kryovial mit 2×10^6 B16F10*Luc2*-Zellen wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Rest Eis im Vial sichtbar war. Anschließend wurden die Zellen aus dem Vial in 9 ml vorgewärmtes RPMI-Medium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) in ein 50 ml Falcon überführt und anschließend mit 10 ml DPBS –/– auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert, das Medium-PBS-Gemisch abgesaugt und das Pellet in 1 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. In einer beschrifteten T75 Flasche wurde 9 ml vorgewärmtes Medium vorgelegt und anschließend die 1 ml Zellsuspension in die T75 Flasche überführt und die Flasche vorsichtig geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Kultivierung von Wt31-Zellen

Ein Kryovial mit 4×10^6 Wt31-Zellen wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Rest Eis im Vial sichtbar war. Anschließend wurden die Zellen aus dem Vial in 9 ml vorgewärmtes RPMI-Medium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) in ein 50 ml Falcon überführt und mit 10 ml DPBS –/– auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert, das Medium-PBS-Gemisch abgesaugt und das Pellet in 1 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. In einer beschrifteten T175 Flasche wurde 19 ml vorgewärmtes Medium vorgelegt und anschließend die 1 ml Zellsuspension in die T175 Flasche überführt und die Flasche vorsichtig geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Kultivierung von Mc38- und Mc38*Luc*-Zellen

Ein Kryovial mit 2×10^6 Mc38*Luc*- bzw. Mc38-Zellen wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Rest Eis im Vial sichtbar war. Anschließend wurden die Zellen aus dem Vial in 9 ml vorgewärmtes RPMI-Medium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) in ein 50 ml Falcon überführt und mit 10 ml DPBS –/– auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert, das Medium-PBS-Gemisch abgesaugt und das Pellet in 1 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. In einer beschrifteten

3. Materialien und Methoden

T75 Flasche wurde 9 ml vorgewärmtes Medium vorgelegt und anschließend die 1 ml Zellsuspension in die T75 Flasche überführt und die Flasche vorsichtig geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Zellvorbereitung für Tumorexperimente

Die Zelllinien B16F10*Luc2* und Mc38 bzw. Mc38*Luc* wurde für die Tumorexperimente nach dem folgenden Schema behandelt:

1. Tag: Die Zellen wurden wie unter B16F10*Luc2* beschrieben in einer T75 Flasche aufgetaut.
2. Tag: Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilem DPBS –/– gewaschen. Nach dem Absaugen wurde 10 ml frisches und vorgewärmtes Medium auf die Zellen hinzugegeben.
3. Tag: Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS –/– gewaschen. Nach dem Absaugen wurden 4 ml vorgewärmtes 1 X Trypsin-EDTA in die Flasche gegeben und die Zellen fünf Minuten bei 37 °C abgelöst. Der Verdau der Zellen wurde unter dem Inversmikroskop kontrolliert und die Verdauung mit 6 ml vorgewärmtem Medium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt, die Flasche mit 10 ml DPBS –/– gespült und ebenfalls in das Falcon überführt. Die Zellen wurden bei 300 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, das Medium-PBS-Gemisch abgesaugt und das Pellet in 20 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. 20 µl Zellsuspension wurde zusammen mit 20 µl Trypan-Blau gemischt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden 4 – 8 T175 Flaschen mit je 4 e⁶ Zellen Mc38 bzw. 2,5 e⁶ Zellen B16F10*Luc2* in ein Gesamtvolumen von 20 ml ausgesät. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{4} * 2 * 10.000 * \text{resuspendiertes Volumen} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Im Anschluss wurde die Zellzahl pro Milliliter berechnet. Die benötigte Zellzahl wurde durch die Zellzahl pro Milliliter geteilt und das Volumen pro Flasche ausgesät.

4. Tag: Die Zellen wurden unter dem Mikroskop kontrolliert, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS –/– gewaschen. Nach dem Absaugen wurde 4 ml Cell Dissociation Buffer in die Flasche auf die Zellen gegeben und diese bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Der Ablösevorgang wurde mit 6 ml DPBS –/– gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend wurde die Flasche mit 10 ml DPBS –/– gespült und in das Falcon überführt welches anschließend bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert wurde. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 20 ml DPBS

3. Materialien und Methoden

–/– resuspendiert und 20 µl der Zellen mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Während der Auszählung wurden die verbleibenden Zellen bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert und das entstandene Pellet in ein entsprechendes Volumen DPBS +/- aufgenommen, um auf eine Endkonzentration von 150.000 Zellen/60 µl für B16F10Luc2 und Mc38 bzw. Mc38Luc für Metastasierungsversuche und 300.000 Zellen/60 µl für B16F10Luc2 und Mc38Luc für Retentionsversuche zu erhalten. Die Zellkonzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Gesamtzellen [Mio]}}{0,15 \text{ bzw. } 0,3} * 60 \mu\text{l} = \text{Benötigtes Volumen in } \mu\text{l}$$

Die Zelllinie Wt31 wurde für die Tumorexperimente nach dem folgenden Schema behandelt:

1. Tag: Die Zellen wurden wie unter Kultivierung von Wt31-Zellen beschrieben aufgetaut.
2. Tag: Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS –/– gewaschen. Nach dem Absaugen wurde 10 ml frisches und vorgewärmtes Medium auf die Zellen hinzugegeben.
4. Tag: Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS –/– gewaschen. Nach dem Absaugen wurden 4 ml 1 X Trypsin-EDTA in die Flasche gegeben und die Zellen fünf Minuten bei 37 °C aufgeschlossen. Der Verdau der Zellen wurde unter dem Inversmikroskop kontrolliert und die Verdauung mit 6 ml vorgewärmtem Medium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt, die Flasche mit 10 ml DPBS –/– gespült und ebenfalls in das Falcon überführt. Die Zellen wurden bei 300 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, das Medium-PBS-Gemisch abgesaugt und das Pellet in 20 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. In fünf T175 Flaschen wurde 16 ml vorgewärmtes Medium vorgelegt und jeweils 4 ml Zellsuspension in die Flaschen gegeben.
7. Tag: Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS –/– gewaschen. Nach dem Absaugen wurden 4 ml 1 X Trypsin-EDTA in die Flasche gegeben und die Zellen fünf Minuten bei 37 °C aufgeschlossen. Der Verdau der Zellen wurde unter dem Inversmikroskop kontrolliert und die Verdauung mit 6 ml vorgewärmtem Medium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt, die Flasche mit 10 ml DPBS –/– gespült und ebenfalls in das Falcon überführt. Die Zellen wurden bei 300 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, das Medium-PBS-Gemisch abgesaugt und das Pellet in 20 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. 20 µl Zellsuspension wurde zusammen mit 20 µl Trypan-Blau gemischt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden mindestens acht T175 Flaschen mit je 4 e⁶ Wt31-Zellen in 20 ml vorgewärmtem Medium ausgesät. Die Berechnung der Zellen erfolgte wie bei B16F10Luc2 beschrieben.

3. Materialien und Methoden

8. Tag: Die Zellen wurden unter dem Mikroskop kontrolliert, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS –/– gewaschen. Nach dem Absaugen wurde 4 ml Cell Dissociation Buffer in die Flasche auf die Zellen gegeben und diese bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Der Ablösevorgang wurde mit 6 ml DPBS –/– gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend wurde die Flasche mit 10 ml DPBS –/– gespült und in das Falcon überführt welches anschließend bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert wurde. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 20 ml DPBS –/– resuspendiert und 20 µl der Zellen mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Während der Auszählung wurden die verbleibenden Zellen bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert und das entstandene Pellet in ein entsprechendes Volumen DPBS +/+ aufgenommen, um auf eine Endkonzentration von $1,25 \text{ e}^6 / 100 \text{ µl Wt31}$ zu kommen. Die Berechnung der Zellen erfolgte wie bei B16F10*Luc2* beschrieben.

Produktion von Adenoviren zur Transduktion von Mc38

Für die Herstellung von lentiviralen Partikeln wurden HEK293/T17-Produktionszellen verwendet. 1 e^6 mykoplasmenfreie HEK293/T17-Zellen wurden in DMEM-Medium, ergänzt mit 10 % FCS und 1 % P/S und 100 mM Natriumpyruvat (= DMEM-Komplettmedium), in einer T175 Flasche bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen auf etwa 80 % Konfluenz gezüchtet und mit dem lentiviralen ADR3-Vektor LV252 pLenti-EF1 luciferase-PGK-RFP-T2A-puro transfiziert, welcher das Luciferase- und rotes Fluoreszenzprotein-Gen enthält sowie ein Puromycin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Nach Erneuerung des HEK293/T17-Kulturmediums wurde der ADR3-Vektor LV252 (10 µg) mit den Verpackungsplasmiden der dritten Generation pMD2.G L1 (2,5 µg), pMDLg/pRRE L3 (5 µg), pRSV rev L2 (2,5 µg) und pCDNA3.1/p35 E 71 (1,5 µg) in DMEM-Medium (ohne Zusätze) und X-treme GENE 9 DNA-Transfektionsreagenz für 15 Minuten bei RT inkubiert und tropfenweise zu den HEK293T/17-Zellen gegeben. Am Morgen des folgenden Tages wurde das Kulturmedium durch DMEM-Medium ersetzt, das mit 100 mM Natriumbutyrat ergänzt wurde, um die Freisetzung der produzierten Viren zu stimulieren. Am Abend wurde das Kulturmedium durch ein Erntemedium (DMEM-Medium + 100 mM Natriumpyruvat) ersetzt. Nach 48 Stunden Transfektion wurde das Erntemedium gesammelt, durch einen 0,45 µm Filter filtriert, um zellfreies Medium zu erhalten, das die Lentiviren enthielt, und bei 4 °C gelagert. 60 und 72 Stunden nach der Transfektion wurde der Erntevorgang wiederholt. Schließlich wurde das gesammelte Erntemedium mit den lentiviralen Partikeln in Vivaspin 20-Röhrchen bei 4 °C und 3 000 x g konzentriert. Das Viruskonzentrat wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

3. Materialien und Methoden

Transduktion von Mc38-Zellen

Für die lentivirale Transduktion von Mc38-Zellen mit einem Luciferase-Gen wurden 1×10^5 Mc38-Zellen in eine 10 cm Petrischale ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wurde frisches vorgewärmtes Medium hinzugegeben und ein Vial des einkonzentrierten Lentivirus dazugegeben (vgl. Produktion von Adenoviren zur Transduktion von Mc38). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Medium entfernt, die Zellen gewaschen und frisches vorgewärmtes Medium mit 7 µg/ml Puromycin als Selektionsmarker zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium zusammen mit den abgestorbenen Zellen abgesaugt und die Zellen vorsichtig gewaschen und frisches, Puromycin-haltiges Medium hinzugegeben. Die transduzierten Zellen konnten nach weiteren 48 h mittels 1 X T/E in eine T75 Flasche überführt werden. Nach der Expansion der Zelllinie wurde diese als *Mc38Luc* bezeichnet und mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen in 1 ml FKS mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde mit der Software GraphPad Prism (Version 8.4.3) überprüft. Der Shapiro-Wilk-Test wurde zur Beurteilung der Normalverteilung und der F-Test zur Beurteilung der Varianzgleichheit bei gleicher Varianz der Daten verwendet. Unter der Annahme einer Gauß'schen Verteilung wurde der ungepaarte zweiseitige Student's t-Test oder der Welch's t-Test für die statistische Analyse von zwei Gruppen verwendet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für den statistischen Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit einer unabhängigen Variablen wurde die einseitige ANOVA (Bonferroni-Post-hoc-Test), für den statistischen Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit zwei unabhängigen Variablen die zweiseitige ANOVA (Tukey-Post-hoc-Test) verwendet. Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Sternchen geben das Signifikanzniveau an: * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Die Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip für die verschiedenen Fütterungsregimes ausgewählt und die Quantifizierungen der in vivo Experimente wurden mit mindestens fünf biologischen Replikaten durchgeführt.

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1 Metastasierung des Melanoms in der NASH-assoziierten Leberfibrose

Metastasierung von B16F10Luc2 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen

Um den Effekt einer pathologisch veränderten vaskulären Nische im Rahmen einer NASH-assoziierten Leberfibrose auf die Metastasierung des malignen Melanoms zu untersuchen, wurde das CDAA-Fütterungsmodell ausgewählt, da es die humane NASH im Tiermodell am besten nachahmt. Dazu wurden zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Wildtypmäuse in 2 Gruppen aufgeteilt, eine CDAA-Diätgruppe und eine Kontrollgruppe. Nach einer Fütterungsperiode von zehn Wochen mit CDAA oder Normalfutter wurden beiden Mausgruppen B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert. Nach der Injektion der Melanomzellen wurde die CDAA-Diät durch Normalfutter ersetzt. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl und Fläche der Metastasen in Lunge und Leber bestimmt (Abbildung 7).

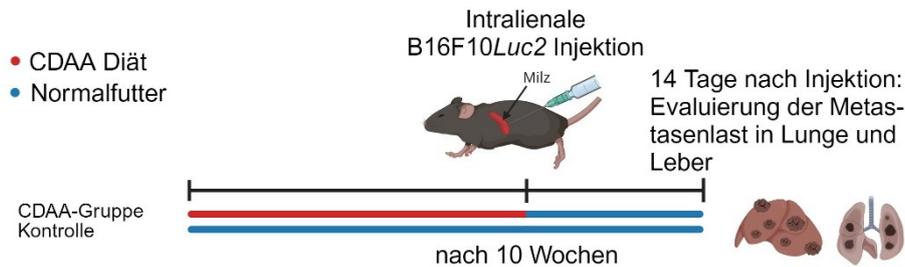


Abbildung 7: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von B16F10Luc2-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert und 14 Tage später die Metastasenbildung in Lunge und Leber analysiert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Makroskopische Aufnahmen der Leber zeigten eine größere Anzahl von Metastasen in der CDAA gefütterten Gruppe im Vergleich zur nebenstehenden normalen Futterkontrolle (Abbildung 8A). Gleichzeitig waren in den Lungen der Kontrollgruppe und der mit CDAA gefütterten Gruppe keine Metastasen sichtbar (Abbildung 8B).

4. Ergebnisse

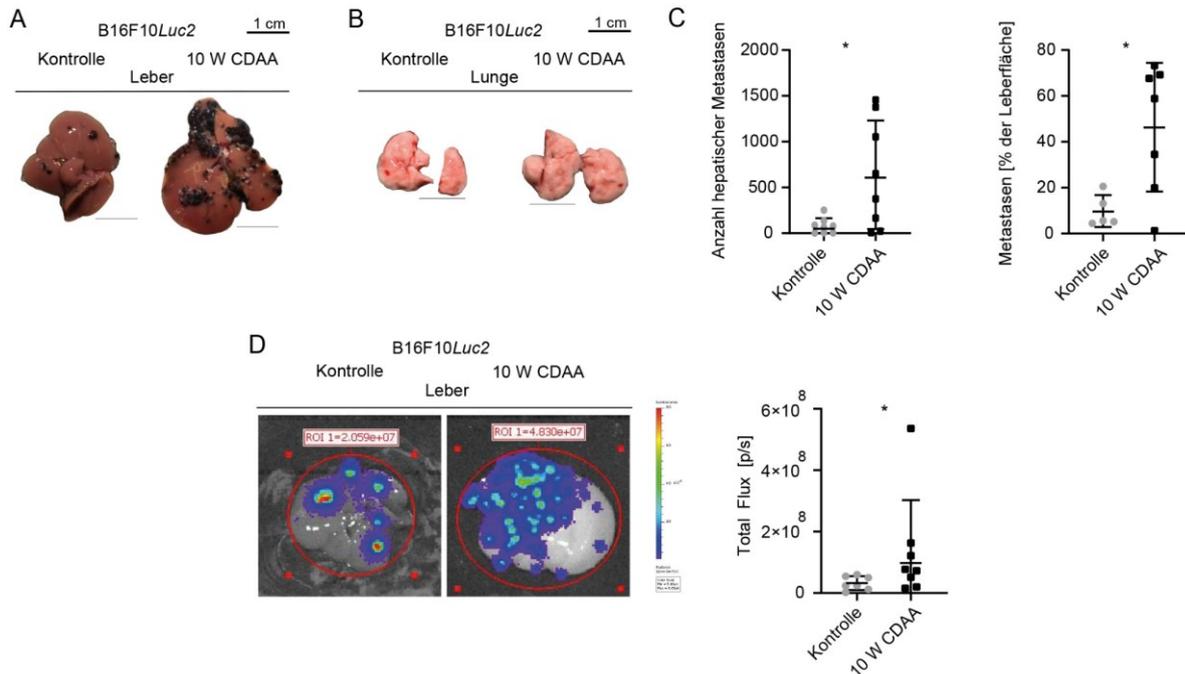


Abbildung 8: Makroskopische Bilder und Auswertung von Leber- und Lungenmetastasen und ex vivo BLI-Bilder mit B16F10Luc2 nach zehn Wochen CDAA-Diät. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (C) Gezählte Metastasen in der Leber (8 vs. 8, $p = 0,0448$), gemessene Metastasenfläche auf der Leber in Prozent. Gezeigt wird der Mittelwert aus dem Ergebnis der Ober- und Unterseite (5 vs. 7, $p = 0,0277$). (D) Repräsentative BLI von zehn Wochen mit CDAA bzw. Kontrollfutter gefütterten Tieren mit anschließender B16F10Luc2-Zellinjektion und zwei Wochen Metastasenwachstum. Skala: Min.: 5×10^4 (p/sec/cm²/sr); Max: 8×10^6 (p/sec/cm²/sr). Biolumineszenz-Signal als Total Flux (Photonen pro Sekunde). Gezeigt wird der Mittelwert des Signals der Ober- und Unterseite (7 vs. 8, $p = 0,0239$).

Sowohl die Anzahl als auch die Fläche der Metastasen im Verhältnis zur Leberoberfläche zeigten signifikant mehr B16F10Luc2-Metastasen in der CDAA-gefütterten Gruppe (Abbildung 8C). Ebenso wurde das Biolumineszenzsignal der Lebermetastasen ausgewertet und durch die „*Biolumineszenz Images*“ (BLI) quantifiziert, welches in der CDAA-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Intensität zeigte (Abbildung 8D). Die Auswertung der Gewichtsmessungen ergab, dass sich das Körpergewicht nach 14 Tagen zwischen den beiden Gruppen nicht unterschied, während das Lebergewicht und das Leber-Körper-Verhältnis in der CDAA-Gruppe signifikant höher waren. Das Lungengewicht zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 9A – D).

4. Ergebnisse

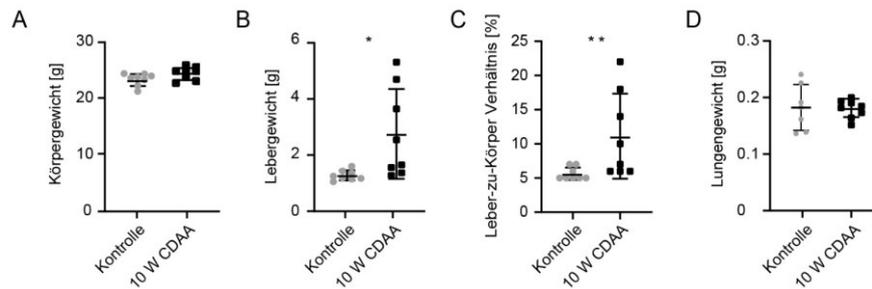


Abbildung 9: Gewichtungsmessungen nach 14 Tagen B16F10Luc2-Metastasenwachstum. (A) Körpergewicht (8 vs. 8, n. s.). (B) Lebergewicht (8 vs. 8, $p = 0,0155$). (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis (8 vs. 8, $p=0,0079$). (D) Lungengewicht (8 vs. 8, n. s.).

In einem weiteren Teil des Versuches wurde untersucht, ob eine Weiterfütterung mit CDAA nach der Injektion von Melanomzellen einen Effekt auf die Metastasierung hat. Dazu wurden zwei Gruppen über zehn Wochen mit CDAA gefüttert, wobei nach der Injektion eine Gruppe mit CDAA weitergefüttert wurde (CDAA+) und die andere Gruppe normales Futter erhielt (CDAA-). Als Kontrolle diente eine Gruppe, die durchgehend nur mit Normalfutter gefüttert wurde. 14 Tage nach der Melanom-Injektion wurde die Metastasierung in Leber und Lunge ausgewertet (Abbildung 10).

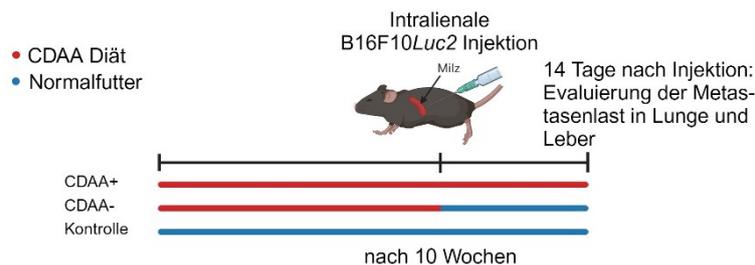


Abbildung 10: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von B16F10Luc2-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen mit und ohne Fortsetzung der CDAA-Fütterung nach Injektion von Melanomzellen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert, wobei eine Gruppe nach der Injektion weiterhin mit CDAA gefüttert wurde und eine andere Gruppe nach der Injektion auf Normalfutter umgestellt wurde. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich Normalfutter. 14 Tage später wurden die Metastasen in Lunge und Leber untersucht.

Zehn Wochen nach CDAA-Fütterung und Tumorzellinjektion sowie mit und ohne Weiterfütterung waren makroskopisch mehr Metastasen in den Lebern beider CDAA-Gruppen im Vergleich zur Normalfutterkontrolle sichtbar. Außerdem war eine deutlich hellere Leber in der CDAA+ Gruppe und eine normalisierte Leberfarbe in der CDAA- Gruppe und der Normalfutterkontrolle erkennbar (Abbildung 11A). Die Lungen zeigten in keiner der drei Gruppen Metastasen oder andere makroskopische Veränderungen (Abbildung 11B).

4. Ergebnisse

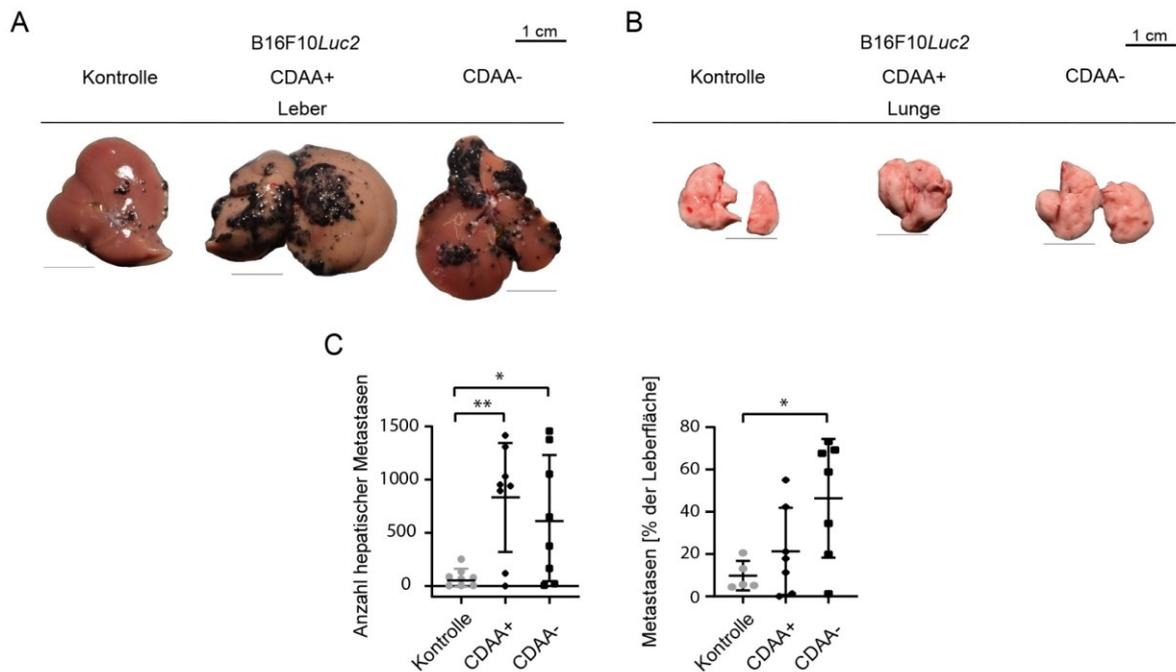


Abbildung 11: Makroskopische Bilder sowie Auswertung von Leber- und Lungenmetastasen mit B16F10Luc2-Metastasen nach zehn Wochen CDAA-Diät mit und ohne Weiterfütterung der CDAA-Diät. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontrollgruppe (links) und der CDAA-Gruppe mit Fortführung der CDAA-Fütterung (Mitte) und Fortführung der normalen Fütterung nach Tumorzellinjektion (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontrollgruppe (links) und der CDAA-Gruppe mit Fortführung der CDAA-Fütterung (Mitte) und Fortführung der normalen Fütterung nach Tumorzellinjektion (rechts). (C) Gezählte Zahl an Lebermetastasen (8 vs. 8 vs. 8, $p = 0,0091$) und quantifizierte Fläche der Metastasen auf der gesamten Leberfläche (8 vs. 8 vs. 8, $p = 0,0316$).

Auch die quantitative Anzahl der Metastasen war in diesen beiden Gruppen signifikant erhöht, während die normale Futterkontrolle eine geringere Anzahl an Metastasen aufwies. Die quantifizierte Metastasenfläche war in der CDAA- Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht, während die CDAA+ Fläche keinen signifikanten Unterschied zeigte (Abbildung 11C). Die Körpergewichte aller Gruppen zeigten keinen Unterschied, jedoch war das Lebergewicht in den gefütterten Gruppen im Vergleich zur Normalfutterkontrolle signifikant erhöht. Auch das Leber-zu-Körper-Verhältnis war in beiden gefütterten Gruppen im Vergleich zur Normalfütterung signifikant erhöht. Die Lungengewichte blieben in allen drei Gruppen unverändert (Abbildung 12A – D).

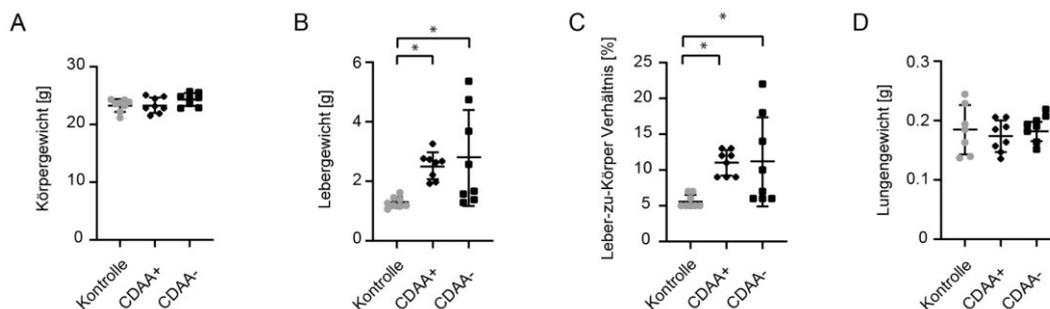


Abbildung 12: Gewichtsmessungen nach 14 Tagen B16F10Luc2-Metastasenwachstum mit und ohne Weiterfütterung der CDAA-Diät. (A) Körpergewicht (8 vs. 8 vs. 8, n. s.). (B) Lebergewicht (8 vs. 8 vs. 8, $p = 0,0131$) (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis (8 vs. 8 vs. 8, $p = 0,0117$). (D) Lungengewicht (7 vs. 8 vs. 8, n. s.).

4. Ergebnisse

Metastasierung von Wt31 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen

Ergänzend zur B16F10Luc2-Linie wurde die murine Wt31-Zelllinie mit ähnlichem Versuchsaufbau eingesetzt. Um Lebermetastasen zu erhalten, wurden die Wt31-Zellen in die Schwanzvene injiziert. Die Metastasen in Leber und Lunge wurden nach 19 Tagen Wachstum analysiert (Abbildung 13).

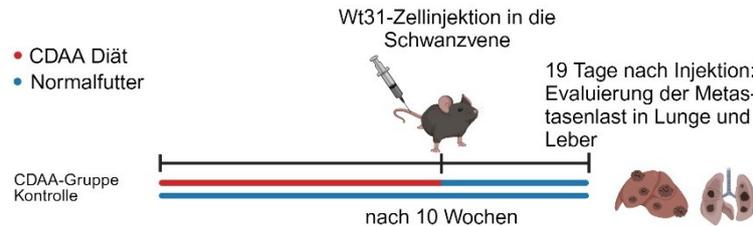


Abbildung 13: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von Wt31-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden Wt31-Zellen in die Schwanzvene injiziert und 19 Tage später die Metastasenbildung in Lunge und Leber analysiert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Auch hier waren makroskopisch mehr Metastasen in der Leber der CDAA-Gruppe im Vergleich zur Normalfutterkontrolle sichtbar (Abbildung 14A). Interessanterweise wurden in den Lungen der mit CDAA gefütterten Gruppe weniger Wt31-Metastasen gefunden (Abbildung 14B).

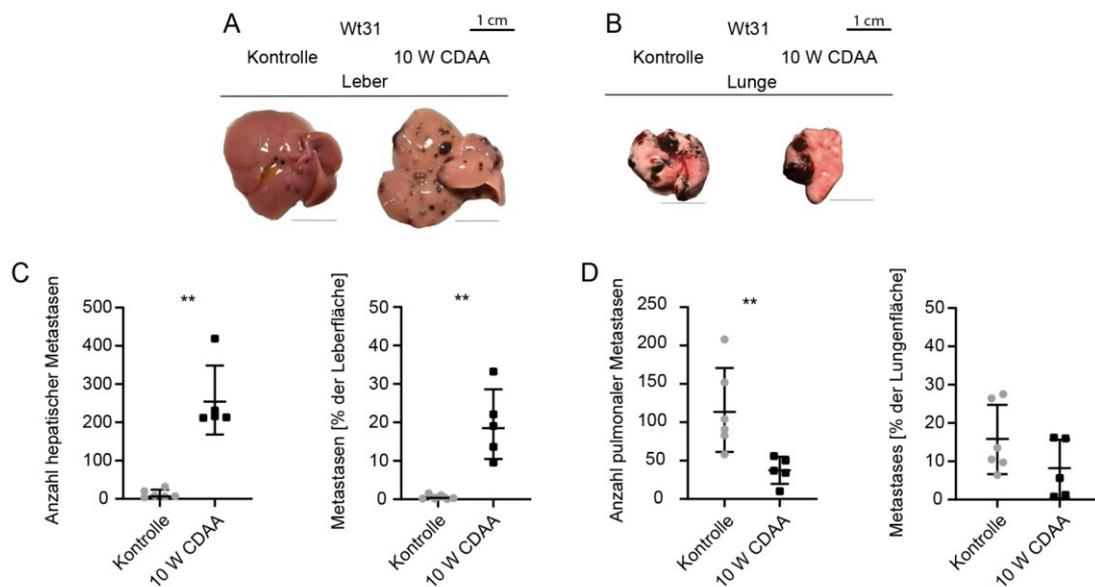


Abbildung 14: Makroskopische Bilder von Leber und Lunge und Auswertung der hepatischen und pulmonaler Metastasen nach 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (C) Anzahl hepatischer Metastasen (6 vs. 5, p = 0,0045) und prozentuale Fläche der Metastasen zur Leberfläche (6 vs. 5, p = 0,0027). (D) Anzahl pulmonaler Metastasen (6 vs. 5, p = 0,0059) und die prozentuale Fläche der Metastasen zur Lungenfläche (6 vs. 5, n. s.).

4. Ergebnisse

Diese makroskopische Beobachtung konnte auch nach Quantifizierung der Wt31-Melanommetastasen bestätigt werden. Es wurden signifikant mehr Metastasen in der mit CDAA gefütterten Gruppe gefunden, sowohl in der Anzahl als auch in der gemessenen Metastasenfläche (Abbildung 14C). Im Gegensatz dazu gab es signifikant mehr Metastasen in den Lungen der Normalfutterkontrollen, während die Metastasenfläche der Lungen in der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied zeigt (Abbildung 14D). Während Körper- und Lungengewicht unverändert blieben, waren Lebergewicht und Leber-zu-Körper-Verhältnis in der CDAA-Gruppe signifikant erhöht (Abbildung 15A – D).

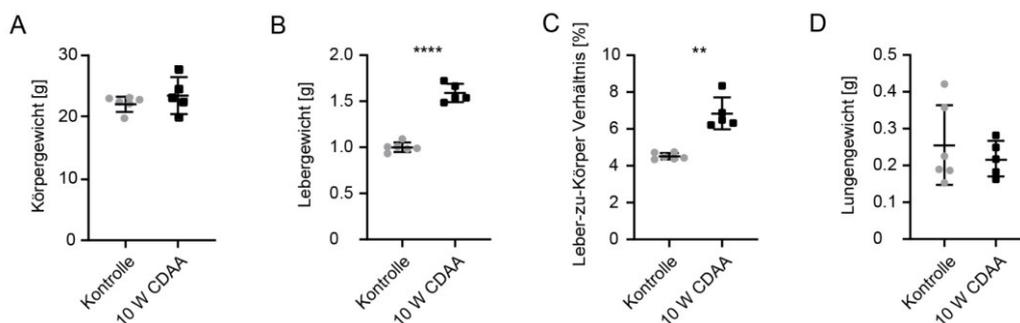


Abbildung 15: Gewichtsmessungen nach 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum. (A) Körpergewicht (6 vs. 5, n. s.). (B) Lebergewicht (6 vs. 5, $p < 0,0001$). (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis (6 vs. 5, $p = 0,0034$). (D) Lungengewicht (6 vs. 5, n. s.).

Auch bei der Wt31-Zelllinie wurde untersucht, wie sich die weitere Fütterung nach der Injektion der Tumorzellen auf die Metastasierung in die Leber auswirkt. Dazu wurden weibliche Mäuse zehn Wochen lang gefüttert und Wt31-Zellen in die Schwanzvene injiziert. 19 Tage später wurde das Metastasenwachstum in Leber und Lunge der CDAA+, CDAA- und der Kontrollgruppe mit Normalfutter untersucht (Abbildung 16).

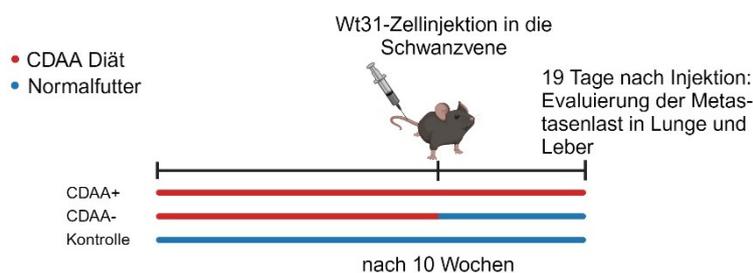


Abbildung 16: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von Wt31-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen mit und ohne Fortsetzung der CDAA-Fütterung nach Injektion von Melanomzellen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden Wt31-Zellen in die Schwanzvene injiziert, wobei eine Gruppe nach der Injektion weiterhin mit CDAA gefüttert wurde und eine andere Gruppe nach der Injektion auf Normalfutter umgestellt wurde. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich Normalfutter. 19 Tage später wurden die Metastasen in Lunge und Leber untersucht.

Nach zehn Wochen CDAA-Diät mit und ohne Weiterfütterung waren in den Lebern der beiden CDAA-Gruppen mehr Metastasen makroskopisch sichtbar im Vergleich zur Normalfutterkontrolle. Die Lungen zeigten mehr Metastasen im Vergleich zu den CDAA+ und CDAA- Gruppen in der Kontrolle (Abbildung 17A, B).

4. Ergebnisse

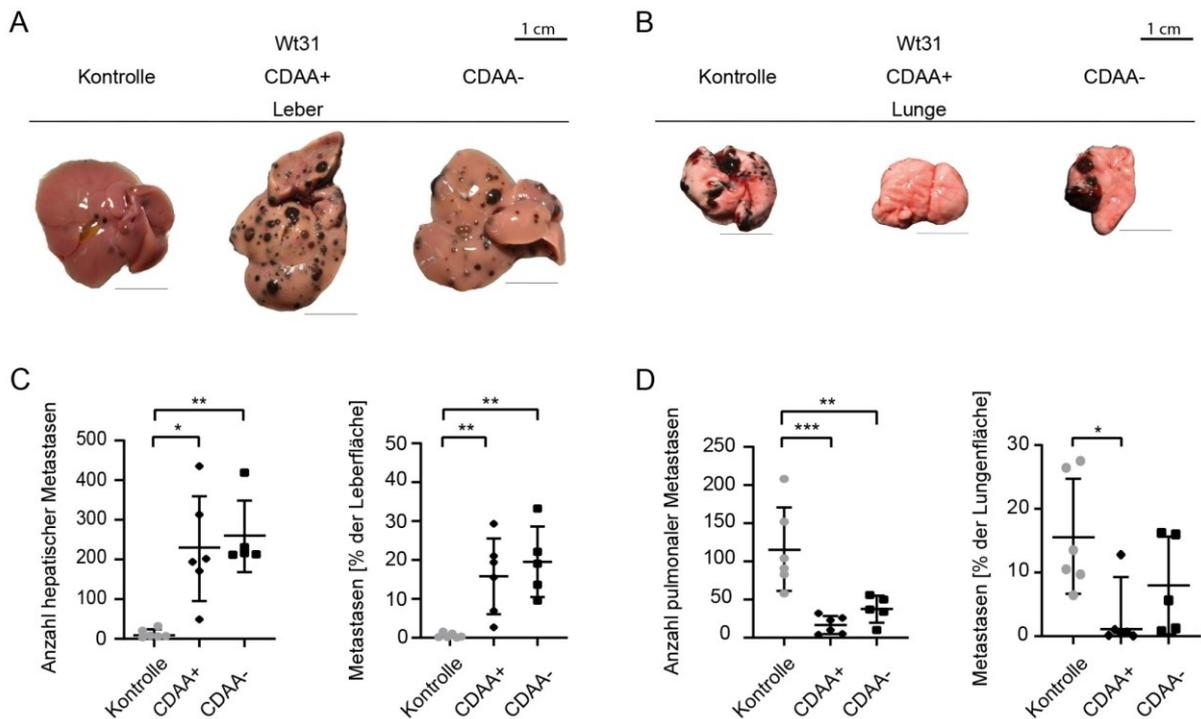


Abbildung 17: Makroskopische Bilder von Leber und Lunge mit Wt31-Metastasen nach zehn Wochen CDAA-Diät mit und ohne Weiterfütterung der Diät. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontrollgruppe (links) und der CDAA-Gruppe mit Fortführung der CDAA-Fütterung (Mitte) und Fortführung der normalen Fütterung nach Tumorzellinjektion (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontrollgruppe (links) und der CDAA-Gruppe mit Fortführung der CDAA-Fütterung (Mitte) und Fortführung der normalen Fütterung nach Tumorzellinjektion (rechts). (C) Gezählte Metastasen in der Leber (6 vs. 6 vs. 5, $p = 0,0009$) und prozentuale Fläche der Metastasen zur Leberfläche (6 vs. 6 vs. 5 $p = 0,002$). (D) Gezählte Metastasen in den Lungen (6 vs. 6 vs. 5, $p = 0,0006$) und prozentuale Fläche der Metastasen zur Lungenfläche (6 vs. 6 vs. 5, $p = 0,025$).

Die Anzahl und metastatische Fläche der Metastasen zeigte in den Lebern mit CDAA-Fütterung in beiden Gruppen eine erhöhte Anzahl an Metastasen und auch eine vergrößerte Fläche der Metastasen im Vergleich zur Normalfutterkontrolle (Abbildung 17C). In den Lungen der Gruppen mit Normalfutter wurden signifikant mehr Metastasen gefunden als in den Gruppen mit CDAA-Futter. Die Fläche der Metastasen in der Lunge der Kontrollgruppe war ebenfalls signifikant größer als in der CDAA+ Gruppe, aber das Signifikanzniveau wurde in der CDAA-Gruppe nicht erreicht (Abbildung 17D). Die Auswertung der Körpergewichte ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Lebergewichte waren in den CDAA-Gruppen signifikant höher als in der Gruppe mit Normalfutter. Dementsprechend war auch das Leber-zu-Körper-Verhältnis in beiden CDAA-Gruppen signifikant erhöht. Das Lungengewicht zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 18A – D).

4. Ergebnisse

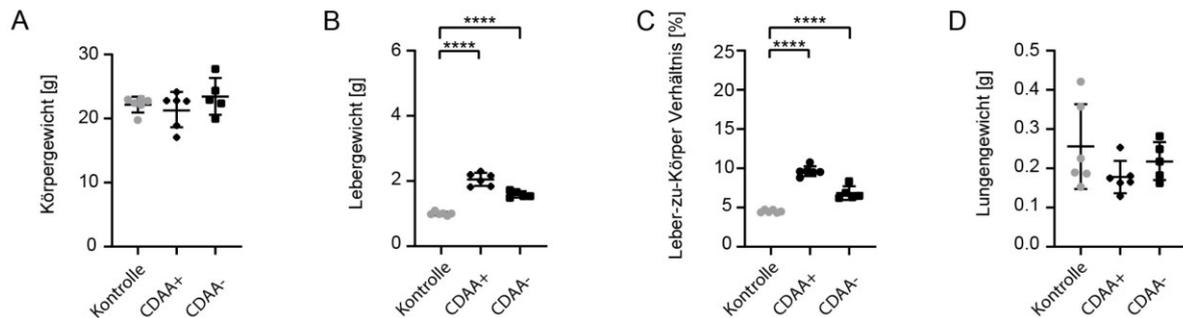


Abbildung 18: Gewichtungsmessungen nach 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum mit und ohne Weiterfütterung der CDAA-Diät. (A) Körpergewicht (6 vs. 6 vs. 5, n. s.). (B) Lebergewicht (6 vs. 6 vs. 5, $p < 0,0001$). (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis (6 vs. 6 vs. 5, $p < 0,0001$). (D) Lungengewicht (6 vs. 6 vs. 5, n. s.).

Da die weitere Fütterung von CDAA nach der Zellinjektion keinen Einfluss auf das Metastasenwachstum zu haben schien, wurde im weiteren Verlauf nach der Tumorzellinjektion auf Normalfutter umgestellt.

Metastasierung von Mc38 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Metastasierung in der NASH-assoziierten fibrotischen Leber Melanom-spezifisch ist, wurden Metastasierungsexperimente nach CDAA-Fütterung mit einer kolorektalen Karzinomzelllinie wiederholt. Dazu wurden zu Beginn zehn Wochen alte weibliche Tiere zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert und anschließend die murinen Mc38-Zellen wie bei den B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert (Abbildung 19).

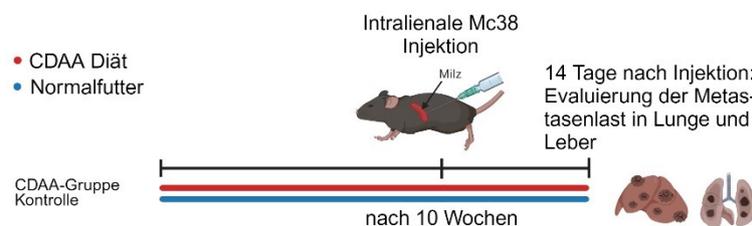


Abbildung 19: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von Mc38-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden Mc38-Zellen in die Milz injiziert und 14 Tage später die Metastasenbildung in Lunge und Leber analysiert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Nach zehn Wochen Fütterung von CDAA und anschließender intralienaler Injektion von Mc38 konnte kein makroskopischer Unterschied in der Anzahl der Metastasen in Lunge und Leber der beiden Fütterungsgruppen festgestellt werden. In den Lungen konnten in beiden Gruppen keine Metastasen nachgewiesen werden. Da die Mäuse in diesem Versuchsteil nach der Mc38-Injektion weiterhin mit CDAA gefüttert wurden, zeigte die Leber eine deutlich hellere Farbe (Abbildung 20A, B).

4. Ergebnisse

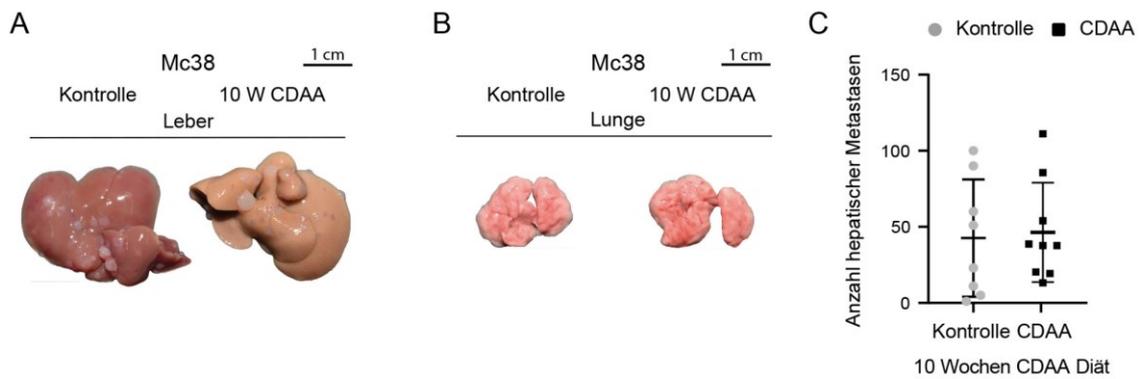


Abbildung 20: Makroskopische Bilder der Lebern und Lungen und Auswertung der Metastasen nach 14 Tagen Mc38-Wachstum (A) Lebern der Kontroll- und CDAA-Gruppe. (B) Lungen der Kontroll- und CDAA-Gruppe. Skala: 1 cm. (C) Gezählte Anzahl der Mc38-Metastasen nach zehn Wochen CDAA-Diät mit Weiterfütterung nach Tumorzellinjektion. 8 vs. 9, $p = 0,8215$.

Neben der makroskopischen Auswertung wurden die sichtbaren Metastasen der Leber gezählt und statistisch ausgewertet. Dabei zeigte sich in der Anzahl der hepatischen Metastasen zwischen der CDAA gefütterten Gruppe und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied (Abbildung 20C).

4. Ergebnisse

4.2 Charakterisierung der steatotischen Leber nach kurzer CDAA-Fütterung

Die Entwicklung der Leberfibrose bei NASH ist ein kontinuierlicher Vorgang, der durch mehrere aufeinander folgende pathologische Ereignisse verursacht wird. Diese Ereignisse, insbesondere in der hepatischen vaskulären Nische, wie z. B. die Verringerung der Anzahl der endothelialen Fenestrations in den Lebersinusoiden, treten bereits innerhalb einer Woche nach Beginn der Fütterung mit CDAA auf [44]. Aus diesem Grund führte ich eine umfassende makroskopische und mikroskopische Analyse von C57BL/6NRj-Lebern zu verschiedenen Zeitpunkten während der CDAA-Fütterung durch, nämlich nach einem Tag sowie nach einer, zwei und vier Wochen. Hierfür wurde biometrische Daten, Fotos, Blutplasma und Leberproben asserviert und analysiert (Abbildung 21).

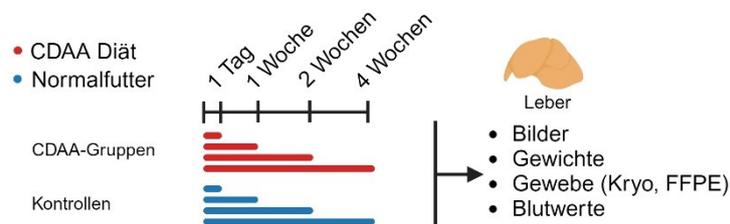


Abbildung 21: Versuchsaufbau zur Charakterisierung der murinen Leber nach kurzer CDAA-Fütterungsdauer. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj wurden für einen Tag sowie eine, zwei und vier Wochen mit CDAA-Diät gefüttert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. Die Organe wurden fotografiert, die Gewichte dokumentiert und das Gewebe asserviert. Zusätzlich wurden Blutparameter zur Leberfunktion bestimmt.

Makroskopisch waren die Lebern nach einem Tag Fütterung im Vergleich zur Kontrollgruppe heller gefärbt und größer. Nach vier Wochen CDAA-Fütterung war dieser Effekt sehr deutlich ausgeprägt (Abbildung 22A). Die Auswertung der Gewichtsmessungen zeigt bei den Körpergewichten keine Veränderungen zwischen beiden Gruppen. Auch die Lungen zeigten keinen Gewichtsunterschied. Die Lebern der CDAA-gefütterten Gruppen zeigten jedoch nach einem Tag CDAA-Diät eine signifikante Gewichtszunahme, die sich bis zu vier Wochen CDAA-Diät kontinuierlich verstärkte. Zudem wurde eine signifikante Zunahme des Leber-zu-Körper-Verhältnisses nach einem Tag festgestellt, welches bis vier Wochen CDAA-Diät ebenfalls kontinuierlich anstieg (Abbildung 22B – E).

4. Ergebnisse

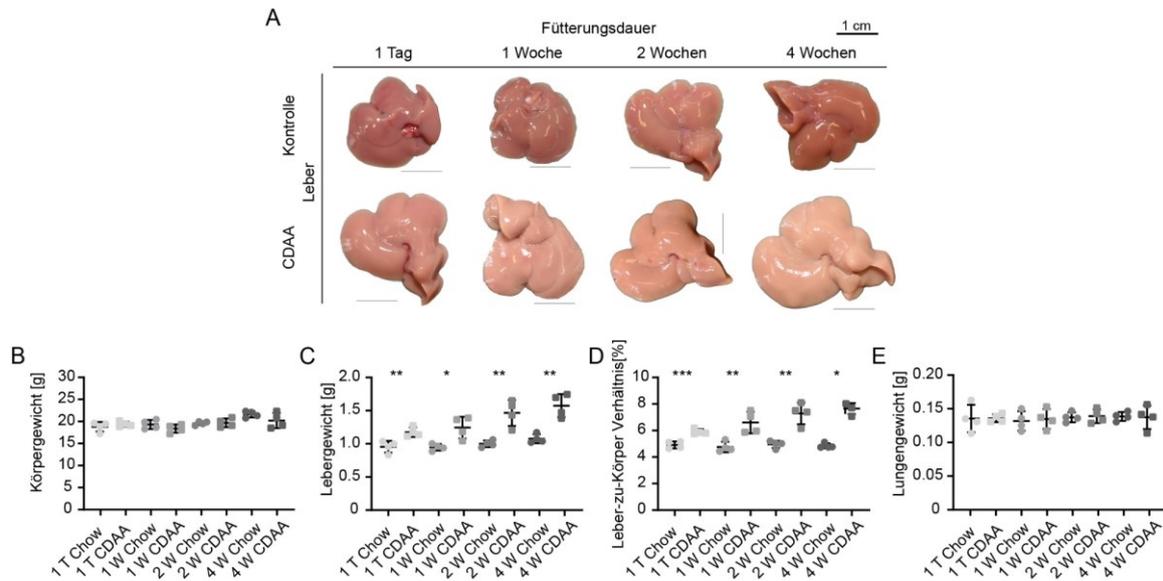


Abbildung 22: Makroskopische Bilder und Gewichtsmessungen von Lebern der Normalfutterkontrolle (obere Reihe) und CDAA-Diät (untere Reihe). (A) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild pro Gruppe. Skala: 1 cm. (B) Körpergewicht: n. s. (C) Lebergewicht: ein Tag, $p = 0,0086$; eine Woche, $p = 0,0129$; zwei Wochen, $p = 0,0057$; vier Wochen, $p = 0,0017$. (D) Leber-zu-Körper-Verhältnis: ein Tag, $p = 0,0010$; eine Woche, $p = 0,01064$; zwei Wochen, $p = 0,0016$; vier Wochen, $p = 0,0286$. (E) Lungengewicht: n. s. Alle Gruppen mit $n = 4$.

Zur histologischen Beurteilung wurde das Lebergewebe mit Hämatoxylin und Eosin (H&E), Pikro-Sirius Rot (PSR) und Oil-Red O (ORO) gefärbt und ausgewertet. Nach einer Woche CDAA-Diät zeigten sich in der H&E-Färbung erste steatotische Veränderungen im Lebergewebe, während die Kontrollgruppe keine Auffälligkeiten aufwies. Diese Steatose nahm mit der Zeit zu, was an den weißen, sogenannten Fett Tröpfchen zu erkennen ist (Abbildung 23A). Zur Färbung der Kollagenfasern in der Leber wurde die PSR-Färbung verwendet. Es gab keine auffälligen Unterschiede zwischen der CDAA-Gruppe und der Kontrolle, was darauf hindeutet, dass keine übermäßigen Kollagenablagerungen vorhanden waren (Abbildung 23B).

Aufgrund der morphologisch sichtbaren beginnenden Steatose in der H&E-Färbungen, wurde der intrahepatische Lipidgehalt mittels ORO-Färbung angefärbt und quantifiziert. Bereits nach eintägiger CDAA-Fütterung ist eine deutliche Anreicherung der rot gefärbten Fläche im Vergleich zur Normalfutterkontrolle zu erkennen. Auch nach ein bis vier Wochen CDAA ist diese rot gefärbte Leberverfettung in zunehmendem Maße sichtbar (Abbildung 23C). Im nächsten Schritt wurde die ORO-positive Fläche quantifiziert und es zeigte sich zu allen Fütterungszeitpunkten ein signifikant erhöhter Lipidgehalt im Lebergewebe im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 23D).

4. Ergebnisse

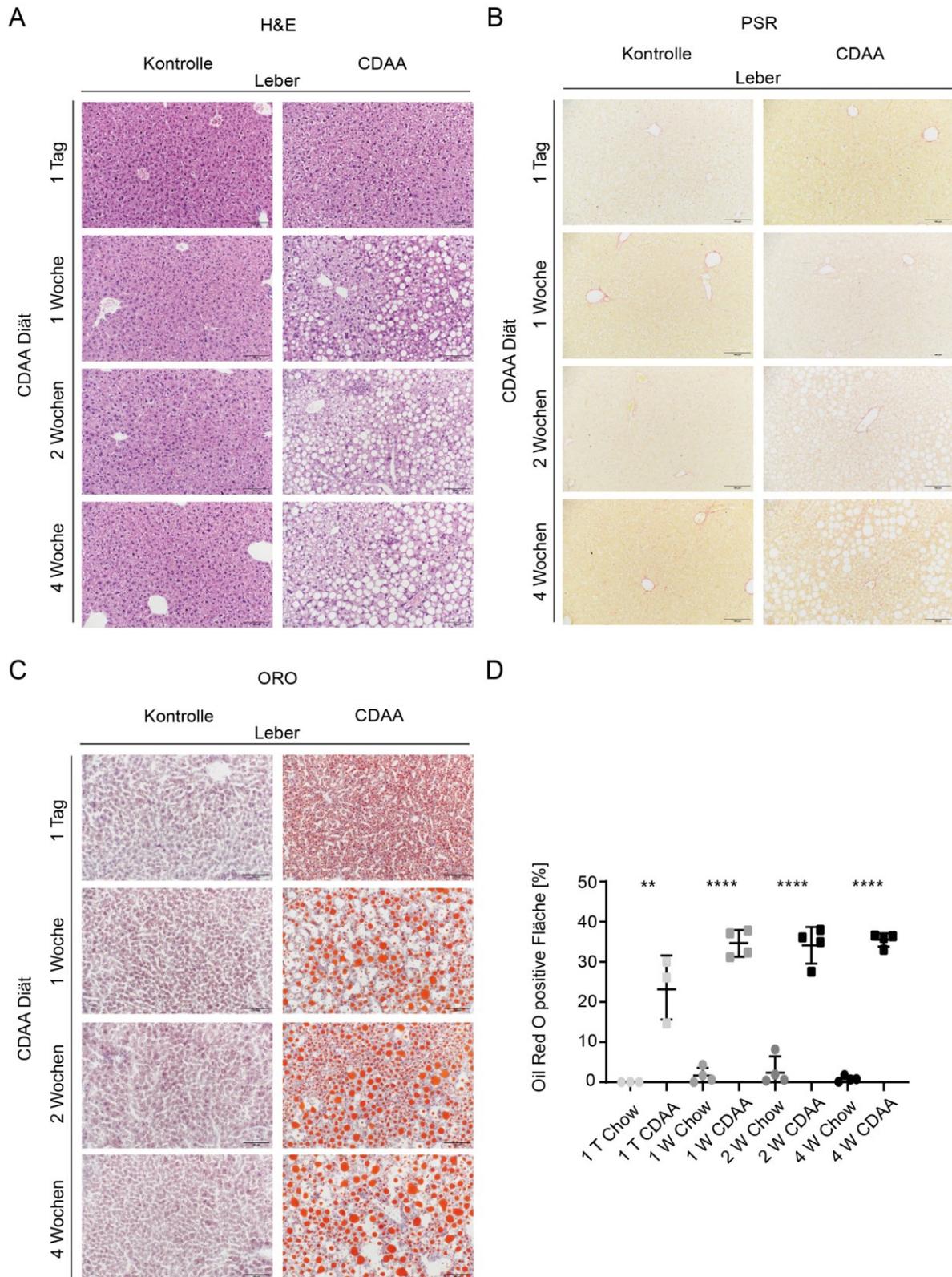


Abbildung 23: H&E-, PSR- und ORO-Färbungen zur Charakterisierung von kurzen CDAA-Fütterungen und Quantifizierung der ORO-positiven Fläche. (A) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives H&E-Bild von der CDAA gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach einem Tag, sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 μ m. (B) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives PSR-Bild von der CDAA gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach einem Tag, sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 μ m. (C) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives ORO-Bild von der CDAA gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach einem Tag, sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 μ m. (D) Quantifizierung der ORO-positiven Fläche: Ein Tag, $p = 0,0069$; eine Woche, $p < 0,0001$; zwei Wochen, $p < 0,0001$; vier Wochen, $p < 0,0001$. Alle Gruppen mit $n = 4$.

4. Ergebnisse

Untersuchungen des Blutplasmas auf Blutfettwerte und Leberschädigungsmarker ergaben einen signifikanten Anstieg der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der Aspartat-Aminotransferase (AST) nach einer und vier Wochen CDAA-Diät. Das Cholesterin war nach einem Tag, sowie nach einer und vier Wochen CDAA-Diät signifikant erhöht, ebenso die Cholinesterase. Die Triglyceride zeigten keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 24A – E).

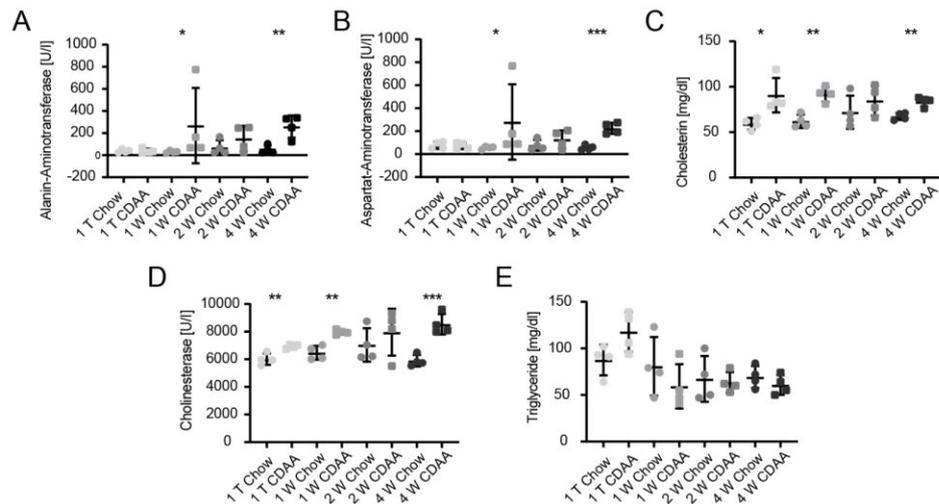


Abbildung 24: Blutfettwerte und Leberschadensmarker von gefütterten Wildtypen nach kurzen CDAA-Fütterungen. (A) Serumspiegel von Alanin-Aminotransferase (ALT) (ein Tag, n. s.; eine Woche, $p = 0,0286$; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, $p = 0,0079$). (B) Aspartat-Aminotransferase (AST) (ein Tag, n. s.; eine Woche, $p = 0,0286$; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, $p = 0,0007$). (C) Gesamtcholesterin (ein Tag, $p = 0,0286$; eine Woche, $p = 0,0017$; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, $p = 0,0024$). (D) Cholinesterase (ein Tag, $p = 0,006$; eine Woche, $p = 0,0014$; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, $p = 0,0008$). (E) Triglyceride (TG) (ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.). Alle Gruppen mit $n = 4$.

4. Ergebnisse

4.3 Metastasierung des Melanoms in die steatotische vaskuläre Nische nach kurzer CDAA-Fütterung

Metastasierung von B16F10Luc2 in die Leber nach kurzer CDAA-Fütterung

Um herauszufinden, ob die pathologischen Veränderungen nach einem Tag sowie nach einer, zwei und vier Wochen CDAA-Fütterung bereits einen Einfluss auf das Metastasierungsverhalten der Versuchszelllinien haben, wurden die Fütterungsversuche mit anschließender intraspinaler B16F10Luc2-Injektion nach diesen kürzeren Fütterungsperioden wiederholt. Auch in diesem Fall wurde nach der Tumorzellinjektion wieder mit Normalfutter gefüttert. Die Auswertung der Metastasen in Leber und Lunge erfolgte 14 Tagen nach der Injektion (Abbildung 25).

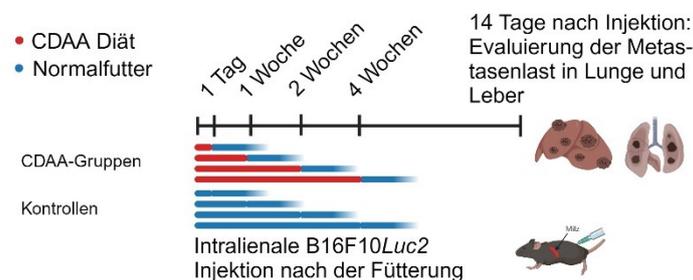


Abbildung 25: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von B16F10Luc2-Zellen in der Leber nach kürzeren Fütterungsperioden von einem Tag, eine, zwei und vier Wochen CDAA-Diät. Zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden einen Tag sowie eine, zwei und vier Wochen lang mit CDAA gefüttert, dann wurden B16F10-Zellen in die Milz injiziert und anschließend mit Normalfutter weitergefüttert. Das Metastasenwachstum in Leber und Lunge wurde 14 Tage nach der Injektion bewertet. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse derselben Linie, desselben Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Nach einer eintägigen CDAA-Diät war makroskopisch kein Effekt auf die Anzahl und die Fläche der Metastasen zu erkennen, jedoch zeigte sich nach einer Woche CDAA-Diät makroskopisch eine signifikante Zunahme der Metastasen in der CDAA-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle, die sich auch nach zwei und vier Wochen CDAA-Diät fortsetzte (Abbildung 26A). Die Anzahl der gezählten Metastasen bestätigte die makroskopisch sichtbare Metastasenlast in der Leber. Darüber hinaus wurde ein Trend zu mehr Metastasen mit zunehmender Fütterungsdauer festgestellt (Abbildung 26B).

Zusätzlich wurde die metastatische Fläche im Verhältnis zur Leberoberfläche ausgewertet. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch in diesem Fall. Nach einer eintägigen Fütterung von CDAA kam es zu keiner Zunahme der metastatischen Fläche, während nach einer einwöchigen Fütterung von CDAA eine Zunahme der metastatischen Fläche in der CDAA-Gruppe zu verzeichnen war. Auch nach zwei und vier Wochen CDAA-Fütterung war die metastatische Fläche erhöht (Abbildung 26C). Das von den B16F10Luc2-Zellen in der Leber emittierte Biolumineszenzsignal wurde ebenfalls ausgewertet und zeigte nach einem Tag CDAA-Fütterung ein sig-

4. Ergebnisse

nifikant stärkeres Signal in der Kontrollgruppe im Vergleich zur CDAA-gefütterten Gruppe. Umgekehrt zeigte die CDAA-Gruppe nach einer Woche CDAA-Fütterung ein signifikant stärkeres Biolumineszenz-Signal in der Leber, ebenso nach zwei Wochen und nach vier Wochen CDAA-Fütterung (Abbildung 26D).

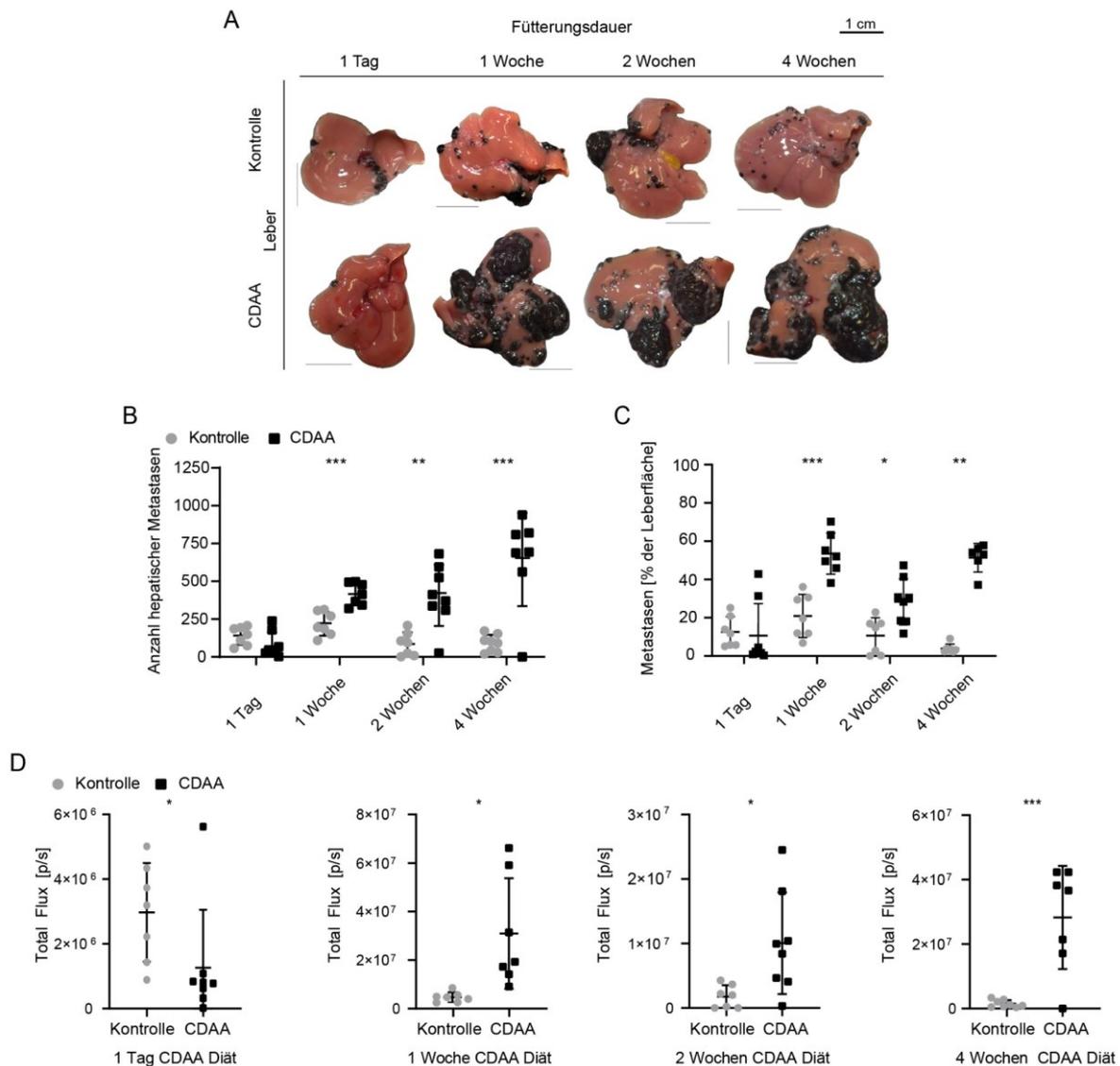


Abbildung 26: Makroskopische Bilder der Lebern, Auswertung der hepatischen Metastasen und Auswertung des gemessenen hepatischen Biolumineszenz-Signals nach kurzer CDAA-Fütterung und B16F10Luc2-Injektion. (A) Obere Reihe: Normalfutterkontrolle mit sichtbaren B16F10Luc2-Metastasen nach einem Tag, einer, zwei und vier Wochen Fütterung. Untere Reihe: CDAA-Diät Gruppe nach einem Tag, einer, zwei und vier Wochen CDAA-Diät. Skala: 1 cm. (B) Gezählte Metastasen in der Leber: Ein Tag, n. s. n = 7 vs. 8; eine Woche, p = 0,0004 n = 7 vs. 7; zwei Wochen, p = 0,009 n = 7 vs. 8; vier Wochen, p = 0,0002 n = 8 vs. 7. (C) Gemessene Metastasenfläche auf der Leber in Prozent: Ein Tag, n. s. n = 7 vs. 8; eine Woche, p = 0,0001 n = 7 vs. 8; zwei Wochen, p = 0,0152 n = 7 vs. 8; vier Wochen, p = 0,0012 n = 7 vs. 6. (D) Gemessenes Biolumineszenz-Signal der Lebern: Ein Tag, p = 0,0205 n = 7 vs. 8; eine Woche, p = 0,0225 n = 8 vs. 7; zwei Wochen, p = 0,0209 n = 7 vs. 8; vier Wochen, p = 0,0004 n = 8 vs. 7.

Die Körpergewichte der Tiere und die der Leber und Lunge wurden statistisch ausgewertet. Bei den Körpergewichten zeigten sich keine Veränderungen. Das Lebergewicht stiegen nach

4. Ergebnisse

einer Woche und vier Wochen CDAA mit Metastasenwachstum signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Gleichzeitig änderte sich auch das Leber-zu-Körper-Verhältnis in gleichem Maße. Das Lungengewicht zeigten keiner Veränderungen (Abbildung 27A – D).

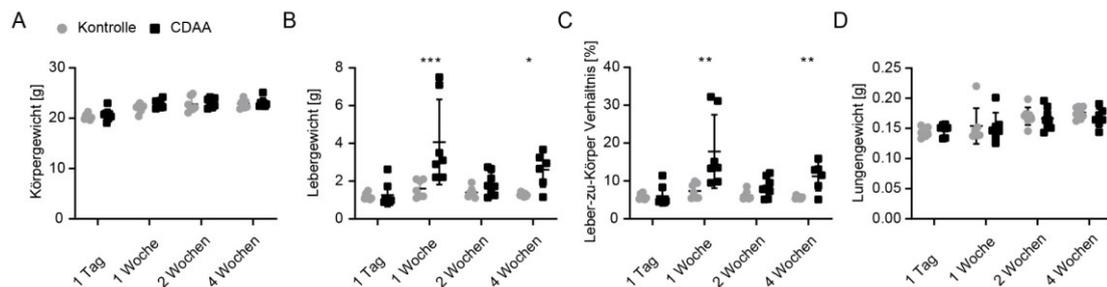


Abbildung 27: Auswertung der biometrischen Auswertungen nach kurzer CDAA-Fütterung und B16F10Luc2-Injektion. (A) Körpergewicht: Ein Tag n. s., n = 7 vs. 8, eine Woche n. s., n = 8 vs. 7, zwei Wochen n. s., n = 7 vs. 8, vier Wochen n. s., n = 8 vs. 7. (B) Lebergewicht: Ein Tag n. s., n = 7 vs. 8, eine Woche p = 0,0006, n = 8 vs. 7, zwei Wochen n. s., n = 7 vs. 8, vier Wochen p = 0,0015, n = 8 vs. 7. (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis: Ein Tag n. s., n = 7 vs. 8, eine Woche p = 0,0023, n = 8 vs. 7, zwei Wochen n. s., n = 7 vs. 8, vier Wochen p = 0,0013, n = 8 vs. 7. (D) Lungengewicht: Ein Tag n. s., n = 7 vs. 8, eine Woche n. s., n = 8 vs. 7, zwei Wochen n. s., n = 7 vs. 8, vier Wochen n. s., n = 8 vs. 7.

Steatose und ihre Spätfolgen, wie z. B. NASH, ist eine Erkrankung, die sowohl bei Frauen als auch bei Männern auftritt. Daher wurden in diesem Versuchsteil zu Beginn zehn Wochen alte C57BL/6NRj-Männchen eine Woche lang mit CDAA gefüttert und anschließend B16F10Luc2 in die Milz injiziert. Ebenfalls in diesem Versuchsteil zeigten sich makroskopisch mehr Metastasen in der CDAA-gefütterten Gruppe im Vergleich zur normalen Futterkontrolle. Die Auswertung der Metastasen ergab eine signifikant erhöhte Anzahl sowie eine erhöhte Metastasenfläche und ein erhöhtes BLI-Signal in der CDAA-Gruppe. Die Lungen zeigten wie üblich keine Metastasen nach intralienaler Injektion von B16F10Luc2 (Abbildung 28A – C).

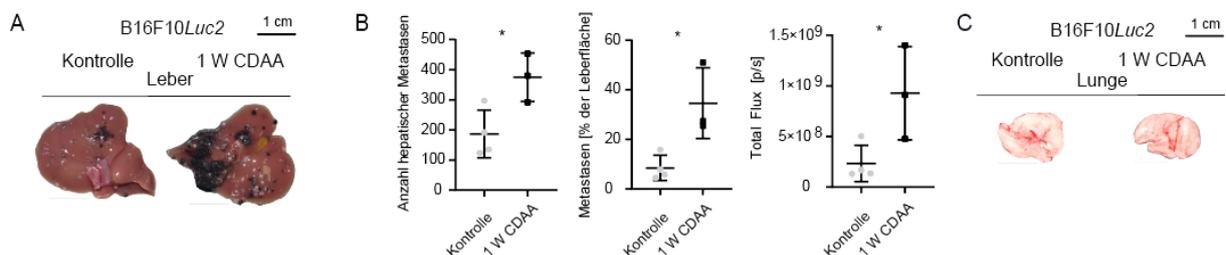


Abbildung 28: Makroskopische Bilder und Auswertung der B16F10Luc2-Metastasen nach einer Woche CDAA in Männchen. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (B) Gezählte Metastasen in der Leber (4 vs. 3, p = 0,0273) sowie die gemessene Fläche der Metastasen auf der Leber in Prozent. Gezeigt wird der Mittelwert der BLI-Quantifizierung aus dem Ergebnis der Ober- und Unterseite (4 vs. 3, p = 0,0176). Biolumineszenz Signal als Total Flux (Photonen pro Sekunde). Gezeigt wird der Mittelwert des Signals der Ober- und Unterseite (4 vs. 3, p = 0,0374). (C) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts).

4. Ergebnisse

Metastasierung von Wt31 in die Leber nach kurzer CDAA-Fütterung

Neben B16F10*Luc2* wurde zusätzlich die murine Melanomzelllinie Wt31 verwendet. Dazu wurden die Tiere über die gleichen kurzen Zeiträume wie bei B16F10*Luc2* gefüttert und die Wt31-Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert und anschließend mit Normalfutter weitergefüttert. Nach weiteren 19 Tagen Wachstum wurde die Anzahl der Metastasen in Leber und Lunge ausgewertet (Abbildung 29).

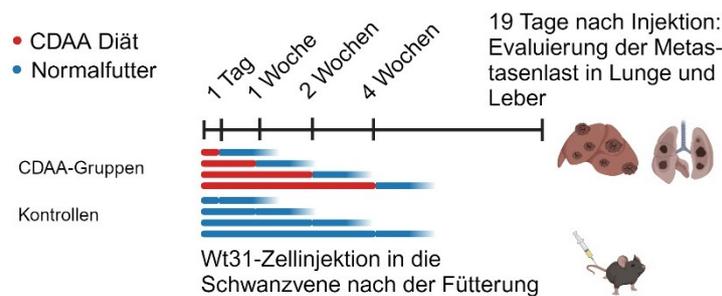


Abbildung 29: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von Wt31-Zellen in der Leber nach kürzeren Fütterungsperioden von einem Tag, einer, zwei und vier Wochen CDAA-Diät. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden einen Tag sowie eine, zwei und vier Wochen lang mit CDAA gefüttert, dann wurden Wt31-Zellen intravenös injiziert und anschließend mit Normalfutter weitergefüttert. Das Metastasenwachstum in Leber und Lunge wurde 19 Tage nach der Injektion bewertet. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse derselben Linie, desselben Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Die makroskopischen Leberbilder zeigten bei dieser Zelllinie zwischen den mit CDAA gefütterten Tieren und den normal gefütterten Kontrolltieren keinen Unterschied (Abbildung 30A). Die Auswertung der Anzahl der Lebermetastasen ergab keinen Unterschied zwischen den mit CDAA gefütterten und den normal gefütterten Tieren. Dieses Ergebnis wurde bei allen Fütterungszeitpunkten beobachtet. Neben der Anzahl wurde auch die Fläche der Metastasen quantifiziert und statistisch ausgewertet. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den gefütterten Gruppen und den Kontrollen (Abbildung 30B, C).

4. Ergebnisse

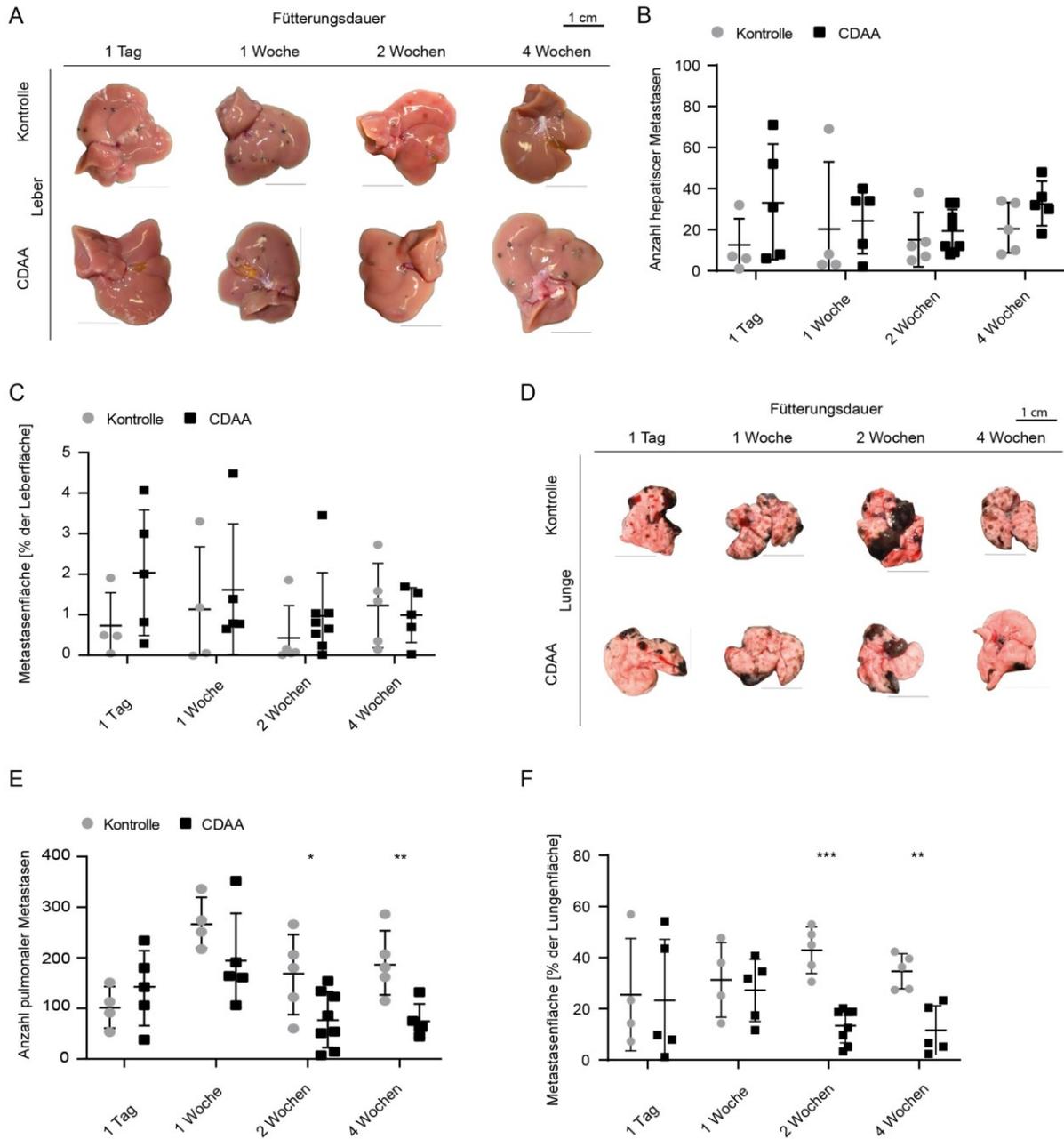


Abbildung 30: Makroskopische Bilder der Lebern und Lungen sowie die Auswertung der Metastasen nach kurzer CDAA-Fütterung und 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum. (A) Repräsentative Bilder der Lebern: Obere Reihe: Normalfutterkontrollen. Untere Reihe: CDAA-Diät Gruppen. Skala: 1 cm Die farblichen Unterschiede sind auf unterschiedliche Belichtungsverhältnisse zurückzuführen. (B) Gezählte hepatische Metastasen: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, n. s. n = 5 vs. 8; vier Wochen, n. s. n = 5 vs. 5. (C) Gemessene metastatische Fläche der Lebern: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, n. s. n = 5 vs. 8; vier Wochen, n. s. n = 5 vs. 5. (D) Repräsentative Bilder der Lungen: Obere Reihe: Normalfutterkontrolle mit sichtbaren Wt31-Metastasen nach einem Tag, einer, zwei und vier Wochen Fütterung. Untere Reihe: CDAA-Diät Gruppe nach einem Tag, einer, zwei und vier Wochen CDAA-Diät. Skala: 1 cm. (E) Gezählte pulmonale Metastasen: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, p = 0,0351 n = 5 vs. 8; vier Wochen, p = 0,0071 n = 5 vs. 5. (F) Gemessene metastatische Fläche der Lungen: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, p = 0,0005 n = 5 vs. 8; vier Wochen, p = 0,0029 n = 5 vs. 5.

4. Ergebnisse

In der Lunge zeigte sich bei dieser Zelllinie ein umgekehrtes Bild. Nach der Injektion von Wt31-Zellen wurden in der CDAA-Gruppe makroskopisch weniger Metastasen als in der normalen Futterkontrolle festgestellt (Abbildung 30D). Die tatsächliche Anzahl in der Lunge zeigte nach zwei und vier Wochen Fütterung eine statistische Zunahme der Metastasen in der Normalfutterkontrolle im Vergleich zur CDAA-Gruppe. Die Messung der Metastasenfläche zeigte nach zwei und vier Wochen CDAA ebenfalls eine signifikant größere Fläche in den Lungen der Normalfutterkontrolle im Vergleich zur CDAA-Gruppe (Abbildung 30E, F).

Das Körpergewicht war zu allen Zeitpunkten unverändert, ebenso wie die Gewichte der Lebern. Dementsprechend zeigt auch das Leber-zu-Körper-Verhältnis und auch die Lungengewichte zeigen keine Veränderungen (Abbildung 31A – D).

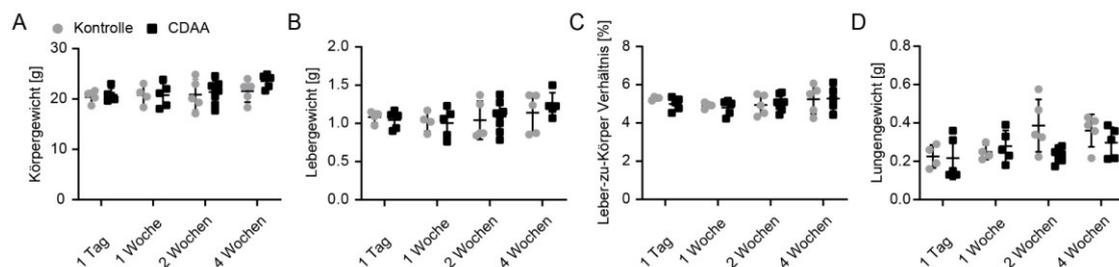


Abbildung 31: Auswertung der Gewichtsmessungen nach kurzer CDAA-Fütterung und 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum. (A) Körpergewicht: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, n. s. n = 5 vs. 8; vier Wochen, n. s. n = 5 vs. 5. (B) Lebergewicht: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, n. s. n = 5 vs. 8; vier Wochen, n. s. n = 5 vs. 5. (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, n. s. n = 5 vs. 8; vier Wochen, n. s. n = 5 vs. 5. (D) Lungengewicht: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, n. s. n = 5 vs. 8; vier Wochen, n. s. n = 5 vs. 5.

4. Ergebnisse

Metastasierung von Mc38 in die Leber nach kurzer CDAA-Fütterung

Da bei der Zelllinie B16F10*Luc2* nach einwöchiger Fütterung mit CDAA eine verstärkte Metastasierung beobachtet wurde, wurde dieser Versuchsaufbau auch für die Überprüfung der Metastasierung der Kolonkarzinom-Zelllinie Mc38 durchgeführt. Hierbei wurden die Mäuse eine Woche lang mit CDAA gefüttert, Mc38-Zellen in die Milz injiziert und Leber und Lunge nach zwei Wochen auf Metastasen analysiert. Analog zu B16F10*Luc2* und Wt31, wurden die Mäuse nach der Injektion mit Normalfutter gefüttert (Abbildung 32).

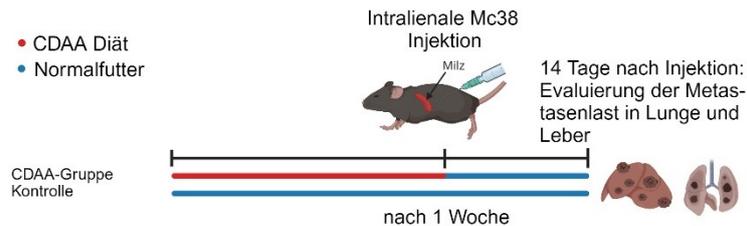


Abbildung 32: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Metastasierung von Mc38-Zellen in der Leber nach einwöchiger Fütterung mit CDAA. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden eine Woche lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden Mc38-Zellen in die Milz injiziert und 14 Tage später die Metastasierung in Lunge und Leber analysiert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Zwei Wochen nach der Injektion waren makroskopisch in der Leber der CDAA- und der Kontrollgruppe gleich viele Metastasen sichtbar, während die Lunge in allen Gruppen keine Metastasen aufwies. Anschließend wurde die Anzahl der Metastasen ausgezählt und statistisch ausgewertet. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 33A – C).

In Kontrast zu malignen Melanomzellen zeigten die Experimente mit Mc38-Zellen auch in diesem Versuchsteil keine signifikanten Unterschiede in der Bildung von Lebermetastasen nach intrasplenischer Injektion nach einer Woche CDAA-Fütterung.

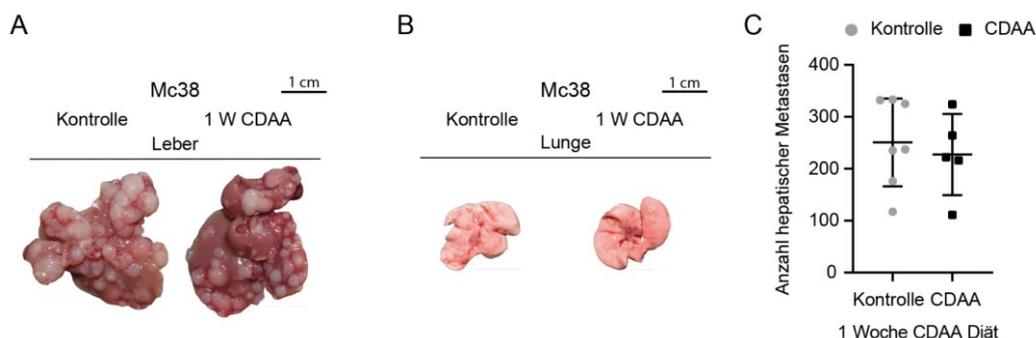


Abbildung 33: Makroskopische Bilder von Leber und Lunge nach einer Woche CDAA-Diät und 14 Tagen Mc38-Metastasenwachstum. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (C) Gezählte Metastasen in der Leber (7 vs. 6, $p = 0,6376$).

4. Ergebnisse

4.4 Einfluss einer fettreichen Diät auf die Leber und Metastasierung des Melanoms

Metastasierung von B16F10Luc2 in der Leber nach kurzer fettreicher Diät

Um zu überprüfen, ob nur der angesammelte Lipidgehalt der Leber das Metastasenwachstum der B16F10Luc2-Zellen beeinflusst, wurde das Metastasierungsexperiment mit kürzeren Fütterungszeiten mit einer rein fettreichen Diät (engl. *high fat diet*, HFD) wiederholt. Diese hat mit fast 35 % einen doppelte so hohen Fettanteil wie die CDAA-Diät mit ca. 15,6 % Fett. Die Injektion der B16F10Luc2-Zellen erfolgte nach zwei und vier Wochen HFD und die Auswertung der Metastasen 14 Tage nach Zellinjektion (Abbildung 34).

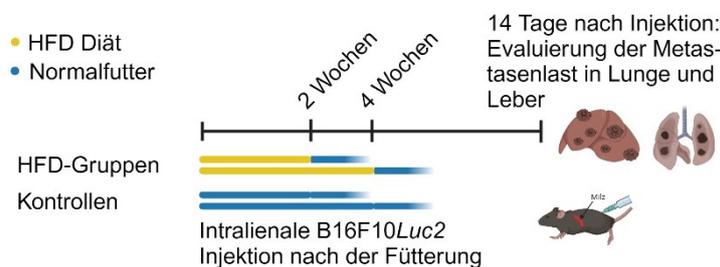


Abbildung 34: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von B16F10Luc2-Zellen in der Leber nach kürzeren Fütterungsperioden von zwei und vier Wochen mit einer fettreichen Diät (HFD). Zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden zwei und vier Wochen lang mit HFD gefüttert, dann wurden B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert und anschließend mit Normalfutter weitergefüttert. Das Metastasenwachstum in Leber und Lunge wurde 14 Tage nach der Injektion bewertet. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse derselben Linie, desselben Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Nach zwei und vier Wochen HFD konnte kein makroskopischer Unterschied in der Anzahl der Metastasen zwischen der gefütterten Gruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Lediglich in der zweiwöchigen HFD-Gruppe gab es einen signifikanten Unterschied mit mehr Metastasen in der Kontrollgruppe. Dagegen gab es wiederum keinen signifikanten Unterschied in der 4-wöchigen HFD-Gruppe. Die Fläche der Metastasen zeigte in beiden Gruppen keine nennenswerten Differenzen (Abbildung 35A – C). Um neben der Metastasenzählung und der Flächenquantifizierung ein bildgebendes Verfahren zur Quantifizierung der Metastasenlast zu verwenden, wurde das Biolumineszenzsignal der B16F10Luc2-Zellen in der Leber gemessen und statistisch ausgewertet. Nach zwei Wochen HFD war auf den Bildern kein stärkeres Biolumineszenzsignal sichtbar, was durch die statistische Auswertung des Signals bestätigt wurde. Auch nach vier Wochen HFD war keine Veränderung zwischen der Kontrollgruppe und der HFD-Gruppe zu erkennen, was durch die Quantifizierung bestätigt wurde (Abbildung 35D, E).

4. Ergebnisse

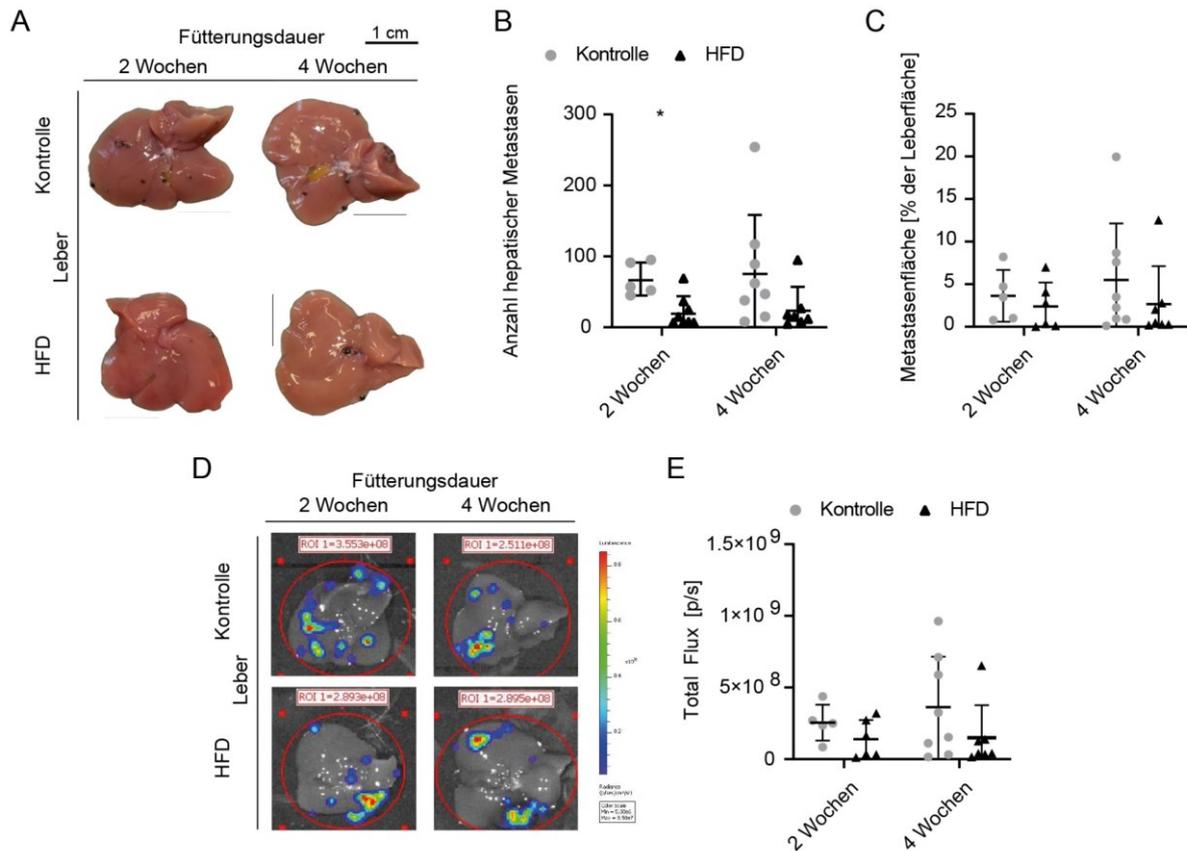


Abbildung 35: Auswertung der hepatischen Metastasen nach HFD und 14 Tagen B16F10Luc2-Metastasenwachstum. (A) Makroskopische Bilder der Lebern nach 14 Tagen Metastasenwachstum in der Kontrollgruppe (obere Reihe) gegen die HFD-Gruppe (untere Reihe). Maßstab: 1 cm. (B) Zwei Wochen, 5 vs. 6; $p = 0,0303$, vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (C) Gemessene Metastasenfläche auf der Leber in Prozent: zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (D) Repräsentative BLI-Bilder der Kontroll- und HFD-Gruppe. Skala: Min.: 5×10^4 (p/sec/cm²/sr); Max: $8,5 \times 10^6$ (p/sec/cm²/sr). Die Lebern wurden als ROI festgelegt und die BLI-Signale wurden angezeigt. (E) Quantifizierung des BLI-Signals: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s..

Nach HFD-Fütterung und anschließender Metastasierung änderte sich das Körpergewicht in beiden Gruppen nicht. Auch das Lebergewicht, das Leber-zu-Körper-Verhältnis und das Lungengewicht blieben unverändert (Abbildung 36A – D).

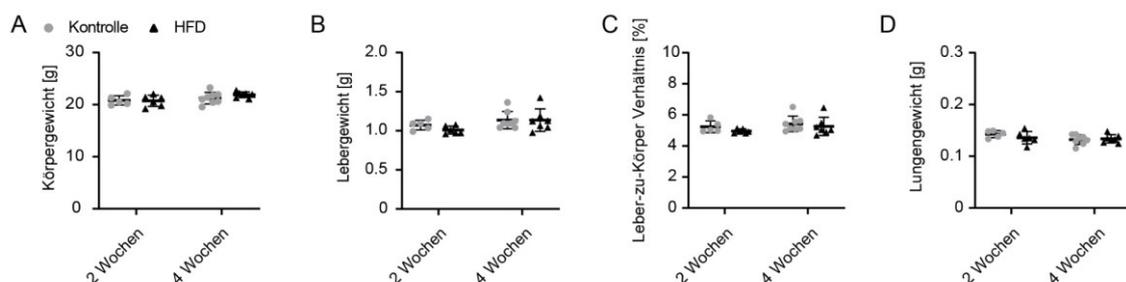


Abbildung 36: Auswertung der Gewichtsmessungen nach kurzer Fettdiät und 14 Tagen B16F10Luc2-Metastasenwachstum. (A) Körpergewicht: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (B) Lebergewicht: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (D) Lungengewicht: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s..

4. Ergebnisse

Charakterisierung der Leber nach kurzer fettreicher Diät

Um zu untersuchen, inwiefern sich die CDAA-Leber nach kürzeren Fütterungsperioden von der HFD-Leber unterscheidet, wurden C57BL/6NRj-Mäuse über verschiedene kurze Zeiträume mit HFD gefüttert und die mikro- und makroskopischen Veränderungen in der Leber analysiert. Die Tiere wurden dazu für einen Tag, sowie eine, zwei und vier Wochen mit der fettreichen Fett-Diät gefüttert. Anschließend wurden biometrische Daten, Fotos, Blutplasma und Gewebeproben der Lebern asserviert und analysiert (Abbildung 37).

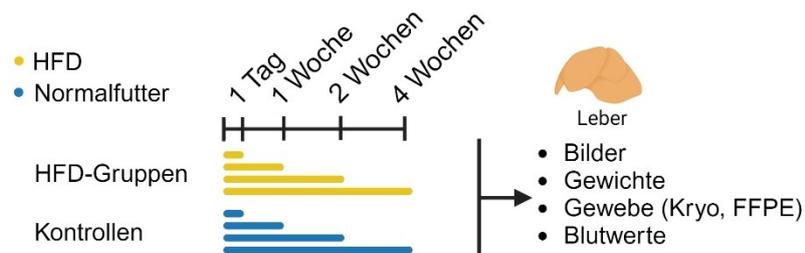


Abbildung 37: Versuchsaufbau zur Charakterisierung der murinen Leber nach kurzer HFD-Fütterungsdauer. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj wurden für einen Tag sowie eine, zwei und vier Wochen mit HFD-Diät gefüttert. Die Kontrollgruppe erhielt normales Futter. Die Organe wurden fotografiert, die Gewichte dokumentiert und das Gewebe asserviert. Zusätzlich wurden Blutparameter zur Leberfunktion bestimmt. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Makroskopisch zeigten die Lebern keine offensichtlichen Veränderungen, weder in Farbe noch in Größe. Die Körpergewichte zeigten zu allen Zeitpunkten in beiden Gruppen konstante Werte und auch das Lebergewicht wurde durch die Diät nicht beeinflusst. Das Verhältnis von Leber zum Körper und das Lungengewicht veränderte sich ebenfalls in den Gruppen nicht (Abbildung 38A – E).

4. Ergebnisse

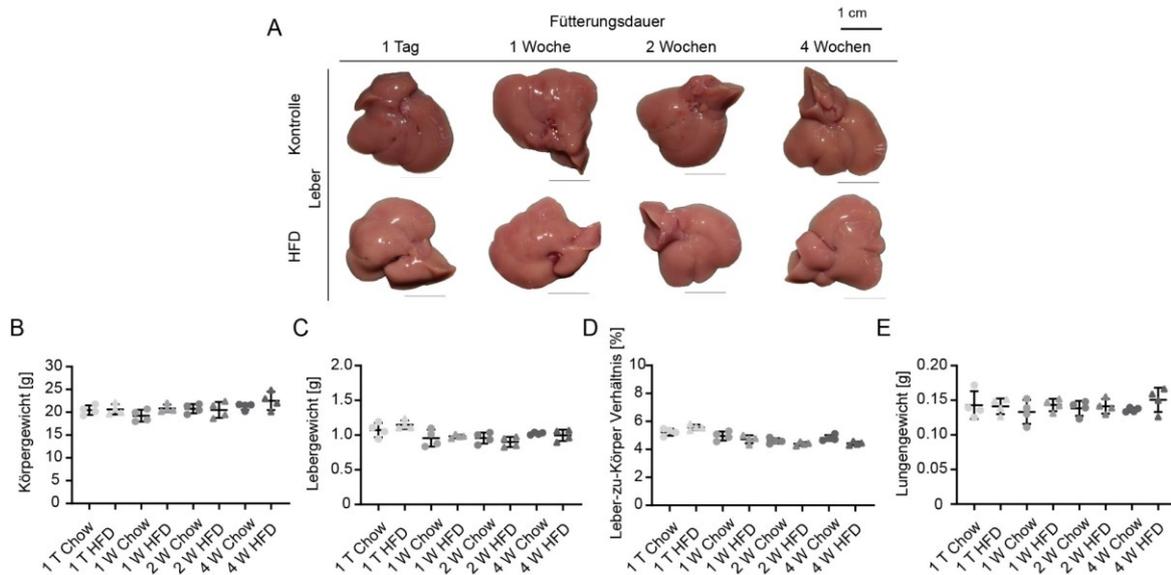


Abbildung 38: Biometrische Daten nach einem Tag bis vier Wochen Fettdiät. (A) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild pro Gruppe. Skala: 1 cm. (B) Körpergewicht: Ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.. (C) Lebergewicht: Ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.. (D) Leber-zu-Körper-Verhältnis: Ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.. (E) Lungengewicht: Ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.. Alle Gruppen mit n = 4.

Um Veränderungen auf mikroskopischer Ebene zu erkennen, wurden die Proben mittels histologische Routinefärbungen, identisch zur CDAA-Diät, untersucht. Die H&E-Färbungen zeigte in der HFD keine Veränderungen der Leberstruktur verglichen zur Kontrollgruppe mit normaler Fütterung (Abbildung 39A). Zusätzlich wurde PSR gefärbt, um mögliche fibrotische Veränderungen in der Leber zu erkennen. Auch hier ergab sich nach der HFD keine fibrotischen Veränderungen in der Leberstruktur (Abbildung 39B).

Lipideinlagerungen wurden mittels ORO-Färbung nachgewiesen. In der HFD-Gruppe wurde bereits nach einem Tag Fütterung ein vergrößerte ORO-positive Fläche beobachtet. Auch nach einer, zwei und vier Wochen konnte in der gefütterten Gruppe mehr ORO-positive Fläche festgestellt werden (Abbildung 39C). Für die Validierung der sichtbaren Fetteinlagerungen wurde die positive ORO-Fläche gemessen und ausgewertet. Nach einem Tag HFD kam es zu einem signifikanten Anstieg der ORO-positive Fläche, die mit der Dauer der Fütterung tendenziell abnahm, aber statistisch erhöht blieb (Abbildung 39D). Um die tatsächliche Menge an Triglyceriden pro Gramm Lebergewebe zu bestimmen, wurde ein Triglycerid-Assay durchgeführt. Ein Tag fettreiche Diät führte zu einem signifikanten Anstieg der Triglyceride in der Leber. Dieses Ergebnis zeigte sich auch nach einer und zwei Wochen fettreicher Diät. Nach vier Wochen HFD gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der gefütterten und der normalen Kontrollgruppe bei größerer Streuung der Leber-Triglyceride in der Kontrollgruppe (Abbildung 39E).

4. Ergebnisse

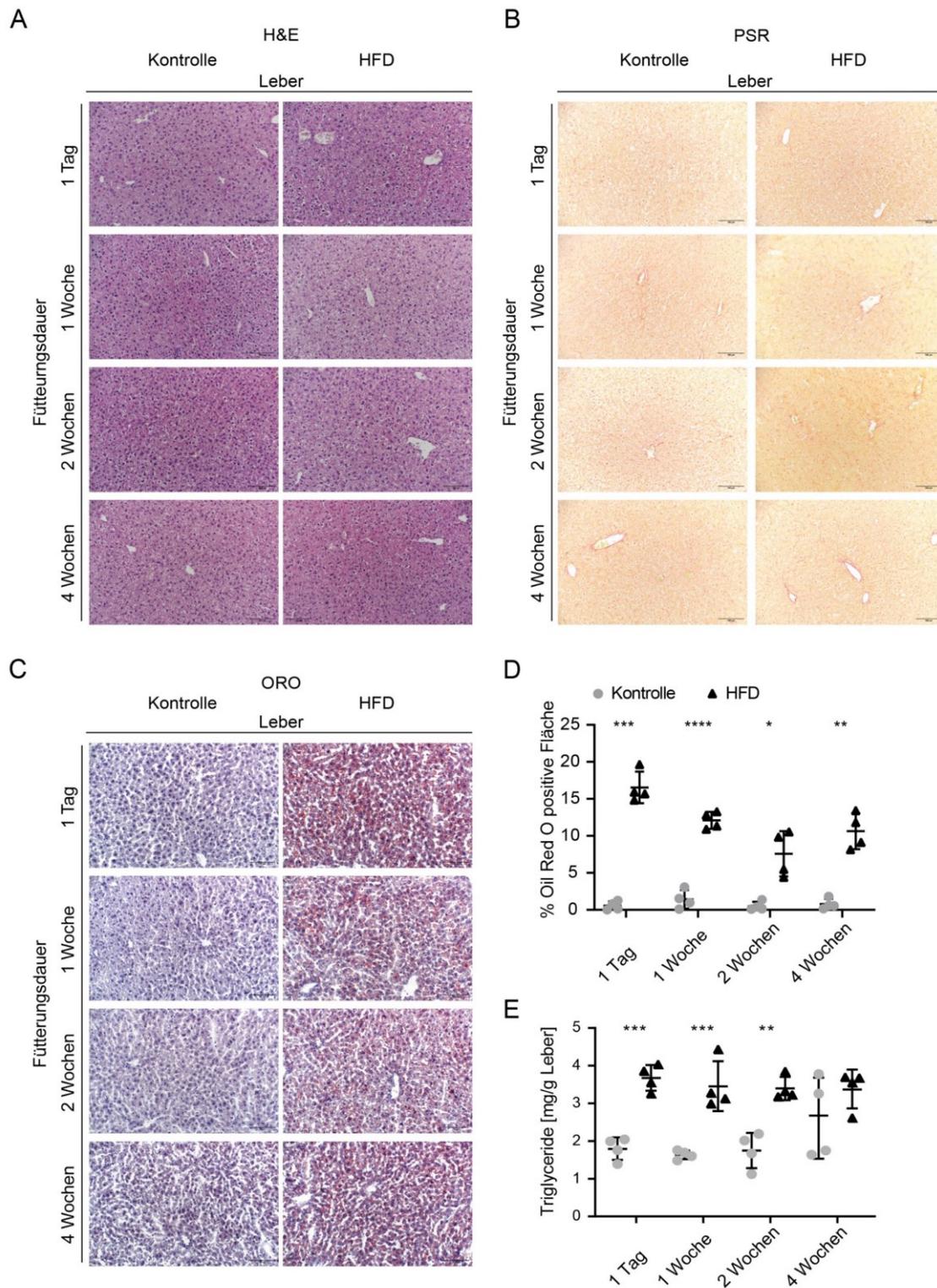


Abbildung 39: H&E-, PSR- und ORO-Färbungen zur Charakterisierung von kurzen HFD-Fütterungen sowie ORO-Quantifizierung und Triglycerid-Assay. (A) Gezeigt ist jeweils eine repräsentative H&E-Aufnahme von der gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach ein Tag sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 μ m. (B) Gezeigt ist jeweils eine repräsentative PSR-Aufnahme von der gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach ein Tag sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 μ m. (C) Gezeigt ist jeweils eine repräsentative ORO-Aufnahme von der HFD gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach ein Tag sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 μ m. (D) Quantifizierung der ORO-positiven Fläche in Prozent der gesamten Leberfläche: Ein Tag, $p = 0,0003$; eine Woche, $p < 0,0001$; zwei Wochen, $p = 0,0173$; vier Wochen, $p = 0,0025$. (E) Triglycerid-Assay von Lebergewebe nach kurzen Fütterungszeiten mit HFD: Ein Tag, $p = 0,0002$; eine Woche, $p = 0,0003$; zwei Wochen, $p = 0,0011$; vier Wochen, n. s.. Alle Gruppen mit $n = 4$.

4. Ergebnisse

Eine Analyse des Blutplasmas ergab, dass die Leberenzyme ALT und AST nach den unterschiedlichen Fütterungen keine signifikante Veränderungen zeigten (Abbildung 40A, B). Der Cholesterinwert war nach einem Tag fettreicher Diät erhöht, was sich auch nach einer, zwei und vier Wochen Diät weiterhin zeigte (Abbildung 40C). Cholinesterase- und Triglyceridwerte zeigten bei allen Zeitpunkten keine Unterschiede (Abbildung 40D, E).

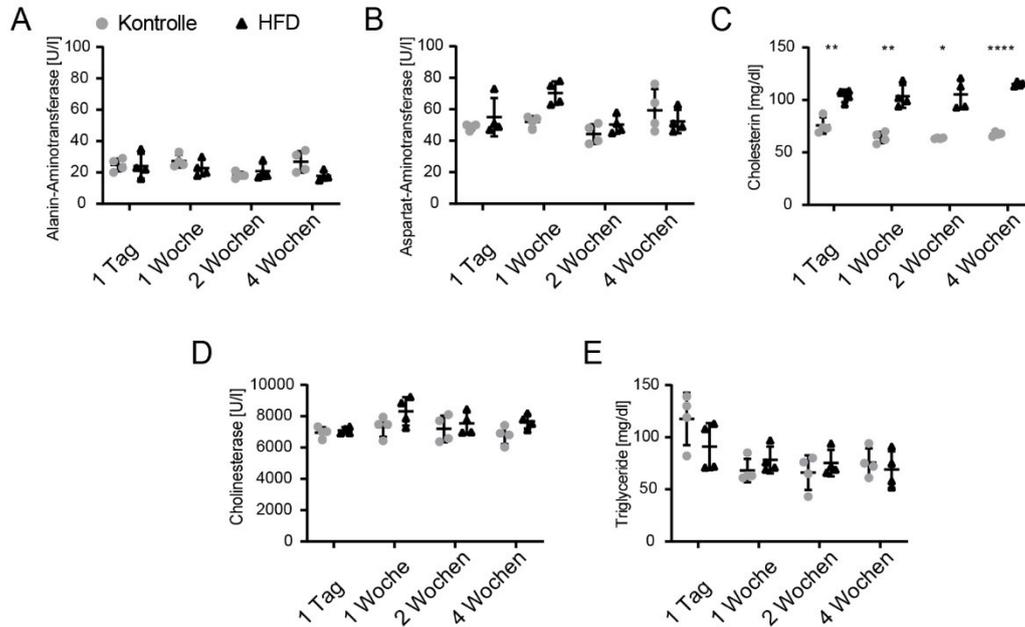


Abbildung 40: Auswertung der Blutplasmawerte nach kürzerer Fütterungsdauer einer fettreichen Diät mit der jeweiligen Kontrollgruppe. (A) Serumspiegel von Alanin-Aminotransferase (ALT), (B) Serumspiegel von Aspartat-Aminotransferase (AST). (C) Serumspiegel von Cholesterin (ein Tag, $p = 0,0015$; eine Woche, $p = 0,0021$; zwei Wochen, $p = 0,0286$; vier Wochen, $p < 0,0001$). (D) Serumspiegel von Cholinesterase. (E) Serumspiegel von Triglyceriden (TG). $n = 4$ je Gruppe.

4. Ergebnisse

4.5 Melanommetastasierung in der genetisch veränderten hepatischen vaskulären Nische

Um zu untersuchen, ob eine rein genetisch bedingte Leberfibrose ohne Vorliegen einer Steatose einen ähnlichen Einfluss auf die Metastasierung des malignen Melanoms in die Leber hat, wurde das B16F10*Luc2*-Metastasierungsexperiment in Mäusen mit LSEC-spezifischer *Gata4*-Defizienz (*Clec4g-icre^{tg/0} × Gata4^{fl/fl}; Gata4^{LSEC-KO/BL}*) durchgeführt. Diese Mäuse entwickeln eine NASH-ähnliche perisinusoidale Leberfibrose ohne hepatische Steatose aufgrund einer profibrotischen angiokrinen Umstellung der LSEC. Interessanterweise zeigte sich im CDAA-Modell eine deutliche Verringerung der endothelialen *Gata4*-Expression in LSEC nach zehnwöchiger CDAA-Fütterung. Veränderung des transkriptomischen Profils von LSEC waren dabei teilweise ähnlich wie in den Daten der *Gata4^{LSEC-KO}*-Mäusen [94]. *Gata4^{LSEC-KO}*-Mäuse stellen daher ein geeignetes genetisches Modell zur Untersuchung einer NASH-ähnlichen perisinusoidalen Fibrose dar, wie sie im CDAA-Modell vorkommt, jedoch ohne Steatose und ohne Notwendigkeit einer Fütterung. Für die Verwendung im Metastasierungsexperiment wurden die *Gata4^{LSEC-KO}*-Mäuse zuvor auf einen C57BL/6-Hintergrund rückgekreuzt. Nach sechs Rückkreuzungszyklen wurde ein C57BL/6-Hintergrund von 99,3 % erreicht. Der daraus resultierende *Gata4^{LSEC-KO/BL}*-Stamm wurde einer gründlichen Analyse unterzogen, um seine biologische Identität mit *Gata4^{LSEC-KO}*-Mäusen zu bestätigen, was aber nicht Gegenstand dieser Arbeit ist.

Für den Versuch bekamen zwölf Wochen alte *Gata4^{LSEC-KO/BL}*-Weibchen B16F10*Luc2* intrasplenisch injiziert und die Metastasen wurden 14 Tage nach der Injektion ausgewertet (Abbildung 41).

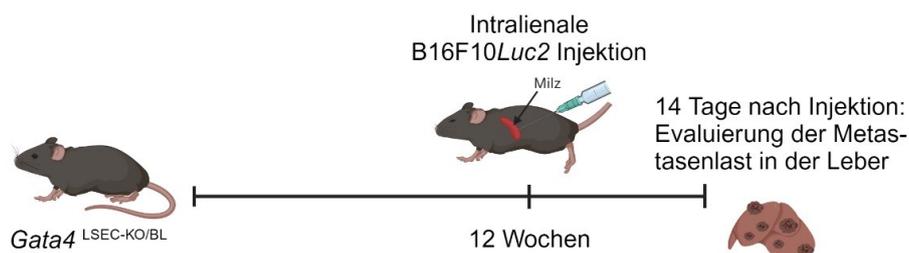


Abbildung 41: Versuchsaufbau für die Bildung von B16F10*Luc2*-Metastasen im genetischen *Gata4^{LSEC-KO/BL}*-Mausmodell. Bei zwölf Wochen alten weiblichen *Gata4^{LSEC-KO/BL}*-Mäusen wurden B16F10*Luc2*-Zellen in die Milz injiziert und 14 Tage später die Bildung der Metastasen in der Leber analysiert. Als Kontrollen wurden die Cre-negativen Geschwistertiere der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters verwendet.

Nach zwei Wochen waren in der Leber der *Gata4^{LSEC-KO/BL}*-Mäuse makroskopisch mehr Metastasen zu sehen, die nach Zählung auch eine signifikant höhere Anzahl aufwiesen (Abbildung 42A, B). Ebenso waren die quantifizierte metastatische Fläche und das BLI-Signal in der *Gata4^{LSEC-KO/BL}*-Maus signifikant höher (Abbildung 42C – E).

4. Ergebnisse

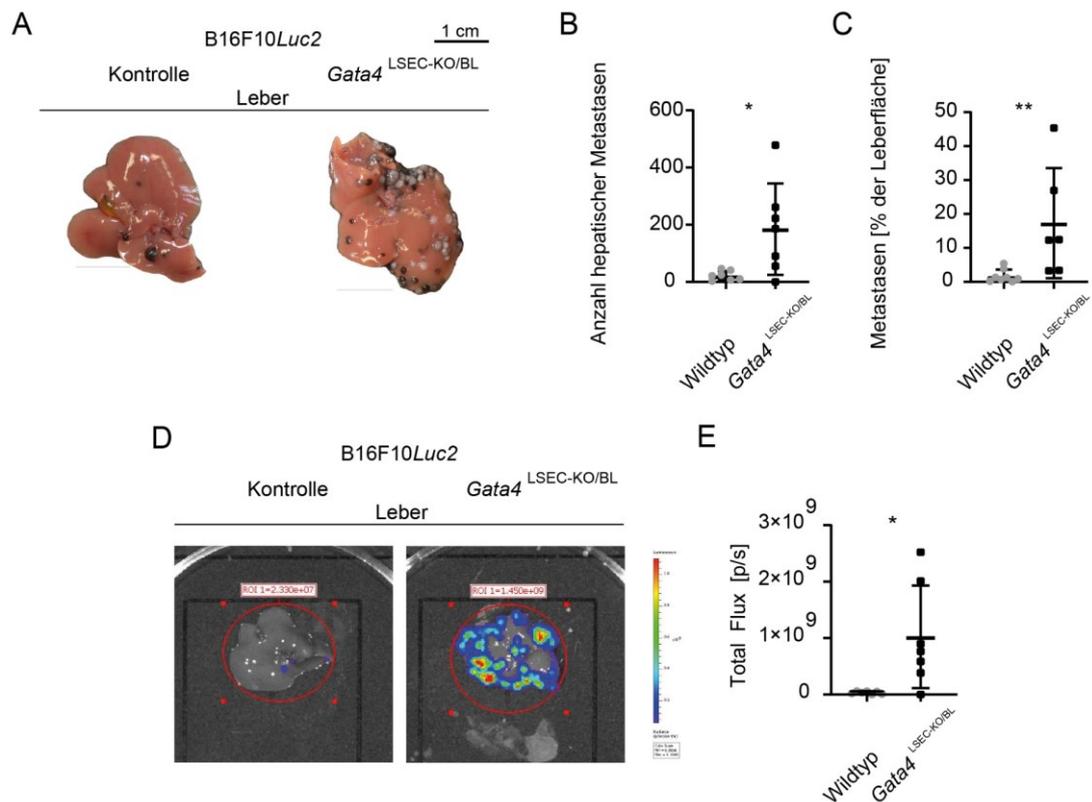


Abbildung 42: Qualitative und quantitative Auswertung der B16F10Luc2-Metastasen im *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Modell. (A) Repräsentative makroskopische Bilder der Lebern (Maßstab = 1 cm). (B) Gezählte Anzahl der Lebermetastasen (8 vs. 7, $p = 0,0199$). (C) Quantifizierter Anteil der Metastasen an der gesamten Leberfläche (8 vs. 7, $p = 0,0080$). (D) *Ex vivo* BLI-Bilder der Lebern 14 Tage nach der Zellinjektion. Skala: Min: 6×10^6 (p/sec/cm²/sr); Max: $1,1 \times 10^8$ (p/sec/cm²/sr). Die Lebern wurden als ROI festgelegt und die BLI-Signale wurden ausgewertet. (E) Quantifiziertes BLI-Signal 14 Tage nach der Injektion (8 vs. 7, $p = 0,0138$).

4. Ergebnisse

4.6 Identifizierung endothelialer Genveränderungen in der steatotischen Leber nach kurzer CDAA-Fütterung

Zur Erkennung transkriptomischer Veränderungen in LSEC unter CDAA-Diät, wurden isolierte Lebersinusendothelzellen (LSEC) nach einem Tag und einer Woche CDAA-Diät mittels Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-Seq) analysiert. Dazu wurden LSEC nach CDAA-Fütterung aus der Leber isoliert, eine LSEC-Einzelzellsuspension hergestellt und anschließend die RNA extrahiert. Diese wurde dann sequenziert und die Daten bioinformatisch ausgewertet (Abbildung 43).

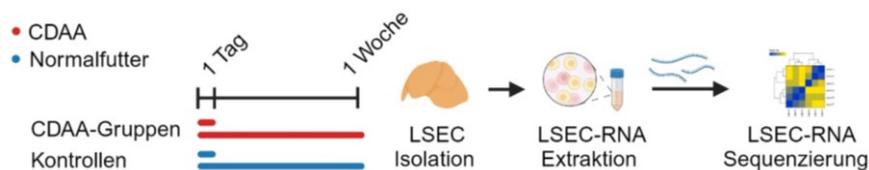


Abbildung 43: Schematischer Versuchsaufbau der RNA-Sequenzierung. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden einen Tag oder eine Woche mit CDAA gefüttert und anschließend die aus den LSEC isolierte RNA sequenziert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Die Sequenzierungsdaten ergaben, dass nach einem Tag CDAA-Diät im Vergleich zur Kontrolle kein Gen signifikant reguliert wurde (Abbildung 44A). Nach einer Woche CDAA-Fütterung konnten jedoch aus ca. 15.800 Genen 4.540 signifikant positiv und negativ regulierte Gene identifiziert werden (Abbildung 44B).

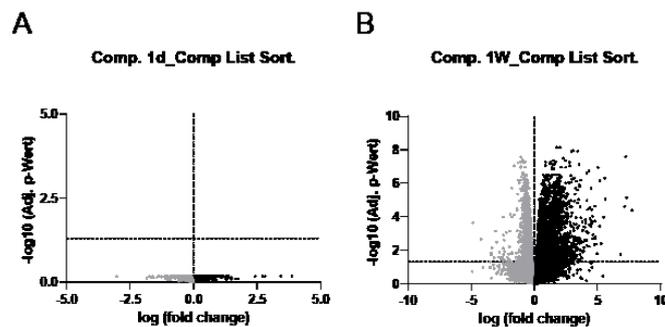


Abbildung 44: Volcano Plot aller Gene nach einem Tag und einer Woche CDAA-Diät. Aufgetragen ist der negative \log_{10} (Adj. p-Wert) gegen den $\log(\text{fold change})$. Die gestrichelte Linie zeigt den *significant cut off* ($\text{Adj. p} = 0,05$ bzw. $> 1,30$ als $-\log_{10}(0,05)$) und die gepunktete Linie den *fold change* größer (schwarz) und kleiner gleich 0 (grau). (A) Regulierte Gene nach ein Tag CDAA-Diät. (B) Regulierte Gene nach einer Woche CDAA.

Um die transkriptomischen Veränderungen der LSEC genauer zu untersuchen, wurden die Sequenzierungsdaten auf LSEC- und kontinuierlichen Endothelzell-spezifischen (CEC)-Gene untersucht, deren Anreicherung ausgewertet und in sogenannten Heatmaps dargestellt. Nach einem Tag CDAA-Diät zeigte der Enrichment-Plot einen Verlust von LSEC-spezifischen Ge-

4. Ergebnisse

nen und gleichzeitig eine moderate Induktion von CEC-Genen (Abbildung 45A). In den Heatmaps zeigten weder die LSEC-Gene (Abbildung 45B), noch die CEC-Gene ein deutliches Gruppieren nach eintägiger CDAA-Fütterung (Abbildung 45C).

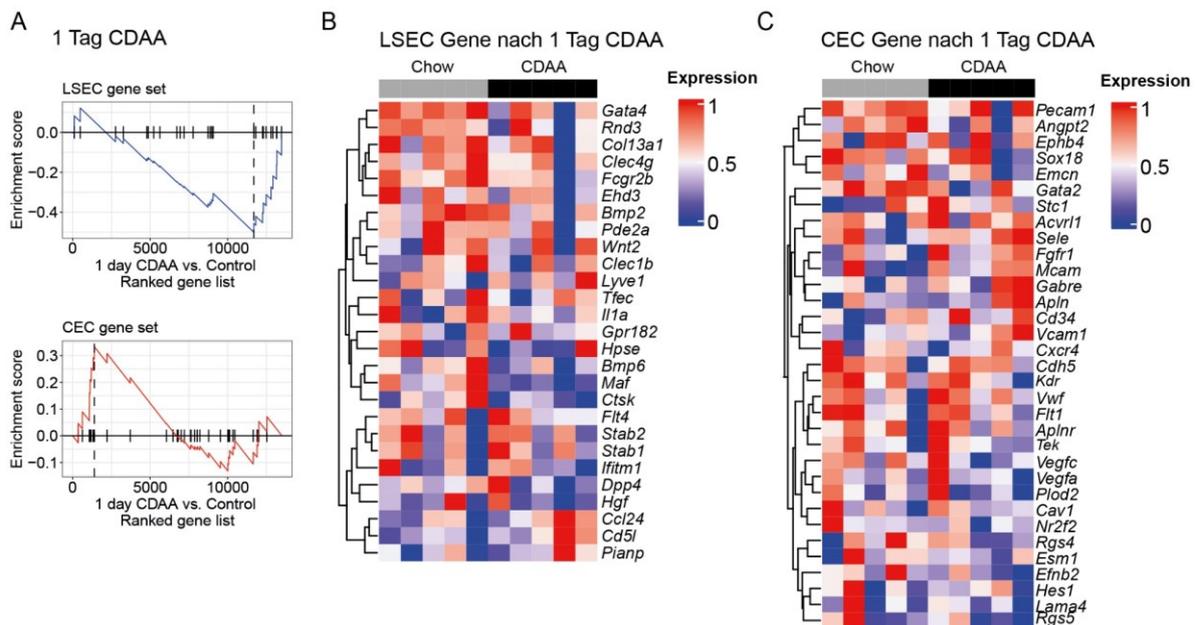


Abbildung 45: Enrichment Scores und Heatmaps der LSEC- und CEC-spezifischen Gene nach einem Tag CDAA-Diät. (A) Enrichment Scores der LSEC (oben, NES: $-1,7$; Adj. p-Wert: $0,026$) und CEC (unten, NES: $1,2$; Adj. p-Wert: $0,196$) Gene. (B) Heatmap mit LSEC-Genen nach einem Tag CDAA. (C) Heatmap mit CEC-Genen nach einem Tag CDAA.

Die Enrichment-Scores nach einer Woche CDAA-Diät ergaben bei den LSEC-spezifischen Genen einen deutlichen Verlust sowie eine partielle Induktion von CEC-spezifischen Genen. In den Heatmaps zeigten die LSEC-Gene eine reduzierte Expression nach einwöchiger CDAA-Fütterung und bestätigen damit den Enrichment-Score (Abbildung 46A, B). Viele, für die LSEC-vermittelte Leberhomöostase relevanten Gene, wie *Stabilin-1* und *-2*, *Maf*, *Clec4g*, *Gata4* und *Gpr182*, sind in der Heatmap negativ reguliert. Bei den CEC-Genen kommt es zu einer ähnlichen Verteilung der Gruppierungen zwischen den hoch- und herunterregulierten Genen, was ebenfalls mit dem Ergebnis der Enrichment-Score übereinstimmt (Abbildung 46A, C). Dabei tauchen Gene wie *CD34* oder *Angpt2* auf, die für eine Kapillarisation der LSEC sprechen.

4. Ergebnisse

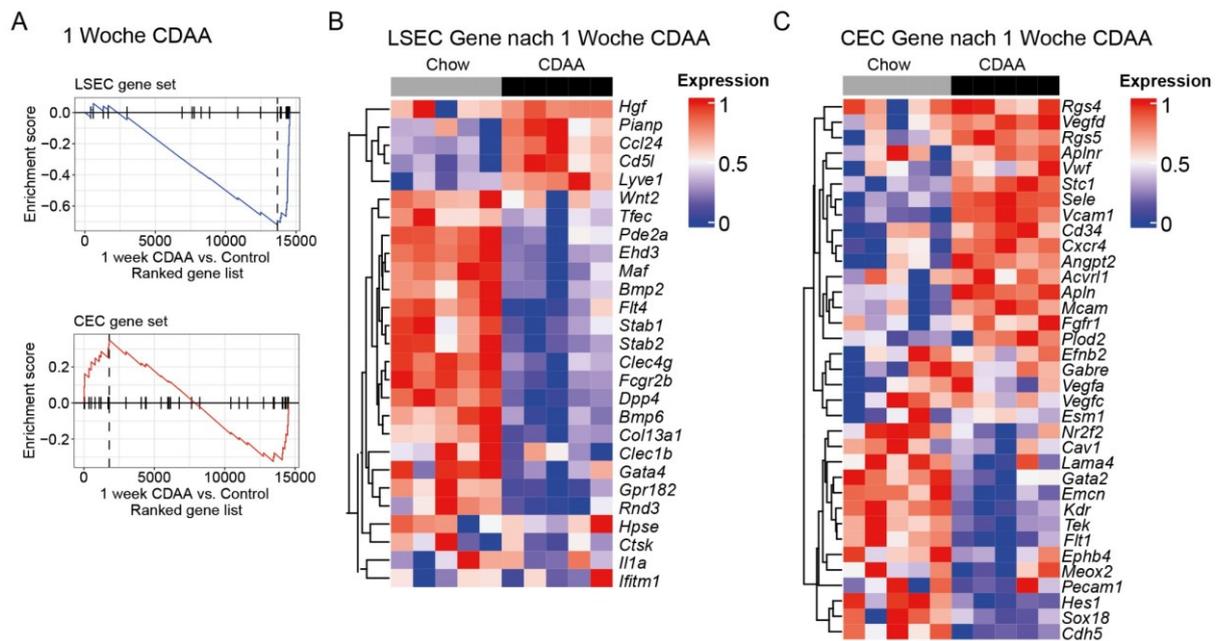
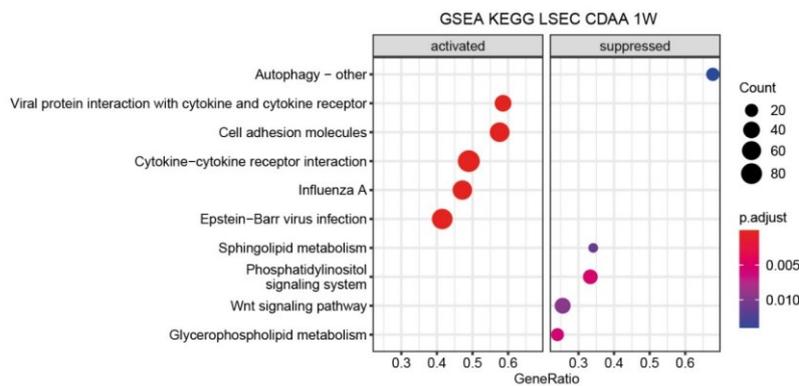


Abbildung 46: Enrichment Scores und Heatmaps der LSEC- und CEC-spezifischen Gene nach einer Woche CDAA-Diät. (A) Enrichment Scores der LSEC (oben, NES: $-2,4$; Adj. p-Wert: $4,27 \cdot 10^{-7}$) und CEC (unten, NES: $1,1$; Adj. p-Wert: $0,28171$) Gene. (B) Heatmap mit LSEC-Genen nach einer Woche CDAA. (C) Heatmap mit CEC-Genen nach einer Woche CDAA.

Bei der Auswertung der KEGG (engl.: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Signalwege mittels Genset Enrichment Analysis ClusterProfiler erschien der Signalweg „*Cell adhesion molecules*“ in CDAA-gefütterten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle auf dem zweiten Platz der am stärksten aktivierten Signalwege (Abbildung 47A). Dies konnte zusätzlich durch eine Gen Set Enrichment Plot mit einem positiven Enrichment Score im Genset „*Cell adhesion molecules*“ nachgewiesen werden (Abbildung 47B). Ebenfalls in der CDAA-Gruppe positiv reguliert waren „*Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor*“ oder „*Cytokine-cytokine receptor interaction*“. Des Weiteren waren die Gensets „*Wnt Signaling pathway*“ neben „*Sphingolipid pathway*“ und „*Autophagy – other*“ die am stärksten supprimierten Signalwege.

4. Ergebnisse

A



B

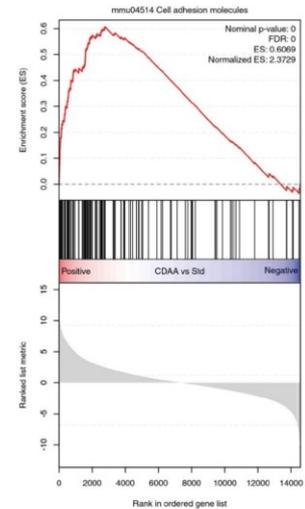


Abbildung 47: Aktivierte und supprimierte KEGG-Signalwege in murinen LSECs. (A) Geneset Enrichment Plot mit den stärksten aktivierten und unterdrückten KEGG-Signalwegen. (B) Geneset Enrichment der „Cell adhesion molecules“ (Enrichment-Score: 2,3729, Adj. p-Wert: < 0,0001).

Zur weiteren Analyse des am zweitstärksten regulierten „Cell adhesion molecules“-Signalwegs wurde eine Heatmap mit den 40 am signifikantesten regulierten Genen des „GO Term Cell Adhesion“-Signalwegs erstellt. Insgesamt wurden in diesem Geneset 207 Gene signifikant reguliert, jedoch nur die 40 Gene mit dem höchsten Signifikanzniveau dargestellt. Diese teilten sich in 13 in der CDAA-Gruppe herunter- und 27 in der CDAA-Gruppe hochregulierten Genen auf (Abbildung 48A, B). Bei den herunterregulierten Genen tauchen unter Anderem der LSEC-Marker *Stabilin-2* auf (Abbildung 48A) und bei den hoch regulierten Genen wichtige Tumorzelladhäsionsmarker wie E-Selektin (*Sele*), *Vcam1*, *Icam1*, *CD44* und P-Selektin (*Selp*) (Abbildung 48B). Um die Expressionswerte und die Signifikanz der Zelladhäsionsmoleküle zu veranschaulichen, wurden die Gene des KEGG „Cell adhesion molecules“-Pathways mit dem $-\log_{10}$ (Adj. p-Wert) gegen den \log (fold change) in einem Volcano-Plot dargestellt. Dies zeigt, dass vor allem Zelladhäsionsmoleküle wie *Icam1*, *Vcam1* und *Sele* die höchste Signifikanz aufweisen (Abbildung 48C).

4. Ergebnisse

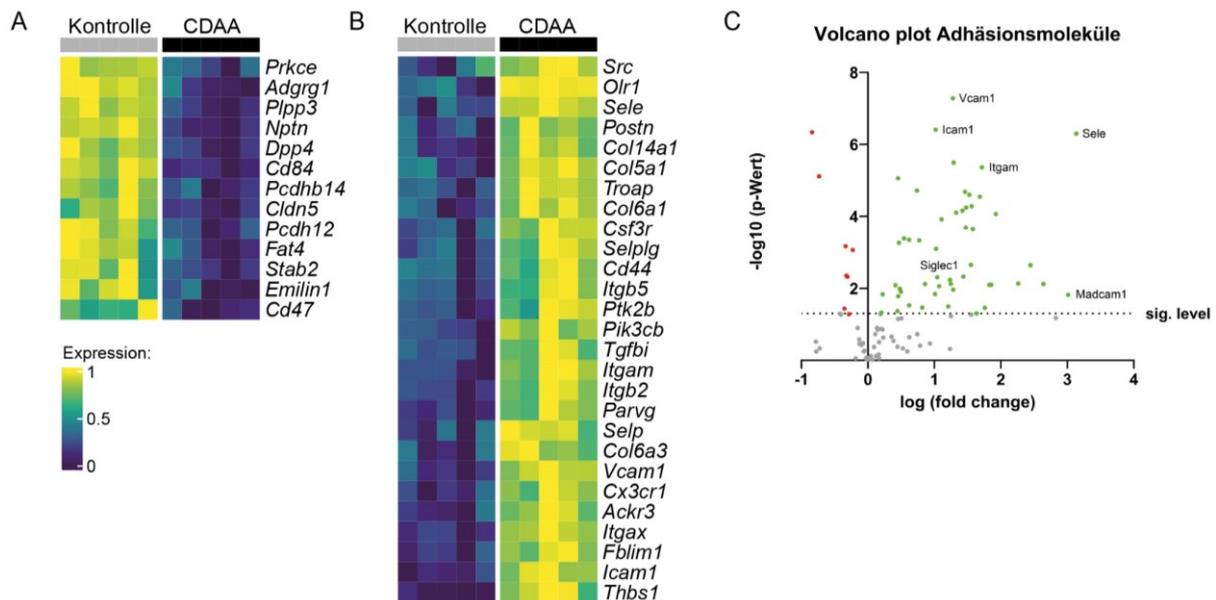


Abbildung 48: Heatmap der 40 am signifikantesten regulierten Gene des GO Term „Cell adhesion“-Geneset und Volcano Plot des „cell adhesion molecules“-KEGG Genesets nach einer Woche CDAA-Diät. (A) Die 13 am signifikantesten herunterregulierten Gene in der CDAA-Gruppe. (B) Die 27 am signifikantesten hochregulierten Gene in der CDAA-Gruppe. (C) Aufgetragen ist der $-\log_{10}$ (Adj. p-Wert) gegen den \log (fold change). Die gestrichelte Linie zeigt den *significant cut off* (Adj. p-Wert = 0,05 bzw. $> 1,30$ als $-\log_{10}(0,05)$). Signifikante Gene mit einem positiven *fold change* sind in Grün, signifikante Gene mit einem negativen *fold change* in Rot dargestellt. Gene, die das Signifikanzniveau nicht erreichen sind als graue Punkte dargestellt.

Da es in der *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Maus ebenfalls zu einer verstärkten Metastasen-Bildung kam, wurden die nach einer Woche CDAA in LSEC regulierten Gene nach 73 LSEC-Genen sortiert, welche vom Transkriptionsfaktor GATA4 reguliert werden. Diese 73 Gene wurden in einer früheren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe identifiziert [94], in dem hier verwendeten Datensatz kommen jedoch nur 72 der 73 identifizierten Gene vor. Es zeigte sich in der Heatmap, dass eine Woche CDAA-Diät mit einem signifikanten Verlust von GATA4 nachgeschalteten Genen einhergeht (Abbildung 49). Dies führt u. a. zum Verlust bekannter Gene wie *Gpr182*, *Maf*, *Clec4g* oder *Bmp2*, deren Verlust bekanntermaßen mit schweren Leberfunktionsstörungen einhergeht.

4. Ergebnisse

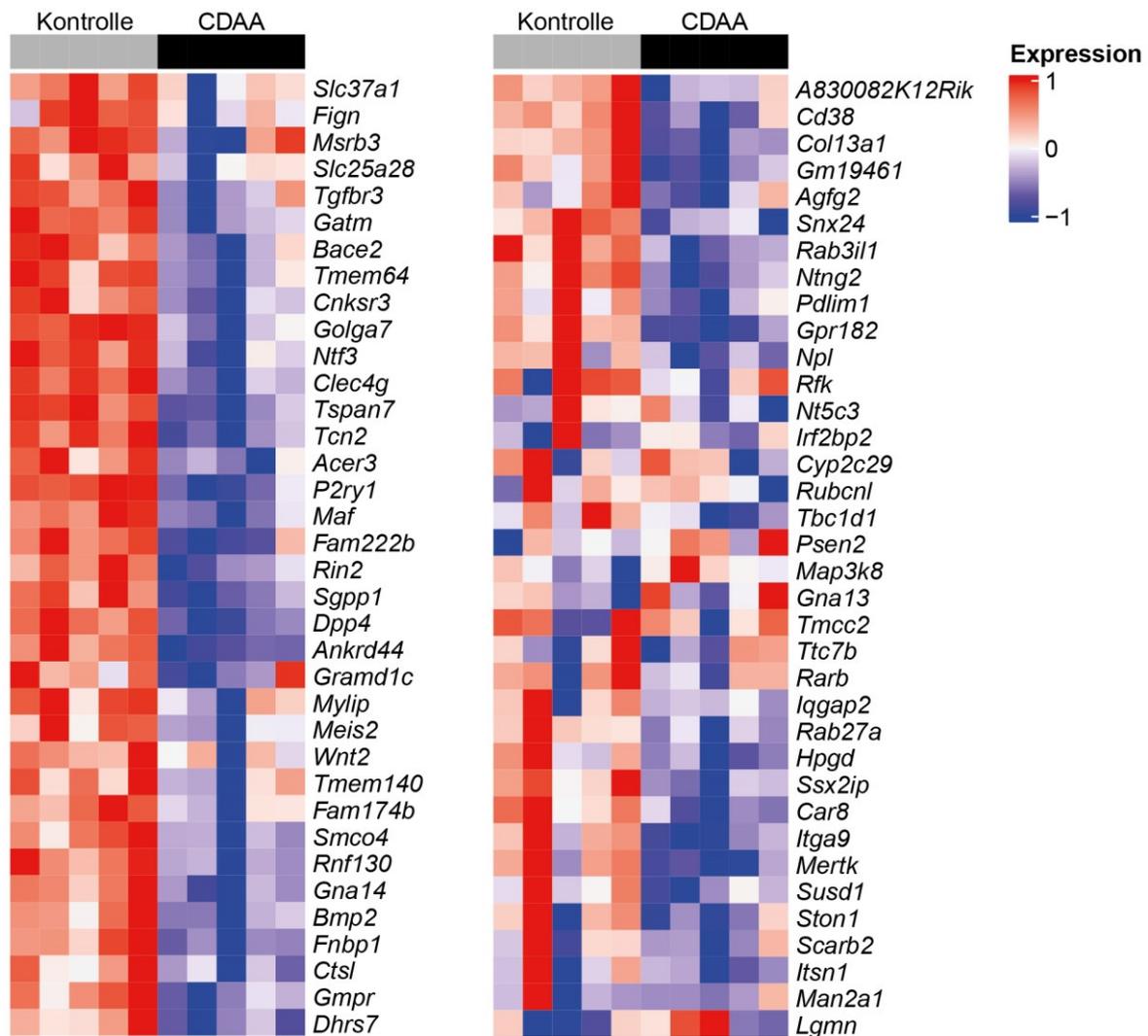


Abbildung 49: Heatmap von GATA4 nachgeschalteten Gene nach einer Woche CDAA-Diät. Dargestellt sind 72 Gene nach einer Woche CDAA-Diät, die durch den Transkriptionsfaktor GATA4 reguliert werden. Dargestellt sind die auf eins normierten Expressionswerte der Sequenzierungsdaten.

Um die durch die CDAA-Diät induzierte verstärkte Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle *in situ* zu bestätigen, wurden eine Immunfluoreszenzanalyse und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) durchgeführt. Um die Überexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM1, VCAM1 und E-Selektin (*Sele*) auf den LSEC nachzuweisen, wurden diese zusammen mit Endothelmarkern kogefärbt. Nach einer Woche CDAA-Diät war die ICAM1-Fläche signifikant erhöht, während der Endothelmarker Endomucin (EMCN) eine signifikant reduzierte Fläche aufwies (Abbildung 50A). Des Weiteren konnte eine verstärkte LYVE1 und VCAM1 Expression nachgewiesen werden (Abbildung 50B), was mit den RNA-Seq-Daten übereinstimmte. Mittels FISH konnte eine verstärkte E-Selektin (*Sele*) Expression nachgewiesen werden, während die Cadherin 5 (*Cdh5*) Expression unverändert blieb (Abbildung 50C).

4. Ergebnisse

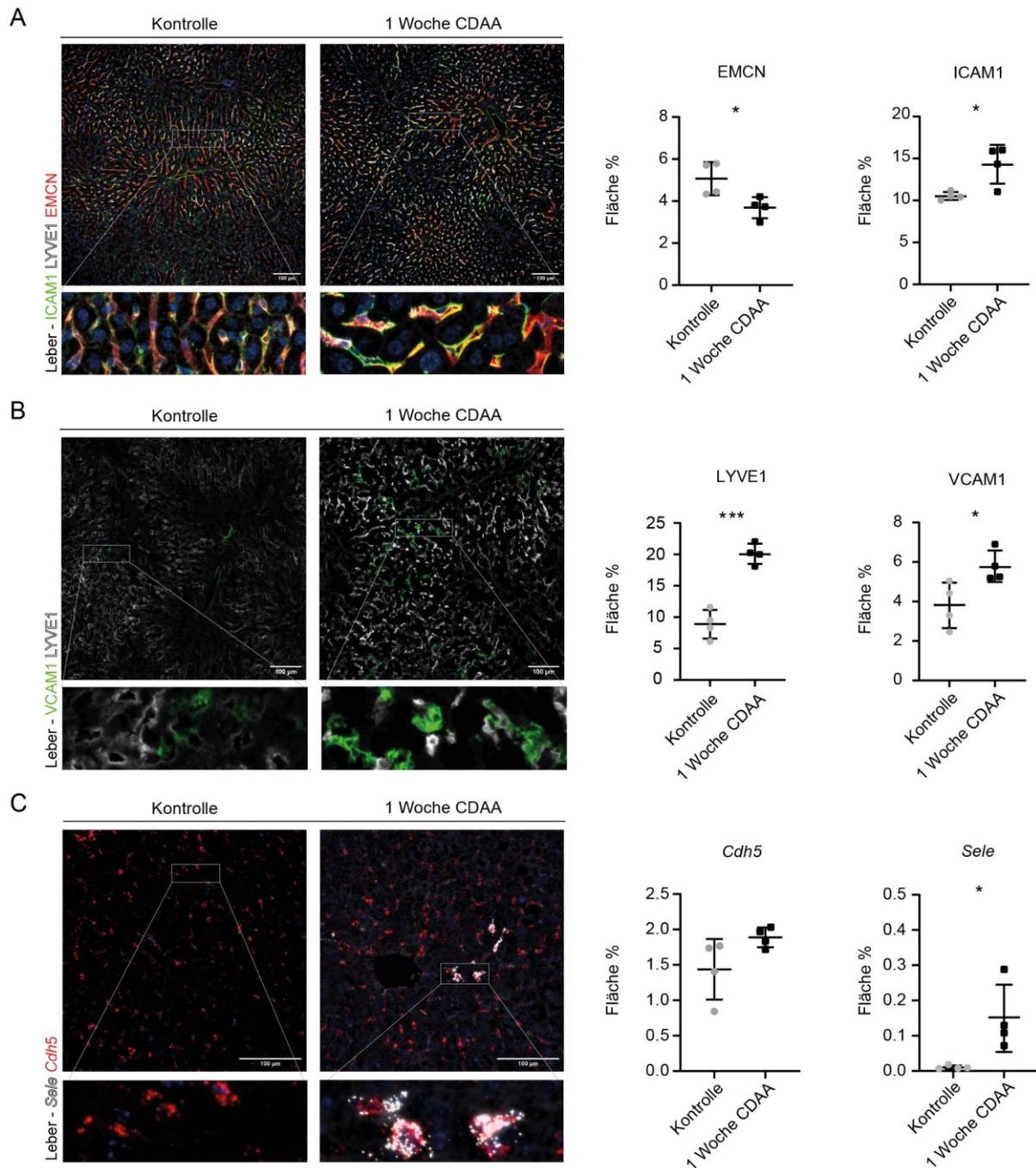


Abbildung 50: Immunfluoreszenz-Färbungen (IF) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) von Adhäsionsmolekülen und Endothelmarkern nach einer Woche CDAA in der Leber. (A – C) Hepatische Immunfluoreszenzfärbung und FISH (links) und Quantifizierung (rechts) von Adhäsionsmolekülen und Endothelmarkern nach einer Woche CDAA-Diät (n = 4 bei allen Färbungen). (A) ICAM1 (p = 0,0184), LYVE1 und EMCN (p = 0,0307). (B) VCAM1 (p = 0,034) und LYVE1 (p = 0,003). (C) FISH von *Cdh5* (n. s.) und *Sele* (p = 0,0273).

Den Verlust des LSEC-spezifischen Endothelmarkers Stabilin-2 konnte ebenfalls mittels Färbung nachgewiesen werden. Nach einer Woche CDAA kam es zu einem Verlust der Stabilin-2 positiven Fläche, während die Podocalyxin-positive Fläche unverändert blieb (Abbildung 51A). Bei CD31 bzw. PECAM1, ebenfalls ein Endothelmarker, nahm die positive Fläche in der CDAA-Gruppe signifikant zu, ebenso war die CD44-positive Fläche stark erhöht (Abbildung 51B).

4. Ergebnisse

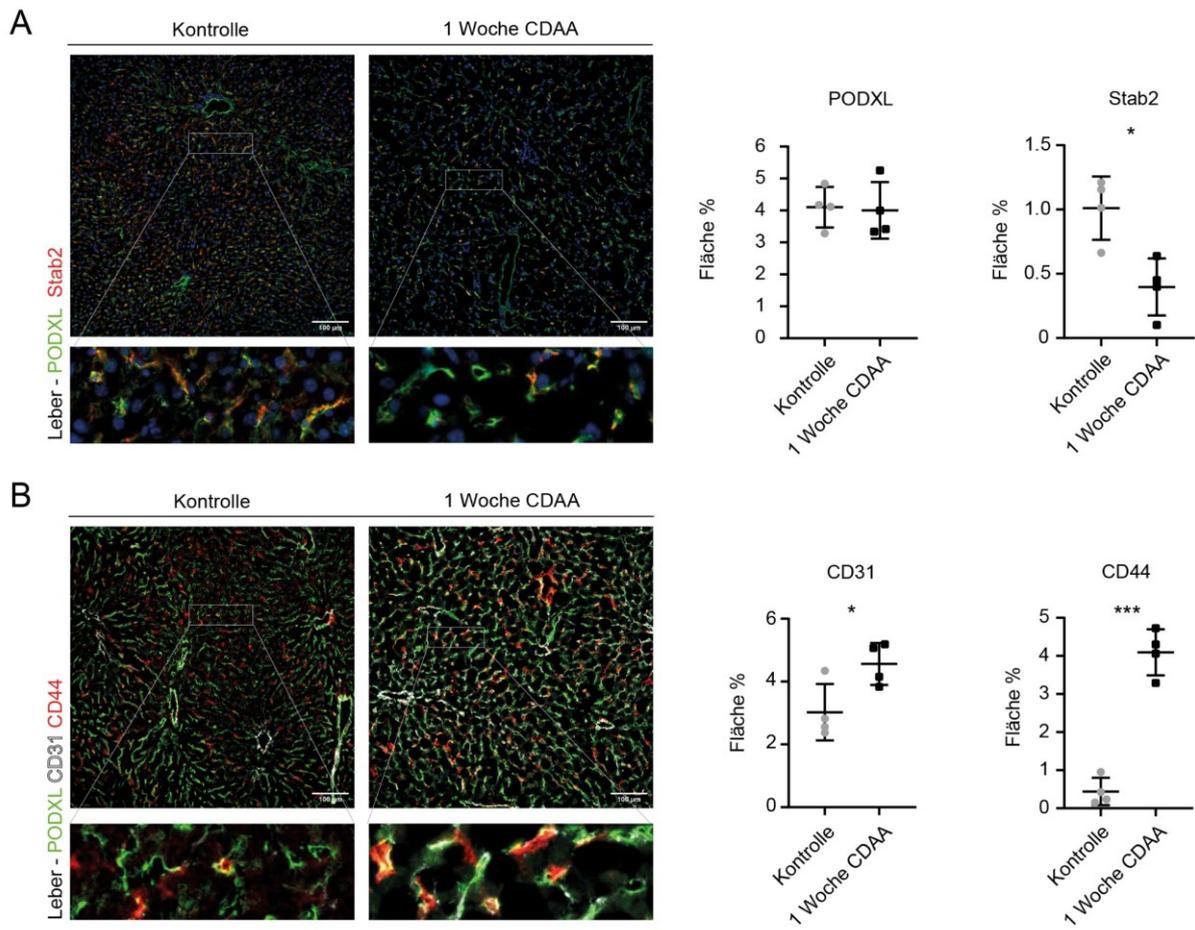


Abbildung 51: IF-Färbungen von weiteren Endothelmarkern nach einer Woche CDAA in der Leber. (A, B) Hepatische Immunfluoreszenzfärbung (links) und Quantifizierung (rechts) von Kapillarierungs- und Endothelmarkern nach einer Woche CDAA-Diät (n = 4 bei allen Färbungen). (A) PODXL und Stab2 (p = 0,0103). (B) PODXL, CD31 (p = 0,0337) und CD44 (p = 0,0002).

Zusätzlich wurden die Färbungen der Endothelmarker und Adhäsionsmoleküle nach einem Tag CDAA-Diät in der Leber wiederholt, um sicherzustellen, dass die Veränderungen erst nach einer Woche vorhanden sind. Dabei zeigten die Färbungen und die dazugehörigen Quantifizierungen, dass es nach einem Tag CDAA-Diät zu keinen Veränderungen bei den LSEC-Markern sowie bei den Adhäsionsmolekülen kommt. Auch die *in situ* Hybridisierung *Cdh5* und *Sele* zeigte keine Veränderungen (Abbildung 52A – D).

4. Ergebnisse

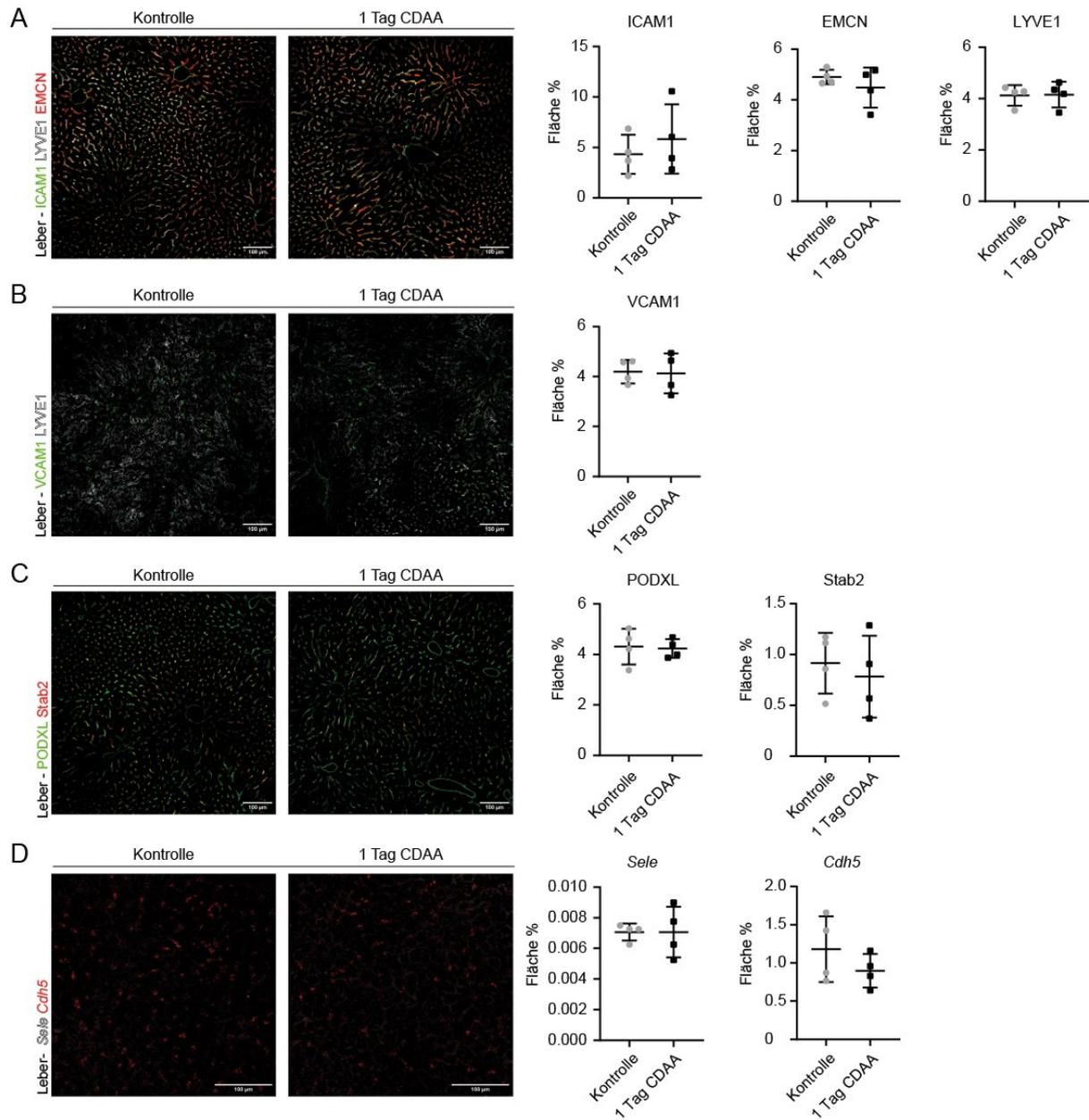


Abbildung 52: Immunfluoreszenz-Färbungen (IF) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) von Adhäsionsmolekülen und Endothelmarkern nach einem Tag CDAA-Diät in der Leber. (A – D) Hepatische Immunfluoreszenzfärbung und FISH (links) und Quantifizierung (rechts) von Adhäsionsmolekülen und LSEC-Markern nach einem Tag CDAA-Diät (n = 4 bei allen Färbungen). (A) ICAM1, LYVE1 und EMCN. (B) VCAM1 und LYVE1. (C) PODXL und Stab2. (D) FISH von *Cdh5* und *Sele*. Alle Quantifizierungen nicht signifikant.

Bei der Betrachtung der einzelnen signifikant regulierten Genlisten fiel auf, dass viele Makrophagengene nach einer Woche CDAA-Diät in den LSECs induziert wurden. Daher wurden die Gene der relevantesten Makrophagen der Leber aus den RNA-Seq-Daten in einer Heatmap dargestellt. Das Geneset wurde für diese Forschungsarbeit anhand von Literaturrecherchen erstellt. Diese zeigten ein deutliches Cluster in der CDAA-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 53).

4. Ergebnisse

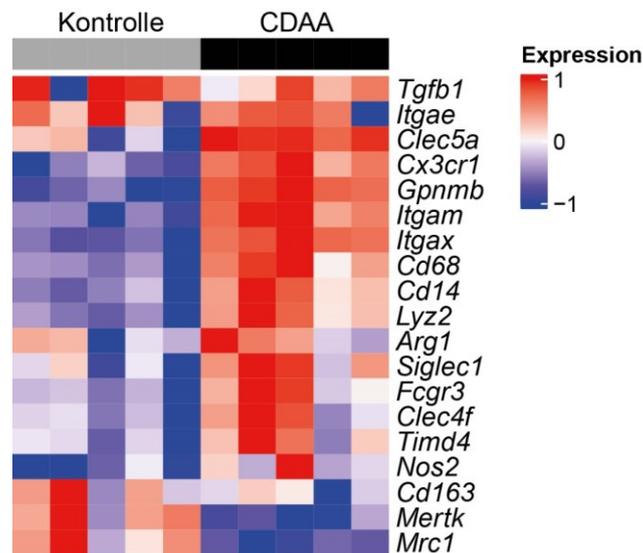


Abbildung 53: Heatmap mit Makrophagen-Genen nach einer Woche CDAA-Diät. Gezeigt sind 19 Makrophagen-Gene mit ihrem auf 1 normalisierten Expressionsniveau.

Im nächsten Schritt wurden daher die Makrophagen-Marker CLEC4F, ein Kupfferzell-Marker, und CD169 mittels Immunfluoreszenz-Färbung und *Gpnmb* zusammen mit endothelialen *Cadherin 5* mittels FISH nachgewiesen. GPNMB, ein Glykoprotein mit gegensätzlichem Einfluss auf das Tumorwachstum, war auf RNA-Ebene in Intensität und positiver Fläche signifikant erhöht, zeigte aber keine Kolo-kalisation mit *Cadherin 5* (Abbildung 54A). *Gpnmb* zeigte die stärkste Hochregulation in den RNA-Seq-Daten nach einer Woche CDAA-Diät. Auch CD169 zeigte eine signifikant erhöhte Intensität und Fläche. In der Kofärbung mit VCAM1 ergab sich eine partielle Überlappung beider Signale (Abbildung 54B). Die erhöhte Expression des Kupfferzell-Markers CLEC4F konnte ebenfalls durch die Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigt werden. Auch dieser zeigte in der Intensität und positiven Fläche eine verstärkte Expression (Abbildung 54C).

4. Ergebnisse

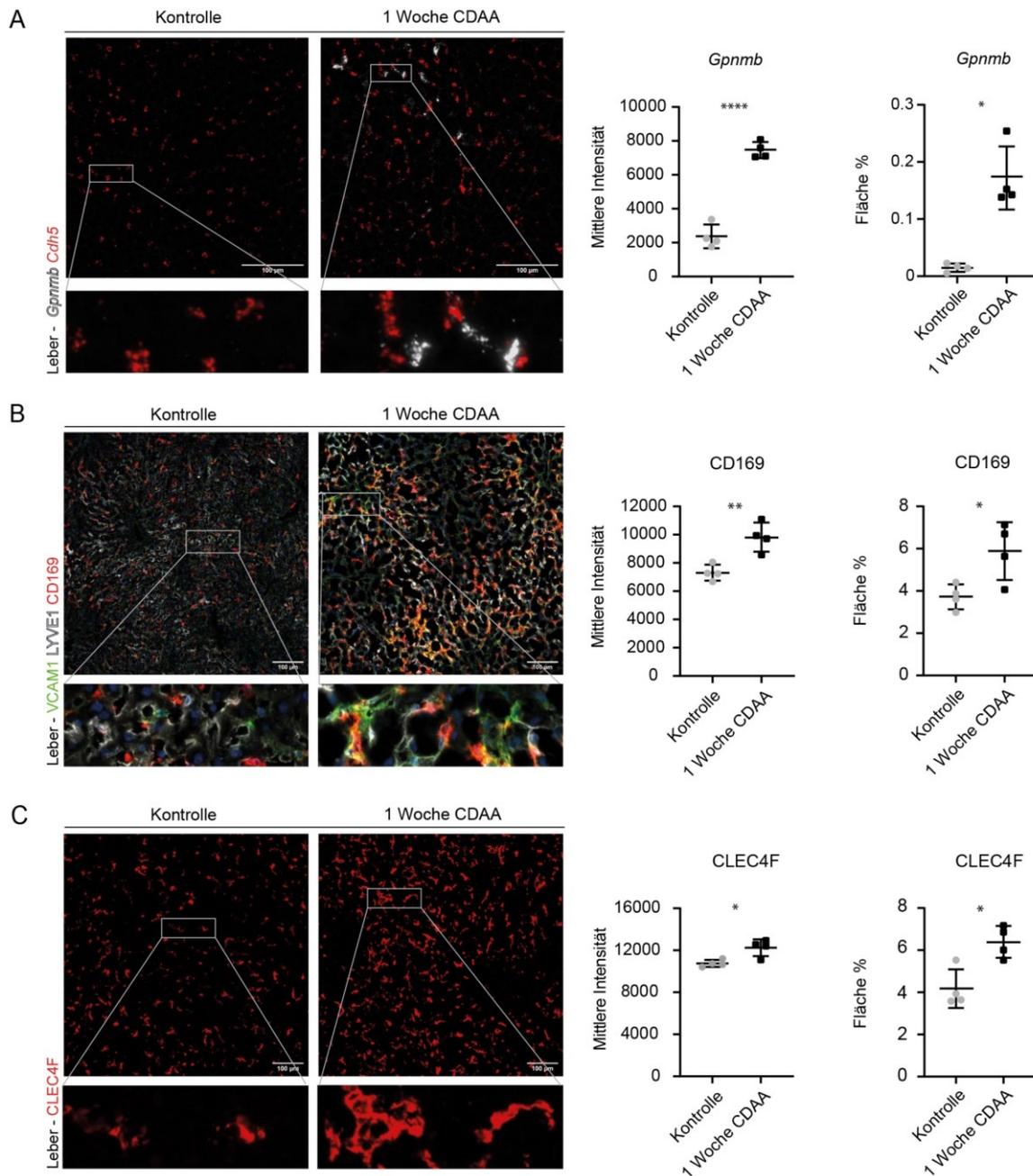


Abbildung 54: IF und FISH von Makrophagen- und Endothelmarkern nach einer Woche CDAA in der Leber. (A) FISH von *Gpnmb* (Mittlere Intensität $p < 0,0001$; Fläche $p = 0,01$) und *Cdh5*. (B, C) Immunfluoreszenz-Färbungen (linke Seite) und Quantifizierung (rechte Seite) von Makrophagen-Markern und Adhäsionsmolekülen nach einer Woche CDAA-Diät. (B) VCAM1, LYVE1 und CD169 (Mittlere Intensität, $p = 0,0092$; Fläche, $p = 0,0425$; $n = 4$). (C) CLEC4F (Mittlere Intensität, $p = 0,0258$; Fläche, $p = 0,0286$; $n = 4$).

Die gleichen Färbungen wurden an Leberschnitten von *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Mäusen durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der VCAM1-positiven Fläche im Vergleich zu den Cre-negativen Geschwisterkontrollen. Der für *Gata4*^{LSEC-KO/BL} typische, signifikante Verlust von LYVE1 wurde mit dieser Färbung bestätigt (Abbildung 55A) [94]. Zusätzlich wurden die beiden Makrophagenmarker F4/80 und CLEC4F gefärbt. Während CLEC4F keinen Unterschied zeigte, war F4/80 in der *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Gruppe signifikant erhöht (Abbildung 55B). Auch die

4. Ergebnisse

Endomucin-positive Fläche war signifikant erhöht, während das Adhäsionsmolekül ICAM1 das Signifikanzniveau nicht erreichte (Abbildung 55C).

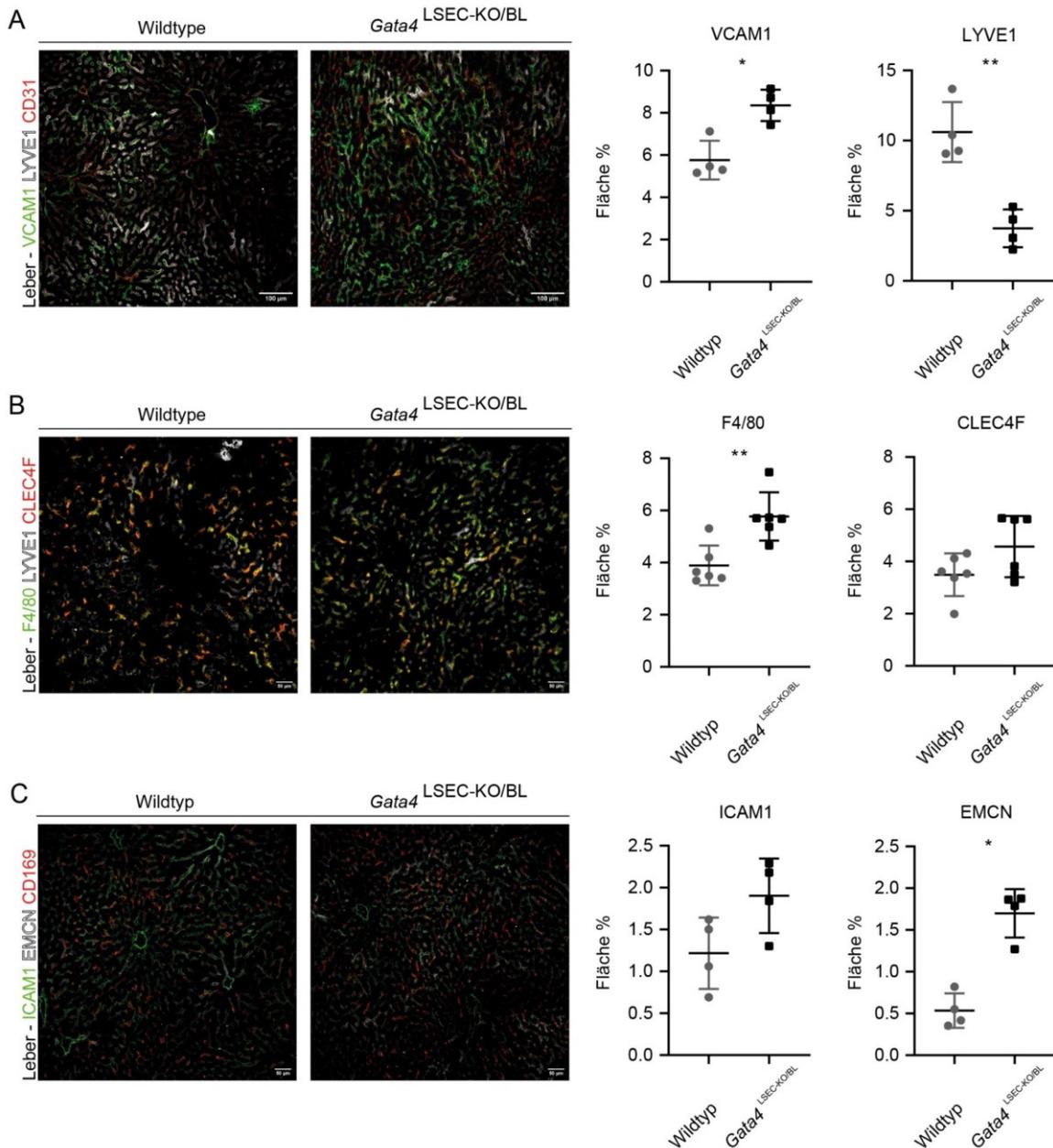


Abbildung 55: IF von Makrophagen-, Adhäsions- und Endothelmarkern in den Lebern von *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Mäusen. (A – C) Immunfluoreszenzfärbung (linke Seite) und Quantifizierungen (rechte Seite). (A) VCAM1, LYVE1 und CD31 (VCAM1 Fläche, p = 0,0286; LYVE1 Fläche, p = 0,0016; n = 4). (B) F4/80, CLEC4F und LYVE1 (F4/80 Fläche, p = 0,0033; CLEC4F Fläche, p = 0,3095; n = 4). (C) ICAM1, EMCN und CD169 (ICAM1 Fläche, p = 0,0679; EMCN Fläche, p = 0,0286; n = 4).

4. Ergebnisse

4.7 CDAA-induzierte Steatose fördert die hepatische Retention von Melanom- und Kolonkarzinomzellen

Erhöhte B16F10*Luc2*-Retention in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen

Zur Untersuchung der Relevanz von Adhäsionsmoleküle auf die Retention von Melanom- und Kolonkarzinomzellen in der hepatischen Nische, wurde ein Tumorzell-Retentions-Assay nach einem Tag, einer, zwei und zehn Wochen CDAA durchgeführt. Hierfür wurden B16F10*Luc2*-Zellen in die Milz der Mäuse injiziert und nach 90 Minuten die Zellretention in der Leber durch Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals gemessen (Abbildung 56).

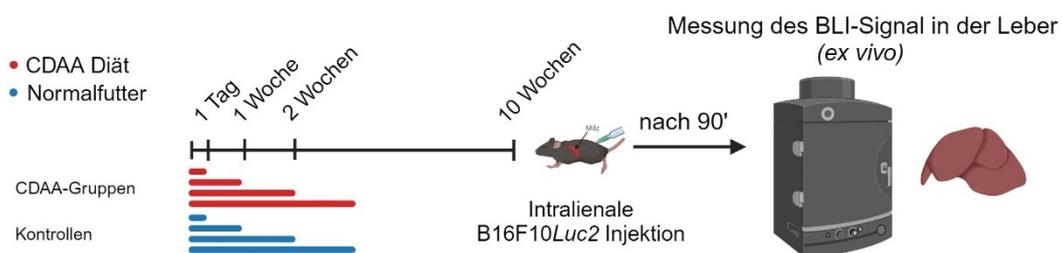


Abbildung 56: Schematischer Versuchsaufbau des B16F10*Luc2*-Zellretentions-Assays nach einem Tag, einer, zwei und zehn Wochen CDAA-Diät. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden für einen Tag sowie eine, zwei und zehn Wochen mit CDAA-Diät gefüttert. Anschließend wurden B16F10*Luc2*-Zellen in die Milz injiziert und das Biolumineszenz-Signal nach 90 Minuten in der Leber gemessen. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Die Auswertung und Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals zeigten bereits nach einem Tag CDAA-Diät ein signifikant erhöhtes Signal in den CDAA-gefütterten Lebern nach 90 Minuten (Abbildung 57A). Dasselbe Ergebnis zeigte sich bei allen weiteren Fütterungszeitpunkten, also einer Woche und zwei Wochen CDAA-Diät was einer frühen Steatose entspricht sowie nach zehn Wochen CDAA-Diät, was mit einer NASH-assoziierten Leberfibrose zu assoziieren ist (Abbildung 57B – D).

4. Ergebnisse

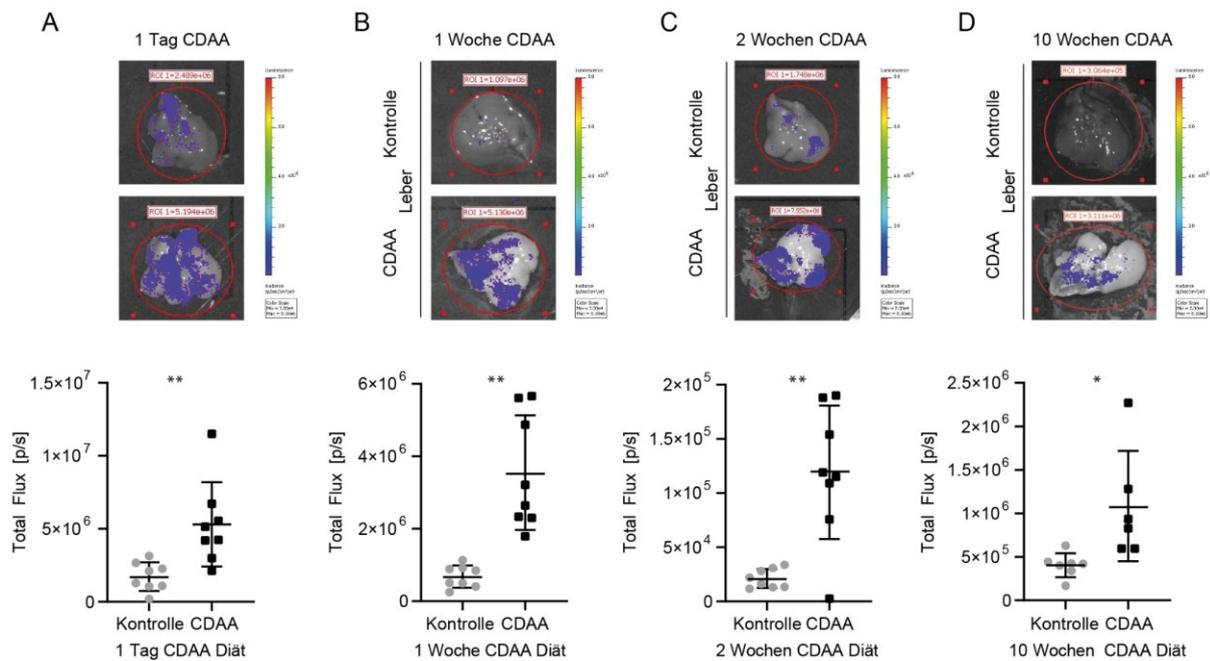


Abbildung 57: Makroskopische Aufnahmen der Lebern und Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals (A – D) Ex vivo BLI-Bilder von Lebern 90 Minuten nach der Zellinjektion. Skala: Min.: 7×10^4 (p/sec/cm²/sr); Max: 8×10^6 (p/sec/cm²/sr) und Quantifizierung des BLI-Signals der Lebern. Die Lebern wurden als ROI festgelegt, quantifiziert und die BLI-Signale wurden angezeigt. (A) Ein Tag, $p = 0,0094$ $n = 8$ vs. 8. (B) Eine Woche, $p = 0,0012$ $n = 8$ vs. 8. (C) Zwei Wochen, $p = 0,0027$ $n = 8$ vs. 8. (D) Zehn Wochen, $p = 0,0461$ $n = 7$ vs. 6.

Auch in diesem Versuchsteil wurde der geschlechtsspezifische Unterschied untersucht und der Retentions-Assay an männlichen Mäusen wiederholt. In den Lebern der Männchen war nach einer Woche CDAA-Diät ebenfalls ein erhöhtes Biolumineszenz-Signal in den Lebern sichtbar und quantifizierbar (Abbildung 58A – B).

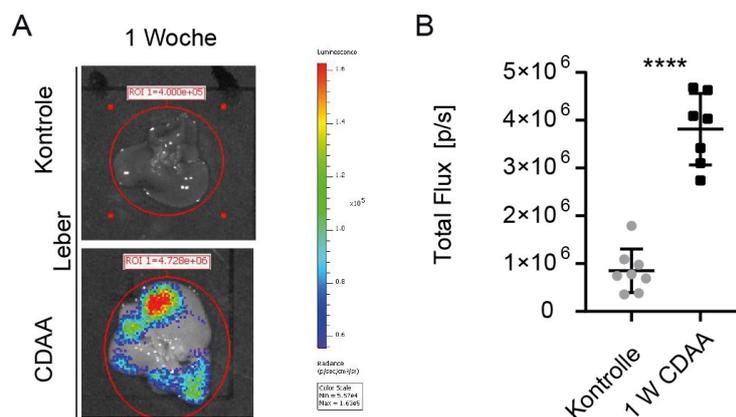


Abbildung 58: Makroskopische Aufnahmen der Lebern und Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals in Männchen. (A, B) Ex vivo BLI-Bilder von Lebern 90 Minuten nach der Zellinjektion. Skala: Min.: $5,57 \times 10^4$ (p/sec/cm²/sr); Max: $1,63 \times 10^5$ (p/sec/cm²/sr). Die Lebern wurden als ROI festgelegt und die BLI-Signale wurden angezeigt. (B) Quantifizierung des BLI-Signals in Lebern nach einer Woche, $p < 0,0001$, $n = 8$ vs. 7.

4. Ergebnisse

Erhöhte *Mc38Luc*-Retention in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen

Derselbe Retentions-Assay wurde mit *Mc38*-Zellen durchgeführt, die durch lentivirale Transduktion Luciferase exprimierten. Dadurch entstand die Zelllinie *Mc38Luc*. Für den Retentions-Assay wurden die Mäuse für eine Woche mit CDAA-Diät gefüttert und nach 90 Minuten die Retention in der Leber mittels Biolumineszenz gemessen, analog zu den anderen Retentions-Versuchen (Abbildung 59).

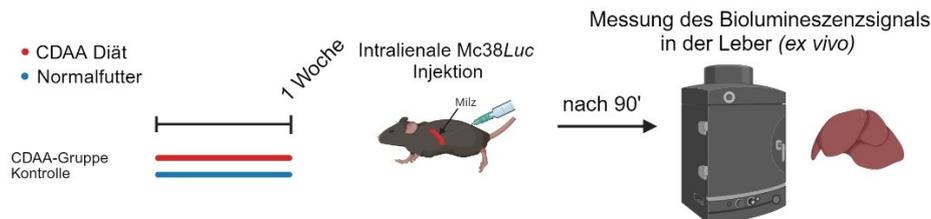


Abbildung 59: Schematischer Versuchsaufbau für den Retentions-Assay nach einer Woche CDAA-Diät und *Mc38Luc*-Zellen. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden für eine Woche mit CDAA-Diät gefüttert. Anschließend wurden *Mc38Luc* Zellen in die Milz injiziert und das Biolumineszenz-Signal 90 Minuten später in der Leber gemessen. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert.

Die BLI-Aufnahmen der Lebern zeigten nach einer Woche CDAA-Diät ein stärkeres Biolumineszenz-Signal in den CDAA-gefütterten Tieren im Vergleich zu Normalfutter-Kontrolle (Abbildung 60A), was anschließend durch die Quantifizierung des gemessenen Signals bestätigt wurde (Abbildung 60B).

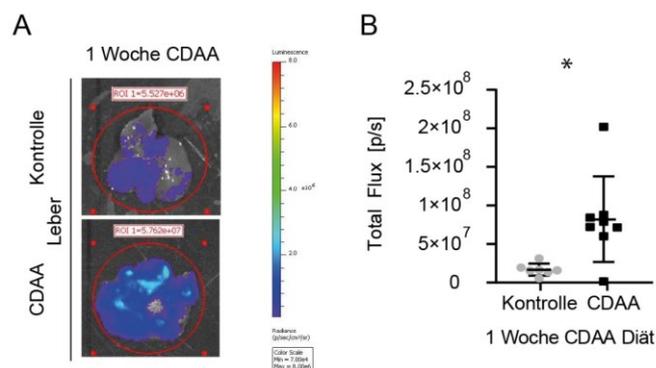


Abbildung 60: Makroskopische Aufnahmen der Lebern und Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals von *Mc38Luc*. (A) *Ex vivo* BLI-Bilder von Lebern 90 Minuten nach der Zellinjektion. Skala: Min.: 7×10^4 (p/sec/cm²/sr); Max: 8×10^6 (p/sec/cm²/sr). Die Lebern wurden als ROI festgelegt und die BLI-Signale wurden angezeigt. (B) Quantifizierung des BLI-Signals in Lebern nach einer Woche CDAA, $p = 0,014$, $n = 7$ vs. 8

5. Diskussion

5.1 Der Einfluss einer fibrotisch veränderten hepatischen vaskulären Nische auf die Metastasierung des malignen Melanoms

Lange Zeit ging die Wissenschaft davon aus, dass die Gefäße lediglich passive Transportwege darstellen. Mittlerweile weiß man jedoch, dass insbesondere die Endothelzellen der Gefäßinnenwände eine aktive Rolle bei verschiedenen Organfunktionen spielen [203]. Diese neuen Erkenntnisse haben das Verständnis der Gefäßphysiologie revolutioniert und die Forschung in neue Richtungen gelenkt. Insbesondere die hepatische vaskuläre Nische, die eine entscheidende Rolle bei Lebererkrankungen und der Metastasierung von Tumoren spielt, steht nun im Mittelpunkt zahlreicher Studien. Für die experimentelle Modifikation der hepatischen vaskulären Nische stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung, darunter verschiedene Diäten [204], die Verwendung von Noxen [205] oder genetische Modelle [206]. Um den Einfluss einer NASH-assoziierten Leberfibrose auf die Metastasierung des malignen Melanoms zu untersuchen, wurde in dieser Forschungsarbeit die CDAA-Diät genutzt. Durch den Mangel an Cholin kommt es zur Hemmung der Fettsäureoxidation, zu einem erhöhten oxidativen Stress und zu einer erhöhten Lipidsynthese, was zu einer, unter anderem von Kupferzellen vermittelten, Leberfibrose führt, ohne dabei eine Insulinresistenz oder veränderte Blutzuckerwerte zu bewirken [151]. Auch wurde *in vitro* gezeigt, dass die Supplementierung von Cholin die Seneszenz, Proliferation, Migration und Angiogenese von Endothelzellen verbessert [207]. Aufgrund dieses Effekts wurde in dieser Arbeit vermutet, dass ein diätetisch bedingter Cholinmangel nicht nur die Homöostase der Leber beeinflusst, sondern auch signifikante Auswirkungen auf die Funktion der LSEC hat und über diesen Weg die Metastasierung von Tumorzellen möglicherweise verändert.

Nach zehn Wochen CDAA-Diät wurden die Melanomzelllinien B16F10*Luc2* in die Milz und Wt31 in die Schwanzvene injiziert, um die Anzahl und Fläche der Metastasen in Leber und Lunge zu analysieren. Beide Zelllinien zeigten eine signifikante Zunahme der Lebermetastasen in der CDAA-Gruppe. Gleichzeitig nahm die Zahl der Lungenmetastasen bei der Wt31-Zelllinie im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Dies ist meines Wissens die erste Studie, die die metastasenfördernde Wirkung der CDAA-Diät auf Melanomzellen nachweist. Andere Diäten, die eine Leberfibrose hervorrufen, zeigen ähnliche Effekte. So zeigten Mäuse, die drei Monate lang mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, nach Injektion der Melanomzelllinie B16 ebenfalls eine verstärkte Metastasierung in die Leber. Die Autoren erklären, dass pathologische lipolytische Produkte, die durch mitochondriale Oxidation metabolisiert werden, das Tumorstadium fördern [208]. Um einen Einfluss der in der CDAA-Diät enthaltenen Fette bzw. der

5. Diskussion

damit verbundenen vermehrten hepatischen Lipidakkumulation als Hauptfaktor des Metastasenwachstums auszuschließen, wurden in einem weiteren Experiment zwei Gruppen mit CDAA gefüttert und die Zelllinien B16F10*Luc2* und Wt31 über den etablierten Weg injiziert. Eine CDAA-Gruppe wurde nach der Injektion mit CDAA weitergefüttert, während die andere Gruppe nach der Injektion auf Normalfutter umgestellt wurde. Dabei zeigte sich in beiden CDAA-Gruppen kein ausgeprägter Unterschied in Anzahl und Fläche der Metastasen, dennoch wiesen beide Diätgruppen im Vergleich zur Normalfutterkontrolle mehr Metastasen auf. Daraus konnte geschlossen werden, dass die kontinuierliche CDAA-Diät während des Metastasenwachstums keinen zusätzlichen Einfluss hat und die metastasenverstärkende Wirkung vor der Injektion durch die Nischenveränderungen im Rahmen der zurückliegenden CDAA-Diät aufgetreten sein muss. Daher ist die Konditionierung der hepatischen vaskulären Nische durch die CDAA-Diät zum Zeitpunkt der Injektion der entscheidende Faktor. Für alle weiteren Versuche wurde daher mit der Injektion der Tumorzellen kein CDAA-Futter mehr gefüttert und die Tiere auf Normalfutter umgestellt.

Qi et al. nutzten CCl₄ als Leberfibrose-Model um die B16F1-Metastasierung zu untersuchen [177]. Um die Leberfibrose zu induzieren, behandelten sie Mäuse für acht bis zehn Wochen mit CCl₄ und injizierten die B16F1-Zellen in die Portalvene. Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigte die CCl₄ Gruppe einen massiven Anstieg an hepatischen Metastasen. Sie führten dieses Ergebnis auf eine Hochregulation von verschiedenen Adhäsionsmolekülen wie VCAM1, ICAM1 und E-Selektin zurück. In einem anderen Experiment mit Mc38-Kolorektalkarzinomzellen, die nach 16 Wochen Western Diät (WD) injiziert wurden, waren Anzahl und Größe der Metastasen im Vergleich zu den Kontrollen jedoch deutlich geringer, obwohl eine Leberfibrose vorlag [209]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine Steatose oder NASH-assoziierte Leberfibrose möglicherweise kein universelles Tumorwachstum fördert, sondern nur tumorspezifische stimulierende Effekte hat. Tatsächlich konnte diese Beobachtung durch zusätzliche Experimente mit Mc38-Kolorektalkarzinomzellen nach zehn Wochen CDAA-Diät bestätigt werden. In diesem Versuch konnte nach zehn Wochen CDAA-Diät mit der Kolonrektalkarzinom-Zelllinie Mc38 im Vergleich zu beiden Melanomzelllinien B16F10*Luc2* und Wt31 keine verstärkte Metastasenbildung in den CDAA-gefütterten Lebern festgestellt werden. Das Ergebnis deckt sich allerdings nicht ganz mit den Ergebnissen der oben genannten Forschungsgruppe [209]. Sie hat nachgewiesen, dass Dickdarmkrebszellen weniger Metastasen bilden, wenn eine NASH-assoziierte Leberfibrose vorliegt. Jedoch wurde in dieser Studie eine WD verwendet. Über den IL-6 vermittelten STAT3-Signalweg kommt es zu einer geringeren Expression von SAA und MMP9, was die Bildung einer prämetastatischen Nische verhindern könnte. Zusätzlich zeigte eine andere Studie beim Menschen, dass Patienten mit kolorektalem Karzinom und einer Fettleber weniger Metastasen in der Leber zeigen und eine höhere 5-Jahres-Überlebensrate haben [210].

5. Diskussion

Interessanterweise konnte diese erhöhte Metastasierung der B16F10*Luc2*-Zelllinie auch in einem genetischen Mausmodell, der *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Mauslinie nachgewiesen werden, in dem nur eine NASH-ähnliche Leberfibrose, aber keine Steatose vorlag. Genetisch veränderte Mäuse, bei denen die LSEC-spezifische GATA4-Expression fehlt, zeigen ein verändertes transkriptomisches Profil, das dem der LSEC von Mäusen, die zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert wurden, ähnlich ist [94]. Mit dieser Mauslinie war es möglich, ein genetisches Fibrosemodell ohne die Nebenwirkungen einer diätetischen Methode zu verwenden. Grundlage hierfür war unter anderem die von unserer Arbeitsgruppe publizierte Untersuchung der GATA4 nachgeschalteten Gene. Ohne GATA4 kommt es zu einer MYC-Aktivierung und damit zu einer erhöhten profibrotischen angiokrinen Signalübertragung über endotheliales PDGFB [94]. Die GATA-abhängigen herunterregulierten Gene haben eine nachgewiesene Rolle bei der Leberfibrose, so wie GPR182, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor dessen Expression bei einer Leberfibrose verloren geht [211]. Die reduzierte Expression von CLEC4G, das Mitglied G der C-Typ-Lektindomänenfamilie 4, korreliert möglicherweise mit einer Kapillarisation der LSEC in humanen Proben [212]. Schaltet man mittels induzierbarer Cre-Aktivität den Transkriptionsfaktors Maf an einem frühen Zeitpunkt der murinen Embryonalentwicklung aus, so verhindert dies eine normale Leberentwicklung und die LSEC differenzieren sich nicht in bekanntem Maße aus [213]. Diese GATA4 nachgeschalteten Gene sind auch nach einer Woche CDAA-Diät herunterreguliert. Somit scheint auch die rückgekreuzte LSEC-spezifische *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Mauslinie in Bezug auf die frühen genetischen perisinusoidalen Veränderungen mit denen nach einer Woche CDAA-Diät sehr gut vergleichbar zu sein. Durch IF-Färbungen konnte bei der *Gata4*^{LSEC-KO/BL} auch eine signifikante Hochregulation von VCAM1 gezeigt werden, das die Metastasenbildung positiv unterstützen könnte. Bei ICAM1 zeigte sich eine Tendenz zu mehr positiver Fläche bei der Knockout-Maus, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Im Metastasierungsexperiment führte die Injektion von B16F10*Luc2*-Zellen in die Milz auch in *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Mäusen zu einer erhöhten Anzahl von Metastasen und einer größeren metastatischen Fläche in der Leber. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die perisinusoidale Leberfibrose, unabhängig von ihrer Pathogenese, sei sie CDAA-induziert oder durch die LSEC-spezifische Deletion von GATA4 hervorgerufen, das metastatische Potential bestimmter Melanomzellen fördern kann. Umgekehrt könnten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuten, dass die GATA4-Signaltransduktion eine schützende Rolle sowohl gegen Leberfibrose als auch gegen die Metastasierung von Melanomen in die Leber spielen könnte.

5.2 Charakterisierung der pathologischen Leberveränderungen in den Anfangsstadien der Lebersteatose

Die Entwicklung der NASH-assoziierten Leberfibrose ist ein schleichender und schrittweise erfolgender Prozess. Der erste Schritt ist eine Steatose, also eine Verfettung der Leber ohne Entzündungszeichen. Besteht die Verfettung über einen längeren Zeitraum, kommt es zusätzlich zu einer Entzündung, der so genannten Steatohepatitis. Diese frühen Stadien der NASH sollten durch kürzere Fütterungszeiten der CDAA-Diät weiter untersucht werden. Es zeigte sich, dass bereits nach eintägiger CDAA-Fütterung Veränderungen in der Leber auftraten, die sich in einem erhöhten Lebergewicht und einem erhöhten Leber-zu-Körpergewichtsverhältnis widerspiegelten. Außerdem kommt es nach einem Tag CDAA-Fütterung zu einer deutlichen Fetteinlagerung in die Leber, die sich nach einer Woche zu einer manifesten Steatose entwickelt. Bleibt die Entzündung weiterhin bestehen, so kommt es zur Aktivierung von Sternzellen, die die Bildung einer abnormalen extrazellulären Matrix induzieren und es entwickelt sich eine Leberfibrose [214]. In dieser Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass eine vierwöchige Fütterung mit CDAA nicht ausreicht, um eine Fibrose zu induzieren, was durch die Pikro-Sirius-Rot-Färbung nachgewiesen werden konnte. Eine Arbeit zu hepatischen Veränderungen bei der CDAA-Diät bestätigte dies und zeigte, dass fibrotische Veränderungen, ebenfalls nachgewiesen durch Pikro-Sirius-Rot-Färbungen, erst nach acht Wochen CDAA-Diät vorhanden waren. Es gab dabei keine Veränderung des Körpergewichts, aber eine signifikante Erhöhung des Leber-zu-Körpergewichts Verhältnisses. Die Analyse der Blutplasmawerte zeigte keine Erhöhung der Triglyzeridkonzentration im Blut, jedoch eine Erhöhung des Cholesterinspiegels, was mit den Daten dieser Arbeit übereinstimmt [215].

Da die CDAA-Charakterisierung eine sehr schnelle und ausgeprägte Fettakkumulation in der Leber zeigte, erschien es notwendig, die Rolle der hepatischen Lipide auf die Metastasierung zu klären, weshalb ein zusätzliches, noch fettreicheres Fütterungsmodell verwendet wurde. Viele Studien weisen darauf hin, dass Adipositas und eine hohe hepatische Lipidkonzentration einen negativen Einfluss auf das Metastasierungsverhalten verschiedener Krebsarten haben. Calle et al. zeigen in einer epidemiologischen Studie, dass Adipositas positiv mit der Mortalität der meisten Krebsarten, wie Darmkrebs oder das maligne Melanom, korreliert [216]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine fettreiche Diät verwendet und die frühen hepatischen Veränderungen charakterisiert. Interessanterweise zeigten die Mäuse nach kurzen Fütterungsperioden mit HFD keine Zunahme des Körper- und Lebergewichtes, was mit den Ergebnissen einer anderen Veröffentlichung übereinstimmt [217]. Die ORO-Färbung bestätigte die frühe Lipidakkumulation in der Leber, was durch eine Flächenquantifizierung und

5. Diskussion

Analyse der hepatischen Triglyzerid-Konzentration untermauert werden konnte. Bei den gemessenen Blutwerten zeigten nur die Cholesterinwerte eine Veränderung, alle anderen Werte blieben unverändert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kürzere Fütterungszeiträume mit HFD und CDAA gute Ansätze darstellen, um das Metastasierungsverhalten von Krebsarten, insbesondere des malignen Melanoms in steatotischen Lebern ohne fibrotische Veränderungen, zu untersuchen.

5.3 Frühe Lebersteatose unter CDAA-Diät fördert die Metastasierung von B16F10*Luc2*-Melanomzellen

Aufgrund der Beobachtung, dass nach einem Tag CDAA-Diät eine Lipidakkumulation und nach einer Woche Anzeichen einer frühen Steatose in der Leber auftreten, wurden die Tumorexperimente mit B16F10*Luc2* und Wt31 mit den zuvor analysierten kurzen CDAA-Fütterungszeiten mit Standardfütterung nach Injektion wiederholt. Interessanterweise scheint diese tumorzellenspezifische Wachstumsförderung nur auf eine Subpopulation von Melanomzellen übertragbar zu sein, denn eine verstärkte Metastasenbildung wurde nur nach kürzeren Fütterungszeiten von einer, zwei und vier Wochen CDAA-Diät bei B16F10*Luc2*-Melanomzellen, nicht aber bei Wt31-Zellen beobachtet. Bei beiden handelt es sich um murine Zelllinien die aus Melanomen stammen, sich jedoch in der Art und Weise, wie und wo sie Metastasen ausbilden unterscheiden. Wohlfeil et al. charakterisierten beide Melanomzelllinien auf ihr Metastasierungsverhalten hin und untersuchten die gebildeten Metastasen morphologisch. B16F10*Luc2*-Zellen sind über die Lunge passagierende B16F1-Melanomzellen aus der Maus, welche über die Milzinjektion nur in die Leber metastasieren [218]. Sie haben eine mittlere hepatische Kolonisationseffizienz und bilden Metastasen ohne große CD31-positive Gefäße, aber mit vielen Nekrose-Arealen aus. Des Weiteren konnten mittels cCasp3-Färbungen im Zentrum zahlreiche apoptotische Zellen gezeigt werden. Wt31-Zellen enthalten eine humane NRAS-Mutation und metastasieren sowohl nach intravenöser als auch nach intralientaler Injektion in die Leber mit einer höheren Kolonisierungseffizienz als B16F10*Luc2* [200, 219]. Nach intravenöser Injektion von Wt31-Zellen bilden sich zusätzlich Metastasen in Lunge, Milz und Nieren. Darüber hinaus vaskularisieren Wt31-Metastasen sehr stark und entwickeln in den Metastasen so gut wie keine Nekrosen, was zusammen positiv korreliert [220]. Eine RNA-Seq-Auswertung der beiden Zelllinien ergab außerdem, dass B16F10*Luc2*-Zellen höhere Expressionswerte bestimmter Adhäsionsmoleküle aufweisen. Dazu zählten die α -Integrin Untereinheiten 2b, 5, 7, 9, 10, sowie β -Integrin 2, 3 und das aktivierte Leukozyten-Zelladhäsionsmolekül, was ihre Adhäsion an extrazelluläre Matrixkomponenten erleichtert. Im Vergleich zu Wt31-Zellen waren

5. Diskussion

die α -Integrin Untereinheiten 1, 2, 3, 4 und 8 in B16F10*Luc2*-Zellen herunterreguliert [219]. Die Expression von Integrin $\alpha 2$ war bei leberpassagierten B16-Melanom-Sublinien signifikant erhöht. Dies führte zu einer verstärkten Kolonisierung der Leber durch Interaktionen mit Kollagen Typ IV, nicht jedoch der Lunge [221]. Die vorliegenden Unterschiede in der Genexpression dieser Melanomzellen können ihr Metastasierungspotenzial in die Leber unter pathologisch veränderten Bedingungen, wie sie bei der CDAA-Diät vorliegen, beeinflussen und damit einen möglichen Erklärungsansatz liefern. Ebenfalls wurde der Effekt der einwöchigen CDAA-Diät auf das Metastasenwachstum der Mc38-Zelllinie getestet, welche im Ergebnis zwar eine starke Besiedelung der Leber zeigte, es aber keinen Unterschied zwischen CDAA- und Standard-Fütterung gab. Diese Beobachtung verdeutlicht einen kritischen Punkt: Die Auswirkungen von ernährungsbedingten Veränderungen der hepatischen Mikroumgebung auf die Extravasation und Kolonisierung von Tumorzellen sind in hohem Maße tumorzellspezifisch. Die CDAA-Diät fördert die Metastasierung von B16F10*Luc2*-Melanomzellen bereits zu früheren Fütterungszeiten, während sie bei Mc38-Krebszellen keine vergleichbaren Effekte zeigt. Dies verdeutlicht, dass es neben den bereits bekannten, zelltypspezifischen Faktoren weitere, für die Bildung von Lebermetastasen bei verschiedenen Krebsarten verantwortliche Faktoren gibt.

Da die HFD eine ähnlich frühe steatotisch veränderte, vaskuläre Nische zeigte, erfolgte auch hier eine Untersuchung auf das Metastasierungsverhalten von Melanomzellen. Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass eine HFD das Metastasierungsverhalten von Krebszellen beeinflusst. Eine koreanische Arbeitsgruppe fütterte Mäuse über einen Zeitraum von 16 Wochen mit HFD und injizierte B16F10*Luc2*-Zellen in die Haut. Nach zwei Wochen konnte ein verstärktes Tumorstadium mit einer verstärkten Lymphangiogenese im Tumor und in den Lymphknoten gezeigt werden [222]. Li et. al. nutzten eine 12-wöchige HFD und injizierten sowohl die murine Brustkrebszelllinie Bo1 also auch die murine Melanomzelllinie B16 in die Portalvene, was unserer Tumorzell-Applikation sehr nahekommt [208]. Auch diese Gruppe konnte eine verstärkte Metastasierung bei beiden Zelllinien in die Leber beobachten. Auf der Grundlage dieser Veröffentlichungen und der beobachteten Lipidakkumulation in der Leber nach kürzeren HFD-Fütterungszeiten wurden in der vorliegenden Arbeit Metastasierungsexperimente auch mit einer fettreicheren Diät durchgeführt. Diese HFD-Experimente ergaben nach zwei und vier Wochen Fettdiät kein verstärktes Wachstum von Melanommetastasen in den Diät-Gruppen. Nach zwei Wochen Fettdiät waren in der Diätgruppe weniger Metastasen vorhanden verglichen mit der Kontrollgruppe. Daraus kann abgeleitet werden, dass die starke Lipidakkumulation in der Leber nach einer CDAA-Diät nicht der Haupteffekt für das ausgeprägte Metastasenwachstum sein kann.

5.4 Endotheliale Genveränderungen bei früher Lebersteatose unter CDAA-Diät

Für die Bildung von Metastasen in entfernten Organen ist es entscheidend, dass die im Blut frei zirkulierenden Tumorzellen am Ort der Metastasierung zurückgehalten werden oder sie aktiv adhären, also aus dem Gefäßlumen in das Gewebe einwandern können (Extravasation) und das primäre Tumorgewebe in der neuen, perivaskulären Nische überlebt [223]. Da das Sinuslumen der Leber durch spezifische Endothelzellen ausgekleidet ist, welche die erste Kontaktschicht zum Blut hin bilden [224], ist deren Expressionsprofil in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung. Daher wurden LSEC nach einem Tag und nach einer Woche CDAA-Diät isoliert und das mRNA-Expressionsprofil mit der jeweiligen Normalfutter-Gruppe verglichen. Nach einem Tag CDAA-Diät zeigte sich keine signifikante Veränderung von einzelnen Genen. Allerdings zeigte der Enrichment-Plot einen teilweisen Verlust von LSEC-spezifischen Genen, was für eine sehr schnelle Adaption der LSEC an die vorherrschende Nährstoffsituation im Blut spricht. Nach einer Woche zeigte sich, dass in der mit CDAA-Diät gefütterten Gruppe mehr Gene signifikant hoch- als herunterreguliert wurden. Dies würde das Ergebnis von Miyao et al. unterstützen, dass es bereits nach einer Woche CDAA zu weitreichenden Veränderungen, wie einer ausgeprägten Steatose und dem Verlust von Fenestrations kommt, was bereits auf eine Kapillarisation hindeutet [44]. Die Daten dieser Arbeit zeigten in den isolierten LSECs transkriptomische Veränderungen, insbesondere in Bezug auf LSEC-spezifische Gene und Adhäsionsmoleküle. Die Heatmaps mit LSEC- und CEC-spezifischen Genen zeigten einen deutlichen Verlust von LSEC-Genen im Vergleich zur Normalfutterkontrolle sowie eine mäßige Induktion von Genen, welche für kontinuierliche Endothelzellen (CEC) spezifisch sind und für eine frühe Kapillarisation sprechen. Relevant ist dabei, dass LSEC einen wichtigen Einfluss auf die Leberhomöostase haben, was schon in vielen Publikationen gezeigt wurde. So konnten Schledzewski et. al zeigen, dass ein Verlust von Stabilin-1 und -2 zu einer perisinusoidalen Leberfibrose, glomerulofibrotische Nephropathie und eine verringerte Überlebensrate bei Mäusen führt [72, 225]. Stabilin-1 und -2 sind die am stärksten exprimierten Gene von LSEC und gehören zur Klasse H der Scavenger-Rezeptoren und sind damit an der Endozytose von verschiedenen Pathogenen und LDL beteiligt. Fluoreszenz-Färbungen von hepatischem Gewebe nach einer Woche CDAA-Diät bestätigten den Verlust von Stabilin-2 in LSEC.

Nicht eindeutig ist hingegen die Auswertung der CEC-spezifischen Gene. Hier kam es nur teilweise zu einer Induktion, während etwas weniger als die Hälfte keine erhöhte Expression zeigten. Auffällige Marker sind hier CD34, ein Antigen, welches auf kontinuierlichem und ka-

5. Diskussion

pillarisiertem Endothel exprimiert wird, oder Angiopoetin-2 sowie VEGF-A, welche synergistisch zueinander wirken. Beide haben eine wichtige Rolle bei der Regulation der Blutgefäßbildung und Gefäßpermeabilität, was einen Effekt auf die Tumorprogression haben kann. Auch tauchen hier Adhäsionsmoleküle wie VCAM1 und E-Selektin auf, welche vor allem bei entzündlichen Reaktionen verstärkt exprimiert werden [78, 226]. Zusätzlich konnte durch Färbungen die verstärkte Expression von CD31 in der Leber nach CDAA-Fütterung und einen signifikanten Anstieg der CD31-positiven Fläche in der gefütterten Leber nachgewiesen werden. Dieser Marker deutet auf eine beginnende Kapillarisation hin [227]. All diese Marker und Expressionswerte bestärken die Hypothese, dass die CDAA-Diät nach einer Woche Fütterung einen weitreichenden Einfluss auf die Integrität von LSEC hat und sich eine veränderte Nische beginnt zu bilden, in welche Krebsarten wie das maligne Melanom gut adhären und wachsen können.

5.5 Identifizierung hochregulierter endothelialer Adhäsionsmoleküle bei früher Lebersteatose unter CDAA-Diät

Eine lediglich beginnende Kapillarisation nach einer Woche CDAA-Diät erklärt die erhöhte Metastasierung in die Leber jedoch nur unzureichend. Damit Tumorzellen effizient in entfernten Organen in der prämetastatischen Nische wachsen können, müssen diese im Zielorgan ausreichend lange und effektiv zurückgehalten werden. Dabei sind Oberflächenmoleküle wie Zelladhäsionsmoleküle von besonderer Bedeutung [228]. Eine Analyse der in LSEC nach einwöchiger CDAA-Diät veränderten Gene ergab, dass das Genset der Zelladhäsionsmoleküle das am zweitstärksten aktivierte Genset war, was durch ein Plotdiagramm und einen Enrichment-Score von 2,3 bestätigt wurde. Das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül VCAM1 wird hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert und durch inflammatorische Zytokine induziert und hochreguliert, wodurch es bei entzündlichen Lebererkrankungen, und im speziellen auch bei NASH in höheren Konzentrationen nachweisbar ist [78, 228, 229]. Unter physiologischen Bedingungen spielt es eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten, wodurch es im Umkehrschluss bei entzündlichen Erkrankungen der Leber hochreguliert wird. Als Adhäsionsmolekül hat es eine kritische Rolle bei der Bildung von Metastasen bei verschiedenen Krebsarten, unter anderem beim malignen Melanom [176]. Chen et al. konnten zeigen, dass VCAM1 im Gewebe von Lungenkrebs vermehrt exprimiert wird und dass eine Antikörper-vermittelte Blockade von VCAM1 die Proliferation und Invasion von Krebszellen vermindert. Dabei interagiert $\alpha 4$ -Integrin auf Tumorzellen mit VCAM1 auf Endothelzellen, wodurch die Extravasation und Metastasierung erleichtert wird [230, 231]. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zeigen in VCAM1 einen starken Kandidaten, der unter allen positiv regulierten Genen zu den 30 am

5. Diskussion

stärksten regulierten Genen gehörte. Durch Immunfluoreszenzfärbung konnte die hochregulierte Expression auf Proteinebene und auf LSEC nachgewiesen werden. Dies wurde durch eine erhöhte VCAM1-positive Fläche und einer Ko-Lokalisation mit dem LSEC-Marker LYVE1 gezeigt. Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression von ICAM1, dem interzellulären Zella-dhäsionsmolekül, auf LSEC nach CDAA-Diät sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene durch die Färbungen nachgewiesen werden. ICAM1 besitzt eine physiologische Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten und ermöglicht deren transzelluläre oder parazelluläre Migration [232, 233]. Eine spanische Gruppe schreibt ICAM1 eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Metastasierungskaskade zu, welches die Progression des Tumors entscheidend beeinflusst. Relevant ist dabei vor allem die Bindung von Liganden an ICAM1 auf den LSEC, da dies zur Aktivierung mehrerer Signalwege führt, welche eine Schlüsselrolle bei verschiedenen Stadien der Bildung von Metastasen haben [234]. Wohlfeil et al. konnten zeigen, dass eine LSEC-spezifische Überaktivierung von Notch zu einer verminderten Tumorzelladhäsion führt, die durch eine verminderte Expression von ICAM1 erklärt wird. Die Blockade von intrahepatischem ICAM1 durch monoklonale Antikörper in Wildtyp-Mäusen führte zu einer reduzierten Adhäsion von Melanomzellen in der Leber [178]. Während oben beschriebene Adhäsionsmoleküle der Immunoglobulin Superfamilie angehören, gibt es noch einige weitere, wie Selektine. Nach einer Woche CDAA-Diät tauchten vor allem E- und P-Selektin auf. Während P-Selektin auf aktivierten Plättchen und Endothelzellen gebildet wird, wird E-Selektin nur auf aktivierten Endothelzellen exprimiert [235]. Da Tumorzellen oft Kohlenhydratdeterminanten auf ihrer Oberfläche tragen, die gleichzeitig als Selektinliganden fungieren, können leicht Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Selektin-exprimierenden Zellen auftreten. Während der Entzündungsreaktionen kommt es zu einer Selektin-vermittelten Extravasation von Leukozyten weshalb vermutet wird, dass Tumorzellen über denselben Mechanismus die Extravasation erleichtert wird. Biancone et al. haben gezeigt, dass die Expression von E-Selektin die Bildung von Metastasen im Körper steuern kann [236]. Die Verteilung von Metastasen wurde in zwei transgenen Mäusen mit Wildtyp-Mäusen und B16F10-Melanomzellen untersucht und verglichen. Während die Gruppe der transgenen Mäuse E-Selektin konstitutiv auf allen Körperzellen bildete, exprimierte die andere transgene Gruppe eine lösliche Form nur in der Leber. Bei den Wildtyp-Mäusen führte eine B16-Injektion nur zu Lungenmetastasen, während bei den beiden transgenen Gruppen die Metastasen nur in den E-Selektin-exprimierenden Bereichen auftraten, zum Beispiel in der Leber. Die Gruppe um Biancone schlussfolgerte daraus, dass die gewebsspezifische Expression von E-Selektin die Metastasenbildung steuern kann.

Außerdem fiel CD44 auf, welches unter CDAA-Diät von LSEC verstärkt exprimiert wurde. Dies konnte ich sowohl mittels RNA-Seq-Daten als auch mit Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen. CD44 ist ein Nicht-Kinase-Transmembran-Proteoglycan, genauer ein Einzelketten Gly-

5. Diskussion

coprotein. Es aktiviert Downstream verschiedene Signalwege, bei welchen schon eine Relevanz bei der Entstehung von Metastasen nachgewiesen wurde [237]. Dazu zählt die Induktion von Zellproliferation, die Verlängerung des Zellüberlebens, die Modulation des Zytoskeletts und die Steigerung der Zellmotilität. Es gilt dabei zu unterscheiden, ob CD44 auf den Krebszellen oder auf den Endothelzellen gebildet wird. In unserem Fall ist die endotheliale Expression von CD44 im Sinus erhöht, was die Ko-Lokalität mit Podocalyxin zeigte. Einer der wichtigsten Liganden, der an CD44 bindet, ist Hyaluronsäure, was auf Tumorzellen stark exprimiert wird, wie eine Arbeitsgruppe zu B16F10 nachweisen konnte [238]. Zusätzlich kann CD44 über den EGFR-Signalweg die MMP9-Aktivität verstärken, was die Zellmigration verstärken kann, was eine Gruppe aus Kanada zeigt [239]. Da die CDAA-Diät zu einer erhöhten Expression von CD44 in Lebersinusendothelzellen führt, könnte dies zu einem verstärkten Metastasierungsprozess beitragen. Durch die Interaktion mit Hyaluronsäure und die Verstärkung der MMP9-Aktivität über den EGFR-Signalweg könnte CD44 die Zellmigration und damit die Metastasierung in der Leber fördern.

Um die gewonnenen Erkenntnisse über die hochregulierten Adhäsionsmoleküle und ihre Rolle bei der Metastasenbildung mit unseren Metastasierungsexperimenten in Zusammenhang zu bringen, wurden Retentionsexperimente nach CDAA-Fütterung durchgeführt. Diese Retentionsversuche wurden auf der Grundlage durchgeführt, dass 88 % der in die Leber injizierten Melanomzellen innerhalb von 90 Minuten nach der Injektion als solitäre Zellen in den periportalen Sinusoiden zurückgehalten werden. Weitere 82 % dieser Tumorzellen extravasieren bis zum dritten Tag in das Lebergewebe [240]. Die Retentionsversuche belegten eine signifikant erhöhte hepatische Retention der B16F10*Luc2*-Zellen 90 Minuten nach Injektion bei allen CDAA-Fütterungszeitpunkten, also ein Tag, eine, zwei und zehn Wochen. Bemerkenswert ist, dass nach einem Tag CDAA-Diät die Retention erhöht ist, aber es zu keiner vermehrten Metastasenbildung kommt, ähnlich dem Ergebnis der *Mc38Luc*-Zelllinie, nach einer Woche CDAA-Diät. Auch hier kommt es zu einer erhöhten Retention in der Leber aber zu keinem verstärkten Metastasenwachstum. Dies deutet darauf hin, dass neben der initialen Retention und Adhäsion weitere Überlebensmechanismen – zellautonom oder organspezifisch – für das metastatische Wachstum in der Leber von Bedeutung sind.

5.6 Verstärktes Auftreten von Makrophagen bei früher Lebersteatose unter CDAA-Diät

Bei einer gesunden Nagetierleber kommen ungefähr 20 – 40 Makrophagen pro 100 Hepatozyten vor [241]. Da sie dem Immunsystem angehören und in so großer Anzahl in der Leber vorhanden sind, haben sie eine relevante Bedeutung bei der Pathogenese von akuten und chronischen Lebererkrankungen. Dies bezieht sich auf die Steuerung von Entzündungen und die daraus im Verlauf entstehende Fibrose, aber auch auf die Tumorprogression [242]. Betrachtet man die Heatmap mit Makrophagen-Genen, so erkennt man eine deutlich gruppierte Induktion von Makrophagen-Genen nach einer einwöchigen CDAA-Fütterung. Da es sich hierbei um RNA-Seq-Daten von isolierten LSEC handelt, weist dies auf eine geringfügige Verunreinigung der LSEC durch Makrophagen hin, was sehr wahrscheinlich bei der Isolation der LSEC aufgetreten ist. Es konnte durch IF-Färbungen gezeigt werden, dass es auch zu einer erhöhten Expression mancher Marker auf Proteinebene kommt. Wie bei Winkler et al. nach 10 Wochen CDAA-Diät konnte auch nach einer Woche CDAA-Diät das Non-Metastatic Melanoma Protein B, kurz GPNMB, als das am stärksten regulierte Gen identifiziert werden. Die Rolle von GPNMB bei Krebs und NAFLD zeigt sehr ambivalente Ergebnisse. Einige Arbeiten zeigten, dass es bei einer genetischen Überexpression von GPNMB zu einer reduzierten fibrotischen Fläche in der Leber und zu einer reduzierten Triglycerid-Konzentration in der Leber kommt [243]. Bei verschiedensten Schädigungen der Leber kommt es ebenfalls zu einer erhöhten GPNMB Expression, welche vor allem durch residente Lebermakrophagen wie Kupferzellen vermittelt wird. Die Forschungsgruppe um Miyazaki konnten bei Ratten, die mit CDAA gefüttert wurden, nachweisen, dass GPNMB in zirrhotischem Gewebe erhöht ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von GPNMB in HCC-umgebenden zirrhotischen Gewebeproben höher ist als im umgebenden Normalgewebe [244]. Jedoch tritt GPNMB meist nicht allein auf. Kumagai et al. konnten in einem Versuch mit Mäusen und CCl₄-Injektion beweisen, dass es nach der Injektion zu einer verstärkten Expression von GPNMB in CD68-positiven Makrophagen kam, sowie eine verstärkte MMP-13 Expression [245]. In Versuchen mit MMP-13 defizienten Mäusen zeigte sich, dass sich die metastatische Tumormast in der Leber mit der Abwesenheit von MMP-13 stark reduziert. Dazu wurden B16F1-Melanomzellen in die Haut gespritzt und das Metastasierungsmuster in Lunge, Lymphknoten, Leber, Hirn und Herz untersucht. Bei der Leber reduzierte sich durch ein Defizit an MMP-13 die Tumormast um bis zu 70 %, und zwar von 10 % auf 2,9 % [246]. SIGLEC1, auch bekannt als CD169 oder Sialoadhesin, wird von einem Teil der Makrophagen exprimiert. Die Datenlage zeigt, dass CD169-pos. Makrophagen unterschiedliche Effekte auf die Entstehung und den Verlauf von Krebs hat. Beim Menschen ist die Hochregulation von CD169-pos. Makrophagen mit einem schlechten Krebsverlauf assoziiert [247, 248]. Im Brustkrebs vermitteln sie einen besseren

5. Diskussion

Krankheitsverlauf sowie eine anti-metastatische Wirkung [249, 250]. Gleichzeitig ermöglichen sie aber auch eine Immunflucht über den JAK2-Signalweg [251]. Auch konnte hier mit Immunfluoreszenzfärbungen und RNA-Seq-Daten gezeigt werden, dass CD169 im Sinus von CDAA-gefütterten Mäusen erhöht ist, wobei die Wirkung auf die Bildung von Melanommetastasen unklar ist. Auch CLEC4F, ein Marker für Kupfferzellen, stieg sowohl in den Färbungen als auch in den RNA-Seq-Daten signifikant an. Eine Gruppe aus Boston zeigte, dass Dickdarmkrebszellen einen Faktor produzieren, der Kupfferzellen zur Produktion von Zytokinen anregt. Diese Zytokine wie IL-1b und TNF α wirken dann wiederum aktivierend auf Leberendothelzellen, die dann ICAM1, VCAM1 und E-Selektin produzieren [252]. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Zunahme der Kupfferzellen, die sich aus der Zunahme von CLEC4F ergibt, einen Einfluss auf die LSEC haben könnte, der sich in einer übermäßigen Expression von Adhäsionsmolekülen äußert.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte ich mit meiner Forschungsarbeit zeigen, dass die Melanomzelllinien B16F10*Luc2* und Wt31 nach zehn Wochen CDAA-Fütterung, was einer NASH-assoziierten Leberfibrose entspricht, verstärkt in die Leber metastasieren. Dabei spielt es keine Rolle, ob nach der Injektion mit CDAA-Diät weiter gefüttert wurde oder nicht, wodurch die Konditionierung der hepatischen Nische zum Zeitpunkt der Tumorzellinjektion ausschlaggebend ist. Interessanterweise zeigte die B16F10*Luc2*-Zelllinie bereits nach einer Woche CDAA-Fütterung eine verstärkte Metastasierung in die Leber. Wt31 zeigte hingegen nach den kurzen Zeiträumen keine Veränderung im Metastasierungsverhalten in die Leber. Der Unterschied in der Lebermetastasierung zwischen den Melanomzelllinien Wt31 und B16F10*Luc2* unter der CDAA-Diät könnte auf inhärente biologische Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zurückzuführen sein, die ihre Interaktion mit der Mikroumgebung der Leber als Reaktion auf die Ernährungsumstellung beeinflussen. B16F10*Luc2*-Zellen, welche von der Melanomlinie B16 abstammen, sind für ihr aggressives Metastasierungsverhalten, insbesondere in Leber und Lunge in Mausmodellen, gut charakterisiert. Diese Aggressivität kann auf die starke Expression von Molekülen zurückgeführt werden, die ihre Fähigkeit zur Adhäsion, Invasion und Metastasierung verbessern, wodurch sie der Wt31-Zelllinie bei kurzzeitiger Fütterung überlegen sind.

Im Rahmen eines Retentions-Assays wurde die Retention der B16F10*Luc2*-Zellen in der Leber 90 Minuten nach der Injektion mittels Biolumineszenz *ex vivo* gemessen. Nach einem Tag CDAA-Diät zeigte sich eine erhöhte Biolumineszenz-Signal in der Leber, was sich nach einer Woche bis zehn Wochen CDAA fortsetzte. Die Verwendung der Kolonkarzinom-Zelllinie Mc38 zeigte in der CDAA-gefütterten Maus keine verstärkte Metastasierung in die Leber, obwohl die primäre Retention der Tumorzellen nach 90 Minuten signifikant erhöht war. Dies ist eine Bestätigung der bestehenden Hypothese, dass für jede Art von Tumor spezifische Faktoren zur individuellen Förderung des Wachstums erforderlich sind.

In Anbetracht der Tatsache, dass einige Publikationen darauf hindeuten, dass die Lipide in der CDAA-Diät ein entscheidender Faktor sein können, wurde die Injektion von B16F10*Luc2* nach zwei und vier Wochen mit einer fettreichen Diät wiederholt. Die Untersuchung der Lebergewebe nach zwei und vier Wochen ergab keine verstärkte Bildung von Metastasen in der verfetteten Leber nach kürzeren HFD Fütterungszeiten.

Neben den diätbasierten Modellen, nutzte ich ein genetisches Mausmodell mit einem LSEC-spezifischen *Gata4*-Knockout. Die Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu den Cre-negativen Geschwistertieren eine höhere Anzahl und Fläche an Metastasen in der Leber. In einem früheren Projekt konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die CDAA-Veränderungen

6. Zusammenfassung und Ausblick

nach zehn Wochen ähnlich denen nach *Gata4*^{LSEC-KO} sind. Nach einer Woche CDAA-Diät und Untersuchung des Transkriptoms der LSEC stellte ich fest, dass LSEC-spezifische Gene verloren gingen und CEC-spezifische Gene induziert wurden. Zudem wurde eine starke Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM1, VCAM1 und E-Selektin beobachtet, die auch durch Färbungen auf dem Sinusendothel der Leber nachgewiesen werden konnten.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es durch die CDAA-Diät zu frühzeitigen Veränderungen in der hepatischen vaskulären Nische kommt. Diese führen dazu, dass das vaskuläre Milieu schnell in einen Zustand versetzt wird, der die Metastasierung von Melanom-Subpopulationen begünstigt. Die Ergebnisse könnten neue potenzielle Strategien aufzeigen, um das Metastasierungsverhalten des malignen Melanoms in die Leber zu beeinflussen.

Um die hier aufgeführten Hypothesen zu verifizieren, wird diese Arbeit in einem weiteren PhD-Projekt weitergeführt, bei welchem es gezielt um eine Antikörper-Therapie gegen die hier diskutierten Adhäsionsmoleküle geht. Es wird untersucht, ob die Blockade der Adhäsionsmoleküle vor der Tumorzellinjektion sowohl die Retention als auch das Metastasen-Wachstum beeinflusst. Zusätzlich soll der Einfluss von der im Rahmen der CDAA-Diät beschriebenen Makrophagen-Akkumulation untersucht werden.

7. Quellenverzeichnis

1. Read, A.E., *Clinical physiology of the liver*. Br J Anaesth, 1972. **44**(9): p. 910-7.
2. Kruepunga, N., et al., *Anatomy of rodent and human livers: What are the differences?* Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(5): p. 869-878.
3. Lorente, S., M. Hautefeuille, and A. Sanchez-Cedillo, *The liver, a functionalized vascular structure*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 16194.
4. Torres Rojas, A.M., et al., *Hierarchical Modeling of the Liver Vascular System*. Front Physiol, 2021. **12**: p. 733165.
5. Soon, G.S.T. and M. Torbenson, *The Liver and Glycogen: In Sickness and in Health*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(7).
6. Selen, E.S., J. Choi, and M.J. Wolfgang, *Discordant hepatic fatty acid oxidation and triglyceride hydrolysis leads to liver disease*. JCI Insight, 2021. **6**(2).
7. Charlton, M.R., *Protein metabolism and liver disease*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1996. **10**(4): p. 617-35.
8. Sticova, E. and M. Jirsa, *New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(38): p. 6398-407.
9. Adeva, M.M., et al., *Ammonium metabolism in humans*. Metabolism, 2012. **61**(11): p. 1495-511.
10. Li, X., et al., *Lactate metabolism in human health and disease*. Signal Transduct Target Ther, 2022. **7**(1): p. 305.
11. Hyun, J., et al., *Pathophysiological Aspects of Alcohol Metabolism in the Liver*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(11).
12. Grant, D.M., *Detoxification pathways in the liver*. J Inherit Metab Dis, 1991. **14**(4): p. 421-30.
13. Hikspoors, J., et al., *Human liver segments: role of cryptic liver lobes and vascular physiology in the development of liver veins and left-right asymmetry*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17109.
14. Kogure, K., et al., *A comparative study of the anatomy of rat and human livers*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 1999. **6**(2): p. 171-5.
15. Kalra, A., et al., *Physiology, Liver*, in *StatPearls*. 2024: Treasure Island (FL).
16. Krishna, M., *Microscopic anatomy of the liver*. Clin Liver Dis (Hoboken), 2013. **2**(Suppl 1): p. S4-S7.
17. Hundt, M., C.Y. Wu, and M. Young, *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Biliary Ducts*, in *StatPearls*. 2024: Treasure Island (FL).
18. Mackay, I.R., *Hepatoimmunology: a perspective*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(1): p. 36-44.
19. Racanelli, V. and B. Rehermann, *The liver as an immunological organ*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S54-62.
20. Wiesner, R.J., J.C. Ruegg, and I. Morano, *Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **183**(2): p. 553-9.
21. Lazarow, P., *Disorders of peroxisome biogenesis*. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th edition, 1995: p. 2287-2324.

7. Quellenverzeichnis

22. Wang, M.J., et al., *Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes*. Cell Death Dis, 2017. **8**(5): p. e2805.
23. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. Compr Physiol, 2014. **4**(1): p. 177-97.
24. Barrows, B.R. and E.J. Parks, *Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1446-52.
25. Havel, R.J., *Lipoproteins and lipid transport*. Adv Exp Med Biol, 1975. **63**: p. 37-59.
26. Mederacke, I., et al., *Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2823.
27. Bonner, J.C., *Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 255-73.
28. Dewidar, B., et al., *TGF-beta in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019*. Cells, 2019. **8**(11).
29. Liu, X., et al., *Identification of Lineage-Specific Transcription Factors That Prevent Activation of Hepatic Stellate Cells and Promote Fibrosis Resolution*. Gastroenterology, 2020. **158**(6): p. 1728-1744 e14.
30. Carpino, G., et al., *Activated hepatic stellate cells in liver cirrhosis. A morphologic and morphometrical study*. Ital J Anat Embryol, 2004. **109**(4): p. 225-38.
31. Li, D., et al., *Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging*. EJNMMI Res, 2015. **5**(1): p. 71.
32. Puche, J.E., Y. Saiman, and S.L. Friedman, *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Compr Physiol, 2013. **3**(4): p. 1473-92.
33. Sanz-García, C., et al., *The Space of Disse: The Liver Hub in Health and Disease*. Livers, 2021. **1**(1): p. 3-26.
34. Shen, K., et al., *Depletion of activated hepatic stellate cell correlates with severe liver damage and abnormal liver regeneration in acetaminophen-induced liver injury*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011. **43**(4): p. 307-15.
35. Nguyen-Lefebvre, A.T. and A. Horuzsko, *Kupffer Cell Metabolism and Function*. J Enzymol Metab, 2015. **1**(1).
36. Steib, C.J., et al., *Kupffer cell activation in normal and fibrotic livers increases portal pressure via thromboxane A(2)*. J Hepatol, 2007. **47**(2): p. 228-38.
37. Smedsrod, B., et al., *Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells*. Gut, 1994. **35**(11): p. 1509-16.
38. Adachi, Y., et al., *Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury*. Hepatology, 1994. **20**(2): p. 453-60.
39. Rivera, C.A., et al., *Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. J Hepatol, 2007. **47**(4): p. 571-9.
40. Maslak, E., A. Gregorius, and S. Chlopicki, *Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver*. Pharmacol Rep, 2015. **67**(4): p. 689-94.
41. Fraser, R., A.G. Bosanquet, and W.A. Day, *Filtration of chylomicrons by the liver may influence cholesterol metabolism and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1978. **29**(2): p. 113-23.
42. Smedsrod, B. and M. Einarsson, *Clearance of tissue plasminogen activator by mannose and galactose receptors in the liver*. Thromb Haemost, 1990. **63**(1): p. 60-6.

7. Quellenverzeichnis

43. Limmer, A., et al., *Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1348-54.
44. Miyao, M., et al., *Pivotal role of liver sinusoidal endothelial cells in NAFLD/NASH progression*. Lab Invest, 2015. **95**(10): p. 1130-44.
45. Arias, I.M., *The liver : biology and pathobiology*. 2020, Wiley-Blackwell,: Hoboken, NJ. p. 1 online resource.
46. Cogger, V.C., et al., *Hyperlipidemia and surfactants: the liver sieve is a link*. Atherosclerosis, 2006. **189**(2): p. 273-81.
47. Wisse, E., et al., *Scanning electron microscope observations on the structure of portal veins, sinusoids and central veins in rat liver*. Scan Electron Microsc, 1983(Pt 3): p. 1441-52.
48. Mohamad, M., et al., *Ultrastructure of the liver microcirculation influences hepatic and systemic insulin activity and provides a mechanism for age-related insulin resistance*. Aging Cell, 2016. **15**(4): p. 706-15.
49. Le Couteur, D.G., et al., *Hepatic pseudocapillarisation and atherosclerosis in ageing*. Lancet, 2002. **359**(9317): p. 1612-5.
50. Smedsrod, B., *Clearance function of scavenger endothelial cells*. Comp Hepatol, 2004. **3 Suppl 1**(Suppl 1): p. S22.
51. Falkowska-Hansen, B., et al., *Clathrin-coated vesicles form a unique net-like structure in liver sinusoidal endothelial cells by assembling along undisrupted microtubules*. Exp Cell Res, 2007. **313**(9): p. 1745-57.
52. Perrais, D. and C.J. Merrifield, *Dynamics of endocytic vesicle creation*. Dev Cell, 2005. **9**(5): p. 581-92.
53. Eskild, W., et al., *Intracellular transport of formaldehyde-treated serum albumin in liver endothelial cells after uptake via scavenger receptors*. Biochem J, 1989. **258**(2): p. 511-20.
54. Juvet, L.K., T. Berg, and T. Gjoen, *The expression of endosomal rab proteins correlates with endocytic rate in rat liver cells*. Hepatology, 1997. **25**(5): p. 1204-1212.
55. Ezekowitz, R.A., et al., *Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1785-94.
56. Martinez-Pomares, L., et al., *Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor*. Eur J Immunol, 2006. **36**(5): p. 1074-82.
57. Fiete, D.J., M.C. Beranek, and J.U. Baenziger, *A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates GalNAc-4-SO4 binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2089-93.
58. Ganesan, L.P., et al., *FcgammaRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes*. J Immunol, 2012. **189**(10): p. 4981-8.
59. Ganesan, L.P., et al., *Rapid and efficient clearance of blood-borne virus by liver sinusoidal endothelium*. PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002281.
60. Goerdts, S., et al., *Identification of a novel high molecular weight protein preferentially expressed by sinusoidal endothelial cells in normal human tissues*. J Cell Biol, 1991. **113**(6): p. 1425-37.
61. Kzhyshkowska, J., A. Gratchev, and S. Goerdts, *Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(3): p. 635-49.

7. Quellenverzeichnis

62. Heil, J., et al., *Bone marrow sinusoidal endothelium controls terminal erythroid differentiation and reticulocyte maturation*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 6963.
63. Yannariello-Brown, J., B. Zhou, and P.H. Weigel, *Identification of a 175 kDa protein as the ligand-binding subunit of the rat liver sinusoidal endothelial cell hyaluronan receptor*. Glycobiology, 1997. **7**(1): p. 15-21.
64. Qian, H., et al., *Stabilins are expressed in bone marrow sinusoidal endothelial cells and mediate scavenging and cell adhesive functions*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(3): p. 883-6.
65. Koch, P.S., et al., *Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis*. Blood, 2017. **129**(4): p. 415-419.
66. McCourt, P.A., et al., *Characterization of a hyaluronan receptor on rat sinusoidal liver endothelial cells and its functional relationship to scavenger receptors*. Hepatology, 1999. **30**(5): p. 1276-86.
67. Harris, E.N., J.A. Weigel, and P.H. Weigel, *Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36201-9.
68. Li, R., et al., *Endocytosis of advanced glycation end-products in bovine choriocapillaris endothelial cells*. Microcirculation, 2009. **16**(7): p. 640-55.
69. Harris, E.N., J.A. Weigel, and P.H. Weigel, *The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17341-50.
70. Swystun, L.L., et al., *The endothelial cell receptor stabilin-2 regulates VWF-FVIII complex half-life and immunogenicity*. J Clin Invest, 2018. **128**(9): p. 4057-4073.
71. Li, R., et al., *Role of liver sinusoidal endothelial cells and stabilins in elimination of oxidized low-density lipoproteins*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(1): p. G71-81.
72. Schledzewski, K., et al., *Deficiency of liver sinusoidal scavenger receptors stabilin-1 and -2 in mice causes glomerulofibrotic nephropathy via impaired hepatic clearance of noxious blood factors*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 703-14.
73. Knolle, P.A., et al., *Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10*. Clin Exp Immunol, 1997. **107**(3): p. 555-61.
74. Pohlmann, S., et al., *DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2670-5.
75. Liu, W., et al., *Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECTin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18748-58.
76. Banerji, S., et al., *LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 789-801.
77. Campbell, J.J., et al., *Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 255-66.
78. Guo, Q., et al., *Liver sinusoidal endothelial cell expressed vascular cell adhesion molecule 1 promotes liver fibrosis*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 983255.
79. Benedicto, A., et al., *Liver sinusoidal endothelial cell ICAM-1 mediated tumor/endothelial crosstalk drives the development of liver metastasis by initiating inflammatory and angiogenic responses*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 13111.

7. Quellenverzeichnis

80. Pandey, E., A.S. Nour, and E.N. Harris, *Prominent Receptors of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Liver Homeostasis and Disease*. *Front Physiol*, 2020. **11**: p. 873.
81. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
82. Medvedev, A.E., et al., *Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells*. *J Immunol*, 2002. **169**(9): p. 5209-16.
83. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. *Immunol Rev*, 2000. **173**: p. 89-97.
84. Calne, R.Y., et al., *Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts*. *Nature*, 1969. **223**(5205): p. 472-6.
85. Knolle, P.A., et al., *Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(6): p. 1428-40.
86. Koch, P.S., et al., *Angiodiversity and organotypic functions of sinusoidal endothelial cells*. *Angiogenesis*, 2021. **24**(2): p. 289-310.
87. Leibing, T., et al., *Angiocrine Wnt signaling controls liver growth and metabolic maturation in mice*. *Hepatology*, 2018. **68**(2): p. 707-722.
88. Wang, B., et al., *Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver*. *Nature*, 2015. **524**(7564): p. 180-5.
89. Rocha, A.S., et al., *The Angiocrine Factor Rspondin3 Is a Key Determinant of Liver Zonation*. *Cell Rep*, 2015. **13**(9): p. 1757-64.
90. Koch, P.S., et al., *Imbalanced Activation of Wnt/ β -Catenin-Signaling in Liver Endothelium Alters Normal Sinusoidal Differentiation*. *Front Physiol*, 2021. **12**: p. 722394.
91. Zhang, X.J., et al., *Angiocrine Hepatocyte Growth Factor Signaling Controls Physiological Organ and Body Size and Dynamic Hepatocyte Proliferation to Prevent Liver Damage during Regeneration*. *Am J Pathol*, 2020. **190**(2): p. 358-371.
92. Ding, B.S., et al., *Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration*. *Nature*, 2010. **468**(7321): p. 310-5.
93. Desroches-Castan, A., et al., *Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Paracrine Factor Controlling Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestration and Protecting Against Hepatic Fibrosis*. *Hepatology*, 2019. **70**(4): p. 1392-1408.
94. Winkler, M., et al., *Endothelial GATA4 controls liver fibrosis and regeneration by preventing a pathogenic switch in angiocrine signaling*. *J Hepatol*, 2021. **74**(2): p. 380-393.
95. Geraud, C., et al., *GATA4-dependent organ-specific endothelial differentiation controls liver development and embryonic hematopoiesis*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(3): p. 1099-1114.
96. Sayiner, M., et al., *Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World*. *Clin Liver Dis*, 2016. **20**(2): p. 205-14.
97. Younossi, Z.M., et al., *Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011. **9**(6): p. 524-530 e1; quiz e60.
98. Bedogni, G., et al., *Incidence and natural course of fatty liver in the general population: the Dionysos study*. *Hepatology*, 2007. **46**(5): p. 1387-91.

7. Quellenverzeichnis

99. Berzigotti, A., et al., *Elastography, spleen size, and platelet count identify portal hypertension in patients with compensated cirrhosis*. *Gastroenterology*, 2013. **144**(1): p. 102-111 e1.
100. Arroyo, V., et al., *Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis*. *International Ascites Club. Hepatology*, 1996. **23**(1): p. 164-76.
101. Kovalak, M., et al., *Endoscopic screening for varices in cirrhotic patients: data from a national endoscopic database*. *Gastrointest Endosc*, 2007. **65**(1): p. 82-8.
102. Huang, H.C., et al., *Intestinal and plasma VEGF levels in cirrhosis: the role of portal pressure*. *J Cell Mol Med*, 2012. **16**(5): p. 1125-33.
103. Davis, G.L., et al., *Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States*. *Liver Transpl*, 2003. **9**(4): p. 331-8.
104. Collaborators, G.B.D.C., *The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020. **5**(3): p. 245-266.
105. Cortez-Pinto, H., et al., *Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome?* *Clin Nutr*, 1999. **18**(6): p. 353-8.
106. Nouredin, M., et al., *Clinical and histological determinants of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in elderly patients*. *Hepatology*, 2013. **58**(5): p. 1644-54.
107. Hamaguchi, E., et al., *Histological course of nonalcoholic fatty liver disease in Japanese patients: tight glycemic control, rather than weight reduction, ameliorates liver fibrosis*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(2): p. 284-6.
108. Ipsen, D.H., J. Lykkesfeldt, and P. Tveden-Nyborg, *Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease*. *Cell Mol Life Sci*, 2018. **75**(18): p. 3313-3327.
109. Divella, R., et al., *Obesity, Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Adipocytokines Network in Promotion of Cancer*. *Int J Biol Sci*, 2019. **15**(3): p. 610-616.
110. Mendez-Sanchez, N., et al., *New Aspects of Lipotoxicity in Nonalcoholic Steatohepatitis*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(7).
111. Qayyum, A., et al., *MRI steatosis grading: development and initial validation of a color mapping system*. *AJR Am J Roentgenol*, 2012. **198**(3): p. 582-8.
112. Ahmadian, M., et al., *Triacylglycerol metabolism in adipose tissue*. *Future Lipidol*, 2007. **2**(2): p. 229-237.
113. Neuschwander-Tetri, B.A. and S.H. Caldwell, *Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference*. *Hepatology*, 2003. **37**(5): p. 1202-19.
114. Caldwell, S., et al., *Hepatocellular ballooning in NASH*. *J Hepatol*, 2010. **53**(4): p. 719-23.
115. Du, W. and L. Wang, *The Crosstalk Between Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Hepatic Microenvironment in NASH Related Liver Fibrosis*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 936196.
116. Bonnans, C., J. Chou, and Z. Werb, *Remodelling the extracellular matrix in development and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(12): p. 786-801.
117. Hynes, R.O. and A. Naba, *Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(1): p. a004903.

7. Quellenverzeichnis

118. Starkel, P. and I.A. Leclercq, *Animal models for the study of hepatic fibrosis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 319-33.
119. Iwaisako, K., et al., *Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(32): p. E3297-305.
120. Wong, L., et al., *Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture*. J Clin Invest, 1994. **94**(4): p. 1563-9.
121. Wang, Y., et al., *New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis*. J Hepatol, 2010. **53**(1): p. 132-44.
122. Meyer, D.H., M.G. Bachem, and A.M. Gressner, *Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **171**(3): p. 1122-9.
123. Win, K.M., et al., *Mitogenic effect of transforming growth factor- β 1 on human ito cells in culture: Evidence for mediation by endogenous platelet-derived growth factor*. Hepatology, 1993. **18**(1): p. 137-145.
124. Park, H.Y., J.H. Kim, and C.K. Park, *VEGF induces TGF- β 1 expression and myofibroblast transformation after glaucoma surgery*. Am J Pathol, 2013. **182**(6): p. 2147-54.
125. Brown, B., et al., *The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix*. Tissue Eng, 2006. **12**(3): p. 519-26.
126. Flammer, A.J., et al., *The assessment of endothelial function: from research into clinical practice*. Circulation, 2012. **126**(6): p. 753-67.
127. Picchi, A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome*. Circ Res, 2006. **99**(1): p. 69-77.
128. Gao, F., et al., *Reduction of Endothelial Nitric Oxide Increases the Adhesiveness of Constitutive Endothelial Membrane ICAM-1 through Src-Mediated Phosphorylation*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 1124.
129. Takahashi, M., et al., *Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells*. Cytokine, 1996. **8**(11): p. 817-21.
130. Biffl, W.L., et al., *Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1*. J Surg Res, 1996. **63**(1): p. 328-32.
131. Khan, B.V., et al., *Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9114-9.
132. Lyck, R. and G. Enzmann, *The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues*. Curr Opin Hematol, 2015. **22**(1): p. 53-9.
133. Tateya, S., et al., *Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding*. Diabetes, 2011. **60**(11): p. 2792-801.
134. Farrell, G., et al., *Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis*. Hepatology, 2019. **69**(5): p. 2241-2257.
135. Matsumoto, M., et al., *An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis*. Int J Exp Pathol, 2013. **94**(2): p. 93-103.

7. Quellenverzeichnis

136. Shiota, J., L.C. Samuelson, and N. Razumilava, *Hepatobiliary Organoids and Their Applications for Studies of Liver Health and Disease: Are We There Yet?* Hepatology, 2021. **74**(4): p. 2251-2263.
137. Keegan, A., R. Martini, and R. Batey, *Ethanol-related liver injury in the rat: a model of steatosis, inflammation and pericentral fibrosis*. J Hepatol, 1995. **23**(5): p. 591-600.
138. Yoshida, T., et al., *SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1701-7.
139. Aparicio-Bautista, D.I., et al., *Comparative proteomic analysis of thiol proteins in the liver after oxidative stress induced by diethylnitrosamine*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1834**(12): p. 2528-38.
140. Low, T.Y., et al., *A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3960-74.
141. Wu, S., et al., *An update on animal models of liver fibrosis*. Front Med (Lausanne), 2023. **10**: p. 1160053.
142. Ibrahim, S.H., et al., *Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation*. Dig Dis Sci, 2016. **61**(5): p. 1325-36.
143. Yao, Z.M. and D.E. Vance, *The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1988. **263**(6): p. 2998-3004.
144. Rinella, M.E. and R.M. Green, *The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance*. J Hepatol, 2004. **40**(1): p. 47-51.
145. Wang, X., et al., *Gliptins Suppress Inflammatory Macrophage Activation to Mitigate Inflammation, Fibrosis, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Models of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(2): p. 87-109.
146. Lee, S., et al., *Comparative study of liver injury induced by high-fat methionine- and choline-deficient diet in ICR mice originating from three different sources*. Lab Anim Res, 2019. **35**: p. 15.
147. Chiba, T., et al., *Evaluation of Methionine Content in a High-Fat and Choline-Deficient Diet on Body Weight Gain and the Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164191.
148. Nakae, D., et al., *Comparative changes in the liver of female Fischer-344 rats after short-term feeding of a semipurified or a semisynthetic L-amino acid-defined choline-deficient diet*. Toxicol Pathol, 1995. **23**(5): p. 583-90.
149. Wei, G., et al., *Comparison of murine steatohepatitis models identifies a dietary intervention with robust fibrosis, ductular reaction, and rapid progression to cirrhosis and cancer*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020. **318**(1): p. G174-G188.
150. Denda, A., et al., *Development of hepatocellular adenomas and carcinomas associated with fibrosis in C57BL/6J male mice given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet*. Jpn J Cancer Res, 2002. **93**(2): p. 125-32.
151. Kodama, Y., et al., *c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice*. Gastroenterology, 2009. **137**(4): p. 1467-1477 e5.
152. Liu, J., et al., *Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) regulates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-fibrosis progression by determining hepatic glucose/fatty acid preference under high-fat diet conditions*. J Pathol, 2018. **246**(3): p. 277-288.

7. Quellenverzeichnis

153. Febbraio, M.A., et al., *Preclinical Models for Studying NASH-Driven HCC: How Useful Are They?* Cell Metab, 2019. **29**(1): p. 18-26.
154. Kohli, R., et al., *High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis.* Hepatology, 2010. **52**(3): p. 934-44.
155. Fogli-Cawley, J.J., et al., *The 2005 Dietary Guidelines for Americans and risk of the metabolic syndrome.* Am J Clin Nutr, 2007. **86**(4): p. 1193-201.
156. Schierwagen, R., et al., *Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 12931.
157. Zheng, S., et al., *Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice.* Eur J Pharmacol, 2008. **584**(1): p. 118-24.
158. Suriano, F., et al., *Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin.* Microbiome, 2021. **9**(1): p. 147.
159. Mayer, J., M.W. Bates, and M.M. Dickie, *Hereditary diabetes in genetically obese mice.* Science, 1951. **113**(2948): p. 746-7.
160. Brix, A.E., et al., *Evaluation of liver fatty acid oxidation in the leptin-deficient obese mouse.* Mol Genet Metab, 2002. **75**(3): p. 219-26.
161. Sahai, A., et al., *Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(5): p. G1035-43.
162. Leclercq, I.A., et al., *Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury.* J Hepatol, 2002. **37**(2): p. 206-13.
163. Heinrich, S., et al., *Partial bile duct ligation in mice: a novel model of acute cholestasis.* Surgery, 2011. **149**(3): p. 445-51.
164. Zhu, H., et al., *AICAR-Induced AMPK Activation Inhibits the Noncanonical NF-kappaB Pathway to Attenuate Liver Injury and Fibrosis in BDL Rats.* Can J Gastroenterol Hepatol, 2018. **2018**: p. 6181432.
165. Georgiev, P., et al., *Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation.* Br J Surg, 2008. **95**(5): p. 646-56.
166. Meuleman, P., et al., *Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus.* J Virol, 2006. **80**(6): p. 2797-807.
167. Cai, P., et al., *Comprehensive Transcriptome Analysis of Sex-Biased Expressed Genes Reveals Discrete Biological and Physiological Features of Male and Female Schistosoma japonicum.* PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(4): p. e0004684.
168. Song, L.J., et al., *The Differential and Dynamic Progression of Hepatic Inflammation and Immune Responses During Liver Fibrosis Induced by Schistosoma japonicum or Carbon Tetrachloride in Mice.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 570524.
169. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast.* 1889. Cancer Metastasis Rev, 1989. **8**(2): p. 98-101.
170. Kaplan, R.N., et al., *VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche.* Nature, 2005. **438**(7069): p. 820-7.
171. Poisson, J., et al., *Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases.* J Hepatol, 2017. **66**(1): p. 212-227.
172. Yang, L., et al., *ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow.* Blood, 2005. **106**(2): p. 584-92.

7. Quellenverzeichnis

173. Simons, N., et al., *The endothelial function biomarker soluble E-selectin is associated with nonalcoholic fatty liver disease*. Liver Int, 2020. **40**(5): p. 1079-1088.
174. Tozeren, A., et al., *E-selectin-mediated dynamic interactions of breast- and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers*. Int J Cancer, 1995. **60**(3): p. 426-31.
175. Carlos, T. and J. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-2101.
176. Zhang, D., et al., *VCAM1 Promotes Tumor Cell Invasion and Metastasis by Inducing EMT and Transendothelial Migration in Colorectal Cancer*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1066.
177. Qi, K., et al., *Impact of cirrhosis on the development of experimental hepatic metastases by B16F1 melanoma cells in C57BL/6 mice*. Hepatology, 2004. **40**(5): p. 1144-50.
178. Wohlfeil, S.A., et al., *Hepatic Endothelial Notch Activation Protects against Liver Metastasis by Regulating Endothelial-Tumor Cell Adhesion Independent of Angiocrine Signaling*. Cancer Res, 2019. **79**(3): p. 598-610.
179. Han, S., et al., *Activated hepatic stellate cells promote hepatocellular carcinoma cell migration and invasion via the activation of FAK-MMP9 signaling*. Oncol Rep, 2014. **31**(2): p. 641-8.
180. Foda, H.D. and S. Zucker, *Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis*. Drug Discov Today, 2001. **6**(9): p. 478-482.
181. Jones, J.L. and R.A. Walker, *Control of matrix metalloproteinase activity in cancer*. The Journal of Pathology, 1997. **183**(4): p. 377-379.
182. Gjoen, T., R. Seljelid, and S.O. Kolset, *Binding of metastatic colon carcinoma cells to liver macrophages*. J Leukoc Biol, 1989. **45**(4): p. 362-9.
183. Tsilimigras, D.I., et al., *Liver metastases*. Nature reviews Disease primers, 2021. **7**(1): p. 27.
184. Yu, J., et al., *Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination*. Nat Med, 2021. **27**(1): p. 152-164.
185. Tumei, P.C., et al., *Liver Metastasis and Treatment Outcome with Anti-PD-1 Monoclonal Antibody in Patients with Melanoma and NSCLC*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(5): p. 417-424.
186. Sandru, A., et al., *Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma*. J Med Life, 2014. **7**(4): p. 572-6.
187. Arnold, M., et al., *Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040*. JAMA Dermatol, 2022. **158**(5): p. 495-503.
188. Garbe, C., et al., *European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics: Update 2022*. Eur J Cancer, 2022. **170**: p. 236-255.
189. Dr. Benjamin Barnes, D.N.B.-S., Dr. Stefan Dahm, Manuela Franke, Ina Schönfeld, Dr. Klaus Kraywinkel, Dr. Antje Wienecke, *Krebs in Deutschland für 2019/2020*. 2023, Berlin: Robert Koch-Institut.
190. Saginala, K., et al., *Epidemiology of Melanoma*. Med Sci (Basel), 2021. **9**(4).
191. Rabbie, R., et al., *Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities*. J Pathol, 2019. **247**(5): p. 539-551.
192. Elder, D.E., *Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites*. Mod Pathol, 2006. **19 Suppl 2**: p. S4-20.

7. Quellenverzeichnis

193. Curtin, J.A., et al., *Distinct sets of genetic alterations in melanoma*. N Engl J Med, 2005. **353**(20): p. 2135-47.
194. Candido, S., et al., *Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure*. Oncol Rep, 2014. **31**(3): p. 1079-82.
195. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
196. Sullivan, R.J. and K. Flaherty, *MAP kinase signaling and inhibition in melanoma*. Oncogene, 2013. **32**(19): p. 2373-9.
197. Schuchter, L.M., R. Green, and D. Fraker, *Primary and metastatic diseases in malignant melanoma of the gastrointestinal tract*. Curr Opin Oncol, 2000. **12**(2): p. 181-5.
198. Hauschild, A., et al., *Modeled Prognostic Subgroups for Survival and Treatment Outcomes in BRAF V600-Mutated Metastatic Melanoma: Pooled Analysis of 4 Randomized Clinical Trials*. JAMA Oncol, 2018. **4**(10): p. 1382-1388.
199. Nakamura, K., et al., *Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model*. Life Sci, 2002. **70**(7): p. 791-8.
200. Lindsay, C.R., et al., *P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 555.
201. Corbett, T.H., et al., *Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure*. Cancer Res, 1975. **35**(9): p. 2434-9.
202. Watt, A.J., et al., *GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12573-8.
203. Manfred D. Laubichler, W.C.A., Jane Maienschein, *The endothelium in history*. Cambridge University Press, 2007: p. 18.
204. Zhong, F., et al., *Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Digestion, 2019: p. 1-14.
205. Weber, L.W., M. Boll, and A. Stampfl, *Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model*. Crit Rev Toxicol, 2003. **33**(2): p. 105-36.
206. Kohli, R. and A.E. Feldstein, *NASH animal models: are we there yet?* J Hepatol, 2011. **55**(4): p. 941-3.
207. Mone, P., et al., *Choline Supplementation Improves Cognitive Performance in Frail Hypertensive Patients: Novel Insights on Endothelial Function from the INTERVENTIONIST Study*. Eur J Prev Cardiol, 2023.
208. Li, Y., et al., *Hepatic lipids promote liver metastasis*. JCI Insight, 2020. **5**(17).
209. Yamada, S., et al., *Inhibitory effect of non-alcoholic steatohepatitis on colon cancer liver metastasis*. Eur J Surg Oncol, 2022.
210. Hayashi, S., H. Masuda, and M. Shigematsu, *Liver metastasis rare in colorectal cancer patients with fatty liver*. Hepatogastroenterology, 1997. **44**(16): p. 1069-75.
211. Schmid, C.D., et al., *GPR182 is a novel marker for sinusoidal endothelial differentiation with distinct GPCR signaling activity in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **497**(1): p. 32-38.
212. Chen, X., et al., *C-type Lectin Domain Family 4 Member G (CLEC4G) Is a Negative Marker for CD34 in the Evolution of Liver Pathogenesis*. Ann Clin Lab Sci, 2023. **53**(4): p. 516-528.

7. Quellenverzeichnis

213. Gomez-Salineró, J.M., et al., *Specification of fetal liver endothelial progenitors to functional zoned adult sinusoids requires c-Maf induction*. Cell Stem Cell, 2022. **29**(4): p. 593-609 e7.
214. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 209-18.
215. Kucsera, D., et al., *Characterization of the CDAA Diet-Induced Non-alcoholic Steatohepatitis Model: Sex-Specific Differences in Inflammation, Fibrosis, and Cholesterol Metabolism in Middle-Aged Mice*. Front Physiol, 2021. **12**: p. 609465.
216. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
217. Li, J., et al., *High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR*. Exp Anim, 2020. **69**(3): p. 326-335.
218. Fidler, I.J., *Selection of successive tumour lines for metastasis*. Nat New Biol, 1973. **242**(118): p. 148-9.
219. Wohlfeil, S.A., et al., *Angiogenic and molecular diversity determine hepatic melanoma metastasis and response to anti-angiogenic treatment*. J Transl Med, 2022. **20**(1): p. 62.
220. Korn, C. and H.G. Augustin, *Mechanisms of Vessel Pruning and Regression*. Dev Cell, 2015. **34**(1): p. 5-17.
221. Yoshimura, K., et al., *Integrin alpha2 mediates selective metastasis to the liver*. Cancer Res, 2009. **69**(18): p. 7320-8.
222. Jung, J.I., et al., *High-fat diet-induced obesity increases lymphangiogenesis and lymph node metastasis in the B16F10 melanoma allograft model: roles of adipocytes and M2-macrophages*. Int J Cancer, 2015. **136**(2): p. 258-70.
223. Geraud, C., et al., *The metastatic cycle: metastatic niches and cancer cell dissemination*. J Dtsch Dermatol Ges, 2014. **12**(11): p. 1012-9.
224. Shetty, S., P.F. Lalor, and D.H. Adams, *Liver sinusoidal endothelial cells - gatekeepers of hepatic immunity*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **15**(9): p. 555-567.
225. Olsavszky, V., et al., *Exploring the transcriptomic network of multi-ligand scavenger receptor Stabilin-1- and Stabilin-2-deficient liver sinusoidal endothelial cells*. Gene, 2021. **768**: p. 145284.
226. Rodrigues, R.M., et al., *E-Selectin-Dependent Inflammation and Lipolysis in Adipose Tissue Exacerbate Steatosis-to-NASH Progression via S100A8/9*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2022. **13**(1): p. 151-171.
227. Lertkiatmongkol, P., et al., *Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)*. Curr Opin Hematol, 2016. **23**(3): p. 253-9.
228. Hintermann, E. and U. Christen, *The Many Roles of Cell Adhesion Molecules in Hepatic Fibrosis*. Cells, 2019. **8**(12).
229. Furuta, K., et al., *Lipid-induced endothelial vascular cell adhesion molecule 1 promotes nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis*. J Clin Invest, 2021. **131**(6).
230. Chen, Q. and J. Massague, *Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5520-5.
231. Zhao, J., et al., *Inhibition of alpha(4) integrin mediated adhesion was involved in the reduction of B16-F10 melanoma cells lung colonization in C57BL/6 mice treated with gambogic acid*. Eur J Pharmacol, 2008. **589**(1-3): p. 127-31.
232. Garrido-Urbani, S., et al., *Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 2): p. 203-11.

7. Quellenverzeichnis

233. Reinisch, W., et al., *Targeting Endothelial Ligands: ICAM-1/alicaforsen, MAdCAM-1*. J Crohns Colitis, 2018. **12**(suppl_2): p. S669-S677.
234. Benedicto, A., I. Romayor, and B. Arteta, *Role of liver ICAM-1 in metastasis*. Oncol Lett, 2017. **14**(4): p. 3883-3892.
235. Laubli, H. and L. Borsig, *Selectins promote tumor metastasis*. Semin Cancer Biol, 2010. **20**(3): p. 169-77.
236. Biancone, L., et al., *Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 581-7.
237. Chen, C., et al., *The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 64.
238. Rudrabhatla, S.R., C.L. Mahaffey, and M.E. Mummert, *Tumor microenvironment modulates hyaluronan expression: the lactate effect*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(6): p. 1378-87.
239. Dufour, A., et al., *Role of matrix metalloproteinase-9 dimers in cell migration: design of inhibitory peptides*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 35944-56.
240. Luzzi, K.J., et al., *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 865-73.
241. Lopez, B.G., et al., *Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice*. Comp Hepatol, 2011. **10**(1): p. 2.
242. Krenkel, O. and F. Tacke, *Liver macrophages in tissue homeostasis and disease*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(5): p. 306-321.
243. Katayama, A., et al., *Beneficial impact of Gpnmb and its significance as a biomarker in nonalcoholic steatohepatitis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16920.
244. Onaga, M., et al., *Osteoactivin expressed during cirrhosis development in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet, accelerates motility of hepatoma cells*. J Hepatol, 2003. **39**(5): p. 779-85.
245. Kumagai, K., et al., *Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma B (Gpnmb)-Positive Macrophages Contribute to the Balance between Fibrosis and Fibrolysis during the Repair of Acute Liver Injury in Mice*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0143413.
246. Zigrino, P., et al., *Stromal expression of MMP-13 is required for melanoma invasion and metastasis*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(11): p. 2686-93.
247. Cassetta, L., et al., *Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets*. Cancer Cell, 2019. **35**(4): p. 588-602 e10.
248. Lopez-Yrigoyen, M., L. Cassetta, and J.W. Pollard, *Macrophage targeting in cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2021. **1499**(1): p. 18-41.
249. Kong, W., et al., *Prognostic value of CD169-positive macrophages in various tumors: a meta-analysis*. Bioengineered, 2021. **12**(1): p. 8505-8514.
250. Tacconi, C., et al., *CD169(+) lymph node macrophages have protective functions in mouse breast cancer metastasis*. Cell Rep, 2021. **35**(2): p. 108993.
251. Jing, W., et al., *Breast cancer cells promote CD169(+) macrophage-associated immunosuppression through JAK2-mediated PD-L1 upregulation on macrophages*. Int Immunopharmacol, 2020. **78**: p. 106012.

7. Quellenverzeichnis

252. Gangopadhyay, A., D.A. Lazure, and P. Thomas, *Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells.* Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(8): p. 703-12.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der menschlichen Leber. Die Leber ist in kleine Leberläppchen unterteilt, welche als sechseckige Struktur interpretiert werden können. Das Blut stammt aus den im Portalfeld gelegenen Leberarterien und Portalvenen, welches sich im Lebersinus mischt und in der Zentralvene abfließt. Angepasst von „Structure of Liver Lobule“ von BioRender.com (2024). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates-> 2 -

Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Lebersinus mit Darstellung der verschiedenen Zellpopulationen. Im Sinuslumen sitzen die Kupferzellen direkt auf den Lebersinusendothelzellen (LSEC). Die LSEC bilden eine fenestrierte Barriere, hinter der der Dissesche Raum beginnt. In diesem befinden sich die Sternzellen und die Hepatozyten. Erstellt mit BioRender.com. - 3 -

Abbildung 3: Rasterelektronenaufnahme des Lebersinus mit den angrenzenden Strukturen. Zu erkennen ist der Lebersinus mittig im Bild mit seinen charakteristischen Fenestrationsen, welche in Siebplatten angeordnet sind. An den Lebersinus grenzt der Dissesche Raum an, hinter dem die Hepatozyten mit den Gallengängen liegen. [Das Bild wurde freundlicherweise von Frau Julia Schüler, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt]. - 6 -

Abbildung 4: Clearance-Funktionen und Immunregulation der LSEC (A) Chylomikrone können über die Fenestrationsen die LSEC passiv passieren. (B) Über Oberflächenrezeptoren wie Mannose-Rezeptoren, den Fc-Rezeptor CD32B, die Scavenger-Rezeptoren Stabilin-1 und -2, C-Typ-Lectin-Rezeptoren wie CLEC4F, CLEC4G und CLEC4M sowie Adhäsionsmoleküle wie ICAM1 und VCAM1 können LSEC verschiedene Substanzen aktiv aus dem Blutstrom entfernen. (C) LSEC exprimieren Toll-like Rezeptoren, welche an der angeborenen Immunität beteiligt sind, sowie MHC I und II Rezeptoren, die ebenfalls an der angeborenen Immunität beteiligt sind. Die Grafik wurde adaptiert und lizenziert unter CC BY 4.0 aus Koch, Philipp-Sebastian et al. "Angiodiversity and organotypic functions of sinusoidal endothelial cells." *Angiogenesis* vol. 24,2 (2021): 289-310. doi:10.1007/s10456-021-09780-y [86]..... - 8 -

Abbildung 5: Schematischer Krankheitsverlauf der nichtalkoholischen Fettleber-Erkrankung. Zu Beginn kommt es zu einer „nichtalkoholischen Fettleber“ (NAFLD), welche sich durch Entzündungen zu einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) entwickeln kann. Bis zu diesem Stadium ist die Erkrankung reversibel. Wird die chronische Schädigung der Leber nicht unterbrochen, so kann es zu einer irreversiblen Zirrhose und/oder hepatozellulärem Karzinom kommen. Bei der Zirrhose ist die kompensierte Form komplikationslos. Eine dekomensierte Zirrhose bringt gravierende Folgeerkrankungen mit sich und bedarf einer Lebertransplantation. Angepasst von „Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Spectrum“ von BioRender.com (2024). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates->..... - 10 -

Abbildung 6: LV252 Plasmid mit einem Luciferase-Gen mit EF1-Promotor und tdTomato mit PGK-Promotor. Als Selektionsmarker besitzt das Plasmid ein Ampicillin-, Bleomycin- und ein Puromycin-Resistenz-Gen. - 23 -

Abbildung 7: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von B16F10Luc2-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert und 14 Tage später die Metastasenbildung in Lunge und Leber analysiert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. - 55 -

Abbildung 8: Makroskopische Bilder und Auswertung von Leber- und Lungenmetastasen und ex vivo BLI-Bilder mit B16F10Luc2 nach zehn Wochen CDAA-Diät. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (C) Gezählte Metastasen in der Leber (8 vs. 8, $p = 0,0448$), gemessene Metastasenfläche auf der Leber in Prozent. Gezeigt wird der Mittelwert aus dem Ergebnis der Ober- und Unterseite (5 vs. 7, $p = 0,0277$). (D) Repräsentative BLI von zehn Wochen mit CDAA bzw. Kontrollfutter gefütterten Tieren mit anschließender B16F10Luc2-Zellinjektion und zwei Wochen Metastasenwachstum. Skala: Min.: 5×10^4 (p/sec/cm²/sr); Max: 8×10^6 (p/sec/cm²/sr). Biolumineszenz-Signal als Total Flux (Photonen pro Sekunde). Gezeigt wird der Mittelwert des Signals der Ober- und Unterseite (7 vs. 8, $p = 0,0239$). - 56 -

Abbildung 9: Gewichtsmessungen nach 14 Tagen B16F10Luc2-Metastasenwachstum. (A) Körpergewicht (8 vs. 8, n. s.). (B) Lebergewicht (8 vs. 8, $p = 0,0155$). (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis (8 vs. 8, $p=0,0079$). (D) Lungengewicht (8 vs. 8, n. s.). - 57 -

Abbildung 10: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von B16F10Luc2-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen mit und ohne Fortsetzung der CDAA-Fütterung nach Injektion von Melanomzellen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert, wobei eine Gruppe nach der Injektion weiterhin mit CDAA gefüttert wurde und eine andere Gruppe nach der Injektion auf Normalfutter umgestellt wurde. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich Normalfutter. 14 Tage später wurden die Metastasen in Lunge und Leber untersucht. - 57 -

Abbildung 11: Makroskopische Bilder sowie Auswertung von Leber- und Lungenmetastasen mit B16F10Luc2-Metastasen nach zehn Wochen CDAA-Diät mit und ohne Weiterfütterung der CDAA-Diät. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontrollgruppe (links) und der CDAA-Gruppe mit Fortführung der CDAA-Fütterung (Mitte) und Fortführung der normalen Fütterung nach Tumorzellinjektion (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontrollgruppe (links) und der CDAA-Gruppe mit Fortführung der CDAA-Fütterung (Mitte) und Fortführung der normalen Fütterung nach Tumorzellinjektion (rechts). (C) Gezählte Zahl an Lebermetastasen (8 vs. 8 vs. 8, $p = 0,0091$) und quantifizierte Fläche der Metastasen auf der gesamten Leberfläche (8 vs. 8 vs. 8, $p = 0,0316$). - 58 -

Abbildung 12: Gewichtsmessungen nach 14 Tagen B16F10Luc2-Metastasenwachstum mit und ohne Weiterfütterung der CDAA-Diät. (A) Körpergewicht (8 vs. 8 vs. 8, n. s.). (B) Lebergewicht (8 vs. 8 vs. 8, $p = 0,0131$) (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis (8 vs. 8 vs. 8, $p = 0,0117$). (D) Lungengewicht (7 vs. 8 vs. 8, n. s.). - 58 -

Abbildung 13: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von Wt31-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden Wt31-

8. Anhang

Zellen in die Schwanzvene injiziert und 19 Tage später die Metastasenbildung in Lunge und Leber analysiert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. - 59 -

Abbildung 14: Makroskopische Bilder von Leber und Lunge und Auswertung der hepatischen und pulmonaler Metastasen nach 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (C) Anzahl hepatischer Metastasen (6 vs. 5, $p = 0,0045$) und prozentuale Fläche der Metastasen zur Leberfläche (6 vs. 5, $p = 0,0027$). (D) Anzahl pulmonaler Metastasen (6 vs. 5, $p = 0,0059$) und die prozentuale Fläche der Metastasen zur Lungenfläche (6 vs. 5, n. s.). - 59 -

Abbildung 15: Gewichtsmessungen nach 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum. (A) Körpergewicht (6 vs. 5, n. s.). (B) Lebergewicht (6 vs. 5, $p < 0,0001$). (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis (6 vs. 5, $p = 0,0034$). (D) Lungengewicht (6 vs. 5, n. s.). - 60 -

Abbildung 16: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von Wt31-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen mit und ohne Fortsetzung der CDAA-Fütterung nach Injektion von Melanomzellen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden Wt31-Zellen in die Schwanzvene injiziert, wobei eine Gruppe nach der Injektion weiterhin mit CDAA gefüttert wurde und eine andere Gruppe nach der Injektion auf Normalfutter umgestellt wurde. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich Normalfutter. 19 Tage später wurden die Metastasen in Lunge und Leber untersucht. - 60 -

Abbildung 17: Makroskopische Bilder von Leber und Lunge mit Wt31-Metastasen nach zehn Wochen CDAA-Diät mit und ohne Weiterfütterung der Diät. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontrollgruppe (links) und der CDAA-Gruppe mit Fortführung der CDAA-Fütterung (Mitte) und Fortführung der normalen Fütterung nach Tumorzellinjektion (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontrollgruppe (links) und der CDAA-Gruppe mit Fortführung der CDAA-Fütterung (Mitte) und Fortführung der normalen Fütterung nach Tumorzellinjektion (rechts). (C) Gezählte Metastasen in der Leber (6 vs. 6 vs. 5, $p = 0,0009$) und prozentuale Fläche der Metastasen zur Leberfläche (6 vs. 6 vs. 5 $p = 0,002$). (D) Gezählte Metastasen in den Lungen (6 vs. 6 vs. 5, $p = 0,0006$) und prozentuale Fläche der Metastasen zur Lungenfläche (6 vs. 6 vs. 5, $p = 0,025$). - 61 -

Abbildung 18: Gewichtsmessungen nach 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum mit und ohne Weiterfütterung der CDAA-Diät. (A) Körpergewicht (6 vs. 6 vs. 5, n. s.). (B) Lebergewicht (6 vs. 6 vs. 5, $p < 0,0001$). (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis (6 vs. 6 vs. 5, $p < 0,0001$). (D) Lungengewicht (6 vs. 6 vs. 5, n. s.). - 62 -

Abbildung 19: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von Mc38-Zellen in der Leber von mit CDAA gefütterten Mäusen. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden zehn Wochen lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden Mc38-Zellen in die Milz injiziert und 14 Tage später die Metastasenbildung in Lunge und Leber analysiert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. - 62 -

Abbildung 20: Makroskopische Bilder der Lebern und Lungen und Auswertung der Metastasen nach 14 Tagen Mc38-Wachstum (A) Lebern der Kontroll- und CDAA-Gruppe.

8. Anhang

(B) Lungen der Kontroll- und CDAA-Gruppe. Skala: 1 cm. (C) Gezählte Anzahl der Mc38-Metastasen nach zehn Wochen CDAA-Diät mit Weiterfütterung nach Tumorzellinjektion. 8 vs. 9, $p = 0,8215$ - 63 -

Abbildung 21: Versuchsaufbau zur Charakterisierung der murinen Leber nach kurzer CDAA-Fütterungsdauer. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj wurden für einen Tag sowie eine, zwei und vier Wochen mit CDAA-Diät gefüttert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. Die Organe wurden fotografiert, die Gewichte dokumentiert und das Gewebe asserviert. Zusätzlich wurden Blutparameter zur Leberfunktion bestimmt. - 64 -

Abbildung 22: Makroskopische Bilder und Gewichtsmessungen von Lebern der Normalfutterkontrolle (obere Reihe) und CDAA-Diät (untere Reihe). (A) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild pro Gruppe. Skala: 1 cm. (B) Körpergewicht: n. s. (C) Lebergewicht: ein Tag, $p = 0,0086$; eine Woche, $p = 0,0129$; zwei Wochen, $p = 0,0057$; vier Wochen, $p = 0,0017$. (D) Leber-zu-Körper-Verhältnis: ein Tag, $p = 0,0010$; eine Woche, $p = 0,01064$; zwei Wochen, $p = 0,0016$; vier Wochen, $p = 0,0286$. (E) Lungengewicht: n. s. Alle Gruppen mit $n = 4$ - 65 -

Abbildung 23: H&E-, PSR- und ORO-Färbungen zur Charakterisierung von kurzen CDAA-Fütterungen und Quantifizierung der ORO-positiven Fläche. (A) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives H&E-Bild von der CDAA gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach einem Tag, sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 μm . (B) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives PSR-Bild von der CDAA gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach einem Tag, sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 μm . (C) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives ORO-Bild von der CDAA gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach einem Tag, sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 μm . (D) Quantifizierung der ORO-positiven Fläche: Ein Tag, $p = 0,0069$; eine Woche, $p < 0,0001$; zwei Wochen, $p < 0,0001$; vier Wochen, $p < 0,0001$. Alle Gruppen mit $n = 4$ - 66 -

Abbildung 24: Blutfettwerte und Leberschadensmarker von gefütterten Wildtypen nach kurzen CDAA-Fütterungen. (A) Serumspiegel von Alanin-Aminotransferase (ALT) (ein Tag, n. s.; eine Woche, $p = 0,0286$; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, $p = 0,0079$). (B) Aspartat-Aminotransferase (AST) (ein Tag, n. s.; eine Woche, $p = 0,0286$; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, $p = 0,0007$). (C) Gesamtcholesterin (ein Tag, $p = 0,0286$; eine Woche, $p = 0,0017$; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, $p = 0,0024$). (D) Cholinesterase (ein Tag, $p = 0,006$; eine Woche, $p = 0,0014$; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, $p = 0,0008$). (E) Triglyceride (TG) (ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.). Alle Gruppen mit $n = 4$ - 67 -

Abbildung 25: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von B16F10Luc2-Zellen in der Leber nach kürzeren Fütterungsperioden von einem Tag, eine, zwei und vier Wochen CDAA-Diät. Zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden einen Tag sowie eine, zwei und vier Wochen lang mit CDAA gefüttert, dann wurden B16F10-Zellen in die Milz injiziert und anschließend mit Normalfutter weitergefüttert. Das Metastasenwachstum in Leber und Lunge wurde 14 Tage nach der Injektion bewertet. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse derselben Linie, desselben Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. - 68 -

Abbildung 26: Makroskopische Bilder der Lebern, Auswertung der hepatischen Metastasen und Auswertung des gemessenen hepatischen Biolumineszenz-Signals nach kurzer CDAA-Fütterung und B16F10Luc2-Injektion. (A) Obere Reihe:

8. Anhang

Normalfutterkontrolle mit sichtbaren B16F10Luc2-Metastasen nach einem Tag, einer, zwei und vier Wochen Fütterung. Untere Reihe: CDAA-Diät Gruppe nach einem Tag, einer, zwei und vier Wochen CDAA-Diät. Skala: 1 cm. (B) Gezählte Metastasen in der Leber: Ein Tag, n. s. n = 7 vs. 8; eine Woche, p = 0,0004 n = 7 vs. 7; zwei Wochen, p = 0,009 n = 7 vs. 8; vier Wochen, p = 0,0002 n = 8 vs. 7. (C) Gemessene Metastasenfläche auf der Leber in Prozent: Ein Tag, n. s. n = 7 vs. 8; eine Woche, p = 0,0001 n = 7 vs. 8; zwei Wochen, p = 0,0152 n = 7 vs. 8; vier Wochen, p = 0,0012 n = 7 vs. 6. (D) Gemessenes Biolumineszenz-Signal der Lebern: Ein Tag, p = 0,0205 n = 7 vs. 8; eine Woche, p = 0,0225 n = 8 vs. 7; zwei Wochen, p = 0,0209 n = 7 vs. 8; vier Wochen, p = 0,0004 n = 8 vs. 7. - 69 -

Abbildung 27: Auswertung der biometrischen Auswertungen nach kurzer CDAA-Fütterung und B16F10Luc2-Injektion. (A) Körpergewicht: Ein Tag n. s., n = 7 vs. 8, eine Woche n. s., n = 8 vs. 7, zwei Wochen n. s., n = 7 vs. 8, vier Wochen n. s., n = 8 vs. 7. (B) Lebergewicht: Ein Tag n. s., n = 7 vs. 8, eine Woche p = 0,0006, n = 8 vs. 7, zwei Wochen n. s., n = 7 vs. 8, vier Wochen p = 0,0015, n = 8 vs. 7. (C) Leber-zu-Körper-Verhältniss: Ein Tag n. s., n = 7 vs. 8, eine Woche p = 0,0023, n = 8 vs. 7, zwei Wochen n. s., n = 7 vs. 8, vier Wochen p = 0,0013, n = 8 vs. 7. (D) Lungengewicht: Ein Tag n. s., n = 7 vs. 8, eine Woche n. s., n = 8 vs. 7, zwei Wochen n. s., n = 7 vs. 8, vier Wochen n. s., n = 8 vs. 7. - 70 -

Abbildung 28: Makroskopische Bilder und Auswertung der B16F10Luc2-Metastasen nach einer Woche CDAA in Männchen. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (B) Gezählte Metastasen in der Leber (4 vs. 3, p = 0,0273) sowie die gemessene Fläche der Metastasen auf der Leber in Prozent. Gezeigt wird der Mittelwert der BLI-Quantifizierung aus dem Ergebnis der Ober- und Unterseite (4 vs. 3, p = 0,0176). Biolumineszenz Signal als Total Flux (Photonen pro Sekunde). Gezeigt wird der Mittelwert des Signals der Ober- und Unterseite (4 vs. 3, p = 0,0374). (C) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). - 70 -

Abbildung 29: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von Wt31-Zellen in der Leber nach kürzeren Fütterungsperioden von einem Tag, einer, zwei und vier Wochen CDAA-Diät. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden einen Tag sowie eine, zwei und vier Wochen lang mit CDAA gefüttert, dann wurden Wt31-Zellen intravenös injiziert und anschließend mit Normalfutter weitergefüttert. Das Metastasenwachstum in Leber und Lunge wurde 19 Tage nach der Injektion bewertet. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse derselben Linie, desselben Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. - 71 -

Abbildung 30: Makroskopische Bilder der Lebern und Lungen sowie die Auswertung der Metastasen nach kurzer CDAA-Fütterung und 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum. (A) Repräsentative Bilder der Lebern: Obere Reihe: Normalfutterkontrollen. Untere Reihe: CDAA-Diät Gruppen. Skala: 1 cm Die farblichen Unterschiede sind auf unterschiedliche Belichtungsverhältnisse zurückzuführen. (B) Gezählte hepatische Metastasen: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, n. s. n = 5 vs. 8; vier Wochen, n. s. n = 5 vs. 5. (C) Gemessene metastatische Fläche der Lebern: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5; zwei Wochen, n. s. n = 5 vs. 8; vier Wochen, n. s. n = 5 vs. 5. (D) Repräsentative Bilder der Lungen: Obere Reihe: Normalfutterkontrolle mit sichtbaren Wt31-Metastasen nach einem Tag, einer, zwei und vier Wochen Fütterung. Untere Reihe: CDAA-Diät Gruppe nach einem Tag, einer, zwei und vier Wochen CDAA-Diät. Skala: 1 cm. (E) Gezählte pulmonale Metastasen: Ein Tag, n. s. n = 4 vs. 5; eine Woche, n. s. n = 4 vs. 5;

8. Anhang

zwei Wochen, $p = 0,0351$ $n = 5$ vs. 8; vier Wochen, $p = 0,0071$ $n = 5$ vs. 5. (F) Gemessene metastatische Fläche der Lungen: Ein Tag, n. s. $n = 4$ vs. 5; eine Woche, n. s. $n = 4$ vs. 5; zwei Wochen, $p = 0,0005$ $n = 5$ vs. 8; vier Wochen, $p = 0,0029$ $n = 5$ vs. 5. - 72 -

Abbildung 31: Auswertung der Gewichtsmessungen nach kurzer CDAA-Fütterung und 19 Tagen Wt31-Metastasenwachstum. (A) Körpergewicht: Ein Tag, n. s. $n = 4$ vs. 5; eine Woche, n. s. $n = 4$ vs. 5; zwei Wochen, n. s. $n = 5$ vs. 8; vier Wochen, n. s. $n = 5$ vs. 5. (B) Lebergewicht: Ein Tag, n. s. $n = 4$ vs. 5; eine Woche, n. s. $n = 4$ vs. 5; zwei Wochen, n. s. $n = 5$ vs. 8; vier Wochen, n. s. $n = 5$ vs. 5. (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis: Ein Tag, n. s. $n = 4$ vs. 5; eine Woche, n. s. $n = 4$ vs. 5; zwei Wochen, n. s. $n = 5$ vs. 8; vier Wochen, n. s. $n = 5$ vs. 5. (D) Lungengewicht: Ein Tag, n. s. $n = 4$ vs. 5; eine Woche, n. s. $n = 4$ vs. 5; zwei Wochen, n. s. $n = 5$ vs. 8; vier Wochen, n. s. $n = 5$ vs. 5. - 73 -

Abbildung 32: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von Mc38-Zellen in der Leber nach einwöchiger Fütterung mit CDAA. Weibliche C57BL/6NRj-Mäuse im Alter von zehn Wochen wurden eine Woche lang mit CDAA gefüttert. Anschließend wurden Mc38-Zellen in die Milz injiziert und 14 Tage später die Metastasierung in Lunge und Leber analysiert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. - 74 -

Abbildung 33: Makroskopische Bilder von Leber und Lunge nach einer Woche CDAA-Diät und 14 Tagen Mc38-Metastasenwachstum. (A) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Leber aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (B) Makroskopische Aufnahme einer repräsentativen Lunge aus der Kontroll- (links) und CDAA-Gruppe (rechts). (C) Gezählte Metastasen in der Leber (7 vs. 6, $p = 0,6376$). - 74 -

Abbildung 34: Versuchsablauf zur Untersuchung der Metastasierung von B16F10Luc2-Zellen in der Leber nach kürzeren Fütterungsperioden von zwei und vier Wochen mit einer fettreichen Diät (HFD). Zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden zwei und vier Wochen lang mit HFD gefüttert, dann wurden B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert und anschließend mit Normalfutter weitergefüttert. Das Metastasenwachstum in Leber und Lunge wurde 14 Tage nach der Injektion bewertet. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse derselben Linie, desselben Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. . - 75 -

Abbildung 35: Auswertung der hepatischen Metastasen nach HFD und 14 Tagen B16F10Luc2-Metastasenwachstum. (A) Makroskopische Bilder der Lebern nach 14 Tagen Metastasenwachstum in der Kontrollgruppe (obere Reihe) gegen die HFD-Gruppe (untere Reihe). Maßstab: 1 cm. (B) Zwei Wochen, 5 vs. 6; $p = 0,0303$, vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (C) Gemessene Metastasenfläche auf der Leber in Prozent: zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (D) Repräsentative BLI-Bilder der Kontroll- und HFD-Gruppe. Skala: Min.: 5×10^4 (p/sec/cm²/sr); Max: $8,5 \times 10^6$ (p/sec/cm²/sr). Die Lebern wurden als ROI festgelegt und die BLI-Signale wurden angezeigt. (E) Quantifizierung des BLI-Signals: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. - 76 -

Abbildung 36: Auswertung der Gewichtsmessungen nach kurzer Fettdiät und 14 Tagen B16F10Luc2-Metastasenwachstum. (A) Körpergewicht: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (B) Lebergewicht: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (C) Leber-zu-Körper-Verhältnis: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. (D) Lungengewicht: Zwei Wochen, 5 vs. 6; n. s., vier Wochen 8 vs. 7; n. s.. - 76 -

Abbildung 37: Versuchsaufbau zur Charakterisierung der murinen Leber nach kurzer HFD-Fütterungsdauer. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj wurden für einen Tag sowie eine, zwei und vier Wochen mit HFD-Diät gefüttert. Die Kontrollgruppe erhielt normales Futter. Die Organe wurden fotografiert, die Gewichte dokumentiert und das Gewebe asserviert. Zusätzlich wurden Blutparameter zur Leberfunktion bestimmt. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert..... - 77 -

Abbildung 38: Biometrische Daten nach einem Tag bis vier Wochen Fettdiät. (A) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild pro Gruppe. Skala: 1 cm. (B) Körpergewicht: Ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.. (C) Lebergewicht: Ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.. (D) Leber-zu-Körper-Verhältnis: Ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.. (E) Lungengewicht: Ein Tag, n. s.; eine Woche, n. s.; zwei Wochen, n. s.; vier Wochen, n. s.. Alle Gruppen mit n = 4. - 78 -

Abbildung 39: H&E-, PSR- und ORO-Färbungen zur Charakterisierung von kurzen HFD-Fütterungen sowie ORO-Quantifizierung und Triglycerid-Assay. (A) Gezeigt ist jeweils eine repräsentative H&E-Aufnahme von der gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach ein Tag sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 µm. (B) Gezeigt ist jeweils eine repräsentative PSR-Aufnahme von der gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach ein Tag sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 µm. (C) Gezeigt ist jeweils eine repräsentative ORO-Aufnahme von der HFD gefütterten Gruppe und Normalfutterkontrolle nach ein Tag sowie einer, zwei und vier Wochen. Skala: 100 µm. (D) Quantifizierung der ORO-positiven Fläche in Prozent der gesamten Leberfläche: Ein Tag, p = 0,0003; eine Woche, p < 0,0001; zwei Wochen, p = 0,0173; vier Wochen, p = 0,0025. (E) Triglycerid-Assay von Lebergewebe nach kurzen Fütterungszeiten mit HFD: Ein Tag, p = 0,0002; eine Woche, p = 0,0003; zwei Wochen, p = 0,0011; vier Wochen, n. s.. Alle Gruppen mit n = 4. - 79 -

Abbildung 40: Auswertung der Blutplasmawerte nach kürzerer Fütterungsdauer einer fettreichen Diät mit der jeweiligen Kontrollgruppe. (A) Serumspiegel von Alanin-Aminotransferase (ALT), (B) Serumspiegel von Aspartat-Aminotransferase (AST). (C) Serumspiegel von Cholesterin (ein Tag, p = 0,0015; eine Woche, p = 0,0021; zwei Wochen, p = 0,0286; vier Wochen, p < 0,0001). (D) Serumspiegel von Cholinesterase. (E) Serumspiegel von Triglyceriden (TG). n = 4 je Gruppe..... - 80 -

Abbildung 41: Versuchsaufbau für die Bildung von B16F10Luc2-Metastasen im genetischen *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Mausmodell. Bei zwölf Wochen alten weiblichen *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Mäusen wurden B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert und 14 Tage später die Bildung der Metastasen in der Leber analysiert. Als Kontrollen wurden die Cre-negativen Geschwister der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters verwendet..... - 81 -

Abbildung 42: Qualitative und quantitative Auswertung der B16F10Luc2-Metastasen im *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Modell. (A) Repräsentative makroskopische Bilder der Lebern (Maßstab = 1 cm). (B) Gezählte Anzahl der Lebermetastasen (8 vs. 7, p = 0,0199). (C) Quantifizierter Anteil der Metastasen an der gesamten Leberfläche (8 vs. 7, p = 0,0080). (D) *Ex vivo* BLI-Bilder der Lebern 14 Tage nach der Zellinjektion. Skala: Min: 6×10^6 (p/sec/cm²/sr); Max: $1,1 \times 10^8$ (p/sec/cm²/sr). Die Lebern wurden als ROI festgelegt und die BLI-Signale wurden ausgewertet. (E) Quantifiziertes BLI-Signal 14 Tage nach der Injektion (8 vs. 7, p = 0,0138). - 82 -

8. Anhang

Abbildung 43: Schematischer Versuchsaufbau der RNA-Sequenzierung. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden einen Tag oder eine Woche mit CDAA gefüttert und anschließend die aus den LSEC isolierte RNA sequenziert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert..... - 83 -

Abbildung 44: Volcano Plot aller Gene nach einem Tag und einer Woche CDAA-Diät. Aufgetragen ist der negative log₁₀ (Adj. p-Wert) gegen den log (fold change). Die gestrichelte Linie zeigt den *significant cut off* (Adj. p = 0,05 bzw. > 1,30 als $-\log_{10}(0,05)$) und die gepunktete Linie den *fold change* größer (schwarz) und kleiner gleich 0 (grau). (A) Regulierte Gene nach ein Tag CDAA-Diät. (B) Regulierte Gene nach einer Woche CDAA. - 83 -

Abbildung 45: Enrichment Scores und Heatmaps der LSEC- und CEC-spezifischen Gene nach einem Tag CDAA-Diät. (A) Enrichment Scores der LSEC (oben, NES: -1,7; Adj. p-Wert: 0,026) und CEC (unten, NES: 1,2; Adj. p-Wert: 0,196) Gene. (B) Heatmap mit LSEC-Genen nach einem Tag CDAA. (C) Heatmap mit CEC-Genen nach einem Tag CDAA. .. - 84 -

Abbildung 46: Enrichment Scores und Heatmaps der LSEC- und CEC-spezifischen Gene nach einer Woche CDAA-Diät. (A) Enrichment Scores der LSEC (oben, NES: -2,4; Adj. p-Wert: $4,27 \cdot 10^{-07}$) und CEC (unten, NES: 1,1; Adj. p-Wert: 0,28171) Gene. (B) Heatmap mit LSEC-Genen nach einer Woche CDAA. (C) Heatmap mit CEC-Genen nach einer Woche CDAA. - 85 -

Abbildung 47: Aktivierte und supprimierte KEGG-Signalwege in murinen LSECs. (A) Geneset Enrichment Plot mit den stärksten aktivierten und unterdrückten KEGG-Signalwegen. (B) Geneset Enrichment der „*Cell adhesion molecules*“ (Enrichment-Score: 2,3729, Adj. p-Wert: < 0,0001)..... - 86 -

Abbildung 48: Heatmap der 40 am signifikantesten regulierten Gene des GO Term „*Cell adhesion*“-Geneset und Volcano Plot des „*cell adhesion molecules*“-KEGG Genesets nach einer Woche CDAA-Diät. (A) Die 13 am signifikantesten herunterregulierten Gene in der CDAA-Gruppe. (B) Die 27 am signifikantesten hochregulierten Gene in der CDAA-Gruppe. (C) Aufgetragen ist der $-\log_{10}$ (Adj. p-Wert) gegen den log (fold change). Die gestrichelte Linie zeigt den *significant cut off* (Adj. p-Wert = 0,05 bzw. > 1,30 als $-\log_{10}(0,05)$). Signifikante Gene mit einem positiven *fold change* sind in Grün, signifikante Gene mit einem negativen *fold change* in Rot dargestellt. Gene, die das Signifikanzniveau nicht erreichen sind als graue Punkte dargestellt..... - 87 -

Abbildung 49: Heatmap von GATA4 nachgeschalteten Gene nach einer Woche CDAA-Diät. Dargestellt sind 72 Gene nach einer Woche CDAA-Diät, die durch den Transkriptionsfaktor GATA4 reguliert werden. Dargestellt sind die auf eins normierten Expressionswerte der Sequenzierungsdaten..... - 88 -

Abbildung 50: Immunfluoreszenz-Färbungen (IF) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) von Adhäsionsmolekülen und Endothelmarkern nach einer Woche CDAA in der Leber. (A – C) Hepatische Immunfluoreszenzfärbung und FISH (links) und Quantifizierung (rechts) von Adhäsionsmolekülen und Endothelmarkern nach einer Woche CDAA-Diät (n = 4 bei allen Färbungen). (A) ICAM1 (p = 0,0184), LYVE1 und EMCN (p = 0,0307). (B) VCAM1 (p = 0,034) und LYVE1 (p = 0,003). (C) FISH von *Cdh5* (n. s.) und *Sele* (p = 0,0273)..... - 89 -

Abbildung 51: IF-Färbungen von weiteren Endothelmarkern nach einer Woche CDAA in der Leber. (A, B) Hepatische Immunfluoreszenzfärbung (links) und Quantifizierung (rechts) von Kapillarierungs- und Endothelmarkern nach einer Woche CDAA-Diät (n = 4 bei allen

8. Anhang

Färbungen). (A) PODXL und Stab2 ($p = 0,0103$). (B) PODXL, CD31 ($p = 0,0337$) und CD44 ($p = 0,0002$)..... - 90 -

Abbildung 52: Immunfluoreszenz-Färbungen (IF) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) von Adhäsionsmolekülen und Endothelmarkern nach einem Tag CDAA-Diät in der Leber. (A – D) Hepatische Immunfluoreszenzfärbung und FISH (links) und Quantifizierung (rechts) von Adhäsionsmolekülen und LSEC-Markern nach einem Tag CDAA-Diät ($n = 4$ bei allen Färbungen). (A) ICAM1, LYVE1 und EMCN. (B) VCAM1 und LYVE1. (C) PODXL und Stab2. (D) FISH von *Cdh5* und *Sele*. Alle Quantifizierungen nicht signifikant. - 91 -

Abbildung 53: Heatmap mit Makrophagen-Genen nach einer Woche CDAA-Diät. Gezeigt sind 19 Makrophagen-Gene mit ihrem auf 1 normalisierten Expressionsniveau. - 92 -

Abbildung 54: IF und FISH von Makrophagen- und Endothelmarkern nach einer Woche CDAA in der Leber. (A) FISH von *Gpnmb* (Mittlere Intensität $p < 0,0001$; Fläche $p = 0,01$) und *Cdh5*. (B, C) Immunfluoreszenz-Färbungen (linke Seite) und Quantifizierung (rechte Seite) von Makrophagen-Markern und Adhäsionsmolekülen nach einer Woche CDAA-Diät. (B) VCAM1, LYVE1 und CD169 (Mittlere Intensität, $p = 0,0092$; Fläche, $p = 0,0425$; $n = 4$). (C) CLEC4F (Mittlere Intensität, $p = 0,0258$; Fläche, $p = 0,0286$; $n = 4$)..... - 93 -

Abbildung 55: IF von Makrophagen-, Adhäsions- und Endothelmarkern in den Lebern von *Gata4*^{LSEC-KO/BL}-Mäusen. (A – C) Immunfluoreszenzfärbung (linke Seite) und Quantifizierungen (rechte Seite). (A) VCAM1, LYVE1 und CD31 (VCAM1 Fläche, $p = 0,0286$; LYVE1 Fläche, $p = 0,0016$; $n = 4$). (B) F4/80, CLEC4F und LYVE1 (F4/80 Fläche, $p = 0,0033$; CLEC4F Fläche, $p = 0,3095$; $n = 4$). (C) ICAM1, EMCN und CD169 (ICAM1 Fläche, $p = 0,0679$; EMCN Fläche, $p = 0,0286$; $n = 4$). - 94 -

Abbildung 56: Schematischer Versuchsaufbau des B16F10Luc2-Zellretentions-Assays nach einem Tag, einer, zwei und zehn Wochen CDAA-Diät. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden für einen Tag sowie eine, zwei und zehn Wochen mit CDAA-Diät gefüttert. Anschließend wurden B16F10Luc2-Zellen in die Milz injiziert und das Biolumineszenz-Signal nach 90 Minuten in der Leber gemessen. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. - 95 -

Abbildung 57: Makroskopische Aufnahmen der Lebern und Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals (A – D) *Ex vivo* BLI-Bilder von Lebern 90 Minuten nach der Zellinjektion. Skala: Min.: 7×10^4 (p/sec/cm²/sr); Max: 8×10^6 (p/sec/cm²/sr) und Quantifizierung des BLI-Signals der Lebern. Die Lebern wurden als ROI festgelegt, quantifiziert und die BLI-Signale wurden angezeigt. (A) Ein Tag, $p = 0,0094$ $n = 8$ vs. 8. (B) Eine Woche, $p = 0,0012$ $n = 8$ vs. 8. (C) Zwei Wochen, $p = 0,0027$ $n = 8$ vs. 8. (D) Zehn Wochen, $p = 0,0461$ $n = 7$ vs. 6. - 96 -

Abbildung 58: Makroskopische Aufnahmen der Lebern und Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals in Männchen. (A, B) *Ex vivo* BLI-Bilder von Lebern 90 Minuten nach der Zellinjektion. Skala: Min.: $5,57 \times 10^4$ (p/sec/cm²/sr); Max: $1,63 \times 10^5$ (p/sec/cm²/sr). Die Lebern wurden als ROI festgelegt und die BLI-Signale wurden angezeigt. (B) Quantifizierung des BLI-Signals in Lebern nach einer Woche, $p < 0,0001$, $n = 8$ vs. 7. - 96 -

Abbildung 59: Schematischer Versuchsaufbau für den Retentions-Assay nach einer Woche CDAA-Diät und Mc38Luc-Zellen. Zu Beginn zehn Wochen alte weibliche C57BL/6NRj-Mäuse wurden für eine Woche mit CDAA-Diät gefüttert. Anschließend wurden Mc38Luc Zellen in die Milz injiziert und das Biolumineszenz-Signal 90 Minuten später in der

8. Anhang

Leber gemessen. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse der gleichen Linie, des gleichen Geschlechts und Alters kontinuierlich mit Normalfutter gefüttert. - 97 -

Abbildung 60: Makroskopische Aufnahmen der Lebern und Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals von Mc38Luc. (A) *Ex vivo* BLI-Bilder von Lebern 90 Minuten nach der Zellinjektion. Skala: Min.: 7×10^4 (p/sec/cm²/sr); Max: 8×10^6 (p/sec/cm²/sr). Die Lebern wurden als ROI festgelegt und die BLI-Signale wurden angezeigt. (B) Quantifizierung des BLI-Signals in Lebern nach einer Woche CDAA, $p = 0,014$, $n = 7$ vs. 8 - 97 -

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kommerziell erworbene Plasmide	- 23 -
Tabelle 2: Primer-Sequenzen zur Bestimmung der Genotypen	- 24 -
Tabelle 3: Unkonjugierte Antikörper	- 24 -
Tabelle 4: Konjugierte Antikörper	- 25 -
Tabelle 5: RNA-Sonden zur Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	- 25 -
Tabelle 6: Verwendete Kits	- 26 -
Tabelle 7: Verwendete Medikamente	- 26 -
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien.....	- 26 -
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien, Lösungsmittel und Reagenzien	- 27 -
Tabelle 10: Puffer und Medien.....	- 30 -
Tabelle 11: Liste der verwendeten Diäten.....	- 31 -
Tabelle 12: Liste der Verbrauchsmaterialien	- 31 -
Tabelle 13: Liste der verwendeten Geräte	- 34 -
Tabelle 14: Verwendete Programme mit Entwickler und der verwendeten Version .	- 37 -
Tabelle 15: Verwendete Mauslinien mit Lieferanten und Literaturangaben	- 38 -
Tabelle 16: Stufen der Hämatoxylin & Eosin- und Pikro-Sirius Rot-Färbungen	- 46 -

8.3 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AEG	advanced glycation end-products
AF	Alexa Fluor®
ALT	Alanin-Aminotransferase
AM	akral-lentiginöse Melanom
ANOVA	Analysis of Variance
AOX	Acyl-Coenzym-A-Oxidase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BDL	bile duct ligation
BLI	Biolumineszenz Imaging
BMP2	Bone Morphogenetic Protein-2
BRAF	B-rapidly accelerated fibrosarcoma protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cCasp3	Cleaved Caspase3
CCl ₄	Tetrachlormethan
CD	Cluster of Differentiation
CDAA	L-Aminosäure-definierte Cholin-defiziente Diät
CDH5	Cadherin-5
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CEC	Continuous endothelial cell
CLEC4G	C-Type Lectin Domain Family 4 Member G
Cre	cyclization recombination
CSD	Chronic sun-damaged
Cy	Cyanine
CYP	Cytochrome P450
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEN	Diethylnitrosamin
dH ₂ O	Destilliertes H ₂ O
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMN	Dimethylnitrosamin

8. Anhang

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epithelial growth factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
et al.	et alteri, „und die jeweils andere“
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fcy	fragment crystallisable Gamma
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded tissue
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
Fw	forward
G	Gauge
GATA4	GATA Binding Protein 4
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
GGPPS	Geranylgeranyl Diphosphate Synthase 1
GLUT	Glucosetransporter
GPNMB	Non-Metastatic Melanoma Protein B
GPR	G protein-coupled receptor
GS	Glutaminsynthetase
GSEA	Gene set enrichment analysis
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
h	hours
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HAL	Histidine Ammonia-Lyase
HbA1C	Hämoglobin A1c
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozellulaeres Karzinom
HFD	High fat diet
HIER	Heat induced epitope retrieval

8. Anhang

HSC	Hepatic stellate cell
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
IF	Immunofluorescence
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IVIS	<i>In vivo</i> Imaging System
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
KI	Konfidenzintervall
KO	Knockout
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cells
LSECtin	Alias CLEC4G
LYVE1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCD	methionine- and choline-deficient
MDB	Mallory-Denk-Körperchen
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
MIF-1	Melanocyte-inhibiting factor
MM	Malignes Melanom
Mm	Mus musculus
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	messengerRNA
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
NDS	Normal donkey serum
NES	Normalized Enrichment Score
NF-1	Neurofibromatose Typ 1

8. Anhang

NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen
NOX1	NADPH Oxidase-1
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral
ORO	Oil red O
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PFA	Paraformaldehyde
PRR	pattern-recognition receptors
PSR	Pikro-Sirius Rot
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RIN	RNA integrity number
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of Interest
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Room temperature
Rv	Reverse
SAA	Serum Amyloid A
SELE	E-Selektin
α SMA	alpha-smooth muscle actin
SSM	superfiziell spreitende Melanom
Stab2	Stabilin-2
TAA	Thioacetamid
TGF β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Ugs.	Umgangssprachlich

8. Anhang

UV	Ultraviolett
VAP-1	Vascular adhesion protein 1
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
ZV	Zentralvene

Danksagung

Auch wenn bei einer Dissertation die eigenständige wissenschaftliche Arbeit im Vordergrund steht, ist sie ohne eine gute Betreuung, ein unterstützendes Kollegium und den Rückhalt im privaten Umfeld nur schwer zu bewältigen.

Daher vielen Dank an Prof. Goerdts und Prof. Reiners-Koch, die mir dieses Projekt zugetraut und mich in ihrer Arbeitsgruppe betreut und beraten haben. Ich danke meinem Erstgutachter Prof. Dr. Thomas Wieland sowie Prof. Dr. Dr. Georg Stöcklin und Prof. Dr. Peter Angel für ihre Bereitschaft, als Gutachter zu fungieren. Vielen Dank Philipp, dass du dich in den ersten Monaten meines Projektes wöchentlich mit mir getroffen hast, um meine Ergebnisse zu besprechen und die nächsten Schritte zu planen. Danke für die Begutachtung dieser Arbeit und die Betreuung meiner Projekte.

Ich danke auch meinem wissenschaftlichen Betreuer, Oberarzt PD Dr. med. Victor Olsavszky, für seine nette, offene und freundschaftliche Unterstützung. Ich habe mich immer auf unsere Treffen gefreut, die sehr ausgeglichen, ruhig und meistens sehr produktiv waren. Obwohl die erste Einreichung des Papers bis zur Abgabe dieser Arbeit nicht mit Erfolg gekrönt war, konnte ich persönlich viel mitnehmen und sehr viel von dir lernen.

Um die Menschen hinter den Kulissen nicht zu vergessen, möchte ich dem Laborteam von ganzem Herzen für alles danken. Es sind zu viele Namen und zu viele Erlebnisse, um sie hier alle zu nennen, ohne jemanden zu vergessen. Jeder Tag mit Euch war für mich eine Freude, geprägt von viel Lachen, lustigen kleinen Streichen und stets offenen Ohren, um Probleme und Ergebnisse zu diskutieren oder Fragen zu stellen und Lösungen zu finden. Dieser bunte Haufen an verschiedensten Charakteren führte zu einer perfekten Laborsymbiose, in der jeder jedem hilft und für den anderen einspringt. Die Mittagspausen waren dabei immer das kleine Highlight des Tages. Liebes Laborteam, vielen Dank für alles! Liebe Bianca, vielen Dank für jede Kaffeepause und Diskussion über Gott und die Welt, aber vor allem auch für die methodische Hilfe, zusammen mit Céline, in meiner Anfangszeit. Liebe Sina, vielen Dank für deine Hilfsbereitschaft und dass du immer da bist, wenn irgendwo „Not am Mann“ ist. Liebe Julia, vielen Dank, dass du frischen Wind in unser Projekt gebracht hast und mich in den letzten Jahren immer wieder neu motiviert hast.

Zum Schluss möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken. Danke an meine Eltern für die selbstverständliche Unterstützung meine eigenen Ziele zu erreichen und dafür, dass ihr mich immer meinen Weg habt gehen lassen. Von ganzem Herzen danke ich Katharina, du hast mir im Privaten immer den Rücken freigehalten, angefangen beim Studium, über das Staatsexamen bis hin zur Promotion. Danke für deine Hilfe und Unterstützen, sowie beim Korrekturlesen und Formatieren. Liebe Schwiegereltern, vielen Dank für Eure Unterstützung in jeder Art und Weise. Lieber Stephan, vielen Dank für den Druck dieser Arbeit. Vielen Dank an Sammy, Cordu und Toni. Ihr Tiere seid einfach etwas Wundervolles.