

**II. Medizinische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Charakterisierung der Funktion der transaktivierenden
NF- κ B Untereinheit RelA/p65 in der Leberregeneration nach
partieller Hepatektomie in der Maus**

Marc Ringelhan

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. F. K. Geisler
2. Univ.-Prof. Dr. J. H. Kleeff

Die Dissertation wurde am 27.03.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.04.2013 angenommen.

Für meine Eltern und Verena

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie der Leber	2
1.2 Mythologie und Geschichte der Leberregeneration	3
1.3 Bedeutung der Leberregeneration in der Klinik.....	5
1.4 Molekulare Mechanismen der Leberregeneration im Tiermodell	8
1.4.1 Drei-Phasen-Modell der Leberregeneration nach PHx	9
1.4.2 NF- κ B (nuclear factor „ κ -light-chain-enhancer“ of activated B-cells).....	11
1.4.3 NF- κ B in der Leberregeneration	13
2 Zielsetzung:	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Material.....	17
3.1.1 Allgemeine Substanzen und Materialien.....	17
3.1.2 Chemikalien	17
3.1.3 Antikörper	19
3.1.4 Kits	20
3.1.5 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide	20
3.1.6 Tierexperimentelle Materialien und Anästhetika	21
3.1.7 Tierexperimentelle Instrumente und Geräte.....	21
3.1.8 Allgemeine Geräte	21
3.2 Tierexperimentelle Methoden.....	23
3.2.1 Allgemeine Haltungsbedingungen	23
3.2.2 Mauslinien	23
3.2.3 Partielle Hepatektomie	24
3.2.4 Erweiterte 80%-PHx.....	28
3.2.5 Intraperitoneale (i.p.) Injektion.....	28
3.2.1 Sektion der Mäuse und Organentnahme	30
3.2.2 Bestimmung der Lebermasse und Berechnung der prozentualen Leberregeneration	30
3.2.3 Blutentnahme bei Mäusen	31

3.2.4	Serumchemie	31
3.2.5	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	31
3.3	Hepatozyten- und Kupffer-Zellisolierung	32
3.4	Genotypisierung der Mäuse	33
3.4.1	DNA-Isolation aus Mäuseschwänzen	33
3.4.2	PCR-Ansatz zur Detektion der Cre-katalysierenden Rekombinase.....	34
3.4.3	PCR-Ansatz zur Detektion RelA/p65-Lox Cre.....	34
3.4.4	Agarosegelelektrophorese	35
3.5	RNA-Extraktion aus Lebergewebe und quantitative Echtzeit-PCR	35
3.5.1	Reverse Transkription	36
3.5.2	Quantitative Echtzeit-PCR	37
3.6	Proteinextraktion und Western-Blot-Analysen.....	38
3.6.1	Ganzzellextrakte aus Lebergewebe	38
3.6.2	Ganzzellextrakte nach Kupffer-Zell-Isolierung	38
3.6.3	Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE	38
3.6.4	Natriumdodecylsulphat (SDS) – Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	40
3.6.5	Western-Blot	41
3.6.6	Immunologische Detektion der zu untersuchenden Proteine.....	41
3.7	Histologische Methoden	42
3.7.1	Prozessierung von Gewebe für Gefrierschnitte (Kryos).....	42
3.7.2	Prozessierung von Gewebe für die Paraffinhistologie	42
3.7.3	Hämatoxylin-Eosin (HE)- Färbung	42
3.7.4	BrdU (Bromodeoxyuridin)- Immunhistochemie	43
3.7.5	TUNEL - Immunhistologie	44
3.7.6	RelA/p65-Immunhistologie	45
3.8	Auswertung und Statistik.....	45
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Die Hepatozyten-spezifische Deletion von RelA/p65 in <i>Rela^{F/F}AlbCre</i> - Mäusen führt nicht zu vermehrtem Zellschaden nach 2/3-PHx	47
4.2	<i>Rela^{F/F}AlbCre</i> -Mäuse zeigen einen beschleunigten Zellzykluseintritt nach PHx.....	49
4.3	PHx-induzierte Zytokinantwort nach Hepatozyten-spezifischer	

Inaktivierung von RelA/p65 in <i>Rela^{F/F} AlbCre</i> -Mäusen.	52
4.4 Normale Regeneration der Lebermasse nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 nach PHx	55
4.5 Eine erweiterte Hepatektomie (80%-PHx) führt nicht zu vermehrter Zellschädigung oder verminderter Leberregeneration nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65.	56
4.6 Die Genetische Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen, einschließlich der Kupffer-Zellen in <i>Rela^{F/F} MxCre</i> -Mäusen beeinträchtigt eine NF-κB abhängige Zytokinantwort.	58
4.7 Die Deletion von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in <i>Rela^{F/F} MxCre</i> -Mäusen führt zu keiner erhöhten Leberzellschädigung nach 2/3-PHx.	60
4.8 Normaler Zellzykluseintritt nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in den <i>Rela^{F/F} MxCre</i> -Mäusen	62
4.9 Fehlende intrahepatische Zytokinantwort nach Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen in <i>Rela^{F/F} MxCre</i> - Mäusen nach PHx.	65
4.10 Ungestörte Regeneration der Lebermasse nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in <i>Rela^{F/F} MxCre</i> -Mäusen nach PHx.	67
5 Diskussion	68
6 Zusammenfassung	76
7 Literaturverzeichnis.....	78
8 Danksagung.....	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prometheus und Tityos	4
Abbildung 2: Hypothetisches Drei-Phasen-Modell der Leberregeneration	10
Abbildung 3: Aufbau der Geräte für die partielle Hepatektomie	25
Abbildung 4: OP-Besteck für die partielle Hepatektomie	25
Abbildung 5: Partielle 2/3-Hepatektomie.....	26
Abbildung 6: Erweiterte 80%-Hepatektomie.....	28
Abbildung 7: ALT-, AST- und Bilirubin-Serumchemiewerte in <i>Rela^{F/F}AlbCre</i> - und <i>Rela^{F/F}</i> -Kontrollmäusen nach PHx.	48
Abbildung 8: <i>Rela^{F/F}AlbCre</i> -Mäuse weisen keine erhöhte Apoptoserate nach PHx im Vergleich zu TNF-Injektion auf.....	49
Abbildung 9: <i>Rela^{F/F}AlbCre</i> -Mäuse zeigen einen beschleunigten Zellzykluseintritt nach PHx.....	50
Abbildung 10: Beschleunigter Zellzykluseintritt mit veränderter Expression Zellzyklus-assoziiertes Proteine in <i>Rela^{F/F}AlbCre</i> -Mäusen nach PHx.	52
Abbildung 11: <i>Rela^{F/F}AlbCre</i> -Mäuse zeigen im Vergleich zu Kontrollmäusen eine unauffällige Zytokinantwort.	54
Abbildung 12: Die Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten führt zu einer verstärkten Aktivierung von STAT3 und JNK nach PHx.	55
Abbildung 13: Normale Regeneration der Lebermasse nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 nach PHx.....	56
Abbildung 14: Ungestörte Regenerationsfähigkeit der Leber nach erweiterter 80%-PHx nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65.	57
Abbildung 15: Verminderte NF-κB abhängigen Zytokinantwort nach genetische Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen, einschließlich der Kupffer-Zellen.	60
Abbildung 16: Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in <i>Rela^{F/F}MxCre</i> -Mäusen führt nicht zu gesteigerter Apoptose nach PHx.....	62
Abbildung 17: Ungestörter Zellzykluseintritt und –progression nach Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen in <i>Rela^{F/F}MxCre</i> - Mäusen nach PHx.	64
Abbildung 18: Fehlende intrahepatische Zytokinantwort in <i>Rela^{F/F}MxCre</i> -Mäusen nach PHx.....	66

Abbildung 19: Ungestörte Leberregeneration nach Inaktivierung von RelA/p65 in
Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen nach PHx. 67

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cre	Cyclization Recombination
d	Tag(e) (<i>day</i>)
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
et al.	Et alii (latein „und andere“)
Fa.	Firma
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde(n), (hour)
H ₂ O	Wasser, aqua
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämosin Eosin
IHC	Immunhistochemie
I-κB	Inhibitorisches κB-Protein
IKK-Komplex	Inhibitorischer κB-Kinase-Komplex
IL-6	Interleukin 6
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm

min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	(Messenger) Boten-Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NF-κB	Nuclear faktor of kappa light chain enhancer in B-cells
OD	Optische Dichte
p.a.	Per analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHx	Partielle Hepatektomie
pIC /Poly(I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RT	Reverse Transkriptase bzw. Raumtemperatur
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
T	Thymin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt

1 Einleitung

Die Leber ist das größte innere Organ im menschlichen Körper und erfüllt viele verschiedene essentielle Funktionen zur Aufrechterhaltung der Homöostase des gesamten Organismus. Die Leber besitzt sowohl exokrine als auch endokrine Sekretionsfunktionen und ist das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers als Speicher- und Syntheseort für Glukose, Fette und Vitamine. Außerdem ist sie der zentrale Syntheseort von Plasmaproteinen und dient der Entgiftung des Körpers durch Abbau und Ausscheidung von Giftstoffen und Stoffwechselendprodukten (McCuskey, 2012).

Um diese lebensnotwendigen Aufgaben erfüllen zu können, besitzt die Leber nicht nur große funktionelle Reserven, sondern verfügt darüber hinaus über eine außergewöhnliche Regenerationsfähigkeit. So kann beim Menschen nach Resektion von Lebergewebe innerhalb weniger Wochen die vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Lebergröße und -funktion beobachtet werden (Fausto, 2001). Beim klassischen Tiermodell der partiellen Hepatektomie (PHx) der Ratte oder der Maus kommt es nach Resektion von zwei Dritteln des Lebergewebes zu einer nahezu vollständigen Regeneration der Gewebemasse innerhalb von einer Woche. Dieser Regenerationsprozess ist durch eine kompensatorische Hyperplasie der reifen, voll differenzierten, ruhenden Leberparenchymzellen (Hepatozyten) gekennzeichnet (Fausto et al., 2006; Michalopoulos, 2007; Taub, 2004). Diese einzigartige Regenerationsfähigkeit der Leber ist in der Humanmedizin zum Beispiel nach Leberresektionen oder auch nach akuten oder chronischen Schäden von großer Bedeutung. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, welche die Leberregeneration steuern, ist essentiell, um bestehende Therapien nach verschiedenen Schädigungen des Organs zu erweitern und neue Therapieansätze zu entwickeln. Insbesondere die Identifizierung von intra- und extrazellulären Signalen und Signalwegen, welche die Zellteilung der ruhenden Hepatozyten steuern, sind daher schon lange Gegenstand intensiver Forschung. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Prozesse, wie metabolische Stimuli, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, aber auch ein Zytokinnetzwerk beschrieben, welche die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie steuern. Aus diesen Ergebnissen ist ein hypothetisches Drei-Phasen-Modell der Leberregeneration entstanden: In diesem Modell folgt auf eine Initiierungsphase (Phase 1), in der die Hepatozyten zur Regeneration angeregt werden, die eigentliche Phase der Zellteilung (Phase 2), wobei in Phase 3 der Regenerationsprozess kontrolliert terminiert wird (Fausto, 2000; Taub, 2004). Bereits vor mehr als 15 Jahren

wurde erstmals die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, bestehend aus den NF- κ B Untereinheiten RelA/p65 und p50, als frühes intrazelluläres Ereignis nach PHx beschrieben (Cressman et al., 1994). Der NF- κ B Signalweg steuert als Transkriptionsfaktor so entscheidende Prozesse wie Entzündung, Entwicklung, Proliferation und Apoptose durch die Regulation seiner Zielgene (Ghosh et al., 1998; Karin et al., 2005). Trotz vieler weiterführender Untersuchungen ist die Rolle von NF- κ B in der Leberregeneration nach PHx bis heute widersprüchlich. In frühen Studien wurde eine essentielle Funktion von NF- κ B in den Hepatozyten für die Proliferation nach PHx beschrieben (Iimuro et al., 1998; Yamada et al., 1998). Daneben entwickelte sich die Hypothese einer vor allem zytoprotektiven Funktion von NF- κ B in Hepatozyten (Chaisson, 2002; Iimuro, et al., 1998; Yang et al., 2005), wobei NF- κ B eine essentielle Rolle in Nicht-Parenchymzellen für die Initiierung der Leberregeneration durch Steuerung einer Zytokinantwort zugeschrieben wird (Maeda et al., 2005; Yang, et al., 2005).

In vorliegender Arbeit wurden in einem genetischen Ansatz zwei Mausmodelle benutzt, in denen die transaktivierende NF- κ B Untereinheit RelA/p65 entweder spezifisch in Hepatozyten (*Rela^{F/F}AlbCre*-Mauslinie) oder aber in allen Leberzellen inklusive Nicht-Parenchymzellen (*Rela^{F/F}MxCre*-Mauslinie) inaktiviert werden kann, um mit diesem genetischen Ansatz die widersprüchliche Datenlage zur zellspezifischen Rolle von NF- κ B in der Leberregeneration nach PHx zu klären.

1.1 Anatomie der Leber

Die menschliche Leber wird funktionell nach der Aufteilung der Pfortader in acht Lebersegmente eingeteilt. Die Mikroarchitektur kann morphologisch als polygonales Zentralvenen-Läppchen mit einer Zentralvene als Mittelpunkt und jeweils einer Glisson-Trias (Pfortader-, Arterien- und Gallengangsast) in den äußeren Ecken beschrieben werden. Daneben bestehen einige funktionelle Einteilungen der Mikroarchitektur der Leber. Ein funktionelles Modell stellt der Leber-Azinus dar. Dieser hat einen Portaltrakt als Achse, der auf die Zentralvene zuläuft. Dieses Modell teilt nach dem Nährstoff- und Sauerstoffgradienten von der Basis zur Peripherie die Azini in drei funktionelle Zonen ein (Zone I-III) (Rappaport, 1973).

Die Hepatozyten als Parenchymzellen der Leber machen mit etwa 80% aller Leberzellen die Hauptmasse des Organvolumens aus und erfüllen die meisten der verschiedenen leberspezifischen Funktionen. Als epitheliale Zellen besitzen sie eine

klare Polarisation und sind in Strängen angeordnet. Sie formen mit ihrer basalen Oberfläche zusammen mit den Endothelzellen den sogenannten Disse-Raum. Hier erfolgt der Austausch von Stoffen zwischen den Hepatozyten und dem Blutplasma. Die apikale Oberfläche zwischen den Hepatozytensträngen bilden die Gallengangskanalikuli, in welche die gebildete Galle sezerniert wird und von dort in die Gallengänge abgeleitet wird (McCuskey, 2012). Hepatozyten besitzen häufig zwei Zellkerne mit mehreren prominenten Nucleoli. Manche Nuclei sind zusätzlich noch polyploid und dann auch proportional größer als andere. Ursächlich hierfür wird eine rekurrende toxische Schädigung diskutiert (Anatskaya et al., 1994). Die Veränderungen sind aber möglicherweise auch einfach nur Ausdruck der hohen Anforderungen an die Syntheseleistung der Hepatozyten (Vinogradov et al., 2001).

Die restliche Lebermasse wird vor allem durch die im sinusoidalen Raum gelegenen Nicht-Parenchymzellen (Kupffer-, Stern-, Pit- und Endothelzellen) gebildet. Kupffer-Zellen sind ungleichmäßig geformte Gewebsmakrophagen und liegen luminal der Wand der Sinusoide an. Sie phagozytieren Stoffe und Pathogene aus dem Blut, sezernieren Mediatoren und toxische Stoffe, die der Abwehr und Gewebsintegrität dienen (Wisse et al., 1996). Die sinusoidalen Endothelzellen bilden das fenestrierte Endothel hin zum Disse-Raum (Blouin et al., 1977). Sie haben verschiedene sekretorische Funktionen (Sekretion von u.a. Interleukin-1, Interleukin-6 und Prostaglandinen) und erfüllen ebenso eine wichtige Rolle bei Immunabwehr und verschiedenen pathophysiologischen Zuständen (van Oosten et al., 1995). Stern-Zellen (auch Stellate- oder Ito-Zellen genannt) befinden sich im Disse-Raum und speichern fettlösliche Vitamine. Sie haben eine wichtige Funktion in der Regulation des Blutflusses in den Sinusoiden und spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Leberzirrhose als Hauptsynthesequelle von Kollagen (Gressner, 1994; Rockey, 2001).

1.2 Mythologie und Geschichte der Leberregeneration

Die außergewöhnliche Fähigkeit der Leber zur Regeneration ist schon lange bekannt. Häufig wird in diesem Zusammenhang auch die griechische Mythologie mit der Bestrafung des Prometheus zitiert. Als Prometheus das Feuer des Olymp gestohlen und den Menschen gebracht hatte, ließ Zeus ihn an das Atlasgebirge fesseln und ein Adler verzehrte jeden Tag einen Teil seiner Leber als Bestrafung. Die Leber des unsterblichen Titan wuchs jede Nacht nach, und die Bestrafung konnte sich wiederholen bis Prometheus durch Heracles befreit wurde (Aeschylus, 1990) (Abbildung 1,

linkes Bild). Als zweites, weniger geläufiges Beispiel aus der griechischen Mythologie ist die Bestrafung des Sünders Tityos, einem Sohn des Zeus mit Elara zu nennen. Der erdgeborene Riese Tityos wurde, nachdem er versucht hatte, die schöne Leto zu vergewaltigen, von deren Kindern Apollon und Artemis überwältigt und zur Bestrafung in den Tartaros verbannt. Dort fressen seither zwei Geier an seiner stets nachwachsenden Leber (Abbildung 1, rechtes Bild) (Tiniakos et al., 2010). Es besteht jedoch reger Diskurs darüber, ob diese Sagen medizingeschichtlich auf tatsächliches Wissen der alten Griechen über die Regenerationsfähigkeit der Leber hindeuten (Chen et al., 1994), oder doch eher im übertragenen Kontext zu bewerten sind (Power et al., 2008). Trotz dieser aus dem heutigen wissenschaftlichen Kenntnisstand prinzipiell richtigen Beschreibungen der Regenerationsfähigkeit der Leber gibt es keinen Beweis für eine Kenntnis der alten Griechen über die Leberregeneration. Vielmehr ist medizingeschichtlich die Fähigkeit der Leber zur Regeneration erst seit einem Jahrhundert wissenschaftlich belegt (Power, et al., 2008; Tiniakos, et al., 2010).



Abbildung 1: Prometheus und Tityos

Linkes Bild: „Prometheus Bound“ von Peter Paul Rubens 1618 (Philadelphia Museum of Art). Rechtes Bild: „Tityos“ by Tiziano Vecellio (Tizian) 1548-1549 (Madrid, Museo del Prado, Deckengemälde aus Schloß Binche (Flandern), vor 1566 transferiert).

Einen Meilenstein zur Erforschung der Leberregeneration erbrachte das von Higgins und Anderson 1931 an Ratten etablierte 2/3-Hepatektomiemodell. Die Resektion erfolgte in diesem Modell mittels einer einzigen Ligatur um den gemeinsamen Ursprung zweier Leberlappen. Hier konnte nach Resektion des Mittellappens (ML) und

des linken Leberlappens (LLL), die gemeinsam rund 70% des Lebergewebes bei Ratten ausmachen, eine komplikationslose Leberregeneration durch das verbleibende Gewebe innerhalb von 7-14 Tage gezeigt werden (Higgins, 1931). Dies war ein großer Fortschritt, da es hier im Vergleich zu chemischen Hepatotoxinen wie zum Beispiel dem Kohlenstofftetrachlorid (CCl_4) zu keiner größeren Gewebsschädigung oder Entzündung des verbleibenden Gewebes kommt (Michalopoulos et al., 1997).

1.3 Bedeutung der Leberregeneration in der Klinik

Lebererkrankungen weisen weltweit eine steigende Prävalenz auf, stellen eine häufige Todesursache dar und verursachen hohe finanzielle und soziale Kosten (Rockey et al., 2012). Vom klinischen Standpunkt ist daher das Verständnis der molekularen Mechanismen der Leberregeneration von großem Interesse, um neue Therapiestrategien bei akuten und chronischen Lebererkrankungen zu entwickeln.

Ähnlich wie bei Maus oder Ratte kommt es beim Menschen in den ersten 7 Tagen nach Resektion von Lebergewebe zu einer massiven Proliferation des restlichen Lebergewebes. Hier scheint die Regeneration denselben Mechanismen wie im Tiermodell zu folgen, auch wenn beim Menschen die Ausgangsgröße der Leber erst ein bis drei Monate nach Resektion erreicht wird (Fausto, 2001). Somit sind Erkenntnisse aus den PHx-Tiermodellen grundlegend zur Entwicklung gezielter Therapiestrategien, um häufige Komplikationen wie das Leberversagen nach großen Verlusten an Leberorganmasse in Zukunft verhindern oder besser beherrschen zu können. Nicht nur nach Traumata oder Resektion, sondern auch nach infektiösen und toxischen Leberschäden tritt eine kompensatorische Hyperplasie des verbleibenden Lebergewebes auf und kann so den Verlust an Organmasse und Funktion wieder ausgleichen. Wenn der Leberzelluntergang oder der absolute Organverlust die Kompensationsmechanismen der Leber übersteigt, kommt es zu einem sogenannten Leberversagen. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der Leber betreffen die Symptome den gesamten Organismus. Häufig sind erst im fortgeschrittenen Stadium oder bei rasch progredienten und fulminant verlaufenden Erkrankungen Symptome zu verzeichnen (Bernal et al., 2010; Sass et al., 2003). Neben einer Störungen der Stoffwechsellleistungen, einer insuffizienten Syntheseleistung mit gestörter plasmatischer Gerinnung und Störung des kolloidosmotischen Drucks kann im fortgeschrittenen Stadium vor allem auch die mangelnde Entgiftungsfunktion der Leber zu schwerwiegenden Symptomen mit Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie führen (McPhail et

al., 2010).

Dies stellt zum Beispiel auch eine Grenze der Resektabilität von benignen und malignen Lebertumoren oder von Lebermetastasen dar. Die Resektion stellt eine maßgebliche Therapieoption dar und kann zum Beispiel beim limitiert hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinom bei ausreichendem, nicht-zirrhosischen Leberrestparenchym mit kurativer Intention erfolgen (Song et al., 2005). Hier kann eine deutliche Prognoseverbesserung im Vergleich zur alleinigen chemotherapeutischen Therapie mit einem durchschnittlichen 5-Jahres-Überleben bei einem Drittel der Patienten erreicht werden. (Fong et al., 1999). Grenzen der Resektabilität sind jedoch das benötigte Restvolumen (kritische Masse) und die Regenerationsfähigkeit der Leber, mit der Komplikation eines sogenannten Post-Hepatektomie-Leberversagens (Garcea et al., 2009). Auch im Tiermodell zeigt sich diese Grenze bei Resektionen von über 70% der Lebermasse mit einer gestörten Regenerationsfähigkeit der im Verhältnis zur Körper-Masse zu kleinen Restleber und konsekutiv deutlich erhöhter Mortalität (Cataldegirmen et al., 2005).

Andere chronische oder akute Schädigungen der Leber treten beispielsweise im Rahmen von Infektionen (u.a. Virushepatitiden, hepatotrope Viren oder Bakterien, Parabiosen), toxischen Schäden (u.a. Alkohol, Acetaminophen, Halothan, Mykotoxine), autoimmunen Erkrankungen (u.a. Autoimmunhepatitis, primär sklerosierende Cholangitis) und metabolischen hereditären Erkrankungen (u.a. Hämochromatose, M. Wilson, α 1-Antytrypsinmangel, zystische Fibrose) auf. Die resultierenden Leberschäden können nach akutem Verlauf entweder völlig ausheilen, nach fulminantem Verlauf in ein akutes Leberversagen gipfeln, oder in einem chronischen Leberschaden mit Ausbildung einer Leberzirrhose enden. Eine Leberzirrhose ist durch eine Aufhebung der Leberarchitektur, Akkumulation von extrazellulärer Matrix (Fibrogenese) und Funktionsverlust der Leber als gemeinsame Endstrecke vieler akuter oder chronischer Leberschädigung gekennzeichnet. Anfangs sind bis zu 40% der Patienten mit histologisch nachweisbarer Zirrhose klinisch asymptomatisch. Das Fortschreiten dieser Erkrankung ist jedoch mit einer 5-Jahres-Mortalität von über 50% vergesellschaftet (Rockey, et al., 2012). Hier verliert die Leber die Fähigkeit zur Regeneration und die Hepatozyten scheinen ihre proliferative Kapazität eingebüßt zu haben. Dagegen sprechen die Ergebnisse serieller Transplantationen von Maushepatozyten (Overturf et al., 1999), die zeigen, dass sich Hepatozyten mehr als 80-mal teilen können. Aufgrund der mangelnden Regenerationsfähigkeit und des Funktionsverlust

des körpereigenen Lebergewebes im Rahmen der Leberzirrhose stellt, ebenso wie bei einem akuten Leberversagen, die Lebertransplantation die einzige rettende Option dar. Extrakorporale Leberersatzverfahren, wie die Albumin-Dialyse MARS (*Molecular Adsorbent Recirculation System*) und SPAD (*Single-Pass Albumin Dialysis*), oder durch Prometheus® mit einer Albumin-Separationsmembran (fraktionierte Plasmaseparation und -absorption), werden nur innerhalb von Therapiestudien verwendet und können die Behandlungslücke bis zu einer evtl. Lebertransplantation bei diesen Patienten bisher nicht füllen (Karvellas et al., 2007; Rademacher et al., 2011). Die unausweichliche Lebertransplantation in dieser Patientengruppe und der Spenderorganmangel stellen jedoch ein großes Dilemma dar. Neue Transplantationsverfahren sind daher etabliert worden, die sich die einzigartige Fähigkeit der Leber zur Regeneration zu Nutze machen. Bei der Leberteiltransplantation (*split liver*) wird ein Leichen-Spenderorgan für zwei Empfänger verwendet (Emre et al., 2011). Die daraus resultierenden Erfahrungen ermöglichten die Lebendspende in der Lebertransplantation (Kawasaki et al., 1998; Yamazaki et al., 2010). Bei diesen beiden Lebertransplantationsverfahren kann das nach Transplantation im Verhältnis zum Körper des Empfängers zu kleine Organ durch kompensatorische Hyperplasie die Organgröße an die Bedürfnisse des Organismus anpassen. Es bestehen jedoch Grenzen der Regenerationsfähigkeit bei verhältnismäßig zu kleinen Lebertransplantaten (unter 0,8 – 1% des Körpergewichts) (Fausto et al., 2005). So besteht bei zu kleinen Transplantaten wie z.B. nach erweiterter Resektion (>70%) eine Störung oder gar Unfähigkeit zur Regeneration und es kommt zu einem sogenannten *small for size-Syndrom*“ (SFSS), mit den Symptomen des Leberversagens und hoher Mortalität (Dahm et al., 2005). Neben der Organgröße mit mangelnder Organfunktion im Verhältnis zum Körpergewicht scheinen dabei eine portale Hyperperfusion und andere pathologische Gefäß- und Mikroarchitekturveränderungen ursächlich zu sein (Gruttadauria, 2010).

Kann man durch bestimmte Proliferationsreize in Patienten mit Leberzirrhose die Leberfunktion wiederherstellen? Kann die Leberregeneration in Patienten nach erweiterter Resektion oder nach Leberteiltransplantation durch bestimmte Proliferationsreize angestoßen und verbessert werden? Hierfür ist die Entwicklung neuer, frühzeitiger z.B. pharmakologischer Therapiestrategien, die auf die Regenerationsfähigkeit der noch unbeschädigten Hepatozyten abzielt, wünschenswert. Da der Einfluss pharmakologischer Substanzen in der Regel nicht zellspezifisch ist, ist das Wissen

um die Funktion des zu modulierenden Faktors in den einzelnen Zellen unabdingbar. Viele auch bei Patienten nach Lebertransplantation eingesetzte pharmakologische Substanzen haben einen inhibitorischen Einfluss auf die NF- κ B Aktivität in verschiedenen Zellen (z.B. Cyclosporin A, Glukokortikoide, PDTC, Sulfasalazin oder Deoxypergualin). Da eine Vielzahl von proinflammatorischen Stimuli NF- κ B-abhängig reguliert wird, ist der inhibitorische Effekt dieser Substanzen auf die NF- κ B-Aktivierung in Zellen des Immunsystems im Fall einer Hyperinflammation wünschenswert. Allerdings kann die unspezifische Hemmung in anderen Zellen auch eine Reihe deletärer Folgen haben. Diese Arbeit soll daher Grundlagen zum zellspezifischen molekularen Verständnis von NF- κ B in der Leberregeneration und zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte beitragen.

1.4 Molekulare Mechanismen der Leberregeneration im Tiermodell

Durch Standardisierung der partiellen Hepatektomie (PHx) bei der Ratte und Anwendung dieser Methode bei der Maus steht eine gut reproduzierbare Methode zur Erforschung der molekularen Mechanismen der Leberregeneration zur Verfügung. Gerade durch die Anwendung der PHx an zahlreichen verschiedenen genetisch veränderten Mausmodellen konnten in den letzten 20 Jahren verschiedene Signalwege, welche die Leberregeneration steuern, charakterisiert werden (Cressman, et al., 1994; Fausto, et al., 2006; Michalopoulos, 2010; Taub, 2004). Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass die PHx an Mäusen bisher größtenteils nicht standardisiert durchgeführt wurde und die unterschiedliche Anatomie in der Maus im Vergleich zur Ratte nicht ausreichend berücksichtigt wurde. Dies führte zu teils uneinheitlichen Ergebnissen in der aktuellen Literatur. Die durch eine einzelne Ligatur beschriebene PHx bei Ratten (Higgins, 1931) kann aufgrund der unterschiedlichen Anatomie nicht ohne weiteres direkt auf die Maus übertragen werden. So besitzen Mäuse im Vergleich zu Ratten eine Gallenblase. Durch Massenligatur mit nur einer Ligatur (in Analogie zur Ratte) und Resektion von linkem Leberlappen und den Mittel-lappen inkl. Gallenblase kommt es bei der Maus häufig zu venöser Stauung mit Stauungsnekrosen oder Cholestase mit Galleninfarkten und begleitender Inflammation. Somit können involvierte molekulare Prozesse und auch die Leberregenerationsfähigkeit selbst beeinträchtigt sein. Bestrebungen, die technisch schwierige PHx bei Mäusen mit mehreren separaten Ligaturen als Modell zur Erforschung der Leberregeneration zu standardisieren, sind erst kürzlich unternommen worden (Greene et al.,

2003; Martins et al., 2008; Mitchell et al., 2008), finden jedoch noch keine einheitliche Anwendung. Darüber hinaus ist eine komplikationslose, reproduzierbare PHx bei Mäusen nur durch einen geübten Einsatz von mikrochirurgischen Techniken möglich (Martins, et al., 2008).

1.4.1 Drei-Phasen-Modell der Leberregeneration nach PHx

Anders als bei den meisten anderen Organen sind in der Leber organeigene, stammzellartige Progenitorzellen nach PHx nicht an der Regeneration beteiligt. Die Leber erfüllt diese regenerative Leistung durch eine kompensatorische Hyperplasie der voll differenzierten Zellpopulationen im verbleibenden Restgewebe nach PHx mit konsekutiver Vergrößerung der Restleber (Michalopoulos, et al., 1997). Dabei treten normalerweise ruhende, voll differenzierte Hepatozyten in den Zellzyklus ein, und kehren nach einem bis zwei Zellteilungszyklen wieder in die Ruhephase (G₀-Phase) zurück (Sandgren et al., 1991). Die Zellteilung der restlichen Nicht-Parenchymzellen des Lebergewebes folgt den Hepatozyten mit einigen Stunden Latenz. Dieser Prozess zur Wiederherstellung der Lebermasse und Funktion kann wiederholt erfolgen und ist streng reguliert (Fausto, 2001). Nur wenn die regenerative Kapazität der Hepatozyten nach PHx gestört ist, können auch stammzellartige Zellen (*oval cells*) proliferieren. Diese *oval cells* befinden sich im Übergangsbereich der kleinen Äste der intrahepatischen Gallengänge zu den Gallengangskanalikuli (Heeringkanäle) und können sowohl zu Hepatozyten als auch Gallengängen differenzieren und so das geschädigte Lebergewebe regenerieren (Forbes et al., 2002).

Zahlreiche Zytokine, Transkriptionsfaktoren und metabolische Stimuli wurden in den letzten beiden Jahrzehnten identifiziert, welche die Leberregeneration nach PHx steuern und hieraus wurde ein hypothetisches, streng reguliertes Drei-Phasen-Modell abgeleitet. Demzufolge erfolgt in der Initiierungs- oder auch „*Priming*-Phase“ in den ersten 4-6 Stunden nach PHx eine Vorbereitung (*Priming*) der Hepatozyten auf den Eintritt in den Zellzyklus (Phase 1). Phase 2 beschreibt die Ereignisse vom Eintritt der Zellen in den Zellzyklus bis zur Phase 3, der Beendigung oder Terminierung der Zellteilungsereignisse (Fausto, et al., 2006; Michalopoulos, 2007). Gemäß diesem Modell erfolgt in der Initiierungsphase unter Einfluss von Zytokinen wie TNF oder IL-6 vornehmlich aus Nicht-Parenchymzellen eine rasche Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1, C/EBP β oder STAT3 als wichtige Ereignisse für ein *Priming* der Hepatozyten, welches die Hepatozyten maximal emp-

findlich für proliferative Stimuli machen soll. Darauf kommt es zu sequentiellen Veränderungen der Genexpression mit mehr als 70 aktivierten Genen in der Leber. Darunter sind in der Initiierungsphase die sogenannten *immediate early genes*, wie *c-fos*, *c-jun*, *junB*, *c-myc* und *delayed genes* wie *bcl-XL* (Fausto, 2000; Fausto, 2001; Taub, 1996). Dieses *Priming* soll zur Progression der Hepatozyten von der G0- in die G1-Phase des Zellzyklus führen. Ab hier beginnt eine Phase, in der die Hepatozyten maximal sensitiv für Wachstumsfaktoren wie dem hepatischen Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor, HGF), dem epithelialen Wachstumsfaktor (epithelial growth factor, EGF), dem transformierenden Wachstumsfaktor- α (transforming growth factor, TGF- α) oder Amphiregulin sind. Durch diese Faktoren wird ein Eintritt über den Restriktionspunkt in der G1-Phase in Richtung Synthesephase ermöglicht. Hier ist die Aktivierung der bekannten Zellzyklusgene und somit die Expression und Aktivierung der einzelnen Cycline (Cyclin D, E, A, C, B) sowie der Cyclin-abhängigen-Kinasen (Cdks) essentiell (Fausto, et al., 2006; Taub, 2004; Taub et al., 1999). Bei Mäusen liegt der Übertritt der meisten Hepatozyten von der G1- in die S-Phase zwischen 30 bis 36 Stunden nach PHx. Nach erfolgreicher kompensatorischer Hyperplasie folgt dann Phase 3 mit der Terminierung des Regenerationsprozesses. Hierbei ist vor allem TGF- β (*transforming growth factor- β*) (Michalopoulos, 2010) durch die Stimulation von u.a. p15, einem Inhibitor von CDK 2 und 4, aber auch activin A, einem Mitglied der TGF- β -Superfamilie (Oe et al., 2004) über die Aktivierung des Smad-Komplex als intrazellulärer Signaltransduktionsweg dieser Signale (Macias-Silva et al., 2002) in der Terminierungsphase der Leberregeneration beteiligt.

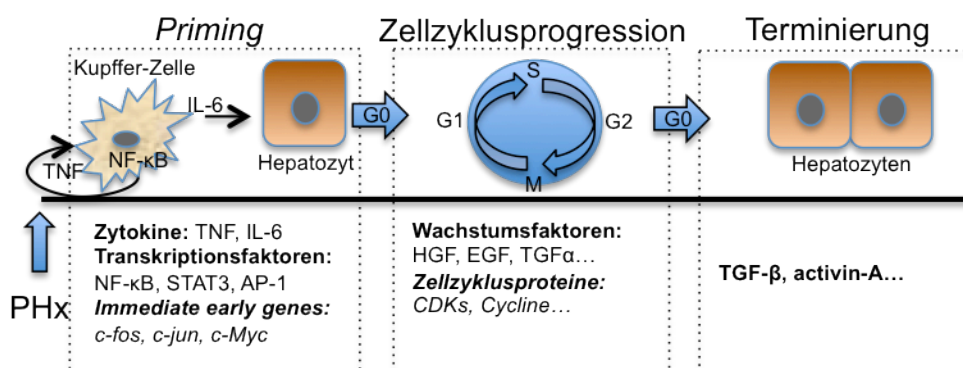


Abbildung 2: Hypothetisches Drei-Phasen-Modell der Leberregeneration

Quelle: Frei nach Fausto N. et al. (2006). Liver regeneration. *Hepatology*, 43 (2 Suppl 1), S45-53 und Nevzorova, Y. A., & Trautwein, C. (2012). Chapter 2 - Liver Regeneration, Zakim and Boyer's *Hepatology* (Sixth Edition) (pp. 20-35). Saint Louis: W.B. Saunders.

1.4.2 NF- κ B (nuclear factor „ κ -light-chain-enhancer“ of activated B-cells)

Frühe Untersuchungen der Leberregeneration an Maus und Ratte unterstützen die Hypothese eines Zytokinnetzwerkes in den ersten Stunden nach PHx, wobei der Aktivierung von NF- κ B dabei eine funktionell entscheidende Bedeutung beigemessen wurde (Cressman et al., 1996; Yamada et al., 1997).

Der NF- κ B/Rel Signalweg ist ein sehr schneller Aktivierungsmechanismus in verschiedenen Zellsystemen. Der Name dieses Transkriptionsfaktors leitet sich von der bei der Entdeckung beschriebenen Interaktion von NF- κ B mit einem spezifischen Abschnitt im Enhancer der Immunglobulinleichtketten des Typ κ in B-Lymphozyten nach Aktivierung ab (Sen et al., 1986). NF- κ B kommt in fast allen eukaryontischen Zellen vor und spielt eine zentrale Rolle u.a. in der Kontrolle von Infektionen, der Immunantwort, Zellproliferation und -differenzierung und von Apoptose durch die Regulation der Expression von Genen, die diese Prozesse steuern (Karin et al., 2002). Daneben ist eine fehlerhafte Aktivierung von NF- κ B mit vielen pathologischen Vorgängen, wie Infektionserkrankungen, Autoimmunerkrankungen und dem septischen Schock assoziiert (Chen et al., 2004; Ghosh et al., 2002; Ghosh, et al., 1998).

NF- κ B ist der Überbegriff für eine Familie von Transkriptionsfaktoren. Darunter sind beim Menschen mit NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (auch als p65 bezeichnet), RelB und c-Rel fünf bekannt, die nur als Hetero- oder Homodimere ihre Funktion entfalten. Alle diese Proteine besitzen die 300 Aminosäuren umfassende, hochkonservierte Rel Homologie-Domäne (RHD) in ihrem N-Terminus. Die RHD ist für DNA-Interaktion, die Dimerisierung und die Interaktion mit I κ B verantwortlich (siehe unten). Anhand der Fähigkeit, Zielgene durch eine transaktivierende Domäne (TAD) zu aktivieren, werden die einzelnen Proteine in zwei Klassen eingeteilt. Die zweite Klasse mit C-terminaler TAD umfasst die Proteine RelA/p65, RelB und c-Rel. In die erste Klasse gehören die Proteine p105 und p100, die durch ihre C-Terminushohen Ankyrin-*Repeats* auch inhibitorische Wirkung auf die NF- κ B-Aktivierung haben und durch Ubiquitin/ Proteasom -Degradation zu p50 und p52 prozessiert werden (Chen, et al., 2004; Ghosh, et al., 1998).

Die Aktivität von NF- κ B wird streng reguliert durch die Interaktion mit multiplen Ankyrin-*Repeat*-Motiven einer inhibitorischen Proteinfamilie, den I κ B-Proteinen (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ und Bcl-3). In den meisten ruhenden Zellen ist NF- κ B im Zytoplasma in einer inaktiven Form durch die Bindung an diese inhibitorischen Proteine seques-

triert. Die Maskierung der nukleären Lokalisationssequenzen (NLS) der NF- κ B-Proteine durch die Ankyrin-*Repeats* blockiert deren Fähigkeit, in den Zellkern zu gelangen und sind aufgrund eines starken nukleären Exportsignals der I κ Bs primär im Zytoplasma lokalisiert (Ghosh, et al., 1998). Die klassische kanonische Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade erfolgt unter anderem durch inflammatorische Zytokine, UV-Licht, reaktive Sauerstoffradikale, bakterielle oder virale Toxine durch die Degradation von I κ B α . Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch extrazelluläre Stimuli erfolgt über eine Phosphorylierung und nachfolgenden Degradation der I κ B Proteine. Die Phosphorylierung wird durch eine Familie von Serin/Threonin Kinasen gesteuert, den I κ B-Kinasen (IKKs). Der IKK-Komplex besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK α und IKK β) und einem regulatorischen Adapterprotein NEMO („NF- κ B essential modulator“, oder auch IKK γ). Vor allem IKK β führt zur Phosphorylierung der I κ B Proteine und somit Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs (Karin, et al., 2002). Alle I κ B Proteine enthalten zwei konservierte Serinreste innerhalb ihres N-terminalen Endes, die durch IKK phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierungsergebnisse führen zur sofortigen Ubiquitinierung der I κ B Proteine und raschen Degradation durch das 26S Proteasom (Varfolomeev et al., 2004). Dadurch kommt es zur Translokation des freien NF- κ B-Dimers (meist p50–RelA/p65) in den Nukleus, wo es an Enhancer- und Promoterregionen mit der spezifischen Zielsequenz für NF- κ B von Zielgenen bindet und deren Transkription reguliert. Im Nukleus bestimmen weitere Regulationsmechanismen durch Phosphorylierung und Acetylierung von NF- κ B dessen aktiven oder inaktiven Zustand. Die Phosphorylierung vor allem der Rel-Proteine wird für die volle Induktion der Zielgene benötigt (Karin, et al., 2002; Sizemore et al., 1999). NF- κ B selbst aktiviert die Expression von Proteinen, wie zum Beispiel I κ B α , die für dessen eigene Inhibierung verantwortlich sind. Neu synthetisiertes I κ B α kann in den Zellkern eintreten, NF- κ B von der DNA entfernen und den Komplex zurück in das Zytoplasma exportieren, um den ursprünglichen latenten Zustand wieder herzustellen (Chen, et al., 2004; Ghosh, et al., 2002).

Neben dieser prototypischen Aktivierung des klassischen, kanonischen NF- κ B-Signalwegs gibt es zumindest einen weiteren, als nicht-kanonisch bezeichneten Aktivierungsweg nach rezeptorvermittelter Stimulierung durch zum Beispiel Lymphotoxin α (LT α). Hier kommt es durch eine IKK α abhängigen Prozessierung von p100 zu p52 und nach Translokation des nicht durch I κ Bs inhibierten p52–RelB Heterodimers zur

Aktivierung spezifischer Zielgene, die z.B. die B-Zell-Reifung und Entwicklung von Lymphorganen regulieren (Karin, et al., 2002; Senftleben et al., 2001). Beide Signalwege und die Aktivierung der verschiedenen Homo- und Heterodimere des NF- κ B-Signalwegs sind strikt reguliert. So ist zum Beispiel die Synthese von RelB als maßgeblicher Regulationsschritt des nicht-kanonischen Signalwegs durch den kanonischen Signalweg kontrolliert. Somit können inflammatorische Signale und Entwicklungssignale der beiden verschiedenen Aktivierungswege nicht getrennt betrachtet werden, sondern sind miteinander streng verbunden (Basak et al., 2008)

1.4.3 NF- κ B in der Leberregeneration

Schon früh konnte gezeigt werden, dass der kanonische NF κ B-Signalweg (NF- κ B bestehend aus RelA/p65 und p50 Heterodimeren) innerhalb von 30 min nach PHx transient in der Leber aktiviert und innerhalb 4-5 h wieder terminiert wird (Cressman, et al., 1994; Imuro, et al., 1998; Plümpe et al., 2000). In den letzten 15-20 Jahren war daraufhin die Rolle des kanonischen NF κ B-Signalwegs in der Leberregeneration unter Verwendung verschiedener Mausmodelle Gegenstand intensiver Forschung. Mäuse mit einem konstitutiven Knockout von p50 zeigen außer einem eingeschränkten humoralen Immunsystem keine Auffälligkeiten in der Entwicklung (Sha et al., 1995) und adulte p50-Knockout-Mäuse zeigen eine normale Leberregeneration nach PHx (DeAngelis et al., 2001). In diesem Modell wurde jedoch eine vermehrte möglicherweise kompensatorische nukleäre Translokation von RelA/p65 in der Leber nachgewiesen. Die funktionelle Relevanz dieser NF- κ B-Aktivierung und die Rolle der transaktivierenden Untereinheit RelA/p65 konnte bisher nicht ausreichend beantwortet werden. Während mehrere Arbeitsgruppen diese frühe Aktivierung von NF- κ B hauptsächlich in Hepatozyten nachgewiesen haben (Cataldegirmen, et al., 2005; Li et al., 2006; Plümpe, et al., 2000; Trautwein et al., 1996), zeigen andere Arbeitsgruppen eine Aktivierung von NF- κ B vornehmlich in Nicht-Parenchymzellen (Li, et al., 2006; Seki et al., 2005; Yang, et al., 2005). Da konstitutive RelA/p65-Knockoutmäuse aufgrund TNF induzierten Apoptose embryonal letal sind (Beg et al., 1995), wurden bereits verschiedene Methoden entwickelt, um die nukleäre Translokation von RelA/p65 *in vivo* zu inhibieren. Die adenovirale Infektion von adulten Ratten mit einem nicht abbaubaren Superrepressor von NF- κ B (Ad5I- κ B), und somit Hemmung der nukleären Translokation von RelA/p65 sowohl in Hepatozyten als auch Nicht-Parenchymzellen zeigte nach PHx eine stark gestörte Leberregeneration. Daneben

zeigte sich eine vermehrte Leberschädigung i. S. vermehrter Apoptose und eine verminderte Mitoserate bei normaler DNA-Synthese (Iimuro, et al., 1998). Die Überprüfung dieses Versuchsansatzes durch dieselbe Arbeitsgruppe mit demselben Superrepressor bei Mäusen bestätigte zwar eine verzögerte Leberregeneration sowie vermehrt Zeichen der Leberschädigung, allerdings ohne signifikant Apoptosen zu detektieren (Yang, et al., 2005). Diese Tiere zeigten aber nach adenoviralem Transfer von Ad5I- κ B α bereits basal vor PHx eine deutliche Leberschädigung (Yang, et al., 2005). Im Gegensatz hierzu zeigte sich nach Hepatozyten-spezifischer Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch konditionale Expression eines I- κ B α -Superrepressors (Δ N-I- κ B α) unter Kontrolle des Transthyretinpromoter eine normale Regeneration (Chaisson, 2002). Hieraus wurde geschlossen, dass die NF- κ B-Aktivierung in Nicht-Parenchymzellen maßgeblich an der Regeneration der Leber nach PHx beteiligt sein muss. In diesem durch Mifepriston-Injektionen induzierbaren Modell gelang jedoch die Inhibition von NF- κ B nur in 45% der Hepatozyten. Die konditionale Hepatozyten-spezifische Deletion von IKK β in $IKK\beta^{F/F}$ -*AlbCre* Mäusen zeigte ebenso keine Veränderungen der Regenerationsfähigkeit (Maeda et al., 2003). Dieselbe Gruppe konnte jedoch zeigen, dass nach Inaktivierung von IKK β in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in $IKK\beta^{F/F}$ -*MxCre* Mäusen die Leberregeneration gestört ist (Maeda, et al., 2005). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde der NF- κ B-Aktivierung tatsächlich eine tragende Rolle in der Leberregeneration in den Nicht-Parenchymzellen möglicherweise als Initiator der *Priming*-Phase zugeschrieben. Darüber hinaus wurde sogar eine Beschleunigung des Zellzyklus nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von IKK β in $IKK\beta^{F/F}$ -*AlfpCre*- (Malato et al., 2008) und in $IKK\beta^{F/F}$ -*AlbCre*- (Koch et al., 2009) Mäusen beobachtet, wenngleich eine systemische pharmakologische Inhibierung von IKK β keinen Einfluss auf die Leberregeneration hatte (Malato, et al., 2008). Allerdings führt zumindest die genetische Deletion von IKK β in den genannten Mausmodellen nicht zu einer kompletten Inhibition von NF- κ B, da eine Restaktivierung von NF- κ B zumindest nach TNF-Stimulation noch möglich ist (Geisler et al., 2007; Luedde, 2005).

In Zusammenschau dieser neueren Untersuchungen scheint NF- κ B in Hepatozyten vor allem eine zytoprotektive Rolle einzunehmen (Chaisson, 2002; Iimuro, et al., 1998; Yang, et al., 2005). Dafür sprechen auch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, wonach Hepatozyten *in vivo* und *in vitro* nach genetischer Inaktivierung von RelA/p65

und damit völliger Hemmung der TNF-induzierten NF- κ B-Aktivierung hoch empfindlich für TNF-induzierte Apoptose sind (Geisler, et al., 2007; Luedde, 2005; Maeda, et al., 2003). Diese TNF-induzierte Apoptose nach Inhibierung des NF- κ B Signalwegs ist durch die Aktivierung von Caspase-3, Spaltung von PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerase) und einer verlängerten JNK (c-Jun N-terminale Kinasen)-Aktivierung gekennzeichnet (Geisler, et al., 2007).

Wie oben ausgeführt, reichen die derzeitigen Meinungen über die Rolle von NF- κ B in der Leberregeneration nach PHx von „kein Einfluss generell“, „unabdingbar für Proliferation in Hepatozyten“, „spielt eine v.a. protektive Rolle in Hepatozyten“, „besonders wichtig für Zytokinantwort in Kupfferzellen“ bis „hat antiproliferative Effekte in Hepatozyten“. Diese unterschiedlichen und sehr kontroversen Ansichten sind darauf zurückzuführen, dass ein „sauberes“ Mausmodell zur Untersuchung der Rolle von NF- κ B bei der Regeneration der Leber nach PHx fehlt und Untersuchungen durch pharmakologische unspezifische NF- κ B-Inhibitoren nur von sehr eingeschränktem Aussagewert sind. Um die kontrovers diskutierte Rolle von NF- κ B Zellkompartiment-spezifisch eindeutig zu klären, wurden in dieser Arbeit Mauslinien benutzt, in denen die transaktivierende NF- κ B-Untereinheit RelA/p65 genetisch entweder spezifisch in Hepatozyten oder aber in allen Leberzellen inaktiviert werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Mausmodelle verschiedenen PHx-Modellen unterzogen und ihre Regenerationsfähigkeit charakterisiert.

2 Zielsetzung:

Wie bereits ausgeführt, ist die Rolle von NF- κ B in der Leberregeneration weiterhin nicht eindeutig geklärt. Auch über 15 Jahre nach der Beschreibung einer raschen Aktivierung von NF- κ B (bestehend aus p50-RelA/p65 Heterodimeren) in der Restleber nach 2/3-PHx sind viele Fragen offen. Im vorliegenden Projekt soll die Rolle von RelA/p65 bei der Leberregeneration nach PHx charakterisiert werden. Insbesondere soll eine mögliche unterschiedliche Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den verschiedenen Zellkompartimenten der Leber im Rahmen der Regeneration charakterisiert werden.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Ist RelA/p65 als transaktivierende Untereinheit des klassischen, kanonischen NF- κ B-Signalwegs in Hepatozyten ein essentiell zytoprotektiver Faktor nach PHx?
2. Ist RelA/p65 in Hepatozyten essentiell für eine normale Proliferation von Hepatozyten und damit erfolgreiche Leberregeneration nach PHx?
3. Ist eine funktionell intakter kanonischer NF- κ B-Signalweg in Nicht-Parenchymzellen essentiell für die Initiierung einer Zytokin-Antwort und Initiierung der Leberregeneration?

Zur Beantwortung dieser Fragen soll die transaktivierende Untereinheit RelA/p65 in der adulten Leber mit Hilfe des *Cre/lox*-Systems genetisch inaktiviert werden. Dies soll anhand von zwei unterschiedlichen genetischen Mausmodellen nach konditionaler Inaktivierung von RelA/p65 zum einen spezifisch in Hepatozyten (*Rela^{F/F}AlbCre*-Mäuse) und zum anderen mittels Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen (*Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse) *in vivo* untersucht werden. Hierfür soll eine reproduzierbare, schnelle und schonende partielle Hepatektomie-Methode benutzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien haben mindestens einen Reinheitsgrad für analytische Zwecke.

3.1.1 Allgemeine Substanzen und Materialien

Acrylamid/Bisacrylamid; 37,5:1; 30%; Rotiphorese (Fa. Roth)

Bioradreagenz (Fa. Bio-Rad und Fa. Serva)

Blocking-Buffer, Odyssey (Fa. Li-Cor)

DAPI-Mounting Medium; Eindeckelmedium (Fa. Vector Laboratories)

DNase-Set RNase free (Fa. Quiagen)

Filmkassetten mit Verstärkerfolie (Fa. Kodak)

Leiter 1kb plus, DNA-Marker (Fa. Invitrogen)

Microspin Minisäulen, Micro-spin S200 HR Mini Columns (Fa. Quiagen)

Mounting Medium; Eindeckelmedium; Vectashield (Fa. Vector Laboratories)

Nitrocellulose-Membran, Protan BA 83 (Fa. Whatman)

Objektträger, Menzel-Gläser (Fa. Thermo Scientific)

PCR Power SYBR Green PCR master mix (Fa. Applied Biosystems)

Percoll (Fa. Sigma)

Pertex, Mounting Medium (Fa. Medite)

Phosphatase Inhibitor Set (Fa. Calbiochem)

Proteinmarker, Precision Plus Protein All Blue Standard (Fa. Bio-Rad)

Proteinase K, PCR Grade (Fa. Roche)

Proteinase Inhibitor Set III (Fa. Calbiochem)

Röntgenfilme (Fa. Amersham)

TaqDNA Polymerase (Fa. Quiagen)

Tissue-Tek, Kryo-Medium für Gefrierschnitte (Fa. Sakura)

Transfermembran, Immobilon-FL (Fa. Millipore)

Unmasking-Stock Solution (Fa. Vector-Lab)

Zell-Lysepuffer 10x (Fa. Cell Signaling)

3.1.2 Chemikalien

Aceton (Fa. Merk)

Agarose (Fa. Invitrogen)

Agarosebeads (Fa. Sigma)
Ammoniumpersulfat (Fa. Sigma)
BSA, Bovines Serum Albumin (Fa. Serva)
Bromphenol Blau (Fa. Serva)
Carboxymethylzellulose (Fa. Sigma)
DTT (Fa. Sigma)
EDTA, N,N,N',N'-Ehtylendiamin-tetraacetat (Fa. Fluka)
Eisen(II) – sulfat (Fa. Merck)
Eosin (Fa. Waldeck)
Ethanol, unvergällt 99,9% (Fa. Merk)
Ethanol, 80% (Apotheke Klinikum rechts der Isar)
Ethidiumbromid (Fa. Sigma)
Glycerol (Fa. Sigma)
Hämatoxin-Lsg., mod. Nach Gill II (Fa. Merck)
Hydrochlorid (Fa. Merck)
HEPES, 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonsäure (Fa. Roth)
Isopropanol (Apotheke Klinikum rechts der Isar)
Kaliumacetat (Fa. Merck)
Kaliumhydrogenphosphat (Fa. Merck)
Kaliumoxalat (Fa. Merck)
Kaliumchlorid (Fa. Merck)
Kaliumhydrogencarbonat (Fa. Merck)
Kalziumchlorid (Fa. Merk)
LPS, Lipopolysaccharid (Fa. Sigma)
Magnesiumchlorid (Fa. Merck)
 β -Mercaptoethanol (Fa. Sigma)
Methanol (Fa. Merck)
Natriumacetat (Fa. Merck)
Natriumbicarbonat (Fa. Merck)
Natriumborat (Fa. Bio-Rad)
Natriumdihydrogenphosphat – Monohydrat (Fa. Merck)
Natriumdisulfit (Fa. Merck)
Natriumhydroxyd (Fa. Merck)
Natriumlaurylsulfat, SDS (Fa. Sigma)

Natriumsulfat (Fa. Merck)
Natriumthiosulfat wasserfrei (Fluka)
Nonidet P-40 (Fa. Roche)
Paraformaldehyd, phosphatgepuffert 4% (Fa. Roth)
PBS, Phosphatgepufferte Saline, DPBS (Fa. GIBCO)
Phenolrot (Fa. Merck)
Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (Fa. Sigma)
Sucrose (Fa. Merk)
TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Fa. Sigma)
Trichloressigsäure (Fa. Sigma)
TRIS (Fa. Roth)
Triton X-100 (Fa. Roche)
TWEEN-20 (Fa. Sigma)

3.1.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen Western Blot (WB) und Immunhistochemie (IHC) verwendet:

Anti-BrdU (Fa. Serotec; MCA2060; rat; IHC 1:200)
Anti- β -Actin (Fa. Sigma-Aldrich; mouse; WB 1:2000)
Anti-Cyclin-D1 (Fa. Santa-Cruz; sc-450; mouse; WB 1:500)
Anti-Cyclin-A (Fa. Santa-Cruz; sc-596; rabbit; WB 1:500)
Anti-goat biotinyliert (Fa. Vector; rabbit; IHC 1:500)
Anti-mouse biotinyliert (Fa. Vector; goat; IHC 1:500)
Anti-mouse IgG, AlexaFluor 680 (Fa. Invitrogen; goat; WB 1:5000)
Anti-mouse IgG, AlexaFluor 750 (Fa. Invitrogen; goat; WB 1:5000)
Anti-rabbit biotinyliert (Fa. Vector; goat; IHC 1:500)
Anti-rabbit IgG, AlexaFluor 680 (Fa. Invitrogen; goat; WB 1:5000)
Anti-rabbit IgG, AlexaFluor 750 (Fa. Invitrogen; goat; WB 1:5000)
Anti-NFkB p65 C20 (Fa. Santa-Cruz; sc-372-G; goat; IHC 1:100)
Anti-NFkB p65 C20 (Fa. Santa-Cruz; sc-372; mouse; WB 1:1000)
Anti-Phospho-SAPK/JNK (Fa. CellSignaling; 9255S; mouse; WB 1:1000)
Anti-SAPK/JNK (Fa. CellSignaling; 9252; rabbit; WB 1:1000)
Anti-STAT3 (Fa. CellSignaling; Tyr705; 9139; rabbit; WB 1:1000)

Anti-Phospho-STAT3 (Fa. CellSignaling; Tyr705; 9131; rabbit; WB 1:1000)

3.1.4 Kits

Blocking Kit, IHC, Avidin/Biotin (Fa. Vector)

DAB Kit (Fa. Vector)

ECL Substratansatz, Western-Blot-analysis (Fa. Amersham)

Mouse-TNF α -ELISA, Quantikine (Fa. R&D Systems)

Mouse-IL-6-ELISA, Quantikine (Fa. R&D Systems)

RNeasy Mini Kit für RNA-Isolation aus Gewebe (Fa. Quiagen)

TaqMan Reverse Transcription Kit (Fa. Applied Biosystems) TUNEL, In situ cell death detection kit POD (Fa. Roche)

3.1.5 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

Genotypisierung:

Cre-PCR

Cre003 5'-TTA CAT TGG TCC AGC CAC C-3'

Cre004 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3'

Rela^{F/F}-PCR:

p65-LoxP1 5'-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG

p65-LoxP2 5'-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G

Echtzeit-PCR :

A20 forward: 5'-CAG TTC CGA GAG ATC ATC CAC AAA G-3'

A20 reverse: 5'-CTA GAG GCA GTT TCC ATC ACC A-3'

CyclinD1 forward: 5'-AGG TAA TTT GCA CAC CTC TG-3'

CyclinD1 reverse: 5'-ACA AAG CAA TGA GAA TCT GG-3'

mTNF forward: 5'-ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC-3'

mTNF reverse: 5'-TGG GTC AGG AGC ACG TAG T-3'

mIL-6 forward: 5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3'

mIL-6 reverse: 5'-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3'

Cyclophilin forward: 5'-ATG GTC AAC CCC ACC GTG T-3'

Cyclophilin reverse: 5'-TTC TTG CTG TCT TTG GAA CTT TGT C-3'

3.1.6 Tierexperimentelle Materialien und Anästhetika

Futter (Fa. Altromin)
Heparin (Fa. Bayer)
Isufluran, Forene (Fa. Abbott)
Ketamin, (Fa. Pfizer)
Poly(I)-Poly(C) (Fa. Amersham Biosciences)
Xylazin, Rompun (Fa. Bayer)

3.1.7 Tierexperimentelle Instrumente und Geräte

Einmalspritzen; 1ml (Fa. Braun)
Hämatokritkapillaren (Fa. Hirschmann)
Halbgeschlossenes Narkosesystem (Fa. Dräger)
Kanülen Sterican; Gr. 17, Gr. 20 und Gr. 21 (Fa. Braun)
Operationsbesteck (Fa. FST)
Operationsmikroskop OPMI, 1FC (Fa. Carl Zeiss AG)
Venenverweilkanüle (Fa. Braun; 22G blau)

3.1.8 Allgemeine Geräte

Analysenwaage (Fa. Kern AGB Gottlieb Kern & Sohn GmbH)
AxioCam MRc (Fa. Carl Zeiss AG)
Blotting-Apparatur Semi-Dry (Fa. Kreutz)
Brutschrank und CO₂-Inkubator HERAccl (Fa. Thermo Fisher Scientific)
Echtzeit-PCR- StepOnePlus (Fa. Applied Biosystems)
Einbettssystem (Fa. Leica Microsystems GmbH)
Eppendorf -Mixer (Fa. Eppendorf AG)
Färbestation (Fa. Thermo Scientific)
Geldokumentationssystem (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH)
Gelelektrophoresekammer „Mini“-Apparatur (Fa. Biometra)
Homogenisator Silent Crusher (Fa. Heidolph Instruments GmbH)
Lumineszenzgerät FLUOstar OPTIMA (Fa. BMG Labtech GmbH)
Mikroskop Axiovert 25 und Axio A1 (Fa. Carl Zeiss AG)
Mikroskop DM LB (Fa. Leica Microsystems)
Mikrotom HM355S (Fa. Thermo Scientific)
Mikrowelle (Fa. Siemens)

NanoDrop Spektrophotometer ND-1000 (Fa. PEQLAB Biotech.)
Neubauer-Zählkammer (Fa. LO-Laboroptik GmbH)
Odyssey Infrared Imaging System (Fa. LI-COR Bioscience Corp.)
Photometer Anthos 2001 (Fa. Anthos Mikrosysteme)
PCR-Maschinen TPersonal/TGradient (Fa. Biometra)
pH-Meter (Fa. WTW)
Power Supply EPS 601 (Fa. GE Healthcare Europe)
Präzisionswaage Kern (Fa. Gottlieb Kern & Sohn GmbH)
Thermomixer (Fa. Eppendorf)
VacuGene-Pumpe (Fa. GE Healthcare Europe)
Vortexer 2000 (Fa. Heidolph Instruments)
Wasserbad (Fa. Thermo Fisher Scientific)
Western Blot-System Mighty Small II (Fa. Hoefer Inc.)
Schwenkplatte (Fa. LTF Labortechnik)
Tischzentrifuge 5417/5R (Fa. Eppendorf)
Vortexer (Fa. Bender & Hobein)
Zentrifuge Avanti; J-25 (Fa. Beckman)

3.2 Tierexperimentelle Methoden

Alle Versuche wurden unter Einhaltung tierschutzrechtlicher Bedingungen des Gesundheitsministeriums und nach durch die Regierung von Oberbayern geprüften Protokollen des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) der Technischen Universität München durchgeführt. Eine eigene Genehmigung der nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigungspflichtigen Tierversuche der Regierung von Oberbayern lag vor (Tierversuchsantrag: TVA 55.2-1-54-2531-55-07).

3.2.1 Allgemeine Haltungsbedingungen

Die Haltung der Tiere erfolgte in speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen (Maxi-Meiser-System/Thoren-Caging-System oder Techniplast-IVC) unter standardisierten Bedingungen in den Räumen des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) der Technischen Universität München. Die Räume sind speziell als Tierhaltungsräume konzipiert mit Klimatisierung und Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase. Futter (Autoklaviertes Mäusefutter Fa. Altromin) und Wasser (Trinkwasser bei Wechsel der Tränkflaschen 2x pro Woche) erhielten die Tiere *ad libitum*. Spezielles Holzgranulat diente als Einstreu bei einmaligem Wechsel pro Woche. Das Hygienemanagement erfolgt gemäß Empfehlungen der FELASA. Die Haltung der Tiere erfolgt in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen.

3.2.2 Mauslinien

Um die Rolle der transaktivierenden Untereinheit RelA/p65 des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zu untersuchen, wurden zwei verschiedene transgene Mausmodelle untersucht. Da RelA/p65 Knockout-Mäuse aufgrund TNF-induzierter Apoptose der Leber embryonal letal sind (Beg, et al., 1995), wurden konditionale RelA/p65 Knockout-Mäuse (*Rela^{F/F}*-Mäuse) untersucht, in denen unter Verwendung des Cre-loxP-Systems RelA/p65 genetisch inaktiviert werden kann. *Rela^{F/F}*-Mäuse wurden in der AG Prof Roland M. Schmid generiert. Eine Cre-Expression führt in diesen Mäusen zur Deletion der Exons 7-10 des *Rela*-Gens, die für das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) und die Transaktivierungsdomäne (TAD) kodieren. Somit wird RelA/p65 nach Aktivierung der Cre-Rekombinase genetisch inaktiviert und kann keine Zielgene regulieren (Algül et al., 2007). Dies resultiert in der Expression eines funktionsunfähigen trunkierten Δ RelA/p65, das nicht

mehr in den Zellkern translozieren kann (Geisler, et al., 2007).

Zur Hepatozyten-spezifischen Inaktivierung von RelA/p65 wurden *Rela^{F/F}*-Mäuse mit transgenen *AlbCre*-Mäusen gekreuzt (Geisler, et al., 2007; Maeda, et al., 2003). In diesen Mäusen erfolgt die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Hepatozyten-spezifischen Albumin Enhancer/ Promoter spezifisch in Albumin-exprimierenden Hepatozyten (Postic et al., 2000). Die funktionelle Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten aus *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen konnte unsere Arbeitsgruppe nach primärer Hepatozytenisolation auf Proteinebene und durch den Nachweis des Verlusts von NF- κ B-Bindungsaktivität nach mTNF Stimulation EMSAs (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) gezeigt werden (Geisler, et al., 2007).

Zur Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Kupffer-Zellen wurden *Rela^{F/F}*-Mäuse mit transgenen *MxCre*-Mäusen gekreuzt. *MxCre*-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase induzierbar in diversen Typ-1-Interferon-responsiven Geweben und zeigen folglich eine Deletion in Lymphozyten, Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen der Leber nach poly(I)-poly(C) (pIC)-Injektion (Kuhn et al., 1995). Die Cre-Expression in den resultierenden *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen kann durch die Gabe von IFN α oder pIC induziert werden, was zur Expression des funktionsunfähigen trunkierten Δ RelAp65 führt. In den folgenden Untersuchungen wurden *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse mit einer intraperitonealen Injektion von 200 μ g pIC 7 d vor PHx induziert.

Die erfolgreiche Deletion gefloxter Allele wurde in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen nach pIC-Injektion nach PHx oder anderen Versuchen stets auf Proteinebene mittels einer Western-Blot Analyse für p65 des Lebergewebes überprüft. Die resultierende Bande des trunkierten Δ RelA/p65 war sicher unterhalb der Wildtyp-RelA/p65 Bande von Kontrollmäusen (*Rela^{F/F}*-Mäusen) zu identifizieren. *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse durften nach Induktion keine signifikante Wildtyp-RelAp65 Bande in Leberproteinlysaten mehr aufweisen.

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels Schwanzbiopsien und daraus isolierter DNA mit standardisierten PCRs (Polymerasekettenreaktionen) (siehe unten).

3.2.3 Partielle Hepatektomie

An den beiden verschiedenen konditionalen Knockout-Mauslinien (*Rela^{F/F}AlbCre* und *Rela^{F/F}MxCre*) wurde die partiellen 2/3-PHx stets im direkten Vergleich zu Cre-negativen Kontrollmäusen (*Rela^{F/F}*) mit demselben Geschlecht und vorzugsweise aus demselben Wurf durchgeführt. Die partielle 2/3-PHx wurde für die verschiedenen

Zeitpunkte der Sektion (1, 4, 6, 24, 36, 48, 72 und 168 h) durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt und Mauslinie wurden mindestens vier Tiere erfolgreich operiert.

Versuchsaufbau und OP-Materialien

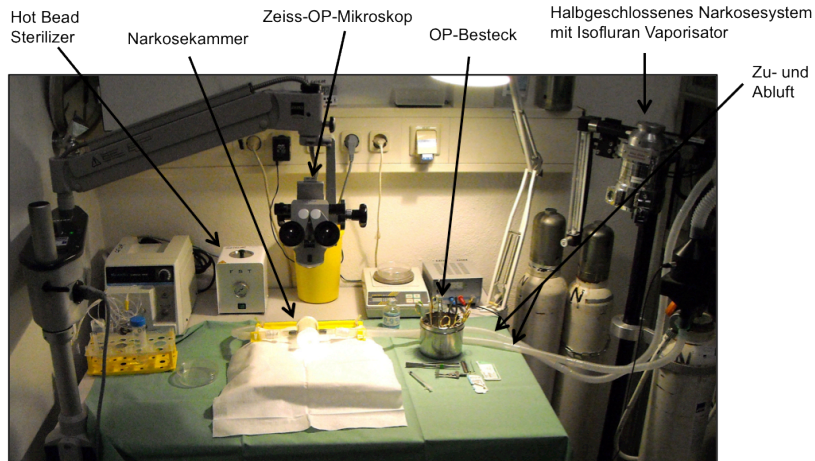


Abbildung 3: Aufbau der Geräte für die partielle Hepatektomie



Abbildung 4: OP-Besteck für die partielle Hepatektomie

Für die PHx wurden im Hot-Bead-Sterilizer sterilisierte OP-Werkzeuge der Firma FST (Fine Science Tools) verwendet (Abbildung 4).

Narkose

Da viele Anästhetika lebertoxisch sind, wurde eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran durchgeführt. Diese ist anderen Verfahren deutlich überlegen (Mitchell, et al., 2008). Es wurde ein halbgeschlossenes Narkosesystem mit Narkosekammer und Inhalationsnarkotika-Vaporisator verwendet (Abbildung 3). Die Narkoseeinleitung wurde mit Isofluran (5%) und O₂ (5 l/min) durchgeführt und zur Narkoseaufrechterhaltung auf Isofluran (1,5 – 2,0%) und O₂ (0,5 – 1,0 l/min) reduziert. Auf eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch den tail/ toe pinch reflex (Flexorenreflex) geachtet.

Partielle 2/3 Hepatektomie-Methode

Es wurde eine schnelle, schonende und gut reproduzierbare PHx-Methode mit drei separaten Ligaturen unter Schonung der Gallenblase etabliert. Für jeden Zeitpunkt post PHx (1, 4, 6, 24, 36, 48, 72 und 168 h) wurden von *Rela^{F/F}AlbCre-*, und *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen 4 – 10 Tiere jeweils zusammen mit den Cre-negativen Kontrollen (*Rela^{F/F}*) operiert. Obwohl die Progression in der G1 und S-Phase des Zellzyklus nicht tageszeitabhängig zu sein scheint (Matsuo et al., 2003), wurde die Operation stets vormittags durchgeführt.

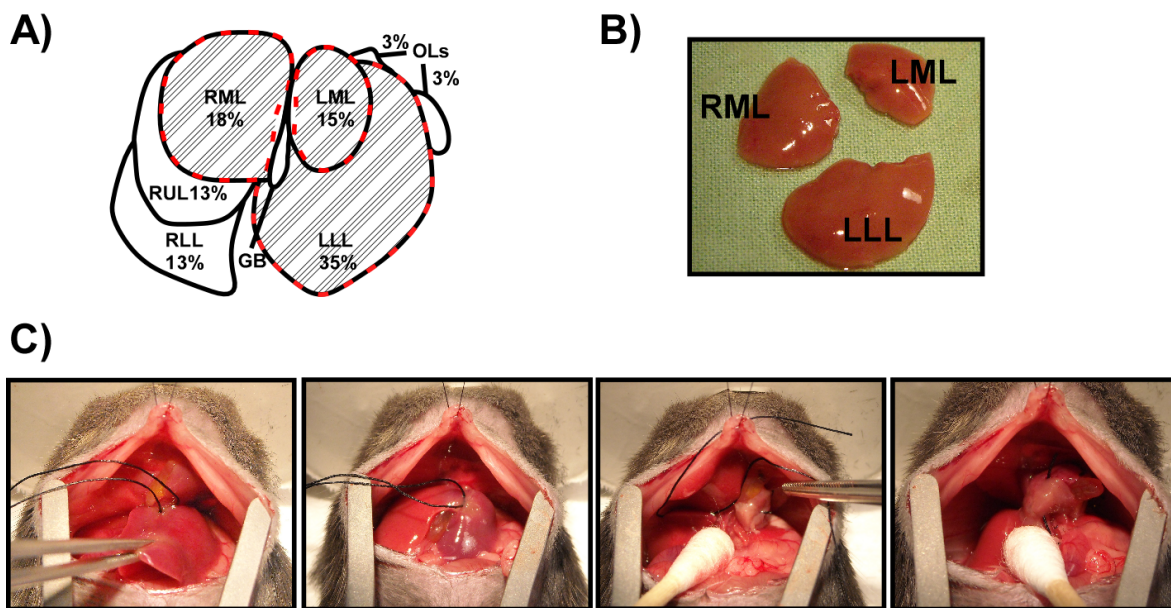


Abbildung 5: Partielle 2/3-Hepatektomie.

(A) Schematische Darstellung der Mausleber mit den resezierten Leberlappen. (B) Resezierte Leberlappen LLL (linker Leberlappen), LML (linker Mittellappen), RML (rechter Mittellappen). (C) Intraoperative Bilder mit Darstellung aller drei Ligaturen und verbleibendem Mittelsteg (von links nach rechts).

Für die 2/3-PHx (Abbildung 5 A) wurden die Mäuse bei ausreichender Narkosetiefe in Rückenlage auf der OP-Unterlage fixiert. Um möglichst sterile Bedingungen herzustellen, wurde das Fell im Bereich des Abdomens großzügig mittels eines Langhaarschneiders entfernt und dieser Bereich anschließend mit 80%igem Ethanol desinfiziert. Darauf erfolgte mittels einer circa drei Zentimeter langen, medianen Laparotomie die Eröffnung des Abdomens in zwei separaten Schichten von distal nach proximal bis kurz über den Processus xiphoideus. Der Retraktor mit stumpfen 16 mm Zähnen wurde rechts und links vorsichtig entlang der inneren Bauchwand eingeführt und geöffnet. Dadurch und mittels einer durch den Knorpel des Processus xiphoideus gestochenen Ligatur, die auf der Oberseite der Inhalationsmaske befestigt wurde, konnte eine ideale Exposition des oberen Abdomens erreicht werden.

Durch leichten Druck mit einem sterilen, in 0,9%iger Natriumchlorid Lösung getränkten Wattestäbchen auf den rechten Mittellappen (RML) wurde das Ligamentum falciforme aufgespannt und mit einer gebogenen, mikrochirurgischen Schere bis kurz vor die Vena cava durchtrennt. Eine gute Exposition des linken Leberlappens (LLL) wurde erreicht, indem die Mittellappen an das Diaphragma geklappt und kleine Bindegewebssepten zwischen Leber und Magen durchtrennt wurden. Der LLL wurde mit einem Wattestäbchen angehoben und eine Ligatur (Prolene 4-0) wurde um die Basis des LLL nahe dem Hilus gelegt (Abbildung 5 C, erstes Bild von links). Beim Umlegen muss darauf geachtet werden, dass keine Pankreas- oder Netzteile mit gegriffen sind. Der LLL konnte darauf mit einer mikrochirurgischen Schere entfernt werden. Dies erfolgte dicht an der Ligatur, wobei ein kleiner anämischer Stumpf stehen bleibt, um den sicheren Halt der Ligatur nicht zu gefährden. Die zweite Ligatur wurde um die Basis des linken Mittellappen (LML) gelegt und dieser distal davon abgetrennt (Abbildung 5 C, zweites Bild von links). Hier blieb ebenso ein kleiner Steg von Lebergewebe einschließlich der Gallenblase bis zur V. cava stehen, um eine Cholestase und Nekrosen der verbleibenden Leberlappen und der Gallenblase zu vermeiden. Beim Einbringen der dritten Ligatur um die Basis des rechten Mittellappen (RML) (Abbildung 5 C, drittes Bild von links) musste darauf geachtet werden, die rechten Leberlappen und die mediodorsal gelegene V. cava nicht zu verletzen. Die Ligatur wurde ca. 0,5 mm lateral des ehemaligen Lig. falciforme platziert und vorsichtig zugezogen und analog zu der zweiten Ligatur auch der RML abgetrennt. Signifikante Blutungen aus den Absetzungsrändern sollten zu keiner Zeit zu beobachten sein. Nach abschließender Inspektion der Ligaturen wurde Blut (aus den resezierten, gestauten Leberlappen) mit einem Wattestäbchen entfernt und eine intraperitoneale Infusion mit 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung verabreicht. Die mediane Laparotomie wurde stets in zwei Schichten (Peritoneum/ Muskel- und Hautnaht) mit 7-0 monofil Ethilone verschlossen und die Wundfläche der Haut nochmals mit einer Klammerreihe gesichert. Insgesamt betrug die Operationszeit stets zwischen 15-20 min. Die Tiere wurden zum Aufwachen unter eine Wärmelampe gelegt und eine postoperative Beobachtung wurde angeschlossen.

Bei gut ausgeführter Operation durften keine Kriterien von starken postoperativen Schmerzen wie struppigem Fell, Lahmen, flach anliegende Ohren, ein gekrümmter Rücken, Isolation von der Gruppe oder andere Zeichen von definierten Abbruchkriterien beobachtet werden.

3.2.4 Erweiterte 80%-PHx

Nach standardisierter 2/3 Hepatektomie (siehe Kapitel 3.2.3.) mit Entnahme des linken Leberlappens (LL), des linken Mittellappens (LML) und des rechten Mittellappens (RML) wurden mit der Mikrodissektionsschere die bindegeweblichen Septen zur Magenoberseite durchtrennt und der obere Netz-Leberlappen („omental lobe“, OL) freipräpariert. Dadurch war es möglich, eine Ligatur (Prolene 4-0) um die Basis des oberen OL zu legen. Darauf erfolgte die Resektion des OL kurz hinter der Ligatur. Als nächstes wurde der Retraktor gelöst und in einem neuen Winkel eingespannt um eine bessere Exposition des rechten Oberbauchs zu erlangen. Mittels eines sterilen Wattetupfers wurde der obere und der untere rechte Leberlappen voneinander abgepreizt und die Bindegewebssepten bis zur gemeinsamen Basis der beiden Lappen präpariert. Mit dem Operationsmikroskop konnte darauf die Basis der Leberlappen inspiziert werden, um den Verlauf der Gefäße und der Gallengänge zu differenzieren. Je nach Winkel der Gefäßstrukturen wurde darauf die Ligatur von kranial nach dorso-kaudal um den oberen rechten Leberlappen (RUL, „right upper lobe“) gelegt und nach Kontrolle vorsichtig geschlossen. Hierbei schneidet die Ligatur in das Lebergewebe und durch die Stauung des Lebergewebes des RUL wird die suffiziente Ligatur der großen Gefäße und des Gallengangs angezeigt. Darauf kann die Resektion des RUL von medio-kaudal nach latero-kranial erfolgen. Da die Ligatur nicht ausreichend das gesamte Lebergewebe und die großen Gefäße am Absetzungsrand greifen kann, muss auf Nachblutung geachtet werden. Bei signifikanten Blutungen, oder Durchblutungsstörungen des verbleibenden unteren rechten Leberlappens kann die Maus nicht für analytische Zwecke benutzt werden.

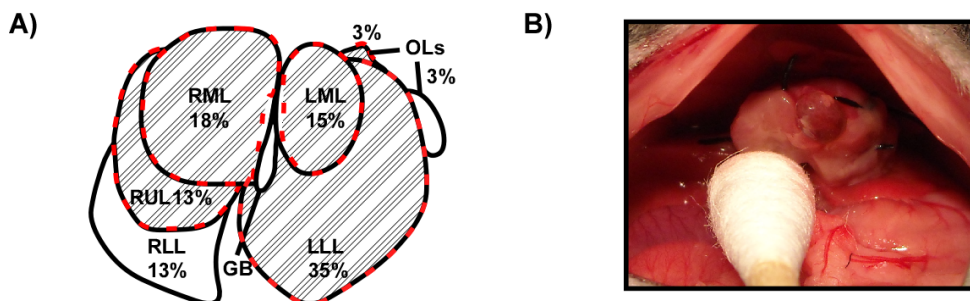


Abbildung 6: Erweiterte 80%-Hepatektomie

(A) Schematische Darstellung der erweiterten 80%-PHx und (B) intraoperativer Situs post-OP.

3.2.5 Intraperitoneale (i.p.) Injektion

Die Maus wurde hierzu in einer Hand an Nackenfalte und Schwanz immobilisiert und

die Einstichstelle im rechten unteren Abdomen mit 80%igem Ethanol desinfiziert. Darauf erfolgte der Einstich im linken Unterbauch in einem flachen Stichwinkel nach kranial mit einer Einmalspritze und 22G Einmal-kanüle.

Intraperitoneale Injektion von Bromodeoxyuridin

Für den Nachweis proliferierender Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie erfolgte die i.p. Injektion von Bromodeoxyuridin (BrdU) zwei h vor der geplanten Sektion. BrdU als chemisches Analogon von Thymidin wird in der Synthesephase in die DNA eingebaut, weshalb der immunhistochemische nukleäre Nachweis proliferierende Zellen anzeigt. Die BrdU-Stammlösung (50 mg/ml) wurde in leicht alkalisiertem aqua dest. gelöst und bei -20°C in Aliquots bis zur Verwendung gelagert. Nach Verdünnung auf 5 mg/ml mit steriler 0,9%iger Natriumchlorid Lösung erfolgte die i.p. Injektion (siehe Kapitel 3.2.6.) von 100 µg BrdU /g KG exakt zwei h vor der geplanten Sektion der Maus.

Intraperitoneale Injektion von Poly(I)-Poly(C)

Die transgenen *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen wurden durch pIC-Injektion induziert. Das lyophilisierte pIC wurde in steriler 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung bei 50°C gelöst. Die resultierende Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml pIC wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Induktion der Cre-Rekombinase durch den Interferon-responsiven Promoter wurden den *Rela^{F/F}MxCre*-, als auch den Kontrollmäusen (*Rela^{F/F}*) 10 µg pIC/ g KG i.p. injiziert. Sieben Tage danach wurden die Mäuse für weitere Versuche verwendet.

Intraperitoneale Injektion von LPS (Lipopolysaccharid)

Lipopolysaccharide als Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien wurden in ihrer Eigenschaft als starke NF-κB-abhängige TNF-Induktoren genutzt. Zunächst erfolgte eine Verdünnung der LPS-Stocklösung (2 mg/ml) mit steriler 0,9%iger Natriumchlorid Lösung auf 0,2 µg/µl. Den Mäusen wurde 2 µg/g Körpergewicht i.p. injiziert. Danach erfolgte zu spezifischen Zeitpunkten die Sektion.

Injektion von murinem TNF

Hierzu wurde die Stammlösung mit steriler 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung auf 2,5 ng/µl verdünnt. Die i.p. Injektion von murinem TNF (mTNF) erfolgte mit 25 ng/ g KG .

45 Minuten nach Injektion erfolgte jeweils die Sektion.

Die intravenöse Injektion von mTNF erfolgte mit 10 ng /g KG in die rechte oder linke Schwanzvene. Die Mäuse wurden dann 6 Stunden nach Injektion untersucht.

3.2.1 Sektion der Mäuse und Organentnahme

Die Mäuse wurden stets durch Inhalation von Isofluran getötet. Wenn keine Organentnahme erfolgte, wurde stets zusätzlich ein Genickbruch durchgeführt.

Die Sektion der Mäuse zu den verschiedenen Zeitpunkten nach PHx erfolgte standardisiert. Es wurde stets durch eine mediane Laparotomie das Abdomen eröffnet und der Schnitt beidseits entlang des Rippenbogens erweitert. Der Darm wurde zur Seite gelegt und es erfolgte die Blutentnahme aus der Vena cava (siehe unten). Darauf wurde die (Rest-)Leber als komplettes Präparat entfernt und sofort gewogen. Anschließend wurde die Leber auf Eis zerteilt. Drei Gewebestücke für Protein- und RNA-Analysen wurden sofort in separaten Kryotubes in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die verbleibenden Leberstücke wurden für die Paraffin-/ Kryo-Histologie weiterverarbeitet.

3.2.2 Bestimmung der Lebermasse und Berechnung der prozentualen Leberregeneration

Zur Bestimmung der Lebermasse wurde das durchschnittliche prozentuale Gewicht der resezierten Leberlappen (LL, RML, LML) zum Lebergesamtwicht bestimmt. Die daraus resultierenden 66% wurden in folgender Formel zur Errechnung des Gesamtlebergewichts vor Operation benützt: $100 \times (\text{Gewicht der resezierten Leberlappen in Gramm} / 66) = \{\text{errechnetes Lebergewicht in Gramm}\}$.

Bei der erweiterten 80%igen Hepatektomie wurde die resezierten Leberlappen (LLL, RML, LML, OL, RUL) mit 78% des Gesamtlebergewebes bestimmt und die Formel $100 \times (\{\text{Gewicht der resezierten Leberlappen in Gramm}\} / 78) = \{\text{errechnetes Lebergewicht in Gramm}\}$ angewendet. Zur Überprüfung wurde der prozentuale Anteil des errechneten Lebergewichts am Körpergewicht der Maus errechnet und mit einem Standard verglichen. Die standardisierten Hepatektomie-Methoden wurden mit dem prozentualen Anteil des resezierten Lebergewebes am Körpergewicht errechnet. Nach Sektion der Mäuse zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde das Lebergewebe nach Entfernung der nekrotischen Reste im Bereich der Ligatur (0,06 bis 0,2g) gewogen und der prozentuale Anteil zu dem errechneten Lebergesamtwicht vor Ope-

ration (siehe oben) berechnet. $\left(\frac{\{\text{Gewicht des Lebergewebes nach Sektion in Gramm}\}}{\{\text{errechnetes Lebergewicht in Gramm}\}}\right) \times 100 = \{\text{Gewicht der regenerierten Leber in Prozent zum Ausgangsgewicht}\}$.

3.2.3 Blutentnahme bei Mäusen

Blutabnahme mittels Schwanzveneninzision

Nach Fixierung der Maus im Restrainer erfolgte eine Hyperämisierung des Schwanzes mittels einer Wärmelampe und Stauung der Schwanzvenen durch leichten Fingerdruck. Die Inzision erfolgte in der Schwanzspitze und Blut wurde durch die Kapillarwirkung der Hämatokritröhrchen passiv entnommen. Anschließend erfolgte eine suffiziente Blutstillung mittels Verödung.

Blutentnahme während der Sektion

Die Blutentnahme erfolgte nach Eröffnen des Abdomens durch Punktion der Vena cava inferior mit einer 26G Kanüle und einer 1 ml Einwegspritze. Es wurde je nach Mausgröße zwischen 0,5 bis 1 ml Vollblut gewonnen.

Serumgewinnung und Serumanalysen

Für die weitere Analyse wurde das Vollblut in ein Epi überführt, auf Eis gekühlt und die zellulären Bestandteile durch Zentrifugation bei 4°C für 10 Minuten bei 8.000 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Serum als Überstand wurde in ein frisches Epi überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4 Serumchemie

Zur Abschätzung des Leberschadens wurden Aliquots der Serumproben 1:5 mit dH₂O verdünnt und die Transaminasen Aspartat- und Alanin-Amino-Transferase-Aktivität (AST, ALT) sowie das Gesamtbilirubin nach genormten, standardisierten Methoden bestimmt. Dies erfolgte durch das Institut für klinische Chemie am Klinikum rechts der Isar in München.

3.2.5 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Für die quantitative Bestimmung der Serum- und Gewebsspiegel von TNF α und IL-6 wurden Sandwich Enzym-Immunoassays mit spezifischen Kits (Quantikine[®]) nach den Protokollen des Herstellers R&D Systems durchgeführt.

3.3 Hepatozyten- und Kupffer-Zellisolierung

Zunächst wurden alle verwendeten Lösungen auf 37°C vorgewärmt und die Instrumente sterilisiert. Der Maus wurde 10 bis 13 µl/ g Körpergewicht des Xylazin/ Ketamin-Gemisch i.p. injiziert und auf eine ausreichende Narkosetiefe gewartet. Darauf wurde die Maus auf den Rücken gelegt und fixiert. Mit einer großzügigen medianen Laparotomie bis zum Processus Xyphoideus erfolgte die blutungsarme Eröffnung des Abdomens. Nach Darstellung der Vena cava inferior wurde diese mit einer Ligatur umstochen und der erste Knoten vorgelegt, jedoch noch nicht geschlossen. Darauf wurde distal der Ligatur, kranial der Einmündung der Venae renalis in die Vena cava inferior eine 22G Braunüle eingeführt, bis kurz unterhalb der Leber vorgeschoben und diese mit der Ligatur fixiert. Darauf wurde der vorbereitete Puffer 1 (250 µl EGTA (50mM) ad 50 ml HBSS; (37°C) in dem entlüfteten Pumpensystem abgeschlossen und die Pumpe mit 2 ml/min gestartet. Sobald sich die Pfortader füllte, wurde diese durchtrennt und der Pumpenfluss auf 7 ml/min erhöht und die Leber mit 35 ml des Puffer 1 perfundiert. Darauf wurde die Leber mit 40 – 50 ml des frisch mit Liberase versetzten Puffers 2 (67 µl Calcium 1M ad 50 ml HBSS, Liberase) perfundiert (7 ml/min). Die Perfusion konnte gestoppt werden, sobald sich das Parenchym der Leber enzymatisch aufgelockert hatte. Dies wurde mit einer Pinzette überprüft. Anschließend erfolgte die Entnahme der Leber. Die folgenden Schritte erfolgten alle bei 37°C unter sterilen Bedingungen. Die Leber wird darauffolgend in einer Petrischale Williams-Medium (ad 5% FCS, 1:100 Pen/Strep, 1:100 L-Glut) mit einer Pinzette zerkleinert und die resultierenden Teile anschließend durch einen 70 µm Filter in eine frische Petrischale gepresst, um die Zellen von dem verbleibenden Gewebegerüst zu trennen. Die Zellsuspension wird mit insgesamt 35 ml Williams-Medium (ad 5% FCS, 1:100 Pen/Strep, 1:100 L-Glut) aufgefüllt und bei 4°C 300 G für zwei Minuten zentrifugiert, um intakte Zellen von Gewebsresten zu trennen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Williams-Medium (37°C) aufgenommen. Ab hier konnte entweder eine Hepatozytenkultur oder weitere eine Auftrennung für die Kupffer-Zellkultur erfolgen.

Für die Kupffer-Zellisolierung folgte nach Aufnahmen des ersten Pellets in Williams-Medium in 35 ml eine Zentrifugation mit 50 G für 2 Minuten bei 4°C. Der Großteil der Hepatozyten wird im resultierenden Pellet entfernt. Der Überstand wird in einem 50 ml Falcon auf Eis gelagert und mit dem Überstand von mindestens einer zweiten Maus gepoolt. Die 50 ml Falcons werden dann nochmals eine Minute bei 50 G zentri-

fugiert und erneut das Pellet verworfen. Darauf folgen zwei Zentrifugationschritte bei 350 G für 10 Minuten bei 4°C mit dazwischen erfolgter Erythrozyten-Lyse (5 Minuten) sowie dem Waschen mit 20 ml kaltem 1x PBS. Das resultierende Pellet (gepoolt aus 2-3 Mäusen) wird in 10 ml 1x PBS suspendiert. Im folgenden Schritt erfolgte die Separation der verschiedenen Zellen mittels Übersichten eines Percoll-Gradienten (unten → 15 ml 50% Percoll → 20ml 25% Percoll → 10ml Zellen in 1x PBS oben) und Zentrifugation bei 800 G für 15 Minuten. Das Pellet, die 25% Percoll-Phase und der Überstand wurden verworfen. Für die Kupffer-Zellen wurde die 50% Percoll und Interphase zwischen 50% und 25% Percoll-Phase in ein neues Falcon überführt und mit 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut 10 min bei 800 G und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pallet wurde in 10 ml RPMI resuspendiert und die Zellzahl nach Neubauer bestimmt und auf 1×10^6 Zellen/ml mit RPMI verdünnt. Die Zellen wurden dann in 12-Well Platten ausgesät. Die weitere Trennung von Endothelzellen und anderen Nicht-Parenchymzellen erfolgt durch selektive Adhärenz. Nach 15 Minuten waren die meisten Kupffer-Zellen angeheftet; darauf erfolgte ein Mediumwechsel mit Vollmedium (RPMI, 10% FCS, 1:100 L-Glut, 1:100 Pen/Strep). Anschließend konnte die Inkubation in 37°C Brutschränken mit 5% CO₂ über Nacht erfolgen.

3.4 Genotypisierung der Mäuse

3.4.1 DNA-Isolation aus Mäuseschwänzen

Es wurden etwa ein 3-6 mm der Schwanzspitze von 3 Wochen alten Mäusen abgeschnitten und diese in 300 µl Zelllyse-Puffer (siehe unten) mit 20 µl Proteinase K-Lösung über Nacht in einem Thermomixer bei 55°C inkubiert. Bei der darauf folgenden Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min wurde der verbleibende Schwanzrest abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß mit 300 µl vorgelegtem Isopropanol gegeben und mehrmals auf und ab pipettiert. Anschließend wurde erneut bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge bei 4°C für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgekippt. Das resultierende DNA-Pellet wurde mit 300 µl Ethanol (70%) gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 14.000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abkippt. Das Pellet wurde darauf im Heizblock bei 55°C getrocknet und daraufhin über Nacht in 100 µl TE-Puffer (siehe unten) gelöst.

Proteinase K-Lösung:	10 µg Proteinase K Pulver in 1 µl H ₂ O _{bidest.} (= 10 mg/ml)
Zelllyse-Puffer:	10 mM Tris-HCL pH 8

	5 mM	EDTA
	0,5%	SDS
	0,4 M	NaCl
TE-Puffer (1l):	10 mM	Tris-HCL pH 8
	1 mM	EDTA

3.4.2 PCR-Ansatz zur Detektion der Cre-katalysierenden Rekombinase

Gesamtes Volumen pro Ansatz: 25 µl (24 µl ohne DNA):

	H ₂ O		10,5 µl
	Ready Mix Red Taq		12,5 µl
	Primer Mix: (Cre 1-4 je 10µM)		1 µl
	DNA		1 µl
Konditionen:	95°C 10 min	}	40x
	95°C 40 sec		
	58°C 40 sec		
	72°C 1,5 min		
	72°C 10 min		
	10°C ∞		

3.4.3 PCR-Ansatz zur Detektion RelA/p65-Lox Cre

Gesamtes Volumen pro Ansatz: 25 µl (24 µl ohne DNA):

	H ₂ O		10,5 µl
	Ready Mix Red Taq		12,5 µl
	Primer Mix: (p65 lox1 ; p65 lox2)		1 µl
	DNA		1 µl
Konditionen:	95°C 10 min	}	40x
	95°C 40 sec		
	58°C 40 sec		
	72°C 1,5 min		
	72°C 10 min		
	10°C ∞		

Fragmentgröße = Doppelbande - auf dem (2%igen) Gel: WT = ca. 250 bp
 KO = ca. 285 bp

Die Proben wurden in eine vorgeheizte PCR-Maschine gestellt und die Amplifikation der DNA erfolgte entsprechend den Reaktionsbedingungen.

Nach Beendigung des PCR-Programms wurden die Proben über Nacht bei 4°C oder für längere Zeit bei -20°C gelagert. Zur Analyse wurde ein Aliquot der PCR-Reaktion (10-15 µl) auf ein geeignetes Agarosegel aufgetragen.

3.4.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte eine Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurde 2% Agarose in TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht, und nach abkühlen bei 50-60°C Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in die Gelvorrichtung gegossen und bis zur Erkaltung bei RT inkubiert. Das Gel wurde dann in die mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer gelegt und ein 10-15 µl Aliquot der PCR-Reaktion sowie ein DNA-Marker (0,1 - 10 kb) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 110 V für 1,5 Stunden und die anschließende Detektion der Banden erfolgte in einem UV-Licht-Photosystem bei 302 nm.

50x TAE-Puffer: 2 M TRIS pH 8,5
 100 mM EDTA
 5,71% (v/v) Essigsäure (100%)

3.5 RNA-Extraktion aus Lebergewebe und quantitative Echtzeit-PCR

Die RNA-Extraktion erfolgte mittels eines RNeasy Mini-Kit (Fa. Quiagen) nach der im Kit empfohlenen Methode für Lebergewebe mit den im Kit enthaltenen Reagenzien.

Die in flüssigem Stickstoff sofort während der Sektion schockgefrorenen maximal 25 µg schweren Lebergewebestücke wurden hierzu in 600 µl RLT-Puffer mit jeweils 6 µl β-Mercaptoethanol mit dem Homogenisator 3-5 Sekunden auf Eis homogenisiert und anschließend für 3 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte indem die Lysate auf QIA-shredder- spin columns pipettiert wurde und zweimalig durch in 2 ml Sammelröhrchen bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge durch die Schredder abzentrifugiert wurden. Das resultierende Lysat wurde 1:1 mit 70%igem Ethanol gemischt und jeweils maximal 700 µl auf RNeasy Mini Columns pipettiert und 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert. Der resultierende durchgeflossene Rest in den 2 ml Sammelröhrchen wurde verworfen und die Prozedur wiederholt, bis das gesamte

Lysat/Ethanol-Gemisch einmal durch die RNeasy Mini Columns abzentrifugiert wurde. Die im Lysat enthaltenen Nukleinsäuren bleiben hierbei an die Silica-GelMembran des RNeasy Mini Columns gebunden. Danach wurde nach einmaligem Waschen mit 350 µl Puffer RW1 (15 Sekunden bei 10000rpm) je Säule 80 µl DNase I-Lösung (10 µl DNase I Stock-Lösung (RNase-Free) und 70 µl RDD-Puffer) für einen DNA-Verdau zugegeben und 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach folgte ein Waschschriff mit 350 µl RW1 - Puffer und zwei Waschschriffe mit 500 µl RPE-Puffer für jeweils 15 Sekunden bei 10000rpm, wobei der durchgeflossene Rest in den 2 ml Sammelröhrchen verworfen wird. Danach erfolgt eine erneute Zentrifugation ohne Puffer bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute und anschließend das Lösen der RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser und Sammeln in einem frischen Sammelgefäß durch Zentrifugation für eine Minute bei 10000rpm. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung von 2 µl mit einem Nana-Drop-Gerät.

3.5.1 Reverse Transkription

Durch reverse Transkription wurde die isolierte RNA in cDNA für die quantitative Echtzeit-PCR umgeschrieben. Hierzu wurden Reagenzien des TaqMan Reverse Transcription-Kit der Firma Applied Biosystems verwendet.

Reaktionsansatz:	5 µl	10x TaqMan RT Buffer	→ 1x
	11 µl	MgCl ₂ (25 mM)	→ 5,5 mM
	je 10 µl	dNTP-Mix	→ je 500 µM
	2,5 µl	Hexamers-Random	→ 2,5 µM
	1 µl	RNase-Inhibitor	→ 0,4 U/µl
	1,25 µl	Multiscribe RT (50U/µl)	→ 1,25 U/µl
	1 µg	RNA-Probe	
	ad 19,25 µl	RNase-free Wasser	

PCR-Programm: 25°C 10 min
 48°C 1 h
 95°C 5 min

Anschließend wurde die cDNA 1:5 in TE-Puffer verdünnt und bei -20°C gelagert.

TE-Puffer : 10 mM TRIS pH 8,0
 1 mM EDTA

3.5.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde mit den Reagenzien und dem TaqMan Gold RT-PCR Kit nach dem Protokoll des Herstellers Applied Biosystems durchgeführt.

Der Farbstoff SYBR Green I fluoresziert nach Bindung an doppelsträngiger DNA und somit steigt die Fluoreszenzintensität im Laufe der PCR an, da immer mehr doppelsträngige DNA synthetisiert wird. Die spezifischen Oligonukleotid-Sequenzen sind unter Material (3.1.5) aufgeführt.

Ansatz für die quantitative Echtzeit-PCR (25 μ l):

12,5 μ l	Power SYBR Green Mastermix
0,75 μ l	Echtzeit-Oligonukleotid forward (10 μ M)
0,75 μ l	Echtzeit-Oligonukleotid reverse (10 μ M)
6 μ l	H ₂ O
5 μ l	cDNA (4 ng/ μ l)

Bedingungen für die quantitative Echtzeit-PCR:

95°C 10 min

95°C 15 sec

60°C 1 min

95°C 15 sec

60°C 1 min

60°C +0,3°C/min Schmelzkurvenanalyse

95°C 15 sec

40x

Je Well wurde der oben beschriebene Mastermix- Ansatz ohne cDNA (20 μ l) vorgelegt und anschließend in jedes Well 5 μ l der verdünnten cDNA, der Standards oder TE-Puffer als Negativkontrolle hinzugegeben. Pro Probe erfolgte stets eine doppelte Pipettierung und Reaktion als Kontrolle. Im Anschluss an jede Echtzeit-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt um Test-Fehler auszuschließen und die Qualität der Oligonukleotide zu bestimmen. Hierzu wurde die Temperatur kontinuierlich erhöht und die Veränderung der Fluoreszenz gemessen. Am Schmelzpunkt des PCR-Produkts trennen sich die DNA-Stränge und die Fluoreszenz sinkt abrupt ab. Als probeninterne Kontrolle wurde Cyclophilin, das stets gleichmäßig exprimiert wird immer mitbestimmt. Hierdurch konnte mit der Applied Bioscience StepOne Software v2.1 der semiquantitative Wert der zu bestimmenden Probe im Verhältnis zu Cyclophilin angegeben werden (Delta-CT-Methode). Anschließend wurde die relative Veränderung der mRNA Expression (Fold changes) im

Verhältnis zur Negativkontrolle (null Stunden/ ohne Stimulation) berechnet.

3.6 Proteinextraktion und Western-Blot-Analysen

3.6.1 Ganzzellextrakte aus Lebergewebe

Hierfür wurde sofort nach der Sektion in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Lebergewebe verwendet. Der Lysepuffer (Cell Signaling; 10x Stock) wurde 1:10 mit ddH₂O verdünnt (resultierend 1x Lysepuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml leupeptin) und je 1:100 von Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II (Fa. Calbiochem) und Proteinase Inhibitor Cocktail Set III (Fa. Calbiochem) zugegeben. In die Kryo-Röhrchen wurde zu den direkt nach der Sektion der Maus zugeschnittenen Leberstücken die circa fünffache Menge des Gewebsvolumen an Lysepuffer mit Proteinase- und Phosphataseinhibitor (siehe oben) hinzugegeben. Die Proben wurden sofort auf Eis mittels eines Stabhomogenisators mehrmals kurz homogenisiert und dazwischen erneut auf Eis gekühlt. Das homogenisierte Gewebe wurde darauf 15 min bei 4°C geschüttelt und nach Überführung in ein neues Epi 15 min bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand (Proteinlysate) wurde danach aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

3.6.2 Ganzzellextrakte nach Kupffer-Zell-Isolierung

Nach Isolierung und Kultivierung von Kupffer-Zellen wurde zur Gewinnung von Ganzzellextrakten vor der Ernte das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurde 100 μ l Lysepuffer (mit Phosphatase- und Proteinase-Inhibitor siehe 3.7.1) pro Well einer 12-Well-Platte hinzugefügt und die Zellen mit einem Zellschaber auf Eis abgelöst. Das Lysat wurde in ein Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt und 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand (Proteinlysate) in Aliquots verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

3.6.3 Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford Assay)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford. Das Prinzip dieser Methode beruht auf Veränderung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant

Blue quantitativ durch Proteinbindung. Das Protein Assay Dye-Concentrate von Bio-Rad wurde 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und 300 µl pro Well in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Als Standardreihe wurde in aufsteigender Konzentration nach einer Leerprobe, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml und 10 mg/ml von Bovinem Serumalbumin (BSA) in die erste Reihe der 96-Well-Platte pipettiert.

Ein Aliquot der Proteinproben wurde jeweils 1:5 (oder bei sehr hohen Proteinkonzentrationen 1:10) mit destilliertem Wasser verdünnt und 2 µl in je zwei Wells zur Doppelbestimmung pipettiert und vermischt. Darauf erfolgte die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bei 595 nm in einem ELISA-Reader der Fa. Bio-Rad. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption der Probe mit der Absorption der Proteinstandardreihe verglichen.

Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Die zu untersuchenden Proteine wurden nach ihrer elektrophoretischen Mobilität aufgetrennt. Hierfür wurde nach der Konzentrationsbestimmung Aliquots der Proteinlysate mit Lysepuffer auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt. Im Anschluss daran wurde zu allen Proben im Verhältnis 1:1 vierfach Proteinladepuffer zugegeben. Die Proben wurden danach für 4 min bei 95°C im Heizschüttler erhitzt, direkt danach auf Eis gekühlt und vor dem Laden kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Proteinladepuffer: 0,5 ml	Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	250 mM
8,0 ml	SDS (10%)	(8 %)
4 ml	Glycerol	(40 %)
2 ml	2-Mercaptoethanol	(20 %)
0,8mg	bromphenol-blue	(0,008 %)
dH ₂ O	auf insges.10 ml	

Die Proteinproben werden in Anwesenheit des starken anionischen Detergenz Natriumdodecylsulphat (SDS, sodium dodecyl sulfate) und eines reduzierenden Agens (2-Mercaptoethanol) und durch Erhitzen denaturiert, wodurch sekundäre und tertiäre Strukturen aufgebrochen werden. SDS bindet an hydrophobe Bezirke der Proteine, wodurch die Proteine je nach Proteingröße negativ geladen werden. Die negative Ladung kann dann durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte also durch Natriumdodecylsulphat (SDS) - Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Die Menge an gebundenem SDS, mit resultierender, negativer Ladung des Proteins ist dem Molekulargewicht des Proteins proportio-

nal. Dadurch werden die Proteine nach ihrer Größe im Acrylamid-Gel aufgetrennt.

3.6.4 Natriumdodecylsulphat (SDS) – Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die denaturierende SDS-PAGE wurde in einem diskontinuierlichen Gelelektrophorese-System durchgeführt um die Proteine aufzukonzentrieren. Der Acrylamidgehalt wurde je nach Größe des aufzutrennenden Proteins gewählt. In den gezeigten Abbildungen wurde ein 10%iges Trenngel verwendet.

10%iges Trenngel:

- 4,1 ml dH₂O (aqua dest.)
- 2,6 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris- HCl, pH 8,8)
- 3,3 ml Acrylamid 30% (polyacrylamid/bis- 37,5:1)
- 100 µl 10% SDS
- 50 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- 15 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Das Trenngel wurde nach Zugabe von APS und TEMED sofort in eine Minigel-Apparatur gegossen und der obere Rand mit Isopropanol abgedichtet. Dadurch konnte eine saubere, glatte Oberfläche erzeugt werden. Nach Polymerisierung und Aushärtung des Trenngels wurde das Sammelgel nach Abgießen des Isopropanol darauf gegossen und ein Kamm für die Taschen eingefügt.

5%iges Sammelgel:

- 3 ml dH₂O (aqua dest.)
- 1,3 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris- HCl, pH 6,8)
- 750 µl Acrylamid 30% (polyacrylamid/bis- 37,5:1)
- 50 µl 10% SDS
- 25 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- 10 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Nach Aushärtung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gespült. Nach Einspannen in die mit Laufpuffer gefüllte Gelelektrophoresekammer erfolgte ein Gelvorlauf von ca. 30 Minuten bei 120 mV.

10X SDS Laufpuffer:

- 6,06 g Tris Base (0,25 M, pH 8,3)
- 28,8 g Glycin (1,92 M)
- 20 ml 10% SDS (1%)

Danach wurden die Taschen mit 20 µl der denaturierter Proteinprobe (2,5 mg/ml siehe oben) beladen. Als Protein Standard wurde Precision Plus Protein All Blue Standard (Bio-Rad) 1:1 verdünnt mit zweifach Proteinladepuffer verwendet. Darauf wurde eine Spannung von 80 – 100 mV zur Konzentrierung im Sammelgel und eine Auf-

trennungsspannung von 100-120 mV bei Erreichen des Trenngels angelegt. Die Dauer der Gelelektrophorese erfolgte in Abhängigkeit der Größe des zu detektierenden Proteins. Als Kontrolle dienten die Banden eines Proteinstandards.

3.6.5 Western-Blot

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst, das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt und mittels einer Semi-Dry Blotting Apparatur auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran übertragen. Nach Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol (15 s) und anschließendem Waschen in aqua dest. (15 s) wurde diese kurz in Transferpuffer (siehe unten) zwischengelagert. In die waagrecht montierte Blot-Apparatur wurden zunächst drei in Transferpuffer getränkte Saugpapiere (Whatman Paper) gelegt und die Apparatur befeuchtet. Darauf kam die aktivierte PVDF-Membran, dann das Polyacrylamidgel und zuletzt wieder drei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere. Die Apparatur wurde vorsichtig geschlossen und mit 150 mA für 50 Minuten geblottet.

Transferpuffer: 48 mM TRIS-HCl (pH 8,3)
 39 mM Glycin
 0,037% SDS
 20% Ethanol

3.6.6 Immunologische Detektion der zu untersuchenden Proteine

Zur Reduktion von unspezifischen Bindungen wurde die Membran mit dem nach Elektrotransfer darauf befindlichen Proteinen mittels Odyssey Blocking Buffer (1:1 mit PBS verdünnt) für 60 min bei RT auf einer Schüttelplatte geblockt und danach kurz in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert. Dies geschah meist bei 4°C auf einer Schwenkplattform über Nacht. Die primären Antikörper, gegen Strukturen des nachzuweisenden Proteins gerichtet, wurden in Verdünnungen mit 1:1 Odyssey Blocking Buffer und steriler Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS; phosphate buffered saline) benützt. Für die Verdünnungen siehe Kapitel 3.1.3. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend mit PBS/ 0,1% Tween mehrmals für jeweils 10 min gewaschen. Die Inkubation mit den an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten, sekundären Antikörpern erfolgte lichtgeschützt für 30 min bis 1 h bei RT (Verdünnungen siehe Kapitel 3.1.3.). Danach wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 10 min auf

einer Schwenkplattform gewaschen. Die Membran konnte dann sofort auf dem Odyssey Infrared Imager eingescannt werden. Die Auswertung erfolgte mit der integrierten Odyssey Software. Als Ladekontrolle wurde in jeder Western Blot Membran das ubiquitär vorkommende zytoplasmatische β -Actin nachgewiesen und quantifiziert.

3.7 Histologische Methoden

3.7.1 Prozessierung von Gewebe für Gefrierschnitte (Kryos)

Das aus der Sektion oder Operation gewonnene Gewebe wurde zunächst 1 h bei RT in PFA 4% (Paraformaldehyd) vorfixiert. Zur Entwässerung wurde das Gewebe danach in eine 15%ige Sucrose-Lösung überführt und bei 4°C für 4-6 h (je nach Größe) darin belassen. Darauf erfolgte die Überführung in 30%ige Sucrose-Lösung bei 4°C für ungefähr 12 h über Nacht. Anschließend wurde das Gewebe in Tissue-Tek[®] blasenfrei eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert. Gewebsschnitte wurden mit dem Kryotom auf 7 μ m dicke Schnitte zugeschnitten und auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen.

3.7.2 Prozessierung von Gewebe für die Paraffinhistologie

Hierfür wurden die Gewebeproben in wässriger 4% Formalinlösung (PFA; siehe oben) 20 h bei RT im Dunkeln fixiert. Dies diente der Erhaltung des Gewebes und wurde bei großen Präparaten auf 24 h ausgedehnt. Danach erfolgte die Überführung der Gewebe in eine Entwässerungsmaschine. Dort erfolgte eine aufsteigende Alkoholreihe von 20% Isopropanol bis 100% in 20% Schritten alle 60 min. In 100%igem Isopropanol verblieben die Proben für mindestens 8 h und es folgte eine dreistufige Xylol-Reihe. Anschließend wurden die Proben in Paraffinöl und dann im Wärmeschrank bei 55°C bis 65°C erhitzt und nach erneuten 8-16 h in heißes Paraffin eingegossen, das langsam im Wärmeschrank und später bei RT aushärtete. Die entstandenen Paraffin-Blöcke wurden vor dem Schneiden bei -20°C gekühlt. Mittels des Mikrotoms wurden 3,5 μ m dicke Serienschnitte gemacht und aus einem Heißwasserbad (ca. 45°C) auf unbehandelte Objektträger aufgezogen. Diese Schnitte wurden dann über Nacht bei RT getrocknet.

3.7.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)- Färbung

Die HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) wurde als Routinefärbung bei allen

gewonnen Gewebeproben nach partieller Hepatektomie eingesetzt, um die Gewebsarchitektur und ggf. pathologische Veränderungen zu beurteilen. Hierfür wurden die getrockneten Schnitte mit Xylol entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe wieder hydriert. Danach erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin. Anschließend eine aufsteigende Alkoholreihe und der Abschluss mit Xylol. Danach wurden die gefärbten Schnitte eingedeckelt.

Färbereihe: 2 x 5 Minuten in Xylene/Rotihistol

Je 2 x 5 Minuten in 100%, in 95% und in 80% Ethanol

1 x 5 Minuten in dH₂O

10-30 Sekunden Hämosin

spülen in dH₂O

30-60 Sekunden Eosin

2 x kurz in 80% Ethanol spülen

Je 2 x 60 Sekunden in 96 und 100% Ethanol

5 Minuten in Xylene/Rotihistol

Zur Auswertung wurden die Schnitte unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

3.7.4 BrdU (Bromodeoxyuridin)- Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurde die indirekte Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC) – Methode verwendet. Die getrockneten Paraffinschnitte wurden hierfür ebenso entparaffinisiert und durchliefen die absteigende Alkoholreihe zur Rehydrierung (siehe 3.10.1). Darauf wurden die Schnitte in einer Mikrowelle bei maximaler Watt Leistung acht bis neun Minuten in einer auf Citrat basierten Antigen-Unmasking-Solution (Vector-Lab) gekocht und zwanzig Minuten bei RT abgekühlt. Danach wurde die Schnitte in 1xPBS (phosphate buffered saline) überführt.

Nach Einspannen der Schnitte in eine Immunhistologie-Kammer wurden diese erneut 3x mit 1x PBS gewaschen und die endogene Peroxidase mittels 3% H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) für 10 min geblockt und anschließend 3x mit 1x PBS gewaschen. Zum Blocken von unspezifischen Bindungen erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 200 µl 5%iger Blocklösung mit Serum der Spezies in der zweite Antikörper hergestellt wurde. Ein ml 5% Serumblocklösung enthält: 850µl 1xPBS, 50µl Goat-Serum, 4 Tropfen Avidin-Lösung. Danach wurde erneut 3 x mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer mit 150 -200 µl Lösung des ersten Antikörper (anti-BrdU, rat; Fa. Serotec; Verdünnung: 1:200 in 1xPBS, Goat-Serum, plus Bio-

tin) bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Schnitte wurden am nächsten Tag wieder in die Immunhistologie-Kammern eingespannt und 3x mit 1x PBS gewaschen. Als nächstes erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 150 -200µl der Lösung des biotinylierten zweiten Antikörpers (Goat anti-rat; Verdünnung: 1:500 in 1x PBS, Goat-Serum) für eine Stunde bei RT. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte mit 200 µl des ABC-Reagenz (zwei Tropfen Avidin-Reagenz, zwei Tropfen Biotin-Reagenz ad 5 ml 1x PBS) für 30 Minuten inkubiert und erneut 3 x mit 1x PBS gewaschen. Abschließend wurde die 3'3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung lichtgeschützt angesetzt (2 Tropfen buffer stock, 2 Tropfen H₂O₂, 4 Tropfen DAB ad 5 ml dH₂O) und 300 µl pro Schnitt für ca. 5 min im Dunkeln inkubiert und sofort danach 3x mit dH₂O gewaschen. Zu der spezifischen Braunfärbung des gesuchten Antigens (BrdU) durch DAB wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 2 Sekunden durchgeführt. Sofort nach Eintauchen der Schnitte in Hämatoxylin wurde eine Wässerung der Schnitte in dH₂O vorgenommen. Zum Abschluss erfolgte dann eine aufsteigende Alkoholreihe und eine Xylene/ Rotihistol-Reihe (siehe 3.6.3) mit anschließendem Eindeckeln mit Mounting Medium.

Auswertung der BrdU-Immunhistologie

Zum Nachweis des in der Synthesephase an die DNA angelagerte BrdU wurden immunhistochemische Färbungen der Lebergewebe aller für die Zeitpunkte 24, 36, 48, 72 und 168 h (= 7 d) operierten Mäuse durchgeführt. Darauf wurden von den immunhistologischen Schnitten mit einer an ein Zeiss-Lichtmikroskop angeschlossener Digitalkamera (Axio Vision, Fa. Zeiss) in einem Kreuzraster von links oben nach rechts unten und von links unten nach rechts oben in zwei verschiedenen Leberlappen acht Bilder in 200facher Vergrößerung gemacht. Daraufhin folgte die Auszählung aller BrdU-positiven, im Vergleich zu den lediglich Hämatoxylin gefärbten Hepatozytenkernen, in allen acht Bildern. Das resultierende Verhältnis aus BrdU-positiven zu der Gesamtzahl der Hepatozytenkernen des 200fachen Bildausschnittes wurde als Prozentsatz angegeben.

3.7.5 TUNEL - Immunhistologie

Durch die Aktivität von Endonukleasen wird der Desoxyribonukleinsäure-Strang der Zelle im Rahmen der Apoptose zerteilt und es werden Hydroxygruppen an den Enden frei. Hier kann die Terminale Desoxyribosyl Transferase biotinylierte dUTP ein-

bauen, die wiederum über eine Avidin-Peroxidase-Reaktion und DAB gefärbt werden können und somit apoptotische Zellen detektieren (Terminale Desoxyribosyl Transferase Mediated biotinylated dUTP Nick End Labelling)(Gavrieli et al., 1992). Hierzu wurden Paraffinschnitte wie in Kapitel 3.6.4. deparaffinisiert und rehydriert. Nach Blocken der endogenen Peroxidase wurde die TUNEL-Kit-Lösung (Fa. Roche) angesetzt und je 50 µl pro Schnitt aufgetragen. Nach abdecken des Objektträgers mit Parafilm wurde bei 37°C 1 h inkubiert. Danach wurde wieder 3x mit 1x PBS gewaschen und die Schnitte mit 50 µl der Converter-POD-Lösung des TUNEL-Kit bei 37°C für 30 min inkubiert. Dann wurden die Schnitte mit je 300 µl DAB-Lösung 10 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Eosin für ungefähr 5 s. Abschließend folgte die aufsteigende Alkohol- und Histoclear Reihe (siehe 3.6.3.) und Eindeckeln mit Mounting Medium.

3.7.6 RelA/p65-Immunhistologie

Die Paraffinschnitte wurden wie in Kapitel 3.6.4. deparaffinisiert, rehydriert und mit Antigen-Unmasking-Solution behandelt. Nach Blocken der endogenen Peroxidase und Inkubation mit 5%iger Serumblocklösung (5% Donkey-Serum) wurde erneut 3x mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer mit 150-200 µl Lösung des ersten Antikörper (anti-p65 sc372-G, goat; Fa. Santa-Cruz; Verdünnung: 1:200 in 1x PBS, Donkey-Serum, plus Biotin) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach waschen mit 1x PBS erfolgte danach die Inkubation der Schnitte mit 150-200 µl der Lösung des biotinylierten zweiten Antikörpers (Donkey anti-goat; Verdünnung: 1:500 in 1x PBS, Donkey-Serum) für 1h bei RT. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte mit 200 µl der ABC-Reagenz für 30 min inkubiert, erneut 3x mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl pro Schnitt 3'3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung lichtgeschützt für ungefähr 5 min im Dunkeln inkubiert und sofort danach 3x mit dH₂O gewaschen. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin für 2 bis 5 s durchgeführt. Abschließend folgte die aufsteigende Alkohol- und Histoclear Reihe (siehe 3.6.3.) und Eindeckeln mit Mounting Medium.

3.8 Auswertung und Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Angabe dem jeweiligen *standard error of mean* (SEM; Standardabweichung (SD) der Proben/ die Wurzel von n-Proben, als Standardabweichung der Population) dargestellt. Beim Vergleich zweier Messwerte

wurde zur Berechnung der Signifikanzen ein zweiseitiger Student's t-Test für unabhängige Stichproben verwendet und Werte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel, SPSS und SigmaStat durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Hepatozyten-spezifische Deletion von RelA/p65 in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen führt nicht zu vermehrtem Zellschaden nach 2/3-PHx

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass eine hohe Empfindlichkeit der Hepatozyten nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 für Apoptose nach Stimulation mit sehr geringen TNF-Dosen in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen *in vivo* und *in vitro* besteht (Geisler, et al., 2007). Da mehrere Studien signifikante TNF-Serumspiegel innerhalb der ersten Stunden nach partieller Hepatektomie beschreiben und TNF von einigen Autoren als mitentscheidendes Signal für die Initiierung der Leberregeneration betrachtet wird (Fausto, et al., 2006), würde man auch nach PHx ein erhöhtes Ausmaß an Zellschaden bzw. Apoptose nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von NF- κ B erwarten.

Zur Untersuchung des Ausmaßes der Gewebsschädigung nach PHx wurden daher Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung der transaktivierenden NF- κ B Untereinheit RelA/p65 (*Rela^{F/F}AlbCre* Mäuse) sowie Cre-negative Kontrollmäuse (*Rela^{F/F}*) einer 2/3-PHx unterzogen und die Bestimmung verschiedener Leber- und Cholestaseparameter im Serum durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 6, 24, 36, 48, 72 und 168 h nach PHx wurden die Serumspiegel von ALT, AST und Bilirubin bestimmt (n= 3-6 pro Zeitpunkt und Versuchsgruppe). Normalerweise kommt es zu einem transienten Transaminasenanstieg (ALT, AST) nach PHx, was durch den operativ bedingten Gewebsschaden sowie den nekrotischen Leberresten am Absetzungsrand der resezierten Lappen bedingt ist (Mitchell, et al., 2008). Überraschenderweise waren weder ALT- noch AST-Serumspiegel nach PHx signifikant unterschiedlich in Knockout- (*Rela^{F/F}AlbCre*) und in Kontrollmäusen (Abbildung 7 B und C). Zudem war das Serum-Gesamtbilirubin in *Rela^{F/F}AlbCre* und den Kontrolltieren zu den verschiedenen Zeitpunkten post PHx mit stets unter 0,8 mg/dl nie signifikant erhöht (Abbildung 7 A). Zusätzlich wurden die Restlebern von *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Kontrollmäusen zu den Zeitpunkten 6, 24, 36, 48, 72 und 168 h nach PHx histologisch untersucht (HE-Färbungen). Hier zeigten sich keine signifikanten Nekrosen oder entzündliche Infiltrate nach PHx (Abbildungen nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten bereits darauf hin, dass Hepatozyten-spezifisches RelA/p65 unter unseren Versuchs- bzw. Operationsbedingungen nicht essentiell zur Wahrung der Gewebsintegrität nach partieller Hepatektomie ist.

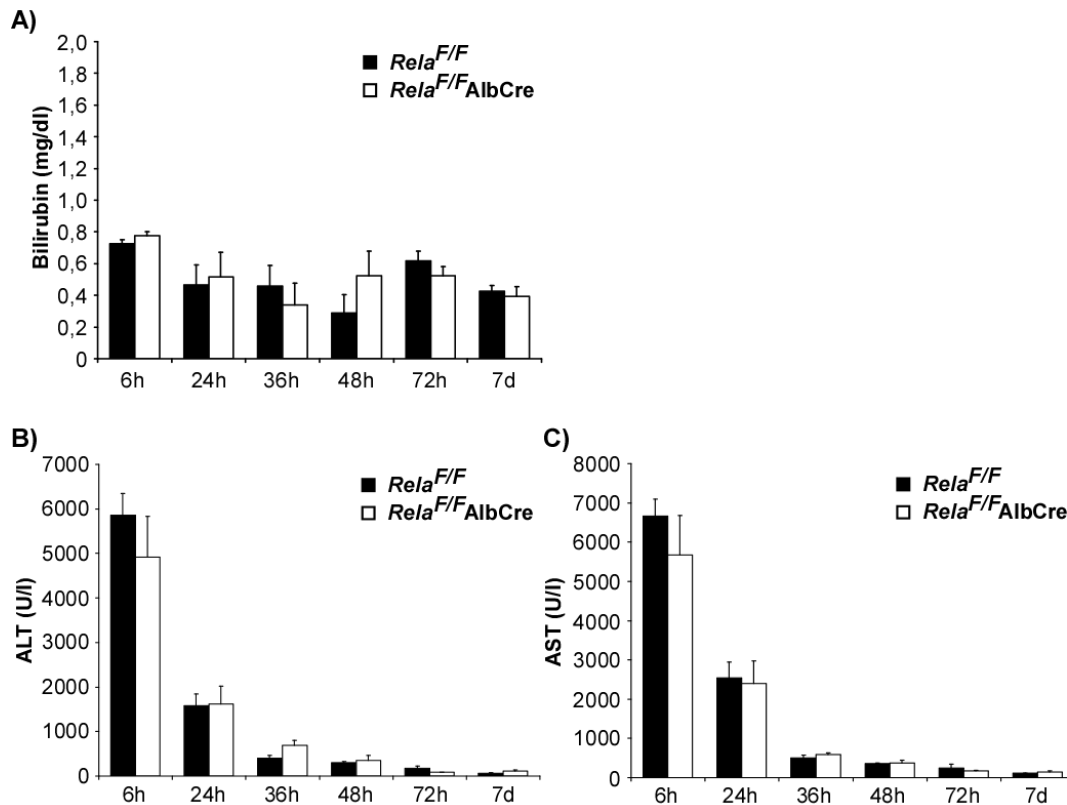


Abbildung 7: ALT-, AST- und Bilirubin-Serumchemiewerte in *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Kontrollmäusen nach PHx.

Eine 2/3 PHx wurde bei *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Kontrollmäusen durchgeführt und die Bilirubin-, ALT- und AST-Serumspiegel zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx bestimmt (n= 3-6 pro Zeitpunkt). Die Werte sind als Mittelwerte +/- SEM angegeben. **(A)** Das Gesamtbilirubin war zu keinem Zeitpunkt pathologisch erhöht. **(B)** Sowohl ALT-, **(C)** als auch AST-Serumspiegel zeigen zwischen *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Kontrollmäusen keine signifikanten Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten.

Um mögliche erhöhte Apoptoseraten in den regenerierenden Restlebern nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 nachzuweisen, wurde das Lebergewebe von *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Kontrollmäusen mittels TUNEL-Immunhistologie untersucht. Als Positivkontrollen wurde nicht operierten *Rela^{F/F}AlbCre* und *Rela^{F/F}*-Mäusen mTNF (10 ng/g KG) i.v. injiziert und die Lebern 6 h nach Injektion untersucht. Nach PHx konnte in der lichtmikroskopischen Auswertung auch hier weder nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in den *Rela^{F/F}AlbCre* noch in den Kontrollmäusen erhöhte Apoptoseraten nachgewiesen werden. Dagegen zeigten *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäuse nach mTNF-Injektion als Positivkontrollen im Vergleich zu den Kontrollmäusen wie erwartet massive Apoptosen (Abbildung 8, (Geisler, et al., 2007)). Obwohl in früheren Studien eine essentielle zytoprotektive Funktion von NF- κ B in Hepatozyten auch nach PHx angenommen wurde (Chaisson, 2002; Imuro, et al., 1998; Yang, et al., 2005) und Hepatozyten nach Inhi-

bierung des NF- κ B Signalwegs hoch empfindlich für TNF-induzierte Apoptose sind (Geisler, et al., 2007; Luedde, 2005; Maeda, et al., 2003), zeigen unsere Untersuchungen, dass ein funktionelles RelA/p65 unter unseren Versuchsbedingungen nicht essentiell ist, um Hepatozyten nach PHx vor Apoptose oder anderen Leberzellschäden zu schützen.

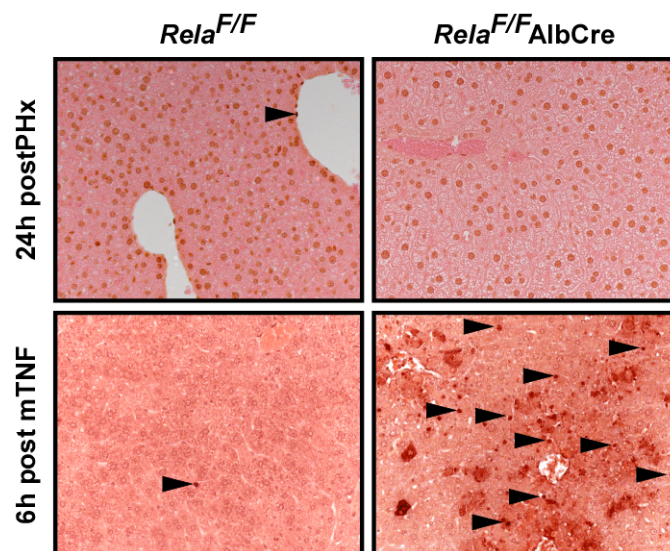


Abbildung 8: *Rela*^{F/F} *AlbCre*-Mäuse weisen keine erhöhte Apoptoserate nach PHx im Vergleich zu TNF-Injektion auf.

Repräsentative TUNEL-Immunhistologie von *Rela*^{F/F} *AlbCre*- und *Rela*^{F/F}-Kontrollmäusen 24 h nach PHx (oberen Reihe) sowie als Positivkontrolle 6 h nach mTNF-Injektion (i.v., 10 ng/g KG, untere Reihe). Es wurden keine signifikanten Apoptosen in den Restlebern nach PHx zu den einzelnen Zeitpunkten festgestellt während *Rela*^{F/F} *AlbCre*-Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren massive Apoptosen nach mTNF-Injektion aufweisen (je 200-fache Vergrößerung).

4.2 *Rela*^{F/F} *AlbCre*-Mäuse zeigen einen beschleunigten Zellzykluseintritt nach PHx

Frühere Studien deuten auf eine essentielle, proliferative Rolle von NF- κ B in den Hepatozyten nach PHx hin (Iimuro, et al., 1998; Yamada, et al., 1998). In dieser Arbeit zeigte sich nicht etwa eine verminderte, sondern erstaunlicherweise sogar eine beschleunigte Regenerationsfähigkeit der Leber nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in *Rela*^{F/F} *AlbCre*-Mäusen. Die Bestimmung der DNA-Synthese wurde zu den Zeitpunkten 24, 36, 48, 72 und 168 h nach PHx mittels anti-BrdU-Immunhistochemie durchgeführt. *Rela*^{F/F} *AlbCre*-Mäuse zeigten bei 36 Stunden signifikant mehr BrdU-positive Hepatozytenkerne als die Kontrollen (*Rela*^{F/F}) (Abbildung 9 A und C). Das Verhältnis an Hyperplasie zu Hypertrophie wurde durch Bestimmung der absoluten Zahl an Hepatozytenkernen in 8 Bildausschnitten bei 200-

facher Vergrößerung bestimmt. Trotz des beschleunigten Zellzykluseintritts nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen *Rela*^{F/F}*AlbCre*- und den Kontrollmäusen (Abbildung 9 B). Somit ist bei der bekannten Neigung der Hepatozyten zur Polyploidie (Sigal et al., 1999) keine unterschiedliche Zellteilungsrate im Verhältnis zur DNA-Synthese zwischen *Rela*^{F/F}*AlbCre*- und Kontrollmäusen zu beobachten.

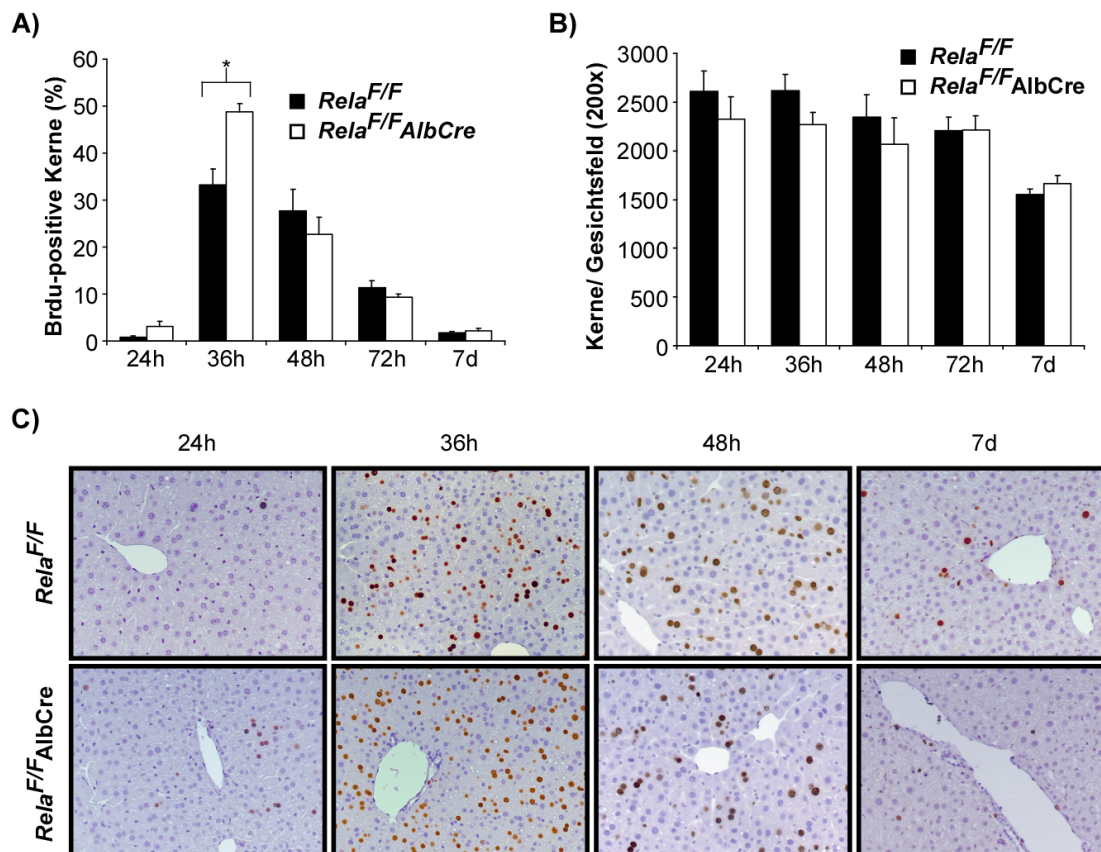


Abbildung 9: *Rela*^{F/F}*AlbCre*-Mäuse zeigen einen beschleunigten Zellzykluseintritt nach PHx.

Rela^{F/F}*AlbCre*- und *Rela*^{F/F} Kontrollmäuse wurden einer 2/3-PHx unterzogen und zwei Stunden vor der jeweils geplanten Sektion BrdU (i.p. 100 mg/kg KG) injiziert. **(A)** Die Quantifizierung der DNA-Synthese erfolgte durch Auswertung der immunhistochemisch BrdU-positiven Hepatozyten im Verhältnis zur Gesamtzahl an Hepatozyten aus acht Bildern in 200-facher Vergrößerung zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx (n= 4-8 pro Zeitpunkt und Genotyp) (*p= 0,002). **(B)** Das Verhältnis an Hyperplasie zu Hypertrophie wurde als absolute Zahl der Hepatozytenkerne als Mittelwert aus acht Bildausschnitten (200 fache Vergrößerung) aller zu diesen Zeitpunkten operierten *Rela*^{F/F}*AlbCre* und *Rela*^{F/F}-Mäusen ermittelt. **(C)** Repräsentative anti-BrdU-Immunhistochemie von *Rela*^{F/F}*AlbCre* und *Rela*^{F/F}-Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx (200 fache Vergrößerung).

Der immunhistochemisch beschleunigte Zellzykluseintritt nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung in *Rela*^{F/F}*AlbCre*-Mäusen wurde in Western-Blot Analysen zu den Zeitpunkten 24, 36 und 48 h nach PHx überprüft. Obwohl in früheren Studien eine Abhängigkeit der Cyclin D1 Expression von einer NF-κB-Aktivierung mit Re-

IA/p65-p50 Heterodimere mit Reduktion der Promoter Aktivierung von *cyclin D1* (*CCND1*) nach Überexpression eines NF- κ B-Super-repressors (nicht-phosphorylisierbares I κ B α) beschrieben wurde (Joyce et al., 1999), zeigte sich in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen überraschend eine deutlich stärkere Expression von Cyclin D1 im Vergleich zu den Kontrollen zu den Zeitpunkten in Western-Blot Analysen (Abbildung 10 A). Die Expression von Cyclin D1 und dessen Bindung an CDKs (Cyclin dependent kinases) ist essentiell für den G1 zu S-Phasen Übergang im Zellzyklus und scheint daneben auch den Austritt aus der Ruhephase (G0) von Zellen zu bahnen (Resnitzky et al., 1994). Dies bestätigen die Ergebnisse aus der BrdU-Immunhistologie nach PHx (Abbildung 9). Das Ergebnis einer verstärkten Cyclin D1 Expression in der Western-Blot Analyse nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in den *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen konnte ebenso durch eine Echtzeit-PCR Analyse der mRNA-Level von Cyclin D1 mit höherer Expression von Cyclin D1 ($p=0,057$) 24 h nach PHx im Vergleich zu den Kontrollmäusen gezeigt werden (Abbildung 10 B). Western-Blot Analysen zu den Zeitpunkten 24, 36 und 48 h nach PHx zeigten ebenso eine stärkere Expression von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) und deutlich stärkere und frühere Expression von Cyclin A in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen im Vergleich zu den *Rela^{F/F}*-Kontrollmäusen (Abbildung 10 A). PCNA ist im Zellzyklus während der S-Phase aktiv und ist innerhalb einer Replikationsblase essentiell als Bindestruktur für humane DNA-Polymerasen in der DNA-Replikation (Acharya et al., 2008). Das Cyclin A wird als Zellzyklusprotein nach Bindung mit CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) für den Progress durch die S-Phase benötigt (Girard et al., 1991). Dies spricht für einen früheren Eintritt in die Synthesephase und früheren Progress von der S-Phase in die G2-Phase der Hepatozyten in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen. Nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 wird die beschleunigte Transition der Hepatozyten in die Synthesephase somit mit einer verkürzten G1 Phase durch eine deutlich stärkere Expression von Cyclin D1 erklärt. Diese Ergebnisse unterstützen die immunhistochemische Beobachtung einer beschleunigten Zellzyklus Progression in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäuse nach PHx.

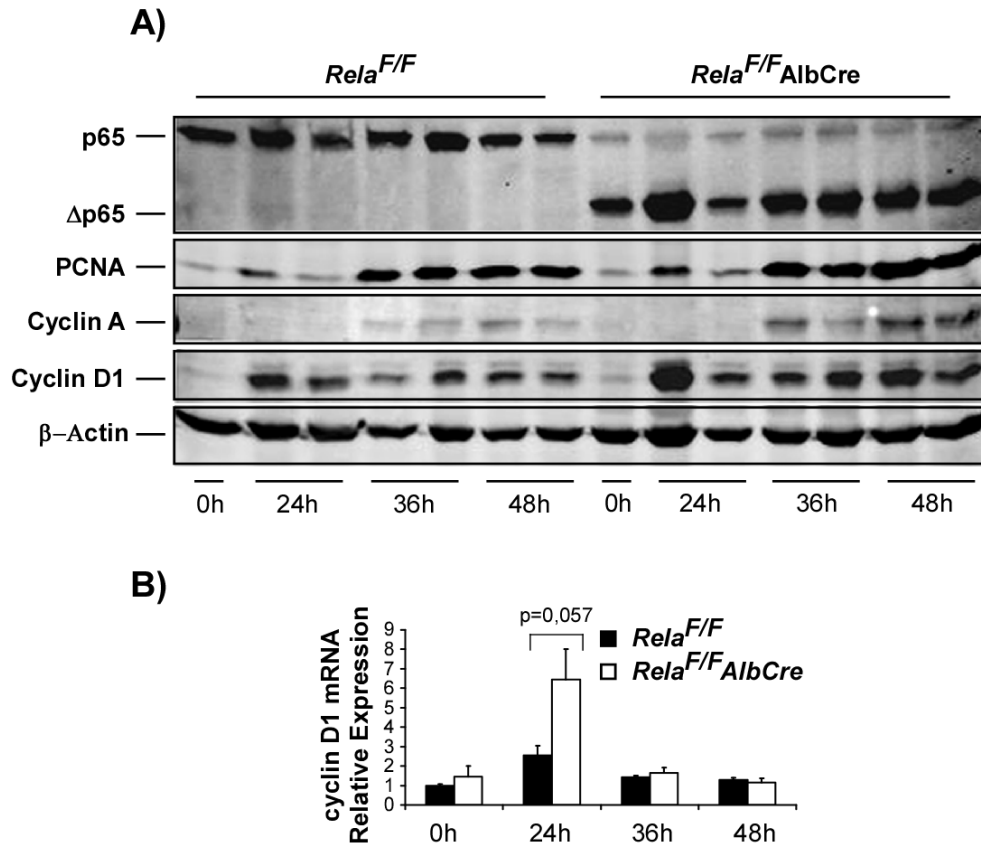


Abbildung 10: Beschleunigter Zellzykluseintritt mit veränderter Expression Zellzyklus-assoziiierter Proteine in *Rela*^{F/F}AlbCre-Mäusen nach PHx.

(A) Proteinlysate der regenerierenden Leber von *Rela*^{F/F}AlbCre- und Kontrollmäusen (*Rela*^{F/F}) wurden in Western-Blot Analysen auf die Expression von Zellzyklus-assoziierten Proteinen (PCNA, Cyclin A, Cyclin D1) zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx untersucht. Eine effektive Deletion des Wildtyp-RelA/p65 in den *Rela*^{F/F}AlbCre- Mäusen zeigt das trunkierte, funktionell inaktive Δp65. Es wurden jeweils zwei repräsentative Lysate pro Zeitpunkt und Genotyp aufgetragen und β-Actin diente als Ladungskontrolle. **(B)** Quantitative Cyclin D1-mRNA-Analyse in *Rela*^{F/F}AlbCre- und *Rela*^{F/F}-Mäusen aus Lebergewebe vor (0 h) und 24, 36 und 48 h nach PHx. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse als Dreifachbestimmung und Normalisierung auf Cyclophilin.

4.3 PHx-induzierte Zytokinantwort nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in *Rela*^{F/F}AlbCre-Mäusen.

Bei deutlich früherem Zellzykluseintritt und beschleunigter Progression nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in *Rela*^{F/F}AlbCre- Mäusen stellt sich die Frage nach den dafür ursächlichen Mechanismen nach PHx. Frühe Ereignisse nach partieller Hepatektomie, welche die Transition der ruhenden, voll differenzierten Hepatozyten (G0-Phase) in die G1-Phase initiieren können, wurden bereits vielfach untersucht. Ereignisse mit Anstieg von Zytokinen, wie TNF α , oder IL-6, der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, STAT3 und der Induktion von raschen frühen Genen (*immediate early genes*), wie *c-fos*, *c-jun* und *c-Myc* wurden in einer hypothetischen *Priming* Phase als Initiierung der Leberregeneration nach PHx sub-

sumiert (Fausto, 2000). Eine in früheren Studien häufiger berichtete, transiente Erhöhung der TNF α -Serumspiegel in der frühen Phase nach PHx (Cressman et al., 1995; Cressman, et al., 1994; Iwai et al., 2001; Trautwein, et al., 1996), waren in dieser Arbeit weder nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in *Rela^{F/F}AlbCre*- Mäusen noch in den Kontrollmäusen (*Rela^{F/F}*) mittels eines hoch sensitiven ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) zu den Zeitpunkten 1, 4 und 6 h nach PHx nachweisbar (n= 3-4 pro Zeitpunkt und Genotyp, Abbildung nicht gezeigt). Die relative Expression von TNF-mRNA im Lebergewebe nach PHx waren ebenso kaum messbar (CT Werte >30) und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Rela^{F/F}AlbCre*- und Kontrollmäusen nach PHx (Abbildung 11 A). Auch in anderen Studien konnte eine Erhöhung der TNF- Serum- oder Gewebsspiegel nicht einheitlich nachgewiesen werden (Fausto, et al., 2006). Somit sind unsere Ergebnisse nicht unerwartet und sprechen gegen eine tragende Rolle von löslichem TNF bei der Initiierung der Leberregeneration nach PHx.

Trotz nicht nachweisbarer signifikanter TNF-Serumspiegel nach PHx zeigten sich sowohl in *Rela^{F/F}AlbCre*- als auch in *Rela^{F/F}*-Mäusen erhöhte IL-6 Serumspiegel ohne signifikante Unterschiede zu den Zeitpunkten 4, 6 und 36 h nach PHx (Abbildung 11 B). Dies ist insofern unerwartet, da die IL-6-Antwort in der Leberegeneration als TNFR-1 abhängig beschrieben wurde (Taub, 2004). Ein Serumspiegelanstieg von IL-6 tritt somit unabhängig von einer Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und unabhängig von TNF nach partieller Hepatektomie auf. Jedoch sind die IL-6 Serumspiegel in unseren Ergebnissen früher messbar und deutlich niedriger als vorbeschrieben (Trautwein, et al., 1996). Die Bestimmung der relativen IL-6 mRNA Expression aus Lebergewebe bestätigte die mittels ELISA gemessenen Serumspiegeln mit einem mRNA Expressionsmaximum bei 1 h nach PHx, ohne signifikante Unterschiede zwischen den der *Rela^{F/F}AlbCre*- und der *Rela^{F/F}*-Mäusen zu 1, 4, 6 und 24 h nach PHx (Abbildung 11 C).

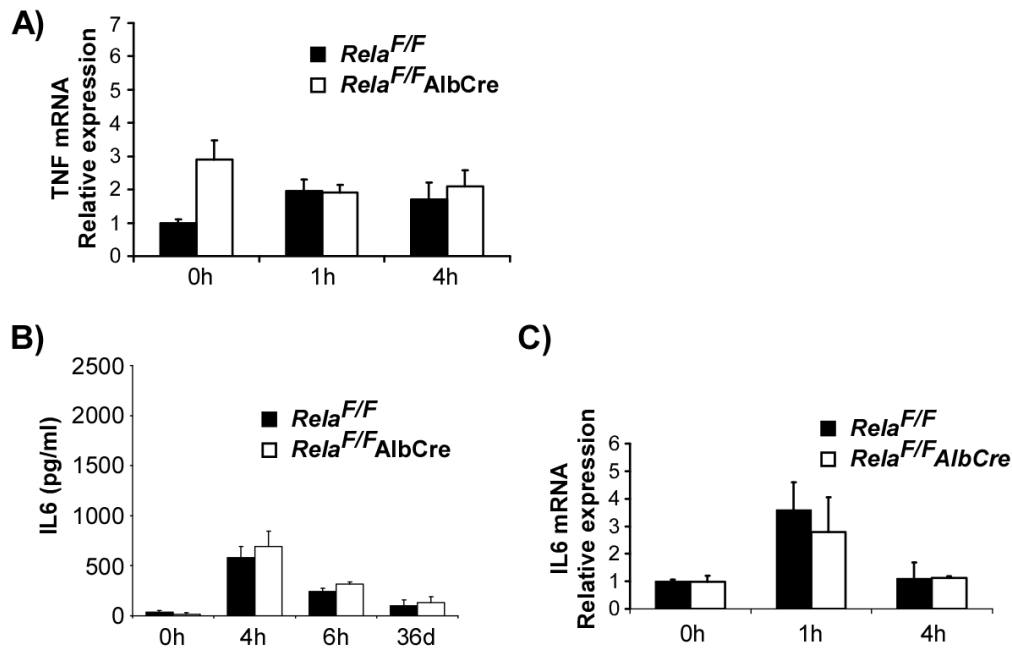


Abbildung 11: *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäuse zeigen im Vergleich zu Kontrollmäusen eine unauffällige Zytokinantwort.

(A) Quantitative TNF-mRNA-Analyse in *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Mäusen aus Lebergewebe vor (0 h), sowie 1 und 4 h nach PHx. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse als Dreifachbestimmung und Normalisierung auf Cyclophilin. **(B)** Bestimmung der IL-6-Serumspiegel mittels ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx in *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Mäusen mit einem Maximum 4 Stunden nach PHx ohne signifikante Unterschiede. Die Daten sind als Mittelwert, + SEM angegeben; n =3-6 pro Zeitpunkt und Genotyp. **(C)** Quantitative IL-6-mRNA-Analyse in *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Mäusen aus Lebergewebe vor (0 h), sowie 1 und 4 h nach PHx. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse als Dreifachbestimmung und Normalisierung auf Cyclophilin.

Obwohl in den Serumspiegeln und der mRNA-Induktion des gp130 Liganden und Jak/STAT3-Aktivators IL-6 keine signifikanten Unterschiede in *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Mäusen nach PHx bestanden, zeigte sich in der Western-Blot-Analyse eine deutlich stärkere Aktivierung von STAT3 durch Phosphorylierung (pSTAT3) in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen (Abbildung 12, zweiter Kasten von oben).

Da durch NF- κ B die Signaltransduktion von JNK (c-Jun N-terminale Kinase) supprimiert wird (Liu et al., 2002) und die Expression von Cyclin D1 durch JNK/AP1 reguliert ist (Schwabe et al., 2003), wurde in Western-Blot-Analysen die Aktivierung des JAK-Signalwegs untersucht. Bei *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen zeigte sich eine Stunde nach PHx eine deutlich stärkere Aktivierung von JNK im Sinne einer Phosphorylierung von p54-JNK im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 12, erste und zweite Reihe von unten). Da NF- κ B eine JNK-Suppressor-Funktion besitzt (Geisler, et al., 2007), ist diese vermehrte JNK-Aktivierung eine mögliche Erklärung für die höhere Expression von Cyclin D1 und dadurch schnellere Transition von der G0 zu G1-Phase in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen.

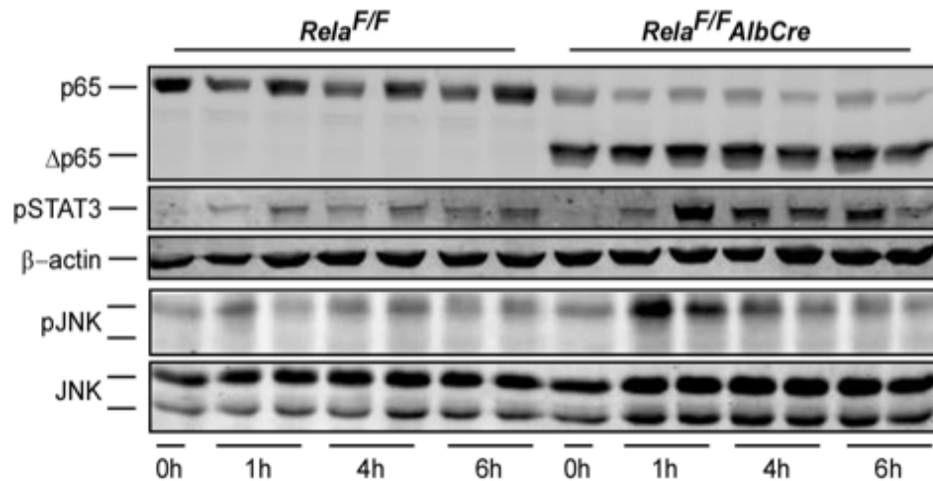


Abbildung 12: Die Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten führt zu einer verstärkten Aktivierung von STAT3 und JNK nach PHx.

Proteinlysate von *Rela^{F/F} AlbCre*- und Kontrollmäusen (*Rela^{F/F}*) wurden in Western-Blot Analysen auf die Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT3 und JNK zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx untersucht. Die effektive Deletion des Wildtyp-RelA/p65 zeigt in den *Rela^{F/F} AlbCre*- Mäusen das trunkierte Δp65. Es wurden jeweils zwei repräsentative Lysate pro Zeitpunkt und Genotyp aufgetragen. β-Actin diente als Ladungskontrolle.

4.4 Normale Regeneration der Lebermasse nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 nach PHx

In den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung der transaktivierenden NFκB-Untereinheit RelA/p65 keine gesteigerte Leberschädigung auftritt und überraschenderweise sogar ein etwas beschleunigter Zellzykluseintritt nach PHx zu beobachten ist. Die Bestimmung der Lebermasse 24, 36, 48, 72 und 168 h nach PHx zeigte allerdings eine normale Regeneration der Lebermasse in beiden Gruppen ohne signifikante Unterschiede zwischen *Rela^{F/F} AlbCre*- und den *Rela^{F/F}*-Mäusen (Abbildung 13). Sowohl *Rela^{F/F}*-Kontrollmäuse als auch *Rela^{F/F} AlbCre*-Mäuse erreichten sieben Tage nach partieller Hepatektomie ungefähr 90% der jeweils errechneten Leberausgangsmasse. Somit besteht bei beiden Mauslinien eine suffiziente Regenerationsfähigkeit der Leber und das Ausgangsgewicht der Leber wird nach 2/3 PHx durch kompensatorische Hyperplasie nahezu innerhalb von 7 d wieder erreicht. Somit war der beschleunigte Zellzykluseintritt in *Rela^{F/F} AlbCre*-Mäusen nicht mit einer beschleunigten Regeneration der Lebermasse assoziiert.

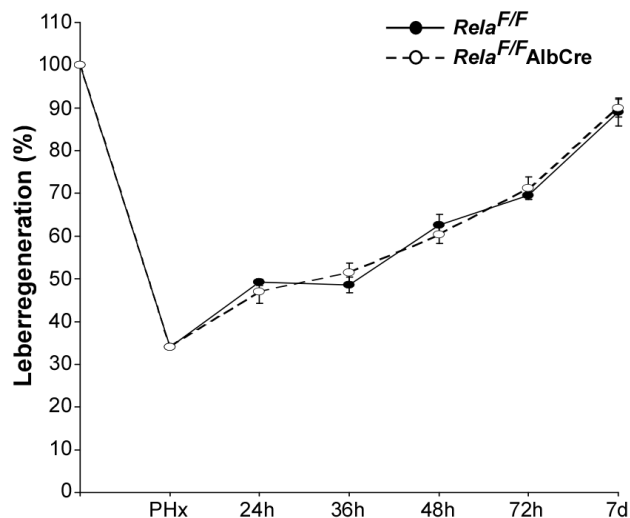


Abbildung 13: Normale Regeneration der Lebermasse nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 nach PHx.

Die Regeneration der Lebermasse wurde in *Rela*^{F/F}AlbCre- und *Rela*^{F/F}-Mäusen zu den einzelnen Zeitpunkten nach PHx bestimmt und als prozentualer Wert zur errechneten Lebermasse vor PHx bestimmt (siehe Material und Methoden). Die Werte sind als Mittelwerte +/- SEM in Prozent der errechneten Lebermasse vor PHx angegeben (n =4-9 pro Zeitpunkt und Genotyp).

4.5 Eine erweiterte Hepatektomie (80%-PHx) führt nicht zu vermehrter Zellschädigung oder verminderter Leberregeneration nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65.

Die Ergebnisse nach 2/3-PHx zeigten überraschenderweise keine vermehrte Zellschädigung und eine normale Regenerationsfähigkeit der Lebermasse. Um zu überprüfen, ob die Regenerationsfähigkeit und die Zellintegrität nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 auch nach erweiterter Hepatektomie erhalten bleibt, wurden *Rela*^{F/F}AlbCre- und Kontrollmäuse einer 80%-PHx unterzogen (Abbildung 14 A). Für dieses PHx-Modell ist eine post-OP Letalität von 60-70% in WT-Mäusen in den ersten drei Tagen beschrieben (Cataldegirmen, et al., 2005). Mit unserer Operationsmethode zeigte sich aber kein Unterschied im Gesamtüberleben zwischen *Rela*^{F/F}AlbCre- (4/7) und Kontrollmäusen (4/6) (Abbildung 14 B). Letale Verläufe waren nur innerhalb der ersten 60 h nach 80%-PHx zu beobachten, wobei diese Lebern beider Mauslinien ausgedehnte zentrilobuläre Nekrosen aufwiesen. In den überlebenden Mäusen war zudem histologisch sowie in biochemisch (AST, ALT, Gesamtbilirubin) keine erhöhte Leberschädigung in *Rela*^{F/F}AlbCre- im Vergleich zu Kontrollmäusen zu detektieren (Abbildung 14 C-E). In der BrdU-Immunhistologie zeigten sich sowohl in *Rela*^{F/F}AlbCre- als auch in *Rela*^{F/F}-Mäusen noch einige BrdU-positive Hepatozyten, ohne signifikanten Unterschied 7 d nach erweiterter 80%-PHx (Abbildung 14 F). Dabei war die absolute Zahl an Hepatozytenkernen/ HPF nicht sig-

nifikant unterschiedlich (normales Hypertrophie/Hyperplasia-Verhältnis) (Abbildung 14 G). Erstaunlicherweise zeigte sich auch nach erweiterter 80%-PHx eine ungestörte Leberregeneration der Lebermasse nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in *Rela^{F/F} AlbCre*-Mäusen (Abbildung 14 H).

Somit zeigen diese Daten sowohl nach 2/3-PHx als auch nach 80%-PHx, dass eine genetische Inaktivierung von RelA/p65 spezifisch in Hepatozyten diese nicht für einen erhöhten Zellschaden durch Apoptose oder Nekrose sensibilisiert und dabei eine völlig normale Regeneration der Lebermasse nach PHx möglich ist.

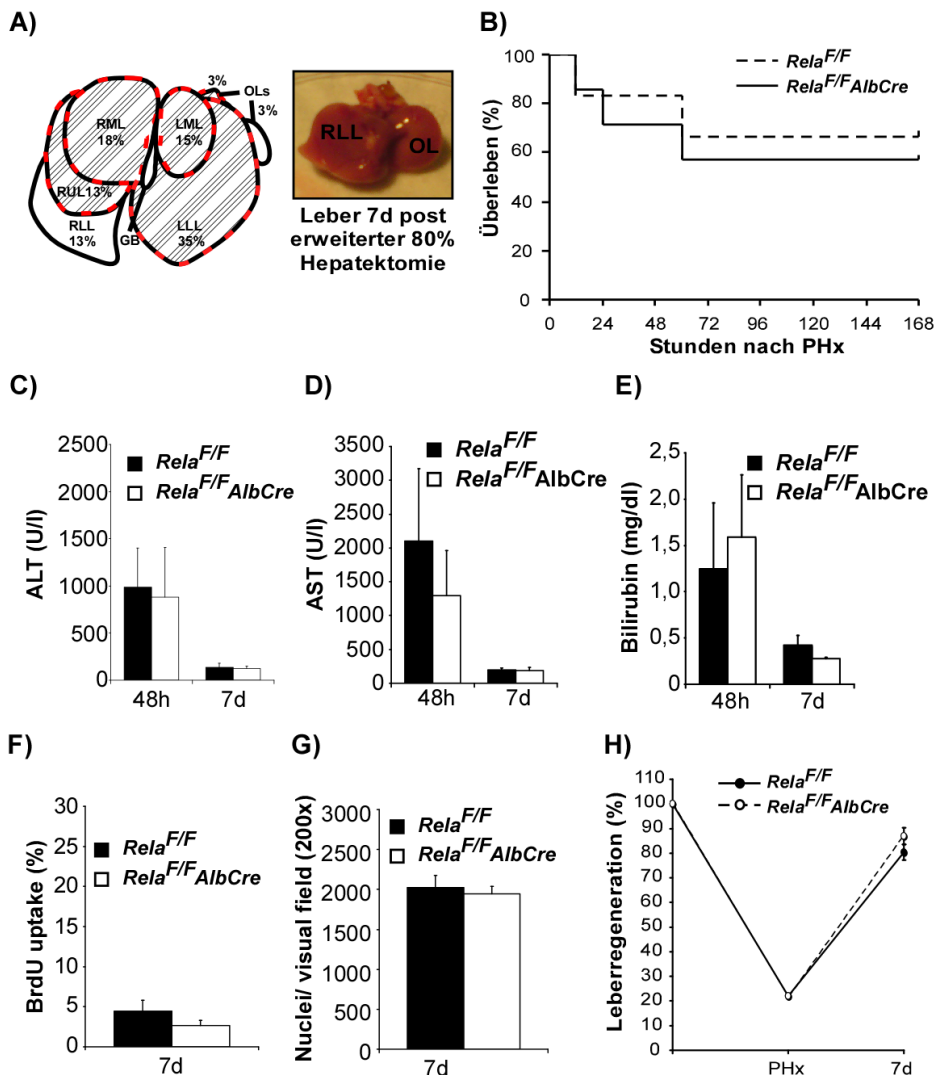


Abbildung 14: Ungestörte Regenerationsfähigkeit der Leber nach erweiterter 80%-PHx nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65.

Rela^{F/F} AlbCre- und *Rela^{F/F}*-Kontrollmäusen wurden einer erweiterter, 80%-PHx unterzogen (n= 6-7). **(A)** schematische Darstellung des OP-Modells (Bild links) und die Regeneration nach 7 d mit kompensatorischer Hyperplasia des verbleibenden RLL und des linken OL (Bild rechts). **(B)** Das Gesamtüberleben nach 80%-PHx bei Kontroll- (4/6) und *Rela^{F/F} AlbCre*-Mäusen (4/7) war nicht signifikant unterschiedlich. **(C-E)** Die Bilirubin-, ALT- und AST-Serumspiegel zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx sind in der jeweiligen Einheit angegeben. **(F)** Die BrdU-Immunhistologie 7 d nach erweiterter 80%-PHx zeigten bei den *Rela^{F/F} AlbCre*- und Kontrollmäusen noch einige BrdU-positive Hepatozyten, ohne statistisch Signifikanten Unterschied (4,4% bzw. 2,6%, n=4 je Genotyp, p=0,1). **(G)** Verhältnis zwischen Hyperplasia und Hypertrophie als absolute Zahl an Hepatozytenkerne / 8x 200facher Ver-

größerung und **(H)** Regeneration der Lebermasse als prozentualer Wert zur errechneten Lebermasse vor erweiterter Hepatektomie der *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}*-Mäuse.

4.6 Die Genetische Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen, einschließlich der Kupffer-Zellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen beeinträchtigt eine NF-κB abhängige Zytokinantwort.

In neueren Studien wurde ein Konzept entworfen, in dem vor allem eine NF-κB abhängigen Zytokinantwort in Kupffer-Zellen als initiierendes Ereignis der Leberregeneration gesehen wird (Chaisson, 2002; Maeda, et al., 2003; Yang, et al., 2005). Um dieses Konzept zu überprüfen, wurden *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse (Geisler, et al., 2007) nach induzierter genetischer Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen der Leber einer 2/3-PHx unterzogen. *MxCre*-Mäuse exprimieren die *Cre*-Rekombinase induzierbar in diversen Typ-1-Interferon-responsiven Geweben und zeigen folglich eine Deletion in Lymphozyten, Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen der Leber nach pIC-Injektion (Kuhn, et al., 1995). *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse sind ebenso wie *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäuse phänotypisch unauffällig. So zeigt sich 45 Minuten nach i.p. Injektion von mTNF (25 ng mTNF / g KG) immunhistochemisch bei Kontrollmäusen (*Rela^{F/F}*) eine Translokation von RelA/p65 in die Zellkerne aller Leberzellen als Ausdruck einer NF-κB-Aktivierung. (Abbildung 15 A, linkes Bild). Nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen zeigt sich jedoch lediglich eine Translokation von RelA/p65 in Nicht-Parenchymzellen (Abbildung 15 A, mittleres Bild), wobei nach Inaktivierung von RelA/p65 allen Leberzellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen nahezu keine nukleäre Translokation von RelA/p65 weder in Hepatozyten noch in Nicht-Parenchymzellen zu detektieren ist (Abbildung 15 A, rechtes Bild). Demnach konnte die effektive Deletion der geflochtenen Abschnitte des *Rela*-Gens in Kupffer-Zellen von *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen 7 Tage nach pIC Injektion in Western-Blot Analysen von Kupffer-Zell-Isolaten gezeigt werden (Abbildung 15 B). Wie bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, weisen *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse aufgrund der gleichzeitigen Inhibierung von RelA/p65 in Hepatozyten und anderen Typ-1-Interferon reaktionsfähigen Geweben eine stark reduzierte TNF-Antwort nach LPS-Stimulierung auf (Geisler, et al., 2007). LPS ist ein starker Aktivator des NF-κB Signalwegs und führt zur Expression von TNF. Eine Stunde nach i.p. Injektion von LPS (2 µg/ g KG) konnten somit mittels eines TNF spezifischen ELISA stark erhöhte TNF-Serumspiegel bei Kontrollmäusen (*Rela^{F/F}*: TNF 12787 ± 2328,5 pg/ml; n=6) nachgewiesen werden. Nach genetischer Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen,

einschließlich der Kupffer-Zellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen ist die LPS-induzierte TNF-Antwort deutlich reduziert (MW: $1014 \pm 332,8$ pg/ml; $p < 0,001$; $n = 6$) (Abbildung 15 C). Analog zu den Ergebnissen der TNF-Serumspiegel resultiert 1 h nach LPS-Stimulierung (i.p. 2 μ g/ g KG) in der Echtzeit-PCR-Analyse eine massive Steigerung der A20-mRNA-Expression in Kontrollmäusen in und eine lediglich basale Expression A20 in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen (Abbildung 15 D). A20 wird als Produkt des frühen Zielgens *Tfnaip3* rasch nach kanonischer NF- κ B-Aktivierung exprimiert und reguliert u.a. Entzündungs- und Immunreaktionen durch Hemmung der NF- κ B-Aktivierung (Coornaert et al., 2009).

Die semiquantitative Echtzeit-PCR-Analyse der A20-mRNA Expression zeigte nach PHx lediglich eine leichte Induktion des für A20 codierenden *Tfnaip3* als frühes NF- κ B Zielgen in Kontrolltieren (4,5-fach) im Vergleich zu der Induktion nach LPS-Stimulierung (100-fach) und spricht somit für eine nur sehr geringe NF- κ B-Aktivierung nach PHx. *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäuse zeigen eine verminderte relative A20-mRNA Expression nach PHx im Vergleich zu Kontrollen (Abbildung 15 E), als Ausdruck der Inaktivierung von RelA/p65 in den Hepatozyten. *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse zeigen, wie durch die obigen Ergebnisse zu erwarten, keine Erhöhung der relativen Expression von A20 in der Leber nach PHx, aufgrund der Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen. Diese Ergebnisse demonstrieren die effektive induzierbare genetische Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen, einschließlich der Kupffer-Zellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen. Dies ermöglicht eine Untersuchung einer NF- κ B-abhängigen Zytokinantwort in Kupffer-Zellen als möglicherweise notwendigen Prozess zur Initiierung der Leberregeneration nach PHx.

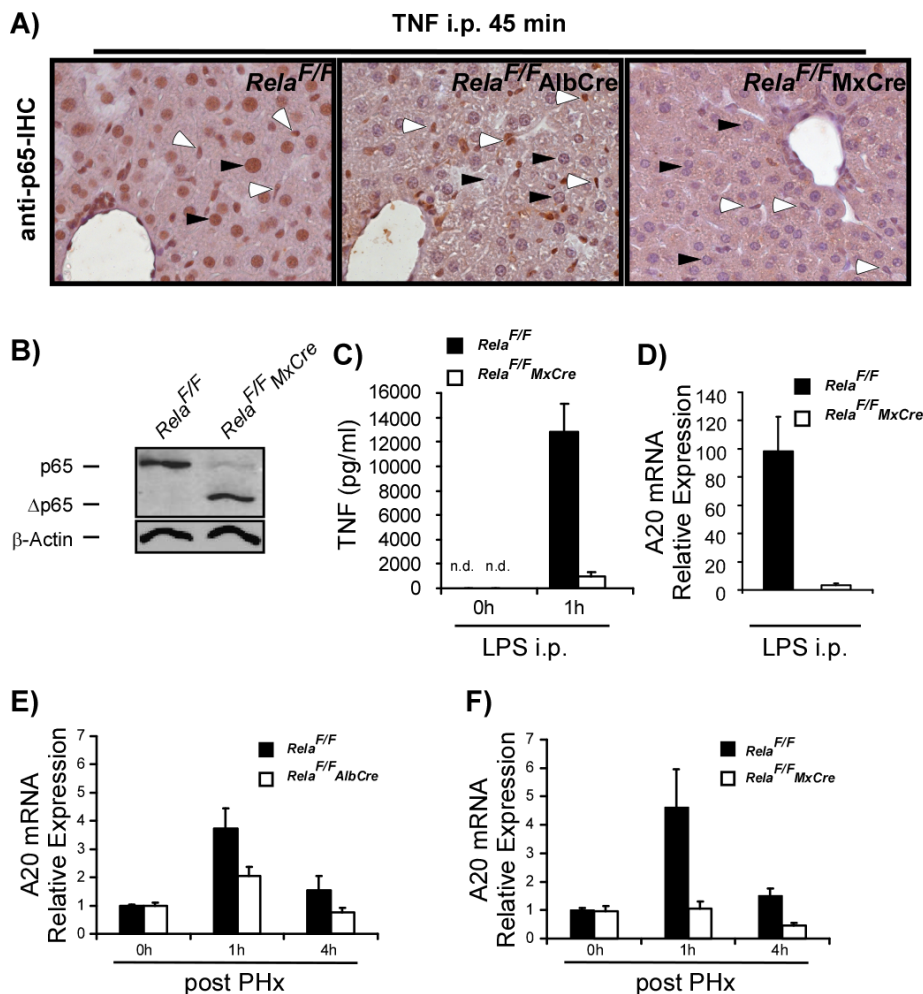


Abbildung 15: Verminderte NF- κ B abhängigen Zytokinanantwort nach genetische Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen, einschließlich der Kupffer-Zellen.

(A) 45 Minuten nach mTNF-Stimulierung (i.p. 25 ng mTNF/ g KG) ist die Aktivierung und nukleäre Translokation von RelA/p65 mittels anti-p65-Immunhistologie in Kontrolltieren (*Rela*^{F/F}) sowohl in Hepatozyten (schwarze Pfeile) und Nicht-Parenchymzellen (weiße Pfeile) zu sehen (linkes Bild). Nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in *Rela*^{F/F}*AlbCre*-Mäusen zeigen sich lediglich positive Nicht-Parenchymzellen (mittleres Bild) und nach Inaktivierung von RelA/p65 in den Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in *Rela*^{F/F}*MxCre*-Mäusen (rechtes Bild) ist nahezu in allen Leberzellen keine nukleäre Translokation von RelA/p65 nachweisbar (200x Vergrößerung). (B) Western-Blot-Analyse von Kupferzell-Ganzzelllysaten zeigt eine effektive Deletion des Wildtyp p65 mit Detektion des trankierten p65 in (Δ p65) in *Rela*^{F/F}*MxCre*-Mäusen 7 d nach Induktion (i.p. 10 μ g/g KG poly-IC) im Vergleich zu Kontrollmäusen (*Rela*^{F/F}). β -Actin diente als Ladungskontrolle. (C) Eine Stunde nach i.p. Injektion von LPS (2 μ g/ g KG) induzierte mittels ELISA bestimmte TNF Serumspiegel in Kontroll- und *Rela*^{F/F}*MxCre*-Mäusen (Mittelwerte + SEM). (D) A20-mRNA-Expressionsanalyse des für A20 kodierenden NF- κ B Zielgens *Tfnaip3* aus Lebergewebe 1 h nach LPS-Stimulierung (s.o.) in Kontroll- und *Rela*^{F/F}*MxCre*-Mäusen, sowie (E) 0, 1 und 4 h nach PHx in *Rela*^{F/F}*AlbCre*- und Kontrollmäusen bzw. (F) in *Rela*^{F/F}*MxCre*- und Kontrollmäusen. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse mit Dreifachbestimmung und Normalisierung auf Cyclophilin angegeben als Mittelwert \pm SEM n =3-6 pro Zeitpunkt und Genotyp.

4.7 Die Deletion von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in *Rela*^{F/F}*MxCre*-Mäusen führt zu keiner erhöhten Leberzellschädigung nach 2/3-PHx.

Zur Überprüfung der neueren Konzepte, die eine NF- κ B-Aktivierung in Kupfer-Zellen

als essentielles Ereignis zur Initiierung der Leberregeneration annehmen (Yang, et al., 2005), wurden *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse mit Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen einer 2/3- PHx unterzogen und zunächst die Leberschädigung nach PHx überprüft.

Nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten als auch in Nicht-Parenchymzellen zeigte sich immunhistochemisch nach TUNEL-Färbungen weder in den *Rela^{F/F}MxCre* noch in den Kontrollen (*Rela^{F/F}*) erhöhte Apoptoseraten (Abbildung 16 A). Somit ist RelA/p65 sowohl in den Hepatozyten als auch den Nicht-Parenchymzellen nicht essentiell um Leberzellen nach partieller 2/3 Hepatektomie vor Apoptose zu schützen. Die Serumwerte für Transaminasen (AST und ALT) sowie das Gesamtbilirubin wurden aus dem Serum nach Sektion zu den Zeitpunkten 6, 24, 36, 48 und 168 Stunden (= 7 d) aller operierter Tiere zur weiteren Bestimmung der Leberschädigung bestimmt. Das Gesamtbilirubin im Serum zeigte eine signifikante Erhöhung in den *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen nur 36 h nach PHx (0,88 mg/dl im Mittelwert; p 0,04; n = 6) im Vergleich zu den Kontrollen (0,44 mg/dl; n = 7). Diese Erhöhung war zwar statistisch signifikant, aber nur gering ausgeprägt (Abbildung 16 B). Die ALT-Aktivität im Serum zeigte zu den einzelnen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Rela^{F/F}MxCre* und den Kontrollmäusen (Abbildung 16 C). Die Serumspiegel der nicht leberspezifischen AST (Aspartat-Aminotransferase) zeigten überraschenderweise 24 Stunden nach PHx signifikant höhere Werte bei den *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen. Diese Erhöhung der AST glich sich dann bei 36 Stunden wieder den Werten der Kontrollmäuse (*Rela^{F/F}*) an (Abbildung 16 D). In der histologischen Untersuchung des HE-gefärbten Lebergewebes der *Rela^{F/F}MxCre*- und der Kontrollmäuse waren keine nekrotischen Areale oder größere entzündliche Infiltrate abzugrenzen. Die Quelle der transienten Erhöhung des Bilirubins und der AST sind bei histologisch unauffälliger HE-Histologie, fehlender Apoptosen und im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöhten ALT-Werten fraglich. Die ubiquitär vorkommende AST scheint daher am ehesten anderer Herkunft, oder durch präanalytische Störgrößen (wie Hämolyse) erklärbar zu sein. Es zeigte sich somit keine unerwartete Leberschädigung in *Rela^{F/F}MxCre*- oder den Kontrollmäusen nach PHx.

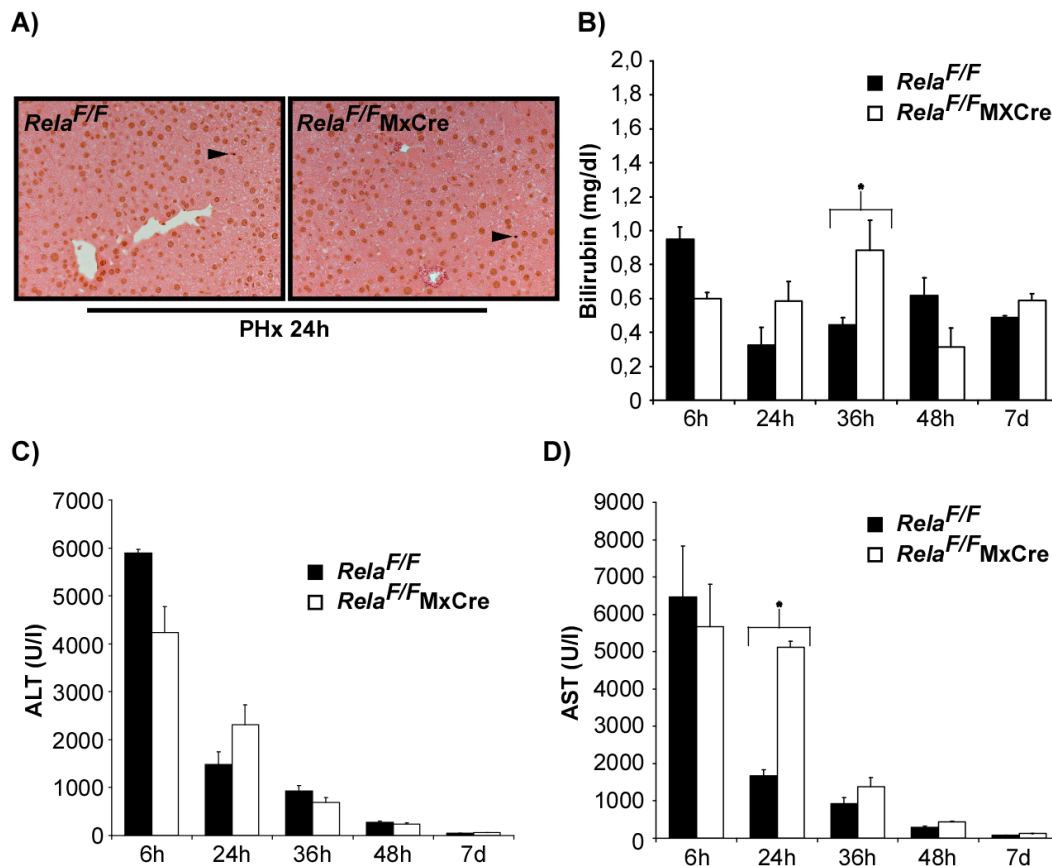


Abbildung 16: Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in *Rela*^{F/F}MxCre-Mäusen führt nicht zu gesteigerter Apoptose nach PHx.

(A) Es wurden keine signifikanten Apoptosen in den Restlebern nach PHx zu den einzelnen Zeitpunkten festgestellt. Repräsentative TUNEL-Immunhistologie von *Rela*^{F/F}MxCre- und *Rela*^{F/F}-Kontrollmäusen 24 h nach PHx (200 fache Vergrößerung). Eine 2/3 PHx wurde bei *Rela*^{F/F}MxCre- und *Rela*^{F/F}-Kontrollmäusen durchgeführt und die Bilirubin-, ALT- und AST-Serumspiegel zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx bestimmt (n= 3-6 pro Zeitpunkt). Die Werte sind als Mittelwerte +/- SEM in der jeweiligen Einheit angegeben. **(B)** Das Gesamtbilirubin war transient 36 Stunden nach PHx in den *Rela*^{F/F}MxCre-Mäusen (0,88 mg/dl im Mittelwert; p 0,039; n = 6) im Vergleich zu den Kontrollen (0,44 mg/dl; n = 7) signifikant erhöht. **(C)** Die ALT-Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede, **(D)** jedoch zeigte sich eine signifikante Erhöhung der AST Werte in den *Rela*^{F/F}MxCre-Mäusen 24 h nach PHx.

4.8 Normaler Zellzykluseintritt nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in den *Rela*^{F/F}MxCre-Mäusen .

Überraschenderweise und im Gegensatz zu der Hypothese einer essentiellen RelA/p65-abhängigen NF κ B-Aktivierung in Kupfer-Zellen mit resultierender Zytokinantwort als Initiierung der Leberregeneration (Chaisson, 2002; Maeda, et al., 2003; Yang, et al., 2005) zeigte sich nach Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen in *Rela*^{F/F}MxCre-Mäusen nach 2/3-PHx kein signifikanter Unterschied an BrdU-positiven Hepatozyten im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abbildung 17 A und B). Die absolute Zahl an Hepatozytenkernen zeigte dabei ebenso keinen signifikanten Unterschied in *Rela*^{F/F}MxCre- im Vergleich zu den *Rela*^{F/F}-Mäusen zu den einzelnen

Zeitpunkten nach PHx (Abbildung 17). Wie in den vorangegangenen Versuchen mit *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen (siehe Kapitel 4.2.) war die deutliche Zunahme der Hypertrophie (Abnahme der Zellkerne/ Gesichtsfeld) 7 Tage nach PHx nicht unterschiedlich von Kontrollmäusen zu verzeichnen. Somit besteht bei *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen ein normaler, ungestörter Zellzykluseintritt und Progress in die Synthesephase. Lediglich die zuvor bei *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen beobachtete Beschleunigung des Zellzyklus scheint durch die zusätzliche Inaktivierung von RelA/p65 in den Nicht-Parenchymzellen, einschließlich der Kupffer-Zellen, in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen verloren zu gehen.

Die erstaunliche Tatsache eines ungestörten Zellzykluseintritts und –progression der *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse, wie zuvor bei den *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen, bestätigte sich in Western-Blot Analysen von Zellzyklus-proteinen nach PHx. Die Proteinbanden aus den Leberlysaten von PCNA, von Cyclin A und von Cyclin D1 zeigen bei den *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (*Rela^{F/F}*) keine signifikanten Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten. Die Proteinbanden von Cyclin D1 wirkten 24 Stunden nach PHx sogar ähnlich wie bei den *Rela^{F/F}AlbCre*-Tieren intensiver bei den *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Es ist jedoch kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Intensität zwischen den *Rela^{F/F}MxCre*- und *Rela^{F/F}*-Mäusen zu den folgenden Zeitpunkten zu verzeichnen.

Nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen bestätigt die Expression der Zellzyklusproteine einen ungehinderten Zellzykluseintritt in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen. Der nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 beobachtete beschleunigte Zellzykluseintritt und Progress scheint durch die zusätzliche Inaktivierung der RelA/p65-abhängigen NF- κ B-Signaltransduktion in den Nicht-Parenchymzellen und dadurch möglicherweise fehlender parakriner Signale aufgehoben zu sein.

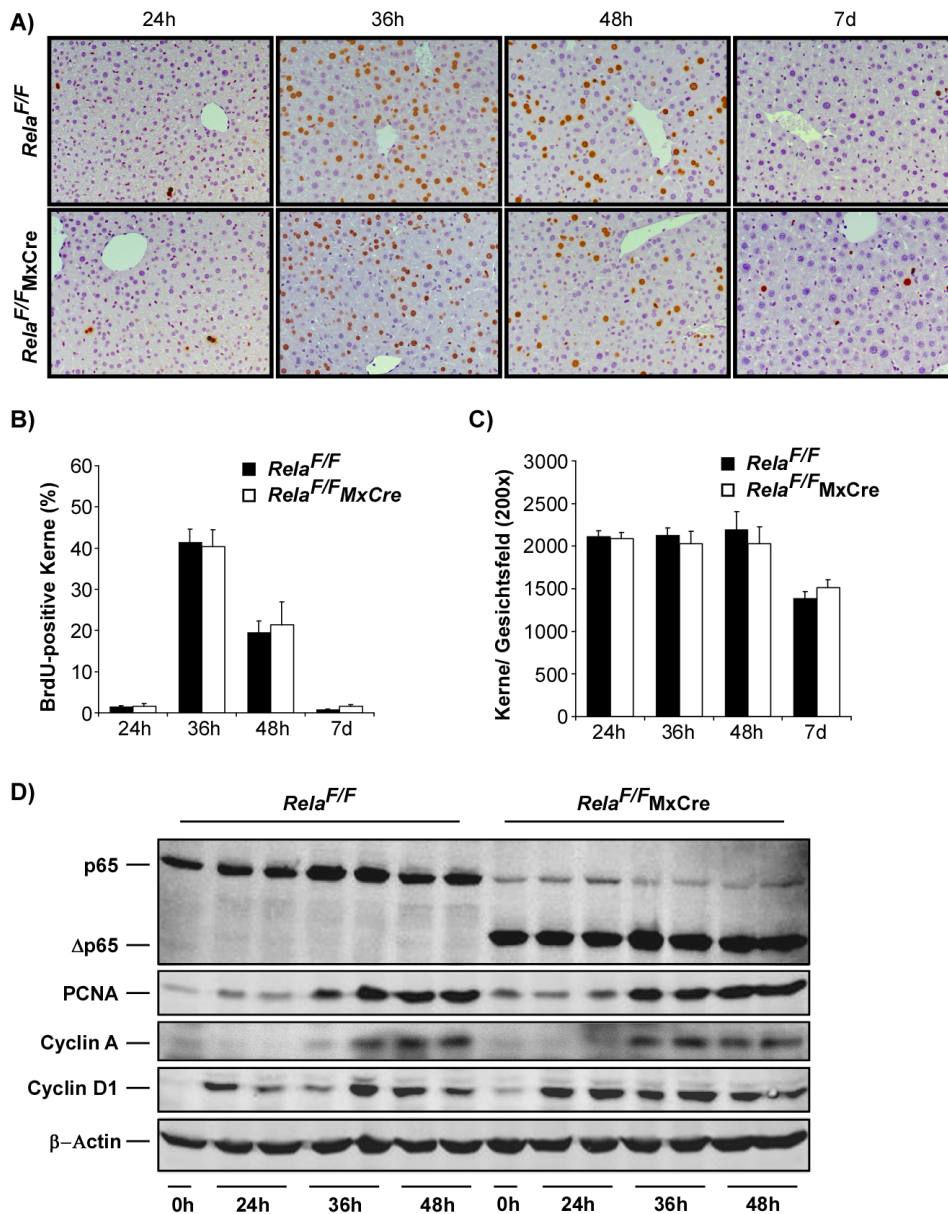


Abbildung 17: Ungestörter Zellzykluseintritt und -progression nach Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen in *Rela^{F/F}MxCre*- Mäusen nach PHx.

Rela^{F/F}MxCre- und *Rela^{F/F}* Kontrollmäuse wurden einer 2/3-PHx unterzogen und zwei Stunden vor der jeweils geplanten Sektion BrdU (i.p. 100 mg/kg KG) injiziert. **(A)** Die Quantifizierung der DNA-Synthese erfolgte durch Auswertung der immunhistochemisch BrdU-positiven Hepatozyten im Verhältnis zur Gesamtzahl an Hepatozyten aus acht Bildern in 200facher Vergrößerung zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx (n= 4-8 pro Zeitpunkt und Genotyp) (*p= 0,002). **(B)** Das Verhältnis an Hyperplasie zu Hypertrophie wurde als absolute Zahl der Hepatozytenkerne als Mittelwert aus acht Bildausschnitten (200 fache Vergrößerung) aller zu diesen Zeitpunkten operierten *Rela^{F/F}MxCre*- und *Rela^{F/F}*-Mäusen ermittelt. **(C)** Repräsentative anti-BrdU-Immunhistochemie Bilder von *Rela^{F/F}MxCre*- und Kontrollmäusen zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx (200 fache Vergrößerung). **(D)** Proteinlysate der regenerierenden Leber von *Rela^{F/F}MxCre*- und Kontrollmäusen (*Rela^{F/F}*) wurden in Western-Blot Analysen auf die Expression von Zellzyklus-assoziierten Proteinen (PCNA, Cyclin A, Cyclin D1) zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx untersucht. Eine effektive Deletion des Wildtyp-RelA/p65 in den *Rela^{F/F}MxCre*- Mäusen zeigt das trunkierte Δp65. Es wurden jeweils zwei repräsentative Lysate pro Zeitpunkt und Genotyp aufgetragen und β-Actin diente als Ladungskontrolle.

4.9 Fehlende intrahepatische Zytokinantwort nach Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen in *Rela^{F/F}MxCre*- Mäusen nach PHx.

Wie durch die Vorversuche (siehe Kapitel 4.6) zu erwarten, konnten nach genetischer Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen keine signifikanten TNF-Serumspiegel nach PHx gemessen werden. Allerdings konnte auch in Kontrolltieren keine signifikanten TNF-Serumspiegel 1, 4 und 6 h nach PHx detektiert werden. Die Überprüfung mittels semiquantitativer Echtzeit-PCR-Analyse des Lebergewebes bestätigte die Abwesenheit signifikanter TNF-Serumspiegel (CT-Werte alle > 30) sowohl in den *Rela^{F/F}MxCre*- als auch in den Kontrollmäusen TNF mit fehlender Erhöhung der relativen Expression von TNF-mRNA 1 und 4 h nach PHx (Abbildung 18 A).

Trotz fehlender signifikanter TNF-Serumspiegel und unter Berücksichtigung der Vorstellung einer TNFR-1 abhängigen IL-6-Antwort in der Leberregeneration (Taub, 2004) zeigte sich eine Erhöhung der IL-6 Serumspiegel zu 4 und 6 h nach PHx bei Kontrollmäusen und überraschenderweise ein sogar signifikant stärkerer IL-6 Anstieg bei *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen 4 h nach PHx ($p = 0,034$) (Abbildung 18 B). Dies war insbesondere unerwartet, da nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen die NF- κ B-abhängige Zytokinantwort in Kupffer-Zellen inhibiert ist (siehe Kapitel 4.6.). Die Bestimmung der IL-6-mRNA Expression aus dem Lebergewebe von *Rela^{F/F}MxCre*- und der *Rela^{F/F}*-Mäusen bestätigte die Expression von IL-6 in der Leber der Kontrollmäuse (*Rela^{F/F}*) nach PHx in der quantitativen Echtzeit-PCR. In *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen zeigte sich jedoch eine Inhibierung der IL-6-Expression im Lebergewebe nach PHx (Abbildung 18 C). Diese Inkongruenz zwischen den IL-6 Serumspiegeln und der IL-6-mRNA Expression im Lebergewebe nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen legt einen extrahepatischen Ursprung des IL-6 in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse nahe.

Durch die intrahepatisch inhibierte Zytokinantwort nach genetischer Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen waren die zuvor bei *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen beobachtete vermehrte STAT3-Aktivierung deutlich attenuiert. In der Western Blot-Analyse aus Leberlysaten zu den Zeitpunkten 1, 4, und 6 h nach PHx zeigte die Phosphorylierung von STAT3 keinen signifikanten Unterschiede zwischen *Rela^{F/F}MxCre*- und den *Rela^{F/F}*-Mäusen (Abbildung 18 D). Eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von JNK konnte im Gegensatz zu *Re-*

la^{F/F}AlbCre-Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer RelA/p65 Inaktivierung (vgl. Abbildung 10) nun nach Deletion von RelA/p65 in allen Leberzellkompartimenten in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen nicht mehr festgestellt werden. Somit kommt es mutmaßlich nach genetischer Inaktivierung von RelA/p65 in allen Leberzellen inklusive Kupffer-Zellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen zu einem Verlust von parakrinen Signalen aus den Kupffer-Zellen, die in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen zu einer stärkeren STAT3 und JNK-Aktivierung und somit beschleunigten Zellzykluseintritt geführt hatten. Erstaunlicherweise ist jedoch trotz dieses Verlustes an NF- κ B-abhängigen parakrinen Signalen in allen Leberzellkompartimenten *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen ein normaler Zellzykluseintritt und -progression im Vergleich zu den Kontrollmäusen möglich. Somit stellen die Ergebnisse dieser Arbeit das Konzept einer essentiellen RelA/p65-abhängigen NF- κ B induzierten Zytokinantwort der Kupffer-Zellen als initiiertes Ereignis der Leberregeneration (Chaisson, 2002; Maeda, et al., 2003; Yang, et al., 2005) in Frage.

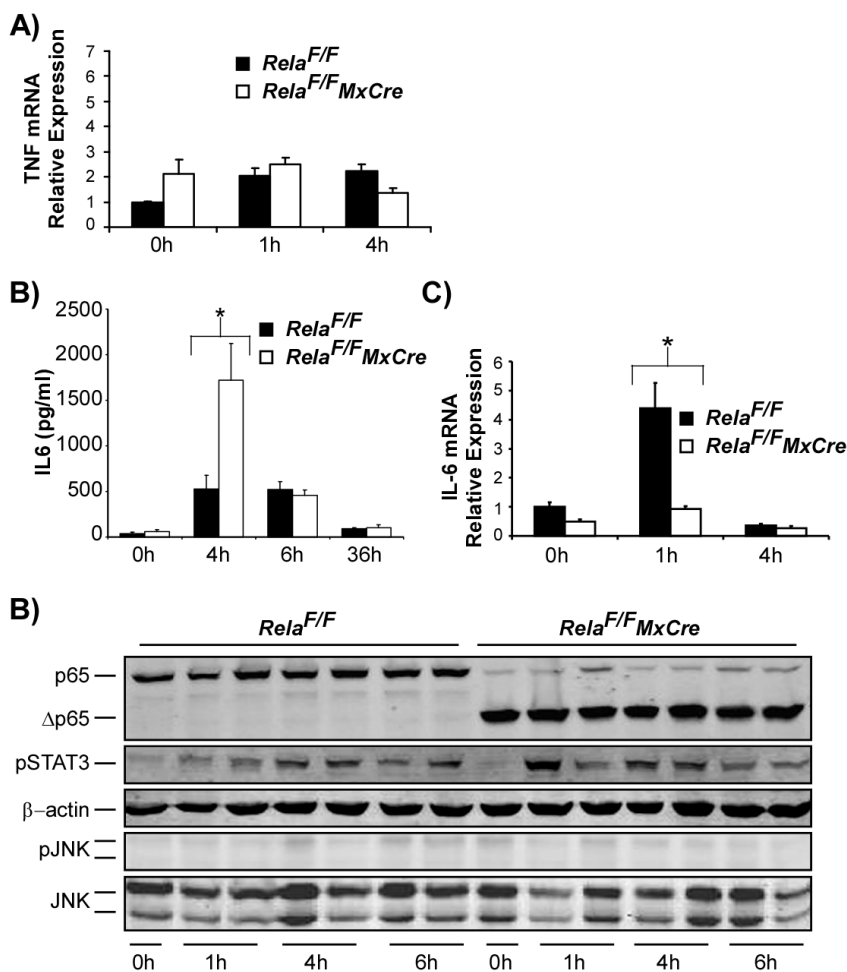


Abbildung 18: Fehlende intrahepatische Zytokinantwort in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen nach PHx.

(A) Semiquantitative TNF-mRNA-Analyse in *Rela^{F/F}MxCre*- und *Rela^{F/F}*-Mäusen aus Lebergewebe basal (0 h), sowie 1 und 4 h nach PHx. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse als Dreifachbestimmung und Normalisierung auf Cyclophilin. **(B)** Bestimmung der IL-6 Serumspiegel mittels ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx mit signifikant stärkeren Anstieg bei *Re-*

$la^{F/F}MxCre$ -Mäusen 4 h nach PHx im Vergleich zu den Kontrollen (*: $p = 0,034$; $n = 3-6$ pro Zeitpunkt und Genotyp). **(C)** Die quantitative IL-6-mRNA-Analyse aus Lebergewebe basal (0 h), sowie zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx zeigte eine signifikant höhere Expression in den Kontrollmäusen 1 h nach PHx im Vergleich zu den $Rela^{F/F}MxCre$ -Mäusen. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse als Dreifachbestimmung und Normalisierung auf Cyclophilin (*, $p < 0,05$, $n = 3-6$ pro Zeitpunkt und Genotyp). **(D)** Proteinlysate von $Rela^{F/F}MxCre$ - und Kontrollmäusen ($Rela^{F/F}$) wurden in Western-Blot Analysen auf die Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT3 und JNK zu den angegebenen Zeitpunkten nach PHx untersucht. Die effektive Deletion des Wildtyp-RelA/p65 zeigt in den $Rela^{F/F}AlbCre$ - Mäusen das trunkierte $\Delta p65$. Es wurden jeweils zwei repräsentative Lysate pro Zeitpunkt und Genotyp aufgetragen und β -Actin diente als Ladungskontrolle.

4.10 Ungestörte Regeneration der Lebermasse nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in $Rela^{F/F}MxCre$ -Mäusen nach PHx.

Im Gegensatz zu der aktuell favorisierten Hypothese einer essentiellen Rolle von NF- κ B in Nicht-Parenchymzellen für die Initiierung der Leberregeneration durch ein Zytokin-*Priming* (Maeda, et al., 2005; Yang, et al., 2005), zeigte sich in unserer Arbeit eine ungestörte Leberregeneration nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen einschließlich der Kupffer-Zellen in $Rela^{F/F}MxCre$ -Mäusen. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den $Rela^{F/F}MxCre$ - und den Kontrollmäusen ($Rela^{F/F}$) in der errechneten, prozentualen Regeneration der Lebermasse zu den einzelnen Zeitpunkten und beide erreichten sieben Tage nach partieller Hepatektomie ca. 90% des errechneten ursprünglichen Lebergewichts (Abbildung 19). Somit ist eine effiziente Leberregeneration auch bei fehlender NF- κ B-abhängiger intrahepatischer parakriner Zytokinantwort aus Kupffer-Zellen möglich.

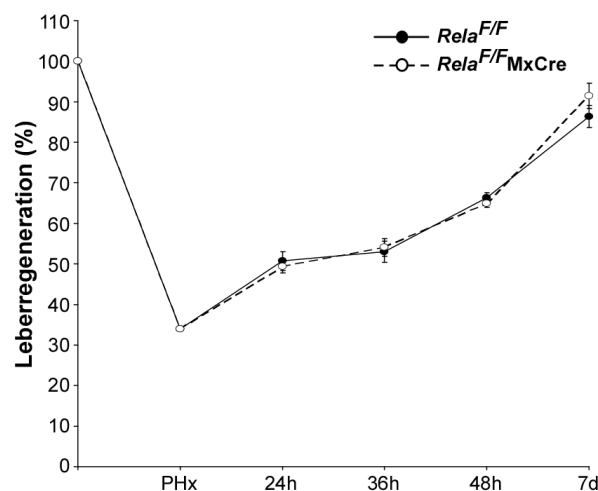


Abbildung 19: Ungestörte Leberregeneration nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen nach PHx.

Die Regeneration der Lebermasse wurde in $Rela^{F/F}MxCre$ - und $Rela^{F/F}$ -Mäusen zu den einzelnen Zeitpunkten nach PHx als prozentualer Wert zur errechneten Lebermasse vor PHx berechnet und als Mittelwerte \pm SEM angegeben ($n = 4-9$ pro Zeitpunkt und Genotyp).

5 Diskussion

Die Leberregeneration ist eine einzigartige Fähigkeit, die evolutionär als Absicherung gegen Schädigungen durch zum Beispiel giftige Pflanzen für die Aufrechterhaltung der Organfunktion gesehen werden kann (Michalopoulos, 2007). Dieser hoch konservierte Prozess kann im Rahmen von Infektionen, toxischen Schäden oder auch nach Resektion beobachtet werden. Das Versagen der Kompensationsmechanismen zum Beispiel bei der Leberzirrhose oder nach Resektion mit zu kleiner Restleber im Verhältnis zum Körpergewicht ist klinisch von großer Bedeutung. Die Entwicklung neuer Therapieansätze und Erweiterung bestehender Therapien setzt ein besseres Verständnis der involvierten Prozesse und molekularen Ereignisse in der Leberregeneration voraus. Somit stellt die Untersuchung der intra- und extrazellulären Ereignisse, welche die voll differenzierten, ruhenden Hepatozyten zur Zellteilung anstoßen und während der Regeneration regulieren eine zentrale Herausforderung für die Forschung dar (Michalopoulos, et al., 1997).

Das Modell der partiellen Hepatektomie ermöglicht es, diesen Prozess und das Zusammenspiel verschiedenster Faktoren *in vivo* zu erforschen. In dieser Arbeit wurde eine schonende und gut reproduzierbare PHx-Methode bei der Maus mit drei einzelnen Ligaturen unter Schonung der Gallenblase durchgeführt (siehe Kapitel 3.2. ff.).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt in vielen Zellen des Körpers eine zentrale Rolle bei Infektionen, der Immunantwort, Zellproliferation und -differenzierung (Ghosh, et al., 2002; Karin, et al., 2002) und ist aufgrund seiner vielfältigen regulatorischen Funktionen auch häufig Gegenstand in der Leberforschung. So wird NF- κ B eine zentrale Rolle bei spezifischen Entzündungsreaktionen, wie zum Beispiel der Hepatitis B oder C (Joo et al., 2005; Su et al., 1996; Yoshida et al., 2001), in der Karzinogenese des hepatozellulären Karzinoms (Maeda, et al., 2005; Pikarsky et al., 2004; Viatour et al., 2005), oder auch bei dem programmierten Zelltod (Luedde et al., 2006) zugeschrieben.

Im Rahmen der Leberregeneration wurde einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bestehend aus den NF- κ B-Untereinheiten p50 und RelA/p65 als frühes intrazelluläres Ereignis nach PHx nach seiner initialen Beschreibung (Cressman, et al., 1994; Yamada, et al., 1998) zunächst eine essentielle proliferative und zytoprotektive Funktion in Hepatozyten zugeschrieben (Chaisson, 2002; Imuro, et al., 1998; Yang, et al., 2005). Neuere Untersuchungen deuten hingegen auf eine essentielle NF- κ B-Aktivierung vor allem in Nicht-Parenchymzellen der Leber hin.

So konnte nach konditionaler Hepatozyten-spezifische Inaktivierung von IKK β eine ungestörte Leberregeneration gezeigt werden (Maeda, et al., 2003). Für die Inaktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen nach adenoviralem Transfer eines Supersuppressors (Ad5I- κ B α) (Yang, et al., 2005) oder nach konditionaler, genetischer Inaktivierung von IKK β in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen (Maeda, et al., 2005) wurde jedoch eine gestörte Leberregeneration beschrieben. Hieraus entwickelte sich die aktuell favorisierte Hypothese einer essentiellen NF- κ B-Aktivierung in der Leberregeneration, nicht nur als zytoprotektive Ereignis in den Hepatozyten, sondern auch um eine Zytokinantwort der Kupffer-Zellen anzustoßen und somit ein Zytokin-*Priming* der Hepatozyten als Initiierung der Leberregeneration zu ermöglichen (Fausto, et al., 2005). Es muss aber auch betont werden, dass eine frühe Aktivierung von NF- κ B nicht von allen Arbeitsgruppen einheitlich nach PHx beobachtet wird (Cataldegirmen, et al., 2005), was darauf hindeutet, dass möglicherweise exogene Faktoren, wie z.B. die verwendete PHx-Technik mit unterschiedlichem Ausmass an Zellschadens den Grad der NF- κ B-Aktivierung mitbestimmen (siehe unten).

Als wichtigstes und überraschendes Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine ungestörte Leberregeneration, sowohl nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen als auch nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen.

Hepatozyten mit kompletter Inaktivierung von NF- κ B nach Deletion von RelA/p65 in Hepatozyten sind *in vivo* und *in vitro* hoch sensitiv gegenüber TNF-induzierter Apoptose. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits früher zeigen, dass *Rela^{F/F}AlbCre*- und *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse eine massive Leberschädigung mit Nekroptose, massiver Transaminasenerhöhung und hoher Letalität zeigen (Geisler, et al., 2007). Eine ähnliche TNF-Sensitivität zeigen IKK γ (NEMO)-defiziente Mäuse (Luedde, 2005). Jedoch zeigen Hepatozyten nach Deletion von IKK β aufgrund einer Restaktivität von NF- κ B einen nur leichten Leberschaden durch TNF-induzierte Apoptose (Geisler, et al., 2007; Luedde, 2005; Maeda, et al., 2003). Aktuell wird daher die Empfindlichkeit der Hepatozyten gegenüber Apoptose in Abhängigkeit vom Grad der NF- κ B-Inaktivierung gesehen (Chakraborty et al., 2010; Pasparakis, 2009).

Überraschenderweise konnten in dieser Arbeit weder in *Rela^{F/F}AlbCre*- noch in *Re-*

Ia^{F/F}MxCre-Mäusen erhöhte Apoptoseraten oder andere signifikante Leberzellschäden nach komplikationsloser PHx festgestellt werden. Zudem zeigten die Ergebnisse nach 80%PHx, dass RelA/p65 in Hepatozyten sogar bei diesem Modell mit normalerweise 60% Letalität (Cataldegirmen, et al., 2005) keine Unterschiede im Ausmaß des Zellschadens im Vergleich zu Kontrolltieren zu beobachten war. Dass eine kanonische NF-κB-Aktivierung in Hepatozyten tatsächlich nicht für den Schutz der Leber nach PHx erforderlich ist, legen auch Untersuchungen an transgenen Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Expression eines I-κBα-Superrepressors nahe, die ebenso keine vermehrte Leberschädigung nach PHx zeigten. (Chaisson, 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass eine kanonische NF-κB-Aktivierung in den Hepatozyten nicht essentiell ist, um Hepatozyten vor Apoptose oder anderen Leberschäden nach PHx zu schützen. Bei der bekannten hohen Sensitivität von Hepatozyten mit kompletter Inaktivierung von NF-κB gegenüber TNF-induzierter Apoptose könnten exogene Entzündungsstimuli wie z.B. nach PHx mit folgender Erhöhung der TNF-Spiegel die unterschiedlichen Beobachtungen in der Literatur erklären. Somit kommt einer sterilen und möglichst schonenden PHx-Methode ohne signifikante TNF-Spiegel zumindest bei NF-κB-defizienten Mäusen eine hohe Bedeutung zu (Fausto, et al., 2006).

Nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung der transaktivierenden NF-κB-Untereinheit RelA/p65 in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen zeigte sich erstaunlicherweise nicht nur ein ungestörter, sondern sogar ein beschleunigter Eintritt der Hepatozyten in die Synthesephase der Zellteilung mit erhöhter DNA-Synthese 36 h nach PHx. Diese Beobachtung wurde durch eine frühere und stärkere Expression von PCNA, Cyclin D1 und Cyclin A in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen bestätigt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einem beschleunigten Zellzyklus in Mäusen nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von IKKβ (Koch, et al., 2009; Malato, et al., 2008).

Dem beschleunigten Zellzykluseintritt in Hepatozyten in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen ging eine gesteigerte Aktivierung von STAT3 und JNK voraus. Die Aktivierung von STAT3 wurde bereits als wichtiger Signaltransduktionsweg für IL-6 in der Leberregeneration nach PHx beschrieben (Taub, 2004). In Mäusen mit genetischer Hepatozyten-spezifischer STAT3-Inaktivierung ist eine verminderte Leberregeneration mit vermindelter Expression von *immediate early genes* bekannt (Li et al., 2002) und in IL-6 defizienten Mäusen mit gestörter Leberregeneration konnte eine Wiederherstellung

der Regenerationsfähigkeit nach Normalisierung der STAT3-Aktivität durch Verabreichung von SCF (Stammzellfaktor) gezeigt werden (Ren, 2003). Durch eine kanonische NF- κ B-Aktivierung ist eine Hemmung der JNK-Signaltransduktion vorbeschrieben (Liu, et al., 2002). Dies erklärt die gesteigerte JNK-Aktivierung in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen nach Inaktivierung von RelA/p65 in Hepatozyten. JNK1-defiziente Mäuse zeigen eine deutlich verringerte Regenerationsfähigkeit (Schwabe, et al., 2003). Zusätzlich ist ein Anstieg von p21, einem Inhibitor der CDKs (*cyclin dependent kinases*), sowie eine verringerte Expression des Proto-Onkogens c-Myc im Zusammenhang mit der reduzierten Regenerationsfähigkeit in JNK1-defizienten Mäusen (Hui et al., 2008) und eine verminderte Leberregeneration mit reduzierter PCNA-Expression in konditionalen c-Myc-Knockout-Mäusen bekannt (Baena et al., 2005). Die gesteigerte JNK-Aktivierung, aufgrund einer fehlenden Inhibierung durch NF- κ B, scheint somit zumindest in Teilen für den beschleunigten Zellzykluseintritt in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen nach PHx verantwortlich. Dies bestätigte sich in einer deutlich stärkeren Expression des c-Myc-abhängigen Zellzyklusprotein PCNA in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen nach PHx. Daneben wurde eine schnellere Transition von der G0 zu G1-Phase durch eine höhere Expression von Cyclin D1 nach JNK-Aktivierung bereits beschrieben (Schwabe, et al., 2003). Ein durch Cyclin D1-Überexpression beschleunigter Zellzykluseintritt mit verkürzter G1-Phase durch eine beschleunigte G1/S-Phasen-Progression scheint jedoch mit einer verlängerten S- und G2-Phase einherzugehen (Malato, et al., 2008; Resnitzky, et al., 1994). Dies erklärt die normale Regeneration der Lebermasse trotz beschleunigtem Zellzykluseintritt nach Inaktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen. Der beschleunigte Zellzykluseintritt sollte daher zumindest hinsichtlich einer Regeneration der Lebermasse nicht überbewertet werden. Vielmehr zeigen diese Ergebnisse, dass der kanonischen NF- κ B-Signalweg in Hepatozyten in der Leberregeneration nach PHx entbehrlich ist.

Die vermehrte JNK-Aktivierung und der kleine proliferative Vorteil in RelA/p65-defizienten Hepatozyten gingen nach zusätzlicher Inaktivierung von RelA/p65 in Nicht-Parenchymzellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse nach PHx verloren, ähnlich wie nach systemischer pharmakologischer Hemmung von IKK β (Malato, et al., 2008). Dies unterstützt die Hypothese von NF- κ B-abhängigen, die Initiierung der Leberregeneration stimulierenden Signalen aus Nicht-Parenchymzellen bzw. Kupffer-Zellen (Fausto, et al., 2006). Sowohl in *Rela^{F/F}AlbCre*-, als auch in Kontrollmäusen zeigten sich erhöhte IL-6 Spiegel nach PHx. Das Konzept einer *Priming-Phase* in der Initiierung der Le-

berregeneration beinhaltet auch eine TNFR1- bzw. TNF-abhängige NF- κ B-Aktivierung mit folgender IL-6 Synthese in Kupffer-Zellen (Chaisson, 2002; Michalopoulos, 2007; Yang, et al., 2005). TNF kann im Rahmen von akuten und chronischen Lebererkrankungen sowohl als pro-apoptotischer, als auch als Überlebensstimulus für Hepatozyten wirken (Luedde, et al., 2006). Eine essentielle Rolle von TNF in der Initiierung der Leberregeneration nach PHx wurde in frühen Arbeiten aufgrund einer gestörten Leberregeneration in TNFR1-Knockout-Mäusen (Cressman, et al., 1996; Yamada, et al., 1997) und nach Injektion eines polyklonalen TNF-Antikörpers (Akerman et al., 1992) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit waren aber mit unserer Operationstechnik weder in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen bzw. in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen noch in Kontrollmäusen signifikante TNF-Serumspiegel nachweisbar, was die Abwesenheit signifikanter Apoptosen im Lebergewebe trotz der bekannten Sensibilität der Hepatozyten gegenüber TNF nach Inaktivierung von NF- κ B erklärt und eine entscheidende Rolle von TNF bei der Leberregeneration nach PHx in Frage stellt. Diese Auffassung unterstützen auch neuere Daten an TNF-defizienten Mäusen, die eine ungestörte Regenerationsfähigkeit zeigen (Fujita et al., 2001; Hayashi et al., 2005).

Auch wenn der geringe Proliferationsvorteil nach Hepatozyten-spezifischer Inaktivierung von RelA/p65 in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen mit zusätzlicher und effektiver Deletion von RelA/p65 in Kupfferzellen verloren ging, so verlief die Leberregeneration hinsichtlich Zellzykluseintritt, -progression und Regeneration der Lebermasse nach PHx ansonsten völlig normal. Dieses Ergebnis spricht gegen eine essentielle Rolle einer kanonischen NF κ B-Aktivierung in Kupffer-Zellen im Rahmen der Initiierung der Leberregeneration und steht im Widerspruch zu der derzeit favorisierten Hypothese eines essentiellen NF- κ B-abhängigen Zytokin-*Priming* der Hepatozyten (Li, et al., 2006; Seki, et al., 2005; Yang, et al., 2005). Eine vorbeschriebene deutlich verminderte Leberregeneration nach Inaktivierung von IKK β in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in *IKK β ^{F/F}MxCre*-Mäusen (Maeda, et al., 2005) könnte auf eine neben der Regulation des kanonischen NF- κ B-Signalwegs zusätzliche Regulation anderer Signalwege durch den IKK-Komplex zurückzuführen sein (Bettermann et al., 2010). Daneben kann jedoch die kompensatorische Aktivierung von RelA/p65 unabhängigen NF- κ B-Signalen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen letztendlich ebenso nicht ausgeschlossen werden.

Die *MxCre*-induzierte Deletion von RelA/p65 in unserem Mausmodell erfolgte nicht nur in allen Leberzellen, sondern auch in anderen IFN-sensitiven Geweben (Kuhn, et al., 1995). Durch die zusätzliche Inaktivierung von NF- κ B in Immunzellen wurde nach Deletion von IKK β oder RelA/p65 mit der *MxCre*-Mauslinie eine Endotoxinvermittelte, systemische Entzündungsreaktion durch eine negative Regulation von IL-1 β vorbeschrieben (Greten et al., 2007). Dies könnte auch ursächlich für die signifikant erhöhten IL-6 Serumspiegel bei völliger Inhibierung der intrahepatischen Expression von IL-6-mRNA in *Rela^{FF}MxCre*-Mäusen sein und legt den extrahepatischen Ursprung der Serumspiegel von IL-6 nahe. Auch wenn extrahepatisches IL-6 möglicherweise den intrahepatischen Verlust der NF- κ B-abhängigen Zytokinantwort der Kupffer-Zellen in *Rela^{FF}MxCre*-Mäusen kompensiert, sprechen neuere Daten ebenfalls gegen eine absolut essentielle Rolle von IL-6 für die Leberregeneration nach PHx. Nachdem frühe Daten auf eine essentielle Rolle von IL-6 in der Leberregeneration in einer Studie mit IL-6 defizienten Mäusen hindeuteten (Cressman, et al., 1996), zeigte sich in folgenden Studien mit IL-6-defizienten und gp130-defizienten Mäusen eine normale Leberregeneration nach PHx (Sakamoto et al., 1999; Wuestefeld et al., 2003). Auch nach genetischer Deletion des essentiellen Signalt-rasduktionsadapters der meisten *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) Myd88 zeigten sich bei äußerst reduzierter TNF- als auch IL-6 Synthese ebenso uneinheitliche Ergebnisse (Campbell et al., 2006; Seki, et al., 2005) wobei nur eine Arbeitsgruppe eine reduzierte DNA-Synthese und Proliferationsrate feststellte (Seki, et al., 2005).

Solche Widersprüche in verschiedenen Studien zu den frühen Ereignissen der Leberregeneration nach PHx sind häufig (Michalopoulos, 2010). Ebenso wie die uneinheitliche Beobachtung einer NF- κ B Aktivierung von 30 min (Cressman, et al., 1994) bis 12 h nach PHx (Yang, et al., 2005) werden auch nur unregelmäßig erhöhte TNF-Spiegel berichtet und die Rolle der Zytokine in der Initiierung der Leberregeneration uneinheitlich bewertet (Fausto, et al., 2006). Für diese unterschiedlichen Ergebnisse in der frühen Phase der Leberregeneration bei Verwendung ähnlicher, oder gleicher Mausmodelle können Störgrößen wie eine unterschiedliche Operationstechnik, unterschiedliche Anästhetika, der postoperative Einsatz von Schmerzmitteln oder unsterile Bedingungen verantwortlich sein. Seit der Beschreibung einer partiellen Hepatektomie durch Higgins und Anderson 1931 bei Ratten (Higgins, 1931) wurde die partielle Hepatektomie stetig weiterentwickelt und viele unterschiedliche operative Me-

thoden beschrieben (Greene, et al., 2003; Martins, et al., 2008). Eine Standardisierung der Operationsmethode ist aber bis heute nicht erfolgt. Allein aufgrund der verschiedenen Anatomie von Ratten und Mäusen, mit dem Vorhandensein einer Gallenblase bei Mäusen, muss die Operationsmethode angepasst werden. Nach Einengung der Vena cava durch die Ligatur zeigen sich Nekrosen im verbleibenden Parenchym, oder bei versehentlicher Ligatur von größeren Gallengängen eine Cholestase mit folgender Cholangitis und einer deutlich reduzierten Regeneration. Dass tatsächlich die Operationstechnik die Untersuchungsergebnisse nach PHx massiv beeinflussen kann, legen Daten an IL-6-defizienten Mäusen nahe. Im Falle der klassischen 1-Ligaturmethode ist eine hohe Letalität nach PHx in IL-6 defizienten Mäusen beschrieben (Blindenbacher et al., 2003; Cressman, et al., 1996), wobei sich in einer anderen Studie nach Resektion der Leberlappen durch separate Ligaturen unter Schonung der Gallenblase keine erhöhte Letalität in IL-6-defizienten Mäusen zeigte (Sakamoto, et al., 1999). Somit sollte bei Mäusen eine PHx-Methode mit separaten Ligaturen unter Einsatz mikrochirurgischer Techniken erfolgen (Martins, et al., 2008). Auch verschiedene Anästhesieverfahren können zu unterschiedlicher Leberzellschädigung nach partieller Hepatektomie führen. So konnte sowohl für das hepatotoxische Avertin eine höhere postoperative Mortalität, als auch für Ketamin eine zumindest erhöhte Hepatotoxizität gegenüber dem inhalativen Isofluran gezeigt werden (Mitchell, et al., 2008).

Die nicht standardisierte PHx-Methode könnte somit zumindest in Teilen für die uneinheitlichen Beobachtungen und teilweise nicht reproduzierbaren Ergebnisse verantwortlich sein. Eine nach PHx zusätzlich bestehende Entzündungsreaktion durch verschiedene Operationsmethoden, kann eine Aktivierung des kanonischen NF- κ B Signalwegs in Hepatozyten erfordern, um diese vor TNF-induzierter Apoptose zu schützen. So konnte ebenso gezeigt werden, dass ein unterschiedliches Ausmaß einer Akut-Phase-Reaktion in konditionalen Glykoprotein-130-Knockout-Mäusen zu unterschiedlicher Leberregeneration und Leberzellschädigung nach PHx führt (Wuestefeld, et al., 2003).

Abschließend ist festzuhalten, dass RelA/p65 als transaktivierende Untereinheit im kanonischen NF- κ B-Signalweg während der Leberregeneration unterschiedliche Funktionen in den einzelnen Zellkompartimenten erfüllt. Diese sind jedoch mit der in dieser Arbeit verwendeten Operationstechnik weder in den Hepatozyten, noch in den Nicht-Parenchymzellen essentiell für eine erfolgreiche Leberregeneration nach PHx.

Die besondere Fähigkeit der Leber durch kompensatorische Hyperplasie nach PHx den Funktions- und Gewebsverlust zu regenerieren scheint nicht auf einzelne Stimuli wie TNF, IL-6, oder eine Aktivierung des kanonischen NF- κ B Signalwegs angewiesen zu sein. Vielmehr besteht ein Netzwerk an stimulierenden Faktoren mit hoher Redundanz. Nur in besonderen Situationen, wie einer gleichzeitig zur Leberregeneration bestehenden Entzündungsreaktion, können einzelne Faktoren essentiell sein, um die Integrität der Zellen und die Regenerationsfähigkeit der Leber zu schützen.

6 Zusammenfassung

Die Leber besitzt die einzigartige Fähigkeit, durch Proliferation reifer, voll differenzierter Hepatozyten nach z.B. infektiösen, toxischen oder auch operativen Schäden Gewebe zu regenerieren. Dieser hoch konservierte Regenerationsmechanismus ist aufgrund der vielfältigen lebensnotwendigen Aufgaben der Leber von großer Bedeutung für den Gesamtorganismus. Die Entwicklung neuer Therapieansätze und Erweiterung bestehender Therapien setzt ein besseres Verständnis der intra- und extrazellulären Regulationsmechanismen voraus, welche die voll differenzierten, ruhenden Hepatozyten zur Zellteilung anstoßen und den Regenerationsprozess steuern. Das Modell der partiellen Hepatektomie (PHx) in Maus und Ratte gilt seit langem als der Goldstandard, um die Leberregeneration nach Verlust von Gewebe und darin das Zusammenspiel verschiedenster Faktoren *in vivo* zu erforschen.

Der NF- κ B/Rel Signalweg ist ein sehr schneller Aktivierungsmechanismus in verschiedenen Zellsystemen, der eine zentrale Rolle bei Infektionen, der Immunantwort, Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose spielt. Vor über 15 Jahren wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, bestehend aus den NF- κ B-Untereinheiten RelA/p65 und p50, erstmals nach partieller Hepatektomie (PHx) in Nagetieren beschrieben. Trotz vieler Bemühungen, die funktionelle Relevanz des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Leberregeneration näher zu charakterisieren, wird die Rolle von NF- κ B in diesem Prozess uneinheitlich bewertet. Nachdem initial eine essentielle proliferative und zytoprotektive Rolle von NF- κ B in Hepatozyten beschrieben worden war, wird aktuell ein Modell favorisiert, in dem eine Aktivierung von NF- κ B in Kupffer-Zellen zu einer Zytokinantwort führt und essentiell ist, um Hepatozyten für proliferative Signale empfänglich zu machen (*Priming*).

Um die teilweise widersprüchliche Datenlage näher zu beleuchten, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle der transaktivierenden NF- κ B-Untereinheit RelA/p65 Leberzellkompartiment-spezifisch in Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen nach PHx zu untersuchen. Hierfür wurden zwei verschiedene genetische Mausmodelle verwendet, in denen RelA/p65 entweder Hepatozyten-spezifisch (*Rela^{F/F}AlbCre*-Mäuse) oder aber in allen Leberzellen (Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen, *Rela^{F/F}MxCre*-Mäuse) konditional inaktiviert ist. In vorliegender Arbeit wurden die verschiedenen Mausmodelle verschiedenen PHx-Modellen unterzogen und auf ihre Regenerationsfähigkeit morphologisch und biochemisch charakterisiert.

Nach Hepatozyten-spezifischer Deletion von RelA/p65 in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen zeigte sich nach 2/3-PHx überraschenderweise ein beschleunigter Zellzykluseintritt möglicherweise durch eine vermehrte JNK-Aktivierung. Dieser geringe Proliferationsvorteil blieb jedoch ohne signifikante Auswirkung auf die Regeneration der Lebermasse. Obwohl Hepatozyten nach Inaktivierung von RelA/p65 höchst empfindlich für TNF-induzierte Apoptose sind, zeigte sich in *Rela^{F/F}AlbCre*-Mäusen nach 2/3-PHx und sogar nach 80%-PHx keine vermehrte Leberschädigung nach PHx. Dies zeigt zum einen, dass die TNF-Spiegel unter schonenden Operationsbedingungen nicht ausreichen, um signifikante Apoptosen in RelA/p65-defizienten Hepatozyten zu induzieren. Zum anderen zeigen diese Ergebnisse, dass RelA/p65 in Hepatozyten nicht essentiell für eine erfolgreiche Leberregeneration ist.

Nach zusätzlicher Inaktivierung von RelA/p65 nicht nur in Hepatozyten sondern auch in Nicht-Parenchymzellen in *Rela^{F/F}MxCre*-Mäusen war die Beschleunigung des Zellzyklus nicht mehr vorhanden, was darauf hinweist, dass NF- κ B-abhängige Signale aus Nicht-Parenchymzellen stimulierende Effekte auf den Regenerationsprozess nach PHx haben. Überraschenderweise verliefen aber ansonsten Zellzykluseintritt und -progression sowie Regeneration der Lebermasse völlig normal.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass die transaktivierende NF- κ B-Untereinheit RelA/p65 gegensätzliche Funktionen in den verschiedenen Leberzellkompartimenten in der Leberregeneration erfüllt. Allerdings waren die beobachteten Effekte nach genetischer Inaktivierung von RelA/p65 in den einzelnen Leberkompartimenten gering ausgeprägt. Zudem war in allen untersuchten Modellen eine normale Regeneration der Lebermasse zu verzeichnen, weshalb der RelA/p65-abhängige kanonische NF- κ B-Signalweg nicht essentiell für eine erfolgreiche Leberregeneration nach PHx ist.

7 Literaturverzeichnis

- Acharya, N., Yoon, J. H., Gali, H., Unk, I., Haracska, L., Johnson, R. E., Hurwitz, J., Prakash, L., & Prakash, S. (2008). Roles of pcna-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase eta in translesion DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 17724-17729.
- Aeschylus. (1990). *Aeschylus . Prometheus bound* (J. Scully & C. J. Herington, Trans. Vol. 27). New York, USA: Oxford University Press.
- Akerman, P., Cote, P., Yang, S. Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G. J., & Diehl, A. M. (1992). Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *263*, G579-585.
- Algül, H., Treiber, M., Lesina, M., Nakhai, H., Saur, D., Geisler, F., Pfeifer, A., Paxian, S., & Schmid, R. M. (2007). Pancreas-specific rela/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*, 1490-1501.
- Anatskaya, O. V., Vinogradov, A. E., & Kudryavtsev, B. N. (1994). Hepatocyte polyploidy and metabolism/life-history traits: Hypotheses testing. *Journal of Theoretical Biology*, *168*, 191-199.
- Baena, E., Gandarillas, A., Vallespinós, M., Zanet, J., Bachs, O., Redondo, C., Fabregat, I., Martínez-A., C., & De Alborán, I. M. (2005). C-myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 7286-7291.
- Basak, S., Shih, V. F., & Hoffmann, A. (2008). Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the nf-kappab signaling system. *Molecular and cellular biology*, *28*, 3139-3150.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., & Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the rela component of nf-kb. *Nature*, *376*, 167-170.
- Bernal, W., Auzinger, G., Dhawan, A., & Wendon, J. (2010). Acute liver failure. *The Lancet*, *376*, 190-201.
- Bettermann, K., Vucur, M., Haybaeck, J., Koppe, C., Janssen, J., Heymann, F., Weber, A., Weiskirchen, R., Liedtke, C., Gassler, N., Müller, M., De Vos, R., Wolf, M. J., Boege, Y., Seleznik, G. M., Zeller, N., Erny, D., Fuchs, T., Zoller, S., Cairo, S., Buendia, M.-A., Prinz, M., Akira, S., Tacke, F., Heikenwalder, M., Trautwein, C., & Luedde, T. (2010). Tak1 suppresses a nemo-dependent but nf-kb-independent pathway to liver cancer. *Cancer Cell*, *17*, 481-496.
- Blindenbacher, A., Wang, X., Langer, I., Savino, R., Terracciano, L., & Heim, M. H. (2003). Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*, *38*, 674-682.

- Blouin, A., Bolender, R. P., & Weibel, E. R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *The Journal of Cell Biology*, *72*, 441-455.
- Campbell, J. S., Riehle, K. J., Brooling, J. T., Bauer, R. L., Mitchell, C., & Fausto, N. (2006). Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is myd88-dependent, but independent of cd14, tlr2, and tlr4. *J Immunol*, *176*, 2522-2528.
- Cataldegirmen, G., Zeng, S., Feirt, N., Ippagunta, N., Dun, H., Qu, W., Lu, Y., Rong, L. L., Hofmann, M. A., Kislinger, T., Pachydaki, S. I., Jenkins, D. G., Weinberg, A., Lefkowitz, J., Rogiers, X., Yan, S. F., Schmidt, A. M., & Emond, J. C. (2005). Rage limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of tnf-alpha and nf-kappab. *The Journal of experimental medicine*, *201*, 473-484.
- Chaisson, M. L. (2002). Hepatocyte-specific inhibition of nf-kappab leads to apoptosis after tnf treatment, but not after partial hepatectomy. *Journal of Clinical Investigation*, *110*, 193-202.
- Chakraborty, J. B., & Mann, D. A. (2010). Nf-kb signalling: Embracing complexity to achieve translation. *Journal of Hepatology*, *52*, 285-291.
- Chen, L.-F., & Greene, W. C. (2004). Shaping the nuclear action of nf-kb. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*, 392-401.
- Chen, T., & Chen, P. (1994). The myth of prometheus and the liver. *JRSM*, *87*, 754-755.
- Coornaert, B., Carpentier, I., & Beyaert, R. (2009). A20: Central gatekeeper in inflammation and immunity. *Journal of Biological Chemistry*, *284*, 8217-8221.
- Cressman, D. E., Diamond, R. H., & Taub, R. (1995). Rapid activation of the stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology*, *21*, 1443-1449.
- Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., Deangelis, R. A., Ciliberto, G., Furth, E. E., Poli, V., & Taub, R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*, *274*, 1379-1383.
- Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., Haber, B. A., & Taub, R. (1994). Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa b in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *Journal of Biological Chemistry*, *269*, 30429-30435.
- Dahm, F., Georgiev, P., & Clavien, P. A. (2005). Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: Definition, mechanisms of disease and clinical implications. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *5*, 2605-2610.
- Deangelis, R. A., Kovalovich, K., Cressman, D. E., & Taub, R. (2001). Normal liver regeneration in p50/nuclear factor kappab1 knockout mice. *Hepatology*, *33*, 915-924.

- Emre, S., & Umman, V. (2011). Split liver transplantation: An overview. *Transplantation proceedings*, 43, 884-887.
- Fausto, N. (2000). Liver regeneration. *Journal of Hepatology*, 32, 19-31.
- Fausto, N. (2001). Liver regeneration: From laboratory to clinic. *Liver Transplantation*, 7, 835-844.
- Fausto, N., Campbell, J. S., & Riehle, K. J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology*, 43, S45-53.
- Fausto, N., & Riehle, K. J. (2005). Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 12, 181-189.
- Fong, Y., Fortner, J., Sun, R. L., Brennan, M. F., & Blumgart, L. H. (1999). Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: Analysis of 1001 consecutive cases. *Annals of Surgery*, 230, 309.
- Forbes, S., Vig, P., Poulsom, R., Thomas, H., & Alison, M. (2002). Hepatic stem cells. *The Journal of Pathology*, 197, 510-518.
- Fujita, J., Marino, M. W., Wada, H., Jungbluth, A. A., Mackrell, P. J., Rivadeneira, D. E., Stapleton, P. P., & Daly, J. M. (2001). Effect of tnf gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery*, 129, 48-54.
- Garcea, G., & Maddern, G. (2009). Liver failure after major hepatic resection. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 16, 145-155.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119, 493-501.
- Geisler, F., Algül, H., Paxian, S., & Schmid, R. M. (2007). Genetic inactivation of rela/p65 sensitizes adult mouse hepatocytes to tnf-induced apoptosis in vivo and in vitro. *Gastroenterology*, 132, 2489-2503.
- Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing pieces in the nf-kb puzzle. *Cell*, 109, S81-S96.
- Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). Nf-kb and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16, 225-260.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., & Lamb, N. J. C. (1991). Cyclin a is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67, 1169-1179.
- Greene, A. K., & Puder, M. (2003). Partial hepatectomy in the mouse: Technique and perioperative management. *Journal of Investigative Surgery*, 16, 99-102.
- Gressner, A. M. (1994). Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis. *Gut*, 35, 1331-1333.
- Greten, F. R., Arkan, M. C., Bollrath, J., Hsu, L.-C., Goode, J., Miething, C., G^ktuna,

- S. I., Neuenhahn, M., Fierer, J., Paxian, S., Van Rooijen, N., Xu, Y., O'cain, T., Jaffee, B. B., Busch, D. H., Duyster, J., Schmid, R. M., Eckmann, L., & Karin, M. (2007). Nf-kb is a negative regulator of il-1 β secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of ikk β . *Cell*, *130*, 918-931.
- Gruttadauria, S. (2010). Small-for-size syndrome in adult-to-adult living-related liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology*, *16*, 5011.
- Hayashi, H., Nagaki, M., Imose, M., Osawa, Y., Kimura, K., Takai, S., Imao, M., Naiki, T., Kato, T., & Moriwaki, H. (2005). Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Liver International*, *25*, 162-170.
- Higgins, G., Anderson, Rm. (1931). Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, *12*, 186-202.
- Hui, L., Zatloukal, K., Scheuch, H., Stepniak, E., & Wagner, E. F. (2008). Proliferation of human hcc cells and chemically induced mouse liver cancers requires jnk1-dependent p21 downregulation. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*, 3943-3953.
- limuro, Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behrns, K. E., Schoonhoven, R., Grisham, J. W., & Brenner, D. A. (1998). Nfkappab prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, *101*, 802-811.
- Iwai, M., Cui, T.-X., Kitamura, H., Saito, M., & Shimazu, T. (2001). Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine*, *13*, 60-64.
- Joo, M., Hahn, Y. S., Kwon, M., Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., & Christman, J. W. (2005). Hepatitis c virus core protein suppresses nf-kappab activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with ikappab kinase beta. *Journal of virology*, *79*, 7648-7657.
- Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J. U., Lee, R. J., Segall, J. E., Westwick, J. K., Der, C. J., & Pestell, R. G. (1999). Integration of rac-dependent regulation of cyclin d1 transcription through a nuclear factor-kappab-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *274*, 25245-25249.
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). Nf-[kappa]b: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, *5*, 749-759.
- Karin, M., & Lin, A. (2002). Nf-kb at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, *3*, 221-227.
- Karvellas, C. J., Gibney, N., Kutsogiannis, D., Wendon, J., & Bain, V. G. (2007). Bench-to bedside review: Current evidence for extracorporeal albumin dialysis systems in liver failure. *Critical care*, *11*, 215.
- Kawasaki, S., Makuuchi, M., Matsunami, H., Hashikura, Y., Ikegami, T., Nakazawa,

- Y., Chisuwa, H., Terada, M., & Miyagawa, S.-I. (1998). Living related liver transplantation in adults. *Annals of Surgery*, *227*, 269-274.
- Koch, K. S., Maeda, S., He, G., Karin, M., & Leffert, H. L. (2009). Targeted deletion of hepatocyte ikk β confers growth advantages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *380*, 349-354.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., & Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science*, *269*, 1427-1429.
- Li, C.-C., Chou, C.-K., Wang, M.-H., & Tsai, T.-F. (2006). Overexpression of abin-2, a negative regulator of nf-kb, delays liver regeneration in the abin-2 transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *342*, 300-309.
- Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V., & Taub, R. (2002). Stat3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 28411-28417.
- Liu, H., Lo, C. R., & Czaja, M. J. (2002). Nf-kappab inhibition sensitizes hepatocytes to tnf-induced apoptosis through a sustained activation of jnk and c-jun. *Hepatology*, *35*, 772-778.
- Luedde, T. (2005). Deletion of ikk2 in hepatocytes does not sensitize these cells to tnf-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation*, *115*, 849-859.
- Luedde, T., & Trautwein, C. (2006). Intracellular survival pathways in the liver. *Liver International*, *26*, 1163-1174.
- Macias-Silva, M., Li, W., Leu, J. I., Crissey, M. A., & Taub, R. (2002). Up-regulated transcriptional repressors snon and ski bind smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *The Journal of biological chemistry*, *277*, 28483-28490.
- Maeda, S., Chang, L., Li, Z.-W., Luo, J.-L., Leffert, H., & Karin, M. (2003). Ikk β is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating tnfa. *Immunity*, *19*, 725-737.
- Maeda, S., Kamata, H., Luo, J.-L., Leffert, H., & Karin, M. (2005). Ikk β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, *121*, 977-990.
- Malato, Y., Sander, L. E., Liedtke, C., Al-Masaoudi, M., Tacke, F., Trautwein, C., & Beraza, N. (2008). Hepatocyte-specific inhibitor-of-kappab-kinase deletion triggers the innate immune response and promotes earlier cell proliferation during liver regeneration. *Hepatology*, *47*, 2036-2050.
- Martins, P. N., Theruvath, T. P., & Neuhaus, P. (2008). Rodent models of partial hepatectomies. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, *28*, 3-11.
- Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., & Okamura, H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo.

- Science*, 302, 255-259.
- Mccuskey, R. (2012). Chapter 1 - anatomy of the liver *Zakim and boyer's hepatology (sixth edition)* (pp. 3-19). Saint Louis: W.B. Saunders.
- Mcphail, M. J. W., Bajaj, J. S., Thomas, H. C., & Taylor-Robinson, S. D. (2010). Pathogenesis and diagnosis of hepatic encephalopathy. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 4, 365-378.
- Michalopoulos, G. K. (2007). Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 286-300.
- Michalopoulos, G. K. (2010). Liver regeneration after partial hepatectomy: Critical analysis of mechanistic dilemmas. *The American Journal of Pathology*, 176, 2-13.
- Michalopoulos, G. K., & Defrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science*, 276, 60-66.
- Mitchell, C., & Willenbring, H. (2008). A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature Protocols*, 3, 1167-1170.
- Oe, S., Lemmer, E. R., Conner, E. A., Factor, V. M., Leveen, P., Larsson, J., Karlsson, S., & Thorgeirsson, S. S. (2004). Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology*, 40, 1098-1105.
- Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Finegold, M., & Grompe, M. (1999). The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *The American Journal of Pathology*, 155, 2135-2143.
- Pasparakis, M. (2009). Regulation of tissue homeostasis by nf-kappab signalling: Implications for inflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology*, 9, 778-788.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., & Ben-Neriah, Y. (2004). Nf-kb functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431, 461-466.
- Plümpe, J., Malek, N. P., Bock, C.-T., Rakemann, T., Manns, M. P., & Trautwein, C. (2000). Nf-kb determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278, G173-G183.
- Postic, C., & Magnuson, M. A. (2000). DNA excision in liver by an albumin-cre transgene occurs progressively with age. *genesis*, 26, 149-150.
- Power, C., & Rasko, J. E. J. (2008). Whither prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration. *Annals of Internal Medicine*, 149, 421-426.
- Rademacher, S., Oppert, M., & Jörres, A. (2011). Artificial extracorporeal liver support therapy in patients with severe liver failure. *Expert Review of*

- Gastroenterology & Hepatology*, 5, 591-599.
- Rappaport, A. M. (1973). The microcirculatory hepatic unit. *Microvascular Research*, 6, 212-228.
- Ren, X. (2003). Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in il-6 knockout mice following 70% hepatectomy. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1407-1418.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., & Reed, S. I. (1994). Acceleration of the g1/s phase transition by expression of cyclins d1 and e with an inducible system. *Molecular and cellular biology*, 14, 1669-1679.
- Rockey, D. C. (2001). Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis*, 21, 337,350.
- Rockey, D. C., & Friedman, S. L. (2012). Chapter 5 - hepatic fibrosis and cirrhosis *Zakim and boyer's hepatology (sixth edition)* (pp. 64-85). Saint Louis: W.B. Saunders.
- Sakamoto, T., Liu, Z., Murase, N., Ezure, T., Yokomuro, S., Poli, V., & Demetris, A. J. (1999). Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology*, 29, 403-411.
- Sandgren, E. P., Palmiter, R. D., Heckel, J. L., Daugherty, C. C., Brinster, R. L., & Degen, J. L. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell*, 66, 245-256.
- Sass, D. A., & Shakil, A. O. (2003). Fulminant hepatic failure. *Gastroenterology clinics of North America*, 32, 1195-1211.
- Schwabe, R. F., Bradham, C. A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B. L., Schoonhoven, R., & Brenner, D. A. (2003). C-jun-n-terminal kinase drives cyclin d1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology*, 37, 824-832.
- Seki, E., Tsutsui, H., Iimuro, Y., Naka, T., Son, G., Akira, S., Kishimoto, T., Nakanishi, K., & Fujimoto, J. (2005). Contribution of toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology*, 41, 443-450.
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein nf-kb by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47, 921-928.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Kr $\sqrt{\text{Hn}}$, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.-C., & Karin, M. (2001). Activation by ikk α of a second, evolutionary conserved, nf-kb signaling pathway. *Science*, 293, 1495-1499.
- Sha, W. C., Liou, H.-C., Tuomanen, E. I., & Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of nfkb leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*, 80, 321-330.
- Sigal, S. H., Rajvanshi, P., Gorla, G. R., Sokhi, R. P., Saxena, R., Gebhard, D. R.,

- Reid, L. M., & Gupta, S. (1999). Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276, G1260-G1272.
- Sizemore, N., Leung, S., & Stark, G. R. (1999). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the nf-kb p65/rela subunit. *Molecular and cellular biology*, 19, 4798-4805.
- Song, T. J., Adusumilli, P., & Fong, Y. (2005). Prognostische faktoren kolorektaler lebermetastasen. *Der Chirurg*, 76, 535-542.
- Su, F., & Schneider, R. J. (1996). Hepatitis b virus hbx protein activates transcription factor nf-kappab by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *Journal of Virology*, 70, 4558-4566.
- Taub, R. (1996). Liver regeneration 4: Transcriptional control of liver regeneration. *The FASEB Journal*, 10, 413-427.
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 836-847.
- Taub, R., Greenbaum, L. E., & Peng, Y. (1999). Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration. *Semin Liver Dis*, 19, 117,127.
- Tiniakos, D. G., Kandilis, A., & Geller, S. A. (2010). Tityus: A forgotten myth of liver regeneration. *Journal of Hepatology*, 53, 357-361.
- Trautwein, C., Rakemann, T., Niehof, M., Rose-John, S., & Manns, M. P. (1996). Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology*, 110, 1854-1862.
- Van Oosten, M., Van De Bilt, E., De Vries, H. E., Van Berkel, T. J. C., & Kuiper, J. (1995). Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology*, 22, 1538-1546.
- Varfolomeev, E. E., & Ashkenazi, A. (2004). Tumor necrosis factor: An apoptosis junkie? *Cell*, 116, 491-497.
- Viatour, P., Merville, M.-P., Bours, V., & Chariot, A. (2005). Phosphorylation of nf-kb and ikb proteins: Implications in cancer and inflammation. *Trends in Biochemical Sciences*, 30, 43-52.
- Vinogradov, A. E., Anatskaya, O. V., & Kudryavtsev, B. N. (2001). Relationship of hepatocyte ploidy levels with body size and growth rate in mammals. *Genome*, 44, 350-360.
- Wisse, E., Braet, F., Dianzhong Luo, De Zanger, R., Jans, D., Crabbe, E., & Vermoesen, A. (1996). Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicologic Pathology*, 24, 100-111.

- Wuestefeld, T., Klein, C., Streetz, K. L., Betz, U., Lauber, J., Buer, J., Manns, M. P., Muller, W., & Trautwein, C. (2003). Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *The Journal of biological chemistry*, 278, 11281-11288.
- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J. Ä., & Fausto, N. (1997). Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: Deficient liver regeneration in mice lacking type i tumor necrosis factor,âreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 1441-1446.
- Yamada, Y., Webber, E. M., Kirillova, I., Peschon, J. J., & Fausto, N. (1998). Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: Requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology*, 28, 959-970.
- Yamazaki, S., Takayama, T., & Makuuchi, M. (2010). The technical advance and impact of caudate lobe venous reconstruction in left liver: Additional safety for living-related donor liver transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 23, 345-349.
- Yang, L., Magness, S. T., Bataller, R., Rippe, R. A., & Brenner, D. A. (2005). Nf-kb activation in kupffer cells after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289, G530-538.
- Yoshida, H., Kato, N., Shiratori, Y., Otsuka, M., Maeda, S., Kato, J., & Omata, M. (2001). Hepatitis c virus core protein activates nuclear factor kappa b-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *The Journal of biological chemistry*, 276, 16399-16405.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung während der Arbeit an meiner Dissertation bedanken.

Herrn Professor Dr. med. Roland M. Schmid danke ich für Bereitstellung der technischen Einrichtungen an seinem Lehrstuhl und der fortwährende Unterstützung.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. med. Fabian Geisler für die Überlassung des spannenden Themas, die fortwährende, exzellente Betreuung und geduldige Unterstützung zu jeder Zeit.

Ebenso danke ich Frau Silvia Krutsch für Ihre fachliche und theoretische Hilfe, sowie für die geduldige Einarbeitung.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und Verena für die Unterstützung während der Zeit meines Studiums und der Erstellung dieser Dissertation.