

**Monoklonale Proliferationseinheiten in der Leber:  
Zusammenhang mit hepatischer Stammzelllokalisierung und  
hepatozellulärem Karzinom**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Livia Diana Koch  
aus Köln

2013

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard Büttner
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.10.2013

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Bonn  
des Universitätsklinikums Bonn  
Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Reinhard Büttner  
Amtierender Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

**Meiner Familie gewidmet**



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Leber und hepatische Regenerationsfähigkeit</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Funktion.....	11
1.2.2 Gefäßversorgung und makroskopische Baueinheiten .....	11
1.2.3 Mikroskopische Bau- und Funktionseinheiten .....	12
1.2.4 Hepatische Zytologie .....	14
1.2.4.1 Hepatozyten .....	14
1.2.4.2 Gallengangsepithelzellen .....	15
1.2.4.3 Sinusoidale Epithelzellen.....	15
1.2.4.4 Kupffer'sche Sternzellen.....	15
1.2.4.5 Ito-Zellen .....	16
1.2.5 Lebererkrankungen.....	16
1.2.6 Das hepatozelluläre Karzinom.....	16
1.2.7 Die hepatische Regeneration .....	19
<b>1.3 Mitochondrien</b> .....	<b>22</b>
1.3.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien.....	22
1.3.2 Die Atmungskette mit der Cytochrom-c-Oxidase .....	22
1.3.3 Mitochondriale Genetik.....	25
1.3.3.1 Mitochondriale Transkription, Translation und Replikation .....	28
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1 Untersuchungsmaterial</b> .....	<b>32</b>
2.1.1 Morphometrischer Vergleich von Patches in HCC- und non-HCC-Lebern	32
2.1.2 Mutationsanalyse der COX-Gene .....	34
<b>2.2 Histologische Präparate aus kryokonserviertem Gewebe</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3 Histologische Färbungen</b> .....	<b>34</b>
2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	34
2.3.2 Enzymhistochemische Färbungen.....	35
2.3.2.1 Cytochrom-c-Oxidase-Aktivitäts-Färbung (COX-Färbung) .....	35

2.3.2.2	Succinat-Dehydrogenase-Färbung (SDH-Färbung) .....	35
2.3.2.3	Färbevorgang .....	36
<b>2.4</b>	<b>Identifikation der Patch-Gruppen .....</b>	<b>36</b>
<b>2.5</b>	<b>DNA-Extraktion aus Patches .....</b>	<b>37</b>
2.5.1	Lasermikrodissektion .....	37
2.5.2	Zelllyse .....	38
<b>2.6</b>	<b>DNA-Amplifizierung der COX-Gene.....</b>	<b>38</b>
2.6.1	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	38
2.6.2	Nested PCR.....	39
<b>2.7</b>	<b>Aufreinigung der PCR-Produkte durch Polyethylenglykol-Fällung.....</b>	<b>42</b>
<b>2.8</b>	<b>Detektion der Fragmente mittels Gelelektrophorese.....</b>	<b>42</b>
<b>2.9</b>	<b>Nachweis von Mutationen mittels DNA-Sequenzierung.....</b>	<b>44</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Morphologie der Patches/Felder .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Größere und zahlreichere Patches in HCC-tragenden Lebern .....</b>	<b>50</b>
3.2.1	HCC tragend.....	51
3.2.2	Nicht HCC-tragend .....	55
3.2.3	Vergleich der Messergebnisse von HCC-tragend und nicht HCC-tragend.....	60
3.2.3.1	Grafische Darstellung der Ergebnisse .....	62
<b>3.3</b>	<b>Mutationsanalyse der MT-COX-Gene in benachbarten Patches.....</b>	<b>63</b>
3.3.1	Identifizierte Polymorphismen.....	67
3.3.2	Analyse der genetischen Beziehungen der Felder in einer Gruppe.....	68
3.3.2.1	Patchgruppe 1 .....	68
3.3.2.2	Patchgruppe 2 .....	69
3.3.2.3	Patchgruppe 3 .....	71
3.3.2.4	Patchgruppe 4 .....	73
3.3.2.5	Patchgruppe 5 .....	75
3.3.2.6	Patchgruppe 6 .....	77
3.3.3	Grafische Auswertung der Mutationsanalyse exemplarisch für eine Patchgruppe .....	79
3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mutationsanalyse .....	80

<b>4. Diskussion</b> .....	<b>81</b>
<b>4.1 Existenz klonaler Proliferationseinheiten in der Leber</b> .....	<b>81</b>
4.1.1 Verminderte Aktivität der COX als phänotypischer Marker für Homoplasmie.....	81
4.1.2 Entstehung von Homoplasmie.....	82
4.1.2.1 Zufall.....	83
4.1.2.2 Selektion.....	83
4.1.2.3 Transmission nur weniger mtDNA-Moleküle in die Tochterzelle.....	85
4.1.2.4 Auswahl von wenigen mtDNA-Molekülen zur Replikation .....	85
4.1.2.5 Rolling circle replication.....	85
4.1.2.6 Replikative Segregation.....	86
<b>4.2 Zusammenhang der klonalen Proliferationseinheiten mit dem hepatozellulären Karzinom</b> .....	<b>94</b>
<b>4.3 Entstehung der einzelnen Patches unabhängig voneinander aus eigenen Stammzellen</b> .....	<b>95</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>97</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>99</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>102</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>104</b>
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>117</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A max	Größte gemessene Fläche
A med	Arithmetisches Mittel der gemessenen Flächen
A min	Kleinste gemessene Fläche
ATP	Adenosintriphosphat
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
COX	Cytochrom-c-Oxidase
Cox1/2/3	Untereinheit 1/2/3 der Cytochrom-c-Oxidase
COX-Färbung	Cytochrom-c-Oxidase-Färbung
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
ddH <sub>2</sub> O	Zweifach destilliertes Wasser (double-distilled water)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FNH	Fokal noduläre Hyperplasie
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H-Strang	Schwerer Strang (Heavy strand)
IGF	Insuline-like Growth Factor
IRS	Insuline Receptor Substrate
L-Strang	Leichter Strang
MMP	Metalloproteinase
MT-CO1/2/3	Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die Untereinheit 1/2/3 der Cytochrom-c-Oxidase
MT-TG	Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die tRNA von Glycin
mtDNA	Mitochondriale DNA
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBT	Nitroblautetrazoliumsals
nDNA	Nukleäre DNA
n-HCC	Kein hepatozelluläres Karzinom tragend
OH	Origin of heavy strand
OL	Origin of light strand
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor

PEG-Fällung	Polyethylenglykol-Fällung
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDH-Färbung	Succinat-Dehydrogenase-Färbung
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffe
TERT	Telomerase-Reverse Transkriptase
TFAM	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TFBM	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor B
TGF	Transforming Growth Factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## 1. Einleitung

### 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Eine der faszinierendsten Eigenschaften der Leber ist ihre Fähigkeit zur Regeneration. Die Lokalisation des hepatischen Stammzellkompartiments, welches zum einen für die normale Zellerneuerung in der gesunden Leber, zum anderen für die hepatische Regeneration nach Leberschädigung verantwortlich ist, ist weiterhin umstritten.

Mit unseren Untersuchungen möchten wir zu der Aufklärung des hepatischen Proliferations- und Regenerationsmechanismus beitragen. Die Kenntnis dieses Mechanismus ist für das Verständnis sowohl der Biologie des normalen Leberparenchyms als auch der Entstehung von Neoplasmen in der Leber wichtig.

In einer vorausgegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass sich das Leberparenchym aus klonalen Zellgruppen zusammensetzt, die alle ihren Ursprung in der gleichen Leberstammzelle/Vorläuferzelle haben (Adam et al., 2012). Dies entspricht dem gleichen Prinzip wie in der klonalen Kolonkrypte, deren Enterozyten sich aus Kryptenstammzellen ableiten. Markermutationen auf der mtDNA machen eine histochemische Darstellung klonaler Proliferationen möglich. In HCC-tragenden, nicht zirrhotischen Lebern fanden sich in der genannten Studie signifikant größere Patches, die zudem auch signifikant mehr Mutationen der mtDNA trugen. Das ist Ausdruck von einer verminderten Anzahl für die Parenchymregeneration zur Verfügung stehender Vorläuferzellen. Unklar ist jedoch weiterhin wie es zu einem Stammzellverlust kommt und wie die verbleibenden Lebervorläuferzellen den Schaden ersetzen.

Den Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms und den beschriebenen klonalen Proliferationseinheiten möchten wir genauer untersuchen.

Insbesondere möchten wir den genetischen Ursprung der verschiedenen klonalen Proliferationseinheiten genauer untersuchen. In dieser Arbeit werden durch Analyse der Markermutationen benachbarte Patches auf ihre Verwandtschaft hin untersucht. Die Ergebnisse sollen Aufschluss darüber geben, ob benachbarte Patches tatsächlich aus verschiedenen Vorläuferzellen oder auch einer reduplizierten Vorläuferzelle entstanden sind. Letzteres würde eine Regenerationsaktivität auch durch symmetrische Teilung bedeuten, ein Mechanismus, der den Stammzellpool selbst regeneriert. So ziehen wir

die Möglichkeit in Erwägung, dass die einzelnen klonalen Proliferationseinheiten, die nebeneinander einem Portalfeld zuzuordnen sind, einen gemeinsamen genetischen Ursprung haben.

## *1.2 Leber und hepatische Regenerationsfähigkeit*

### **1.2.1 Funktion**

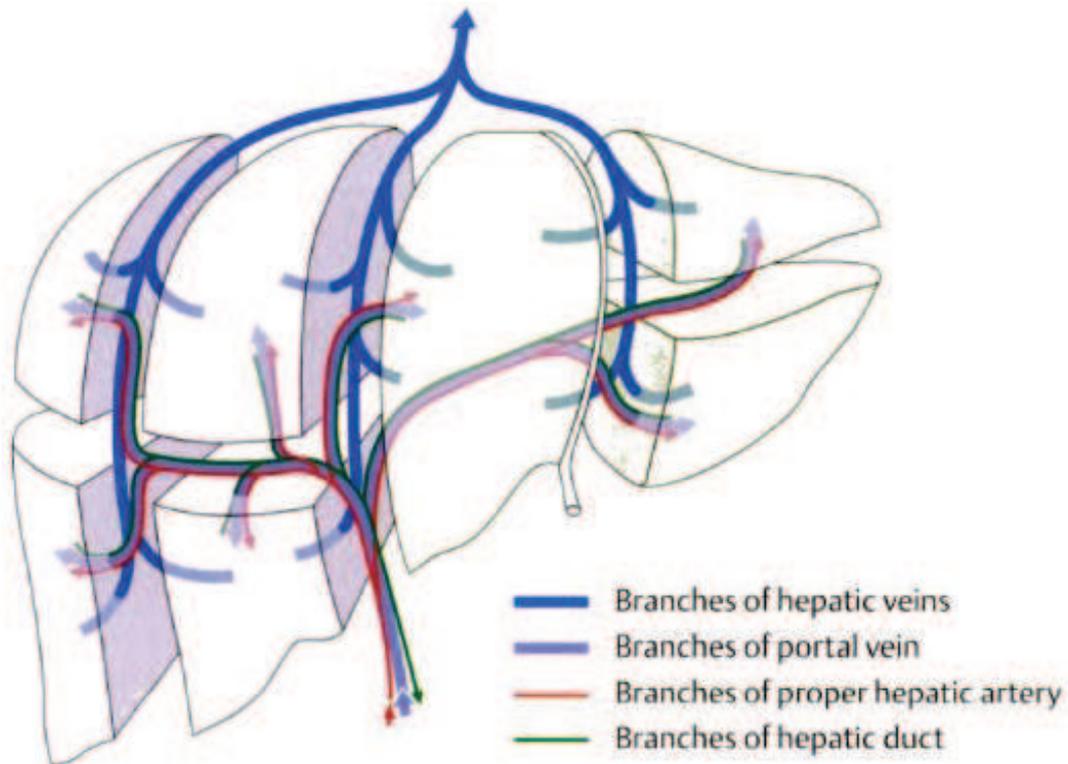
Die Leber als das bedeutendste Stoffwechselorgan des Körpers erfüllt zahlreiche metabolische Funktionen. Unter anderem spielt sie eine Rolle in der Regulation des Blutglucosespiegels und im Fettstoffwechsel. Außerdem übernimmt sie Entgiftungsfunktionen und die Synthese von Plasmaproteinen mit spezifischen Funktionen. Neben der Niere ist sie das wichtigste Organ für die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Fremdstoffen.

Sie übernimmt die Aufnahme und Speicherung von Aminosäuren, Kohlenhydraten, Gallensäuren, Cholesterin, Proteinen, Fetten und Vitaminen und die darauf folgende Abgabe in Galle und/oder Blut.

### **1.2.2 Gefäßversorgung und makroskopische Baueinheiten**

Die Leber wird durch zwei Gefäßsysteme versorgt, die in ihrer Hämodynamik sehr unterschiedlich sind. Das Pfortadersystem stellt mit etwa 70 % den Hauptanteil des Blutflusses und führt als funktionelles Gefäß sauerstoffarmes, aber nährstoffreiches Blut aus dem Magen-Darm-Trakt. Mit sauerstoffreichem Blut wird die Leber über die Arteria hepatica an das arterielle Hochdrucksystem angeschlossen. Durch diese Lage zwischen Magen-Darm-Trakt und peripheren Organen nimmt die Leber eine Sonderstellung in der Blutversorgung ein und wird über die beiden genannten Systeme versorgt. Es kann zu einer unvollständigen Vermengung des Blutes aus dem Gastrointestinaltrakt und der Milz kommen, sodass die verschiedenen Leberlappen manche Toxine, Nährstoffe und andere Elemente in unterschiedlichem Umfang erhalten. Dieses Phänomen bezeichnet man als portales Stromlinienphänomen (Haywood, 1981; Thein et al., 2003). Gemeinsame Endstrecke beider Systeme sind die Lebersinusoide. Hier erfolgt die Aufnahme toxischer Substanzen aus der Blutbahn bzw. die Abgabe wichtiger Verbindungen wie Glutathion und Gerinnungsfaktoren.

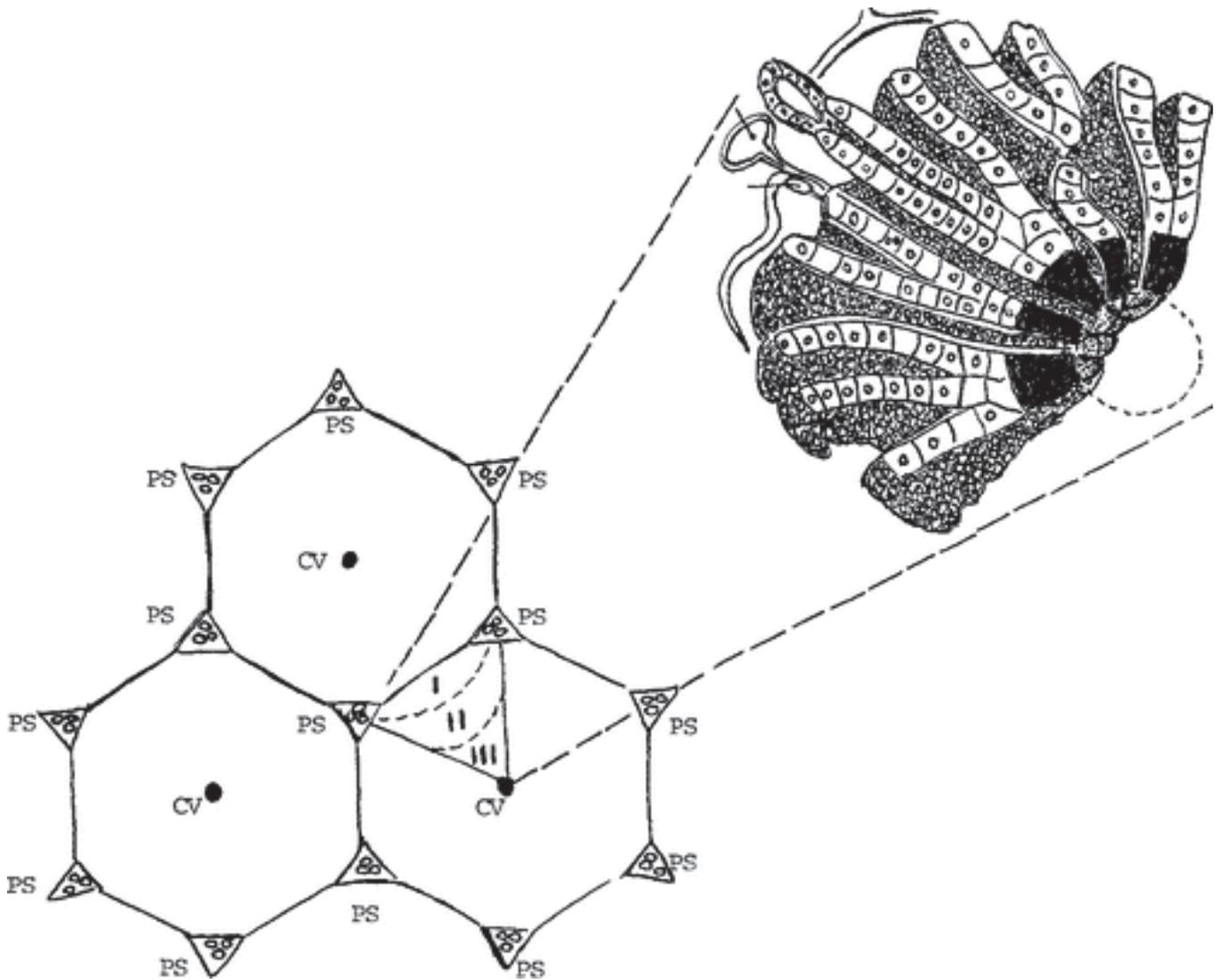
Traditionellerweise wird die menschliche Leber in den rechten Lappen, den linken Lappen, den Lobus quadratus und den Lobus caudatus unterteilt. Später wurde jedoch auch eine andere Unterteilung in neun Segmente, ausgehend von dem vaskulären und duktalem Verzweigungsmuster, vorgestellt (Couinaud, 1957). Die segmentale Einteilung ist zum Beispiel zur chirurgischen Planung sinnvoll.



**Abb. 1: Einteilung der Leber nach der Blutversorgung in acht Segmente (nach Schuenke und Schulte 2010)**

### 1.2.3 Mikroskopische Bau- und Funktionseinheiten

Das Lebergewebe wird klassischerweise in die so genannten Leberläppchen unterteilt (Kiernan, 1833). Unabhängig davon, in welchem Winkel man die Leber anschneidet, man findet immer die Einheiten mit einer Zentralvene in der Mitte, umgeben von 4 – 6 Portalfeldern mit Glissontrias. Aufgrund dieses Phänomens wird die Leber auch als isotropes Parenchym bezeichnet (Matsumoto und Kawakami, 1982).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der klassischen Leberläppchen und der Leberazini (nach Tzanakakis et al., 2000). CV: Zentralvene, PS: Periportalfeld.

Die Glissontrias besteht aus einer Portalvene, einem Gallengang und einer hepatischen Arterie. Ein Portalfeld enthält im Schnitt 1 – 2 Arterien, 1 Portalvene, 1 – 2 Gallengänge, Lymphgefäße und Nerven in einer Bindegewebsmatrix aus hauptsächlich Typ1-Kollagen (Burt et al., 2006).

1954 stellte Rappaport die Einteilung des Lebergewebes in Azini als funktionelle Unter-einheiten vor (Rappaport et al., 1954). Diese Einteilung bezieht sich auf die Zonen zwischen den Zentralvenen. Sie unterschied sich von der bisherigen, denn sie repräsentierte sowohl die funktionelle als auch die strukturelle Einteilung, was eine Erklärung für Läsionen wie Nekrose und Fibrose bot.

Das mikrozirkulatorische, angioarchitektonische Konzept des primären Leberläppchens von Matsumoto et al. (1979) betont die Bedeutung „vaskulärer Septen“ innerhalb des Leberparenchyms als Gerüst der Läppchenarchitektur. Als vaskuläre Septen werden die terminalen Aufzweigungen der Portalvene angesehen. Nach Matsumoto et al. ist jedes primäre Läppchen eine von vaskulären Septen begrenzte keilförmige Struktur aus einer portalen und einer septalen Zone (Dancygier, 2003). Obwohl in den 80er und 90er Jahren weitere alternative Modelle von funktionellen hepatischen Untereinheiten vorgestellt wurden, blieb das Modell von Matsumoto das am weitesten akzeptierte.

#### **1.2.4 Hepatische Zytologie**

Von den 15 Zelltypen, die in der Leber vorkommen (Malarkey et al., 2005; Malik et al., 2002) machen die Hepatozyten 60 % aller Zellen und 80 % des Lebervolumens aus. Sinusoidale Endothelzellen, Kupffer'sche Sternzellen, Ito-Zellen und Gallengangsepithelzellen machen jeweils 3 – 20 % der restlichen biologisch wichtigen Zellen aus.

##### *1.2.4.1 Hepatozyten*

Die Hepatozyten sind große, polygonale Epithelzellen mit meistens einem, manchmal auch zwei Zellkernen. Sie sind in Zellbalken radiär um eine Zentralvene angeordnet (Burt et al., 2006). Die sechs oder mehr Oberflächen des Hepatozyten grenzen entweder an benachbarte Parenchymzellen, bilden die Gallengänge oder grenzen an den perisinusoidalen Raum. Die Seite, die an den perisinusoidalen Raum grenzt, ist mit Mikrovilli bedeckt.

Die Hepatozyten entnehmen die der Leber zugeführten Proteine, Fette und Kohlenhydrate, verstoffwechseln sie und produzieren als Sekret zwischen 250 und 1000 ml Galle pro Tag.

Normalerweise enthält ein Hepatozyt ungefähr 30 Lysosomen und 500 Peroxisomen. 15 % des Zellvolumens besteht aus rauem endoplasmatischem Retikulum (Fawcett, 1997). Es gibt viele freie Ribosomen und Golgi-Komplexe. Hepatozyten enthalten im Vergleich zu anderen Zellen ein besonders dichtes mitochondriales Netzwerk und besonders viel mtDNA. Wiesner et al. (1992) konnten in Rattenleber  $743 \times 10^9$  Moleküle mtDNA pro Gramm und 1 bis 3 Moleküle mtDNA pro Mitochondrium nachweisen.

#### *1.2.4.2 Gallengangsepithelzellen*

Das Gallenepithel dient hauptsächlich als Auskleidung der Gallengänge, modifiziert aber auch die Gallenflüssigkeit. Die Epithelzellen produzieren Mediatoren, die eine Rolle beim Zellwachstum spielen.

#### *1.2.4.3 Sinusoidale Epithelzellen*

Die sinusoidalen Epithelzellen sind die primäre Barriere zwischen Blut und Hepatozyten im Disse-Raum, wo eigentlicher Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten stattfindet (Braet und Wisse, 2002). Die Endothelzellen verbinden sich wegen ihrer verzweigten Form nur unter Bildung von Poren, weshalb man die Lebersinusoiden auch als Kapillaren vom gefensterten Typ bezeichnet. Diese Fenestrierungen sind dynamische Strukturen, deren Durchmesser von Blutdruck, vasoaktiven Substanzen, Medikamenten und Giften abhängt (Fraser et al., 1980; McCuskey et al., 1983) und so in unterschiedlichem Ausmaß den Durchtritt von Makromolekülen ermöglicht (Vollmar et al., 1994). Aufgrund der fehlenden Basallamina, ihrer Fensterung und ihrer ausgeprägten Endozytosekapazität sind sie einzigartige Endothelzellen.

#### *1.2.4.4 Kupffer'sche Sternzellen*

Die Kupffer'schen Sternzellen stammen von zirkulierenden Monozyten ab (Bykov et al., 2004). Sie befinden sich an der Innenwand der Sinusoide zwischen den Endothelzellen und erreichen mit ihren Pseudopodien den Disse'schen Raum und die Leberparenchymzellen. Sie entnehmen dem Pfortaderblut körperfremde und körpereigene Substanzen wie Schadstoffe, Bakterien, Stoffwechselprodukte und geschädigte Erythrozyten, und bauen diese ab. Außerdem produzieren sie Zytokine und Entzündungsmediatoren. Kupffer-Zellen sind amöboid beweglich und können sich so aus dem Endothelverband lösen. Ihre Aufgabe ist es, Viren, Bakterien, Pilze, Immunkomplexe, Endotoxine der gramnegativen Erreger (Decker, 1990; Fabriek et al., 2005) und Zelltrümmer, aber auch Tumorzellen aus dem von der V. portae kommenden Blut zu phagozytieren (McCuskey et al., 1983).

#### 1.2.4.5 Ito-Zellen

Die Ito-Zellen oder hepatischen Sternzellen befinden sich in der normalen Leber in einer Art Ruhezustand. Die ruhenden Ito-Zellen bilden 5-8 % der Leberzellen (Geerts, 2001). Sie dienen der Vitamin A- und Fettspeicherung und gelten als Produzenten der intra-lobulären Bindegewebsfasern.

Wenn die Leber geschädigt wird, können die Ito-Zellen in einen aktivierten Zustand übergehen. Dabei steigt die Menge an gespeichertem Vitamin A und es werden Kollagen sowie andere extrazelluläre Substanzen sezerniert. Zudem kommt es zu einer gesteigerten Proliferation der Ito-Zellen (Stanciu et al., 2002).

Die vermehrte Sekretion von kollagenem Narbengewebe kann zur Leberzirrhose führen.

### 1.2.5 Lebererkrankungen

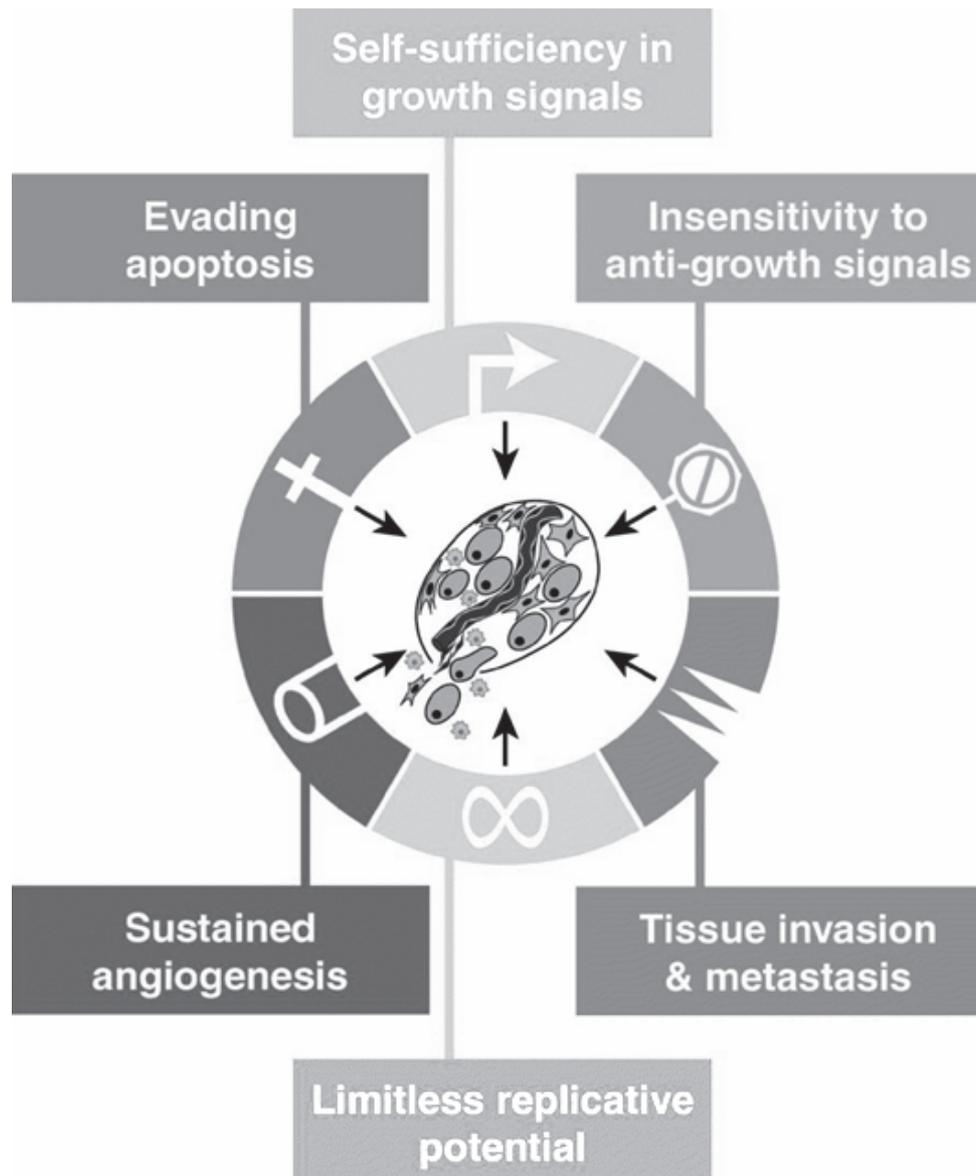
Aufgrund der umfassenden Funktionen der Leber und der nicht ersetzbaren Funktion des Organs im menschlichen Körper, gehören Lebererkrankungen zu den häufigsten Todesursachen weltweit (Anderson und Smith, 2003). Die Erforschung der Regenerationsmechanismen der Leber ist daher für die Entwicklung neuer Therapieprinzipien wichtig.

### 1.2.6 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom ist ein von den Parenchymzellen der Leber ausgehender bösartiger Tumor. Bei der Hepatokarzinogenese herrschen zwei pathogene Mechanismen vor (Whittaker et al., 2010):

1. Leberzirrhose, assoziiert mit hepatischer Regeneration nach Gewebeschädigung durch Hepatitisinfektion, Toxine (Alkohol, Aflatoxin) oder metabolische Einflüsse (Donato et al., 2006)
2. Mutationen in einzelnen oder mehreren Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen

Beide Mechanismen können mit Veränderungen in verschiedenen wichtigen Signaltransduktionswegen in Verbindung gebracht werden. Diese sind besonders für die Entwicklung neuer Therapieansätze von großer Bedeutung.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der sechs Faktoren, die zur Tumorentstehung bei-tragen (nach Hanahan und Weinberg, 2000).** Self-sufficiency in growth signals: Autarkie bei Wachstumssignalen, Insensitivity to anti-growth signals: Resistenz gegenüber wachstumshemmen-den Signalen, Evading apoptosis: Umgehen der Apoptose, Limitless replicative potential: Unbe-grenztes replikatives Potential, Sustained angiogenesis: Anhaltende Angiogenese, Tissue invasion & metastasis: Invasion umliegenden Gewebes und Metastasenbildung

Die Störungen in Signal-wegen, die zur Entstehung eines Karzinoms beitragen, lassen sich in sechs Gruppen unterteilen (Hanahan und Weinberg, 2000):

1. Autarkie bei Wachstumssignalen
2. Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen
3. Umgehen der Apoptose

4. Unbegrenzt replikatives Potential
5. Anhaltende Angiogenese
6. Invasion umliegendes Gewebe und Metastasenbildung

Auch beim HCC lassen sich verschiedene dieser Störungen feststellen (Thorgeirsson und Grisham, 2002):

- Störungen der Zellzyklusregulation, die in etwa 50 % aller Fälle auftreten, führen zu einer unregulierten DNA-Replikation. Sie resultieren aus *TP53* Punktmutationen, dem Verlust der Heterozygotie, dem Verlust von p16 oder Retinoblastomgenen, oder einer Überexpression von Cyclin D1.
- Eine gestörte Angiogenese, die bereits in einem frühen Stadium der Hepatokarzinogenese festgestellt werden kann, resultiert aus einer auto- oder parakrinen Sekretion von VEGF oder PDGF.
- Störungen in extrinsischen oder intrinsischen Apoptosesignalwegen führen zur Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion (durch das Immunsystem oder durch Chemotherapeutika), z.B. über eine verminderte Expression von CD95 (Strand et al., 1996) oder eine vermehrte Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-x<sub>L</sub> (Takehara et al., 2001) oder Survivin (Ikeguchi et al., 2002), die mit der HCC-Progression korrelieren (Fields et al., 2004).
- Reaktivierung der Telomerase-Reverse Transkriptase (TERT), und damit eine Blockade von Seneszenz-assoziiertem Zelltod.
- Vermehrte Expression von Metalloproteinasen (MMP-14/MMP-9) und damit die Begünstigung der Metastasierung.
- Unkontrollierte Expression von Wachstums- und Angiogenesefaktoren oder von Komponenten ihrer Signaltransduktionskaskaden. So konnte beim HCC unter anderem eine Überexpression von IGF-II (Insulin-like Growth Factor II), IRS-1/-2 (Insulin Receptor Substrate-1/-2), TGF- (Transforming Growth Factor-), HGF, dem HGF-Rezeptor cMET, EGFR/Her1 und VEGF nachgewiesen werden (Breuhahn et al., 2006).

Schätzungen über die Inzidenz von Krebserkrankungen zeigen, dass primärer Leberkrebs die fünfthäufigste bösartige Erkrankung beim Mann und die achthäufigste

bösartige Erkrankung bei der Frau bleibt (Bosch et al., 2005). Beim hepatozellulären Karzinom (HCC) gibt es mehr als 1 Millionen Erkrankungsfälle pro Jahr (Bosch et al., 1999). Die meisten HCC-Erkrankungen entwickeln sich auf dem Boden einer Zirrhose.

In Entwicklungsländern südlich der Sahara und in Südostasien besteht die höchste Inzidenz mit etwa 150/100.000 Einwohnern. Dabei korreliert das Auftreten von HCC mit der Prävalenz der Hepatitis-B-Virus-Infektion (HBV-Infektion) (Beasley et al., 1981). Chang et al., (1997) konnten zeigen, dass nach Einführung eines universellen Impfprogramms gegen das HBV die HCC-Inzidenz bei Kindern ab sechs Jahren deutlich zurückging.

In Industrieländern nehmen Inzidenz und Mortalität des HCC zu. Dies wird auf die steigende Zahl chronisch infizierter Hepatitis-C-Virus-Träger zurückgeführt (El-Serag und Mason, 2000). Die Zahl der durch Alkoholabusus und HBV-Infektion verursachten HCC-Erkrankung blieb stabil (El-Serag und Mason, 2000).

Die Prognose des HCC hängt vor allem vom Tumorstadium bei Diagnosestellung ab. Da die Erkrankung in frühen Stadien in der Regel symptomlos verläuft, werden die meisten HCCs erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Die chirurgische Entfernung des Tumors oder eine Lebertransplantation, die einzigen Möglichkeiten einen Patienten potenziell zu heilen, sind nur in etwa 30-40 % der Fälle möglich. Tumorausdehnung und Begleiterkrankungen machen dies in vielen Fällen unmöglich. Auch nach Teilresektion oder Transplantation liegt die 5-Jahre-Überlebensrate nur bei etwa 70 %, nach drei Jahren wird in etwa 50 % der Fälle ein Rückfall beobachtet (Llovet et al., 2003). In der palliativen Situation konnte bisher keine Verbesserung der Überlebenszeit durch Chemotherapie festgestellt werden (Thomas und Zhu, 2005). Lediglich kleinere oder singuläre Tumorknoten können durch lokale Therapien wie perkutane Ethanolinjektion, Radiofrequenz-Thermoablation oder transarterielle Chemoembolisation behandelt werden. Seit November 2007 ist der Multikinaseinhibitor Sorafenib zur Behandlung des fortgeschrittenen HCC zugelassen. Llovet et al. konnten 2008 eine Überlebensverlängerung um 2,7 Monate zeigen.

### **1.2.7 Die hepatische Regeneration**

Die ersten Untersuchungen, die die Aufmerksamkeit auf die ungewöhnliche regenerative Kapazität der Leber lenkten, wurden bereits 1931 durchgeführt. Die unglaublich große

Regenerationsfähigkeit konnte durch Higgins und Anderson eindrucksvoll demonstriert werden, indem zwei Drittel einer Rattenleber entnommen wurden und die verbleibende Leber innerhalb von etwa einer Woche auf die ursprüngliche Lebermasse wuchs (Higgins und Anderson, 1931).

Bis heute wird der Mechanismus der Regeneration des Lebergewebes unter normalen Umständen sowie bei Leberparenchymschädigung kontrovers diskutiert. Ebenso uneinig ist man sich über die Lokalisation des hepatischen Stammzellkompartiments, was unter anderem auch mit der nicht einheitlichen Definition des Stammzellbegriffs zusammenhängt.

Stammzellen sind per definitionem klonale und selbsterneuernde Zellen (Alison et al., 2009), aus denen sich im Laufe der Entwicklung des Organismus spezialisierte Zellen bilden. In der postnatalen Phase dienen die Stammzellen dazu, Gewebe zu ersetzen, das durch Schädigung und physiologischen Zerfall, Nekrose und Apoptose zerstört wurde.

Aufgrund der langen Lebensdauer der Hepatozyten, besteht in der Leber unter normalen Umständen nur eine relativ geringe Zellerneuerung. Diese normale Zellerneuerung wird von den Hepatozyten selbst getragen, sodass diese als funktionelle Stammzellen angesehen werden können. Sie werden als unipotent bezeichnet und haben beim gesunden Menschen eine Lebensdauer von über einem Jahr.

Versuche zu Leberzelltransplantationen zeigten, dass transplantierte Hepatozyten zu einer signifikanten klonalen Expansion in der kranken Leber fähig sind (Alison et al., 2007; Overturf et al., 1997).

Wenn es nun zu einem abnormen Hepatozytenverlust kommt, wird eine schnelle regenerative Antwort von allen Zelltypen in der Leber ausgelöst, um sie wieder in ihren ursprünglichen Zustand zu bringen.

Bei wiederholter Schädigung, wie zum Beispiel einer chronischen Virushepatitis oder bei replikativer Seneszenz (zum Beispiel bei Steatohepatitis), wird ein fakultatives Stammzellkompartiment aktiviert, welches sich in den intrahepatischen Gallengängen befindet. Diese hepatischen Progenitorzellen werden als bipotent bezeichnet, da sie sich zu Hepatozyten oder Gallenepithelzellen differenzieren können (Alison et al., 2004).

In der Vergangenheit gab es hauptsächlich vier anatomische Hypothesen über das fakultative hepatische Stammzellkompartiment:

1. Replizierende Hepatozyten nahe der Portalfelder an der stromal-parenchymalen Schnittstelle – die so genannte “Streaming liver”-Hypothese (Zajicek et al., 1985)
2. Die proximalen Gallengänge, inklusive der Heringkanäle (Theise et al., 1999)
3. Cholangiozyten der intralobulären Gallengänge (Baumann et al., 1999)
4. Periduktuläre „Null“-Zellen (Yavorkovsky et al., 1995)

Mit der „Streaming-Liver“-Theorie stellte Zajicek die Hypothese auf, dass die Leber und andere sich sehr langsam erneuernde Drüsengewebe wie Nieren- oder Speicheldrüsengewebe eigentlich wie Darmepithel in einem unidirektionalen Fluss organisiert sind (Oren et al., 1997; Zajicek et al., 1985). Im Fall der Leber würden die Zellen an einem Ende dieses Flusses, am Portalfeld, entstehen und in Richtung der Zentralvene wandern. Diese These entstammte einigen sehr simplen Beobachtungen. In gesunde adulte Ratten wurde Tritium-Thymidin injiziert. Einige der Ratten wurden eine Stunde später getötet und die markierten Hepatozyten befanden sich im Durchschnitt 70 µm vom Portalfeld entfernt. Die übrigen Ratten wurden in Intervallen bis vier Wochen später getötet und die durchschnittliche Entfernung vom Portalfeld erhöhte sich schrittweise auf 140 µm, was zu dem Schluss führte, dass die Hepatozyten mit einer Geschwindigkeit von 2 µm/Tag vom Portalfeld in Richtung Zentralvene wandern. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die nicht mit dieser Hypothese kompatibel sind (Bralet et al., 1994).

Eine weitere Stammzellpopulation mit hepatischem Potenzial befindet sich im Knochenmark und besteht in den hämatopoetischen Stammzellen. Diese Zellen tragen normalerweise wenig zur Regeneration bei. Nach der Verbindung mit metabolisch defekten Hepatozyten können sie jedoch umprogrammiert werden und in großem Ausmaß zur Wiederherstellung der Leberfunktion beitragen (Kallis et al., 2007; Lagasse et al., 2000; Wang et al., 2003). Sie sind multipotent, selten, zeigen dafür aber ein sehr langes Proliferationspotenzial (Zhang et al., 2003).

## 1.3 Mitochondrien

### 1.3.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien bilden ein dynamisches, sich ständig veränderndes Netzwerk innerhalb der Zelle (Lewis, 1915). Dieses Netzwerk wird auch als mitochondriales Retikulum bezeichnet (Bakeeva et al., 1978; Poliakova et al., 1983). Aufgrund ihrer Hauptfunktion, der Energieproduktion in Form von ATP, sind Mitochondrien essentiell in allen eukaryontischen Zellen. Außerdem spielen sie ausschlaggebende Rollen in vielen anderen metabolischen und regulatorischen Prozessen, wie zum Beispiel der  $\beta$ -Oxidation oder der Apoptose. Zudem dienen sie dem Organismus als Calcium-Speicher.

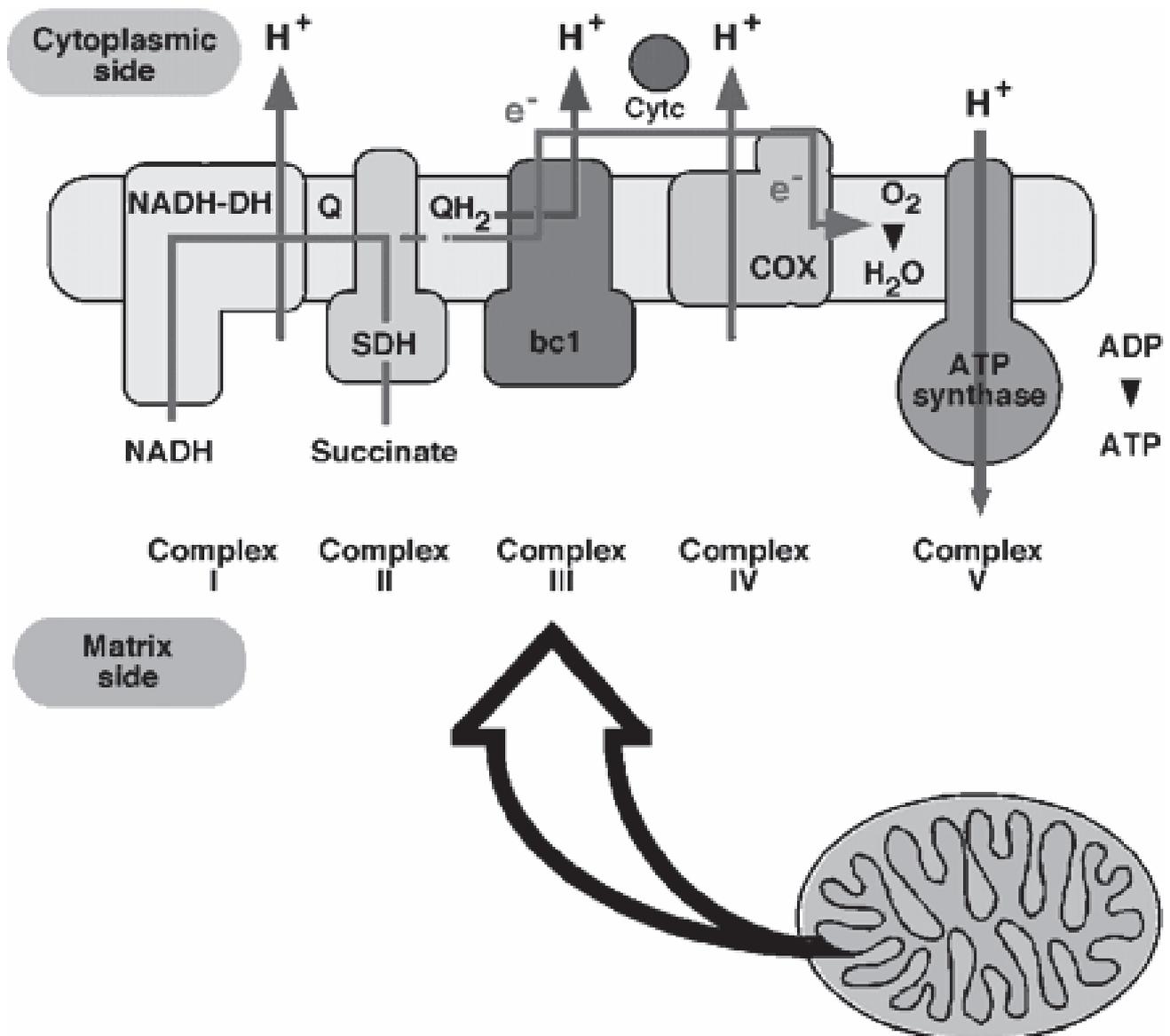
Die Endosymbiontentheorie geht davon aus, dass Mitochondrien aus der Symbiose eines  $\alpha$ -Proteobacteriums mit den Vorläufern der heutigen Eukaryoten hervorgegangen sind (Schimper, 1883; Gray et al., 1999). Hinweise dafür sind der Besitz eigener genetischer Information, eigene Proteinbiosynthese und der mitochondriale Membranaufbau mit einer inneren Membran, die einen völlig anderen Aufbau als die Zellmembranen eukaryotischer Zellen aufweist.

Obwohl Mitochondrien ihr eigenes Genom besitzen, wird ein Großteil der mitochondrialen Proteine nukleär kodiert und ins Mitochondrium importiert.

Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen können Störungen der Mitochondrien zu einer Vielzahl sehr unterschiedlicher Krankheiten, wie zum Beispiel Diabetes (Højlund et al., 2008), Parkinson (Mandemakers et al., 2007) oder auch zum polyzystischen Ovarsyndrom (Zhuo et al., 2010) führen. Außerdem sind Mitochondrien am normalen Alterungsprozess beteiligt (Guarente, 2008).

### 1.3.2 Die Atmungskette mit der Cytochrom-c-Oxidase

Die Atmungsenzyme wurden 1928 erstmals beschrieben (Warburg, 1928). Die Atmungskette besteht aus fünf Enzymkomplexen (I – V) und zwei Elektronentransportern. Sie ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Die Hauptfunktion dieses Systems besteht im koordinierten Transport von Elektronen und Protonen, um ATP als Energiequelle für die Zelle herzustellen. Die Atmungskette mit ihren Untereinheiten, die zum Teil im Zellkern, zum Teil im Mitochondrium selber kodiert sind, ist höchst komplex und besteht aus fast 90 Proteinen.



**Abb. 4: Modell der Atmungskette (nach Saraste, 1999).** NADH: Reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, Q: Ubichinon, SDH: Succinat-Dehydrogenase, bc1: Cytochrom-c-Reduktase, COX: Cytochrom-c-Oxidase,  $e^-$ : Elektron,  $H_2O$ : Wasser,  $O_2$ : Sauerstoff, ATP: Adeno-sintri-phosphat, ADP: Adenosindiphosphat.

An NAD und FAD gebundener Wasserstoff wird durch die Komplexe I und II in Protonen und Elektronen aufgespalten. Die Komplexe I, II und IV transportieren Protonen aus dem Matrixraum in den Membranzwischenraum, sodass ein elektrochemischer Gradient über der inneren Mitochondrienmembran entsteht. Dieser treibt die ATP-Synthese im Komplex V an (Boyer, 1997). Elektronen werden entlang der Atmungskette weitergegeben und schließlich im Komplex IV zur Reduktion von molekularem Sauerstoff verwendet.

Komplex IV der Atmungskette, die Cytochrom-c-Oxidase (COX), überträgt Elektronen von Cytochrom-c auf molekularen Sauerstoff und pumpt Protonen über die innere Mitochondrienmembran (van Gelder, 1966).

Die COX besteht aus 13 Untereinheiten, von denen die drei Größten mitochondrial und die anderen 10 nukleär kodiert werden. Die Anzahl der kerncodierten Untereinheiten variiert von Spezies zu Spezies. Bei Säugetieren gelten dreizehn Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten als gesichert (Capaldi, 1990; Tsukihara et al., 1995).

Cox1, Cox2 und Cox3 werden mitochondrial kodiert (MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3) und bilden den evolutionär konservierten strukturellen Kern des Enzyms. Cox1 und Cox2 bilden die Redoxseite, die in den Elektronentransfer involviert ist. Cox1 besitzt die drei redoxaktiven Metallzentren Häm  $a$ , Häm  $a_3$  und  $Cu_B$ . Häm  $a_3$  und  $Cu_B$  bilden zusammen das katalytisch aktive Zentrum, an dem Sauerstoff gebunden und zu Wasser reduziert wird. Cox2 besitzt das redoxaktive Metallzentrum  $Cu_A$ , das Elektronen vom Cytochrom  $c$  aufnimmt, die dann zum Häm  $a$  und weiter zum Häm  $a_3$  transferiert werden (Zhen et al., 1999; Stiburek et al., 2006). Cox3 enthält keine katalytischen Zentren und spielt somit keine direkte Rolle beim Elektronentransport. Vermutlich ist diese Untereinheit für die Zusammensetzung und die Stabilisierung des Enzymdimers bei Säugetieren verantwortlich.

Die kerncodierten Untereinheiten der COX sind wesentlich kleiner als die mitochondrial kodierten Untereinheiten und sind ebenfalls nicht an dem direkten Elektronentransport beteiligt. Sie sind am Zusammenbau und der Stabilität des Holoenzym beteiligt und haben vermutlich einen Einfluss auf seine Aktivitätsregulation (Fontanesi et al., 2008; Helling et al., 2008; Hüttemann et al., 2008). Bei Säugern existieren gewebespezifische Isoformen der Untereinheiten Cox4, Cox6a, Cox6b, Cox7a und Cox8 (Hüttemann et al., 2001; Kadenbach et al., 2000).

Interessant ist, dass die Polypeptiduntereinheiten der Komplexe der Atmungskette an unterschiedlichen Stellen kodiert werden. Die Untereinheiten von Komplex II der Atmungskette, der Succinat-Dehydrogenase (SDH), sind komplett kerncodiert und werden ins Mitochondrium importiert (Scheffler, 1998). Dies macht einen Vergleich der messbaren Aktivität der COX und der SDH im Gewebe so interessant. Er kann bei einer Dysfunktion der Atmungskette aufzeigen, ob eine eventuelle Mutation nukleär oder mitochondrial vorliegt.

Wie genau die Kommunikation und Koordination zwischen Zellkern und Mitochondrium funktioniert ist noch unklar. Sicher ist jedoch, dass ein Transkriptionsprogramm essentiell (Scarpulla, 2002) ist, das – abhängig vom Energiebedarf der Zelle – die Expression sowohl der nukleär als auch der mitochondrial kodierten Gene koordiniert.

Isolierte Mutationen der für die COX kodierenden Abschnitte der mtDNA werden mit Myopathien (Keightley et al., 1996) und Multisystemerkrankungen (Manfredi et al., 1995) in Zusammenhang gebracht. Für nukleär kodierte Untereinheiten der COX konnten lange keine pathogenen Mutationen nachgewiesen werden (Jaksch et al., 1998). Mittlerweile sind jedoch auch einige pathogene Mutationen der nukleär kodierten Gene für SURF1, SCO1, SCO2, COX10, and COX15 bekannt (Pecina et al., 2004).

### **1.3.3 Mitochondriale Genetik**

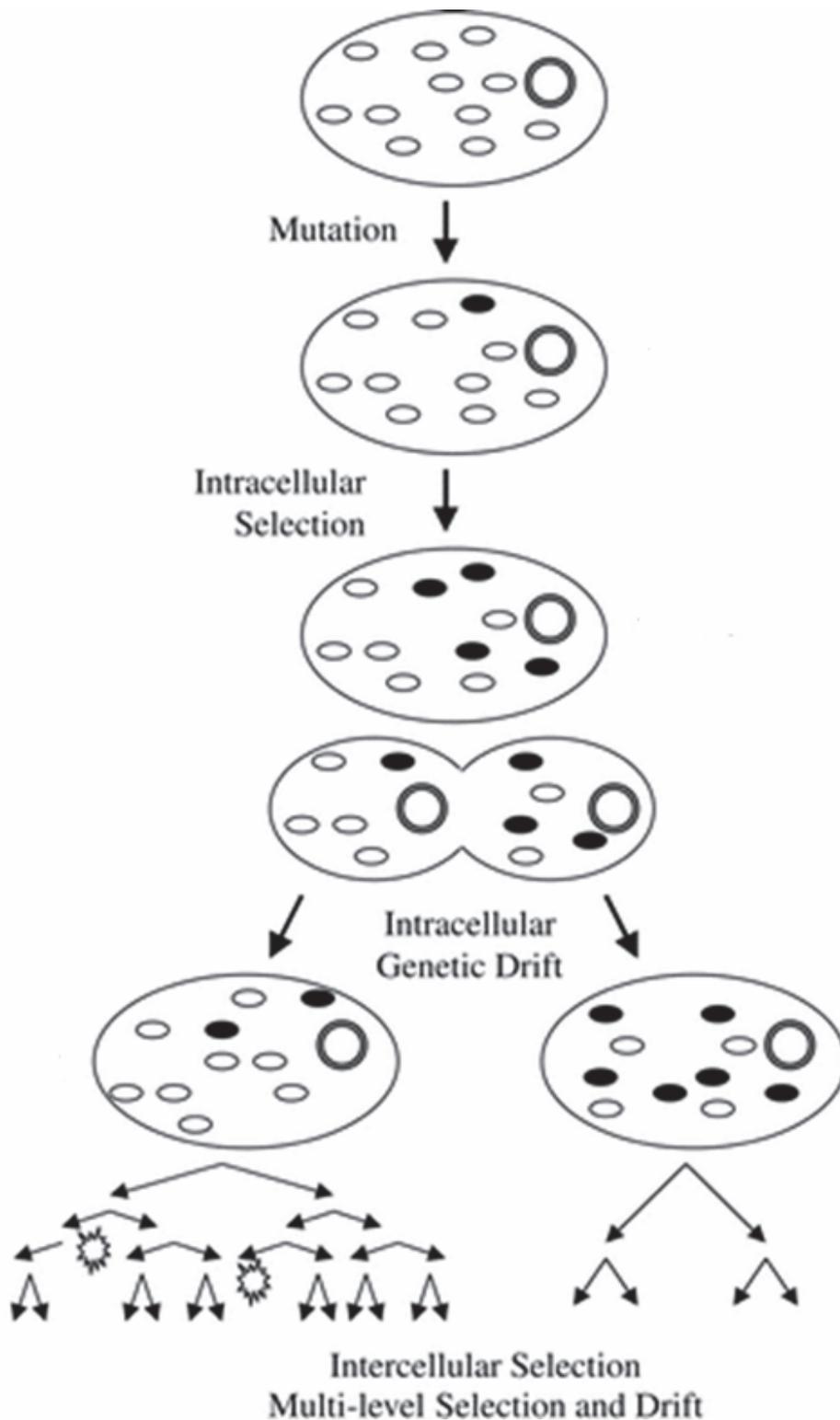
Das mitochondriale Genom liegt in Form von 16659 Basenpaaren langen doppelsträngigen, zirkulären Molekülen vor (Anderson et al., 1981). Somatische Zellen enthalten zwischen  $10^3$  und  $10^4$  mtDNA-Kopien (Robin und Wong, 1988), davon je 2 – 10 Kopien pro Organelle (Sato und Kuroiwa 1991).

Die kodierenden Bereiche der mtDNA sind sehr viel kompakter als in der nDNA: Die mtDNA enthält keine Introns, die kodierenden Genregionen liegen direkt nebeneinander – zum Teil sogar überlappend. Es existiert nur eine größere nichtkodierende Region, die hauptsächlich regulatorische Funktion hat. Aufgrund der daraus resultierenden hohen Gendichte ist die Wahrscheinlichkeit für eine funktionelle Beeinträchtigung durch eine Mutation höher als in der nDNA. Die mtDNA enthält 37 Gene, die für 22 tRNAs, 2rRNAs und 13 Polypeptiduntereinheiten der Atmungskette, nämlich der Komplexe I, III, IV und V kodieren (Anderson et al., 1981).

Die Mutationsrate der mtDNA ist 10 – 20 mal höher als die der nDNA (Brown et al., 1979; Richter et al., 1988). Dies wird einerseits durch die fehlende Kondensierung und nicht vorhandene Histone erklärt, zum anderen durch die kontinuierliche mitochondriale Replikation während des gesamten Zellzyklus und die direkte Nähe zu freien Sauerstoffradikalen der Atmungskette (Richter et al., 1988; Shigenaga et al., 1994). Auch wenn die DNA-Reparaturmechanismen für die mtDNA doch sehr viel ausgedehnter vorhanden sind, als lange Zeit vermutet wurde, trägt doch das Fehlen gewisser DNA-Reparaturmechanismen im Mitochondrium zur Fixierung von mtDNA-Mutationen bei (Liu und

Demple, 2010). Es zeigte sich, dass DNA-Schäden durch oxidativen Stress, die abhängig von der Dauer der Einwirkung im Zellkern repariert werden konnten, unter gleichen Bedingungen im Mitochondrium Wachstumsstillstand und Apoptose bewirkten (Yakes und Van Houten, 1997).

Eine weitere Besonderheit der mitochondrialen Genetik ist das Vorliegen mehrerer Tausend Kopien mtDNA pro Zelle. So kann es dazu kommen, dass Mutationen entweder alle mtDNA-Kopien einer Zelle betreffen (Homoplasmie) oder nur einige wenige Kopien. Letzteres führt zu einer Koexistenz von zwei oder mehr Genotypen innerhalb einer Zelle (Heteroplasmie). Während der mitotischen Teilung werden die Mitochondrien zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Dies führt bei Heteroplasmie im Verlauf des Lebens zu einem genetischen Drift, wobei man nicht vorhersagen kann, in welche Richtung der Mutationsload geht (Smits et al., 2010).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des genetischen Drifts der mtDNA (nach Rand, 2001). Gezeigt ist, wie es nach Entstehung einer Mutation im ersten Schritt durch genetischen Drift zu einem unterschiedlichen Heteroplasmiegrad kommt. Dabei ist nicht vorhersehbar in welche Richtung der Mutationsload sich entwickelt.

Klar ist, dass Heteroplasmie zu verschiedensten Erkrankungen führt (DiMauro und Schon, 2001; Holt et al., 1988; Holt et al., 1990).

Es existieren verschiedene Mechanismen, die die paternale Vererbung von mtDNA verhindern, sodass lediglich die mütterliche mtDNA erhalten bleibt und es nicht zu Heteroplasmie kommt. Auf diese Weise wird die mitochondriale DNA fast ausschließlich maternal vererbt (Wallace et al., 1988), es existiert lediglich ein Fall der paternalen mitochondrialen Vererbung in der Literatur (Schwartz und Vissing, 2002).

Shitara et al. konnten durch Mikroinjektion von Mitochondrien aus Spermien bzw. aus Leberzellen in Embryos zeigen, dass spezifische Mechanismen zur Zerstörung der mtDNA existieren, die die Mitochondrien in Spermien betreffen, nicht jedoch in Leberzellen (Shitara et al., 2000). Der oben genannte Fall der paternalen mtDNA-Vererbung (Schwartz und Vissing, 2002) ist der einzige Fall, bei dem es nachgewiesenermaßen zu Rekombination der mtDNA kam.

Es konnte sogar gezeigt werden, dass Mechanismen existieren, die im Ovar Mitochondrien mit besonders schädlichen Mutationen eliminieren (Wallace, 2010). Durch dieses einzigartige genetische System wird den Spezies eine schnelle Anpassung an Veränderungen des Lebensraumes ermöglicht.

### *1.3.3.1 Mitochondriale Transkription, Translation und Replikation*

Replikation und Transkription der mtDNA unterscheiden sich in einigen Punkten von der der nDNA. Die mtDNA wird unabhängig vom Zellzyklus ständig repliziert, braucht aber mit 2 Stunden sehr viel länger als die Replikation der nDNA.

Das zirkuläre Genom der mtDNA wird in einen leichten und einen schweren Strang unterteilt (L-Strang und H-Strang). Die überwiegende Zahl der Gene wird vom H-Strang kodiert. Lediglich 8 tRNA-Gene und das ND6-Gen sind auf dem L-Strang lokalisiert (Ganten und Ruckpaul, 2007). Sämtliche von der mtDNA kodierten Proteine sind Bestandteile der Atmungskette.



Stränge. Ein zusätzlicher Faktor, entweder TFB1M oder TFB2M lässt die mitochondriale RNA-Polymerase an der richtigen Stelle der mtDNA binden, um die RNA-Primer für die Replikation zu erzeugen (Xu und Clayton, 1995). Die mitochondriale DNA-Polymerase gamma kann diese Primer dann benutzen, um die Replikation am Origin of heavy strand replication ( $O_H$ ) innerhalb des D-Loops zu starten und den Tochter-DNA-Strang zu produzieren.

Nach der Replikation von ungefähr zwei Dritteln des mitochondrialen Genoms, wird durch die Bildung des neuen schweren Strangs der Origin of light strand replication ( $O_L$ ) auf dem elterlichen Strang freigelegt. Die Replikation des leichten Stranges kann daraufhin in entgegengesetzter Richtung begonnen werden. Am Ende der Replikation werden die Stränge durch eine Topoisomeraseaktivität voneinander gelöst.

Man ging lange davon aus, dass die mitochondriale Replikation völlig unabhängig vom Zellkern in den Mitochondrien stattfindet. Zum Beispiel für die Spermatogenese konnte jedoch ein nukleärer regulatorischer Einfluss auf die mitochondriale Replikation nachgewiesen werden. Hier wird durch eine herabgesetzte Expression des TFAM die Anzahl der mtDNA-Kopien möglichst gering gehalten, um die Übertragung von paternaler mtDNA an zukünftige Generationen weitestgehend zu verhindern (Larsson et al., 1997).

Der auffälligste Unterschied zur nukleären Transkription besteht bei der mitochondrialen Transkription im Vorhandensein von nur je einem Transkriptionspromotor für den gesamten H- bzw. L-Strang. Dadurch wird zu beiden Strängen jeweils ein langes Transkript generiert, das multiple Gene enthält. Die nDNA dagegen besitzt in der Regel für jedes Gen einen eigenen Promotor. Aus der bei der Transkription der mtDNA entstehenden polycistronischen Vorläufer-RNA werden dann später durch Endonuklasen die einzelnen Gene herausgetrennt (Ojala et al., 1981).

Auch die Transkription der mtDNA findet wie die Replikation unter einer komplizierten Interaktion zwischen nukleär und mitochondrial kodierten regulatorischen Proteinen statt. Kernkodierte Faktoren, die für die mitochondriale Transkription benötigt werden, sind unter anderem die mitochondriale RNA Polymerase (Tiranti et al., 1997), der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM) (Fisher und Clayton, 1985) sowie TFB1M und TFB2M (Falkenberg et al., 2002).

Auch bei der Translation bestehen Unterschiede zwischen nDNA und mtDNA. Der früher als einheitlich angenommene genetische Code weist für die mtDNA einige Abweichungen auf: AUA steht für Methionin statt Isoleucin, UGA codiert nicht ein Stop-Codon, sondern Tryptophan, und AGA und AGG stehen für ein Stop-Codon und nicht für Arginin (Anderson et al., 1981).

Die Meinungen darüber, welche Faktoren bestimmen, in welchem Maße das mitochondriale Genom exprimiert wird, divergieren stark. Wiesner et al. konnten keine Korrelation zwischen der oxidativen Kapazität eines Gewebes und dessen Gehalt an mtDNA feststellen, woraus sie schlossen, dass transkriptionale und posttranskriptionale Mechanismen eher als der reine Gehalt an mtDNA bestimmen, in welchem Maß das mitochondriale Genom exprimiert wird (Wiesner et al., 1992). Im Gegensatz dazu wurde an anderer Stelle gezeigt, dass die Kopienanzahl der mtDNA direkt proportional zur produzierten ATP-Menge ist (Dumollard et al., 2007; May-Panloup et al., 2007).

## **2. Material und Methoden**

### *2.1 Untersuchungsmaterial*

Als Untersuchungsmaterial dienten Gewebeproben aus dem Institut für Pathologie der Universität Bonn, die aus Operationsmaterial gewonnen wurden.

Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit der ethischen Standarte der zuständigen Ethikkommission und auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) sowie den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

Für unsere Untersuchungen wurden 24 Leberproben verwendet, die in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Eine Gruppe bildeten die Proben, bei denen ein hepatozelluläres Karzinom vorlag. Bei den Proben der zweiten Gruppe lag kein hepatozelluläres Karzinom vor. Die entsprechende Diagnose wurde durch zwei voneinander unabhängige Pathologen des Institutes für Pathologie der Universität Bonn gestellt. Zunächst wurde ein makroskopisch läsionsfreies Areal identifiziert und circa 1 cm<sup>3</sup> große Gewebeproben präpariert. Diese wurden in flüssigen Stickstoff auf -196 °C schockgefroren und bis zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion bei -80 °C aufbewahrt.

#### **2.1.1 Morphometrischer Vergleich von Patches in HCC- und non-HCC-Lebern**

Zum morphometrischen Vergleich von COX-negativen Patches in HCC- und non-HCC-Lebern wurden 24 Gewebeproben von insgesamt 17 Patienten verwendet.

Es wurde normales Parenchym aus HCC-tragenden und Parenchym aus nicht HCC-tragenden Lebern verglichen.

In der Gruppe HCC-tragend wurden 10 Gewebeproben von neun verschiedenen Patienten verwendet.

In der Gruppe nicht HCC-tragend wurden Gewebeproben von Patienten mit nicht primär hepatozytären Läsionen, wie z.B. Kolonkarzinometastasen, verwendet. Dabei wurden die COX-Patches in läsionsfreien Anschnitten vermessen. Wenn fibrosierte Leber verwendet wurde, dann wurden nicht die Fibroseknoten, sondern die Patches im Normalgewebe begutachtet.

Probe Nummer	Patient Nummer	HCC-tragend /nicht HCC-tragend	Diagnose
1	1	HCC	HCC mit Fibrose
2	2	HCC	HCC (normal aus Tumornähe)
3	3	HCC	HCC
4	4	HCC	HCC
5	5	HCC	HCC
6	6	HCC	HCC
7	7	HCC	HCC
8	8	HCC	HCC
9	9	HCC	HCC, tumorfern
10	9	HCC	HCC, tumornah
11	10	n-HCC	Leberzirrhose: $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel, heterozygot
12	10	n-HCC	Leberzirrhose: $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel, heterozygot
13	10	n-HCC	Leberzirrhose: $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel, heterozygot
14	10	n-HCC	Leberzirrhose: $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel, heterozygot
15	11	n-HCC	gesunde Leber (Metastase eines Kolonkarzinoms)
16	12	n-HCC	Äthyltoxische Zirrhose
17	12	n-HCC	Äthyltoxische Zirrhose
18	12	n-HCC	Äthyltoxische Zirrhose
19	13	n-HCC	FNH
20	14	n-HCC	CCC
21	15	n-HCC	Leber (Echinokokkose)
22	16	n-HCC	Leber, Metastase
23	16	n-HCC	Gesunde Leber
24	17	n-HCC	Hämangiom

**Tab. 1: Übersicht über die 24 verwendeten Gewebeproben von insgesamt 17 Patienten.** Wichtig ist hierbei die Unterscheidung zwischen HCC-tragend und nicht HCC-tragenden Patienten. HCC: Hepatozelluläres Karzinom, n-HCC: non HCC

### **2.1.2 Mutationsanalyse der COX-Gene**

Zur Mutationsanalyse wurden sechs tumorfreie Lebergewebeproben eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom verwendet. Die Proben wurden aus makroskopisch unauffälligen Regionen gewählt. Von diesen sechs Kryoblöcken wurden jeweils 10 Gefrierschnitte angefertigt und gefärbt. Nach der histologischen Standard-HE-Färbung wurden die Schnitte mikroskopisch beurteilt und Regionen für die COX-Färbung gewählt, die weder Malignitäts- noch Entzündungs- oder Fibrosierungszeichen zeigten.

In diesen wurden Regionen gesichtet, die für die DNA-Extraktion besonders interessant erschienen. Insgesamt wurden sechs Gefrierschnitte zur DNA-Extraktion ausgewählt.

## *2.2 Histologische Präparate aus kryokonserviertem Gewebe*

Für alle Färbungen und um gezielt die DNA verschiedener Patches isolieren zu können wurden Gefrierschnitte aus Biopsiegewebe angefertigt. Die Biopsieblöcke wurden mithilfe des Einbettmediums Tissue Tek<sup>®</sup> auf dem Präparathalter des Kryomikrotoms Leica CM 1900 aufgefroren und durch justieren in eine geeignete Schneideposition gebracht.

Es wurden 8–10 µm dicke Gefrierschnitte für die Enzymfärbungen und 5 µm dicke Gefrierschnitte für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefertigt und auf Glasobjektträger aufgebracht. Diese wurden auf Trockeneis gelagert und im Anschluss mit den Standardfärbungen oder den Enzymfärbungen gefärbt.

## *2.3 Histologische Färbungen*

### **2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Kryoschnitte wurden aus -80 °C für 5 min bei Raumtemperatur aufgetaut und danach ebenfalls bei Raumtemperatur nacheinander in folgende Lösungen eingebracht:

- Färben in Hämalaun: 5 min
- Spülen in destilliertem Wasser
- Bläuen in warmem Leitungswasser: 5 min
- Spülen in destilliertem Wasser
- Färben in 0,1 %igen wässrigem Eosin: 30 s
- Spülen in destilliertem Wasser

Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und in Xylol entwässert: 1 x 70 %, 1 x 96 %, 2 x 100 % Ethanol, dann 2 x Xylol. Dabei wurden die Schnitte jeweils 10 Sekunden in der jeweiligen Lösung bewegt und zwischen den einzelnen Schritten abgetupft. Zum besseren Erhalt der Gewebemorphologie wurden die gefärbten Schnitte mit einem Deckglas gedeckt. Dazu wurde auf ein Deckglas Pertex gegeben, dieses auf einen noch mit Xylol befeuchteten Objektträger gelegt und dann trocknen gelassen.

## 2.3.2 Enzymhistochemische Färbungen

### 2.3.2.1 Cytochrom-c-Oxidase-Aktivitäts-Färbung (COX-Färbung)

Bei der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivitäts-Färbung (COX-Färbung) handelt es sich um eine enzymatische Färbung, bei der die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette) dargestellt wird. Das Substrat reduziertes Cytochrom c wird durch die Cytochrom-c-Oxidase im Gewebe der Gefrierschnitte oxidiert, wobei Elektronen auf den artifiziellen Elektronenakzeptor 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) übertragen werden. Das so reduzierte Färbemittel DAB bildet ein braunes unlösliches Polymer.

#### Ansatz der COX-Färbelösung (50 ml):

37,5 ml	ddH <sub>2</sub> O
12,5 ml	Natriumphosphatpuffer pH 7,6 [1 M]
3250 mg	Sucrose (Sigma-Aldrich)
50 mg	3,3'-Diaminobenzidine (Sigma-Aldrich)
50 mg	Cytochrom c reduziert (Sigma-Aldrich)
5 µl	Catalase [29 mg/ml] (Sigma-Aldrich)

### 2.3.2.2 Succinat-Dehydrogenase-Färbung (SDH-Färbung)

Bei der Succinat-Dehydrogenase-Aktivitäts-Färbung handelt es sich um eine enzymatische Färbung, die die Aktivität des Komplexes II der Atmungskette (Succinat-Dehydrogenase) darstellt. Das Substrat Succinat wird durch die Succinat-Dehydrogenase im Gewebe der Gefrierschnitte umgesetzt, wobei Elektronen auf den artifiziellen Elektronenakzeptor Nitroblautetrazoliumsalz (NBT) übertragen werden. Dabei bildet das Färbemittel NBT einen blauen unlöslichen Niederschlag.

Ansatz des SDH-Stain (5 ml):

Ad 5 ml	0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 7,6
135 mg	Na <sub>2</sub> Succinat
5 mg	Nitroblautetrazoliumsalz (NBT) (Sigma-Aldrich)

*2.3.2.3 Färbevorgang*

Die Färbelösungen wurden jedes Mal frisch angesetzt und mit einer Pipette bei Raumtemperatur so auf die Objektträger gegeben, dass die Gefrierschnitte vollständig bedeckt waren. In einer geschlossenen feuchten Inkubationskammer wurde die Färbung bei 37 °C 1,5 Stunden inkubiert. Bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung mit destilliertem Wasser abgespült und die Schnitte danach eine Stunde getrocknet. Die Schnitte, die zur DNA-Extraktion verwendet werden sollten, wurden daraufhin bis zur Lasermikrodissektion bei -20 °C gelagert. Die übrigen Schnitte wurden zum besseren Erhalt der Morphologie eingedeckt.

*2.4 Identifikation der Patch-Gruppen*

Sowohl HCC-tragendes als auch nicht HCC-tragendes Gewebe wurde mit der COX-Färbung angefärbt. In beiden Gruppen wurden scharf abgegrenzte Felder gesichtet, die als Patches bezeichnet wurden.

Diese wurden ihrer Anfärbung nach in hyperchrome (COX-positive), normochrome oder hypochrome (COX-negative) Patches eingeteilt. Diese konnten dann nach ihrer Lage zueinander, sowie zu Portalfeldern beurteilt werden.

Zum morphometrischen Vergleich der Patches in HCC-tragenden und nicht HCC-tragenden Lebern wurden COX-negative und COX-positive Patches gezählt und vermessen und zwischen den Gruppen verglichen. Dazu wurden die Schnitte mithilfe des XL Palm S1 051 von Zeiss und der Software Axiovision Rel. 4.7 zunächst eingescannt. Danach wurden sie mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen, indem manuell ein Rahmen um die jeweiligen Felder gezogen und die Fläche daraus berechnet wurde.

Zur DNA-Extraktion und Mutationsanalyse wurden solche Patch-Gruppen ausgewählt, bei denen COX-negative und -positive Patches in direkter Nachbarschaft zueinander, sowie zu einem Portalfeld lagen.

## 2.5 DNA-Extraktion aus Patches

### 2.5.1 Lasermikrodissektion

Aus Patch-Gruppen sollte DNA gewonnen werden. Dazu wurden nicht eingedeckte Schnitte nach der Identifikation interessanter Patch-Gruppen zur Lasermikrodissektion eingesetzt.

Die Lasermikrodissektion ist ein Verfahren, welches es ermöglicht, aus einem ungedeckelten Gewebeschnitt ein exakt definiertes Areal herauszuschneiden. Dies geschieht mithilfe eines fokussierten Laserstrahls, der das markierte Areal in den Deckel eines 200 µl PCR-Reaktionsgefäßes katapultiert.

Es wurde das XL Palm S1 051 Laser-Mikrodissektionsmikroskop der Firma Zeiss benutzt, bei dem das Mikroskop mit einem Laser gekoppelt ist und die Bilddaten von einer Kamera auf den Bildschirm übertragen werden. Über den Rechner ist sowohl der Laser als auch der Objektisch steuerbar, wodurch eine exakte Steuerung des Objektträgers sowie des Laserstrahls ermöglicht wird.

Die zuvor identifizierten Areale wurden am Rechner über das Programm PALMRobo V4.2 SP2 für den Laser markiert. Für ungedeckelte Schnitte auf Glasobjektträgern bietet dieses Programm eine spezielle Funktion, mithilfe derer das auf dem Computerbildschirm umrandete Areal mit einzelnen Punkten ausgefüllt wird, die jeweils mit einem einzelnen Laserstrahl in das Reaktionsgefäß katapultiert werden. Auf diese Weise wird das gesamte markierte Areal in kleinen Gewebsfragmenten in den Reaktionsgefäßdeckel katapultiert. Das Programm bietet zudem die Funktion, den Abstand zwischen den einzelnen Laserpunkten, sowie die Energie des Laserstrahls festzulegen. Es wurden die Einstellungen „Energy“ 72 % und „Distance“ 60 µm verwendet.

Über dem Objektisch wurde in einer speziellen Halterung ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß so angebracht, dass die aus dem Gewebe katapultierten Areale im Deckel des Reaktionsgefäßes aufgefangen wurden. Dazu wurden 2,5 µl eines Proteinase-K-haltigen Lysepuffers in den Deckel des Reaktionsgefäßes gegeben, wodurch ein Anhaften der Gewebsfragmente gewährleistet wurde. Der Proteinase-K-haltigen Lysepuffer (siehe unten) führte außerdem zum Proteinverdau und Freisetzen der DNA.

Durch Fotos sowohl vor als auch nach dem Laservorgang wurde der Schneidevorgang dokumentiert.

Nach dem Laservorgang wurde das Reaktionsgefäß aus der Halterung genommen und die Gewebefragmente im Lysepuffer aus dem Deckel auf den Boden des Reaktionsgefäßes pipettiert und der Deckel mit weiteren 2,5 µl des Puffers gespült. Bevor das Reaktionsgefäß auf Trockeneis gelagert wurde, wurden die Gewebefragmente am Boden des Reaktionsgefäßes mikroskopisch kontrolliert.

Insgesamt wurde auf diese Weise die DNA von 140 Patches gewonnen.

### 2.5.2 Zellyse

Die durch das Lasermikrodissektionsverfahren gewonnenen Gewebefragmente wurden bei 60 °C im Brutschrank über Nacht durch den Lysepuffer verdaut.

#### Ansatz Lysepuffer (625 µl):

1,25 µl	0,05 M EDTA (Sigma-Aldrich)
12,5 µl	1M TRIS pH 8,0 (Sigma-Aldrich)
12,5 µl	Proteinase K (QIAGEN)
592,5 µl	ddH <sub>2</sub> O
6,25 µl	Tweenlösung (1 %)

Nach dem Verdau wurden die Reaktionsgefäße zur Inaktivierung der Proteinase-K für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und danach bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 13 krpm in der Zentrifuge Centrifuge 5414 D der Firma eppendorf zentrifugiert. Der Überstand des Ansatzes wurde als Template in der folgenden PCR zur Amplifikation der COX-Gene eingesetzt.

## 2.6 DNA-Amplifizierung der COX-Gene

### 2.6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine Methode, bei der ausgewählte Nukleinsäurebereiche gezielt amplifiziert werden. Der zu amplifizierende Bereich wird durch zwei Oligonukleotide (Primer) bestimmt. Temperaturstabile Polymerasen ermöglichen die Durchführung wiederholter DNA-Synthese- und –Denaturierungszyklen.

Bei der Auswahl der Primer wurde beachtet, dass sie nicht mit sich selbst hybridisieren und nur an eine genomische DNA-Sequenz binden können.

### 2.6.2 Nested PCR

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die extrahierte DNA für die nachfolgenden Fragmentamplifikationen nicht in ausreichender Menge vorlag. Daher wurden in einem Zwischenschritt die COX-Gene durch einen nested-PCR-Ansatz voramplifiziert. Die nested-PCR steigert das Endprodukt durch eine nochmalige exponentielle Vervielfältigung erheblich und erhöht zudem die Spezifität der PCR-Reaktion.

Um das Kontaminationsrisiko weiter zu minimieren, fand der Pipettiervorgang unter dem Abzug an einer sterilen Werkbank statt. Zudem wurde in jedem PCR-Lauf eine negative Kontrollprobe ohne DNA (ddH<sub>2</sub>O) eingesetzt, die trotz Mastermixzugabe keine Amplifikate ergeben durfte.

Von den 140 durch Lasermikrodissektion gewonnenen DNA-Proben wurden 87 zur Sequenzierung ausgewählt. Von diesen wurden jeweils zwei PCR-Ansätze angefertigt. Auf diese Weise erhielten wir zu jeder Probe eine Doppelkontrolle. In die PCR-Reaktion wurden jeweils 2 µl Template eingesetzt.

Für die erste Amplifikation wurde ein 4249 bp großes mtDNA-Fragment ausgewählt (mtDNA Position 5798 – 10047), welches sämtliche mitochondrial kodierten Genabschnitte für die Cytochrom-c-Oxidase beinhaltet. Dazu wurden die folgenden Primer durch die Firma metabion synthetisiert:

Name	Sequenz
R12 (forward)	CAATTCAATATGAAAATCACCTCGG
R45 (reverse)	GAATGTTGTCAAACACTAGTTAATTGGAAGT

**Tab. 2: Primer der ersten Amplifikationsrunde.**

Die verwendeten Primer wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert, um ein Degradieren der Primer durch häufiges Auf- und Abtauen zu verhindern. Im Stock hatte die Primer eine Konzentration von 100 µM.

PCR-Ansatz der ersten Amplifikation (100 µl):

10 µl	Puffer EL-2 (10fach) (Roche Applied Science)
3 µl	PCR Grade Nucleotide Mix 10mM each (Roche Applied Science)
1 µl	R12 (50 µM)
1 µl	R45 (50 µM)
1,5 µl	Expand Long Template PCR-System Polymerase (Roche Applied Science)
2 µl pro Reaktion	Template: Aus Überstand nach Zentrifugation

Es wurde mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und ein Reaktionsvolumen von 10 µl angesetzt.

Thermocycler- Programm erste PCR-Runde :

1	94 °C	4 min
2	94 °C	15 s
3	60 °C	30 s
4	68 °C	4 min
5	Wiederholung der Schritte 2 – 4: 34 mal	
6	68 °C	7 min
7	4 °C	∞

Es wurde der Thermocycler Mastercycler eppgradient S von eppendorf verwendet.

Mit dem auf diese Weise entstandenen Fragment als Matrize wurde die Nested-PCR mit 5 verschiedenen Primerpaaren durchgeführt, die alle innerhalb des zuvor amplifizierten Bereiches lagen:

Name	Sequenz
R12 (forward)	CAATTCAATATGAAAATCACCTCGG
R13 (forward)	CTTAGGGGCCATCAATTCATCAC
R14 (forward)	CCCCTTCCACTATGTCCTATCAAT
R15 (forward)	CACATTCGAAGAACCCGTATACATAAA
R18 (forward)	CTGTGCGCCTTAATCCAAGCCTACG
R40 (reverse)	TAGGACTGCTGTGATTAGGACGG
R41 (reverse)	TGGATTTTGGCGTAGGTTTGGTCT
R42 (reverse)	GGAAAATGATTATGAGGGCGTGAT
R43 (reverse)	CGGTAGTATTTAGTTGGGGCATTTCAC

R45 (reverse)      GAATGTTGTCAAACTAGTTAATTGGAAGT

**Tab. 3: Primer der zweiten Amplifikationsrunde.**

Primerpaar	Fragment-Bezeichnung	mtDNA-Abschnitt	Länge
R12/R40	MT-CO11	5798 – 6485	687
R13/R41	MT-CO12	6377 – 7141	764
R14/R42	MT-CO13	7027 – 7682	655
R15/R43	MT-CO2	7413 – 8386	973
R18/R45	MT-CO3	9140 – 10047	907

**Tab. 4: Übersicht über die bei der zweiten Amplifikation erhaltenen Fragmente.** Diese zwischen 655 bp und 973 bp langen Fragmente ließen wir sequenzieren. MT-CO1/2/3: Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die Untereinheit 1/2/3 der Cytochrom-c-Oxidase.

PCR-Ansatz der zweiten Amplifikation (100 µl):

10 µl	Puffer High Fidelity (10fach, invitrogen)
4 µl	MgSO <sub>4</sub> 50mM (invitrogen)
2 µl	dNTP-Mix 10mM (invitrogen)
1 µl	R12 (50 µM)
1 µl	R45 (50 µM)
0,5 µl	Platinum Taq High Fidelity (invitrogen)
1 µl pro Reaktion	Template: Aus erster Amplifikation

Es wurde mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und ein Reaktionsvolumen von 10 µl angesetzt.

Thermocycler- Programm zweite PCR-Runde:

1	94 °C	2 min
2	94 °C	15 s
3	64 °C	15 s
4	68 °C	1 min
5	Wiederholung der Schritte 2 – 4: 34 mal	
6	68 °C	7 min
7	4 °C	∞

Auf diese Weise wurden insgesamt 580 DNA-Proben gewonnen, die vor der Sequenzierung wie unten beschrieben PEG-gefällt oder durch die Firma Eurofins MWG GmbH aufgereinigt wurden.

## 2.7 *Aufreinigung der PCR-Produkte durch Polyethylenglykol-Fällung*

Die Polyethylenglykol-Fällung (PEG-Fällung) ist eine Methode zur Ausfällung hochmolekularer Substanzen.

Die PCR-Produkte (10 µl) wurden mit 10 µl einer 20 %igen PEG-Lösung versetzt und 10 min bei Raumtemperatur vermischt. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 13 krpm in der Zentrifuge Centrifuge 5414 D der Firma eppendorf zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 10 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

## 2.8 *Detektion der Fragmente mittels Gelelektrophorese*

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Proben aufgetrennt werden und die Größe der DNA-Fragmente durch Vergleich mit einem mitlaufenden Standard bestimmt werden.

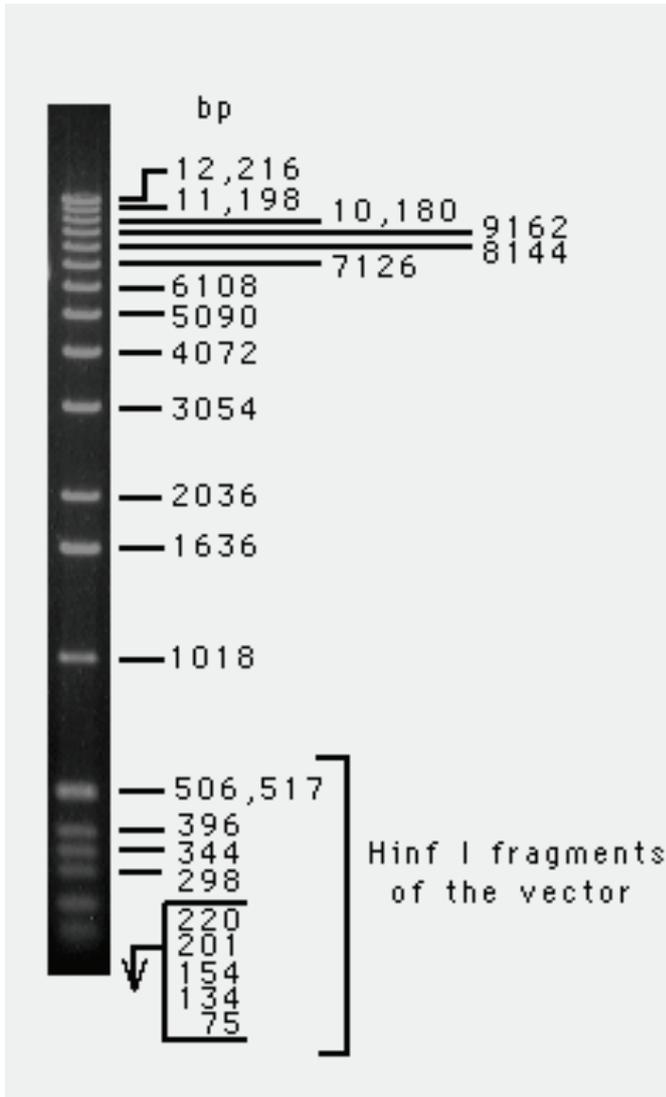
Beim Anlegen von elektrischem Strom wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung der Anode. Dabei ist ihre Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Auch die Porengröße des Agarosegels beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im elektrischen Feld. Sind die Moleküle im Verhältnis zum Durchmesser der Poren klein, wandern sie schneller. Die Porengröße wird durch die Konzentration der Agarose im Gel bestimmt.

Die Agarose (Biozym) wurde für die Detektion der circa 4kb großen Fragmente der ersten Amplifikation in 1 %iger, zur Detektion der Fragmente der zweiten Amplifikation in 2 %iger Lösung mit TAE-Puffer aufgekocht und in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Zur Agarose wurde Ethidiumbromid (Sigma Aldrich, 500 µg/ml) gegeben (Zu 150 ml Agarosegel 15 µl Ethidiumbromid in oben genannter Konzentration). Das Gel ließen wir 20 min erkalten. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet.

Durch die Zugabe von Ethidiumbromid kann die aufgetrennte DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert in die Helices der DNA und wird unter Bestrahlung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 320nm durch Fluoreszieren sichtbar. Auf diese Weise können auch relativ kleine DNA-Mengen sichtbar gemacht werden.

Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (50 % [w/v] Glycerol, 1 mM EDTA, 0.4 % [w/v] Bromphenolblau, 0.4 % [w/v] Xylencyanol) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Puffer erleichtert zum Einen das Absinken der Proben in die Geltaschen, zum

anderen machen die beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol es möglich, den Wanderungsverlauf der Proben im Gel zu verfolgen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden parallel zu den Proben aus der PCR DNA-Größenstandards (Ladder) aufgetragen. Dabei wurden die 1kb-Ready-Load-Ladder (0,1 µg/ µl) der Firma invitrogen verwendet.



**Abb. 7: Der von uns verwendete Größenstandard: 1 Kb DNA Ladder; 0.5 µg/lane; 0.9 % agarose gel; stained with ethidium bromide ©2002 Invitrogen Corporation**

Die Elektrophorese erfolgte 30 min bei 120 V. Anschließend wurde das Gel mit dem UV-Kamerasystem Intas Classic Uno fotografiert.

## *2.9 Nachweis von Mutationen mittels DNA-Sequenzierung*

Um die Nukleotidsequenz der amplifizierten DNA-Fragmente zu bestimmen, wurden die Proben durch die Firma Eurofins MWG GmbH sequenziert.

Die Sequenzanalyse wurde mit einer von uns entwickelten Software durchgeführt, bei dem die ermittelte Sequenz mit der Cambridge-Konsensussequenz verglichen wurde. Dabei wurden die Abweichungen von der Konsensussequenz zunächst durch das Programm ermittelt und später per Hand kontrolliert.

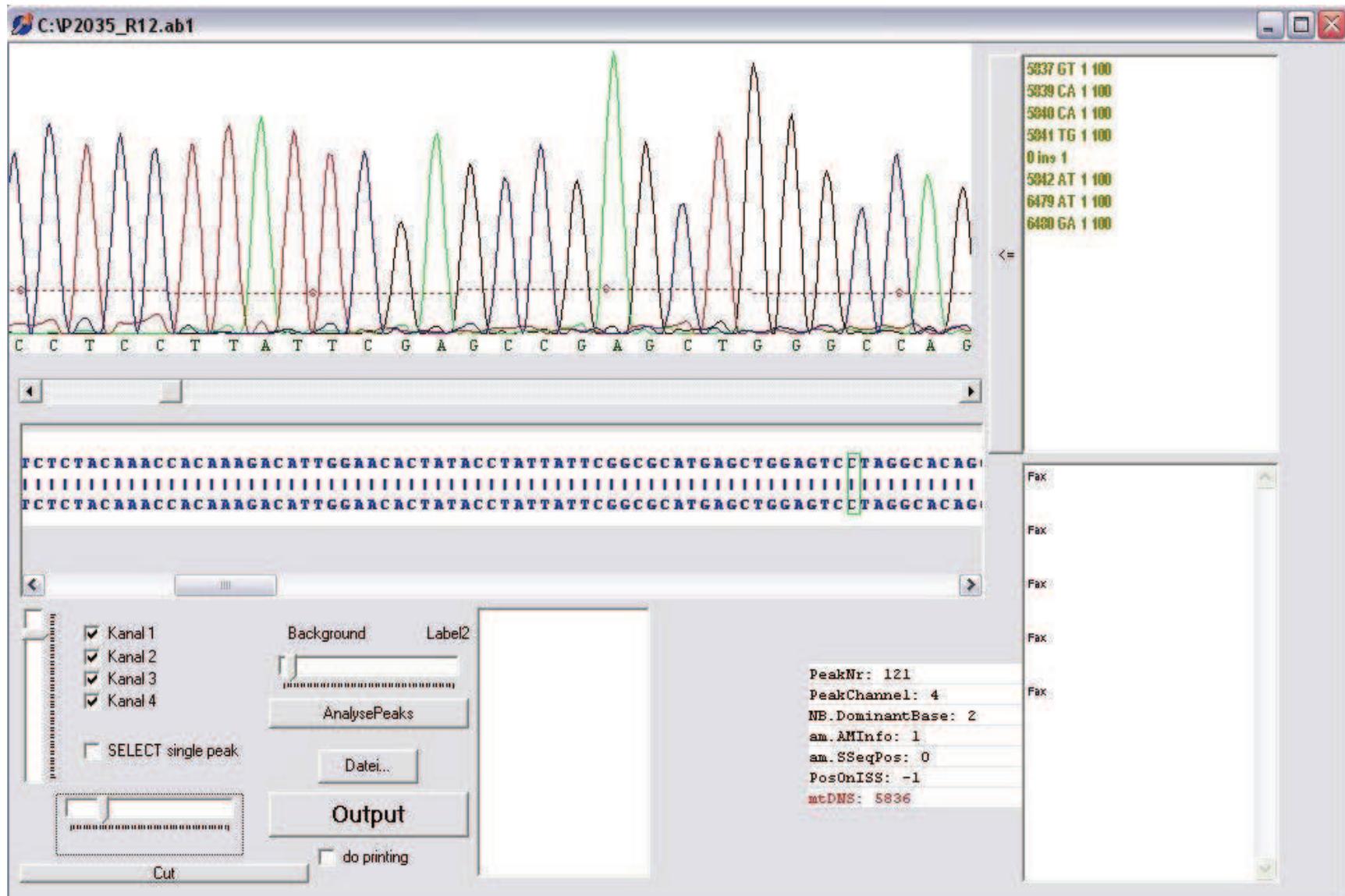


Abb. 8: Verwendete Software, Mutationsanalyse durch Sequenzalignment mit der Cambridge-Konsensussequenz

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Morphologie der Patches/Felder

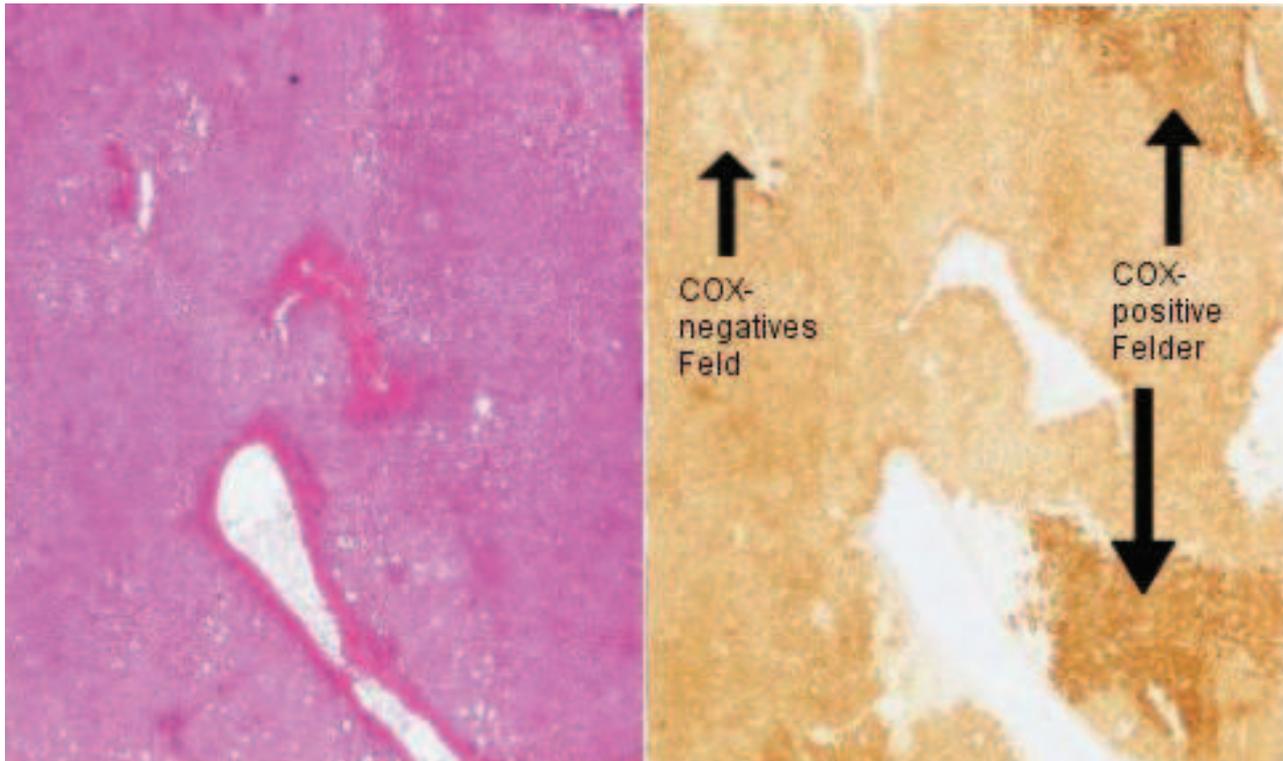
In der Standard-HE-Färbung war die typische Läppchengliederung der Leber zu sehen. Die Hepatozyten als große, polygonale Epithelzellen mit meistens einem, manchmal auch zwei Zellkernen waren in Zellbalken radiär um eine Zentralvene angeordnet. Ebenso wurden die Portalfelder mit der Glissontrias mit jeweils einer Vena und Arteria interlobularis und einem Gallengang aufgesucht. Es wurden sowohl für die Vermessung der Patches als auch zur Mutationsanalyse Anschnitte gewählt, die weder Malignitäts- noch Fibrosierungs- oder Entzündungszeichen zeigten.

Auch in Lebergewebe, das makroskopisch, sowie in der Standard-HE-Färbung homogen erscheint, liegen Zonen mit einer unterschiedlichen Aktivität der COX vor. Diese Zonen können durch die Cytochrom-c-Oxidase-Färbung (COX-Färbung) sichtbar gemacht werden.

Durch die COX-Färbung wird das Leberparenchym je nach Aktivitätsgrad der COX angefärbt. Areale mit einer höheren Aktivität stellen sich dunkelbraun dar, solche mit einer sehr niedrigen Aktivität als hellbraun bis weißlich. Im Zweidimensionalen entstehen so Felder (Patches), die durch die Enzymaktivitätsfärbung unterschiedlich stark angefärbt werden. Je nach Färbeverhalten klassifizierten wir stark angefärbte Felder mit einer überdurchschnittlich hohen Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (COX) als COX-positive Patches, nur schwach angefärbte Felder als COX-negative Patches.

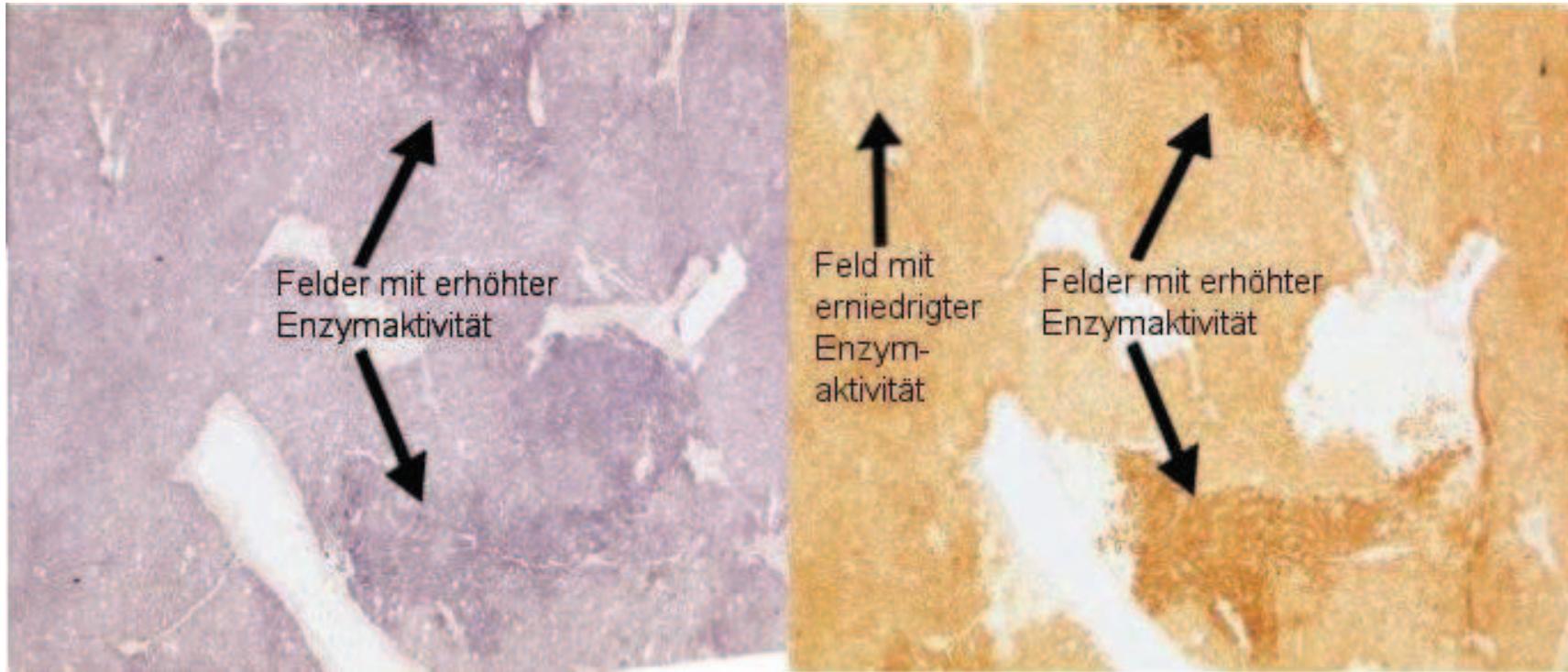
Nach der Färbung mit der Cytochrom-c-Oxidase-Färbung konnten im Leberparenchym sowohl in HCC-tragenden als auch in nicht-HCC-tragenden Lebern beobachten, dass sich das Gewebe in Areale mit einer höheren und Areale mit einer niedrigeren Aktivität des Enzyms einteilen ließ.

Durch den Vergleich mit der Standard-HE-Färbung konnte gezeigt werden, dass sich die Patches nicht an bekannten mikroanatomischen Strukturen orientieren. Sie bilden sich unabhängig von Leberläppchen und –azini. Die Patches sind in der Standard-Färbung nicht zu identifizieren – die Hepatozyten der verschiedenen Patches weisen dort morphologisch keine Unterschiede auf.



**Abb. 9: Vergleich von Lebergewebe in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (links) mit der COX-Färbung (rechts) in direkt aufeinander folgender Serienschritte.** Dabei wird deutlich, dass die im COX-gefärbten Schnitt sichtbaren COX-negativen und COX-positiven Felder (= Patches) sich nicht an mikroanatomischen Strukturen orientieren – im HE-gefärbten Schnitt ist homogen angefärbtes Lebergewebe zu erkennen.

Außerdem verglichen wir direkt aufeinander folgende Anschnitte in der COX-Färbung mit solchen in der SDH-Färbung. Durch diesen Vergleich wollten wir überprüfen, ob nur eine verminderte Aktivität der überwiegend mitochondrial kodierten COX vorlag oder ob auch die kernkodierte SDH in den entsprechenden Arealen eine verminderte Aktivität zeigte. Der Vergleich mit SDH-gefärbten Schnitten zeigt, dass dort zwar Areale mit erhöhter Enzymaktivität entsprechend der COX-positiven Areale vorhanden sind, Areale mit erniedrigter Enzymaktivität entsprechend der COX-negativen Arealen jedoch fehlten.



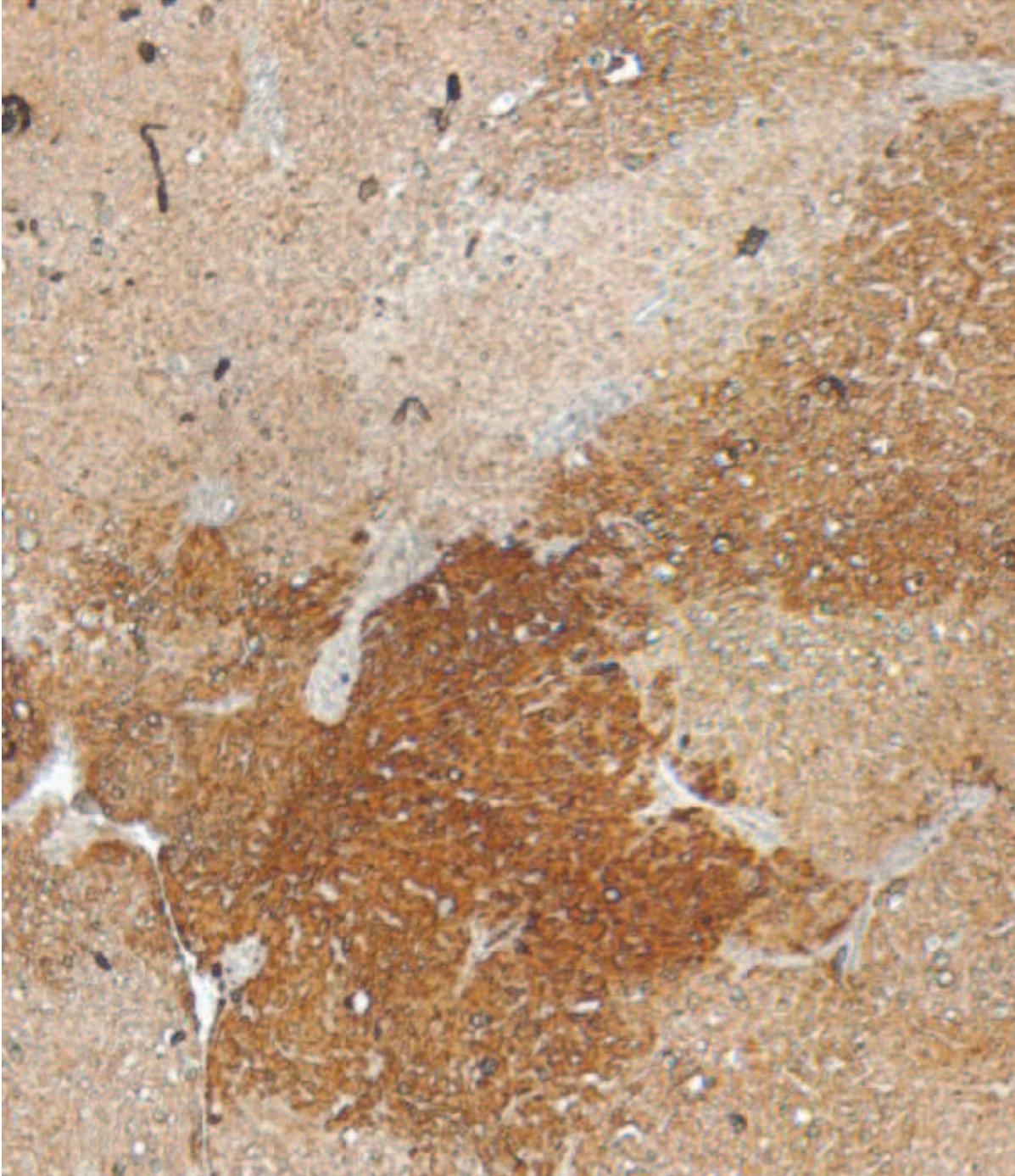
**Abb. 10: Vergleich direkt aufeinander folgender Serienschnitte; auf der linken Seite SDH-Färbung, auf der rechten Seite COX-Färbung.** Hier wird deutlich, dass es in Feldern mit einer erhöhten Aktivität der COX auch zu einer erhöhten Aktivität der SDH kommt, in Feldern mit erniedrigter Aktivität der COX jedoch nicht zu einer Änderung der SDH-Aktivität.

Es entstand im Leberparenchym keine feine Felderung unterschiedlicher COX-Aktivität, sondern große Felder homogener Färbung. Die größten Felder, die wir fanden maßen über 650 000  $\mu\text{m}^2$ . Auffällig war hierbei, dass die verschiedenen Felder nicht fließend ineinander übergingen, sondern überwiegend scharf voneinander abgegrenzte Felder entstanden. So lagen im Randgebiet zwischen COX-positiven und COX-negativen Patches Hepatozyten mit einer sehr verschiedenen Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase nebeneinander.



**Abb. 11: Beispiel für zwei benachbarte Patches mit unterschiedlicher Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase.** Zu sehen ist hier, dass im Randbereich der Patches Hepatozyten mit einer sehr unterschiedlichen Aktivität der COX direkt nebeneinander liegen – die Patches sind scharf voneinander abgegrenzt.

Weiterhin war eine Assoziation von COX-negativen zu COX-positiven Patches auffällig. Diese lagen häufig in direkter Nachbarschaft zueinander und waren zudem meist einem gemeinsamen Portalfeld zuzuordnen, zu dem sie entweder in direktem Kontakt oder zumindest in enger Nachbarschaft lagen. Diese Gruppierung von COX-negativen zu COX-positiven und COX-normalen Patches war für unsere Untersuchung besonders interessant.



**Abb. 12: Beispiel für die Gruppierung von COX-positiven und COX-negativen Patches um ein Portalfeld**

### *3.2 Größere und zahlreichere Patches in HCC-tragenden Lebern*

Zum morphometrischen Vergleich der Patches in HCC-tragenden und nicht HCC-tragenden Lebern wurden 24 Proben von 17 Patienten untersucht.

### 3.2.1 HCC tragend

	COX-negative Felder	COX-positive Felder
Anzahl Felder	5	23
A min [ $\mu\text{m}^2$ ]	24133,96	26648,68
A max [ $\mu\text{m}^2$ ]	464821,1	499738,52
A med [ $\mu\text{m}^2$ ]	216407,612	183038,0026
Gesamtfläche Felder	1082038,06	4209874,06
Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)	1,94 %	7,57 %
Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in $\mu\text{m}^2$ )	0,089851549	0,413317125

**Tab. 5: Ergebnisse der Messungen in Probe 1.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	COX-negative Felder	COX-positive Felder
Anzahl Felder	43	5
A min [ $\mu\text{m}^2$ ]	4810,45	26427,5
A max [ $\mu\text{m}^2$ ]	188762,41	515212,58
A med [ $\mu\text{m}^2$ ]	45285,73767	142217,322
Gesamtfläche Felder	1947286,72	711086,61
Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)	1,53 %	0,56 %
Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in $\mu\text{m}^2$ )	0,338777206	0,039392698

**Tab. 6: Ergebnisse der Messungen in Probe 2.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	COX-negative Felder	COX-positive Felder
Anzahl Felder	2	0
A min [ $\mu\text{m}^2$ ]	32774,24	0

<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	43888,94	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	38331,59	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	76663,18	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,26 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,068361751	0

**Tab. 7: Ergebnisse der Messungen in Probe 3.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	6	0
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	11436,12	0
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	27119,38	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	17943,93167	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	107663,59	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,14 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,076671631	0

**Tab. 8: Ergebnisse der Messungen in Probe 4.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	2	1
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	15300,82	26337,07
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	51977,9	26337,07
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	33639,36	26337,07
<b>Gesamtfläche Felder</b>	67278,72	26337,07
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,36 %	0,14 %

<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,106232522	0,053116261
--	-------------	-------------

**Tab. 9: Ergebnisse der Messungen in Probe 5.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	2	6
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	40986,32	25222,44
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	69837,02	203478,13
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	55411,67	85707,14667
<b>Gesamtfläche Felder</b>	110823,34	514242,88
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,59 %	2,74 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,106536855	0,319610565

**Tab. 10: Ergebnisse der Messungen in Probe 6.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	10	0
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	31821,96	0
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	349957,63	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	109430,988	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	1094309,88	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	2,88 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,263479542	0

**Tab. 11: Ergebnisse der Messungen in Probe 7.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	5	2
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	45973,28	194335,56
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	1876627,07	474424,56
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	534684,274	334380,06
<b>Gesamtfläche Felder</b>	2673421,37	668760,12
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	2,01 %	0,50 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,037625112	0,015050045

**Tab. 12: Ergebnisse der Messungen in Probe 8.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	12	16
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	26779,43	43989,18
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	2628180,28	1516597,46
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	504007,365	353193,5138
<b>Gesamtfläche Felder</b>	6048088,38	5651096,22
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	5,17 %	4,83 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,102612208	0,136816278

**Tab. 13: Ergebnisse der Messungen in Probe 9.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	11	6
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	31884,06	147252
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	926512,96	1555305,5

<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	379568,5518	545268,5317
<b>Gesamtfläche Felder</b>	4175254,07	3271611,19
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	2,21 %	1,73 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,058169358	0,031728741

**Tab. 14: Ergebnisse der Messungen in Probe 10.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

### 3.2.2 Nicht HCC-tragend

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	4	0
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	22106,27	0
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	91324,42	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	61488,475	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	245953,9	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,22 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,036062452	0

**Tab. 15: Ergebnisse der Messungen in Probe 11.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	1	0
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	26280,41	0
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	26280,41	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	26280,41	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	26280,41	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,02 %	0,00 %

<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,006762777	0
--	-------------	---

**Tab. 16: Ergebnisse der Messungen in Probe 12.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	1	0
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	42882,17	0
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	42882,17	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	42882,17	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	42882,17	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,02 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,005221748	0

**Tab. 17: Ergebnisse der Messungen in Probe 13.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	2	0
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	13227,37	0
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	79611,55	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	46419,46	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	92838,92	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,07 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,014752407	0

**Tab. 18: Ergebnisse der Messungen in Probe 14.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	COX-negative Felder	COX-positive Felder
Anzahl Felder	3	0
A min [ $\mu\text{m}^2$ ]	12964,78	0
A max [ $\mu\text{m}^2$ ]	125078,18	0
A med [ $\mu\text{m}^2$ ]	55137,28333	0
Gesamtfläche Felder	165411,85	0
Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)	0,29 %	0,00 %
Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in $\mu\text{m}^2$ )	0,053265663	0

**Tab. 19: Ergebnisse der Messungen in Probe 15.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	COX-negative Felder	COX-positive Felder
Anzahl Felder	3	0
A min [ $\mu\text{m}^2$ ]	7134,5	0
A max [ $\mu\text{m}^2$ ]	268507,98	0
A med [ $\mu\text{m}^2$ ]	103561,7333	0
Gesamtfläche Felder	310685,2	0
Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)	0,29 %	0,00 %
Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in $\mu\text{m}^2$ )	0,027918187	0

**Tab. 20: Ergebnisse der Messungen in Probe 16.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	COX-negative Felder	COX-positive Felder
Anzahl Felder	1	0
A min [ $\mu\text{m}^2$ ]	23985,78	0
A max [ $\mu\text{m}^2$ ]	23985,78	0

<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	23985,78	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	23985,78	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,01 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,005737265	0

**Tab. 21: Ergebnisse der Messungen in Probe 17.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	5	0
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	3707,8	0
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	34623,24	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	16889,192	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	84445,96	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,25 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,149277089	0

**Tab. 22: Ergebnisse der Messungen in Probe 19.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	4	1
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	16683,48	76066,09
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	43675,38	76066,09
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	30044,3225	76066,09
<b>Gesamtfläche Felder</b>	120177,29	76066,09
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,36 %	0,23 %

<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,121396818	0,030349204
--	-------------	-------------

**Tab. 23: Ergebnisse der Messungen in Probe 20.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	3	0
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	13495,4	0
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	50062,43	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	35148,77333	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	105446,32	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,11 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,030548066	0

**Tab. 24: Ergebnisse der Messungen in Probe 21.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	<b>COX-negative Felder</b>	<b>COX-positive Felder</b>
<b>Anzahl Felder</b>	4	1
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	25500,28	283900,32
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	316465,36	283900,32
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	153935,1475	283900,32
<b>Gesamtfläche Felder</b>	615740,59	283900,32
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,51 %	0,24 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,03321126	0,008302815

**Tab. 25: Ergebnisse der Messungen in Probe 22.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

	COX-negative Felder	COX-positive Felder
<b>Anzahl Felder</b>	4	0
<b>A min [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	15987,25	0
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	45365,3	0
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>	25171,225	0
<b>Gesamtfläche Felder</b>	100684,9	0
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>	0,07 %	0,00 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0,026395622	0

**Tab. 26: Ergebnisse der Messungen in Probe 24.** Schnitte der Gewebeprobe eines Patienten ohne hepatozelluläres Karzinom wurden mit der COX-Färbung gefärbt und die Patches mit dem Programm Axiovision Rel. 4.7 ausgemessen. A min: Fläche des kleinsten Patches dieser Probe, A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

In den Proben 18 und 23 wurden jeweils keine COX-positiven oder –negativen Felder gefunden. Die Proben stammten beide von Patienten, bei denen kein hepatozelluläres Karzinom gefunden wurde.

### 3.2.3 Vergleich der Messergebnisse von HCC-tragend und nicht HCC-tragend

Wir konnten COX-positive und –negative Patches sowohl in HCC-tragenden als auch in nicht-HCC-tragenden Lebern nachweisen.

Es kamen sowohl COX-positive als auch COX-negative Patches in HCC-tragenden Lebern zahlreicher vor. Die Dichte (Anzahl der Patches pro  $\text{cm}^2$ ) war in unseren Messungen bei COX-positiven Patches in HCC-Lebern 36,55 mal höher als bei nicht-HCC-Lebern. Bei COX-negativen Patches war die Dichte 3,42 mal größer.

Zudem konnten wir zeigen, dass in HCC-tragenden Lebern größere Patches zu finden sind. Die mittlere Größe der COX-positiven Patches in HCC-Lebern war in unseren Messungen 6,5 mal größer als bei nicht-HCC-Lebern. Die COX-negativen Patches waren im Mittel etwa 4,36 mal größer. Die maximale Größe der COX-positiven Patches in HCC-Lebern war 18,63 mal größer als bei nicht-HCC-Lebern. Die größten COX-negativen Patches waren im Durchschnitt in den HCC-tragenden Lebern 8,08 mal größer.

Der Anteil der Patches an der Gesamtfläche war in unseren Messungen bei COX-positiven Patches in HCC-Lebern 50,35 mal höher als bei nicht-HCC-Lebern. Bei COX-negativen Patches war der Anteil 10,58 mal größer.

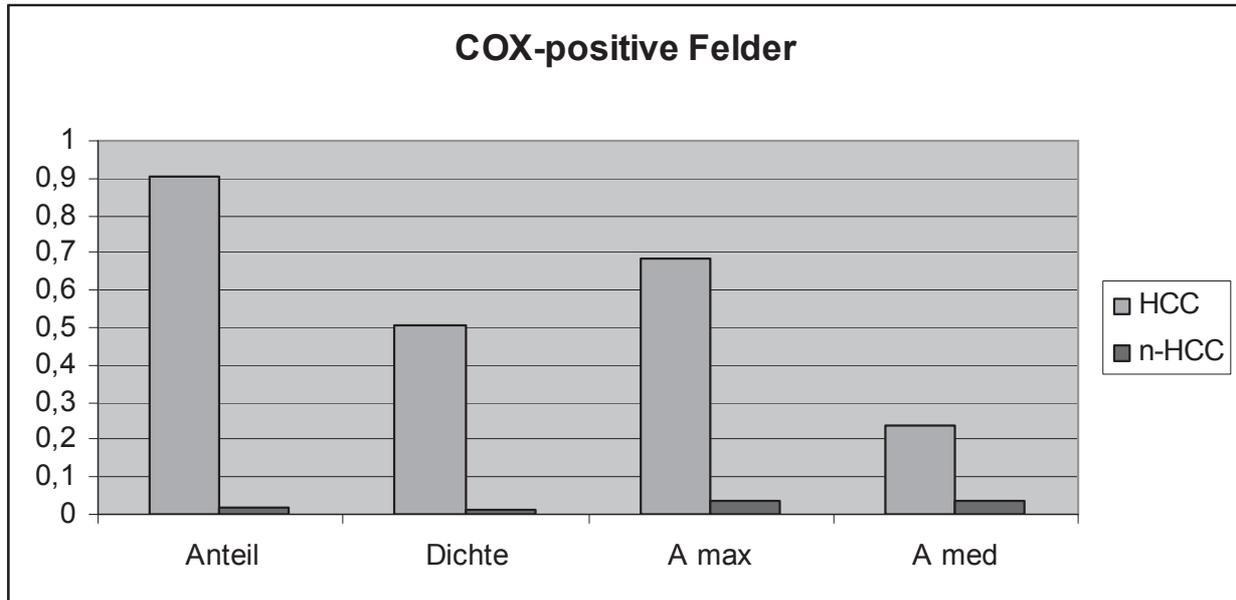
	COX-negative Felder	COX-positive Felder
<b>A max [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>		
HCC	662768,47	479109,38
n-HCC	81990,16	25711,89
<b>A med [<math>\mu\text{m}^2</math>]</b>		
HCC	193471,11	167014,16
n-HCC	44353,14	25711,89
<b>Anteil (Gesamtfläche Felder / Gesamtfläche)</b>		
HCC	1,68 %	1,81 %
n-HCC	0,16 %	0,04 %
<b>Dichte (Anzahl Felder / Gesamtfläche in <math>\text{cm}^2</math>)</b>		
HCC	124,83	100,90
n-HCC	36,47	2,76

**Tab. 27: Arithmetische Mittel der Messungen und Gegenüberstellung der Ergebnisse für HCC-tragende und nicht HCC-tragende Proben.** A max: Fläche des größten Patches dieser Probe, A med: Mittlere Flächengröße der Patches dieser Probe.

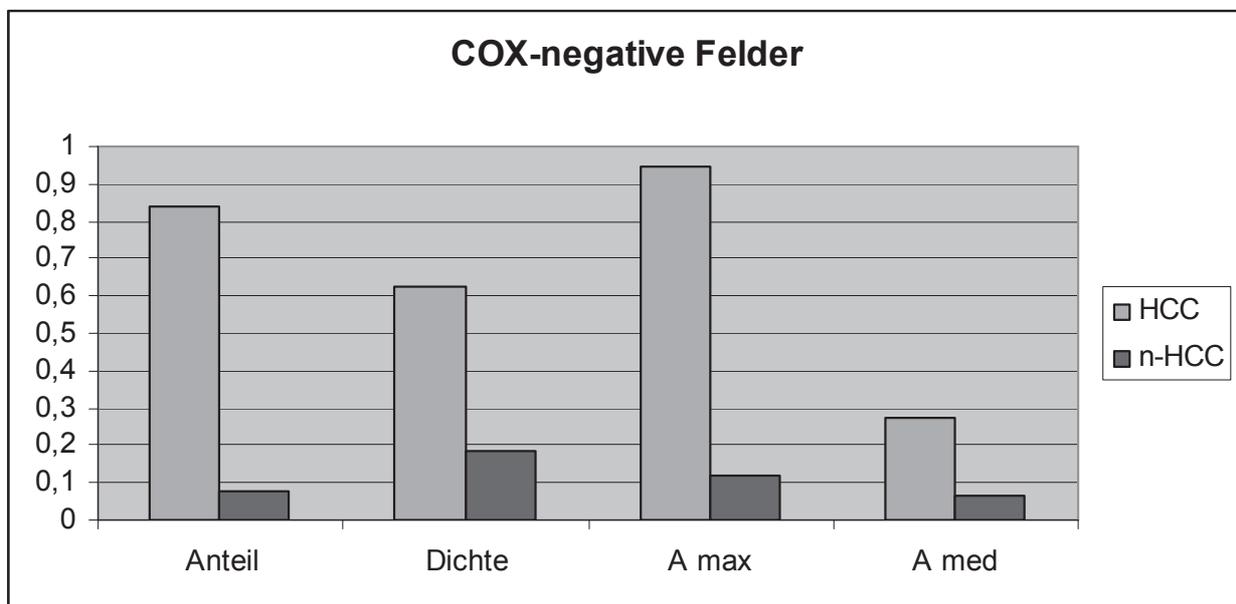
	COX-negative Felder	COX-positive Felder
<b>A max HCC / A max n-HCC</b>	8,08	18,63
<b>A med HCC / A med N-HCC</b>	4,36	6,50
<b>Anteil Felder HCC / Anteil Felder n-HCC</b>	10,58	50,35
<b>Dichte Felder HCC / Dichte Felder n-HCC</b>	3,42	36,55

**Tab. 28: Verhältnis der Messwerte von HCC-tragend und nicht HCC-tragend.** Berechnet wurde um wie viel größer die jeweils größten Patches in HCC-tragenden Proben als in nicht HCC-tragenden Proben waren. Zudem um wie viel größer die mittlere Patchgröße in HCC-tragenden Proben als in nicht HCC-tragenden Proben war. Außerdem wurde gezeigt um wie viel größer der Anteil der Patches an der Gesamtfläche des Schnittes, sowie um wie viel größer die Dichte der Patches in HCC-tragenden Proben als in nicht HCC-tragenden Proben war.

### 3.2.3.1 Grafische Darstellung der Ergebnisse



**Abb. 13: Vergleich der Messwerte für COX-positive Felder in HCC-tragend und nicht HCC-tragend.** Zur besseren Übersicht entspricht dem Wert 1 beim Anteil 0,02; bei der Dichte 0,2; bei A max und A med 700000. HCC: Proben eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom, n-HCC: Proben eines Patienten, bei dem kein hepatozelluläres Karzinom festgestellt wurde.

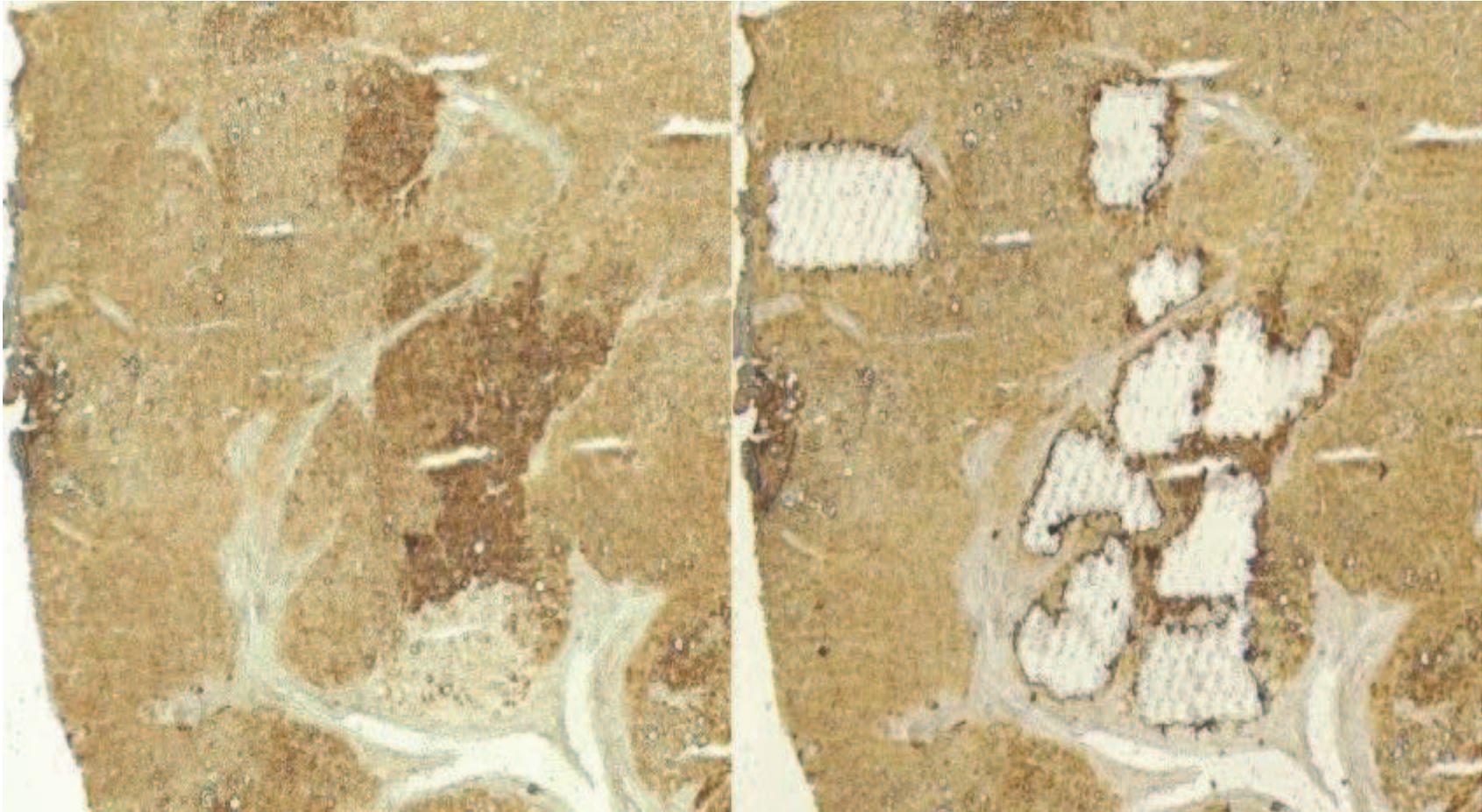


**Abb. 14: Vergleich der Messwerte für COX-negative Felder in HCC-tragend und nicht HCC-tragend.** Zur besseren Übersicht entspricht dem Wert 1 beim Anteil 0,02; bei der Dichte 0,2; bei A max und A med 700000. HCC: Proben eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom, n-HCC: Proben eines Patienten, bei dem kein hepatozelluläres Karzinom festgestellt wurde.

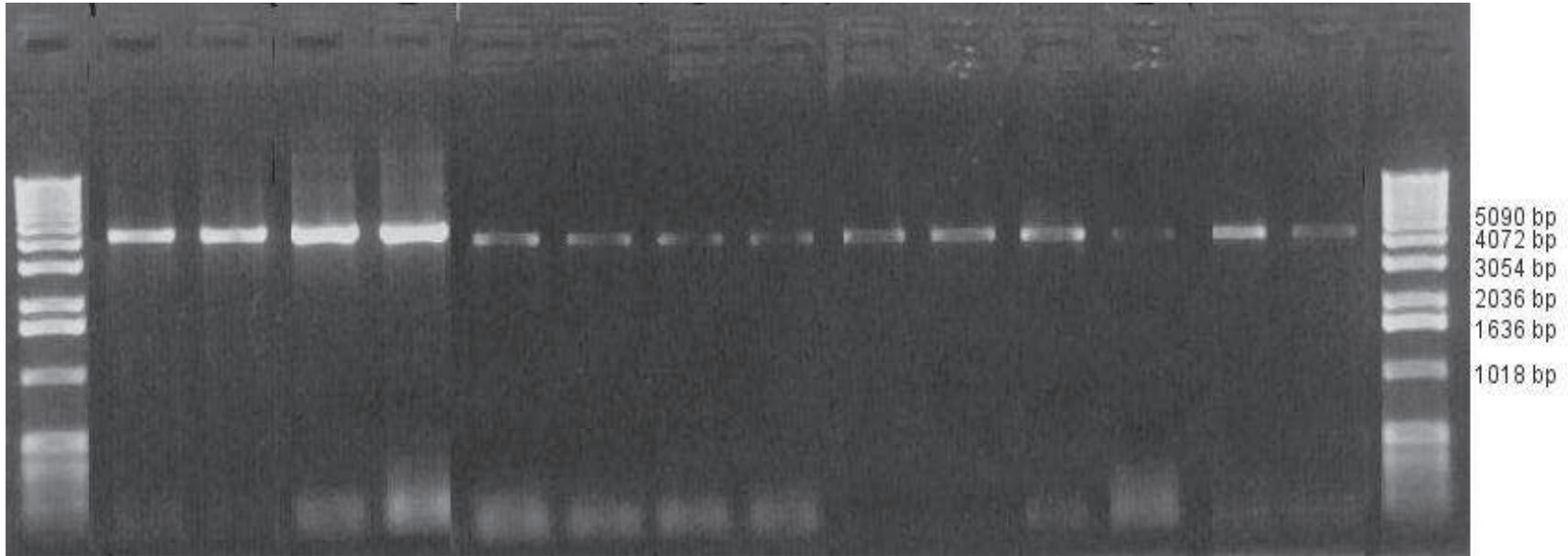
### *3.3 Mutationsanalyse der MT-COX-Gene in benachbarten Patches*

Zur Mutationsanalyse der mitochondrial kodierten COX-Gene wurden COX-negative und COX-positive Patches identifiziert und solche Patch-Gruppen ausgewählt, in denen wie oben beschrieben COX-negative in direkter Nachbarschaft zu COX-positiven Patches, sowie zu einem Portalfeld lagen. Durch Lasermikrodissektion wurden Zellen der benachbarten Patches herausgeschnitten.

Aus der extrahierten DNA wurde in der ersten Runde ein 4249 bp großes mtDNA-Fragment amplifiziert, welches sämtliche mitochondrial kodierte Genabschnitte für die Cytochrom-c-Oxidase beinhaltet.

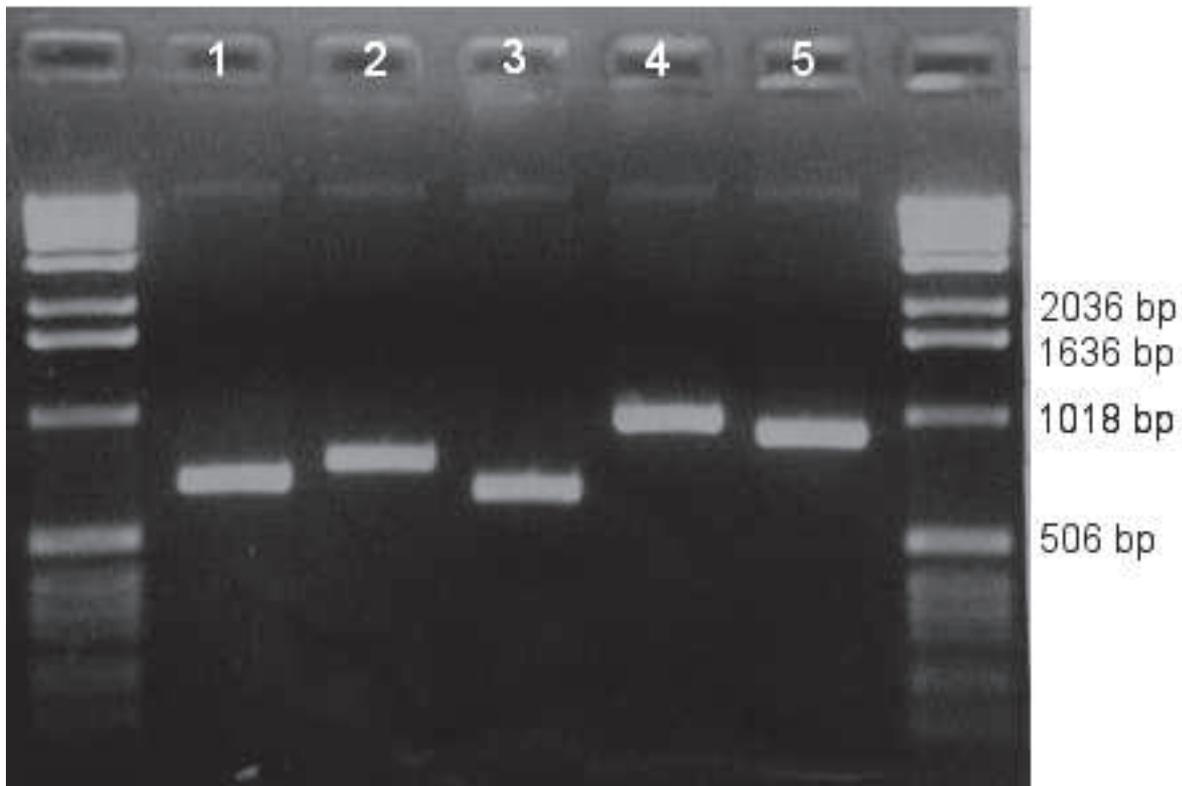


**Abb. 15: Zur DNA-Extraktion ausgewählte Region mit einer Gruppierung von COX-positiven und COX-negativen Patches um ein Portalfeld, vor und nach der Lasermikrodissektion**



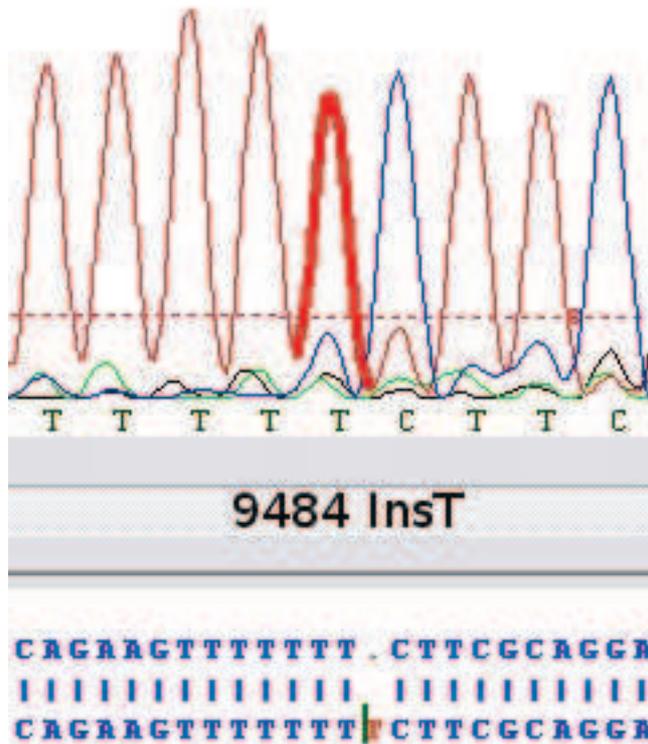
**Abb. 16:** Beispiel für die Überprüfung der PCR-Produkte der ersten Runde durch Gelelektrophorese. Erwartetes PCR-Produkt: 4249 bp großes DNA-Fragment.

In der zweiten Runde wurden jeweils fünf Fragmente amplifiziert, die für die Untereinheiten eins bis drei der Cytochrom-c-Oxidase kodieren.



**Abb. 17: Beispiel für die Überprüfung des PCR-Produkts der zweiten Runde durch Agarose-Gelelektrophorese.** 1. Bande: CO11, kodierende Region im für die Untereinheit 1.1 der Cytochrom-c-Oxidase, erwartete Länge: 687 bp; 2. Bande: CO12, kodierende Region im für die Untereinheit 1.2 der Cytochrom-c-Oxidase, erwartete Länge: 764 bp; 3. Bande: Co13, kodierende Region im für die Untereinheit 1.3 der Cytochrom-c-Oxidase, erwartete Länge: 655 bp; 4. Bande: CO2, kodierende Region im für die Untereinheit 2 der Cytochrom-c-Oxidase, erwartete Länge: 973 bp; 5. Bande: CO3, kodierende Region im für die Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase, erwartete Länge: 907 bp

Nach Fällung wurden die Proben durch die Firma Eurofins MWG GmbH sequenziert. Verglichen wurden die Sequenzen durch Sequenzalignment mit der Cambridge Konsensussequenz, wozu eine von uns programmierte Software verwendet wurde.



**Abb. 18: Beispiel für eine mithilfe unserer Software ermittelte Mutation.** Die Mutation führt durch den Einschub der Base Thymin an der Stelle 9484 der mtDNA zu einer Verschiebung des Leserasters. Dies führte im vorliegenden Fall zu einer Dysfunktion des Enzyms (Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase).

### 3.3.1 Identifizierte Polymorphismen

Vier Sequenzabweichungen konnten wir in allen Proben des untersuchten Individuums nachweisen. Wenn eine von der Normalsequenz abweichende Genvariante mit einer Frequenz von über ein Prozent in einer Population vorliegt, wird sie als Polymorphismus bezeichnet. Die von uns identifizierten Sequenzabweichungen, die in allen Proben des Individuums vorlagen, waren bereits als Polymorphismen in der Mitochondrien-Datenbank ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)) registriert.

Stelle mtDNA	Basenaustausch	Wertung
7028	CT	syn Haplogroups IJKTUVWX (+7025a AluI)
7476	CT	nicht kodierend
7789	GA	synonym
9531	AG	T-A

**Tab. 29: Identifizierte Polymorphismen.** Diese vier Sequenzabweichungen konnten wir in allen Proben des Individuums nachweisen und als bereits bei [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) registrierte Polymorphismen identifizieren.

### 3.3.2 Analyse der genetischen Beziehungen der Felder in einer Gruppe

#### 3.3.2.1 Patchgruppe 1

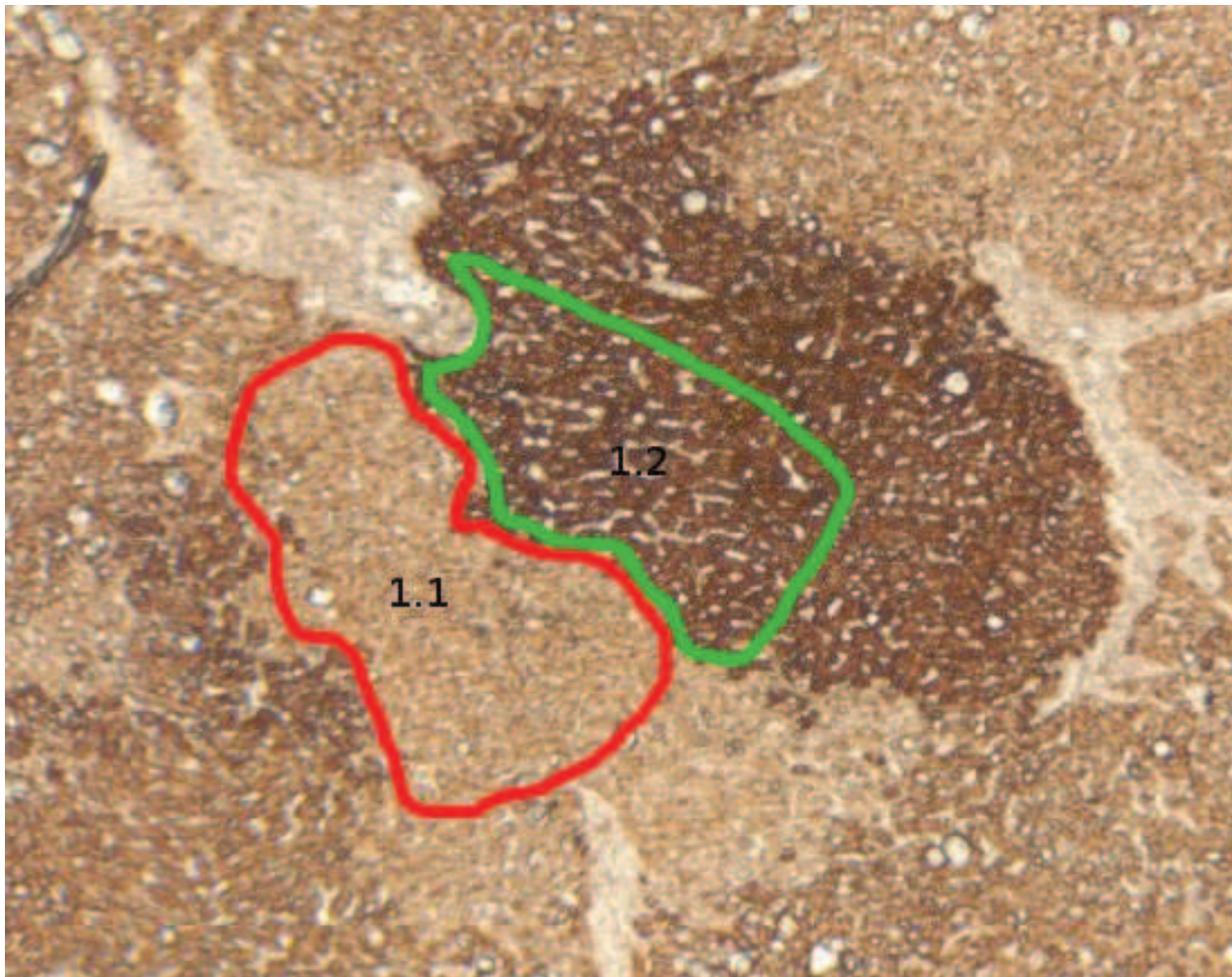


Abb. 19: Patchgruppe 1 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale (rot entspricht COX-negativ, grün COX-positiv bzw. COX-normal)

Patch	COX-Färbung	Mutation / Wildtyp	Homoplasmie	Gen	Auswirkung durch Mutation
1.1	negativ	T9799C	100 %	MT-CO3	An der Stelle 198 wird Phenylalanin durch Serin ersetzt.
1.2	positiv	9799 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp

Tab. 30: In Patchgruppe 1 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positivem Patch. Die im COX-negativen Patch identifizierte Mutation liegt hier nicht vor. MT-CO3: Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die Unter-einheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase.

Die in Patch 1.1 nachgewiesene Mutation führt zu einem Einbau des ungeladenen polaren Serins anstelle des apolaren Phenylalanins. Betroffen ist dabei die für die Unter-einheit Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase kodierende Region der mtDNA. Im direkt an-grenzenden COX-positiven Patch 1.2 wiesen wir an dieser Stelle den Wildtyp nach.

### 3.3.2.2 Patchgruppe 2



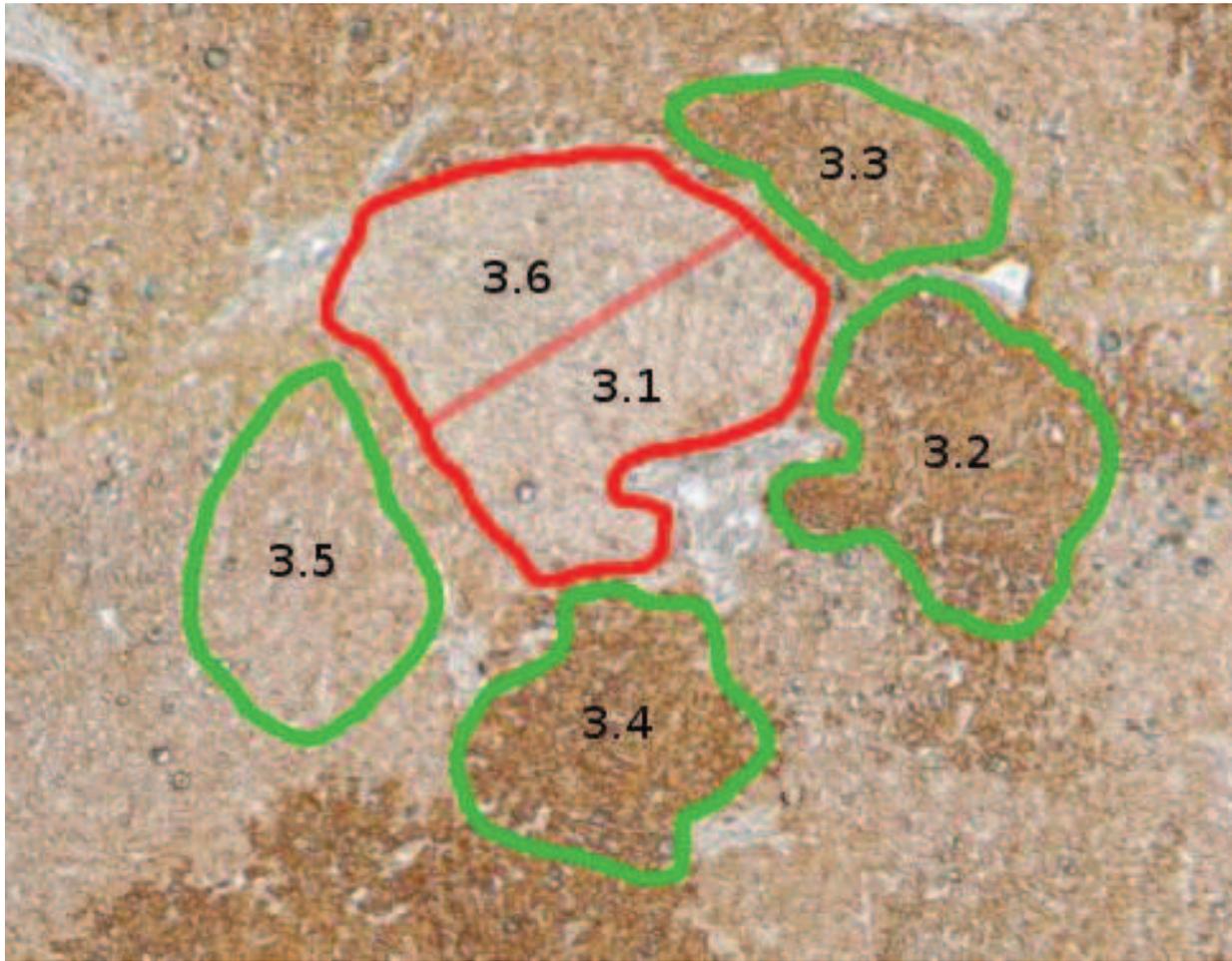
**Abb. 20: Patchgruppe 2 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale (rot entspricht COX-negativ, grün COX-positiv bzw. COX-normal)**

Patch	COX-Färbung	Mutation / Wildtyp	Homoplasmie	Gen	Auswirkung durch Mutation
2.1	negativ	9484InsT	100 %	MT-CO3	Ab der Stelle 93 kommt es zu einem Frameshift.
2.2	positiv	9484 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp
2.3	normochrom	9484 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp

**Tab. 31: In Patchgruppe 2 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbartem COX-positivem und normochromen Patch.** Die im COX-negativen Patch identifizierte Mutation liegt in den anderen beiden untersuchten Patches nicht vor. MT-CO3: Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase, InsT: Insertion von Thymin an entsprechender Stelle.

Die in Patch 2.1 nachgewiesene Mutation führt zu einem Frameshift. Betroffen ist dabei die für die Untereinheit Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase kodierende Region der mtDNA. In den direkt angrenzenden COX-positivem (Patch 2.2) und COX-normalen (Patch 2.3) Patches wiesen wir an dieser Stelle den Wildtyp nach.

### 3.3.2.3 Patchgruppe 3



**Abb. 21: Patchgruppe 3 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale (rot entspricht COX-negativ, grün COX-positiv bzw. COX-normal)**

Patch	COX-Färbung	Mutation / Wildtyp	Homoplasmie	Gen	Auswirkung durch Mutation
3.1	negativ	G9918C	100 %	MT-CO3	An der Stelle 238 wird Alanin durch Prolin ersetzt.
3.2	positiv	9918 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp
3.3	normochrom	9918 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp
3.4	positiv	9918 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp
3.5	normochrom	9918 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp
3.6	negativ	G9918C	100 %	MT-CO3	An der Stelle 238 wird Alanin durch Prolin ersetzt.

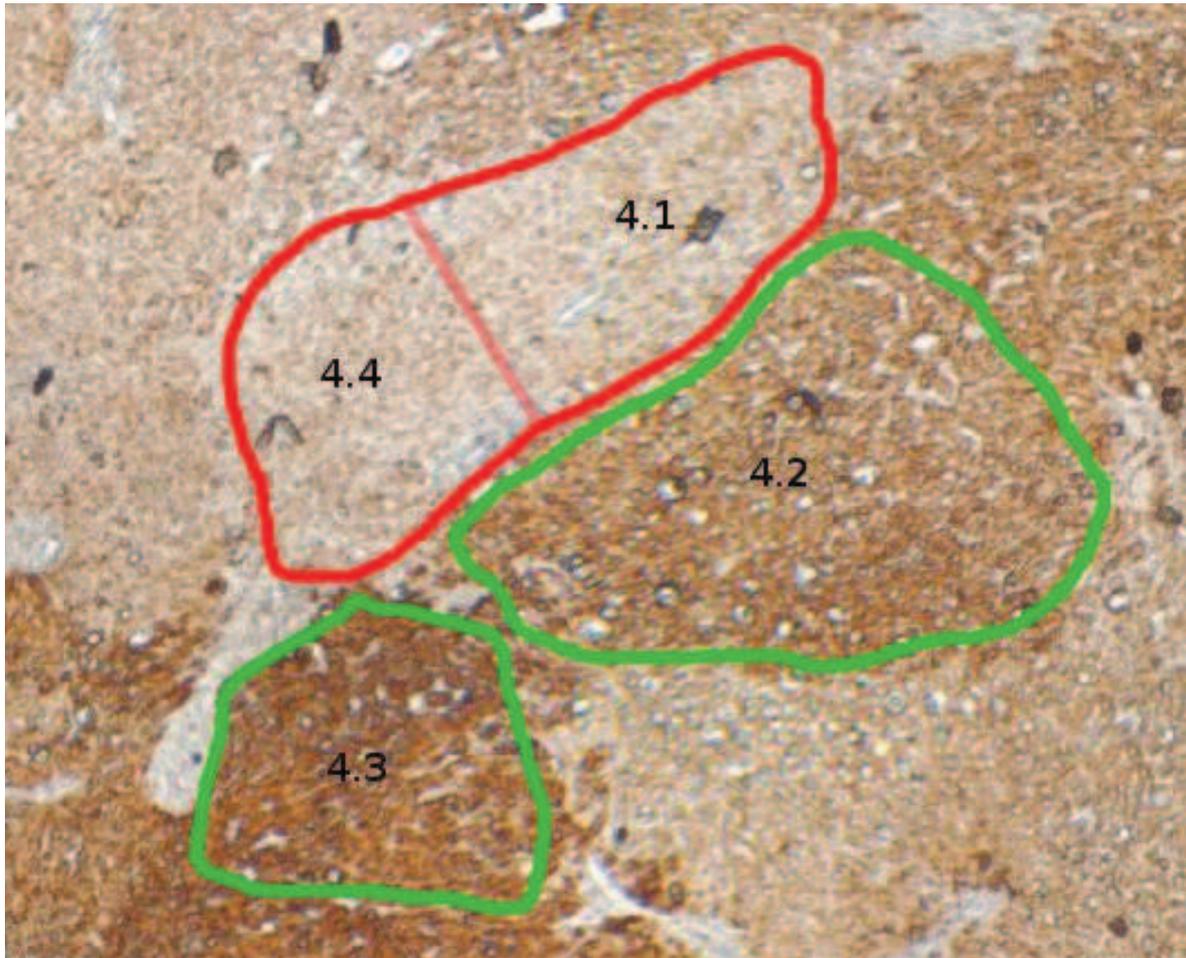
**Tab. 32: In Patchgruppe 3 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positiven und normochromen Patches.** Patch 3.1 und Patch 3.6 entsprechen zwei Anteilen desselben Patches. Zur Kontrolle wurden hier von beiden Anteilen die Lasermikrodissektion, der Verdau, die Amplifizierung, sowie die Sequenzierung getrennt durchgeführt. In beiden Anteilen konnte die gleiche Mutation nachgewiesen werden. Die in beiden Anteilen des COX-negativen Patches identifizierte Mutation liegt in den anderen untersuchten Patches nicht vor. MT-CO3: Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die Untereinheit 3 der Cytochrom-*c*-Oxidase.

Die in Patch 3.1 und 3.6 nachgewiesene Mutation führt zu einem Einbau von Prolin anstelle von Alanin. Betroffen ist dabei die für die Untereinheit Cox3 der Cytochrom-*c*-Oxidase kodierende Region der mtDNA.

Da das hier untersuchte COX-negative Patch relativ groß war, teilten wir es zur Kontrolle in zwei Anteile, aus denen wir getrennt die DNA extrahierten, amplifizierten und sequenzierten. Dadurch wollten überprüfen, ob der Homoplasmiegrad verschiedener Areale innerhalb eines Patches schwankt oder ob er gleichmäßig vorliegt. In beiden Anteilen des COX-negativen Patches der Patchgruppe 3 lag die die COX-Aktivität vermindern Mutation der mtDNA in einem Homoplasmiegrad von 100 % vor.

In den direkt angrenzenden COX-positiven Patches 3.2 und 3.4 wiesen wir an dieser Stelle den Wildtyp nach. In den direkt angrenzenden COX-normalen Patches 3.3 und 3.5 wiesen wir an dieser Stelle ebenfalls den Wildtyp nach.

### 3.3.2.4 Patchgruppe 4



**Abb. 22: Patchgruppe 4 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale (rot entspricht COX-negativ, grün COX-positiv bzw. COX-normal)**

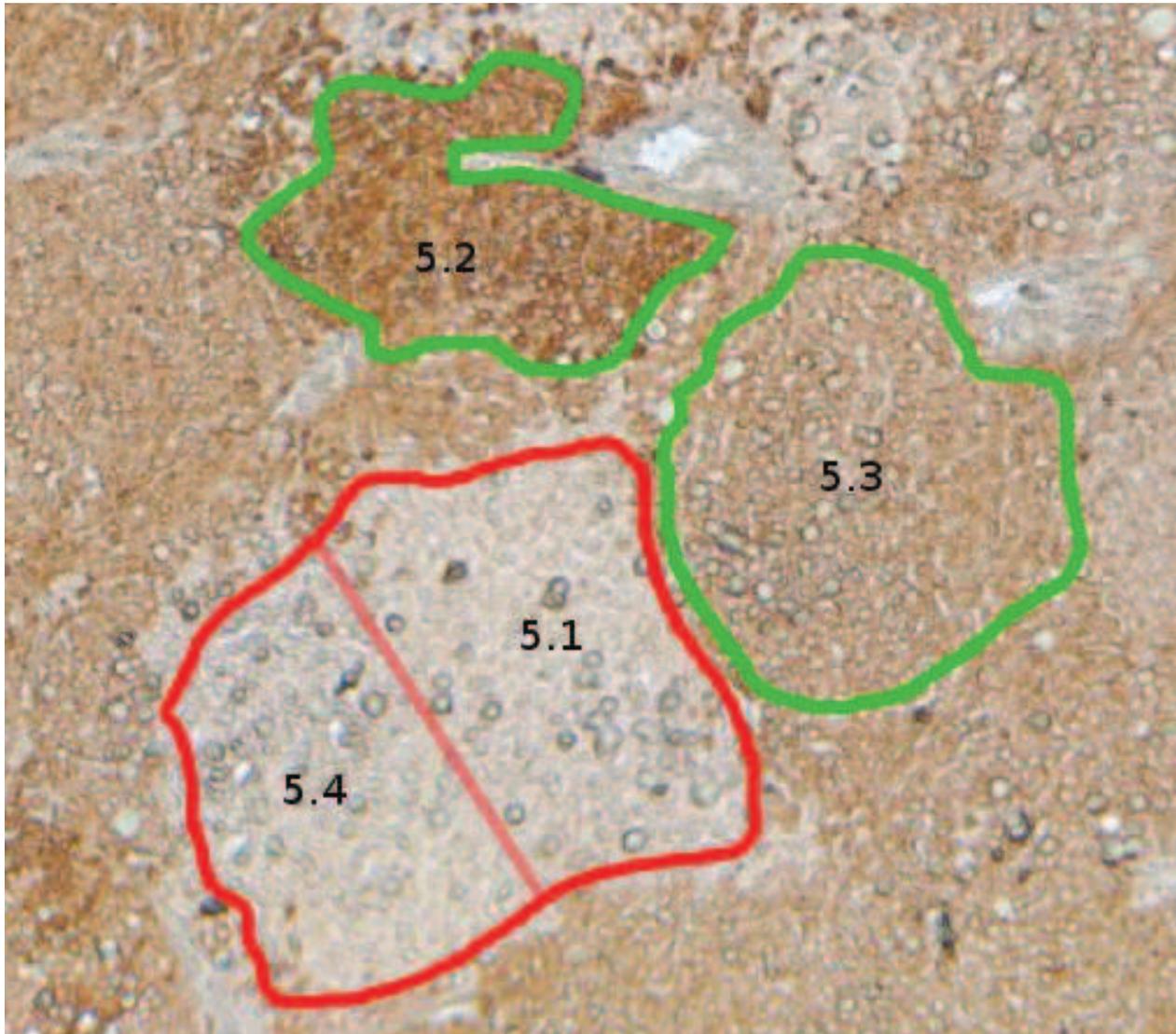
Patch	COX-Färbung	Mutation / Wildtyp	Homoplasmie	Gen	Auswirkung durch Mutation
4.1	negativ	T9885C	100 %	MT-CO3	An der Stelle 227 wird Phenylalanin durch Leucin ersetzt.
4.2	positiv	9885 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp
4.3	positiv	9885 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp
4.4	negativ	T9885C	81 %	MT-CO3	An der Stelle 227 wird Phenylalanin durch Leucin ersetzt.

**Tab. 33:** In Patchgruppe 4 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positiven Patches. Patch 4.1 und Patch 4.4 entsprechen zwei Anteilen desselben Patches. Zur Kontrolle wurden hier von beiden Anteilen die Lasermikrodissektion, der Verdau, die Amplifizierung, sowie die Sequenzierung getrennt durchgeführt. In beiden Anteilen konnte die gleiche Mutation nachgewiesen werden. Die in beiden Anteilen des COX-negativen Patches identifizierte Mutation liegt in den anderen untersuchten Patches nicht vor. MT-CO3: Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase.

Die in Patch 4.1 und 4.4 nachgewiesene Mutation führt zu einem Einbau von Leucin anstelle von Phenylalanin. Betroffen ist dabei die für die Untereinheit Cox3 der Cytochrom-c-Oxidase kodierende Region der mtDNA. Auch hier teilten wir das untersuchte große COX-negative Patch in zwei Anteile, aus denen wir getrennt die DNA extrahierten, amplifizierten und sequenzierten. In Patch 4.1 lag die die COX-Aktivität vermindern Mutation der mtDNA in einem Homoplasmiegrad von 100 % vor, in Patch 4.4 dagegen in einem Heteroplasmiegrad von 81 %.

In den direkt angrenzenden COX-positiven Patches 4.2 und 4.3 wiesen wir an dieser Stelle den Wildtyp nach.

## 3.3.2.5 Patchgruppe 5



**Abb. 23: Patchgruppe 5 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale (rot entspricht COX-negativ, grün COX-positiv bzw. COX-normal)**

Patch	COX-Färbung	Mutation / Wildtyp	Homoplasmie	Gen	Auswirkung durch Mutation
5.1	negativ	T6934C	100 %	MT-CO1	An der Stelle 344 wird Phenylalanin durch Serin ersetzt.
5.2	positiv	6934 Wildtyp	100 %	MT-CO1	Wildtyp
5.3	normochrom	6934 Wildtyp	100 %	MT-CO1	Wildtyp
5.4	negativ	T6934C	100 %	MT-CO1	An der Stelle 344 wird Phenylalanin durch Serin ersetzt.

**Tab. 34:** In Patchgruppe 5 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positiven und normochromen Patches. Patch 5.1 und Patch 5.4 entsprechen zwei Anteilen desselben Patches. Zur Kontrolle wurden hier von beiden Anteilen die Lasermikrodissektion, der Verdau, die Amplifizierung, sowie die Sequenzierung getrennt durchgeführt. In beiden Anteilen konnte die gleiche Mutation nachgewiesen werden. Die in beiden Anteilen des COX-negativen Patches identifizierte Mutation liegt in den anderen untersuchten Patches nicht vor. MT-CO1: Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase.

Die in Patch 5.1 und 5.4 nachgewiesene Mutation führt zu einem Einbau des ungeladenen polaren Serins anstelle des apolaren Phenylalanins. Betroffen ist dabei die für die Untereinheit Cox1 der Cytochrom-c-Oxidase kodierende Region der mtDNA. Auch in dieser Patchgruppe teilten wir das große COX-negative Patch in zwei Anteile, aus denen wir getrennt die DNA extrahierten, amplifizierten und sequenzierten. In beiden Anteilen des COX-negativen Patches der Patchgruppe 5 lag die die COX-Aktivität vermindern Mutation der mtDNA in einem Homoplasmiegrad von 100 % vor.

In den direkt angrenzenden Patches 5.2 (COX-positiv) und 5.2 (COX-negativ) wiesen wir an dieser Stelle den Wildtyp nach.

## 3.3.2.6 Patchgruppe 6

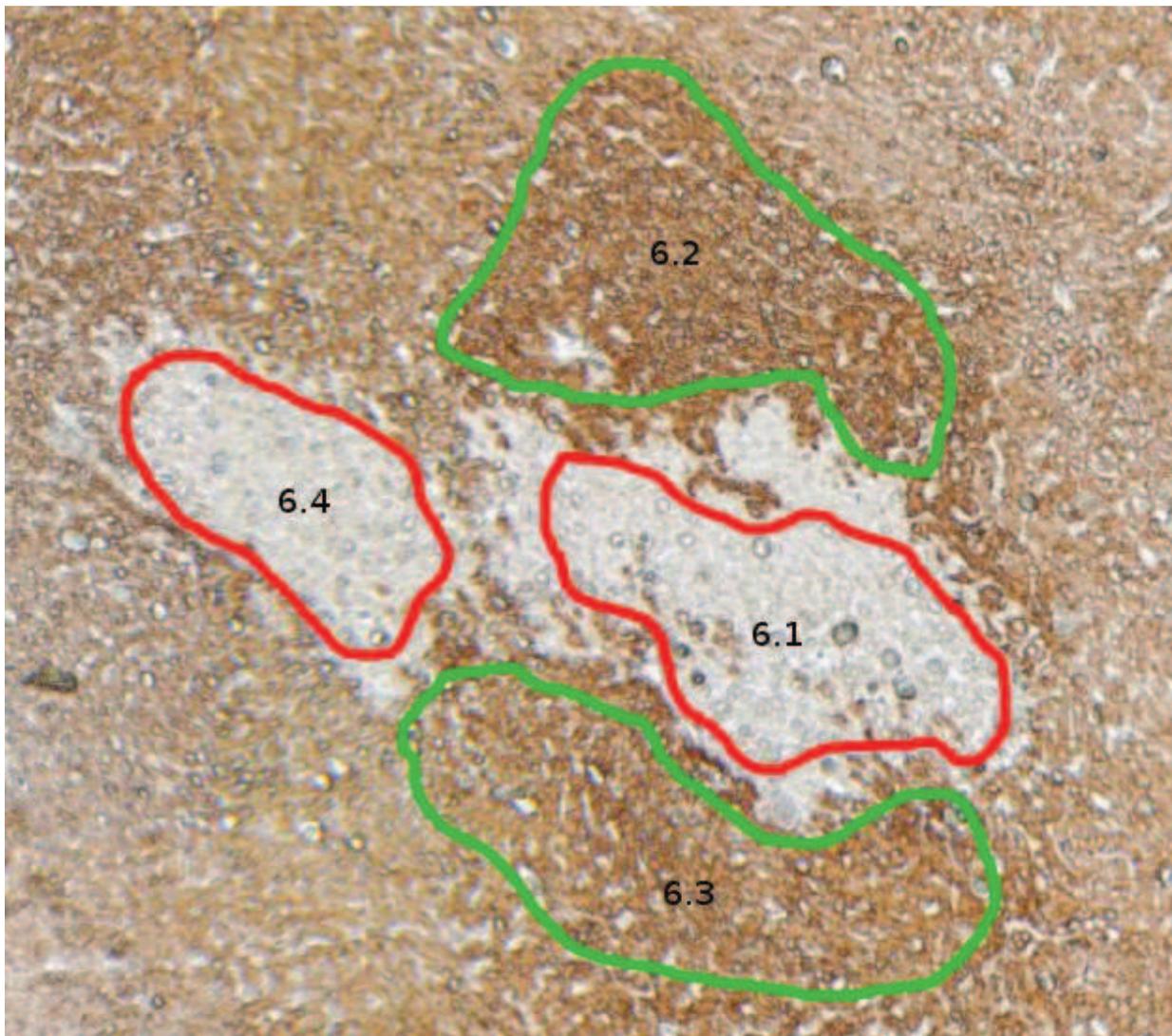


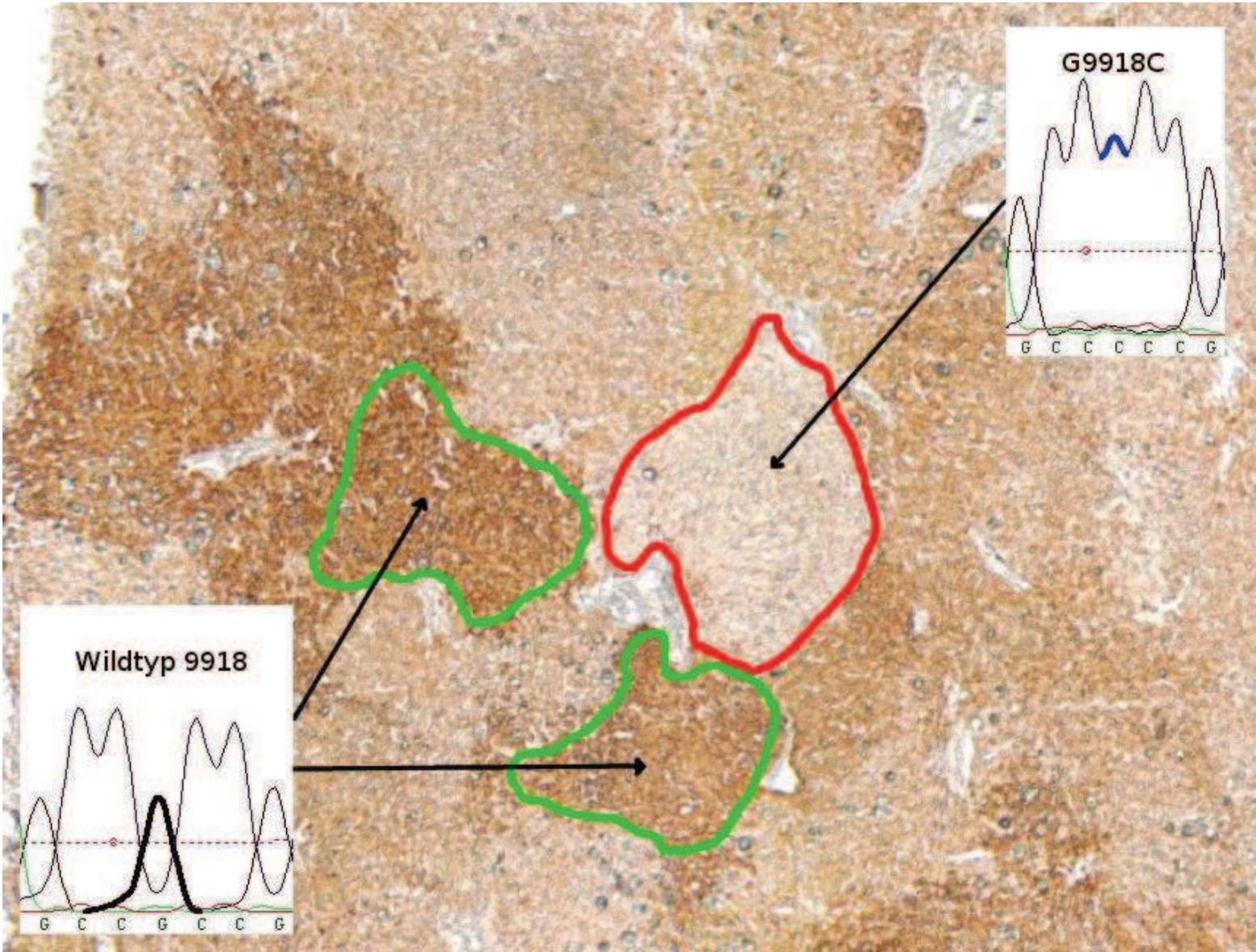
Abb. 24: Patchgruppe 6 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale (rot entspricht COX-negativ, grün COX-positiv bzw. COX-normal)

Patch	COX-Färbung	Mutation / Wildtyp	Homoplasmie	Gen	Auswirkung durch Mutation
6.1	negativ	9484delT	100 %	MT-CO3	Ab der Stelle 93 kommt es zu einem Frameshift.
6.2	positiv	9484 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp
6.3	positiv	9484 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp
6.4	negativ	9484 Wildtyp	100 %	MT-CO3	Wildtyp

6.4	negativ	9998insT	100 %	MT-TG	Ab dem 8. Nukleotid kommt es in der t-RNA für Glycin zu einem Frameshift.
6.2	positiv	9998 Wildtyp	100 %	MT-TG	Wildtyp
6.3	positiv	9998 Wildtyp	100 %	MT-TG	Wildtyp
6.1	negativ	9998 Wildtyp	100 %	MT-TG	Wildtyp

**Tab. 35: In Patchgruppe 6 identifizierte Mutationen in zwei COX-negativen Patches mit zu erwartenden Auswirkungen durch die einzelnen Mutationen und Vergleich sowohl der beiden COX-negativen Patches an den entsprechenden Stellen der mtDNA untereinander, sowie mit dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positiven Patches.** In den beiden COX-negativen Patches 6.1 und 6.4, die nur durch einzelne COX-positive Hepatozyten getrennt wurden, konnten zwei verschiedene Mutationen nachgewiesen werden. An der Stelle der mtDNA, an der in einem COX-negativen Patch eine Mutation gefunden wurde, stellten wir in dem jeweils anderen COX-negativen Patch, sowie in den anderen untersuchten Patches den Wildtyp fest. MT-CO3: Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase. MT-TG: Kodierende Region im mitochondrialen Genom für die tRNA von Glycin.

In der Patchgruppe 6 lagen zwei COX-negative Patches direkt nebeneinander vor, die nur durch einzelne, verbundene COX-positive Hepatozyten getrennt wurden. Hier war die Untersuchung der genetischen Verwandtschaft der beiden COX-negativen Patches besonders interessant. Die in Patch 6.1 nachgewiesene Mutation führt zu einem Frameshift in der für die Untereinheit Cox1 der Cytochrom-c-Oxidase kodierenden Region. Diese Mutation lag in den angrenzenden Patches 6.2, 6.3 und 6.4 nicht vor. Die in Patch 6.4 nachgewiesene Mutation führt zu einem Frameshift in der für die t-RNA für Glycin kodierenden Region. Diese Mutation lag in den angrenzenden Patches 6.1, 6.2 und 6.3 nicht vor. Somit führten in der Patchgruppe 6 unterschiedliche Mutationen der mtDNA zu einer verminderten Aktivität der COX in den beiden benachbarten COX-negativen Patches.



**Abb. 25:** Beispielhafte grafische Auswertung für die Patchgruppe 3. Im COX-negativen Patch konnten wir an Stelle 9918 einen Einbau von Cytosin statt Guanin nachweisen. In den benachbarten COX-positiven Patches wiesen wir an dieser Stelle den Wildtyp nach.

### **3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Mutationsanalyse**

In den von uns untersuchten Patchgruppen konnten wir jeweils eine Mutation identifizieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einen bedeutenden Aminosäureaustausch verursacht und dadurch zu einer verminderten Aktivität der COX in dem COX-negativen Patch, bzw. den COX-negativen Patches führte. Diese Mutation lag in benachbarten COX-positiven oder COX-normalen Patches weder komplett noch anteilig vor. Hier wiesen wir in allen Fällen an dieser Stelle der mtDNA eine Homoplasmie des Wildtyps nach.

## 4. Diskussion

### 4.1 Existenz klonaler Proliferationseinheiten in der Leber

#### 4.1.1 Verminderte Aktivität der COX als phänotypischer Marker für Homoplasmie

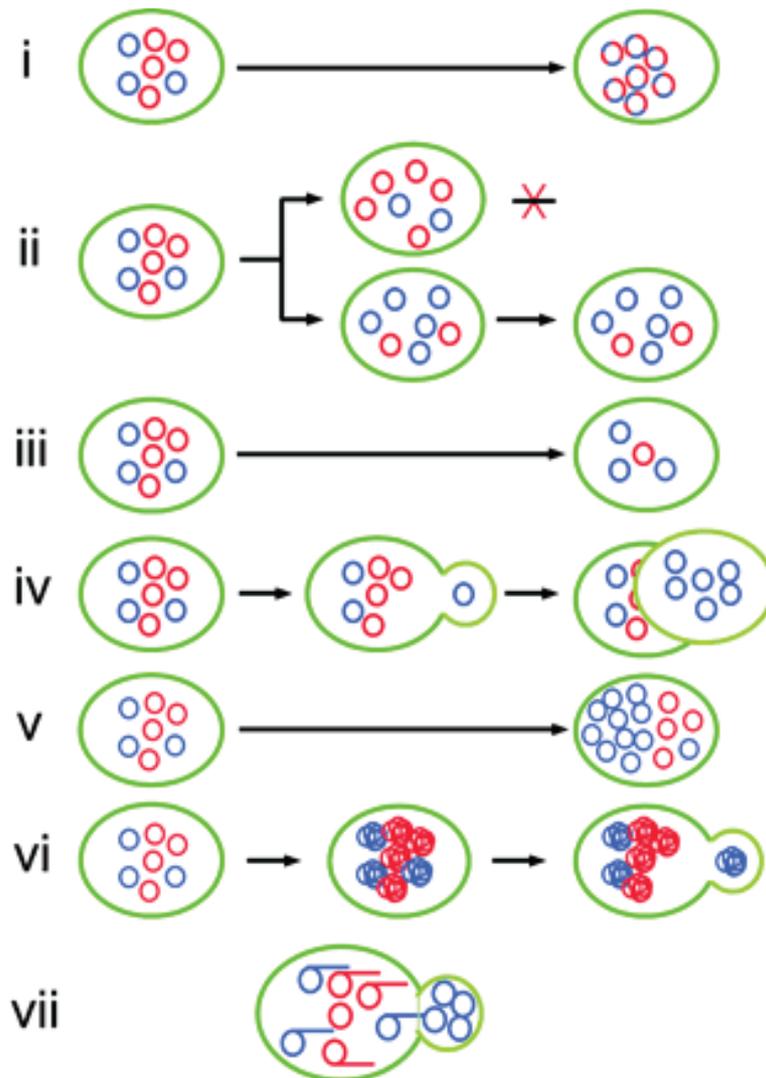
Unsere Beobachtungen der Morphologie des Lebergewebes in der COX-Aktivitätsfärbung ergaben die Existenz großflächiger, scharf voneinander abgegrenzter Patches mit einer unterschiedlichen Aktivität der COX.

Da Mitochondrien multiple Kopien der mtDNA und Leberzellen in der Regel Tausende von Mitochondrien enthalten, muss ein hoher Homoplasmiegrad der Mutation innerhalb einer Zelle vorliegen (>80 %), bevor die Mutation schließlich zu einem biochemisch messbaren Defekt der Cytochrom-c-Oxidase und damit zu einem COX-negativen Patch führt (Lin et al., 2010). Die Frage ist nun, wie es dazu kommt, dass die Mutationen, die zu einer messbaren Verminderung der COX in den COX-negativen Patches führen, homoplasmatisch sind – das heißt, warum anscheinend in nahezu sämtlichen mtDNA-Kopien der Zellen eines Patches eine spezifische Mutation zu annähernd 100 % und nicht anteilig auch der Wildtyp vorliegt.

Zunächst einmal ist die Vermutung nahe liegend, dass es für den Organismus einen Vorteil mit sich bringt, wenn Zellen homoplasmatisch sind. Da die Proteine der Atmungskette zum Teil nukleär, zum Teil mitochondrial kodiert werden, ist eine Koordination zwischen den beiden Genomen unerlässlich für das Überleben der Zelle. Das Vorliegen verschiedener Typen mtDNA in einer Zelle kann zu einer verminderten Funktion einzelner Komplexe oder Komplexuntereinheiten der Atmungskette führen und damit ein Ungleichgewicht und eine Störung der Energieproduktion herbeiführen. Hierdurch kann es zu mitochondrialen Erkrankungen kommen. Aus diesem Grund existieren zum Beispiel bei der Befruchtung der Eizelle Mechanismen, die dazu führen, dass nur die maternale mtDNA weitergegeben und damit die Homoplasmie in zukünftigen Generationen erhalten wird (Spikings et al., 2006). Die Vermutung, dass ein Mechanismus existiert, der auch die Homoplasmie anderer Zellen überstochastisch wahrscheinlich erhält, ist daher nahe liegend (Ling und Shibata, 2004).

Obwohl einige Hypothesen aufgestellt wurden, wie es zur Entstehung von homoplasmatischen Zellen mit einer spezifischen, in nahezu allen mtDNA-Kopien vorliegenden Mutation kommt, konnte noch kein humanes Protein oder Gen identifiziert werden, welches im Entstehungsprozess von homoplasmatischen Zellen eine regulatorische Rolle spielt (Ling und Shibata, 2004).

#### 4.1.2 Entstehung von Homoplasmie



**Abb. 26: Schematische Darstellung der verschiedenen möglichen Entstehungsmechanismen von Homoplasmie, (nach Ling und Shibata, 2004).** i): Entstehung rekombinanter mtDNA durch polare Genkonversion, ii): Selektion von Zellen mit einem bestimmten mitochondrialen Genotyp, iii): Intrazelluläre Selektion von Mitochondrien mit einem bestimmten Genotyp, iv): Transmission nur weniger mtDNA-Moleküle in die Tochterzelle, v): Auswahl weniger mtDNA-Moleküle zur Replikation vi): Selektive Transmission einzelner, physisch verbundener mtDNA-Klone, vii): Von Ling und Shibata (2004) vorgestelltes Modell der Rolling Circle Replication.

Folgende mögliche Mechanismen der Homoplasmieentstehung sollen hier diskutiert werden:

1. Zufall
2. Selektion
3. Intrazelluläre Selektion von Mitochondrien, die einen spezifischen mtDNA-Genotyp besitzen
4. Selektion von Zellen, die eine spezifische Mutation in der mtDNA tragen
5. Transmission nur weniger DNA-Moleküle in die Tochterzelle
6. Auswahl von wenigen mtDNA-Molekülen zur Replikation
7. Rolling circle replication
8. Replikative Segregation

#### *4.1.2.1 Zufall*

Theoretisch könnte es natürlich passieren, dass zufällig in allen mtDNA-Kopien einer Zelle die gleiche Mutation an genau der gleichen Stelle auftritt. Lin et al. berechneten die Wahrscheinlichkeit, dass zufällig die gleiche Mutation an der gleichen Position in nur zwei verschiedenen Zellen auftritt, auf  $2.48 \times 10^9:1$  (Lin et al., 2010). Damit ist eine zufällig gleiche spezifische Neumutation in allen mtDNA-Kopien eines Patches so gut wie ausgeschlossen.

#### *4.1.2.2 Selektion*

Eine Möglichkeit wäre eine Auslese einer zunächst zufällig entstandenen Mutation der mtDNA im Sinne von Selektion. Diese könnte bei der mtDNA theoretisch auf zwei verschiedenen Ebenen stattfinden: Bei der Teilung der Mitochondrien und der Verteilung der mtDNA-Moleküle auf die Tochterorganelle oder bei der Zellteilung.

Zum Beispiel könnte es aufgrund eines potenziellen Replikationsvorteils zur intrazellulären Selektion eines bestimmten mtDNA-Genotyps kommen. Diese Möglichkeit zogen unter anderem Fliss et al. (2000), Habano et al. (2000), Polyak et al. (1998) sowie Ling und Shibata (2004) bei ihren Untersuchungen ebenfalls in Erwägung. Man könnte sich zum Beispiel vorstellen, dass der Import von kernkodierten Proteinen für die

mitochondriale Replikation durch die mitochondriale Membran durch ein verändertes Membranpotenzial verändert wird. Es gibt Beobachtungen, dass einige mitochondriale Punktmutationen einen selektiven Vorteil oder Nachteil für die mtDNA-Kopie oder die Zelle darstellen (Dunbar et al., 1995; Polyak et al., 1998; Shay und Ishii, 1990; Yoneda et al., 1992). Trotzdem gibt es auch Beispiele, für die selektive Vorteile sehr unwahrscheinlich sind, es aber trotzdem zu Homoplasmie kommt (Fliss et al., 2000; Habano et al., 1998; Habano et al., 2000). Daher gehen wir davon aus, dass Selektion zwar unter bestimmten Umständen vorkommen und Einfluss auf das Entstehen von Homoplasmie nehmen kann, dies aber nicht generell der Fall sein muss. Unsere Beobachtungen stimmen mit denen von Ling und Shibata (2004) überein, die diese Hypothese letztendlich ebenfalls für unwahrscheinlich hielten, da die von ihnen verwendeten mtDNA-Moleküle sich lediglich in zwei Basenpaaren in Antibiotikaresistenzgenen (Ling und Shibata untersuchten mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*) unterschieden, wofür sie einen Replikationsvorteil als sehr unwahrscheinlich werteten (Ling und Shibata 2004).

McDonald et al. (2008) verwarfen die Hypothese einer Selektion als Entstehungsmechanismus für Homoplasmie bei ihren Untersuchungen an COX-negative Patches im Magen und an Mutationen in den COX-Genen ebenfalls. Dies begründeten sie damit, dass man in dem Fall wohl COX-negative Einheiten schon bei jüngeren Menschen feststellen würde. Sie konnten keine mutierten Einheiten bei Patienten unter 40 Jahren finden (McDonald et al., 2008).

Durch unsere Untersuchungen kamen wir ebenfalls zu dem Schluss, dass Selektion sowohl auf intrazellulärer Ebene als auch auf zellulärer Ebene eher unwahrscheinlich ist. Wäre Selektion der entscheidende Faktor bei der Entstehung von Homoplasmie, würden wir erwarten, dass die mtDNA-Kopie, die die entsprechende vorteilhafte Mutation trägt, sich langsam bei den Teilungen der Organelle und der Zelle ausbreitet, sodass schließlich vielleicht auch homoplasmatische Zellen entstehen würden, wir jedoch nicht mit großen, scharf abgegrenzten Patches rechnen würden, sondern mit einem Heteroplasmiegradienten innerhalb eines Patches.

Wir hielten es auch für unwahrscheinlich, dass eine defekte Cytochrom-c-Oxidase und damit eine nicht voll funktionstüchtige Atmungskette und ein reduzierter Energiehaushalt der Zelle einen Selektionsvorteil bieten.

Vorstellbar wäre, dass durch den oxidativen Stress, den die Zelle die reduzierte Kapazität der Atmungskette hat, die Proliferation der Mitochondrien angeregt wird, um eine höchstmögliche Aktivität der Atmungskette zu erreichen. Durch eine erhöhte Anzahl von Teilungen der Zellorganellen könnte es zu einer schnelleren Segregation (siehe unten) auf mitochondrialer Ebene kommen. Allerdings würde es in diesem Fall in der SDH-Färbung zu einem entsprechenden hyperchromen Patch an dieser Stelle kommen, da bei einer höheren Anzahl von Mitochondrien auch eine erhöhte Aktivität der kernkodierten SDH vorhanden sein müsste. Dies ist jedoch nicht der Fall.

#### *4.1.2.3 Transmission nur weniger mtDNA-Moleküle in die Tochterzelle*

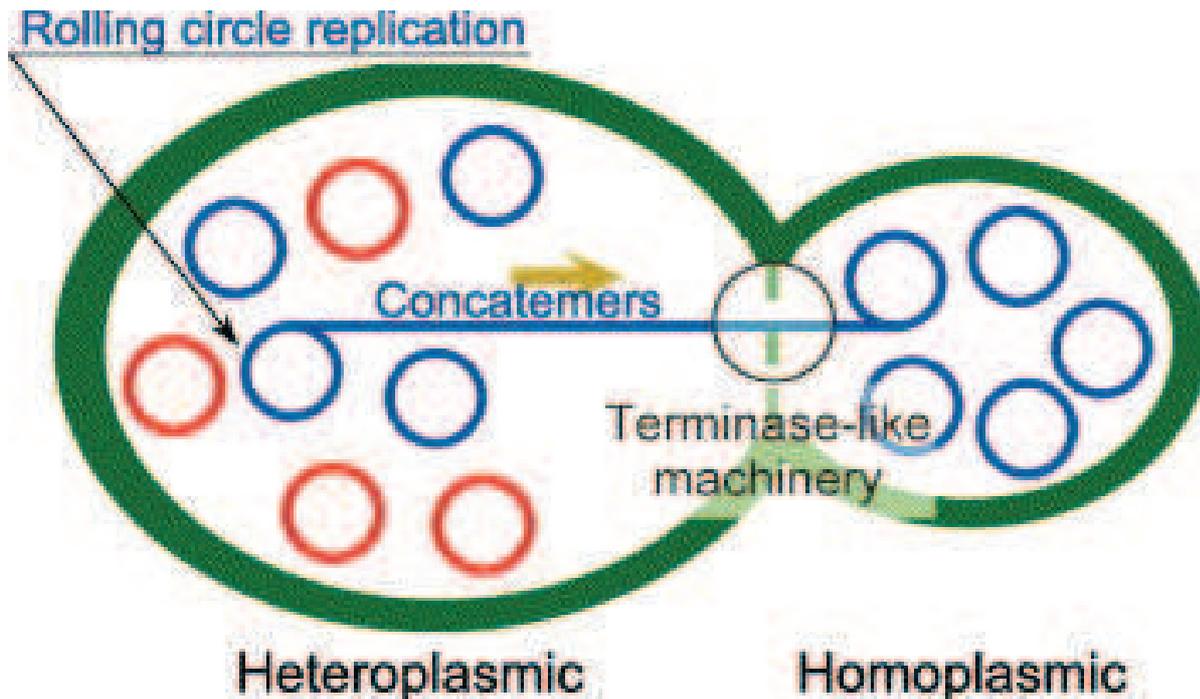
Eine weitere Möglichkeit wäre die Transmission nur weniger mtDNA-Moleküle und damit einer geringen Anzahl an Template-Molekülen in die Tochterzellen bei der Zellteilung. Würden kurz nach der Zellteilung in der Tochterzelle nur wenige mtDNA-Moleküle als Template für die weitere Replikation zur Verfügung stehen, könnte eine einmal entstandene Mutation in der mtDNA sehr schnell Homoplasmie erreichen. Diese Theorie wurde jedoch schon 2002 durch Ling und Shibata widerlegt. Sie konnten zeigen, dass mindestens 5 – 10 mtNukleotide (Ling und Shibata untersuchten mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*) in sich teilenden Zellen vorhanden waren (Ling und Shibata, 2002), von denen wahrscheinlich zumindest einige multiple mtDNA-Kopie enthielten.

#### *4.1.2.4 Auswahl von wenigen mtDNA-Molekülen zur Replikation*

Bei der Entstehung einer homoplasmatischen Zelle könnte ein Mechanismus eine Rolle spielen, bei dem eine Kopie einer zufällig gewählten mtDNA als Template für die Replikation aller Nachkommen mtDNA benutzt würde (Ling und Shibata, 2004).

#### *4.1.2.5 Rolling circle replication*

Die Rolling circle replication ist ein von Maleszka et al. 1991 vorgestelltes Modell für Hefen. Dabei werden bei der Entstehung von Tochterzellen einige wenige mtDNA-Kopien als Template für die Rolling circle replication benutzt, wobei jeweils ein langer, linearer Tochter-mtDNA-Strang, das Concatemer, entsteht, in Tochterknospen übergeben und dort zu zirkulären Monomeren prozessiert wird. Fraglich ist jedoch, ob dieses Modell auf menschliche mtDNA übertragbar ist, da doch einige Unterschiede zwischen menschlicher mtDNA und mtDNA in Hefen bestehen (Lecrenier und Foury, 2000).



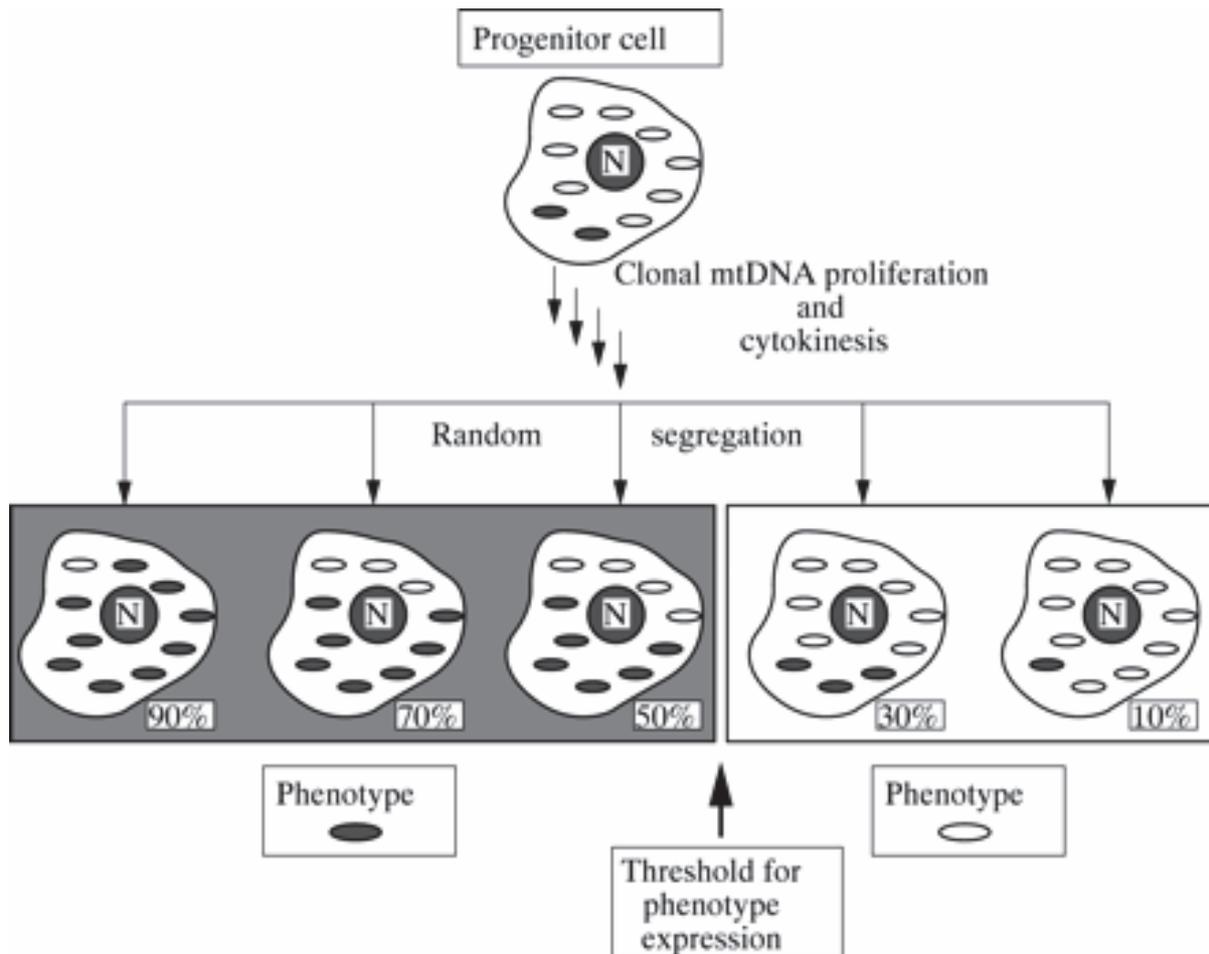
**Abb. 27: Schematische Darstellung der Rolling Circle Replication (nach Ling und Shibata, 2004).** Es werden nur wenige mtDNA-Moleküle durch Zufall als Templates ausgewählt. Diese bilden Concatemere, die selektiv auf die Tochterzellen übertragen werden, sodass diese homo-plasmatisch sind.

#### 4.1.2.6 Replikative Segregation

Da eine typische menschliche Zelle ein paar Hundert mtDNA-Kopien enthält, koexistiert eine, in einer mtDNA-Kopie neu entstandene Mutation neben einer großen Mehrheit von Wildtyp-Molekülen. Die Koexistenz verschiedener mtDNA-Typen wird als Heteroplasmie bezeichnet. Während der Teilungen der Mitochondrien werden normale und mutierte mtDNA-Moleküle auf die Tochterorganellen verteilt. Die Mitochondrien, die nun einen verschiedenen Anteil mutierter und nicht mutierter mtDNA-Moleküle enthalten, werden während Mitose und Meiose auf die Tochterzellen verteilt. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl die Verteilung der mtDNA-Moleküle auf die Tochterorganellen als auch die Verteilung der Mitochondrien auf die Tochterzellen zufällig stattfindet.

Die einzigen beiden stabilen Zustände, die dabei erreicht werden können, sind entweder der Verlust der Mutation oder Homoplasmie der Mutation. Daher wird es nach einer entsprechend langen Zeit, bzw. einer ausreichend großen Zahl an Zellteilungen zu einer dieser beiden Zustände kommen.

Dieser Prozess wird als replikative Segregation bezeichnet (Wallace, 1994).



**Abb. 28: Schematische Darstellung der replikativen Segregation (nach Stacpoole et al., 1997).** Die zufällige Verteilung der Mitochondrien bei der Zellteilung führt zu ungleicher Verteilung von Wildtyp-mtDNA (weiße Ovale) und mutierter mtDNA (schwarze Ovale) in den Tochterzellen. Hier wurde die phänotypbestimmende Grenze bei 50% gewählt. N: Zellkern.

#### 4.1.2.6.1 Beschleunigung der replikativen Segregation

Die Segregationsrate ist eine Funktion der mtDNA-Kopiezahl und der Replikationsrate (Battersby et al., 2003). Je niedriger die mtDNA-Kopiezahl und je höher die Replikationsrate, desto schneller findet replikative Segregation statt.

#### 4.1.2.6.2 Beschleunigung der replikativen Segregation durch einen reduzierten Gehalt an mtDNA

Dieser Effekt, der 1989 für die Oogenese etabliert wurde (Ashley et al., 1989), wird als Bottleneckprinzip bezeichnet. Danach beruht die rasche Entmischung heteroplasmatischer Genotypen auf einem Mechanismus, der dafür sorgt, dass nur eine geringe Zahl an mtDNA-Molekülen effektiv zur mtDNA-Population in der Nachkommenschaft beiträgt.

Auf diese Weise kann eine Mutation in der mtDNA sehr schnell akkumulieren und so fixiert werden.

Man könnte sich vorstellen, dass unter Umständen mtDNA zerstört wird und so nur noch wenige funktionsfähige mtDNA-Moleküle vorliegen, die zur Replikation genutzt werden können.

#### **4.1.2.6.3 Beschleunigung der replikativen Segregation durch eine erhöhte Zahl an Teilungen entweder der Mitochondrien oder der gesamten Zelle**

Bei der Meiose kommt es zum einen zu einer großen Zahl schnell aufeinander folgender Zellteilungen, zum anderen liegt hier ein relativ geringer Gehalt an mtDNA vor (Jenuth et al., 1996). Daher ist hier eine beschleunigte replikative Segregation möglich.

Die mitotische replikative Segregation somatischer Zellen erfordert jedoch eine sehr große Anzahl an Zellteilungen, um annähernd Homoplasmie einer mtDNA-Mutation zu erreichen (Wallace, 1994). Zu einer so großen Anzahl von Zellteilungen kommt es in der Regel nur innerhalb von Zeiträumen, die die normale Lebensdauer der meisten Zellen, überschreiten (Elson et al., 2001).

Zu einer erhöhten Anzahl von Zellteilungen kommt es jedoch bei der Kanzerogenese. In einigen Studien konnte eine hohe Frequenz von homoplasmatischen mtDNA-Mutationen in menschlichen Tumoren gezeigt werden (Alonso et al., 1997; Fliss et al., 2000; Habano et al., 1998; Habano et al., 2000; Polyak et al., 1998; Richard et al., 2000). Dabei war in allen mtDNA-Kopien aller Tumorzellen dieselbe mtDNA-Mutation enthalten, die im umgebenden gesunden Gewebe nicht vorhanden war. Polyak et al. zeigten 1998, dass entweder die Mutation der mtDNA selbst zu einer klonalen Zellproliferation führen kann oder dass eine zufällig gleichzeitig vorliegende Mutation im nukleären Genom dafür verantwortlich ist.

#### **4.1.2.6.4 Nukleäre Beeinflussung der replikativen Segregation**

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die Segregation der mtDNA unter Kontrolle von kernkodierten Genen steht. Für eine nukleäre Kontrolle der mitochondrialen DNA-Segregation konnten 2003 das erste Mal Beweise erbracht werden (Battersby et al., 2003; Ling und Shibata, 2004). Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt,

wäre jedoch eine mögliche Erklärung für die Entstehung der monoklonalen Proliferationseinheiten in der Leber.

#### **4.1.2.6.5 Replikative Segregation auf Stammzellniveau**

Ebenfalls denkbar wäre die beschleunigte Segregation auf Stammzellebene. Die Definition der Stammzellen wird kontrovers diskutiert. Eine minimalistische Definition ist, dass Stammzellen zum einen die Kapazität zur Selbsterneuerung, zum anderen zur Generierung von differenzierten Nachkommen haben (Morrison et al., 1997).

Hier wird sowohl eine vergleichsweise hohe Lebensdauer der Zellen als auch eine ausreichende Zahl an Zellteilungen erreicht. In unseren Proben halten wir daher eine Entstehung der Homoplasmie auf Stammzellebene für am wahrscheinlichsten.

Coller et al. beschrieben 2001 die Entstehung der Mutation in einer Tumorprogenitorzelle und berechneten in einem Computermodell die Wahrscheinlichkeit der Homoplasmieentstehung dieser Mutation ohne das Vorliegen eines irgendwie gearteten Vorteils durch die jeweilige Mutation. Sie konnten zeigen, dass Homoplasmie durch zufälligen genetischen Drift erreicht werden kann. Sie widerlegten damit die zuvor von anderen Forschungsgruppen aufgestellte Hypothese, die Mutationen müssten aufgrund eines Wachstumsvorteils selektiert werden (Fliss et al., 2000; Habano et al., 2000). Diese Feststellung konnte auch durch Elson et al. (2001) bestätigt werden.

Wenn, wie wir vermuten, die Mutation der mtDNA in einer Stammzelle entsteht und die Zelle sich teilt, wird die Hälfte der mtDNA-Kopien auf eine transitorische Zelle verteilt, die andere Hälfte verbleibt in der Stammzelle. Die Kopien der transitorischen Zelle sind für die weitere Proliferation verloren. Abhängig davon, wie die mutierten mtDNA-Kopien zwischen der Stammzelle und der transitorischen Zelle verteilt werden, reichert sich die Mutation in der Stammzelle an oder wird verringert. Der Anteil an mutierten mtDNA-Kopien in der Zelllinie schwankt zufällig.

Wie oben beschrieben muss es nach einer entsprechend langen Zeit, bzw. nach einer ausreichend großen Zahl an Zellteilungen zu einem der einzigen beiden stabilen Zustände – nämlich entweder der Homoplasmie der Mutation oder einem Verlust der Mutation – kommen. Coller et al. berechneten, dass rechnerisch nur ungefähr 70 Generationen nötig sind, damit eine Mutation, die homoplasmatisch werden soll, die Homoplasmie erreicht (Coller et al., 2001). Diese Zahl ist vergleichsweise gering, wenn man

auf Stammzellebene denkt, da Stammzellen ungefähr 200 Teilungen durchmachen (Coller et al., 2001). Dies zeigt, dass, obwohl ein anderer beeinflussender Mechanismus nicht ausgeschlossen ist, die stochastische Erklärung auf Stammzellebene ausreicht, um die hohe Inzidenz an homoplasmatischen mtDNA-Mutationen in humanen Tumoren zu erklären.

Unsere Vermutung ist, dass die Homoplasmie auf der Ebene einer Progenitorzelle entsteht und durch klonale Proliferation weitergegeben wird. Auf diese Weise können große, homoplasmatische Patches entstehen, in denen alle Zellen aus einer Stammzelle hervorgegangen sind.

Ein Punkt, der für die Progenitorzelltheorie spricht, ist, dass diese Zellen eine hohe Lebensdauer und damit die Anzahl an Replikationen erreichen können, die nötig ist, damit es überhaupt zu einer Homoplasmie kommen kann. Dann wie bereits erwähnt ist die Segregationsrate Funktion der mtDNA-Kopie-Anzahl und der Replikationsrate (Battersby et al., 2003).

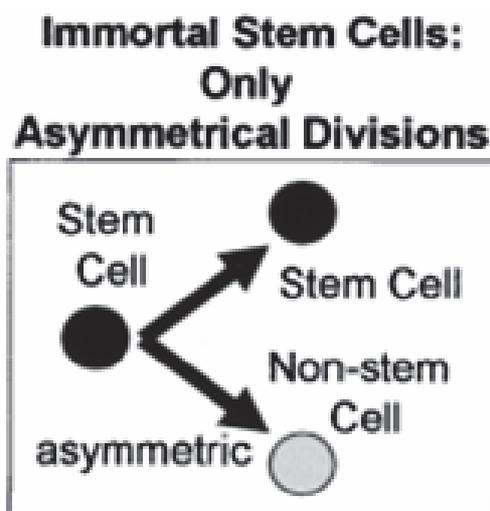
Auch wenn Lin et al. 2010 darauf hin wiesen, dass die Ursprungszelle von klonalen COX-negativen Zellen zwar eine Zelle mit einer langen Lebensdauer sein müsse, jedoch nicht unbedingt eine Stammzelle, da in der Leber die Zellerneuerung viel langsamer als zum Beispiel im Kolonepithel sei, nahmen auch sie letztendlich aufgrund der großen, klonalen Patches mit einer spezifischen Mutation eine klonogene Ursprungszelle an – eine Schlüsseleigenschaft von Stammzellen (Lin et al., 2010). Aufgrund der Lokalisation der großen, COX-negativen Patches direkt an Portalfeldern, die sie bei ihren Untersuchungen zur Klonalität von Regenerationsknoten in der Leberzirrhose fanden, vermuteten sie eine Stammzelle nahe der Portalfelder (Lin et al., 2010).

In Epithelien mit einer geordneten Struktur und kontinuierlicher Zellerneuerung, wie zum Beispiel dem Darmepithel, existiert oft eine hierarchische Organisation mit Stammzellen am Anfang des Flusses und differenzierten, nicht teilungsfähigen Zellen am Ende des Flusses. Hier ist die Entstehung von klonalen Patches daher leichter zu erforschen. Kim und Shibata konnten 2002 zeigen, dass ein Stammzellkompartiment (so genannte Stammzellnischen) für eine Krypte proliferiert und so bei Ausfall der Cytochrom-c-Oxidase durch eine Mutation der mtDNA die gesamte Krypte COX-negativ wird (Kim und Shibata 2002).

In der Leber nicht so leicht nachzuweisen wie in einem kontinuierlich von basal nach apikal proliferierenden Gewebe wie der Darmschleimhaut, da die Richtung des Flusses nicht eindeutig geklärt ist, auch wenn es viele Hypothesen dazu gibt. Eine davon ist die bereits erwähnte Hypothese Zajiceks der „Streaming Liver“ (Zajicek et al., 1985). Schwierig ist die Diskussion dieser Frage auch deshalb, weil sich die Patches nicht wie im Kolon zunächst an morphologischen Einteilungen wie den Krypten orientieren.

Kim und Shibata stellten 2002 die Hypothese auf, dass Stammzellen entweder immortal oder durch Stammzellnischen bestimmt sind (Kim und Shibata, 2002).

Die immortale Stammzelle entspricht der klassischen Vorstellung einer Stammzelle. Sie teilt sich typischerweise asymmetrisch, wobei eine Stammzelle und eine differenzierte Zelle, ihre Teilungsfähigkeit verliert, entstehen. Durch die asymmetrische Teilung geht die Stammzelllinie nie verloren.

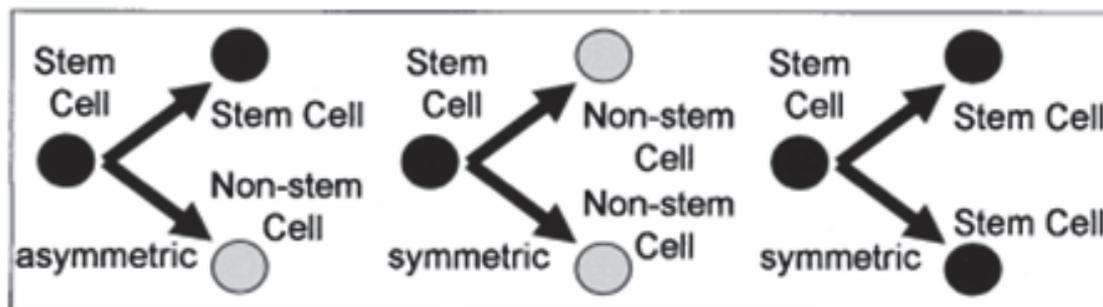


**Abb. 29: Schematische Darstellung der asymmetrischen Teilung immortalere Stammzellen (nach Kim und Shibata, 2002).**

Im Gegensatz dazu können sich Stammzellen in Nischen asymmetrisch oder symmetrisch teilen, wobei bei der symmetrischen Teilung entweder zwei Stammzellen oder zwei differenzierte Zellen entstehen können. Stammzellnischen sind spezialisierte Regionen, die eine bestimmte Mikroumgebung bereitstellen, wo die Stammzellaktivität erhalten und reguliert wird (Fellous et al., 2009). Die Zellen innerhalb der Nische werden hier zu den Funktionen als Stammzellen angeleitet (Spradling et al., 2001).

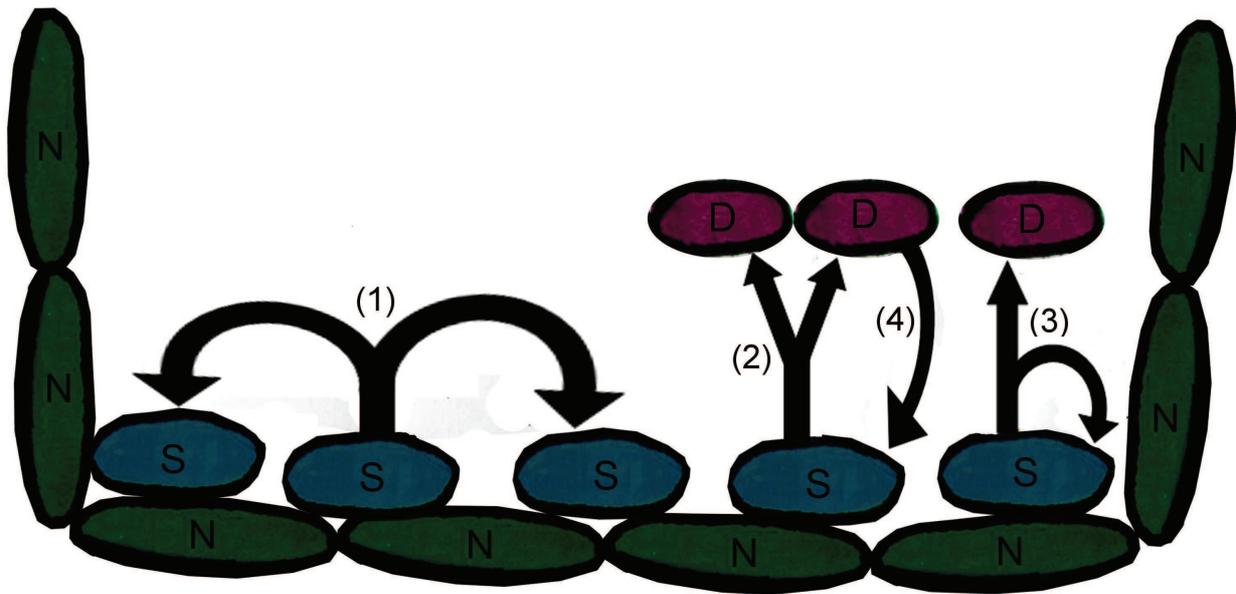
Studien an Mäusen für das Darmepithel haben sich als vereinbar mit dem Stammzellnischenkonzept erwiesen (Booth und Potten, 2000; Potten und Loeffler, 1990; Williams et al., 1992).

### In A Niche: Symmetric and Asymmetric Divisions



**Abb. 30: Schematische Gegenüberstellung der symmetrischen und asymmetrischen Teilung in Stammzellnischen (nach Kim und Shibata, 2002).** Nach diesem Modell können bei der Teilung einer Stammzelle entweder zwei gleiche Zellen entstehen, nämlich entweder zwei Stammzellen oder zwei Nichtstammzellen, was der symmetrischen Stammzellteilung entsprechen würde, oder es können eine Stammzelle und eine Nichtstammzelle entstehen, was der asymmetrischen Stammzellteilung entsprechen würde.

Eine Nische mit ihrer begrenzten asexuellen Population wäre besonders empfänglich für „Muller’s ratchet“, (Muller, 1964). Nach dem 1964 von Hermann Joseph Muller aufgestellten Prinzip der so genannten „Sperrklinke“ sammelt eine begrenzte, asexuelle Population aufgrund des Verlustes von Individuen mit weniger Mutationen bei fehlender Rekombination unvermeidbar schädliche Mutationen an. Zudem überwiegt in kleineren Populationen der genetische Drift gegenüber Selektionseffekten (Chao, 1997).



**Abb. 31: Unsere schematische Darstellung zur Veranschaulichung des Konzeptes der Stammzellnische.** Hier können sich Stammzellen (S) teilen (1) oder differenzieren (2, 3). Eine gerade differenzierte Zelle (D) kann in die Stammzellnische zurückkehren und wieder eine Stammzelle werden (4). Die Nischenzellen (N) kontrollieren die Umgebung der Stammzellen, indem sie verschiedene Faktoren sezernieren und Sauerstofflevel sowie physikalische Faktoren regulieren.

Auf Stammzellebene kann in der Nische rasch Homoplasmie erreicht werden und potenziell können viele Alterationen in der mtDNA akkumuliert und fixiert werden. Veränderungen ohne sofortigen selektiven Wert können passiv in der Stammzelle getragen werden, die während der Nischennachkommenzyklen („Niche succession cycles“) dominant wird (Kim und Shibata, 2002).

McDonald et al. (2008) vermuteten für das Magenepithel ebenfalls eine Stammzellnische analog zu der, die Kim und Shibata für die Kolonkrypten vorschlugen (Kim und Shibata, 2002). Demnach erwirbt eine Stammzelle eine Mutation der Cytochrom-c-Oxidase, wird dominant und erneuert die ganze Einheit. Dabei handelt es sich um einen stochastischen Prozess, bei dem eine Mutation keinen Vorteil bieten muss, um sich bei der Nischennachkommenschaft durchzusetzen.

Läge in der Leber ebenfalls eine solche Stammzellnische vor, bliebe die Frage nach der Lokalisation dieser Nische. Fellous et al. konnten 2009 das erste Mal klonale proliferative Einheiten in der menschlichen Leber nachweisen, deren Lokalisation auf einen Ausgangspunkt von einem Bereich nahe der Portalfelder schließen lässt. Darin stimmen sie mit den Untersuchungen an Mäusen von Kuwahara et al. (2008) und Tang et al.

(2008) überein, deren Ergebnisse auf eine Stammzellnische in der Nähe der Portalfelder schließen lassen. Dies wäre auch kompatibel mit Zajiceks Modell der „streaming liver“ (Zajicek et al., 1985).

Die Morphologie der Patches, die wir in unseren Untersuchungen beobachten konnten, ließe sich ebenfalls gut mit der Theorie einer hepatischen Stammzellnische vereinen. Würde eine Mutation der mtDNA in einem Hepatozyten homoplasmatisch und würde dieser Hepatozyt daraufhin gleichmäßig mit den umliegenden Zellen proliferieren, würde es in der COX-Färbung nicht zu großen, homoplasmatischen Patches kommen. Die benachbarten Hepatozyten, die die entsprechende Mutation nicht enthalten, würden sich neben der Zelle mit der mutierten mtDNA ebenfalls teilen und es würden allenfalls aus wenigen Zellen bestehende, sehr kleine Patches entstehen. Am wahrscheinlichsten würde es in diesem Fall jedoch zu einer heterogenen Felderung aus sehr kleinen Patches mit einem unterschiedlichen Gehalt an mutierter mtDNA kommen.

#### *4.2 Zusammenhang der klonalen Proliferationseinheiten mit dem hepatozellulären Karzinom*

In einer vorausgegangenen Studie konnte bereits anhand klonaler hepatozellulärer Proliferate ein Zusammenhang der Hepatokarzinogenese in nicht-zirrhatischen Lebern mit einer Schädigung des Progenitor-/Stammzellpools gezeigt werden (Adam et al., 2012). Unsere Messungen bestätigten diese Ergebnisse.

Sowohl für COX-positive als auch für COX-negative Patches konnten wir zeigen, dass diese in größerer Anzahl und Größe in tumorfremem Gewebe HCC-tragender Lebern auftraten als in nicht HCC-tragenden Lebern. Wir halten es für wahrscheinlich, dass dies ein Zeichen für eine erhöhte Zahl von Zellteilungen ist. Wie bereits beschrieben, kann die replikative Segregation entweder durch einen erniedrigten Gehalt an mtDNA oder durch eine erhöhte Zahl an Zellteilungen Beschleunigt werden, wodurch es zur Entstehung homoplasmatischer Zellen kommen kann. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse einiger Forschungsgruppen bestätigt, die eine hohe Frequenz von homoplasmatischen mtDNA-Mutationen in menschlichen Tumoren zeigten (Alonso et al., 1997; Fliss et al., 2000; Habano et al., 1998; Habano et al., 2000; Polyak et al., 1998; Richard et al., 2000).

Eventuell wäre es nach weiteren Untersuchungen sogar möglich, anhand der Dichte und des Anteils von COX-negativen und –positiven Patches in der Leber eine Aussage zu der Wahrscheinlichkeit eines Auftretens des HCC zu treffen.

### *4.3 Entstehung der einzelnen Patches unabhängig voneinander aus eigenen Stammzellen*

Wir zogen die Möglichkeit in Erwägung, dass die einzelnen Patches, die nebeneinander einem Portalfeld zuzuordnen waren, einen gemeinsamen genetischen Ursprung hätten.

Die Mutationsanalyse der benachbarten Patches in den Patchgruppen erbrachte in unseren Untersuchungen, dass die Mutationen felderspezifisch sind. In den von uns untersuchten Fällen fand kein Austausch mitochondrialen Erbguts zwischen den einzelnen Patches statt. In allen Fällen konnten wir nur patch-spezifische Mutationen nachweisen. Besonders interessant erschien die in Patchgruppe 6 vorliegende Assoziation zweier COX-negativer Patches. Die beiden COX-negativen Patches lagen fast direkt nebeneinander, sie wurden nur durch einzelne, verbundene COX-positive Hepatozyten getrennt. Hier war die Untersuchung der genetischen Verwandtschaft der beiden COX-negativen Patches besonders interessant. Zum einen könnte es sich um unabhängig voneinander entstandene COX-negative Patches mit verschiedener Mutation handeln. Zum anderen wäre es aber auch möglich, dass sich in diesem Anschnitt zeigt, wie ein COX-negatives Patch, das ursprünglich aus einer gemeinsamen Stammzelle entstanden ist, durch Einwachsen von COX-positiven Hepatozyten einer anderen Zelllinie teilt. Wir konnten durch die Mutationsanalyse dieser Patchgruppe zeigen, dass in diesem Fall zwei verschiedene Mutationen vorlagen. Dies bedeutet, dass in den beiden Arealen unterschiedliche Mutationen zu einer verminderten Aktivität der COX geführt haben.

Lin et al untersuchten 2010 Regenerationsknoten bei Leberzirrhose ebenfalls durch phänotypische Markierung der verminderten COX-Aktivität auf ihre Klonalität und stellten fest, dass 18 % der Regenerationsknoten COX-negativ waren. Mittels DNA-Sequenzierung stellten sie ebenfalls fest, dass diese COX-negativen Knoten monoklonalen Ursprungs waren (Lin et al., 2010). Sie kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass benachbarte COX-negative Regenerationsknoten eine andere Mutation der mtDNA aufwiesen.

Wir vermuten, dass auch in der nicht-zirrhatischen Leber ähnliche klonale proliferative Einheiten, vergleichbar den Regenerationsknoten, vorliegen, für die sich die Ergebnisse unserer Untersuchungen mit denen von Lin et al decken.

Unsere Untersuchungen sprechen für eine Entstehung der einzelnen Patches unabhängig voneinander aus eigenen Stammzellen. Eine Reduplikation des Stammzellpools, die zu einer Heteroplasmie mit gleichen Mutationen in benachbarten Patches führen würde, wurde nicht nachgewiesen. Dies ist möglicherweise ein weiterer Hinweis auf eine Schädigung des Stammzellpools in der Karzinogenese HCC-tragender, nicht-zirrhatischer Lebern.

## 5. Zusammenfassung

Die verschiedenen Theorien über den Mechanismus der Proliferation und Regeneration des Leberparenchyms sind gerade in Hinblick auf die Karzinogenese lebereigener Tumore von besonderer Bedeutung. Hierbei scheint eine Schädigung auf Stammzellebene der Grundstein für die Entwicklung z.B. des hepatozellulären Karzinoms zu sein.

Es existieren unterschiedliche Hypothesen über mögliche Stammzellkompartimente und die Regeneration von Leberparenchym. Diese Arbeit stellt neue Aspekte einer möglichen Hepatokarzinogenese durch eine Schädigung des Stammzellpools vor.

In einer vorausgegangenen Studie konnte anhand klonaler hepatozellulärer Proliferate ein Zusammenhang der Hepatokarzinogenese in nicht-zirrhatischen Lebern mit einer Schädigung des Progenitor-/Stammzellpools gezeigt werden.

In unseren Untersuchungen nutzten wir die besonderen Eigenschaften der mitochondrialen Genetik und verwendeten Mutationen der mitochondrialen DNA als Marker der klonalen Expansion. Zellen, die eine solche Markermutation auf der mtDNA trugen, wurden phänotypisch mithilfe einer enzymhistochemischen Färbung (Cytochrom-c-Oxidase-Aktivitätsfärbung) identifiziert.

Es zeigten sich auch hier scharf abgrenzbare Areale unterschiedlicher COX-Aktivität. Diese Areale wurden als Patches bezeichnet, die entweder als COX-negativ, COX-positiv oder COX-normal klassifiziert wurden.

Durch morphometrischen Vergleich von COX-negativen und –positiven Feldern in HCC-tragenden Lebern mit denen in nicht HCC-tragenden Lebern konnten wir eine Vergrößerung der klonalen Areale in tumorfreien Anteilen HCC-tragender Lebern bestätigen.

Mittels Lasermikrodissektionsverfahren und DNA-Sequenzierung konnten wir in Gewebeproben ausgewählter Patches spezifische Mutationen nachweisen, die die nachgewiesenen Dysfunktionen der COX in diesen Patches erklärten. Ein, in allen Teilen eines Patches gleicher, sehr hoher Heteroplasmiegrad bzw. eine Homoplasmie für die Mutation belegte die klonale Natur der Patches.

Zudem stellten wir uns die Frage nach dem Entstehungsmechanismus der großen, scharf abgrenzbaren Patches.

Aufgrund der Morphologie der Patches schlossen wir auf eine Entstehung der Homoplasmie der entsprechenden Mutation auf Stammzellebene. Auf dieser Ebene wäre aufgrund der größeren Anzahl von Zellteilungen und aufgrund der langen Lebensdauer der Zellen eine Segregation der mtDNA-Mutation möglich.

Wir zogen die Möglichkeit in Erwägung, dass die einzelnen Patches, die nebeneinander einem Portalfeld zuzuordnen waren einen gemeinsamen genetischen Ursprung hätten.

Daher untersuchten wir benachbarte Patches darauf, ob sie, als Zeichen der gemeinsamen Abstammung von einer Ursprungszelle, identische Mutation homoplasmisch oder zumindest heteroplasmisch aufweisen. In allen Fällen konnten wir nur patch-spezifische Mutationen nachweisen. Die benachbarten Patches zeigten eine Homoplasmie des Wildtyps am entsprechenden Locus.

Dies spricht für eine Entstehung der einzelnen Felder unabhängig voneinander aus eigenen Stammzellen. Eine Reduplikation der Stammzellen zur Regeneration des Stammzellpools, die zu einer Heteroplasmie mit gleichen Mutationen in benachbarten Patches führen würde, wurde nicht nachgewiesen. Das ist möglicherweise ein weiterer Hinweis auf eine Schädigung des Stammzellpools in der Karzinogenese HCC-tragender, nicht-zirrhotoser Lebern.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der Leber nach der Blutversorgung in acht Segmente (nach Schuenke und Schulte 2010).....	12
Abb. 2: Schematische Darstellung der klassischen Leberläppchen und der Leberazini (nach Tzanakakis et al., 2000) .....	13
Abb. 3: Schematische Darstellung der sechs Faktoren, die zur Tumorentstehung beitragen (nach Hanahan und Weinberg, 2000) .....	17
Abb. 4: Modell der Atmungskette (nach Saraste, 1999) .....	23
Abb. 5: Schematische Darstellung des genetischen Drifts der mtDNA (nach Rand, 2001). .....	27
Abb. 6: Schematische Darstellung der Struktur und des Aufbaus des mitochondrialen Genoms (nach Ganten und Ruckpaul, 2007).....	29
Abb. 7: Der von uns verwendete Größenstandard .....	43
Abb. 8: Verwendete Software, Mutationsanalyse durch Sequenzalignment mit der Cambridge-Konsensussequenz .....	45
Abb. 9: Vergleich von Lebergewebe in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (links) mit der COX-Färbung (rechts) in direkt aufeinander folgender Serienschritte.....	47
Abb. 10: Vergleich direkt aufeinander folgender Serienschritte; auf der linken Seite SDH-Färbung, auf der rechten Seite COX-Färbung .....	48
Abb. 11: Beispiel für zwei benachbarte Patches mit unterschiedlicher Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase .....	49
Abb. 12: Beispiel für die Gruppierung von COX-positiven und COX-negativen Patches um ein Portalfeld .....	50
Abb. 13: Vergleich der Messwerte für COX-positive Felder in HCC-tragend und nicht HCC-tragend.....	62
Abb. 14: Vergleich der Messwerte für COX-negative Felder in HCC-tragend und nicht HCC-tragend.....	62

Abb. 15: Zur DNA-Extraktion ausgewählte Region mit einer Gruppierung von COX-positiven und COX-negativen Patches um ein Portalfeld, vor und nach der Lasermikrodissektion .....	64
Abb. 16: Beispiel für die Überprüfung der PCR-Produkte der ersten Runde durch Gelelektrophorese.....	65
Abb. 17: Beispiel für die Überprüfung des PCR-Produkts der zweiten Runde durch Agarose-Gelelektrophorese .....	66
Abb. 18: Beispiel für eine mithilfe unserer Software ermittelte Mutation.....	67
Abb. 19: Patchgruppe 1 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale .....	68
Abb. 20: Patchgruppe 2 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale .....	69
Abb. 21: Patchgruppe 3 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale .....	71
Abb. 22: Patchgruppe 4 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale .....	73
Abb. 23: Patchgruppe 5 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale .....	75
Abb. 24: Patchgruppe 6 mit Markierung der zur Lasermikrodissektion ausgewählten Areale .....	77
Abb. 25: Beispielhafte grafische Auswertung für die Patchgruppe 3.....	79
Abb. 26: Schematische Darstellung der verschiedenen möglichen Entstehungsmechanismen von Homoplasmie, (nach Ling und Shibata, 2004) .....	82
Abb. 27: Schematische Darstellung der Rolling Circle Replication (nach Ling und Shibata, 2004).....	86
Abb. 28: Schematische Darstellung der replikativen Segregation (nach Stacpoole et al., 1997).....	87
Abb. 29: Schematische Darstellung der asymmetrischen Teilung immortaler Stammzellen (nach Kim und Shibata, 2002).....	91

Abb. 30: Schematische Gegenüberstellung der symmetrischen und asymmetrischen Teilung in Stammzellnischen (nach Kim und Shibata, 2002) .....	92
Abb. 31: Unsere schematische Darstellung zur Veranschaulichung für das Konzept der Stammzellnische.....	93

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die 24 verwendeten Gewebeproben von insgesamt 17 Patienten.....	33
Tab. 2: Primer der ersten Amplifikationsrunde .....	39
Tab. 3: Primer der zweiten Amplifikationsrunde .....	41
Tab. 4: Übersicht über die bei der zweiten Amplifikation erhaltenen Fragmente.....	41
Tab. 5: Ergebnisse der Messungen in Probe 1 .....	51
Tab. 6: Ergebnisse der Messungen in Probe 2 .....	51
Tab. 7: Ergebnisse der Messungen in Probe 3 .....	52
Tab. 8: Ergebnisse der Messungen in Probe 4 .....	52
Tab. 9: Ergebnisse der Messungen in Probe 5 .....	53
Tab. 10: Ergebnisse der Messungen in Probe 6 .....	53
Tab. 11: Ergebnisse der Messungen in Probe 7 .....	53
Tab. 12: Ergebnisse der Messungen in Probe 8 .....	54
Tab. 13: Ergebnisse der Messungen in Probe 9 .....	54
Tab. 14: Ergebnisse der Messungen in Probe 10 .....	55
Tab. 15: Ergebnisse der Messungen in Probe 11 .....	55
Tab. 16: Ergebnisse der Messungen in Probe 12 .....	56
Tab. 17: Ergebnisse der Messungen in Probe 13 .....	56
Tab. 18: Ergebnisse der Messungen in Probe 14 .....	56
Tab. 19: Ergebnisse der Messungen in Probe 15 .....	57
Tab. 20: Ergebnisse der Messungen in Probe 16 .....	57
Tab. 21: Ergebnisse der Messungen in Probe 17 .....	58
Tab. 22: Ergebnisse der Messungen in Probe 19 .....	58
Tab. 23: Ergebnisse der Messungen in Probe 20 .....	59

Tab. 24:	Ergebnisse der Messungen in Probe 21 .....	59
Tab. 25:	Ergebnisse der Messungen in Probe 22 .....	59
Tab. 26:	Ergebnisse der Messungen in Probe 24 .....	60
Tab. 27:	Arithmetische Mittel der Messungen und Gegenüberstellung der Ergebnisse für HCC-tragende und nicht HCC-tragende Proben.....	61
Tab. 28:	Verhältnis der Messwerte von HCC-tragend und nicht HCC-tragend.....	61
Tab. 29:	Identifizierte Polymorphismen .....	67
Tab. 30:	In Patchgruppe 1 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positivem Patch.....	68
Tab. 31:	In Patchgruppe 2 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbartem COX-positiven und normochromen Patch.....	70
Tab. 32:	In Patchgruppe 3 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positiven und normochromen Patches.....	72
Tab. 33:	In Patchgruppe 4 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positiven Patches.....	74
Tab. 34:	In Patchgruppe 5 identifizierte Mutation in COX-negativem Patch mit zu erwartender Auswirkung durch diese Mutation und Vergleich dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positiven und normochromen Patches.....	76
Tab. 35:	In Patchgruppe 6 identifizierte Mutationen in zwei COX-negativen Patches mit zu erwartenden Auswirkungen durch die einzelnen Mutationen und Vergleich sowohl der beiden COX-negativen Patches an den entsprechenden Stellen der mtDNA untereinander, sowie mit dieser Stelle der mtDNA in benachbarten COX-positiven Patches.....	78

## 8. Literaturverzeichnis

- Adam AC, Fadou V, Paschen SA, Adam OM, Kahl P, Drebber U, Fischer HP, Büttner R. Hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic liver is associated with a reduced number of clonal hepatocellular patches in non-tumorous liver parenchyma. *J Pathol* 2012; in press
- Alison MR, Islam S, Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* 2009; 217: 282–298
- Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes S. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver?. *Cell Prolif* 2004; 37: 1–21
- Alison MR, Choong C, Lim S. Application of liver stem cells for cell therapy. *Sem Cell Dev Biol* 2007; 18: 819–826
- Alonso A, Martin P, Albarran C, Aquilera B, Garcia O, Guzman A, Oliva H, Sancho M. Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. *Electrophoresis* 1997; 18: 682–685
- Anderson RN, Smith BL. Deaths: leading causes for 2001. *Natl Vital Stat Rep* 2003; 52: 1–85
- Anderson SAT, Bankier B, Barrell G, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457–465
- Ashley MV, Laipis PJ, Hauswirth WW. Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 7325–7331
- Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP. Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim Biophys Acta* 1978; 501: 349–369
- Battersby BJ, Loredó-Osti JC, Shoubridge EA. Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. *Nat Genet* 2003; 33: 183–186

- Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell?. *Hepatology* 1999; 30: 112–117
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2: 1129–1133
- Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105: 1493–1499
- Bosch FX, Ribes J, Borràs J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 271–285
- Bosch FX, Ribes J, Cléries R, Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 191–211
- Boyer PD. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 717–749
- Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 2002; 1: 1
- Bralet MP, Branchereau S, Brechot C, Ferry N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. *Am J Pathol* 1994; 144: 896–905
- Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3787–3800
- Brown TA, Cecconi C, Tkachuk AN, Bustamante C, Clayton DA. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev* 2005; 19: 2466–2476
- Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1967–1971
- Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD. *MacSween's Pathology of the Liver*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2006

- Bykov I, Ylipaasto P, Eerola L, Lindros KO. Functional Differences between Periportal and Perivenous Kupffer Cells Isolated by Digitonin-Collagenase Perfusion. *Comp Hepatol* 2004; 3: 34
- Capaldi RA. Structure and assembly of cytochrome c oxidase. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 252–262
- Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 1855–1859
- Chao L. Evolution of sex and the molecular clock in RNA viruses. *Gene* 1997; 205: 301–308
- Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG. High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet* 2001; 28: 147–150
- Couinaud C. *Le foie; études anatomiques et chirurgicales*. Paris: Masson, 1957
- Dancygier H. *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*. Berlin: Springer, 2003
- Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192: 245–261
- DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 2001; 106: 18–26
- Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G. Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Oncogene* 2006; 25: 3756–3770
- Dumollard R, Duchon M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007; 77: 21–49
- Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT, Holt IJ. Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6562–6566

- El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 2000; 160: 3227–3230
- Elsou JL, Samuels DC, Turnbull DM, Chinnery DF. Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 802–806
- Fabrick BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* 2005; 210: 153–160
- Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson N, Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* 2002; 31: 289–294
- Fawcett DW, Bloom W. *A Textbook of Histology*. London: Hodder Arnold Publication, 1997
- Fellous TG, Islam S, Tadrous PJ, Elia G, Kocher HM, Bhattacharya S, Mears L, Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology* 2009; 49: 1655–1663
- Fields AC, Cotsonis G, Sexton D, Santoianni R, Cohen C. Survivin expression in hepatocellular carcinoma: correlation with proliferation, prognostic parameters, and outcome. *Mod Pathol* 2004; 17: 1378–1385
- Fisher RP, Clayton DA. A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J Biol Chem* 1985; 260: 11330–11338
- Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 2000; 287: 2017–2019
- Fontanesi F, Soto IC, Barrientos A. Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life* 2008; 60: 557–568
- Fraser R, Bowler LM, Day WA. Damage of rat liver sinusoidal endothelium by ethanol. *Pathology* 1980; 12: 371–376

- Ganten D, Ruckpaul K. *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Sem Liver Dis* 2001; 21: 311–335
- van Gelder BF. On cytochrome c oxidase. I. The extinction coefficients of cytochrome a and cytochrome a<sub>3</sub>. *Biochim Biophys Acta* 1966; 118: 36–46
- Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* 1999; 283: 1476–1481
- Guarente L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins?. *Cell* 2008; 132: 171–176
- Habano W, Nakamura S, Sugai T. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. *Oncogene* 1998; 17: 1931–1937
- Habano W, Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000; 118: 835–841
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70
- Haywood S. The non-random distribution of copper within the liver of rats. *Br J Nutr* 1981; 45: 295–300
- Helling S, Vogt S, Rhiel A, Ramzan R, Wen L, Marcus K, Kadenbach B. Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase“. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1714–1724
- Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186–202
- Højlund K, Mogensen M, Sahlin K, Beck-Nielsen H. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008; 37: 713–731
- Holt I, Harding JAE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717–719

- Holt I, Harding JAE, Petty, RK, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 428–433
- Hüttemann M, Kadenbach B, Grossman LI. Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene* 2001; 267: 111–123
- Hüttemann, M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr* 2008; 40: 445–456
- Ikeguchi M, Ueta T, Yamane Y, Hirooka Y, Kaibara N. Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3131–3136
- Jaksch M, Hofmann S, Kleinle S, Liechti-Gallati S, Pongratz DE, Müller-Höcker J, Jedele KB, Meitinger T, Gerbitz KD. A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with cytochrome c oxidase (COX) deficiency shows tRNA(Ser)(UCN) mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy. *J Med Genet* 1998; 35: 895–900
- Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1996; 14: 146–151
- Kadenbach B, Hüttemann M, Arnold S, Lee I, Bender E. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 211–221
- Kallis YN, Alison MR, Forbes SJ. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut* 2007; 56: 716–724
- Keightley JA, Hoffbuhr KC, Burton MD, Salas VM, Johnston WS, Penn AM, Buist NR, Kennaway NG. A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nat Genet* 1996; 12: 410–416
- Kiernan F. The Anatomy and Physiology of the Liver. *Philos Trans R Soc London* 1833; 123: 711–770

- Kim KM, Shibata D. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene* 2002; 21: 5441–5449
- Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, Swenson ES, Barendswaard E, Theise ND. The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 2008; 47: 1994–2002
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229–1234
- Larsson, NG, Oldfors A, Garman JD, Barsh JS, Clayton DA. Down-Regulation of Mitochondrial Transcription Factor a During Spermatogenesis in Humans. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 185–1991
- Lecrenier N, Foury F. New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* 2000; 246: 37–48
- Lewis MR, Lewis WH. Mitochondria (and Other Cytoplasmic Structures) in Tissue Cultures. *Amer J Anat* 1915; 17: 339–401
- Lin WR, Lim SN, McDonald SAC, Graham T, Wright VL, Peplow CL, Humphries A. The histogenesis of regenerative nodules in human liver cirrhosis. *Hepatology* 2010; 51: 1017–1026
- Ling F, Shibata T. Recombination-dependent mtDNA partitioning: in vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *EMBO J* 2002; 21: 4730–4740
- Ling F, Shibata T. Mhr1p-dependent Concatemeric Mitochondrial DNA Formation for Generating Yeast Mitochondrial Homoplasmic Cells. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 310–322
- Liu P, Demple B. DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought?. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51: 417–426
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907–1917
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Eng J Med* 2008; 359: 378–390

- Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicol Pathol* 2005; 33: 27–34
- Maleszka R, Skelly PJ, Clark-Walker GD. Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J* 1991; 10: 3923–3929
- Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Sem Cell Dev Biol* 2002; 13: 425–431
- Mandemakers W, Morais VA, De Strooper B. A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *J Cell Sci* 2007; 120: 1707–1716
- Manfredi G, Schon EA, Moraes CT, Bonilla E, Berry GT, Sladky JT, DiMauro S. A new mutation associated with MELAS is located in a mitochondrial DNA polypeptide-coding gene. *Neuromuscul Disord* 1995; 5: 391–398
- Matsumoto T, Kawakami M. The unit-concept of hepatic parenchyma--a re-examination based on angioarchitectural studies. *Acta Pathol Jpn* 1982; 32: 85–314
- May-Panloup P, Chretien MF, Malthiery Y, Reynier P. Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007; 77: 51–83
- McCuskey RS, Urbaschek R, McCuskey PA, Urbaschek B. In vivo microscopic observations of the responses of Kupffer cells and the hepatic microcirculation to *Mycobacterium bovis* BCG alone and in combination with endotoxin. *Infect Immun* 1983; 42: 362–367
- McDonald SAC, Greaves LC, Gutierrez-Gonzalez L, Rodriguez-Justo M, Deheragoda M, Leedham SJ, Taylor RW. Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 500–510
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell* 1997; 88: 287–298
- Muller, HJ. The Relation of Recombination to Mutational Advance. *Mutat Res* 1964; 106: 2–9
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 1981; 290: 470–474

- Oren R, Zajicek G, Maaravi Y, Kenet G, Karmely F, Hubert A, Raanani P, Arber N. Methimazole slows hepatocyte streaming in rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1433–1437
- Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 151: 1273–1280
- Pecina P, Houstková H, Hansíková H, Zeman J, Houstek J. Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res* 2004; 53: 213–223
- Poliakova IA, Zorov DB, Leřkina MI. Polarographic study of cell respiration in a tissue culture. *Tsitologija* 1983; 1: 162–167
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998; 20: 291–293
- Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110: 1001–1020
- Rand DM. The units of selection on mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Syst* 2001; 32: 415–448
- Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. Subdivision of Hexagonal Liver Lobules into a Structural and Functional Unit. Role in Hepatic Physiology and Pathology. *Anat Rec* 1954; 119: 11–33
- Richard SM, Bailliet G, Páez GL, Bianchi MS, Peltomäki P, Bianchi NO. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4231–4237
- Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6465–6467
- Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol* 1988; 136: 507–513
- Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 1999; 283: 1488–1493

- Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 1991; 196: 137–140
- Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1576: 1–14
- Scheffler IE. Molecular genetics of succinate:quinone oxidoreductase in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 60: 267–315
- Schimper AFW. Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot Ztg* 1883; 41: 105–160
- Schuenke M, Schulte E. Neck and Internal Organs (Thieme Atlas of Anatomy). Stuttgart: Thieme, 2010
- Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 2002; 347: 576–580
- Shay JW, Ishii S. Unexpected nonrandom mitochondrial DNA segregation in human cell hybrids. *Anticancer Res* 1990; 10: 279–284
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10771–10778
- Shitara H, Kaneda H, Sato A, Inoue K, Ogura A, Yonekawa H, Hayashi JI. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* 2000; 156: 1277–1284
- Smits P, Smeitink J, van den Heuvel L. Mitochondrial Translation and Beyond: Processes Implicated in Combined Oxidative Phosphorylation Deficiencies. *J Biomed Biotechnol* 2010; 24: 1–24
- Spikings EC, Alderson J, John JCS. Transmission of mitochondrial DNA following assisted reproduction and nuclear transfer. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 401 – 415
- Spradling AD, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414: 98–104

- Stacpoole PW, Barnes CL, Hurbanis MD, Cannon SL, Kerr DS. Treatment of congenital lactic acidosis with dichloroacetate. *Arch Dis Child* 1997; 77: 535–541
- Stanciu A, Cotuțiu C, Amălinei C. New data about ITO cells. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2002; 107: 235–239
- Stiburek L, Hansikova H, Tesarova M, Cerna L, Zeman J. Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res* 2006; 55: 27–41
- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Müller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?. *Nat Med* 1996; 2: 1361–1366
- Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2001; 34: 55–61
- Tang Y, Kitisin K, Jogunoori W, Li C, Deng CX, Mueller SC, Ressom HB. Progenitor/stem cells give rise to liver cancer due to aberrant TGF-beta and IL-6 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 2445–2450
- Thein E, Becker M, Anetzberger H, Hammer C, Messmer K. Direct assessment and distribution of regional portal blood flow in the pig by means of fluorescent microspheres. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1808–1816
- Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30: 1425–1433
- Thomas MB, Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2892–2899
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339–346
- Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M, Zeviani M. Identification of the Gene Encoding the Human Mitochondrial RNA Polymerase (h-mtRPOL) by Cyberscreening of the Expressed Sequence Tags Database. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 615–625

- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 1995; 269: 1069–1074
- Tzanakakis ES, Hess DJ, Sielaff TD, Hu WS. Extracorporeal Tissue Engineered Liver-Assist Devices. *Annu Rev Biomed Eng* 2000; 2: 607–632
- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 145: 1421–1431
- Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8739–8746
- Wallace DC, Zheng XX, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, Epstein CM, Hopkins LC. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 1988; 55: 601–610
- Wallace DC. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51: 440–450
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897–901
- Warburg O. The Chemical Constitution of Respiration Ferment. *Science* 1928; 3: 4-17
- Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010; 29: 4989–5005
- Wiesner RJ, Rüegg JC, Morano I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 553–559
- Williams ED, Lowes AP, Williams D, Williams GT. A stem cell niche theory of intestinal crypt maintenance based on a study of somatic mutation in colonic mucosa. *Am J Pathol* 1992; 141: 773–776

- Xu B, Clayton DA. A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 580–589
- Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 514–519
- Yavorkovsky L, Lai E, Ilic Z, Sell S. Participation of small intraportal stem cells in the restitutive response of the liver to periportal necrosis induced by allyl alcohol. *Hepatology* 1995; 21: 1702–1712
- Yoneda M, Chomyn A, Martinuzzi A, Hurko O, Attardi G. Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11164–11168
- Zajicek G, Oren R, Weinreb M. The streaming liver. *Liver* 1985; 5: 293–300
- Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 201–204
- Zhen Y, Hoganson CW, Babcock GT, Ferguson-Miller S. Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase. I. Biochemical, spectral, and kinetic characterization of surface mutants in subunit ii of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome aa(3). *J Biol Chem* 1999; 274: 38032–38041
- Zhuo G, Feng G, Leng J, Yu L, Jiang Y. A 9-bp deletion homoplasmy in women with polycystic ovary syndrome revealed by mitochondrial genome-mutation screen. *Biochem Genet* 2010; 48: 157–163

## 9. Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit wäre ohne die Unterstützung einiger Mitarbeiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn nicht durchführbar gewesen. Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die dies ermöglicht haben.

Herrn Professor Dr. med. Reinhard Büttner gilt mein Dank für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und für die wissenschaftliche Betreuung.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Alexander C. Adam für die hervorragende Betreuung bedanken. Ich bin ihm für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die Unterstützung bei den Messungen und Versuchen, sowie für die Hilfestellung beim Verfassen dieser Arbeit sehr dankbar. Vielen Dank außerdem für die zügige, sorgfältige und konstruktive Durchsicht der Arbeit.

Bei Dagmar Kindler möchte ich mich ganz herzlich für ihre Hilfe während der Arbeit im Labor und die Beantwortung unzähliger Fragen bedanken.

Zum Schluss, aber nicht zuletzt bin ich meiner Familie und meinen Freunden großen Dank schuldig – zum einen für ihre stetige emotionale Unterstützung, zum anderen auch dafür, dass sie mir in arbeitsintensiven Zeiten immer wieder den Rücken freigehalten haben, sodass ich mich auf diese Arbeit konzentrieren konnte.