

Klinik und Poliklinik für Chirurgie
Technische Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. Helmut Friess)

**Der Einfluss von MAVS und STING auf die Leberregeneration nach
partieller Hepatektomie im Mausmodell**

Sarah Schulze

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Norbert Hüser
2. Priv.-Doz. Dr. Anna M. Schlitter

Die Dissertation wurde am 18.12.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 11.06.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Leber in Mythologie und Medizingeschichte.....	1
1.2 Funktion und Anatomie der Leber.....	2
1.3 Regenerationsfähigkeit der Leber	4
1.3.1 Zelluläres Korrelat des regenerierenden Lebergewebes	4
1.3.2 Regulation der Regeneration.....	5
1.3.3 Rolle von TNF- α , IL-6 und STAT3.....	7
1.4 Innates Immunsystem und seine Rezeptoren.....	9
1.5 Zentrale Adaptermoleküle MAVS und STING.....	10
1.6 Bedeutung einer modulierten Immunantwort für die Leberregeneration.....	14
2 Zielsetzung	16
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Material	18
3.1.1 Verbrauchsmaterialien	18
3.1.2 Chemikalien	18
3.1.3 Stammlösungen, Puffer und Gele	20
3.1.4 Antikörper	21
3.1.5 Reagenzienkits	22
3.1.6 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide	22
3.1.7 Tierexperimentelle Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.8 Allgemeine Geräte.....	23
3.2 Tierexperimentelle Methoden	24
3.2.1 Allgemeine Haltungsbedingungen	25
3.2.2 Mauslinien.....	25
3.2.3 Partielle Hepatektomie.....	25
3.2.4 Intraperitoneale Injektion	27
3.2.5 Blut- und Organentnahme.....	28
3.2.6 Berechnung des Leber/Gewichts-Quotienten	29
3.2.7 Serumanalyse mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	29
3.3 RNA-Extraktion aus Lebergewebe und quantitativer Echtzeit-PCR.....	30
3.3.1 RNA-Isolierung	30
3.3.2 Synthese der cDNA.....	31

3.3.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	32
3.4	Proteinbiochemische Analysen.....	33
3.4.1	Herstellung von Gewebelysaten	33
3.4.2	Bestimmung des Proteingehalts.....	33
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.4.4	Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (Western-Blot).....	35
3.4.5	Immunochemische Detektion spezifischer Proteine (Immunoblot).....	36
3.5	Histologische Methoden.....	36
3.5.1	Vorbereitung der Gewebe für die Paraffinhistologie	36
3.5.2	Bromodeoxyuridin (BrdU)-Immunhistologie	37
3.5.3	Mikroskopische Auswertung der Histologie.....	39
3.6	Auswertung und Statistik.....	39
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Verminderte Regeneration der Lebermasse bei MAVS/STING (-/-) Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx	40
4.2	Verringertes Proliferationsverhalten im defizienten Mausstamm 32h und 40h nach PHx.....	41
4.3	Differentes Expressionsmuster an IL-6 bei unverändertem TNF- α Level im murinen Serum	43
4.4	Induktion von pSTAT3 sowohl in Wildtyp als auch in MAVS/STING (-/-) Mäusen 4h nach PHx.....	44
4.5	Erhöhte Expression von pSTAT3 in MAVS/STING (-/-) Tieren 2h nach PHx... ..	45
4.6	Analyse des STAT3-Zielgens und Inhibitor des JAK-STAT Signalwegs: SOCS3 als Inhibitor der Regeneration.....	46
4.7	Abnahme der Expression von pERK1/2 gleichermaßen in der Wildtyp- und MAVS/STING (-/-) Kohorte zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx	47
4.8	Unveränderte Proteinexpression von TRAF5 4h nach PHx	48
4.9	Zu Serumspiegeln äquivalente IL-6 Genexpression bei vergleichbar exprimierten IL-6 Rezeptoren.....	49
4.10	Analyse der Proliferationsmarker c-Myc und Cyclin D1 zu frühen Zeitpunkten nach PHx.....	51
4.11	Analyse der zellzyklusregulierenden Proteine Cyclin D1, E1, p-RB, p-CDK2 und CDK1.....	52
4.12	p21 ^{Cip1} als Marker für den Zellzyklusarrest.....	55
5	Diskussion.....	56
6	Zusammenfassung	64
7	Summary.....	65
8	Anhang.....	66

8.1	Abbildungsverzeichnis	66
8.2	Tabellenverzeichnis	67
9	Literaturverzeichnis.....	68
	Danksagung.....	75
	Publikationen.....	76

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
ALT	Alanin-Amintransferase
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
c	Konzentration
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDK	Cyclin-dependent kinase
CS	CARDIF (MAVS) und STING
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	Et alii (latein „und andere“)
Fa.	Firma
g	Gramm
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff

HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte growth factor
Hz	Hertz
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IKK β	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IL-6	Interleukin 6
IL-6-R	Interleukin 6 Rezeptor
IL-6-st	Interleukin 6 signal transducer
i.p.	Intraperitoneal
IRF3	Interferon regulatory factor 3
JAK	Januskinase
Jh.	Jahrhundert
KG	Körpergewicht
Lig.	Ligamentum
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling
mg	Milligramm
min	Minuten
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MyD88	Myloid differentiation factor 88
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ s	Mikrosekunde
n	Anzahl
n.Chr.	nach Christus
NaCl	Natriumchlorid

NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
p21 ^{Cip1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHx	Partielle Hepatektomie
Proc.	Processus
PRR	Pattern recognition receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase bzw. Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulphat
sec	Sekunden
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STING	Stimulator of interferon genes
TBST	TBS-Tween Waschpuffer
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAF5	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor-assoziierter Faktor 5
Trpf.	Tropfen

U	Unit
u.a.	unter anderem
UPL	Universal probe library
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watt
WB	Western Blot
well	Vertiefung einer 96-Well-Platte
Wnt2	Wingless-type MMTV integration site family, member 2
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Leber in Mythologie und Medizingeschichte

Auf der Suche nach den ersten historischen Belegen, die auf eine Regenerationsfähigkeit der Leber hindeuten könnten, fällt die griechische Mythologie als Quelle ins Gewicht. Diese wird besonders im Hinblick auf die Legende um Prometheus diskutiert, in der es zu einer Unstimmigkeit zwischen Prometheus und Zeus im Hinblick auf das Wohlergehen der Menschheit kommt. Als Bestrafung, auferlegt vom Herrscher des Olymps, ernährt sich ein Adler Tag für Tag von der Leber des Titans Prometheus, welche sich über Nacht jedoch wieder erholt. Dies wirft die Frage auf, ob die Griechen von der Regenerationsfähigkeit der Leber wussten (Chen & Chen, 1994). Möglicherweise betrachteten die Griechen die Leber aber auch lediglich als Zentrum des Lebens, und damit für diese göttliche Bestrafung als angemessenes Ziel, ohne weitere Kenntnisse über die Regenerationsfähigkeit zu besitzen (Power & Rasko, 2008). Nicht als Zentrum des Lebens, aber als Quelle des Blutes interpretierte der griechische Physiker Galen die Leber später (130-200 n.Chr.), als er den allgemeinen Wissensschatz mit seiner Arbeit zur Leberanatomie und zum Gefäßsystem erweiterte (Lehmann & Clavien, 2010). Nach dieser Zeit der Mythen und Spekulationen folgte ein außerordentliches Geschehen, als Fabricus Hildanus die erste erfolgreiche Leberresektion im frühen 17.Jh. durchführte. Er entfernte einen Teil der Leber bei einem jungen Mann, der sich im Sturz versehentlich ein Messer in den Oberbauch gestochen hatte, und konnte so gegen die massive Hämorrhagie vorgehen (Hardy, 1990). Ob Hildanus vor diesem ersten erfolgreichen chirurgischen Eingriff von der Regenerationsfähigkeit der Leber wusste, bleibt ungeklärt. Um 1880 veränderten sich nicht nur die chirurgischen Methoden, auch Wissenschaftler beschrieben funktionelle Reservekapazität und Regenerationsfähigkeit der Leber, welche sich auf Tierexperimente mit 70 bis 80% Leberresektion ohne Funktionseinbußen stützten. Dieses Wissen, gepaart mit Erkenntnissen über Anästhesie und aseptisches Vorgehen, führte sieben Jahre später zur vermutlich ersten elektiven Leberresektion durch Carl Langenbuch (McClusky et al., 1997). In den darauffolgenden Jahren legten unter anderem Wendels erste Hemihepatektomie 1911, Pringles Idee zur Vermeidung massiver Blutungen und Couinauds Veröffentlichung der segmentalen Anatomie die Prinzipien der Leberregeneration und -hämostase fest (Hardy, 1990). Trotz Langenbuchs chirurgischem Durchbruch und der Tatsache, dass Anatomie und Chirurgie nun als Einheit im Sinne der anatomischen Resektion betrachtet wurden, steckte letztere bis zum Zweiten Weltkrieg weiterhin in den Kinderschuhen. Erst nach 1944 gelangen kontinuierliche Fortschritte z.B. durch Wagensteen und Raven bis hin zu den ersten Transplantationsversuchen durch Starzl und Moore 1960 (McClusky et al., 1997). Kurz zuvor hatte Francis Moore die erste orthotope Lebertransplantationstechnik bei Hunden

beschrieben, als Starzl 1963 die weltweit erste Lebertransplantation an einem 3-jährigen Jungen mit Gallengangsatresie durchführte. Die Operation blieb in diesem Beispiel - aufgrund von Koagulationsstörung und unkontrollierbarer Blutung mit Versterben des Patienten noch während des Eingriffs – erfolglos. Jedoch gelang Starzl anschließend eine Serie von erfolgreichen Lebertransplantationen, und bis 1977 konnten 200 erfolgreiche Operationen weltweit gezählt werden (Meirelles Junior et al., 2015). Als nicht mehr ausschließlich historisch, sondern vielmehr klinisch relevant, können die folgenden Vorgehensweisen betrachtet werden: die Leberteiltransplantation, die erstmals 1984 von Broelsh und Bismuth beschrieben wurde oder die Transplantation im Rahmen einer Leberlebenspende, die erstmals 1989 von Ria, Nery und Mies durchgeführt wurde (McClusky et al., 1997). In den letzten zwei Jahrzehnten entwickelte sich die hepatobiliäre Chirurgie weiter, getragen von technischen Fortschritten, die neue peri- und intraoperative Möglichkeiten eröffneten und die bildliche Darstellung, minimalinvasive Zugänge und das operative Vorgehen selbst erleichterten (Bismuth & Majno, 2000). Doch trotz des vergangenen sowie gegenwärtigen Fortschritts und der sich unaufhörlich weiterentwickelnden Technik bleibt eine physiologische Grundvoraussetzung weiterhin unerlässlich: die Regenerationsfähigkeit der Leber. Ohne sie sind großflächige Resektionen nicht möglich, da der Gewebeverlust eine entsprechend große funktionelle Einbuße bedeutet.

1.2 Funktion und Anatomie der Leber

Als größte Drüse im menschlichen Körper übernimmt die Leber sowohl endokrine als auch exokrine Funktionen. Zu den endokrinen Aufgaben zählt die Sekretion von Hormonen wie Insulin-like growth Faktor, Angiotensinogen und Thrombopoetin, während die Gallenproduktion zur wichtigsten exokrinen Funktion zählt. Die Leber ist zudem verantwortlich für Glykogenhaushalt, Abbau toxischer Metabolite, Stoffwechselkontrolle, Cholesterinsynthese und -transport, Harnstoffhaushalt und Plasmaproteinsekretion (Si-Tayeb et al., 2010). Mit einem Gewicht von rund 1500g nimmt sie 2,5% des menschlichen Körpergewichts ein und hat ein homogenes Erscheinungsbild (Juza & Pauli, 2014). Wie von Claude Couinaud, einem französischen Chirurg und Anatom, beschrieben, handelt es sich bei der intrahepatischen Architektur um ein segmentales Zusammenspiel aus Gefäßen und Gallengängen (Abdel-Misih & Bloomston, 2010). Mit ihrer intraperitonealen Lage unter dem Rippenbogen im rechten Oberbauch reicht die Leber mit ihrem linken Leberlappen bis vor den Magen und ist mit ihrer Area nuda mit dem Zwerchfell verwachsen. Das Ligamentum

(Lig.) falciforme gliedert die Leber in einen linken und rechten Lappen und setzt sich unten als Lig. teres hepatis fort, welches wiederum zur Leberpforte mit ihren Leitungsbahnen verläuft. Auf der rechten Seite der Leberpforte schließt sich kranial die untere Hohlvene, die sog. Vena cava inferior, und kaudal die Gallenblase an (Paulsen & Waschke, 2010). Die, im Folgenden näher differenzierte, zelluläre Ebene besteht aus parenchym- und nicht-parenchymbildenden Zelltypen, die in hexagonalen Lobuli mit periportalen Glisson-Trias (Äste der Arteria hepatica, Vena portae und des Gallengangs enthaltend) angeordnet sind (Juza & Pauli, 2014). Die Lobuli können in drei Zonen unterteilt werden, wobei der periportale Bereich Zone 1, der Transitbereich Zone 2 und der perizentrale Bereich um die Zentralvene Zone 3 bilden. Von der Portalvene und der Arteria hepatica gespeist, fließt das Blut durch die Lebersinusoide zur Zentralvene, welche konsekutiv in die Vena cava mündet (Kang et al., 2012).

Tabelle 1: Einteilung der intrahepatischen Zellen

Einteilung der intrahepatischen Zellen in parenchymbildende und nicht-parenchymbildende Zellen mit Untergliederung nach zellspezifischem Aufbau und Funktion. Tabelle modifiziert (Juza & Pauli, 2014; Ulfing, 2010).

Parenchymbildende Zellen	Aufbau	Aufbau
Hepatozyten	Größte Zellpopulation, balkenartige Anordnung radiär zur Zentralvene	Protein- (z.B. Albumin, Gerinnungsfaktoren) und Lipidsynthese, Glykogenspeicherung, Gallenproduktion und Entgiftung
Nicht-Parenchymbildende Zellen		
Kupfer- Zellen	Leberspezifische Makrophagen, in das Lumen der Sinusoide hineinragende Anlagerung an Endothelzellen	Phagozytose von überalterten Erythrozyten, Zytokinfreisetzung
Sinusoidale Endothelzellen	Anordnung zwischen den Leberzellbalken entlang der Sinusoide	Bildung des fenestrierten Endothels, Austausch zwischen Blut und Hepatozyten
Perisinusoidal-(Ito-)Zellen, auch Sternzellen (HSC) genannt	Vorkommen um die Lebersinusoide herum im Disse-Raum	Vitamin A-Speicherung in Fetttropfen, Vorläufer der Myofibroblasten
Cholangiozyten	Epithelzellen der Gallengänge	Transport von Galle, Sekretion von Bikarbonat und Wasser und Regulierung des pH-Wertes

1.3 Regenerationsfähigkeit der Leber

Die Leber hat die einzigartige Fähigkeit, ihr Wachstum und ihre Masse sowohl im menschlichen Organismus als auch in Tieren zu regulieren. Diese Tatsache ist bemerkenswert, da Hepatozyten unter physiologischen Bedingungen kaum in Zellteilung übergehen, ihre Proliferationskapazität aber dennoch nicht verloren haben (Fausto, 2000). Higgins und Anderson beschrieben 1931 als Pioniere diese Regenerationsfähigkeit nach der partiellen 2/3-Hepatektomie (PHx) am Rattenmodell. Die bei diesem chirurgischen Eingriff entfernten Leberlappen wachsen entgegen der Erwartung nicht nach, vielmehr kommt es bei der Regeneration zu einer hyperplastischen Antwort im Sinne einer Zellreplikation (Taub, 2004). Die ruhenden Hepatozyten treten in ein bis zwei Replikationszyklen ein und stellen so durch kompensatorische Hyperplasie die ursprüngliche Lebermasse wieder her. Es konnte gezeigt werden, dass 11% der Hepatozyten sogar drei Zellteilungen oder mehr durchlaufen, während 15% sich kein einziges Mal teilen. Während der Leberregeneration nach PHx kommt es zu drei Proliferationswellen nach 21h, 30-48h und 48-168h, bei denen eine fortlaufende Kinetik der Wellen von periportal in Richtung Zentralvene beobachtet werden konnte. Hierfür ist eine große Anzahl von Faktoren notwendig, die in verschiedene Gruppen unterteilt werden können: Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Metabolite (Fausto et al., 2006; Y. Wu et al., 2011). Zu den genauen Abläufen werden derzeit u.a. folgende Fragen kontrovers diskutiert: Wie wird entschieden, ob ein Hepatozyt nach einer ersten Zellteilung den Zellzyklus beendet, während ein anderer Hepatozyt eine zweite Proliferationsrunde durchläuft? Stammen Hepatozyten während der Leberregeneration von älteren Hepatozyten, intrahepatischen Stammzellen oder zirkulierenden Stammzellen ab? (Fausto et al., 2012)

1.3.1 Zelluläres Korrelat des regenerierenden Lebergewebes

Um zu klären, wie die komplexe Leberregeneration reguliert wird, sollte auf zellulärer Ebene definiert werden, welche Zellen als Vorläufer der, an der Proliferation beteiligten, neuen Hepatozyten in Betracht kommen. Hierbei muss bedacht werden, dass es nicht nur nach akutem Leberschaden durch PHx zu einem Regenerationsvorgang kommt. Eine Rekonstruktion der Leberarchitektur findet auch im Zusammenhang mit chronischer Schädigung statt, beispielsweise bei dem Krankheitsbild der Leberfibrose. Zu beachten gilt, dass in diesem Fall die proliferative Fähigkeit der Hepatozyten und Cholangiozyten blockiert ist und lediglich kleine Progenitor-(Vorläufer-)zellen für die Parenchymregeneration aktiviert werden (Greenbaum & Wells, 2011). Es handelt sich hierbei um eine Zellpopulation in der

periportalen Zone mit großem Nukleus/Zytoplasma-Verhältnis und ovalem Zellkern, die ausgiebig proliferiert und nach Einwanderung in den Lobulus zu Hepatozyten differenzieren kann. Die Progenitorzellen werden zu der Gruppe der sog. „oval cells“ gezählt, zu denen auch andere heterogene Leberzellgruppen wie reife Gallengangszellen, aktivierte Sternzellen oder Fibroblasten zählen (Duncan et al., 2009). Dass die Progenitorzellen unter Bedingungen einer normalen Homöostase in der erwachsenen Leber zu neuen Hepatozyten werden, konnte widerlegt werden. Vielmehr sind es bei ausbleibender Leberschädigung die bereits existierenden Hepatozyten, die eine neue Generation an Leberzellen bilden (Malato et al., 2011). Ebenso sind es bei dem Modell der PHx nicht die Progenitorzellen, die zu einer erfolgreichen Regeneration führen, sondern die in situ verbleibenden, unbeschädigten Hepatozyten. Sie sind es, die in ihrer Mehrzahl an der Proliferation beteiligt sind und unbegrenzt in Zellteilung übergehen können, bis sie altersbedingt womöglich ihre Fähigkeit verlieren, auf das extrazelluläre Milieu und Signale antworten zu können (Kang et al., 2012).

1.3.2 Regulation der Regeneration

Auf der Suche nach Signalen, die die Hepatozytenproliferation auslösen könnten, kommt der portalen Hämodynamik eine mögliche Rolle zu. Sie ist nach einer Leberteileresektion aufgrund des erhöhten portalen Venendrucks und der Zunahme der Gewebepfusion verändert. Das Modell eines portohepatischen Shunts nach PHx konnte zeigen, dass bei stabilem portalem Druck das Lebergewicht nicht adäquat zunimmt, eine Hypertrophie der Zellen sowie eine Wachstumsfaktoraktivierung ausbleiben - bei gleichzeitig erhöhter Apoptoserate. Dies deutet darauf hin, dass eine portale Hyperdynamik nach PHx für die Leberregeneration essentiell ist (Marubashi et al., 2004).

Neben der Theorie der veränderten Hämodynamik soll eine Vielzahl an nicht-parenchymbildenden Leberzellen wie Kupffer-Zellen, Sternzellen und intrahepatische Lymphozyten an der Regeneration beteiligt sein und wichtige Signale für die Hepatozyten zur Verfügung stellen (Fausto et al., 2012). Sie sind zusammen mit den Faktoren, die sie freisetzen, in der folgenden Abbildung graphisch dargestellt.

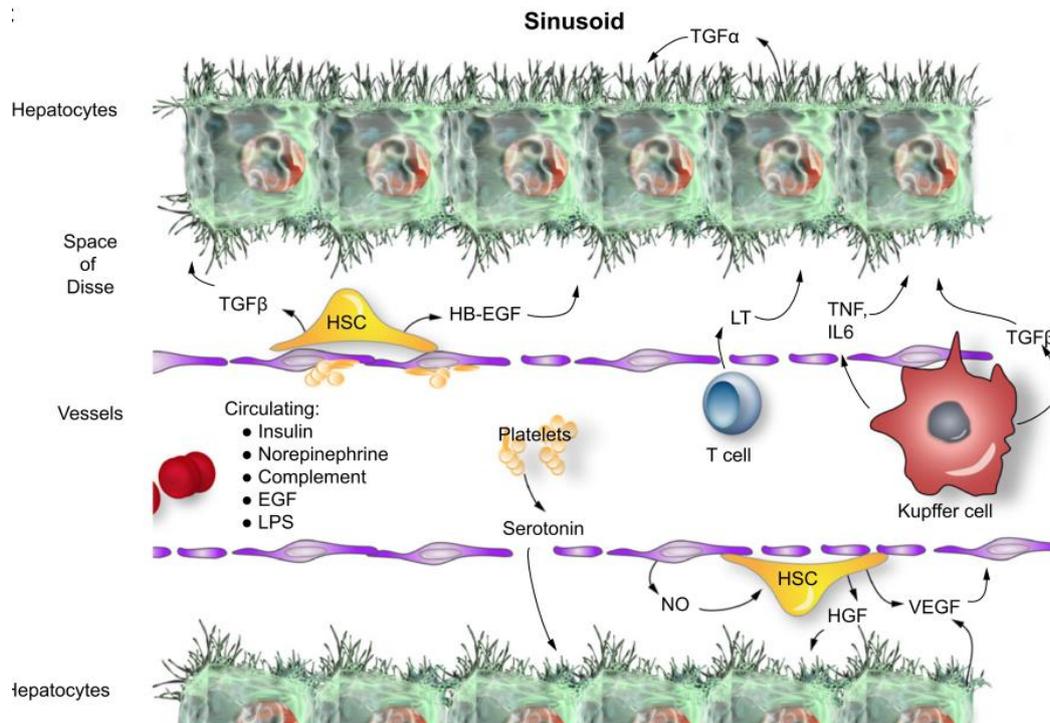


Abb. 1: An der Leberregeneration beteiligte Zellen und sezernierte Faktoren

Kupfer-Zellen, Sternzellen (HSC) und intrahepatische Lymphozyten sind an der Regeneration beteiligt und stellen wichtige Faktoren für die Hepatozyten bereit. Sinusoidale Endothelzellen setzen via VEGF Wnt2 und HGF frei. HB-EGF wird für den Beginn der DNA Replikation benötigt und TGF-β moduliert das hepatozytäre Wachstum. (Fausto et al., 2012)

Es konnte gezeigt werden, dass sinusoidale Endothelzellen nicht nur für die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung wichtig sind, sondern auch die Regeneration stimulieren können. Während der Leberregeneration sorgen sie, mit der Wiederherstellung des funktionellen Gefäßsystems, für eine Induktion der hepatischen Proliferation. Hierfür setzen die Endothelzellen via VEGF (Vascular endothelial growth factor)-Rezeptor-2 angiokrine Faktoren wie Wnt2 (Wingless-type MMTV integration site family, member 2) und HGF (Hepatocyte growth factor) frei (Ding et al., 2010). Letzterer wurde als einer der ersten zirkulierenden Faktoren isoliert und als Mediator der Leberregeneration beschrieben, da er die DNA-Synthese der Hepatozyten induzieren kann (Kang et al., 2012). HGF sichert das Überleben von Zellen, indem er mit dem Tyrosinkinase-Rezeptor MET interagiert, wodurch es zu einer Sequestrierung des Fas-Rezeptors und damit zu einer Inhibition der Apoptose kommt (X. Wang et al., 2002). Außerdem kommt es bei einer Unterdrückung der HGF- und MET-RNA zu einer verringerten Mitoserate bei gleichzeitig erhöhter Apoptose und damit zu einem messbaren negativen Effekt auf die Regeneration (Paranjpe et al., 2007). Einen weiteren Effekt auf die Organogenese hat HGF, indem er via MET zu einer Aktivierung des

Ras-ERK MAP Kinase Signalwegs führt. Daraufhin kommt es, MET-induziert, zu Zellmotilität, Proliferation, Tubulogenese und Abbau von adhärennten Zellverbindungen (Rosario & Birchmeier, 2003).

Neben HGF hat der ebenfalls sezernierte Wachstumsfaktor HB(heparin binding)-EGF (Epidermal growth factor) eine Schlüsselfunktion für die Regeneration, indem er für die hepatozytäre Progression durch die Übergangsphase G1/S im Zellzyklus verantwortlich ist. Nach PHx kommt es durch die Bindung von HB-EGF an seinen Rezeptor zum Beginn der DNA Replikation, sowie im Falle einer HB-EGF-Abwesenheit zu einer Verzögerung der Replikation (Mitchell et al., 2005). Für die erwähnte Progression durch die G1-Phase sind außerdem Holoenzymkomplexe, bestehend aus Cyclinen vom Typ D und E und ihren Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), verantwortlich. Als Antwort auf Wachstumsfaktoren verkürzt Cyclin D1 die G1-Phase und hat somit einen positiven Effekt auf die Zellproliferation in der Leber. Kommt es jedoch zu einer lang anhaltenden Überexpression von Cyclin D1, so wird der anti-proliferative Faktor p21, auch CDK-Inhibitor 1 genannt, für eine Beendigung der Proliferation induziert (Nelsen et al., 2001).

Die Rolle des Zytokins TGF (Transforming growth factor) und seiner Untereinheit TGF- β 1 ist hingegen weiterhin umstritten. Obwohl TGF- β 1 von allen nicht-parenchymbildenden Leberzellen – allen voran den hepatischen Sternzellen – produziert wird und Hepatozyten entsprechende Rezeptoren exprimieren, ist die Auswirkung auf die Leberregeneration unklar. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass TGF- β zwar keine Zytotoxizität besitzt, aber zu einer reversiblen Hemmung der proliferativen Antwort nach PHx führt und somit relevant für Wachstumsmodulierung sein könnte. Nicht ganz damit im Einklang, aber dennoch mit negativer Auswirkung, steht die Beobachtung bzgl. des Smad3/4 Adaptorproteins β 2SP, welches die TGF- β -Signalwege reguliert. In seiner Abwesenheit kommt es zu einer dysfunktionalen Progression durch den hepatozytären Zellzyklus und zu einer verzögerten Regeneration (Kang et al., 2012; Russell et al., 1988; Thenappan et al., 2011).

1.3.3 Rolle von TNF- α , IL-6 und STAT3

Zu den Faktoren, die wie FasL die Apoptose induzieren und damit Hepatozyten in den Zelltod schicken können, zählt auch TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α). Neben der Apoptoseinduktion ist TNF- α für die Aktivierung des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) verantwortlich. Dieser

kann die Hepatozyten - ebenso wie NO (Stickstoffmonoxid) - vor der Fas- und TNF- α -vermittelten Apoptose schützen (Hatano et al., 2001). Wie gezeigt werden konnte, moduliert TNF- α neben der Apoptoseregulation die Leberregeneration nach PHx positiv, da bei Antikörperblockierung von TNF- α eine inhibierte Regeneration eintritt (Akerman et al., 1992). Außerdem sind die Signalkaskaden von TNF- α mit einer Aktivierung von IL-6 (Interleukin 6) und STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) verbunden, wodurch es nach PHx zu einer Sensibilisierung der Hepatozyten und Initiation der proliferativen Antwort kommt (Webber et al., 1998). Wie die Signalkaskaden von TNF- α , IL-6 und STAT3 im Detail zusammenhängen, ist im Folgenden veranschaulicht.

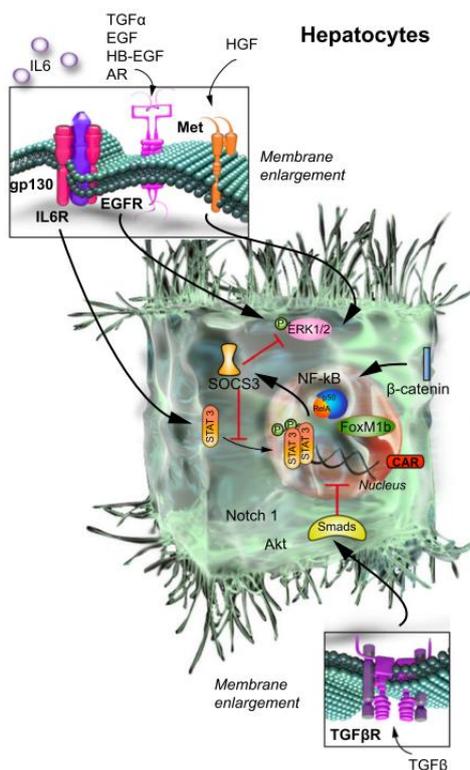


Abb. 2: Die IL-6 Signalkaskade

IL-6 wirkt via Rezeptorbindung und gp130 auf Hepatozyten und aktiviert die STAT3- und MAP-Kinase-Signalkaskade. Es kommt gp130 abhängig zur Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B. STAT-vermittelt kommt es zur Aktivierung von SOCS3 und damit zu einer negativen Gegenregulation. (Fausto et al., 2012)

IL-6 wird, durch Lipopolysaccharide oder TNF getriggert, von den Kupffer-Zellen produziert, und ist als proinflammatorischer Faktor für die frühe Geninduktion während der Leberregeneration sowie für eine Resistenz der Leber gegenüber toxischen, ischämischen oder Fas-vermittelter Schädigung verantwortlich. Freies IL-6 wirkt durch parakrine Interaktion auf benachbarte Hepatozyten, indem es an den löslichen Rezeptor bindet und über das Glykoprotein gp130 eine Janus-Kinase-1 (Jak-1) phosphoryliert. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung von STAT3 und der MAP-Kinase-Signalkaskade (Taub, 2003). Die Expression der Transkriptionsfaktoren c-jun und NF- κ B sowie des TNF-Rezeptors sind ebenfalls gp-130 abhängig und somit Teil der IL-6-Signaltransduktion. Diese Signalkette

unterstützt die Hepatozytenproliferation letztendlich jedoch mehr durch protektive Mechanismen, als durch direktes Einwirken auf den Zellzyklus nach PHx (Wuestefeld et al., 2003). Äquivalent hierzu passen die Beobachtungen bzgl. STAT3: Neben der bekannten Hepatozytenprotektion ist er von großer Bedeutung für das Überleben der Zellen in der akuten Phase nach PHx und für die inflammatorische Reaktion nach Lebernekrose, während die Bedeutung von STAT3 für die Rekonstruktion der Lebermasse eher sekundär ist (Moh et al., 2007).

Der oben beschriebene JAK-STAT Signalweg, der zur Freisetzung zahlreicher, für das Immunsystem unentbehrlicher, Zytokine führt, kann ebendiese Zytokinfreisetzung selbstständig modulieren und somit eine überschießende Zytokinantwort vermeiden. Hierfür wird ein sog. negativer Feedback Loop aktiviert, indem STAT-vermittelt das suppressive Zielgen SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) aktiviert wird, welches den parallel ablaufenden IL-6 Signalweg unterdrückt und somit die Zytokinfreisetzung in der frühen Leberregeneration eindämmt. Neben der physiologischen Proliferation moduliert SOCS3 als potentieller Tumorsuppressor auch neoplastische Zellproliferation (Alexander & Hilton, 2004; Riehle et al., 2008). Als ein weiterer negativer Regulator für den IL-6 Rezeptor Signalweg wird der TNF-Rezeptor assoziierte Faktor TRAF5 beschrieben. TRAF5 inhibiert die, auf IL-6 Bindung folgende, Aktivierung von STAT3, indem er durch Überlappung an der Bindestelle des Glykoproteins gp130 die Interaktion zwischen Transkriptionsaktivator und gp130 verhindert (Nagashima et al., 2014).

1.4 Innates Immunsystem und seine Rezeptoren

Die bereits mehrfach erwähnte Inflammation ist eine der zwei Hauptantwortmöglichkeiten des innaten, von Geburt an bestehenden, Immunsystems. Es reagiert auf potentielle Pathogene in allen Geweben mit einer sofortigen Abwehrreaktion, die entweder eine antivirale Defensive darstellt – durch Inhibition der viralen Replikation oder erhöhte lymphozytäre Zytotoxizität - oder sich als inflammatorische Reaktion äußert. Letztere führt zu einer Aktivierung von Leukozyten und Plasmaproteinen und deren Transport an den Ort der Infektion. Hierbei wird deutlich, dass viele Komponenten des innaten Immunsystems die Fähigkeit besitzen, mit dem adaptiven Immunsystems zu kooperieren. So kommt es u.a. zu einer Interaktion von Antikörpern mit Faktoren des Komplementsystems, Makrophagen oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die Inflammation stellt eine wichtige Reaktion des Organismus auf beschädigte oder tote Zellen sowie auf die Ansammlung von pathologischen Substanzen in Zellen und Gewebe dar. Diese Reaktion kann jedoch erst ausgelöst werden,

wenn das innate Immunsystem Pathogene erkannt hat. Zu diesen zählen z.B. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), die als mikrobielle Substanzen charakteristisch für Prokaryoten sind und das Immunsystem stimulieren. Auf eine ähnliche Art und Weise fungieren auch die sog. DAMPs (damage-associated molecular patterns), die durch infektiösen Zellschaden, chemische Toxine, Verbrennungen, Trauma, verminderte Blutversorgung induziert oder teilweise sogar durch gesunde Immunzellen vermittelt freigesetzt werden. Im Sinne eines sterilen Zellschadens können DAMPs ebenso zu einer Antwort des innaten Immunsystems führen (A. K. Abbas et al., 2012; Rassow et al., 2012). Zu bedenken ist, dass auch die Leberteilresektion einem sterilen Gewebeschaden entspricht und somit als DAMP zu werten ist.

Um zu klären, wie das innate Immunsystem die PAMPs und DAMPs erkennt, müssen die immunologischen Rezeptoren genauer beleuchtet werden. Sie werden unter dem Begriff PRR (pattern recognition receptors) zusammengefasst und auf der plasmatischen und endosomalen Membran sowie im Zytoplasma verschiedener Zellen exprimiert. Die unterschiedliche Lokalisation der Rezeptoren ermöglicht dem Immunsystem eine extra- sowie intrazelluläre Pathogen- und Schadenserkenkung. Auf die Bindung an den Rezeptor folgt anschließend die Aktivierung einer Signaltransduktionskette, die zu einer antimikrobiellen oder proinflammatorischen Zellantwort der PRR-exprimierenden Zelle führt (A. K. Abbas et al., 2012). Zu den Rezeptoren zählt die bereits gut erforschte Familie der TLR (toll-like Rezeptoren), die z.B. auf der Zellmembran von Endothelzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert wird. Die Bindung an den TLR führt über eine Serin/Threoninkinase zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der für die Auslösung von Entzündungsreaktionen wichtig ist, da er die Transkription vieler immunologisch- und entzündungsassoziierter Gene aktiviert (Rassow et al., 2012). Als PRR spielt der TLR3 mit seiner endolysosomalen Lokalisation z.B. bei viralen Infektionen eine Rolle, indem er dsRNA als seinen Liganden bindet und somit Gefahrensignale detektiert. Durch die sich anschließende Signalkaskade werden wiederum inflammatorische Mediatoren freigesetzt, die den Organismus schützen und eine Reparatur von beschädigtem Gewebe sicherstellen sollen (Takeuchi & Akira, 2010).

1.5 Zentrale Adaptermoleküle MAVS und STING

Neben den beschriebenen endolysosomalen Vertretern sind auch zytosolische Nukleinsäure-Rezeptoren für die Detektion der Nukleinsäuren, die als PAMPs und möglicherweise auch als DAMPs fungieren, verantwortlich. Dies ist besonders wichtig für

einen Großteil der Immunzellen, die aufgrund ihrer mukösen Lokalisation eine hohe Kontaktrate mit Infektionen haben und – ohne TLR exprimieren zu können – eine effektive Immunantwort initiieren müssen. Nach dem Eindringen in das Zellinnere, wenn TLR die Detektionen nicht mehr ermöglichen können, wird zytosolische DNA von intrazellulären Proteinen und RNA von der zytosolischen RIG-I-like (RLR) Familie detektiert. Konsekutiv kommt es zu einer Freisetzung von Typ I Interferon (IFN) und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und Interleukin-1 β , wobei Typ I IFN eine Vielzahl von Genen durch JAK- und STAT-Signalwege induziert (J. Wu & Chen, 2014). Die komplexe zytosolische Nukleinsäure-Detektion wird im Folgenden veranschaulicht, wobei die zentralen Adaptermoleküle MAVS (Mitochondrial antiviral signaling, auch als CARDIF oder IPS-2 bekannt) und STING (Stimulator of interferon genes) mit ihrer Schlüsselfunktion in der RNA- und DNA-Erkennung genauer erläutert werden.

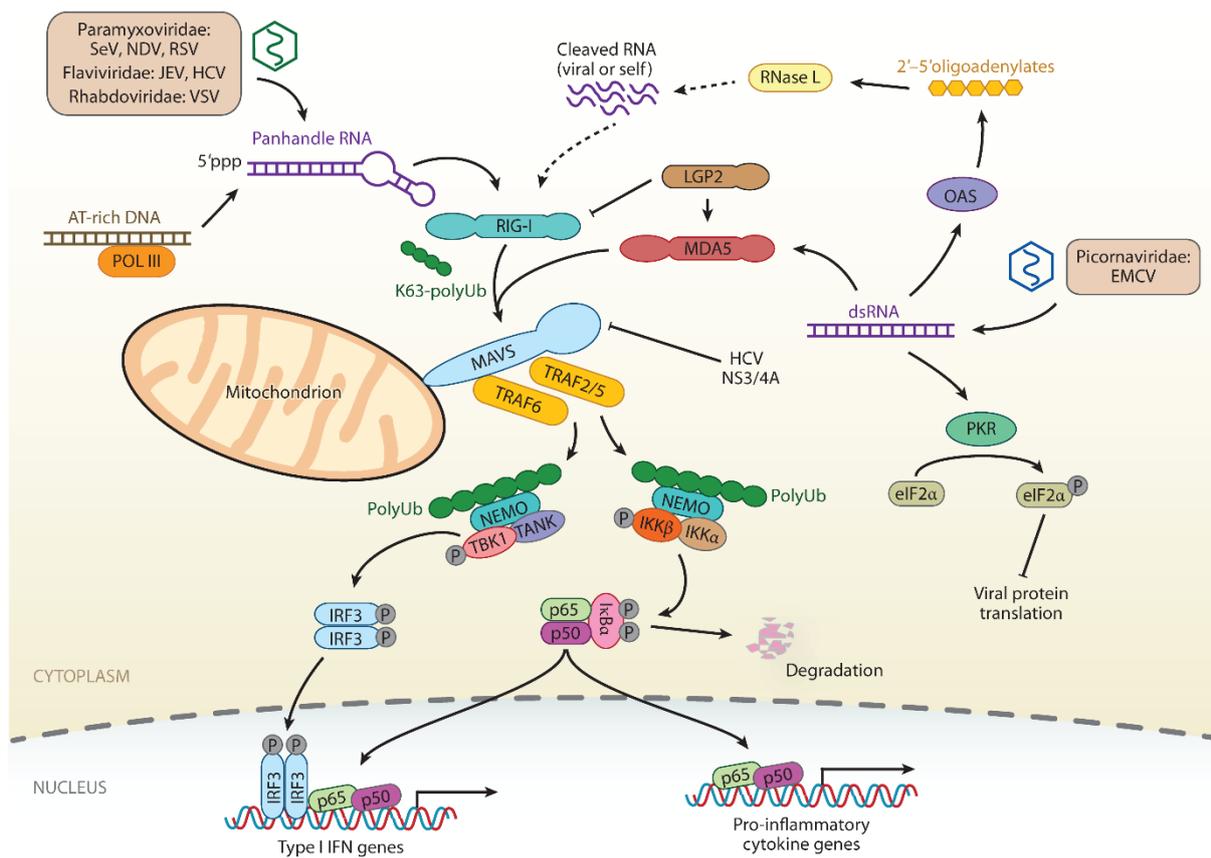


Abb. 3: MAVS (CARDIF) als zentrales Adapterprotein für die RNA-Detektion

MAVS interagiert mit den RNA-Detektoren RIG-I oder MDA5 und aggregiert anschließend an der mitochondrialen Membran. Es kommt zur Bindung von TRAF-Proteinen mit darauffolgender Ubiquitinierung und Rekrutierung der Untereinheit NEMO, wodurch es via IKK und TBK1 zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF- κ B kommt. (J. Wu & Chen, 2014)

Als Mitglieder der RIG-I-like (RLR) Familie sind RIG-I, MDA5 und LGP2, abhängig von der Länge der Fragmente, für die RNA-Detektion im Zytosol verantwortlich. Bindet z.B. eine RNA an RIG-I, so kommt es via ATP-Hydrolyse zu einer Konformationsänderung, und die Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD) am N-Terminus wird freigesetzt, um über Signaltransduktion Transkriptionsfaktoren wie IRF3 (Interferon regulatory factor 3) und NF- κ B zu aktivieren. Mit seiner Lokalisation auf der äußeren Mitochondrienmembran spielt MAVS eine wichtige Rolle als zentrales Adaptermolekül, da es zu einer Interaktion der CARD-Domäne von MAVS mit der von RIG-I oder MDA5 kommt. MAVS kann im Anschluss erheblich auf der mitochondrialen Membran aggregieren und über einen Prionen-ähnlichen Mechanismus weitere MAVS „infizieren“ und eine massive Aggregation bedingen, sodass schon kleine Mengen an RNA ausreichen, um eine erhebliche IRF3 Aktivierung auszulösen. Die MAVS-Polymere binden verschiedene TRAF-Proteine wie TRAF2 oder TRAF5, und es kommt zu einer Ubiquitinierungsreaktion, die über Rekrutierung der regulatorischen Untereinheit NEMO zur Aktivierung der zwei zytosolischen Kinasen IKK und TBK1 und daraufhin zur IRF3- und NF- κ B-Aktivierung führt (Hou et al., 2011; J. Wu & Chen, 2014; Yoneyama et al., 2004).

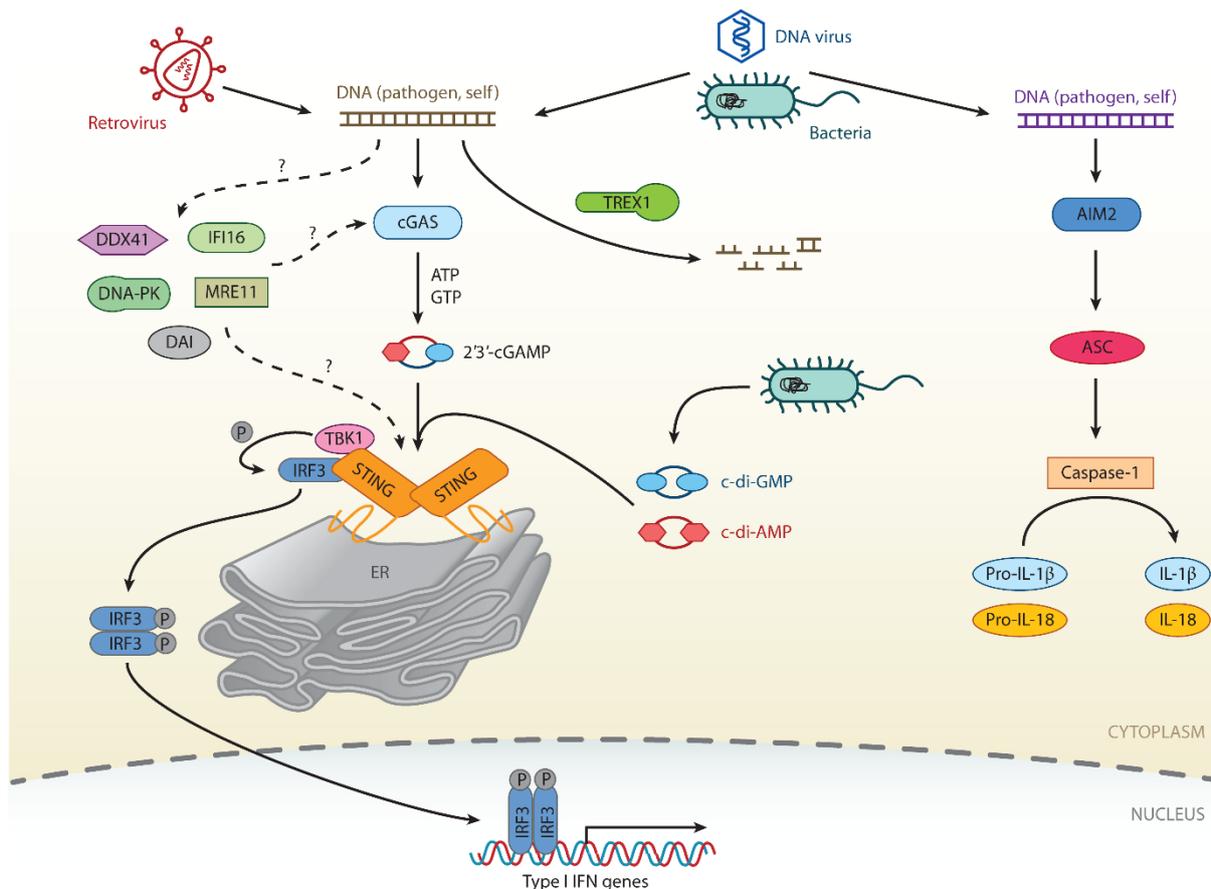


Abb. 4: STING als zentrales Adapterprotein für DNA-Erkennung

cGAS dient als potentieller Sensor für zytosolische DNA und katalysiert im Rahmen der STING-Aktivierung die Produktion von cGAMP. Nach der Aktivierung durch zytosolische DNA wird STING vom ER auf den Golgi-Apparat transloziert, wodurch es via TBK1-Stimulation zu einer Phosphorylierung und Rekrutierung von IRF3 kommt. (J. Wu & Chen, 2014)

Neben der RNA-Signalkaskade ist auch DNA als Trigger der Immunantwort bekannt und kann diese sowohl in Abhängigkeit von MAVS als auch durch einen eigenständigen RIG-I- bzw. MAVS-unabhängigen Signalweg induzieren. Als Pendant zu MAVS hat der Stimulator von IFN-Genen STING (auch MITA, MPYS, ERIS oder TMEM173 genannt) als zentrales Adapterprotein in der DNA-Signalkaskade eine Schlüsselfunktion. Mit seinen fünf transmembranösen Helices und seiner Lokalisation auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ist STING essentiell für die Induktion von Typ I IFN. Nach seiner Aktivierung durch zytosolische DNA wird STING vom ER auf den Golgi-Apparat umgesiedelt, wodurch es über TBK1-Stimulation zu einer Phosphorylierung und Rekrutierung von IRF3 kommt. Allerdings ist bislang noch nicht abschließend geklärt, wie STING durch DNA genau aktiviert wird. Eine mögliche Erklärung ist die Bindung von zyklischen Dinukleotiden (CDN), die als ideale

PAMPs nach Eintritt ins Zytosol von STING erkannt werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die zyklische GMP-AMP Synthase (cGAS) als Sensor für zytosolische DNA in Frage kommt und, über die von ihr katalysierte Produktion von cGAMP, zur Aktivierung von STING führt (Ishii et al., 2006; Ishikawa & Barber, 2008; Sun et al., 2006; J. Wu & Chen, 2014; J. Wu et al., 2013).

Trotz der Entdeckung des RLR-MAVS Signalwegs für RNA-Erkennung und des cGAS-cGAMP-STING Signalwegs für DNA-Erkennung bleiben viele Fragen ungeklärt. Wie sieht die genaue Regulation der Mechanismen aus, wie werden die Signalkaskaden beendet und welches Ziel hat die STING-Translokation vom ER auf den Golgi-Apparat? (J. Wu & Chen, 2014) Neben diesen detaillierten Fragestellungen bleibt ebenfalls zu klären, welche Konsequenzen eine Inaktivierung der oben beschriebenen Signalwege für den Organismus hat und ob eine inhibierte zytosolische Nukleinsäure-Detektion Auswirkungen hat, die zu einer Modulation der Immunantwort führen. Dies wiederum könnte die Leberregeneration ähnlich wie beim endolysosomalen Pendant TLR3 beeinflussen, dessen Inaktivierung eine vorzeitige hepatozytäre Proliferation in Mäusen nach PHx bedingt (Zorde-Khvaleyevsky et al., 2009).

1.6 Bedeutung einer modulierten Immunantwort für die Leberregeneration

Durch den Nachweis einer MAVS/STING-abhängigen Modulation der Immunantwort entstünden neue Möglichkeiten, Einfluss auf die Leberregeneration zu nehmen und diese beispielsweise zu beschleunigen. Im Rahmen einer Leberteilentfernung bei Patienten mit primären oder sekundären malignen Läsionen sollte derzeit das funktionell intakte Restgewebe 20% des ursprünglichen Lebervolumens betragen und im Falle von Steatose, Hepatitis oder Zirrhose 60 bis 70%, um eine ausreichende Leberfunktion zu gewährleisten (Garcea & Maddern, 2009). Zukünftig könnte mehr Lebervolumen reseziert werden, stünden molekulare Therapieoptionen zur Verfügung, die eine Leberregeneration durch Immunmodulation postoperativ optimieren würden. Eine weitere Herausforderung stellt das, nicht sehr häufige aber dennoch signifikante, Auftreten eines postoperativen Leberversagens dar, welches an multiples Organversagen und Sepsis gebunden ist. Denkbar wäre hier eine gezielte pro-regeneratorische Therapie zur Aufrechterhaltung der Leberfunktion und zur Vermeidung einer Proliferationsblockade durch hepatotoxische Zytokine und bakterielle Endotoxine (Garcea & Maddern, 2009). Leberversagen kann ebenfalls nach einer Lebertransplantation auftreten, wenn das Spenderorgan die funktionellen Ansprüche nicht suffizient erfüllen kann. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn das transplantierte Organ zu

klein ist, weil bei einer Lebendspende dem Spender möglichst wenig Lebervolumen entfernt werden soll und es dadurch später beim Empfänger zu dem sog. „Small-for-size Syndrom (SFSS)“ kommt (Dahm et al., 2005). Bei einer Kadaverspende hingegen kann ein sog. „split liver“ Verfahren (SLT) durchgeführt werden, bei dem der linke Leberlappen als Spenderorgan für ein Kind (30-60kg KG) und der rechte Leberlappen für einen Erwachsenen (60-80kg KG) dienen. Dennoch ist diese Transplantationsmethode mit einem hohen Risiko behaftet und wird anhand von Entscheidungskriterien wie Todesursache, Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation, Katecholaminbedarf, anatomischen Gegebenheiten, Qualität des Transplantats und Alter des Spenders nur von erfahrenen Transplantationszentren durchgeführt (Kim et al., 2004). Mit einer auf die Leberregeneration Einfluss nehmenden postoperativen Behandlung, die ein SFSS therapiert, könnten möglicherweise bei einer SLT beide Leberlappen als Spenderorgane für erwachsene Empfänger genutzt werden. Außerdem wäre es denkbar, die kritische Überbrückungszeit bis zu einer Lebertransplantation mittels molekularer Immunmodulation zu decken, welche aufgrund der begrenzten Anzahl an Spenderorganen existiert und derzeit nur mit extrakorporalen Maßnahmen wie der Albumindialyse oder Plasmaseparation und -adsorption therapiert werden kann (Rademacher et al., 2011).

Neben akuten Traumata durch Leberresektionen und -transplantationen könnte eine modulierbare Leberregeneration eine wichtige therapeutische Rolle bei chronischer Leberschädigung spielen. Hierzu zählen ätiologische Faktoren wie Alkoholabusus, Virushepatitiden, Autoimmunhepatitis, primär biliäre Zirrhose (PBC), primär sklerosierende Cholangitis (PSC), toxische Lebererkrankungen, Stoffwechselkrankheiten (Hämochromatose, Morbus Wilson, α 1-Antitrypsinmangel, Mukoviszidose), kardial bedingte chronische Stauungsleber, Budd-Chiari-Syndrom oder Tropenerkrankungen (Bilharziose, Leberegel). Sie können zu einer Zerstörung der Läppchen- und Gefäßarchitektur der Leber führen, die sich durch Ausbildung einer entzündlichen Fibrose mit Septen und Regeneratknoten manifestiert und in der Leberzirrhose gipfelt. Diese führt zu einer funktionellen Leberinsuffizienz, portaler Hypertonie und Bildung von intrahepatischen porto-systemischen Shunts und bedingt nicht selten ein Leberversagen, eine Varizenblutung oder ein primäres Leberzellkarzinom. Könnte die Regeneration der Leber durch Immunmodulation angeregt werden, so gäbe es neben den Allgemeinmaßnahmen (wie Meidung der ursächlichen Noxe, Vitamin- und Folsäuresubstitution, Immunsuppression, antiviraler Therapie, Eisen- oder Kupferentfernung), Komplikationsbehandlung, Früherkennungsdiagnostik und Lebertransplantation einen ganz neuen Therapiezeitweig für chronische Schädigung (Herold, 2015). Dennoch gilt es für solch zukünftige Behandlungsansätze primär alle Faktoren des innaten Immunsystems und ihre Rolle im

Rahmen der Leberregeneration detailliert und in möglichst vollständigem Umfang zu analysieren.

2 Zielsetzung

Trotz der Komplexität der Leberregeneration konnten in der Vergangenheit große Fortschritte in der Identifizierung zugrundeliegender Mechanismen verzeichnet werden. Zellpopulationen, die durch Proliferation oder Produktion von regenerationsmodulierenden Faktoren Einfluss nehmen, wurden in unterschiedlichen wissenschaftlichen Arbeiten analysiert. Ebenso konnten verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren beschrieben und einer Funktion innerhalb der Leberregeneration zugeordnet werden. Dennoch bleibt zu klären, welcher Anteil der Rolle des innate Immunsystem an der Leberregeneration zukommt.

In der vorliegenden Arbeit werden die zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren des innate Immunsystems genauer beleuchtet, indem der Einfluss der zentralen Adapterproteine MAVS und STING auf die Leberregeneration nach PHx untersucht wird. Ziel ist es, potentielle MAVS/STING-abhängige Signalwege zu charakterisieren und deren Auswirkung auf das Proliferationsverhalten der Hepatozyten in vivo zu beurteilen. Folgende Fragen gilt es, zu beantworten:

- 1.) Kommt es zu einer Modulation der Immunantwort in Abwesenheit von MAVS/STING?
- 2.) Was passiert, wenn Zellen aufgrund ihrer Defizienz der zytosolischen Adaptorproteine nicht auf zytosolische Nukleinsäuren antworten können?
- 3.) Wie sieht die Leberregeneration aus, wenn keine Reaktion auf die von absterbenden Zellen freigesetzten Nukleinsäuren, also potentielle Gefahrensignale und Modulatoren der Entzündungsreaktion, stattfindet?
- 4.) Ist eine veränderte Regenerationsfähigkeit zu beobachten oder existieren kompensatorische Mechanismen, die eine vollständige und uneingeschränkte Leberregeneration gewährleisten?

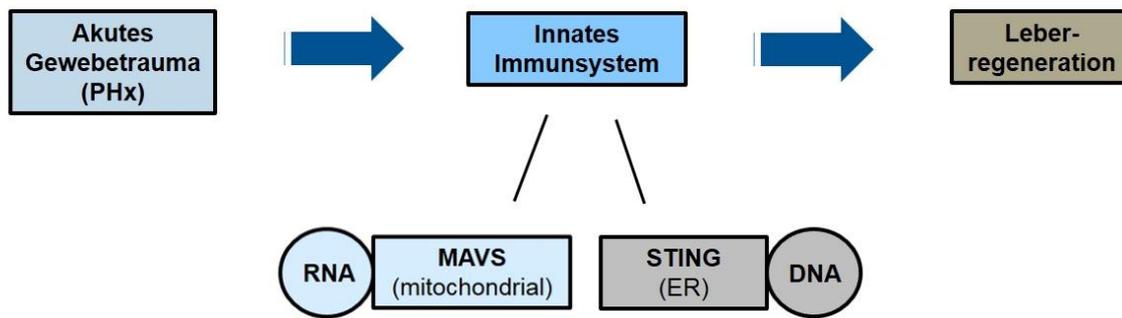


Abb. 5: Auswirkung der PHx auf die Leberregeneration mit Beteiligung des innate Immunsystems

Ziel der Untersuchung ist die Beleuchtung der zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren, wobei MAVS als mitochondrialer Sensor für RNA-Detektion und STING mit seiner Lokalisation auf dem endoplasmatischen Retikulum für die DNA-Erkennung eine wichtige Rolle spielen. Zudem sollen mögliche Auswirkung auf die Leberregeneration in Abwesenheit dieser beiden Proteine untersucht werden, indem das innate Immunsystem durch PHx aktiviert wird.

Hierfür wird eine 2/3-Hepatektomie an einem neu etablierten Mausstamm mit kombinierter Gendefizienz für die Adaptorproteine MAVS und STING durchgeführt. Als ideales Modell kann hiermit ein Fehlen der RNA- und DNA-Erkennung im Zytosol der Hepatozyten provoziert werden und mittels PHx ein akutes Lebertrauma gesetzt werden, welches eine Antwort des innate Immunsystems mit konsekutivem Regenerationsverhalten induziert. Als Vergleichsgruppe dient eine Wildtyp C57BL/6 Kohorte, um die Hypothese zu untersuchen, dass MAVS/STING einen Einfluss auf die Leberregeneration nehmen und diese in ihrer Abwesenheit verändert wird. Postoperativ wird zu verschiedenen Zeitpunkten eine in vivo- sowie eine in vitro-Diagnostik durchgeführt. Die frühen Zeitpunkte dienen der Ermittlung von frühen Proliferationssignalen, während zu späteren Zeitpunkten verzögerte Signale und proliferative Prozesse untersucht werden. Hierfür erfolgen immunhistologische Untersuchung des Lebergewebes, Zytokinmessungen im murinen Serum sowie biochemische und molekulargenetische Analysen der aktivierten Signaltransduktionswege.

Durch ein besseres Verständnis der Prozesse, die sich während der Leberregeneration abspielen, würden sich neue Therapieansätze im Rahmen einer chirurgischen Leberteilresektion eröffnen und ein größeres Resektionsausmaß bzw. eine schnellere Geweberegeneration und damit Patientengenesung ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen, Menzel-Gläser 24x32mm (Fa. Thermo Scientific)

Eppendorf Safe-Lock Röhrchen 1,5ml und 2ml (Fa. Eppendorf)

Filterpapier, extra thick blot paper (Fa. Bio-Rad Laboratories)

Glaspipetten, Serological Pipette, steril, Cellstar® (Fa. Greiner Bio-One)

Kyro-Röhrchen mit Innengewinde 1,2ml (Fa. Brand)

Kugeln für Tissue Lyser (Fa. Qiagen)

Microtainer Röhrchen mit Polymergel für Serumgewinnung, SST Tubes (Fa. BD)

Nitrozellulosemembranen, Amersham Protan 0,45µm NC (Fa. GE Healthcare Life Sciences)

Objektträger, Menzel-Gläser SUPERFROST®PLUS (Fa. Thermo Scientific)

Paraffinblockkassetten, Rotilabo®-Einbettkassetten (Fa. Roth)

PCR-Platten für LightCycler 480, 96-well, weiß, DNase- und RNase-frei (Fa. Kisker Biotech)

Petrischale, Tissue Culture Dish (Fa. Falcon)

Pipetten 200µl, Gel Saver II – Tips (Fa. Kisker Biotech)

Quali-Filterpipettenspitzen, steril, RNase-, DNase – u. Pyrogen frei (Fa. Kisker Biotech)

Röntgenfilme, Amersham Hyperfilm MP (Fa. GE Healthcare Life Sciences)

SafeSeal Reagiergefäß 2ml (Fa. Sarstedt)

Wasserfester Fettstift für Objektträger, Dako Pen (Fa. Dako)

96-Well Platte, Tissue Culture Plate (Fa. Falcon)

3.1.2 Chemikalien

AcetoAcid, Essigsäure (Fa. Merck)

Albumin Fraktion V, proteasefrei (Fa. Roth)

Aprotinin (Fa. Sigma-Aldrich)

Acrylamidlösung

Aqua B. Braun, ddH₂O Spüllösung steril und pyrogenfrei (Fa. Braun)

β-Mercaptoethanol (Fa. Sigma Life Science)
BSA, Bovines Serum Albumin (Fa. Sigma-Aldrich)
Cell Lysis Buffer 10x (Fa. Cell Signaling)
Citronensäure Monohydrat (Fa. Roth)
DAB, Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Fa. Dako)
DNase Set 50, RNase-free (Fa. Qiagen)
ECL Detektionsreagenz, Detection Reagent 1+2 (Fa. Thermo Scientific)
Ethanol (Fa. Merck)
Isofluran CP® 1ml/ml (Fa. Cp-Pharma)
Leupeptin (Fa. Sigma-Aldrich)
Methanol (Fa. Roth)
Milchpulver, Blotting-Grade Blocker (Fa. Bio-Rad)
Molekulargewichtsmarker, Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fa. Thermo Scientific)
Natriumchlorid (Fa. Roth)
Natriumhydroxid (Fa. Roth)
Oligo(dT) Primer (Fa. Thermo Scientific)
O₂-medica® Sauerstoff (Fa. Sauerstoffwerk Friedrichshafen)
PBS, Phosphatgepufferte Saline, D-PBS (Fa. Sigma)
Pepstatin A (Fa. Sigma-Aldrich)
Pierce BCA Protein Assay Reagent A+B (Fa. Thermo Scientific)
Ponceau S (Fa. Sigma-Aldrich)
Random Primer (Fa. Invitrogen)
RevTranskriptase (Fa. Invitrogen)
RNase-freies Wasser (Fa. Qiagen)
Roticlear für die Histologie (Fa. Roth)
Tris base, Trizma base (Fa. Roth)
VectaMount Permanent Mounting Medium, Eindeckmedium (Fa. Vector Laboratories)
Wasserstoffperoxid 30% (Fa. Roth)

3.1.3 Stammlösungen, Puffer und Gele

Tabelle 2: Stammlösungen, Puffer und Gele

Auflistung der verwendeten Stammlösungen, Puffer und Gele inklusive der für die Herstellung benötigten Mengenangaben.

5% BSA-Lösung	1g 20ml	BSA TBS-Tween Waschpuffer
Citratpuffer (20x), pH 6,0	21,0g 500ml ca. 50ml	Citronensäure Monohydrat ddH ₂ O NaOH 5M
Laufpuffer (5x)	30g 144g 5g 1000ml	Tris Glycin SDS ddH ₂ O
Ponceau S Lösung	1g 475ml 25ml	Ponceau S ddH ₂ O AcetoAcid
8% Paraformaldehyd (PFA), pH 7,4 (Zusammensetzung durch Krankenhausapotheke, Klinikum rechts der Isar)	80,0g 9,55g 1000ml	Paraformaldehyd PBS-Pulver Biochrom L Dest. Wasser Natronlauge
TBS-Tween Waschpuffer für den Western-Blot	27,2ml 20ml 952,8ml 1Trpf.	5M NaCl 1M Tris, pH 7,5 ddH ₂ O Tween 20 Detergent
TBS-Waschpuffer (10x), pH 7,6 für immunhistochemische Schnitte	24,2g 80g 1000ml ca. 18ml	Tris NaCl ddH ₂ O HCl 5M
Transblotpuffer (10x)	58,15g 29,28g 1000ml	Tris Glycin ddH ₂ O
Transblotpuffer (1x)	50ml 100ml 350ml	10x Transblotpuffer Methanol ddH ₂ O
10% Trenngel (35ml)	11,8ml 8,7ml 14ml 400µl 20µl 200µl	Acrylamide 30/0,8 1,5M Tris, pH 8,8 ddH ₂ O 10% SDS TEMED 10% APS

12,5% Trenngel (35ml)	14ml	Acrylamide 30/0,8
	8,7ml	1,5M Tris, pH 8,8
	11,8ml	ddH ₂ O
	400µl	10% SDS
	20µl	TEMED
	200µl	10% APS

3.1.4 Antikörper

Tabelle 3: Erstantikörper

Auflistung der Erstantikörper mit Angabe ihres Isotypen, der verwendeten Konzentration, der angewandten Methode und des Herstellers.

Antikörper gegen	Isotyp	Konzentration	Anwendung	Hersteller
BrdU	Mouse IgG	1:40	IHC	Fa. Calbiochem
α-Tubulin	Mouse IgG	1:1000	WB	Fa. Calbiochem
GAPDH	Rabbit IgG	1:5000	WB	Fa. Cell Signaling
SOCS3	Rabbit	1:1000	WB	Fa. Cell Signaling
TRAF5	Rabbit	1:200	WB	Fa. Santa Cruz
pSTAT3	Rabbit	1:1000	WB	Fa. Cell Signaling
p44/42 MAP Kinase (pERK1/2)	Rabbit	1:1000	WB	Fa. Cell Signaling

Tabelle 4: Zweitantikörper

Auflistung der Zweitantikörper mit Angabe der verwendeten Konzentration, der angewandten Methode und des Herstellers.

Antikörper	Konzentration	Anwendung	Hersteller
EnVision+ System-HRP labelled Polymer anti-mouse	unverdünnt	ICH	Fa. Dako
Goat Anti-Mouse IgG-HRP Conjugate	1:3000	WB	Fa. Bio-Rad
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Conjugate	1:3000	WB	Fa. Bio-Rad

3.1.5 Reagenzienkits

PCR Mastermix Kit, LightCycler® 480 Probes Master (Fa. Roche)

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

Quantikine® Mouse TNF- α Immunoassay (Fa. R&D Systems)

RNeasy® Mini-Kit 250 (Fa. Qiagen)

3.1.6 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

β -Actin left primer:	5'-AAG GCC AAC CGT GAA AAG AT-3'	(UPL-Nr. 56)
β -Actin right primer:	5'-GTG GTA CGA CCA GAG GCA TAC-3'	(UPL-Nr. 56)
c-Myc left primer:	5'-CCT AGT GCT GCA TGA GGA GA-3'	(UPL-Nr. 77)
c-Myc right primer:	5'-TCC ACA GAC ACC ACA TCA ATT T-3'	(UPL-Nr. 77)
Cyclin D1 left primer:	5'-TCT TTC CAG AGT CAT CAA GTG TG-3'	(UPL-Nr. 72)
Cyclin D1 right primer:	5'-GAC TCC AGA AGG GCT TCA ATC-3'	(UPL-Nr. 72)
IL-6 left primer:	5'-GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A-3'	(UPL-Nr. 6)
IL-6 right primer:	5'-CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA-3'	(UPL-Nr. 6)
IL-6-R left primer:	5'-ATC CTC TGG AAC CCC ACA C-3'	(UPL-Nr. 53)
IL-6-R right primer:	5'-GAA CTT TCG TAC TGA TCC TCG TG-3'	(UPL-Nr. 53)

IL-6-st left primer:	5'-AGG ACC AAA GAT GCC TCA AC-3'	(UPL-Nr. 85)
IL-6-st right primer:	5'-TGA AGG AAG TTC GAG GAG ACA-3'	(UPL-Nr. 85)
p21 ^{Cip1} left primer:	5'-AAC ATC TCA GGG CCG AAA-3'	(UPL-Nr: 16)
p21 ^{Cip1} right primer:	5'-TGC GCT TGG AGT GAT AGA AA-3'	(UPL-Nr. 16)
SOCS3 left primer:	5'-ATT TCG CTT CGG GAC TAG C-3'	(UPL-Nr. 83)
SOCS3 right primer:	5'-AAC TTG CTG TGG GTG ACC AT-3'	(UPL-Nr. 83)

3.1.7 Tierexperimentelle Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

Absorber für Anästhetika, Cardiff Aldsorber (Fa. Shirley Aldred & Co Ltd)

Injektionsspritze steril, Mirco-Fine + Demi 0,3ml (Fa. BD)

Nahtmaterial Prolene monofil 4-0 (Fa. Ethicon)

Narkosegerät, Uni Vet Porta Tec 3 (Fa. Groppler Medizintechnik)

Narkoseverdampfer (Fa. Groppler Medizintechnik)

Operationsbesteck (Fa. Plazotta)

Operationsmikroskop Stemi DV4 SPOT 0,63x (Fa. Zeiss)

Präzisionswaage KERN 440-49N max. 4000g (Fa. KERN & SOHN GmbH)

Trockenfutter, autoklaviert, fortified gepudert, 10 mm Vierkant, pelletiert (Fa. Altromi)

Analysewaage Sartorius Analytic max. 5g (Fa. Sartorius)

3.1.8 Allgemeine Geräte

Blockthermostat BT 1301 (Fa. HCL)

Elektrophorese-Apparatur, Trans-Blot SD, Semi-dry Transfer Cell (Fa. Bio-Rad Laboratories)

Entwickler für Röntgenfilme, Optimax X-Ray Film Processor (Fa. Typon Medical)

Folienschweißgerät SEVERIN Folio (Fa. Severin)

Gelapparatur (Fa. Biometra)

Gewebeinfiltrationsautomat, Leica ASP200 S (Fa. Leica Biosystems)

Gewebehomogenisator, TissueLyser II (Fa. Qiagen)

Heizblock BB100/40 (Fa. Castle Scientific)
Kühlplatte COP 30 (Fa. Medite Medizintechnik)
LightCycler 480 Real-Time PCR System (Fa. Roche)
Mikrotom, Motorisches Hochleistungsmikrotom LEICA RM2255 (Fa. Leica Biosystems)
Nanodrop-Gerät Spectrophotometer (Fa. Nanodrop)
Paraffinausgießstation LEICA EG 1160 (Fa. Leica Biosystems)
Photometer für Mikrotiterplatten, MRX Microplate Reader ELISA (Fa. Dynatech Laboratories)
Plattformschüttler kreisförmig vibrierend, Titramax 100 (Fa. Heidolph)
Plattformschüttler rotierend, Rotamax 120 (Fa. Heidolph)
Röntgenfilmkassette, X-Ray Cassette (Fa. Rego X-Ray)
Rotor, Mixing Rotor Variospeed (Fa. Renner)
Schwenkplattform, Taumler 2040 (Fa. Heidolph)
Schwenkplattform taumelnd, Polymax 1040 (Fa. Heidolph)
Spannungsquelle, Power Pack P25 (Fa. Biometra)
Tischzentrifuge (Fa. Sprout)
Ultraschallgerät, Bioruptor® Sonication System (Fa. Diagenode)
Waschgeräts Tecan Hydro Flex (Fa. Tecan)
Wasserbad für Paraffinschnitte, Paraffin-Streckbad 1052 (Fa. Gesellschaft für Labortechnik)
Zeiss-Lichtmikroskop Axiolab, HBO 50, AxioCam MRc 5 (Fa. Zeiss)
Zentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5415 R (Fa. Eppendorf)

3.2 Tierexperimentelle Methoden

Alle durchgeführten Versuche fanden im Einklang mit den tierschutzrechtlichen Bedingungen und bei vorliegender Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes der Regierung von Oberbayern statt (Tierversuchsantrag, Aktenzeichen: TVA 55.2-1-54-2532-147-2015).

3.2.1 Allgemeine Haltungsbedingungen

Die Mäuse wurden während der Versuchsdurchführung in belüfteten Käfigen mit Filterabdeckung (Tecniplast-IVC, Typ-I Superlong) gemeinsam in einem speziellen Tierinkubator gehalten. In diesem und den Tierhaltungsräumen allgemein herrschten standardisierte Bedingungen bzgl. Luftfeuchtigkeit, Klimatisierung und 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus. Versorgt wurden die Mäuse mit permanent zur Verfügung stehendem, autoklaviertem Trockenfutter (Fortified gepudert, 10 mm Vierkant, pelletiert Fa. Altromi) sowie frischem Trinkwasser. Als Einstreu erhielten die Tiere Holzgranulat (Select Fine, Ssniff), welches alle sieben Tage erneuert wurde.

3.2.2 Mauslinien

Als genetisch unveränderte Kontrolltiere wurden C57BL/6 Mäuse eingesetzt, die von der Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland) stammten. Alle verwendeten Tiere wurden auf den C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt und hatten zum Zeitpunkt der durchgeführten Leberteileresektion ein Alter von 10-12 Wochen.

Um die Funktion der Adapterproteine MAVS und STING und deren Einfluss auf die Leberregeneration zu untersuchen, wurde ein neu etabliertes Mausmodell mit kombinierter Gendefizienz für MAVS und STING gewählt. Aufgrund des Knockouts können die Zellen der Mäuse ubiquitär nicht mehr durch zytosolische Nukleinsäuren aktiviert werden. Die Tiere wurden von der AG Prof. Dr. med. Bernhard Holzmann am Zentrum für Präklinische Forschung der TU München gezüchtet, für das Versuchsvorhaben zur Verfügung gestellt und mittels PCR aus Schwanzbiopsien genotypisiert. Um einen geschlechterspezifischen Einfluss im Regenerationsverhalten nach partieller Hepatektomie auszuschließen, wurden die Operationen ausschließlich an männlichen Mäusen durchgeführt. Das Alter lag zu Versuchsbeginn zwischen 10-12 Wochen.

Die MAVS; STING Linie ist als nicht belastet eingestuft.

3.2.3 Partielle Hepatektomie

Die etablierte Methode der partiellen Hepatektomie wurde in unserem Labor und mit Hilfe eines Zeiss-Operationsmikroskops unter mikrochirurgischen Bedingungen durchgeführt. Um

die Leberregeneration im Verlauf beurteilen zu können, erfolgte eine 2/3-Hepatektomie mit anschließender Euthanasie der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten (0h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 32h, 40h, 48h, 72h und 168h post-PHx). Die Tierzahl in jeder Knockout- als auch Wildtyp-Gruppe betrug $n \geq 6$ für jeden Zeitpunkt, das Geschlecht der Mäuse war einheitlich maskulin. Alle Tierversuche wurden durch den Leiter des Tierversuchsvorhabens PD Dr. med. Norbert Hüser und gemäß der Angaben im TVA durchgeführt.

Die Narkose der Mäuse erfolgte als Inhalationsanästhesie mit Isofluran in einem halbgeschlossenen Narkosesystem. Isofluran, als gut steuerbares Anästhetikum, hat kaum Auswirkungen auf den Blutdruck der Tiere und ist nur geringgradig hepatotoxisch. Eingeleitet wurde die Anästhesie der Mäuse in einer Narkosekammer mit Ventilationszulauf und -ablauf für 3-5min bei 5% Isofluran und 5l/min O₂, worauf das Abwiegen des Körpergewichts in narkotisiertem Zustand erfolgte. Die prä- und postoperativ ermittelten Werte dienten der internen OP-Erfolgskontrolle. Anschließend wurde die Maus auf einer steril abgedeckten Korkplatte mittels Klebestreifen an den Extremitäten und auf dem Rücken liegend befestigt. Hierbei wurde auf eine faltenfreie Darstellung des Bauchfells bei gleichzeitiger Vermeidung einer Überstreckung der Gliedmaßen geachtet. Die Schnauze des Tieres wurde in das kegelförmige Loch eines Gummipropfens eingebracht, welcher wiederum luftdicht im Ende des Narkoseschlauches steckte. Dadurch konnte die Anästhesie während der gesamten OP-Dauer von 15min bei 2-3% Isofluran und 1l/min O₂ aufrechterhalten werden. Das Fell im Bereich des Situs wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und glattgestrichen. Mit Hilfe der zuvor ebenfalls in Alkohol sterilisierten Instrumente erfolgte die mediane Laparotomie als ca. 2,5cm langer Eröffnungsschnitt. Von distal nach proximal entlang der Linea alba wurde ebenfalls das Peritoneum bis zum des Processus (Proc.) xiphoideus eröffnet. Um eine gute Übersicht während der OP zu gewährleisten, wurde der Situs durch zwei lateral eingebrachte Retraktoren gespreizt und der Proc. xiphoideus mit einer stumpfen Klemme unter leichtem Zug nach kranial gezogen. Durch die Fixierung der Klemme an einem Metallständer oberhalb der Korkplatte konnte der Brustkorb nach kranial gekippt werden, wodurch die Leber entsprechend unter dem Diaphragma hervortrat. Es folgte die Präparation und Mobilisierung der zu resezierenden Leberlappen mittels Wattetupfer. Die 2/3-PHx wurde erreicht, indem zuerst der linke und anschließend der aus zwei Teilen bestehende mittlere Leberlappen entnommen wurden. Unter Schonung der Nachbarorgane und Durchtrennung von störenden Bindegewebssträngen wurde ein monofiler Faden aus Polypropylen der Stärke 4-0 um die Basis der Leberlappen gelegt und mit drei Knoten als zentrale Ligatur verschlossen. Nach dem Abtrennen mit einer Schere wurden die Leberlappen mit einer anatomischen Pinzette geborgen. Zurück blieb ein kurzer Stumpf an der Basis, welcher ein Ablösen der Ligatur vermeiden sollte. Unter optimalen Bedingungen kam es nicht oder nur

zu einer minimalen Blutung, die mittels leichter Kompression der Wattestäbchen behoben werden konnte. Zuletzt wurde die Bauchhöhle durch zwei fortlaufende Nähte verschlossen. Postoperativ wurden die Tiere für 30min auf eine Wärmematte gestellt. Sie erholten sich innerhalb kürzester Zeit ausreichend von der Narkose und konnten anschließend zurück in die Käfige gesetzt werden, wo Futter und Wasser zur Verfügung stand. In der postoperativen Überwachungsphase der Mäuse wurde auf außergewöhnliches Verhalten und Aussehen (z.B. Piloerektion, stumpfes Fell, eingesunkene Augen, aufgekrümmter Rücken, reduzierte Aufrichtbewegungen, verlangsamter Gang oder träges Bewegungsverhalten) geachtet. Im genannten Fall wurden die Tiere analog eines Bepunktungssystems („score sheet“) aus dem Experiment ausgeschlossen und ggf. vorzeitig euthanasiert. Alle Operationen wurden unter aseptischen Bedingungen sowie perioperativ nach dem folgenden Narkose-/Schmerzprotokoll durchgeführt:

- a) Präemptive Analgesie mit Metamizol (200mg/kgKG, oral vor Einleitung der Narkose)
- b) Inhalationsnarkose mit Isofluran (zur Einleitung der Narkose 5%, zum Erhalt 2-3%)
- c) Intraoperativ – aber vor dem Hautschnitt – Temgesic (0,05mg/kgKG, intraperitoneal)
- d) Postoperativ Analgesie mit Temgesic (0,05mg/kgKG subkutan alle 8-10 Stunden für die Gruppen ½, 1, 2 und 3 Tage für die gesamte Überlebenszeit – für die 7 Tage Gruppe bis zum dritten Tag).

3.2.4 Intraperitoneale Injektion

Als Thymidin- bzw. Desoxyuridinanalogen stellt Bromodeoxyuridin (BrdU) nach Einbau in die DNA-Synthese einen proliferativen Marker dar. Spezifisch für die S-Phase des Zellzyklus markiert BrdU vitale Zellen, die sich in Proliferation befinden und somit zur Leberregeneration beitragen. Um diese Zellen in einer später folgenden immunhistochemischen Färbung mittels Antikörper detektieren zu können, musste den Tieren nach erfolgter Operation BrdU gespritzt werden. Die Injektion von 2mg/Tier unverdünntem BrdU (c = 10mg/ml) erfolgte intraperitoneal 2h vor der Sektion der entsprechenden Maus. Dieser zeitliche Abstand diente dazu, eine ausreichende Resorption von BrdU sowie die anschließende Interkalierung in die DNA während der Mitose zu gewährleisten.

Für die Injektion wurde das Tier am Nackenfell hinter den Ohren mit zwei Fingern so gepackt, dass es sich nicht mehr aus dem Griff lösen konnte. In der rechten Hand liegend, den Schwanz mit dem kleinen Finger fixierend, wurde der Bauch des Tieres exponiert. Die Maus wurde durch leichtes Kippen des Handgelenks in Kopf-tief-Position gebracht, um eine

Verlagerung der Bauchorgane nach kranial zu erzielen und eine Verletzung der intraperitoneal gelegenen Organe mit der Spritze zu vermeiden. Die Injektion erfolgte mit einer Einmalspritze im 45° Winkel i.p. im linken unteren Quadranten. Danach konnte die Maus bis zu ihrer schmerzfreien Tötung ohne Weiteres in ihrem Käfig verweilen. Die Vorgehensweisen der BrdU-Applikation ist mit einer einmaligen Punktion der Peritonealhöhle verbunden. Da der Grad der zu erwartenden periinterventionellen Schmerzen als gering eingestuft wird, ist eine vorangehende Schmerzmittelgabe bzw. präemptive Analgesie nicht notwendig. Postinterventionell ist keine Schmerzentwicklung anzunehmen, das Medikament verteilt sich auf Grund seiner Lösung in PBS gleichmäßig im Abdomen. Eine Volumenbelastung (bei einer 25g schweren Maus entsprechend der o.a. Konzentration 200µl) sowie eine intraperitoneale Reizung durch das Medikament kommen nicht vor.

3.2.5 Blut- und Organentnahme

Für die Blut- und Organentnahme zu definierten Zeitpunkten nach Leberteilresektion wurden die Mäuse erneut in Isoflurannarkose laparotomiert, die Bauchhöhle entlang der bestehenden Nähte eröffnet und das Tier durch die Eröffnung des Brustkorbes sowie das Punktieren der Aorta bei der Entnahme des gesamten (regenerierten) Leberstumpfes bzw. Gewebes schmerzfrei getötet. Die entnommenen Proben stellen die Experimentalansätze für die sich anschließenden Untersuchungen dar.

Perioperativ wurde folgendes Narkose-/Schmerzprotokoll durchgeführt:

- a) präemptive Analgesie mit Metamizol (200 mg/kgKG, oral vor Einleitung der Narkose)
- b) Inhalationsnarkose mit Isofluran (zur Einleitung der Narkose 5%, zum Erhalt 2-3%)
- c) Intraoperativ – aber vor dem Hautschnitt – Temgesic (0,05 mg/kgKG, intraperitoneal)

Um das spätere Leber/Gewicht-Verhältnis bestimmen zu können, wurden die narkotisierten Tiere gewogen. Die Laparotomie erfolgt analog der primären Operation bzw. als Durchtrennung des einliegenden Nahtmaterials. Nach Darstellung des Situs erfolgte das Punktieren der Aorta. Hierfür wurde der murine Darm aus dem Peritoneum heraus nach lateral geschlagen, um Blut durch Punktion der Aorta mit einer Einmalspitze aspirieren zu können. Durchschnittlich wurde ein Blutvolumen von 300µl/Maus extrahiert und anschließend in ein Microtainer Röhrchen mit Polymergel für Serumgewinnung übertragen. Die vollständige Hepatektomie der in situ verbliebenen Leber erfolgte zügig, indem Bindegewebssepten durchtrennt wurden und das Organ in toto geborgen wurde. Die Tiere

wurden durch die Organentnahme (Hepatektomie) und eine simultane Eröffnung des Brustraumes und anschließender zervikaler Dislokation schmerzfrei getötet.

Die entnommene Leber wurde in 1x PBS gewaschen und die nekrotischen Anteile vor dem Wiegen abgetrennt und verworfen. So wurde sichergestellt, dass spätere Analysen nur an regenerierter und prä mortal funktionell aktiver Leber erfolgten. Es folgten das Abwiegen mit der Analysewaage und Zerteilen in ein größeres Stück für die Immunhistologie sowie mehrere ca. 30µg schwere Stücke für RNA- und Proteinisolierung. Letztere wurden schockgefroren und in 1,2ml Kryo-Röhrchen bei -80°C gelagert.

Für die nachfolgenden Serumanalysen mussten zelluläre Bestandteile aus dem Blut entfernt und reines Serum gewonnen werden. Hierfür mussten die Blutproben nach Entnahme 30min bei RT in den Microtainer Röhrchen mit Polymergel ruhen. Anschließend konnten die Proben bei 4°C für 7min bei 7.000rpm zentrifugiert und das Serum, welches durch das Polymergel von der zellulären Phase getrennt war, entnommen werden. Das Serum wurde bei -80°C in 1,5ml Eppendorf Safe-Lock Röhrchen verwahrt.

3.2.6 Berechnung des Leber/Gewichts-Quotienten

Um beurteilen zu können, inwieweit sich die Leber prozentual nach partieller Hepatektomie regeneriert hat, wurde der Leber/Gewicht-Quotient pro Tier ermittelt. Eine entsprechende Normalisierung der Werte auf das Körpergewicht war unerlässlich, da die Tiere im Alter von 10-12 Wochen mit einer Varianz durchschnittlich 22-27g wiegen. Folglich wurden die postmortal ermittelten Werten, als Lebermasse dividiert durch Gewicht der entsprechenden Maus, ins Verhältnis gesetzt und der Mittelwert für den definierten Zeitpunkt post-PHx mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism berechnet.

3.2.7 Serumanalyse mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Serumanalysen wurden mittels Quantikine® ELISA Mouse IL-6 und Mouse TNF-α Immunoassay-Kit durchgeführt. Hierbei wird quantitativ die Konzentrationen an IL-6 sowie TNF-α bestimmt. Die für IL-6 und TNF-α spezifischen monoklonalen Antikörper sind bereits auf einer Mikrotiterplatte angebracht und können nach Auftragen der Serumproben eine Bindung mit den genannten Proteinen eingehen. Ein zweiter Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper wird hinzugegeben, der wiederum eine Bindung mit dem ersten Antikörper

eingeht. Das Substrat, welches anschließend folgt, wird als Farbreaktion katalysiert durch das gebundene Enzym umgewandelt, und die stattgefundenen Farbtintensität wird photometrisch gemessen. Sie ist proportional zum gebundenen IL-6 bzw. TNF- α , da überschüssige Antikörper in einem Waschschrift entfernt werden.

Für den ELISA mussten die Serumproben aufgetaut und alle Reagenzien des ELISA-Kits auf RT erwärmt und nach dem Protokoll des Herstellers R&D Systems vorbereitet werden. Die Serumproben wurden 1:2 mit der Kalibrierungslösung des Kits verdünnt und, ebenso wie der Standard, mit einem Volumen von 50 μ l/well zu 50 μ l Assay Diluent-Lösung pipettiert. Es folgte abgedeckt eine Inkubation bei RT auf der Schwenkplattform für 2h. Danach wurde die 96-Well-Platte mit Hilfe des Waschgeräts Tecan Hydro Flex und dem Waschpuffer des Kits 5x gewaschen. Anschließend wurden 100 μ l/well Konjugat hinzugegeben und die Platte erneut abgedeckt 2h bei RT auf der Schwenkplattform inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (5x) folgten 100 μ l/well Substrat-Lösung, welche für 30min bei RT im Dunkeln inkubiert wurden. Mit 100 μ l/well Stop-Lösung wurde die enzymatische Reaktion beendet. Bei 450nm (Korrektur der Wellenlänge bei 570nm) erfolgte die Messung der optischen Dichte mit dem Photometer (Dynatech MRX Microplate Reader ELISA). Die ermittelten Ergebnisse mussten anschließend aufgrund der erfolgten Verdünnung wieder mit dem Faktor 2 multipliziert werden.

3.3 RNA-Extraktion aus Lebergewebe und quantitativer Echtzeit-PCR

3.3.1 RNA-Isolierung

Um RNA aus dem Lebergewebe zu isolieren, wurden das RNeasy Mini-Kit (Fa. Qiagen) und die enthaltenen Reagenzien verwendet. Zu Beginn wurde der RLT-Puffer angesetzt für 600 μ l/Probe, indem zu 6ml RLT-Puffer 60 μ l β -Mercaptoethanol pipettiert wurden. Es wurde großer Wert daraufgelegt, das Gewebe nicht frühzeitig antauen zu lassen und stets Handschuhe zu tragen, um eine Zerstörung der RNA durch die potentiell vorhandenen RNasen zu vermeiden. Folglich wurden der Halteblock für die Kryo-Röhrchen sowie die Pinzette für die Gewebeentnahme in flüssigem Stickstoff für einige Sekunden vorgekühlt. Die Kugeln für den Gewebehomogenisator (TissueLyser II) und 600 μ l RLT-Puffer wurden in 2ml SafeSeal Reagiergefäße vorgelegt und auf Eis gestellt. Das Lebergewebe wurde stets in flüssigem Stickstoff gelagert und transportiert, bis die Entnahme mittels Pinzette erfolgte. Hierbei wurde darauf geachtet, möglichst kleine vorgeschchnittene Stückchen zu wählen, um einer Überladung der Qiagen-Säulen vorzubeugen. Das Gewebe wurde in die Eppendorf Röhrchen gegeben, taute im RLT-Puffer auf und wurde in den Blöcken des

Gewebehomogenisators (TissueLyser II) bei 30Hz für 3min homogenisiert. Danach erfolgte die Zentrifugation für 3min bei maximaler Geschwindigkeit von 13.200rpm. In neue 2ml Reagiergefäße wurde jeweils 600µl 70% Ethanol pipettiert, die flüssige Phase des Gewebelysats vorsichtig entnommen und in das Ethanol gegeben. Nach dem Mischen durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren wurden 600µl direkt weiter in die Qiagen-Säulen überführt und bei 13.200rpm für 30sec zentrifugiert. Der RNA-freie Durchlauf wurde entsorgt, das restliche Volumen des noch vorhandenen ethanolhaltigen Lysats wurde in einem zweiten Schritt ebenso über die Säule geschickt.

Es folgte ein DNA-Verdau, um sicherzustellen, dass die später gemessenen Werte der RNA-Konzentration nicht durch ebenfalls enthaltene DNA verfälscht werden. Hierfür wurden 80µl/Probe aus 10µl DNasen und 70µl Puffer vorbereitet. Diese wurden direkt auf die Membran der Qiagen-Säule gegeben und für 15min bei RT inkubiert. Mit 600µl RW1-Puffer pro Säule wurden die DNasen durch 30sec Zentrifugation heruntergespült. Es folgte zweimaliges Waschen der Membran mit je 500µl RPE-Puffer, der mit 30sec im ersten und 2min im zweiten Schritt abzentrifugiert wurde. In einem neuen trockenen Sammelröhrchen wurde die Membran für 1min zentrifugiert und somit vollständig getrocknet. Nachdem die Qiagen-Säule in ein 1,5ml Eppendorf Röhrchen gestellt wurde, konnte die RNA durch zweimaliges Auftragen von 30µl RNase-freiem Wasser, nach 1min Einweichen und 1min Zentrifugation, eluiert werden. So resultierten am Ende 60µl, auf Eis gekühltes, Probenvolumen, dessen RNA-Konzentration spektrophotometrisch am Nanodrop-Gerät bestimmt wurde.

3.3.2 Synthese der cDNA

Um im letzten Schritt (siehe 3.3.3) mittels Echtzeit-PCR die Expression verschiedener Gene im Lebergewebe bestimmen zu können, wird komplementäre DNA (cDNA) benötigt. Diese wurde aus der isolierten RNA synthetisiert, indem die Methode der reversen Transkription angewandt wurde, bei der eine RNA-abhängige DNA-Polymerase als Enzym die Umschreibung von RNA in DNA katalysiert. Vor dem Beginn der cDNA-Synthese wurde die extrahierte RNA zu einem 1µg RNA/10µl Ansatz vorverdünnt. Hierfür wurden die gewünschten 1000ng durch die ermittelte RNA-Konzentration (optimal im Bereich >100ng/µl) dividiert und das noch fehlende Volumen für 10µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Folgende Reagenzien wurden als Mix vorbereitet und anschließend 3,5µl/Probe zur RNA pipettiert:

- 1.) 1µl Random Primer (1:150)
- 1µl Oligo(dT) Primer (1:20)
- 1,5µl RNase-freies Wasser

Die Proben wurden für 10min bei 70°C im Heizblock inkubiert und anschließend kurz auf Eis gelagert, während der zweite Mix mit 6,5µl/Probe vorbereitet und hinzugefügt wurde:

- 2.) 4µl RT-Puffer (5x)
- 1µl dNTP's
- 1µl RevTranskriptase
- 0,5µl Ribolock (RNase Inhibitor)

Nach 10min Inkubation bei RT wurden die Proben für 1h bei 42°C im Heizblock und anschließend für 5min bei 95°C inkubiert. Die nun vorliegenden 20µl cDNA-Proben mussten bei RT für einige Minuten abkühlen und wurden kurz mit der Tischzentrifuge herunterzentrifugiert, um Tröpfchen am Deckel der Röhrchen zu vermeiden. Anschließend wurde eine 1:5 Verdünnung mit zusätzlichen 80µl RNase-freiem Wasser/Probe erstellt und die Proben bei -20°C gelagert.

3.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur quantitativen Bestimmung der spezifischen Genexpression im Lebergewebe wurde die Echtzeit-PCR mit dem LightCycler 480 durchgeführt. Hierbei wurde in mehreren Zyklen die vorliegende DNA amplifiziert und mittels Fluoreszenz-Messung (465-510nm) in der exponentiellen Phase der DNA-Vermehrung quantifiziert. Als Fluoreszenz-Marker dienten gen-spezifische UPL-Sonden, deren Signal während der PCR proportional zur amplifizierten DNA zunahm. Folgende Reagenzien wurden als Ansatz (15µl/Probe) vorbereitet und zu jeweils 5µl cDNA in eine 96-Well Platte pipettiert:

- 4,4µl H₂O
- 0,2µl UPL Probe (10µM)
- 0,2µl Forward Primer (20pmol/µl)
- 0,2µl Reverse Primer (20pmol/µl)
- 10µl Mastermix

Als probeninterne Negativkontrolle wurde H₂O und als Positivkontrolle ein RNA-Milzpool (c = 0,1µg/µl) aus lysiertem Milzgewebe verschiedener Wildtyp-Mäuse verwendet, der nach dem

Umschreiben in cDNA 1:10 verdünnt wurde. β -Actin diente als internes Referenzgen, zu welchem die entsprechenden Genexpressionswerte ins Verhältnis gesetzt wurden. Die Auswertung erfolgte zwischen dem 20. bis 35. Zyklus als relative Quantifizierung mittels LightCycler 480 Software (Advanced Relative Quantification for All Samples). Erschienen die Amplifikationskurven oder die gemessenen Zielgen/Referenz-Werte suspekt, so wurde die PCR für einen sicheren Qualitätsstandard wiederholt.

3.4 Proteinbiochemische Analysen

3.4.1 Herstellung von Gewebelysaten

Das murine Gewebe wurde vom Zeitpunkt des ersten Schockefrierens bis zur Verwendung stets in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Lyse wurde der Stammpuffer (Cell Lysis Buffer, 10x konzentriert) 1:5 mit ddH₂O auf eine 2x konzentrierte Pufferlösung verdünnt. Für jede Probe (Gewicht ca. 30 μ g) wurde ca. 300 μ l Lysepuffer benötigt, sodass die entsprechende Gesamtmenge an Puffer durch Multiplikation mit der Probenanzahl ermittelt werden konnte. Hinzugegeben wurden die reversiblen Proteaseinhibitoren PMSF (1:100), Leupeptin (1:1000), Aprotinin (1:1000) und Pepstatin A (1:1000). Alle Reagenzien wurden kontinuierlich auf Eis gekühlt. Nach Vorlegen der Kugeln für den Gewebehomogenisator (TissueLyser II) in die 2ml Reagiergefäße wurde jeweils 300 μ l des erstellten Lysepuffers hinzupipettiert. Ohne Abwiegen konnten die ca. 30 μ g wiegenden Gewebestücke in gefrorenem Zustand in den Puffer gelegt werden. Nach sicherem Verschließen wurden die Eppendorf Röhrchen in die zuvor bei -20°C gekühlten Blöcke des Gewebehomogenisators eingespannt und bei 30Hz für 3min geschüttelt. Danach erfolgte eine Rotation für 10min bei 4°C der homogenisierten Proben im senkrecht stehenden Rotor und eine Zentrifugation für 15min bei 4°C und 13.000rpm. Der proteinhaltige Überstand wurde vorsichtig entnommen und in neue Eppendorf Röhrchen ohne Kugel pipettiert und auf Eis gestellt.

3.4.2 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Bestimmung des Proteingehalts einer jeden Probe wurde ein Proteinassay mit photometrischer Bestimmung der Proteinmenge durchgeführt. Hierfür mussten die lysierten Gewebeproben in einem separaten Eppendorf Röhrchen 1:10 mit 1x PBS verdünnt werden. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA (10mg/ml, 5mg/ml, 2,5mg/ml, 1,25mg/ml, 0,625mg/ml, 0,312mg/ml, 0,156mg/ml) sowie 1x PBS als Leerwert verwendet. Es

erfolgte ein 2-fach Ansatz bei Standard und Proben, um die Messungengenauigkeit möglichst gering zu halten. Pro Vertiefung einer 96-Well Platte wurden sowohl vom Standard als auch von den vorverdünnten Gewebeproben 10µl pipettiert. Das Substratreagens (Pierce BCA Protein Assay Reagent A+B), welches mit dem Protein reagiert und die photometrische Messung bei 570nm erlaubt, wurde in einem Verhältnis 50:1 vorbereitet. Von diesem Reagens wurden sofort mit einer 12-Kanalpipette 200µl/well überführt und die 96-Well-Platte bei 37°C für 30min im Wärmeschrank inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung des Proteingehalts im Photometer für Mikrotiterplatten (Dynatech MRX Microplate Reader ELISA). Die ermittelte Konzentration musste aufgrund der 1:10 Verdünnung wiederum mit dem Faktor 10 multipliziert werden, um die korrekte Proteinkonzentration (Ergebnisse durchschnittlich im Bereich 15-45µg/µl) einer jeden Probe zu erhalten. Um die gleiche Gesamtproteinkonzentration (1µg/µl) in jeder Probe zu haben und sie untereinander im Hinblick auf spezifische Proteinexpression vergleichen zu können, wurden die Lysate mit einer entsprechenden Menge 1x SDS-Probenpuffer und β-Mercaptoethanol verdünnt. Die vollständige Freisetzung aller Proteine wurde sichergestellt, indem die Proben 4x10sec im Wasserbad mit Ultraschall behandelt wurden. Bei 95°C für 5min im Heizblock erfolgte die Inaktivierung der Proteine, bevor die Proben bei -20°C mindestens über Nacht, allerdings auch für eine längere Aufbewahrung, gelagert wurden.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die denaturierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Das bereits zur Verdünnung dienende SDS (siehe 3.4.2) ist ein anionisches Detergens und führt durch Anlagerung zu einer negativen Ladung der Proteine. Zusammen mit β-Mercaptoethanol, welches für die Reduktion von Disulfidbrückenbindungen verantwortlich ist, wird die Ausbildung der proteinorganisierenden Strukturform verhindert, und die ehemals gefalteten Proteine liegen somit in linearisierter Form vor. In einem elektrischen Feld laufen die Proteine in Richtung Pluspol und werden in einem polymerisierten Acrylamidgel nach molekularen Masse aufgetrennt. Das hierfür verwendete 10% oder 12,5% Trenngel (siehe 3.1.3) besitzt wesentlich kleinere Poren als das Sammelgel, in welches die Proteine zu Beginn pipettiert werden. Somit kann eine sehr spezifische Auftrennung der Proteine gewährleistet werden. Generell gilt, umso kleiner ein Protein, desto höher muss das Reagens konzentriert sein, um eine möglichst genaue Auftrennung zu erzielen.

Nach ausgiebigem Reinigen der Glasplatten der Gelapparatur wurden diese mit einem Gummiband abgedichtet und zusammengesteckt. Mittels Einfüllen von ddH₂O konnte das System vor dem Gießen des Gels auf eine ausreichende Dichte überprüft werden. Lag diese vor, so wurden pro Kammer 5ml Trenngel verwendet, auf welches ddH₂O bis zum oberen Rand gefüllt wurde, um ein Austrocknen während des Polymerisationsvorgangs zu vermeiden. Nach 45min war das Gel ausreichend ausgehärtet, um das ddH₂O abgießen und die Kammer mit Sammelgel befüllen zu können. Die Kämme, die im Sammelgel die benötigten Taschen bilden, wurden hineingesteckt. Es wurde anschließend erneut 30min auf die vollständige Polymerisation gewartet. Danach konnten die Gummibänder sowie die Kämme zwischen den Glasplatten entfernt werden. Die gesamte Apparatur wurde großzügig mit 1x konzentriertem Laufpuffer befüllt, welcher aus dem Stock Laufpuffer (5x) durch eine 1:5 Verdünnung mit ddH₂O erstellt wurde.

Die Gewebelysate wurden aufgetaut und bei 95°C für 5min im Heizblock erhitzt. Allerdings wurde keine Probe mehr als 3x verwendet, um Schäden durch den Auftauvorgang vorzubeugen. Es folgte das Pipettieren von je 20µl Probenmaterial in die Geltaschen, wodurch eine Menge von 20µg pro Spur aufgetragen wurde. Der ebenfalls aufgetragene Molekulargewichtsmarker (Page Ruler Prestained Protein Ladder) dient der späteren Bestimmung der Proteinbandengröße. Nach Abdecken der Gelapparatur wurde für 15min eine Spannung von 85V, danach für eine Stunde 120-130V angelegt. Eine gute Auftrennung war vorhanden, sobald die blaugefärbten Proben den Unterrand des Gels erreichten.

3.4.4 Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (Western-Blot)

Die im Anschluss an die SDS-PAGE Auftrennung benötigte Membran sowie Filterpapiere wurden mit Transblotpuffer (1x) getränkt, um einen guten Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran zu erzielen. Das Polyacrylamidgel wurde von den Glasplatten gelöst und auf die Membran gelegt, mit einem dünnen Filterpapier bedeckt und zwischen zwei dickere Filterpapiere außen gelegt. Um Luftblasen zwischen den Schichten zu entfernen, wurde mit einem Glasspatel einmal über alle Filter gefahren. Danach wurde die „Semi-Dry“ Elektrophorese-Apparatur zum Transblot für 1h bei 10V geschlossen. Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers auf die Membran wurde diese kurzzeitig mit Ponceau S Lösung gefärbt.

3.4.5 Immunochemische Detektion spezifischer Proteine (Immunoblot)

Mittels Immunoblot können immunhistochemisch spezifische Proteine auf der Membran detektiert werden. Durch Bindung eines ersten Antikörpers an das relevante Protein kann ein zweiter mit Meerrettichperoxidase-markierter Antikörper die Detektion ermöglichen. Um die Bindung der Antikörper spezifischer zu gestalten und ungewollte Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde diese für 1h bei RT in 5% Milchpulverlösung geblockt. Für diese Milchpulverlösung wurden 5g Milchpulver in 100ml TBS-Tween Waschpuffer gelöst. Nach dreimaligem Waschen auf dem Plattformerschüttler für mindestens 10min in TBS-Tween Waschpuffer wurde die Membran mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Hierfür wurde der Antikörper in einer optimierten Verdünnung (siehe 3.1.4) mit 1,5ml 5% BSA-Lösung luftdicht eingeschweißt. Auf einer taumelnden Schwenkplattform bei 25rpm wurde über die Nacht eine gleichmäßige Inkubation der Membran in der Antikörper-BSA-Lösung sichergestellt. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran aus der eingeschweißten Hülle herausgeschnitten und erneut 3x in TBST gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem spezies-spezifischen sekundären Antikörper in 5% Milchpulver für 1h bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran für mindestens 1min in dem Detektionsreagenz ECL (Verdünnung der beiden Komponenten 1 und 2 im Verhältnis 1:1) geschwenkt. Dieses wird von der gebundenen Meerrettichperoxidase katalysiert und es entsteht das Produkt Chemilumineszenz, welches wiederum in einer Dunkelkammer durch Auflegen auf einen Röntgenfilm sichtbar gemacht wird. Um Lufteinschlüsse zu vermeiden und die Röntgenfilmkassetten zu schützen, wurden die Membranen für die Belichtung stets in eine Klarsichtfolie gebettet.

Für die Beladungskontrolle wurde ein Antikörper (α -Tubulin oder GAPDH) gewählt, dessen proteinbandenbestimmendes Molekulargewicht ausreichend weit von den detektierten Proteinproben entfernt lag. So konnte eine Signalüberlagerung vermieden werden, welche die spätere computergestützte Bandenauswertung (mit dem Programm ImageJ) erschwert hätte. Die Beladungskontrolle erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern äquivalent nach der oben beschriebenen Methode.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Vorbereitung der Gewebe für die Paraffinhistologie

Die Gewebestücke, die nach Organentnahme für die Histologie bestimmt waren, wurden nach dem Reinigen mit 1x PBS in die Paraffinblockkassetten gelegt. Für einen langfristig

besseren Erhalt des Gewebes wurden die Leberresektate für mindestens 24h in 4% PFA bei 4°C im Dunkeln fixiert. Die Paraformaldehyd-Lösung wurde in einer 1:2 Verdünnung aus 8% PFA und 1x PBS erstellt. Danach wurden die Kassetten in 70% Ethanol durch Schwenken einmal gewaschen und anschließend in frischem 70% Ethanol bis zum Entwässerungsprozess gelagert. Dieser erfolgte im Gewebeeinfiltrationsautomaten, in welchem ebenfalls nach einer Ethanol- sowie Xylol-Reihe die Überführung in flüssiges Paraffinöl stattfand. Das Paraffin wurde anschließend bei 65°C für mindestens 1h flüssig gehalten, bis die Böcke mit der Paraffinausgießstation gegossen werden und für 1h auf Eis aushärten konnten. Vor dem Schneiden wurden die Paraffin-Blöcke bei -20°C auf der Kühlplatte vorgekühlt, um einem Faltenwurf beim Schneiden vorzubeugen. Nach dem Anschneiden bis zur gewünschten Gewebefläche mit einem Vorschub von 10µm wurde das Mikrotom auf 3µm Schnittdicke umgestellt. Die in Serie erstellten Schnitte wurden für 5-10min auf die Wasseroberfläche (ddH₂O) eines 37°C warmen Wasserbads für Paraffinschnitte gelegt. Durch das Eintauchen der Objektträger ins Wasserbad konnten die Schnitte faltenlos auf das Glas aufgebracht werden. Bei 37°C mussten die Schnitte anschließend über Nacht im Inkubator trocknen.

3.5.2 Bromodeoxyuridin (BrdU)-Immunhistologie

Um das Proliferationsverhalten der Hepatozyten beurteilen zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem für Bromodeoxyuridin (BrdU)-spezifischen Antikörper (Anti-BrdU) durchgeführt. BrdU wird nach intraperitonealer Injektion vom murinen Organismus resorbiert und als Analogon zu Thymidin bzw. Desoxyuridin während der DNA-Synthese interkaliert. Im Vergleich zu anderen Proliferationsmarkern (z.B. Ki67) detektiert BrdU spezifisch Zellen, die sich während der 2-stündigen Resorptionsphase nach i.p. Injektion in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Um die BrdU-positiv gefärbten Hepatozyten unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wird bei der Immunhistochemie ein zweiter mit Meerrettichperoxidase-markierter Antikörper (anti-mouse-HRP) verwendet, der an den primären Antikörper bindet.

Zu Beginn dieser Methode mussten die Schnitte dreimal für je 10min in Roticlear entparaffinisiert werden, bevor sie für eine Rehydrierung die folgende Alkoholreihe durchliefen:

100% Ethanol	3 x 2min
96% Ethanol	1 x 2min

70%	Ethanol	1 x 2min
-----	---------	----------

50%	Ethanol	1 x 2min
-----	---------	----------

Auf einem Plattformschüttler wurden die Schnitte anschließend für 5min in H₂O gewaschen, bevor die Antigen-Demaskierung mit 20x Citratpuffer erfolgte. Hierfür wurden für 20 Schnitte 40ml 20x Citratpuffer mit 760ml H₂O vorbereitet und mit den Schnitten in einer verschlossenen Plastikwanne für 15min bei 600W in der Mikrowelle aufgeköcht. Auf Eis kühlten die Schnitte innerhalb von 20 min ausreichend ab, sodass sie anschließend für 5min mit 1x TBS-Waschpuffer (erstellt aus: 1g Albumin Fraktion V aufgelöst in einer 1:10 Verdünnung aus 10x TBS-Waschpuffer und H₂O) auf dem Plattformschüttler gewaschen werden konnten. Um endogene Peroxidasen zu blockieren, wurden die Schnitte für 5min bei RT mit 3% Wasserstoffperoxid-Lösung gewaschen. Diese wurde aus einer 1:10 Verdünnung von 30% H₂O₂ in Methanol erstellt. Nach dreimaligem Waschen für je 5min in 1x TBS-Waschpuffer wurden die Schnitte für 1h bei RT in 10% Ziegen Serum (aus 100% goat serum 1:10 in 1x TBS-Waschpuffer verdünnt) in einer humiden Kammer inkubiert. Hierfür wurden die Objektträger weitestgehend abgetrocknet, ein Kreis mit dem wasserfesten Fettstift um das Gewebe gezogen und dieses mit 100µl Ziegen Serum/Schnitt benetzt. Nachdem unspezifische Bindungsstellen geblockt waren, folgte über Nacht die Inkubation mit dem primären Antikörper (Anti-BrdU 1:40 verdünnt in der zuvor erstellten Ziegen Serum-Lösung) in der humiden Kammer bei 4°C.

Am nächsten Tag wurde der überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen für je 10min in 1x TBS-Waschpuffer auf dem Plattformschüttler abgespült und der Meerrettichperoxidase-markierter Antikörper mit 2Trpf./Schnitt aufgebracht. Nach 1h Inkubation bei RT in der humiden Kammer folgte erneut dreimaliges Waschen für je 10min. Anschließend wurden die Objektträger wieder getrocknet und das Substrat DAB (aus 1000µl Puffer und 1Trpf. = 20µl DAB-Lösung vorbereitet) mit 90µl/Schnitt für 40sec auf das Gewebe getropft. Katalysiert von der Meerrettichperoxidase konnte die stattfindende Reaktion unter dem Mikroskop beobachtet und mit H₂O gestoppt werden. Es folgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 5sec sowie 15-20min Spülen unter fließendem Wasser. Für eine Dehydrierung musste die folgende Alkoholreihe sowie Roticlear durchlaufen werden:

50%	Ethanol	1 x 2min
-----	---------	----------

70%	Ethanol	1 x 2min
-----	---------	----------

96%	Ethanol	1 x 2min
-----	---------	----------

100%	Ethanol	3 x 2min
------	---------	----------

Roticlear		3 x 5min
-----------	--	----------

Anschließend wurden die Objektträger getrocknet, die Fettstiftumrandung entfernt und die Schnitte mit 1Trpf. VectaMount Medium und Deckgläschen eingedeckelt.

3.5.3 Mikroskopische Auswertung der Histologie

Zur Auswertung der HE-Färbungen sowie Immunhistologie wurde das Zeiss-Lichtmikroskop mit angeschlossener Digitalkamera und die Software Axio Vision 4.8 verwendet. Für die Beurteilung der BrdU-Färbungen wurden fünf, voneinander entfernt liegende, repräsentative Bilder pro Schnitt in einer 20x Vergrößerung bei einer Belichtungszeit von 500 μ s erstellt. Um einen zeitlichen Verlauf der Regeneration nach partieller Hepatektomie beurteilen zu können, wurden die Gewebeschnitte von allen Mäusen zu den späten Zeitpunkten (24h, 32h, 40h, 48h, 72h und 168h post-PHx) ausgezählt. Hierfür mussten sowohl die braun gefärbten BrdU-positiven als auch die bläulich negativen Hepatozyten in ihrer Gesamtzahl pro Schnitt gezählt werden. Es wurde das Verhältnis aus BrdU+ zu Gesamtzahl an Hepatozyten für jedes Bild einzeln errechnet und der Mittelwert an regenerierenden Zellen pro Maus mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism (siehe 3.6) ermittelt. Die finale Angabe der Ergebnisse erfolgte als Prozentsatz.

3.6 Auswertung und Statistik

Berechnungen der Quotienten wie beispielsweise Protein/Ladekontrolle oder Leber/Gewicht wurden mit dem Computerprogramm Excel (Version 2016) durchgeführt.

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm GraphPad Prism (Version 6.00) mit dem studentischen t-Test für ungepaarte Daten verwendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (Standard Deviation, SD) dargestellt. Ist $p < 0,05$ gegeben, liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit, mit der die Nullhypothese gerade noch widerlegt werden kann, unter 5%. Bei einem solchen p-Wert wurde ein Unterschied als signifikant (in den Abbildungen als * markiert), bei $p < 0,01$ (**) und bei $p < 0,001$ als hochsignifikant (***) gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Verminderte Regeneration der Lebermasse bei MAVS/STING (-/-) Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx

Zur Überprüfung der Regenerationsfähigkeit der Leber wurde nach erfolgter 2/3-Hepatektomie stets die Masse der sich regenerierenden Leber bestimmt und ins Verhältnis zum Körpergewicht des Tieres gesetzt. Die Ergebnisse (Abb. 6) zeigen bei unbehandelten WT und KO Mäusen (0h Zeitpunkt) vergleichbare Leber/Gewicht-Quotienten. Auch 2h nach PHx lässt sich noch kein Unterschied zwischen WT und KO Gruppe erkennen, jedoch bestätigt sich hierdurch, dass von einem vergleichbaren Gewebeverlust – erzielt durch die Intervention im Sinne der operativen Resektion - ausgegangen werden kann. Deutliche Unterschiede zeigen sich interessanterweise 40h, 72h als auch 168h post-PHx, einer signifikanten Verringerung des Leber/Gewichts-Quotienten im defizienten Mausstamm entsprechend. Diese phänotypische Veränderung impliziert eine deutlich eingeschränkte Regenerationsfähigkeit der Leber bei den MAVS/STING (-/-) Mäusen. Der zeitliche Verlauf lässt gut erkennen, dass die Regeneration 32h nach PHx das erste Mal verzögert ist und auch zu den darauffolgenden Zeitpunkten keine signifikant erhöhte Regeneration bei den defizienten Mäusen zu verzeichnet ist. Wie in der Literatur beschrieben, kann es trotz einer Verzögerung der Regeneration z.B. bei IL-6 defizienten Mäusen 96h nach PHx dennoch zu einem zur Kontrollgruppe äquivalenten finalen Lebergewicht kommen (Sakamoto et al., 1999). Bei den MAVS/STING (-/-) Mäusen hingegen zeigt sich auch nach 168h ein weiterhin verringerter Leber/Gewicht-Quotient. Erst nach 336h (Ergebnisse hier nicht gezeigt) haben WT und KO ähnliche Leber/Gewicht-Quotienten, wobei die WT Gruppe im Vergleich zur KO Kohorte keine signifikante Zunahme mehr zeigt. Es kann somit von spät greifenden Kompensationsmechanismen ausgegangen werden, die dazu führten, dass eine vollständige finale Leberregeneration nach PHx bis zum ursprünglichen gemessenen präoperativen Lebergewicht (durchschnittlich 5,5% des Körpergewichts einer Maus) erst nach 14 Tagen erreicht werden kann. Somit ist die hier gemessene Regenerationsverzögerung noch gravierender als die im zuvor genannten Beispiel der IL-6 defizienten Mäuse aus der Literatur.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse, dass die zytosolische Nukleinsäureerkennung – vermittelt durch die Signaladaptoren MAVS und STING – für eine effiziente Leberregeneration nach PHx benötigt wird. Fehlt diese, wie bei den MAVS/STING (-/-) Mäusen, ist die Regeneration der Lebermasse deutlich gestört.

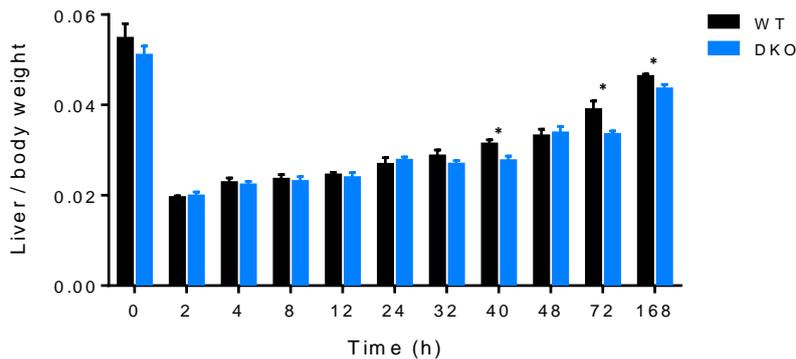


Abb. 6: Gestörte Regeneration der Lebermasse bei CARDIF/STING (-/-) Mäuse nach PHx

Darstellung der regenerierten Lebermasse durch Ermittlung des Verhältnisses von Lebergewicht zu Körpergewicht der einzelnen Tiere zu allen Zeitpunkten nach PHx. ($n \geq 6$ Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe). * $p < 0,05$.

4.2 Verringertes Proliferationsverhalten im defizienten Mausstamm 32h und 40h nach PHx

Nach der 2/3-Hepatektomie beginnt neben einer Zellhyperplasie eine ausgedehnte Proliferation, bei der ca. 95% der Hepatozyten in den Zellzyklus eintreten. Hepatozyten, die sich sonst für gewöhnlich in der G₀-Phase befinden, beginnen diesen erneuten Zyklus einschließlich Mitose mit dem Ziel, das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht wieder auf 100% zu bringen und die Homöostase des Organismus aufrecht zu erhalten (Michalopoulos, 2017; Riehle et al., 2011; Taub, 2004). Um den Wiedereintritt der Hepatozyten in den Zellzyklus zu detektieren, wurde die Eigenschaft von BrdU genutzt, welches als Analogon zu Thymidin bzw. Desoxyuridin während der DNA-Synthese interkaliert wird und anschließend durch immunhistochemische Färbung die S-Phase des Zellzyklus sichtbar macht. In der WT Kohorte zeigt sich eine maximale BrdU-Inkorporation 32h und 40h nach PHx, einem frühen Proliferationspeak entsprechend, der bereits nach 48h absinkt und sich 72h post-PHx noch weiter reduziert (Abb. 7). Die MAVS/STING (-/-) Mäuse hingegen zeigen eine deutlich geringe Zahl an BrdU-positiven Hepatozyten und einen signifikanten Unterschied zur WT Gruppe zu den Zeitpunkten 32h und 40h. Die maximale BrdU-Inkorporation kann bei der KO Kohorte erst 48h nach PHx erreicht werden und zeigt hierbei dennoch eine Abweichung zum Maximum der Proliferationsrate der WT Kontrollgruppe. Nach 72h ist entgegen der Erwartung der Anteil an BrdU positiven Zellen der defizienten Mäuse bereits vergleichbar mit der WT Gruppe. Diese Beobachtungen sprechen für einen quantitativ reduzierten und zeitlich verzögerten Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus nach PHx bei den Hepatozyten, die eine fehlende zytosolische Nukleinsäureerkennung aufweisen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sind konkordant zu den Werten der oben gezeigten

verzögerten Regeneration der Lebermasse und könnten Hinweis darauf sein, dass ein Mechanismus der Proliferationsregulation ursächlich für den beschriebenen Phänotyp sein könnte.

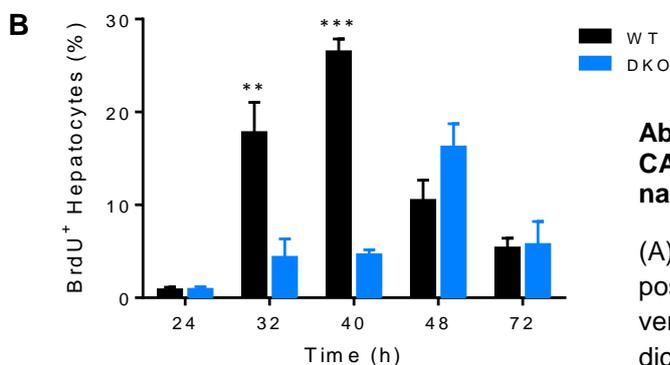
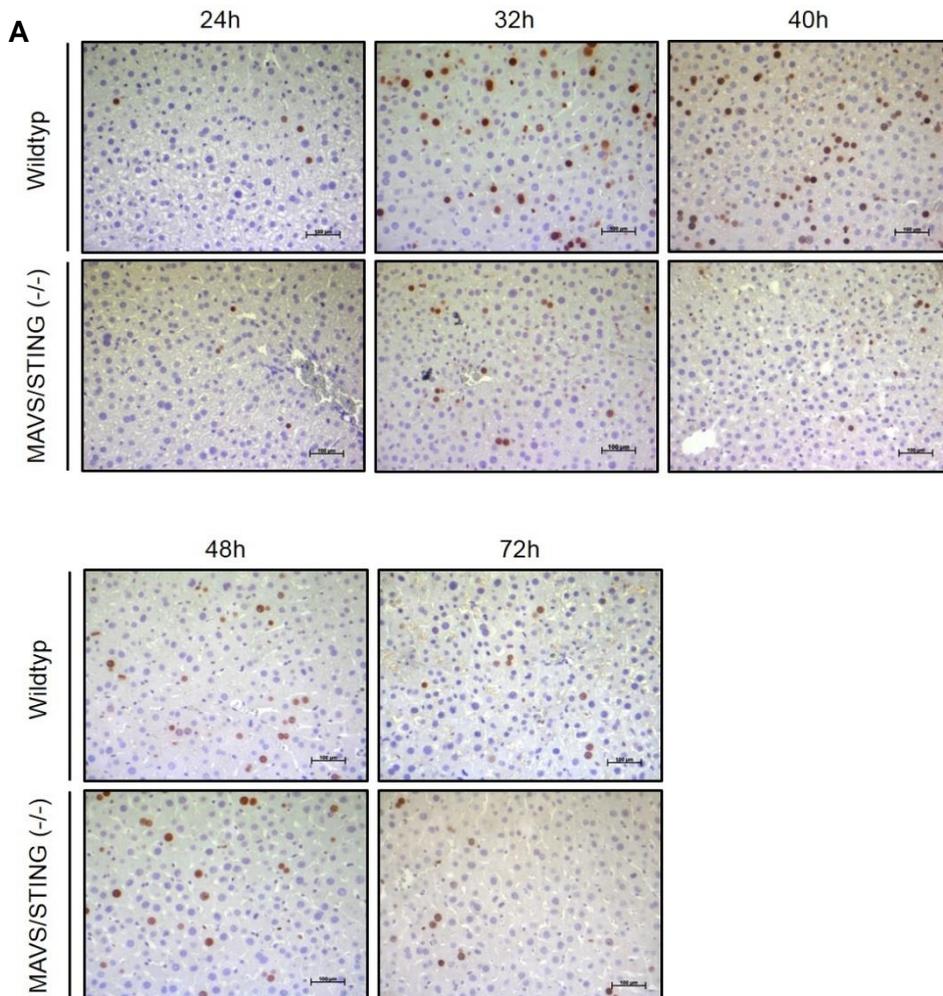


Abb. 7: Verringerte Proliferation bei CARDIF/STING (-/-) Mäuse 32h und 40h nach PHx

(A) Immunhistochemische Detektion von BrdU-positiven Hepatozyten (braune Färbung) zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx an 3μm dicken Paraffinschnitten in 20-facher Vergrößerung.

(B) Darstellung der prozentualen BrdU-Inkorporation durch Auszählung von jeweils fünf repräsentativen Aufnahmen pro Paraffinschnitt und Berechnung der BrdU-positiven Hepatozyten im Verhältnis zur Gesamtzahl an Hepatozyten pro Gesichtsfeld. **p < 0,01 und ***p < 0,001.

4.3 Differentes Expressionsmuster an IL-6 bei unverändertem TNF- α Level im murinen Serum

Als wichtiger pro-regenerativer Faktor und Initiator der Akuten Phase Reaktion in der Leber wird IL-6 von den Kupferzellen produziert und in den ersten Stunden nach PHx, der sog. „priming phase“, als erhöhte Konzentration im Serumlevel exprimiert. Daneben wird auch - als weiteres wichtiges Zytokin in dieser ersten Phase der Regeneration - eine erhöhte TNF-Ausschüttung beschrieben (Fausto et al., 2006; Taub, 2003). Mit der Fragestellung, ob Nukleinsäureerkennung die Leberregeneration via IL-6 und TNF- α Produktion moduliert, wurde die Serumkonzentration dieser Zytokine nach PHx bestimmt (Abb. 8). Die WT Kontrollgruppe zeigt ohne chirurgische Intervention ebenso wie die MAVS/STING (-/-) Mäuse zum 0h Zeitpunkt keine IL-6 Ausschüttung. Dies verdeutlicht eine normale Homöostase im gesunden Organismus und die Tatsache, dass ein akutes Trauma notwendig ist, um eine IL-6 Sekretion zu initiieren. Eine erste und gleichzeitig maximale IL-6 Expression bei den WT Mäusen ist 2h nach PHx mit einem anschließend konstant fallenden Serumspiegel zu erkennen. Dahingegen sind die IL-6 Level im Serum des defizienten Mausstammes 2h sowie 4h nach partieller Hepatektomie signifikant erhöht und weisen ein Maximum an IL-6 Konzentration erst nach 4h auf. Zu späteren Zeitpunkten zeigen beide Gruppen eine vergleichbare IL-6 Expression im murinen Serum. Die erhöhten IL-6 Spiegel bei den KO Tieren gehen entgegen der Erwartung mit einer niedrigeren bzw. verzögerten Proliferationsrate einher (Abb. 7), sodass sich die Frage nach einem inhibierenden Mechanismus in Abwesenheit von MAVS/STING aufwirft, der wiederum eine erhöhte Ausschüttung an pro-proliferativen Zytokinen wie IL-6 erfordert, um die vollständige Leberregeneration zu ermöglichen.

Als Apoptose modulierender Faktor und Aktivator des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt TNF- α eine wichtige Rolle bei der Regulation der Leberregeneration zu (Hatano et al., 2001). Die detektierten TNF Serumspiegel in WT und KO Mäuseseren zeigen eine maximale Expression 4h nach PHx, während davor und danach kaum TNF im Serum nachweisbar ist. Beide Gruppen weisen vergleichbare Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx auf und machen damit eine TNF-abhängige Regulation der Leberregeneration in Abwesenheit der Nukleinsäureerkennung unwahrscheinlich.

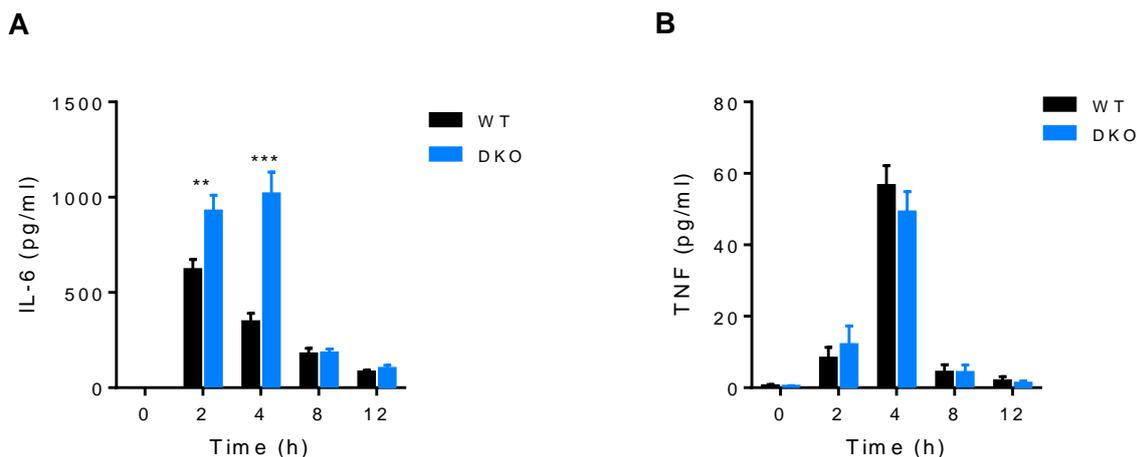


Abb. 8: Erhöhte IL-6 Produktion bei unveränderter TNF- α Expression im murinen Serum in Abwesenheit von MAVS/STING

(A, B) Bestimmung der Serumkonzentrationen von IL-6 und TNF- α zu den frühen Zeitpunkten nach PHx mittels Quantikine® ELISA Mouse IL-6 und Mouse TNF- α Immunoassay-Kit. ($n \geq 6$ Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe). ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

4.4 Induktion von pSTAT3 sowohl in Wildtyp als auch in MAVS/STING (-/-) Mäusen 4h nach PHx

IL-6 wirkt via Rezeptorbindung und gp130 auf Hepatozyten und aktiviert die STAT3- und MAP-Kinase-Signalkaskade, wodurch es nach PHx zu einer Sensibilisierung der Hepatozyten und Initiation der proliferativen Antwort kommt (Fausto et al., 2012; Webber et al., 1998). Um einen ersten Eindruck zu bekommen, ob bei erhöhter IL-6 Expression nach PHx auch eine entsprechende Phosphorylierung von STAT3 zu verzeichnen ist, wurde die Proteinexpression von pSTAT3 in lysiertem Lebergewebe einzelner Tiere zum 0h und 4h Zeitpunkt nach PHx in beiden Gruppen bestimmt (Abb. 9). Mit den Angaben der Literatur vereinbar ist sowohl in WT als auch in MAVS/STING (-/-) Mäusen ein signifikanter Anstieg von pSTAT3 von 0h auf 4h nach PHx zu erkennen. Die untersuchten Proben verhindern allerdings Rückschlüsse auf Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und dem defizienten Mausstamm, da die große Anzahl an Proteinextraktionen nicht auf dem gleichen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden konnten. Daneben sind Aussagen zu zeitlichem Verlauf und Kinetik der pSTAT3 Expression – bei lediglich einem analysierten Zeitpunkt nach PHx - nicht möglich.

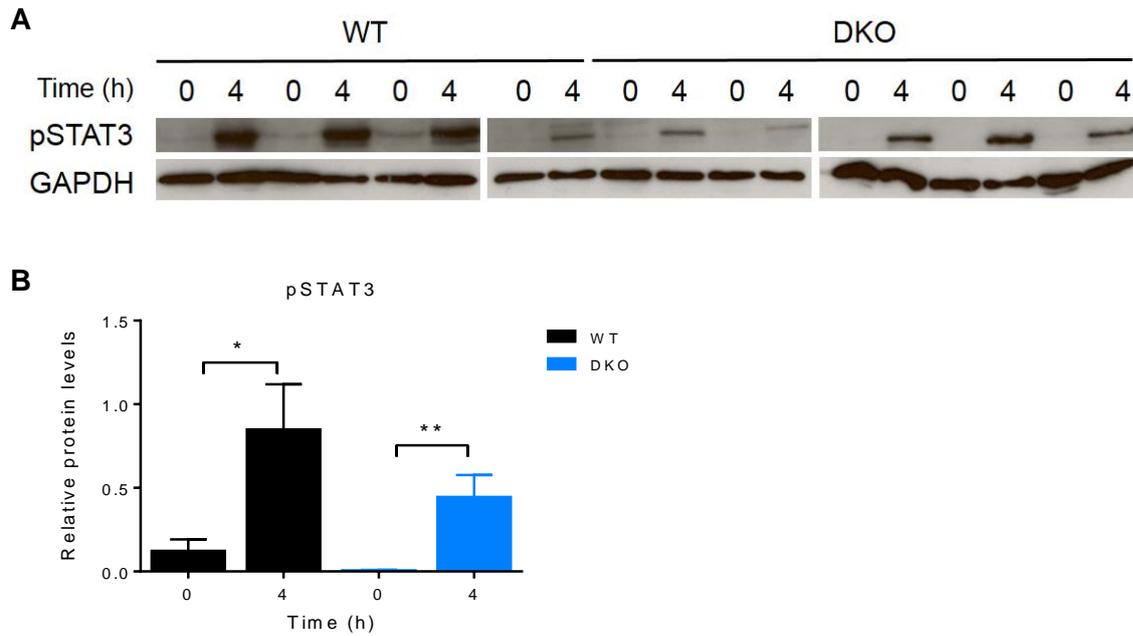


Abb. 9: Induktion von pSTAT3 sowohl in Wildtyp als auch in MAVS/STING (-/-) Mäusen 4h nach PHx

(A) Analysen von pSTAT3 mittels Immunoblot 0h und 4h nach PHx in Wildtyp- und MAVS/STING (-/-) Mäusen bei einer Ladekontrolle mit GAPDH. (B) Verhältnis von pSTAT3 zu GAPDH 0h und 4h nach PHx. (n ≥ 6 Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe). *p < 0,05 und **p < 0,01.

4.5 Erhöhte Expression von pSTAT3 in MAVS/STING (-/-) Tieren 2h nach PHx

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik wurden die Lysate erneut auf SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen, um eine Vergleichbarkeit der beiden Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten zu ermöglichen (Abb. 10). Konkordant zu der erhöhten IL-6 Produktion (Abb. 8) konnte in der KO Gruppe eine signifikant erhöhte Expression von pSTAT3 2h nach PHx gemessen werden (Abb. 10). Im Gegensatz dazu zeigen sich bei unbehandelten Lebern sowie bei WT und MAVS/STING (-/-) Lebern zu späteren Zeitpunkten nach PHx vergleichbare Level von phosphoryliertem STAT3. Somit ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine fehlende zytosolische Nukleinsäuredetektion mit einem transienten IL-6 Anstieg und der konsekutiven pSTAT3 Aktivierung assoziiert ist. Dennoch kann die verzögerte Regeneration der Leber in MAVS/STING (-/-) Mäusen nicht durch diese – in den ersten Stunden nach PHx beobachteten - Ergebnisse erklärt werden.

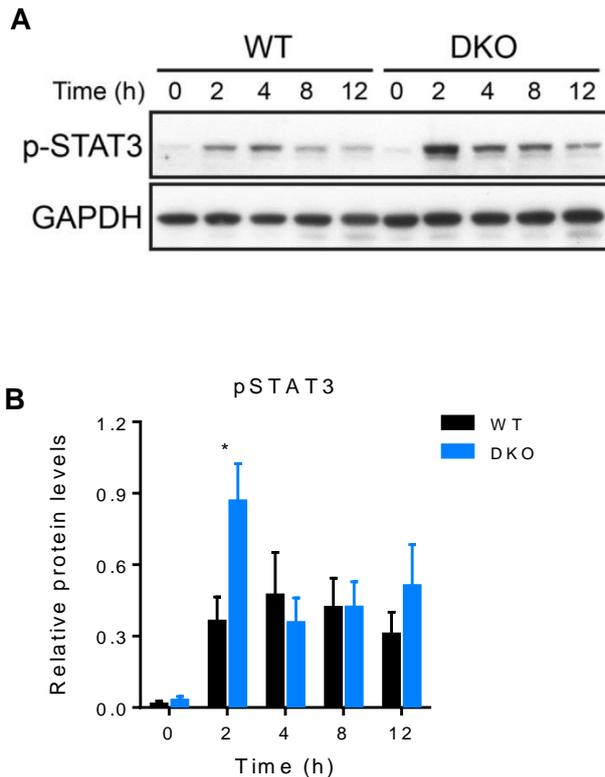


Abb. 10: Signifikant erhöhte Expression von pSTAT3 in MAVS/STING (-/-) Tieren 2h nach PHx

(A) Analysen von pSTAT3 mittels Immunoblot zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx in Wildtyp- und MAVS/STING (-/-) Mäusen bei einer Ladekontrolle mit GAPDH. (B) Verhältnis von pSTAT3 zu GAPDH zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx zum Vergleich der beiden Kohorten. ($n \geq 6$ Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe). * $p < 0,05$.

4.6 Analyse des STAT3-Zielgens und Inhibitor des JAK-STAT Signalwegs: SOCS3 als Inhibitor der Regeneration

Das STAT3-Zielgen SOCS3 wird im Rahmen des JAK-STAT Signalwegs ebenfalls aktiviert und supprimiert die frühe Phase der Leberregeneration im Sinne eines negativen Feedback Loops (Riehle et al., 2008). Die höchste Expression an SOCS3 in der WT Gruppe 4h nach PHx (Abb. 11) geht einher mit der Beobachtung, dass auch pSTAT3 zu diesem Zeitpunkt exprimiert wird. Zu diesem Zeitpunkt ist die SOCS3 Expression an mRNA in den defizienten Mäusen trotz großer SD erkennbar vermindert, während diese nach 8h im Vergleich zur WT Kontrollgruppe signifikant erhöht ist. Folglich ist die SOCS3 Expressionskinetik vergleichbar mit der von STAT3, wodurch eine adäquate STAT3-vermittelte SOCS-Aktivierung naheliegend ist. Eine Aussage bzgl. einer erklärbaren Ursache für die differente IL-6 Produktion oder verzögerte Proliferation lässt sich anhand der beobachteten Negativregulation durch SOCS3 bei lediglich erhöhter Expression von SOCS3 in MAVS/STING (-/-) Mäusen zum 8h Zeitpunkt nicht treffen.

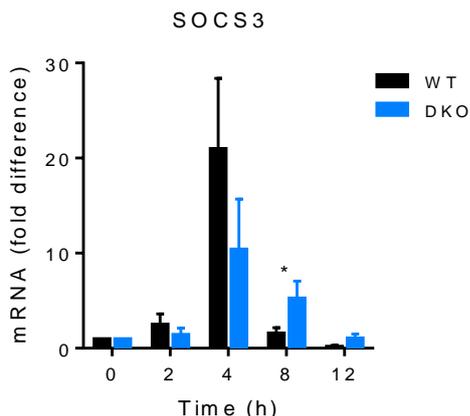


Abb. 11: Verminderte mRNA Expression an SOCS3 4h nach PHx bei wiederum signifikant erhöhter Expression zum 8h Zeitpunkt

Analyse der Genexpression von SOCS3 im Lebergewebe mittels quantitativer Echtzeit-PCR und dem Referenzgen β -Actin nach erfolgter RNA-Isolierung und anschließender cDNA-Synthese. Darstellung der sog. „Fold Difference“ als Verhältnis aus Genexpression zum spezifischen Zeitpunkt nach PHx zur jeweiligen Genexpression zum 0h Zeitpunkt. (n \geq 6 Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe). *p < 0,05.

4.7 Abnahme der Expression von pERK1/2 gleichermaßen in der Wildtyp- und MAVS/STING (-/-) Kohorte zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx

Nach der ersten „priming phase“, in welcher den oben beschriebenen IL-6 und TNF Signalwegen eine Bedeutung bei der Transition der Hepatozyten von G0 zu G1 zukommt, folgt die, durch EGF-Liganden wie HGF, regulierte Hepatozytenproliferation. Der Tyrosinkinase-Rezeptor MET wird durch HGF aktiviert und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung von adhärennten Zellverbindungen, Stimulation der zellulären Motilität, Überleben, Proliferation und Morphogenese, indem er den Ras-ERK MAP Kinase Signalweg stimuliert (Guegan et al., 2012; Rosario & Birchmeier, 2003). Mit der Fragestellung nach einer MAVS/STING abhängigen Aktivierung des Ras-ERK MAP Kinase Signalwegs wurde die pERK1/2 Expression nach Proteinextraktion aus Lebergewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx analysiert (Abb. 12). Während zum 0h Zeitpunkt ohne Intervention bereits ein relativ starkes Signal beobachtet werden kann, zeigt sich zu den Zeitpunkten 2h, 4h und 8h eine Abnahme der Expression von pERK1/2 gleichermaßen in Wildtyp und MAVS/STING (-/-) Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx. Unabhängig von der Nukleinsäureerkennung scheint es im Rahmen der Proliferationsinitiation nicht zu einer vermehrten Aktivierung von ERK zu kommen.

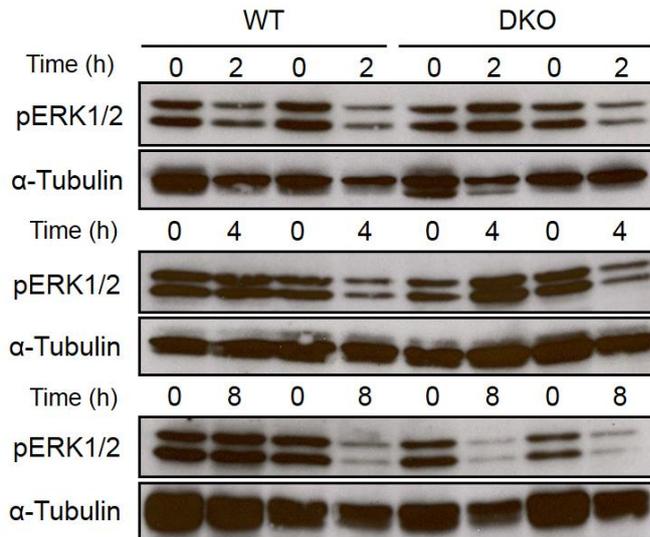


Abb. 12: Verminderte Expression von pERK1/2 gleichermaßen in Wildtyp und MAVS/STING (-/-) Kohorte zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx

Analyse von pERK1/2 mittels Immunoblot 0h, 2h, 4h und 8h nach PHx in Wildtyp- und MAVS/STING (-/-) Mäusen bei einer Ladekontrolle mit α -Tubulin.

4.8 Unveränderte Proteinexpression von TRAF5 4h nach PHx

Als Inhibitor des IL-6 Rezeptor Signalwegs wird der TNF-Rezeptor assoziierte Faktor TRAF5 beschrieben. Nach Bindung von IL-6 unterdrückt er die Rekrutierung und Aktivierung von STAT3 (Nagashima et al., 2014). Um seine mögliche Rolle als anti-proliferativer Faktor und einen möglichen Zusammenhang zu MAVS/STING Signalwegen zu untersuchen, wurde die TRAF5 Proteinexpression 0h und 4h nach PHx in Leberlysaten bestimmt (Abb. 13). Es zeigt sich sowohl im ursprünglichen Gewebe als auch 4h nach chirurgischer Intervention keine Änderung der TRAF5 Expression bei WT als auch KO Mäusen. Die Ergebnisse sprechen bei gemessener IL-6 Expression im Serum für eine ausbleibende TRAF5 Aktivierung im in situ verbleibenden Lebergewebe. Bei fehlender Aktivierung durch partielle Hepatektomie ist auch die vergleichbare Expression zum 4h Zeitpunkt zwischen Kontrollgruppe und defizienten Mäusen nachvollziehbar. Eine grundsätzlich differente TRAF5 Expression, erklärbar durch Abwesenheit der Nukleinsäureerkennung, konnte nicht beobachtet werden.

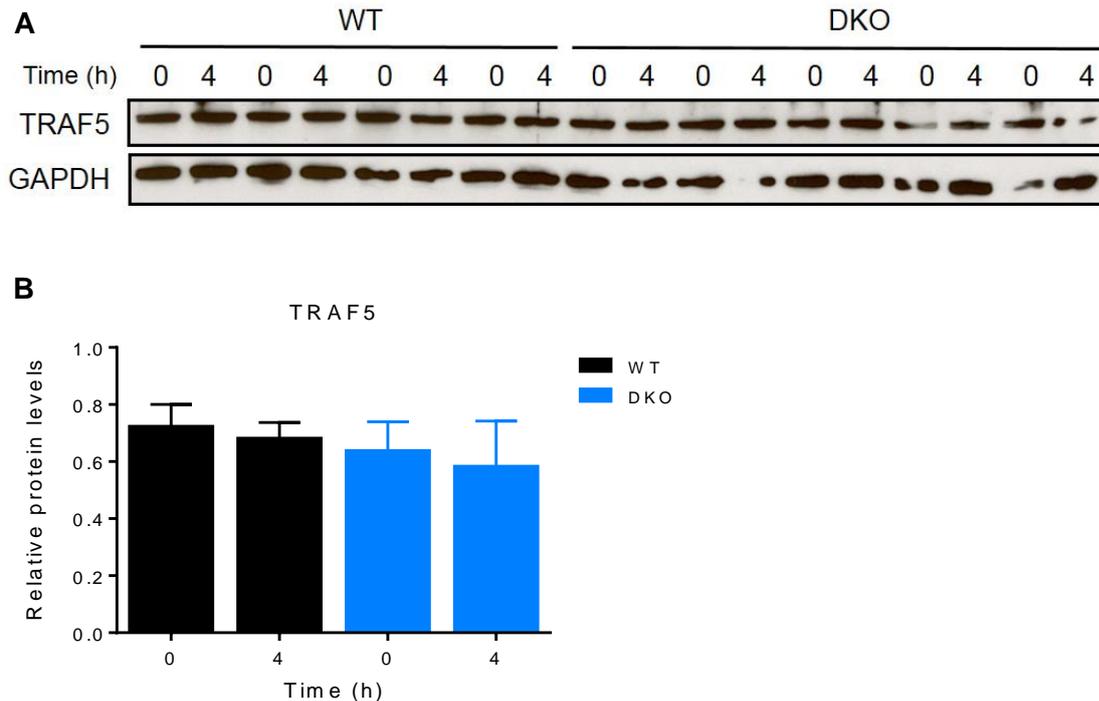


Abb. 13: Unveränderte Proteinexpression von TRAF5 4h nach PHx in WT und KO Mäusen

Analyse von TRAF5 mittels Immunoblot 0h und 4h nach PHx in Wildtyp- und MAVS/STING (-/-) Mäusen bei einer Ladekontrolle mit GAPDH. (n ≥ 4 Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe).

4.9 Zu Serumspiegeln äquivalente IL-6 Genexpression bei vergleichbar exprimierten IL-6 Rezeptoren

Um die Ergebnisse der IL-6 Serumkonzentration nach PHx zu verifizieren, wurde die Genexpression von IL-6 via mRNA aus Lebergewebe gemessen (Abb. 14). In der MAVS/STING (-/-) Kohorte zeigt sich 2h nach PHx eine zum Serumspiegel äquivalent erhöhte IL-6 Genexpression. Während IL-6 im Serum 4h nach PHx immer noch signifikant erhöht ist (Abb. 8), ist die Tendenz der mRNA Expression zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich rückläufig. Die WT Genexpression an IL-6 ist insgesamt niedriger und zeigt nach einem minimalen Peak 2h nach PHx zu späteren Zeitpunkten ebenso wie die Proteinexpression im Serum keinen weiteren Anstieg.

Einige ausgewählte Zellen wie Hepatozyten und Leukozyten exprimieren den membrangebundenen IL-6 Rezeptor, über dessen Bindung IL-6 die Signalweitergabe via gp130 einleiten kann. Andere Zellen benötigen den sog. „IL-6 trans-signaling“ Mechanismus, bei dem eine abgespaltene und lösliche Form des IL-6-R mit gp130 interagiert und so auch den Zellen ohne membrangebundenen IL-6-R eine sofortige Reaktion auf das Zytokin IL-6 ermöglicht (Schmidt-Arras & Rose-John, 2016). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass IL-

6 nach PHx einerseits im Serum in MAVS/STING (-/-) Mäusen hoch exprimiert sein kann und dennoch eine proliferative Stimulation ausbleibt, da andererseits mögliche Zielrezeptoren nur in geringerem Maß in den defizienten Lebern exprimiert sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurde die Genexpression von gp130 bestimmt und damit einschließlich der „IL-6 trans-signaling“ Mechanismus erfasst sowie die Genexpression des membrangebundenen IL-6 Rezeptors gemessen (Abb. 14). Es zeigt sich bei beiden Rezeptorgenmessungen in beiden Kohorten eine vergleichbare Konzentration an mRNA. Lediglich 12h nach PHx ist in der KO Gruppe eine signifikant erhöhte Genexpression des membrangebundenen IL-6-R zu verzeichnen, die zuvor 2h bis 8h nach PHx der WT Genexpression hinterher zu hängen scheint. Diese Beobachtungen erlauben wiederum keine weiteren Schlussfolgerungen.

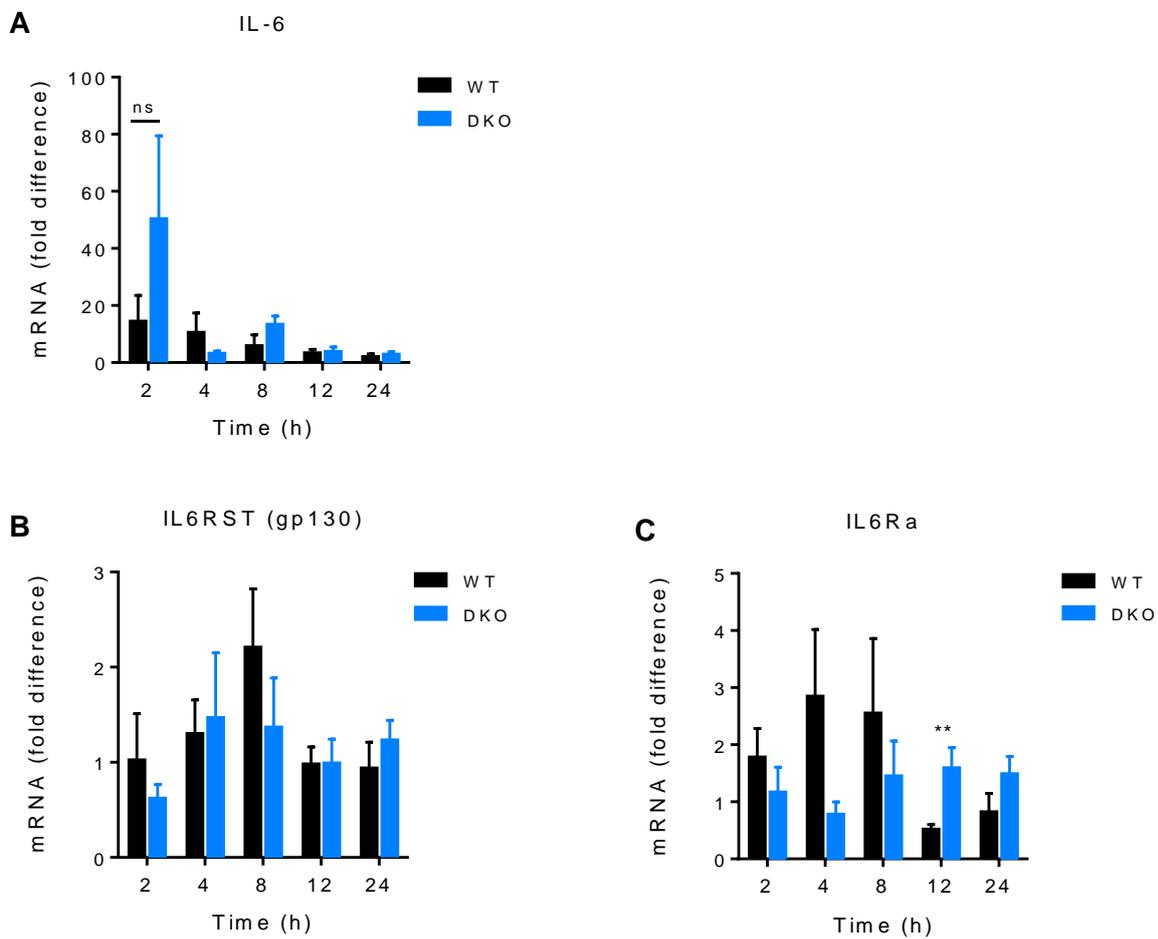


Abb. 14: Zu Serumspiegeln äquivalente IL-6 Genexpression bei vergleichbar exprimierten IL-6 Rezeptoren

(A-C) Analysen der Genexpression von IL-6 sowie der Rezeptoren gp130 und des membrangebundenen IL-6-R im Lebergewebe mittels quantitativer Echtzeit-PCR und dem Referenzgen β -Actin nach erfolgter RNA-Isolierung und anschließender cDNA-Synthese. Darstellung der sog. „Fold Difference“ als Verhältnis aus Genexpression zum spezifischen Zeitpunkt nach PHx zur jeweiligen Genexpression zum 0h Zeitpunkt. ($n \geq 6$ Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe). ** $p < 0,01$.

4.10 Analyse der Proliferationsmarker c-Myc und Cyclin D1 zu frühen Zeitpunkten nach PHx

Mit seiner Hauptaufgabe, das Fortschreiten des Zellzyklus zu unterstützen, hat der Transkriptionsfaktor c-Myc eine wichtige Rolle bei Zellwachstum, Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Stimulation der Mitose bei ruhenden Zellen ruft eine c-Myc Expression hervor, woraus eine Induktion von G1-spezifischen Cyclin-abhängigen Kinasen resultiert (Nevzorova et al., 2013). Neben c-Myc ist Cyclin D1 neben weiteren Holoenzymkomplexen, bestehend aus Cyclinen vom Typ D und E und ihren Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), ein weiterer relevanter Proliferationsmarker, indem er die Progression durch die G1-Phase unterstützt (Nelsen et al., 2001). Um Mechanismen zu beleuchten, die ursächlich für einen verzögerten Eintritt der Hepatozyten der KO Mäuse in den Zellzyklus sein könnten, wurde die Genexpression von c-Myc und Cyclin D1 gemessen (Abb. 15). Zu den frühen Zeitpunkten 2h bis 24h nach PHx zeigt sich insgesamt kein signifikanter Unterschied bei der Expression der gemessenen Gene. Eine starke Expression an c-Myc ist sowohl bei WT Mäusen als auch bei den defizienten Tieren 2h, 4h und 8h nach PHx zu erkennen, die jedoch nach 12h absinkt. Dahingegen scheint die Cyclin D1 Genexpression erst im Verlauf zuzunehmen. Sowohl bei der WT Kontrollgruppe als auch bei der defizienten Mausgruppe zeigen sich zwischen 2h und 12h nach PHx vergleichbare Werte sowie eine anschließende Zunahme der Cyclin D1 Expression nach 24h. Obwohl diese maximale Genexpression bei KO Tieren nicht signifikant abweicht, wirft sie die Frage auf, ob die Proteinexpressionen an Cyclinen und ihren CDKs zu späteren Zeitpunkten different sind.

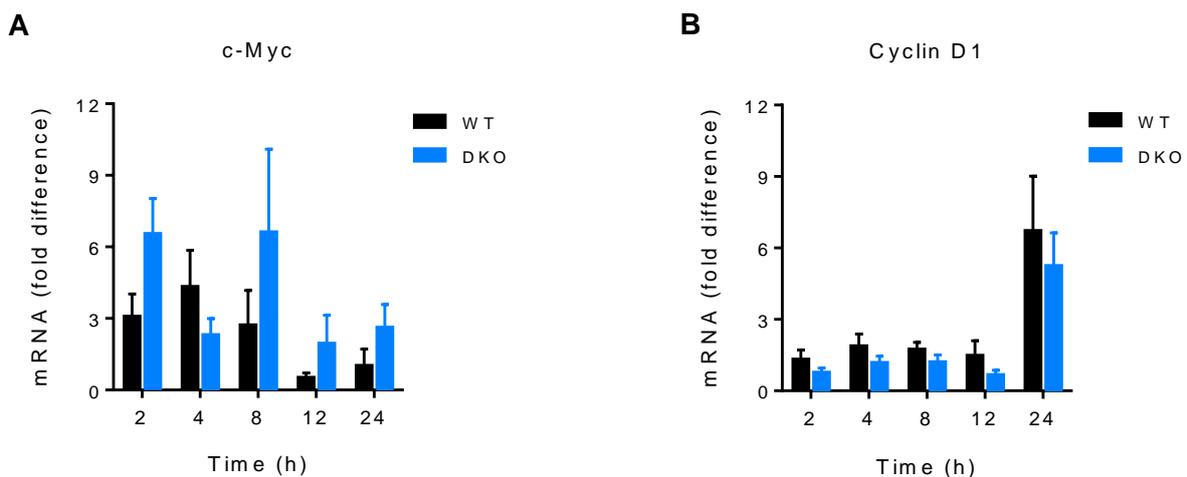


Abb. 15: Vergleichbare c-Myc Expression bei erhöhter Cyclin D1 Expression 24h nach PHx in Kontrolltieren und defizienten Mäusen

(A, B) Analyse der Genexpression von c-Myc und Cyclin D1 im Lebergewebe mittels quantitativer

Synthese. Darstellung der sog. „Fold Difference“ als Verhältnis aus Genexpression zum spezifischen Zeitpunkt nach PHx zur jeweiligen Genexpression zum 0h Zeitpunkt. ($n \geq 6$ Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe).

4.11 Analyse der zellzyklusregulierenden Proteine Cyclin D1, E1, p-RB, p-CDK2 und CDK1

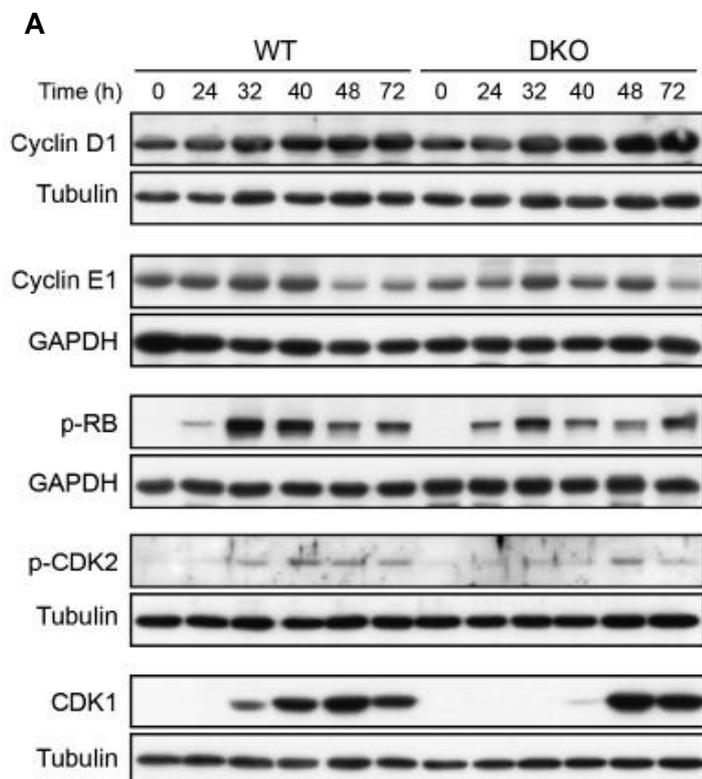
Um zu überprüfen, ob zellzyklusregulierende Proteine erst zu Zeitpunkten $> 24h$ in ihrer Expression bei Abwesenheit von MAVS/STING different zur WT Expression sind, wurden die Proteine Cyclin D1, E1, p-RB, p-CDK2 und CDK1 mittels Immunoblotting detektiert (Abb. 16). Cyclin D1 Proteinlevel zeigen eine Zunahme von 24h bis 72h nach partieller Hepatektomie, aber weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und KO Mäusen auf. Cyclin E1 Proteinlevel haben ein Maximum bei 32h nach PHx, sind aber zu allen Zeitpunkten vergleichbar zwischen WT und KO Tieren. Folglich scheint die zytosolische Nukleinsäureerkennung die Hochregulation von Cyclinen der G1-Phase nicht zu beeinflussen.

Die Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins RB durch Hyperphosphorylierung ist essentiell für das Durchlaufen des Zellzyklus am Übergang der G1- zur S-Phase. Als universaler Regulator des Zellzyklus führt der Verlust des RB Proteins zu unkontrollierter Zellteilung, übermäßiger Proliferation und verstärktem Tumorwachstum (Dick & Rubin, 2013). In WT Lebern zeigt sich die erste maximale Proteinexpression des phosphorylierten RBs 32h nach PHx (Abb. 15). Auch zu späteren Zeitpunkten waren die p-RB Level in der WT Gruppe so hoch, dass von anhaltender Stimulation der Passage von G1- zu S-Phase ausgegangen werden kann. Dahingegen war die Phosphorylierung des RB Proteins in Lebern der KO Mäuse mit signifikantem Unterschied bei 32h und 40h deutlich eingeschränkt. Bei den späten Zeitpunkten 48h und 72h konnten vergleichbare p-RB Proteinexpressionen in WT und KO Tieren gemessen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Abwesenheit von MAVS und STING zu einer erheblichen Abnahme der Hyperphosphorylierung des RB Proteins führt.

Die Phosphorylierung und Inaktivierung des RB Proteins erfolgt durch verschiedene CDKs, zu denen auch CDK2 zählt, welche erst nach CDK4/6 in der G1-Phase aktiv wird und durch Hyperphosphorylierung zur Aufhebung des Zellteilungsarrests beiträgt (Dick & Rubin, 2013; Harbour et al., 1999). Passend zu den Ergebnissen der RB-Phosphorylierung ist auch die Phosphorylierung von CDK2 (Thr160) 32h und 40h nach PHx in der WT Gruppe deutlich erhöht, während sie in KO Mäusen signifikant vermindert ist (Abb. 15). Zu späteren

Zeitpunkten zeigen WT und MAVS/STING (-/-) Mäuse eine vergleichbare CDK2-Phosphorylierung. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivierung von p-CDK2 in Abwesenheit der Nukleinsäureerkennung deutlich eingeschränkt ist.

Auch CDK1, die das Durchlaufen des Zellzyklus in die M-Phase fördert, wird in MAVS/STING (-/-) Mäusen deutlich verzögert hochreguliert (Abb. 15). 32h und 40 h nach PHx ist die CDK1 Proteinexpression in KO Mäusen signifikant verringert, während sie zu späteren Zeitpunkten vergleichbar mit der Proteinexpression der WT Kohorte ist. Den Ergebnissen nach ist eine Nukleinsäureerkennung, vermittelt durch die Signaladapterproteine MAVS und STING, notwendig für ein normales Durchlaufen der Hepatozyten durch den Zellzyklus bis zur Mitose nach partieller Hepatektomie.



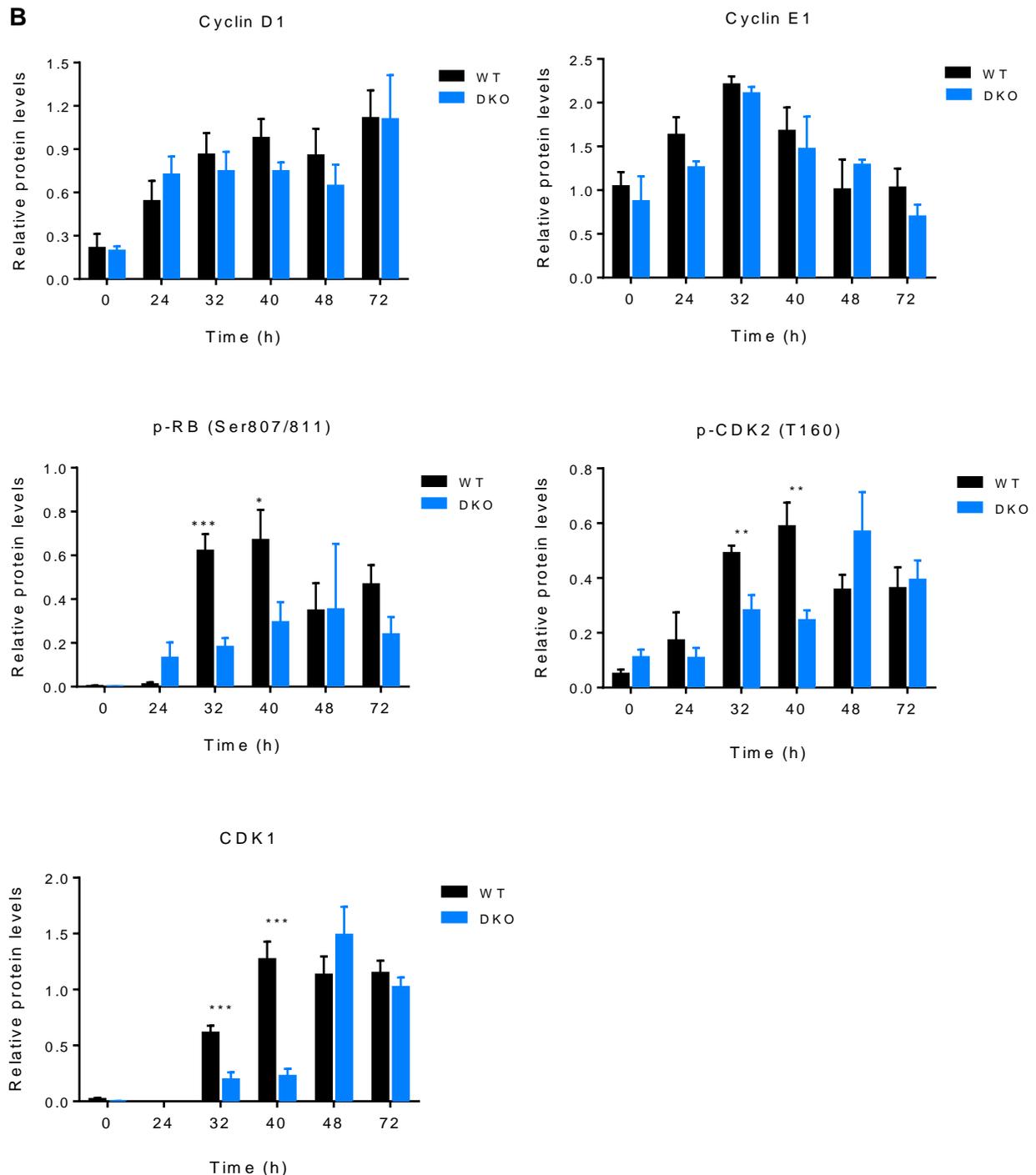


Abb. 16: Vergleichbare Cyclin D1 und E1 Proteinlevel bei signifikant abweichender Expression von p-RB, p-CDK2 und CDK1 32h und 40h nach PHx

(A) Analyse von Cyclin D1, E1, p-RB, p-CDK2 und CDK1 mittels Immunoblot 0h, 24h, 32h, 40h, 48h und 72h nach PHx in Wildtyp- und MAVS/STING (-/-) Mäusen bei einer Ladekontrolle mit Tubulin und GAPDH. (B) Verhältnis von Cyclin D1, E1, p-RB, p-CDK2 und CDK1 zur jeweiligen Ladekontrolle zum Vergleich der Expression bei WT und KO 0h, 24h, 32h, 40h, 48h und 72h nach PHx. (n ≥ 4 Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

4.12 p21^{Cip1} als Marker für den Zellzyklusarrest

Bei Überexpression von Cyclin D1 wird der anti-proliferative Faktor p21^{Cip1}, auch CDK-Inhibitor 1 genannt, für eine Beendigung der Proliferation induziert. Ihm wird auch eine wichtige Rolle als potenter Inhibitor der CDK2 Aktivität zugesprochen, indem er in die aktivierende Phosphorylierung von CDK1 und CDK2 eingreift (T. Abbas & Dutta, 2009; Nelsen et al., 2001). Daher wurde untersucht, ob zytosolische Nukleinsäureerkennung durch MAVS und STING zur Beeinflussung der p21^{Cip1} Genexpression während der Leberregeneration führt. Es zeigt sich in der WT Gruppe eine verhältnismäßig konstante p21^{Cip1} Genexpression zu allen Zeitpunkten (Abb. 17). Dahingegen fällt bei der MAVS/STING (-/-) Kohorte 8h nach PHx eine signifikant erhöhte p21^{Cip1} Expression auf. Auch zu den Zeitpunkten 40h und 72h nach PHx – dieselben Zeitpunkte, bei denen auch der Leber/Gewichts-Quotient signifikant abweicht – ist p21^{Cip1} bei der KO Kohorte im Vergleich zur Expression in den WT Mäusen signifikant erhöht. Dahingegen weisen die WT Mäuse eine insgesamt deutlich geringere p21^{Cip1} Expression auf. Die Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass die Signaladapter MAVS und STING von Bedeutung für eine Unterdrückung des CDK Inhibitors p21^{Cip1} sind und es in ihrer Abwesenheit zu einer p21-vermittelten Zellzyklusinhibition kommt.

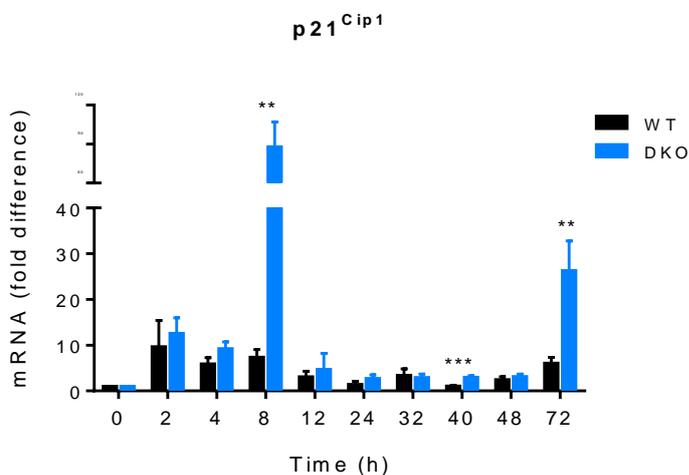


Abb. 17: Assoziation von MAVS/STING Defizienz mit erhöhter Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1}

Analysen der Genexpression von p21^{Cip1} im Lebergewebe mittels quantitativer Echtzeit-PCR und dem Referenzgen β -Actin nach erfolgter RNA-Isolierung und anschließender cDNA-Synthese. Darstellung der sog. „Fold Difference“ als Verhältnis aus Genexpression zum spezifischen Zeitpunkt nach PHx zur jeweiligen Genexpression zum 0h Zeitpunkt. (n \geq 6 Mäuse pro Zeitpunkt in jeder Gruppe). **p < 0,01, ***p < 0,001.

5 Diskussion

Zytosolische Nukleinsäureerkennung durch das innate Immunsystem ist ein zentrales Element der antimikrobiellen Abwehr, jedoch können endogene Moleküle, die im Rahmen von Gewebe- oder Zellschaden freigesetzt werden, auch zu einer Inflammation führen. Dies geschieht, indem die gleichen PRRs aktiviert werden, die auch für die Erkennung von exogenen Strukturen verantwortlich sind. Inflammatorische Antworten ungleich welcher Ursache führen zur Freisetzung von zellulären Fragmenten, die DNA und RNA enthalten. Da der grundlegende genetische Code von eukaryotischen und prokaryotischen Nukleinsäuren identisch ist, ist die Unterscheidung des vorliegenden Genmaterials von eigen zu fremd eine entsprechende Herausforderung für die Immunzellen. In den meisten Fällen führt die Reaktion der Sensoren auf die Nukleinsäuren, unabhängig von ihrem Ursprung, zu der gleichen Antwort. Ist die Exposition gegenüber Nukleinsäuren exzessiv oder die Antwort auf diese nur gering reguliert, resultiert eine erhöhte innate Immunreaktion, die autoimmune und autoinflammatorische Krankheiten begünstigt (Barrat et al., 2016; Roers et al., 2016). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Eigen-DNA, die aus dem Zellkern der Wirtszelle ausgetreten ist – nach Zellteilung oder im Rahmen von DNA Schädigung - als Aktivator des STING-Signalwegs fungieren kann und verantwortlich für die Verursachung einer Vielzahl von autoimmunen Erkrankungen wie Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) oder Aicardi-Goutières Syndrom (AGS) sein kann. Darüberhinaus können chronische Entzündungssignale STING-assoziierte schwere, sich bereits in der Kindheit manifestierende, inflammatorische Vaskulopathien verursachen. Die Untersuchung von Malignomen in murinen Modellen zeigte, dass dauerhafte Inflammation durch Zytokin-, Chemokin- und Wachstumsfaktorfreisetzung auch zur Tumorentwicklung beiträgt, indem zelluläre Proliferation, Überleben und Angiogenese stimuliert werden. Hierbei wird dem STING Signalweg sowohl eine protektive Rolle zugesprochen, als auch eine Funktion als Risikofaktor für Malignome. Er schützt einerseits durch Unterstützung der anti-tumorösen Immunantwort Zellen vor einer Vielzahl von Pathogenen und der Krebsentstehung, da sich bei STING-defizienten Mäusen eine Anfälligkeit für Kolitis-assoziierte Karzinogenese zeigte. Andererseits konnte eine Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischer Karzinogen-induzierter Polypenformation der Haut verzeichnet und eine positive Beeinflussung von entzündungs-assoziierten Malignomen gezeigt werden (Barber, 2015; Nowarski et al., 2013).

Die vorliegende Arbeit liefert den Nachweis, dass die zytosolische Nukleinsäuresensoren des innaten Immunsystems eine wichtige und bis dato unbekannte Rolle in der Leberregeneration spielen. Die Analyse von Mäusen mit kombiniertem Knockout der Adapterproteine MAVS und STING in einem standardisierten Model der 2/3-Hepatektomie

demonstriert, dass die zytosolische Nukleinsäureerkennung und ihre Signalwege für eine normale hepatozytäre Zellzyklusprogression und effiziente Wiederherstellung der Organmasse im Rahmen der Leberregeneration benötigt werden.

Die Regeneration der Lebermasse erfordert nach partieller Hepatektomie eine extensive und koordinierte Proliferation der Hepatozyten. Wie in diesem Projekt gezeigt werden konnte, ist diese nur bei gleichzeitig vorhandener zytosolischer Nukleinsäureerkennung möglich, da Mäuse ohne die Signaladapter MAVS und STING keine - mit der Wildtyp Proliferation vergleichbar - effiziente Leberregeneration bei deutlich verminderten Werten für den Leber/Gewichts-Quotienten nach PHx aufweisen. Eine Erklärung für diese mangelhafte Regeneration in Abwesenheit der zytosolischen Nukleinsäureerkennung stellt der verzögerte Eintritt der Hepatozyten in die S-Phase des Zellzyklus dar. Dieser konnte durch Analysen der bei MAVS/STING-defizienten Hepatozyten als signifikant reduzierte BrdU Inkorporation und somit nicht ablaufende S-Phase 32h und 40h nach Leberteilentfernung detektiert werden. Ohne vollständig ablaufenden Zellzyklus in einer ausreichenden Anzahl an Hepatozyten kann eine ausreichende Wiederherstellung der Organmasse in KO Mäusen nicht gewährleistet werden. Passend zu diesen Ergebnissen konnte eine hochregulierte CDK1 Proteinexpression, die als Marker für die Transition von der S- zur M-Phase des Zellzyklus gewertet werden kann, nur in Wildtyp Mäusen gemessen werden. In Abwesenheit von MAVS/STING hingegen ist eine signifikant verminderte CDK1 Expression 32h und 40h nach PHx – konkordant zu den Zeitpunkten, bei denen auch BrdU Level reduziert sind – gemessen worden.

Im Gegensatz zu BrdU Aufnahme und CDK1 Induktion ist die Proteinexpression der Cycline D1 und E1, die während der G1-Phase des Zellzyklus aktiviert sind, nicht erniedrigt in KO Mäusen. Die Ergebnisse bringen die Idee hervor, dass KO Hepatozyten zwar in die G1-Phase eintreten, aber ihre Fähigkeit, den Zellzyklus bis zur S-Phase zu durchlaufen, beeinträchtigt ist. Diese vermutliche Einschränkung muss durch einen Mechanismus hervorgerufen werden, der einerseits die G1-Phase nicht hinderlich beeinflusst und andererseits den Durchlauf der S-Phase so blockiert, dass eine DNA Replikation nicht beginnen oder vollständig durchgeführt werden kann. Ein Regulator der Zellteilung ist das Tumorsuppressorprotein RB, dessen Hyperphosphorylierung durch Cyclin/CDK Komplexe der G1-Phase bedeutsam ist für die Transition von der G1- zur S-Phase (Dick & Rubin, 2013). Ist RB aktiv in hypophosphoryliertem Zustand, bleibt eine Konformationsänderung aus und RB bindet weiterhin den Transkriptionsfaktor E2F, weshalb keine Gene für die S-Phase transkribiert werden können. Wird das RB-Protein jedoch phosphoryliert, kommt es zur Umstrukturierung von Chromatin, vermehrten Expression von Cyclin E und zur Aktivierung

der CDK2 in der späten G1-Phase. Cyclin E und CDK2 wiederum überführen RB in den erwähnten hyperphosphorylierten Status, sodass sich die Bindung von RB an E2F löst und die Transkription der S-Phase Proteine beginnen kann (Rassow et al., 2012). In diesem Zusammenhang ist die Erkenntnis von großer Bedeutung, dass sowohl Hyperphosphorylierung von RB als auch aktivierende Phosphorylierung von CDK2 (Thr160) in den Lebern der KO Mäuse signifikant reduziert sind. Diese Resultate bekräftigen die Überzeugung, dass eine beeinträchtigte hepatozytäre Zellzyklusprogression nach partieller Hepatektomie in MAVS/STING (-/-) Mäusen gekoppelt ist an Aktivierungsdefekte des Cyclin E/CDK2-Komplexes. Bei ausbleibender Funktion des Cyclin E/CDK2-Komplexes kommt es wiederum nicht zur Hyperphosphorylierung des RB Proteins und somit zu einer ausbleibenden DNA Replikation bei inhibierter S-Phase in den defizienten Mäusen. Daraus entsteht die Schlussfolgerung, dass die Abwesenheit der zytosolische Nukleinsäureerkennung ursprünglich sein muss für die Abnahme der Hyperphosphorylierung des RB Proteins.

Schon in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass p21, als Zellzyklus- und CDK-Inhibitor in eukaryotischen Zellen, während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie hochreguliert wird (Albrecht et al., 1997). Beschrieben wurde ein erster Peak an p21 Genexpression zwischen 6h und 24h sowie ein später zweiter Peak 48h bis 96h nach PHx bei nahezu fehlendem Nachweis von p21 mRNA bei 30h bis 36h. Zeitlich gesehen entspricht dieses bi-phasische Profil einer ersten p21 Zunahme während der frühen G1-Phase, gefolgt von einem Rückgang in der späten G1- und S-Phase bis hin zu einer zweiten Zunahme von p21 nach bereits durchlaufener DNA Synthese der Hepatozyten. Diese zwei beschriebenen p21 Maxima in der frühen G1- und nach abgeschlossener S-Phase wurden hauptsächlich durch erhöhte mRNA Stabilität erklärt. Kurze Zeit später wurden Ergebnisse veröffentlicht, die zeigten, dass p21 mit CDK2, CDK4 und Cyclin D1 in der sich regenerierenden Leber immunopräzipitiert und die Kinaseaktivität nach PHx zeitgleich mit der maximalen DNA Synthese hochreguliert war (Albrecht et al., 1998). Genetische Ablation von p21 führte zu beschleunigter Progression der Hepatozyten durch die G1-Phase nach PHx und phosphoryliertes RB konnte zeitlich früher detektiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gehen einher mit den zuvor beschriebenen Erkenntnissen und zeigen darüber hinaus eine signifikant erhöhte Expression von p21 in Abwesenheit von MAVS und STING 8h sowie 40h und 72h nach PHx. Somit können zytosolische Nukleinsäuresensoren und ihre Signalwege als neuartige Regulatoren der p21 Expression während der Leberregeneration beschrieben werden. Zudem konnte beobachtet werden, dass erhöhte p21 Expression in KO Mäusen zeitlich mit der reduzierten Leber/Gewichts-Quotientenmessung 40h und 72h nach PHx zusammenfällt. Da p21 als Inhibitor der Cycline

und ihrer CDKs die Zellzyklusprogression beeinträchtigt, scheint seine erhöhte Expression in MAVS/STING (-/-) Mäusen die verminderte Regeneration der Organmasse zu erklären. Zusammenfassend wird p21 nicht nur durch den alleinigen Reiz der partiellen Hepatektomie induziert, sondern die Abwesenheit der zytosolischen Nukleinsäureerkennung triggert ebenfalls die Expression von p21 in einem solchen Maße, dass die Kapazität der Leberregeneration nach PHx deutlich eingeschränkt wird (Abb. 18).

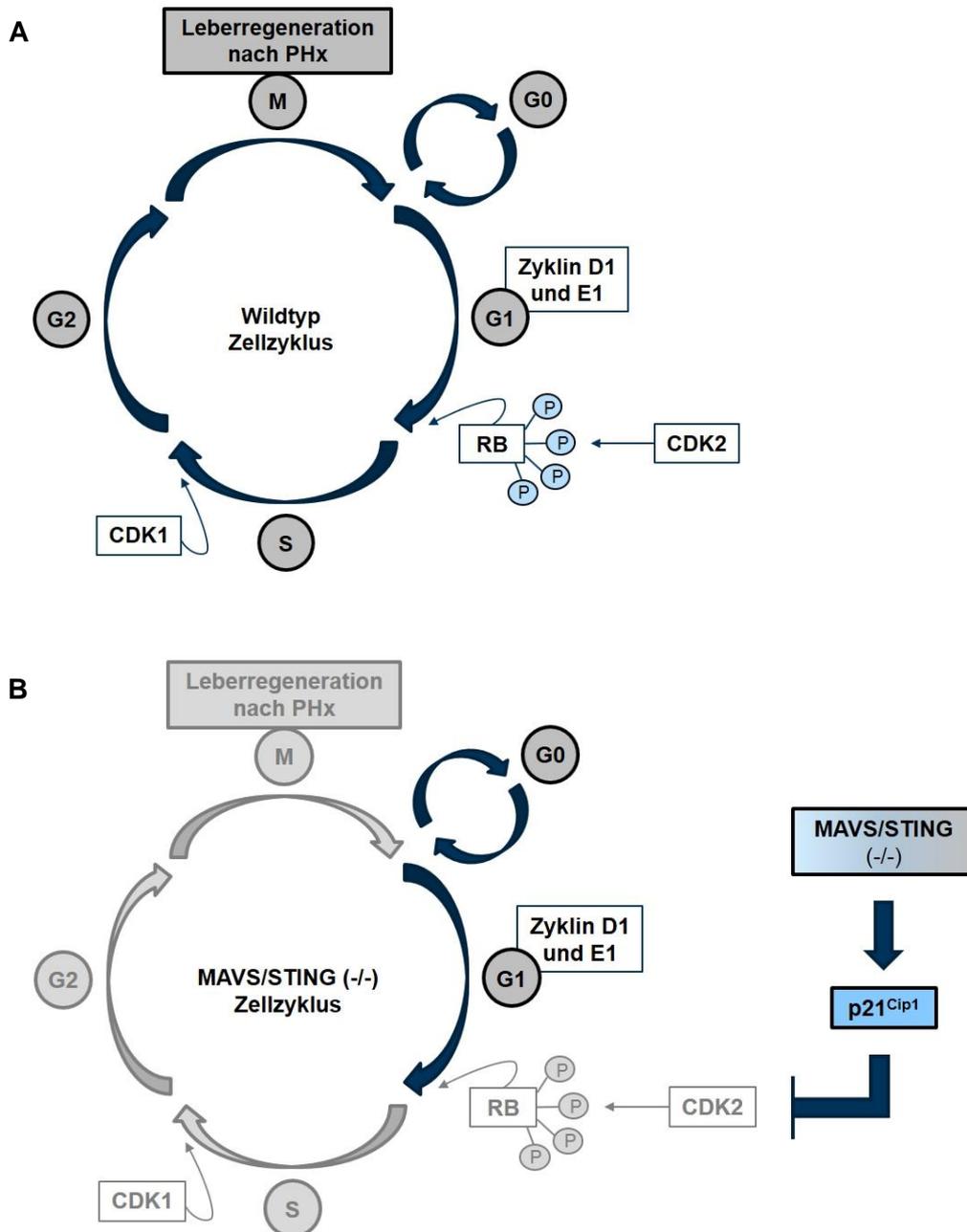


Abb. 18: Modell der Zellzyklusregulation in Wildtyp und MAVS/STING (-/-) Mäusen

(A) Zellzyklusregulation in WT Mäusen unter physiologischen Bedingungen. (B) In Abwesenheit von MAVS/STING wird die Expression von p21 getriggert, sodass es zu einer Inhibition der Funktion der

Cycline und ihrer CDKs kommt. Die Hyperphosphorylierung von RB durch CDK2 bleibt im Folgenden aus und S-Phase Proteine werden nicht transkribiert, sodass die hepatozytäre Zellzyklusprogression nach partieller Hepatektomie in MAVS/STING (-/-) Mäusen beeinträchtigt ist.

Nach ausführlicher Analyse der Zellzyklusregulation stellt sich die Frage, wie die partielle Hepatektomie als steriler Zellschaden zur Zellzyklusinitiation führt und warum die Abwesenheit der Adapter für Nukleinsäureerkennung diese entsprechend beeinflusst. Die chirurgische Intervention muss zu einem ausreichend großen zellulären Stress bei den Hepatozyten führen, sodass es zur Freisetzung von wirtseigenen Nukleinsäuren ins Zytosol und Akkumulation von mitochondrialer und nukleärer DNA kommt. Wie gezeigt werden konnte, sind microRNAs (miRNAs) im Blutkreislauf während der Proliferationsphase der Leberregeneration nach PHx erhöht nachweisbar (Castoldi et al., 2016). Eine Assoziation mit Vesikeln schützt extrazelluläre microRNA im Serum vor dem Abbau und ist Gegenstand der aktuellen internationalen Forschung. Sie kommen als neuartige Biomarker für Krankheiten in Frage. Obwohl die Erkenntnisse zu zirkulierender miRNA noch in den Kinderschuhen stecken, konnte bereits ihr Potential bei der Klassifikation von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, chronischen Nieren- und Lebererkrankungen sowie der viralen Hepatitis beschrieben werden. Zu den extrazellulären Vesikeln zählen Exosomen, Aktivations- oder Apoptose-induzierende Mikrovesikel, Mikropartikel und apoptotische Körperchen, wobei deren Untersuchung durch die technisch limitierten Kapazitäten von Licht-, Laser-Konfokaler- und Durchflussmikroskopie erschwert wird (Gyorgy et al., 2011). Unter dem Aspekt, dass die Freisetzung von Vesikeln eine universale interzelluläre Kommunikationsmöglichkeit darstellt, sind besonders die folgenden Ergebnisse im Rahmen des Lebermodells spannend: Die von Hepatozyten sezernierten Exosomen induzierten dosisabhängig die hepatozytäre Proliferation in vivo und in vitro (Nojima et al., 2016). Darüber hinaus ist die Zahl der zirkulierenden Exosomen mit proliferativen Effekten nach ischämischer Reperfusionsschädigung der Leber erhöht. Da auch die partielle Hepatektomie einem Leberschaden gleichkommt, kann spekuliert werden, dass extrazelluläre Vesikel im Anschluss an den Stimulus der PHx während der Leberregeneration freigesetzt werden und immunstimulatorische Nukleinsäuren auf diesem Weg zu Zielzellen transportiert werden. Nach Erreichen der Zielzelle mit Hilfe der Vesikel könnten die Nukleinsäuren über die Aktivierung der zytosolischen Nukleinsäuresensoren die zuvor erläuterten Schritte des Zellzyklus bis zur vollständigen Proliferation der Hepatozyten und damit eine effiziente Leberregeneration nach PHx stimulieren.

PRRs der Familie der TLR Rezeptoren induzieren Leberregeneration via Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) Signalwege, indem sie die IL-6 Produktion während der

ersten Phase nach partieller Hepatektomie regulieren (Vaquero et al., 2011). Die Induktion von IL-6 wird als bedeutsam für den regenerativen Prozess angesehen, weil gezeigt werden konnte, dass Mäuse, denen IL-6 fehlt, eine beeinträchtigte Leberregeneration mit Lebernekrose und -versagen aufweisen (Cressman et al., 1996). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert, ob PRRs durch zytosolische Nukleinsäuresensoren auch die IL-6 Produktion beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit von MAVS und STING mit einer vorübergehend erhöhten IL-6 Produktion bei dennoch verminderter Proliferationsrate einhergeht. Ähnlich kontrovers ist auch die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass die Hepatozytenproliferation nach PHx in Mäusen ohne MyD88 verstärkt ist, obgleich IL-6 nach PHx ein proliferativer Stimulus ist und die Außerkraftsetzung von IL-6 in MyD88-defizienten Mäusen als entsprechend schwere Beeinträchtigung der Leberregeneration zu erwarten wäre (Vaquero et al., 2011). Die Erwartung, dass bei erhöhten IL-6 Leveln eine vermehrte Stimulation der Wiederherstellung der Lebermasse zu beobachten wäre (Taub, 2003), führt zu der falschen Annahme, dass die als signifikant erhöht gemessenen IL-6 Level der MAVS/STING (-/-) Mäuse eine beschleunigte Leberregeneration im Gegensatz zu der tatsächlich beobachteten Verzögerung induzieren müssten. Als mögliche Erklärung kommt eine kürzlich veröffentlichte Arbeit in Betracht, in der der Transkriptionsfaktor IRF3, welcher durch die MAVS/STING-Signalkaskade aktiviert wird, eine NF- κ B Aktivierung verhindert, indem er die Kinasedomain von IKK β blockiert (X. A. Wang et al., 2014). Mit dem Hauptaugenmerk auf chronische Inflammation bei metabolischen Erkrankungen wurde die regulierende Rolle der IRFs und vor allem die Expression von IRF3 analysiert, da ihnen eine wichtige Aufgabe als Mediatoren der innate Immunität zugesprochen wird. Es zeigte sich, dass systemische und hepatische Inflammation, welche in IRF3 KO Mäusen erhöht ist, durch eine Überexpression von hepatischem IRF3 abgedämpft werden kann, indem IRF3 im Zytoplasma mit IKK β interagiert und die IKK β /NF- κ B Signalkaskade inhibiert. Da auch nukleinsäurebasierte MAVS/STING Aktivierung zu IRF3 Expression führt (J. Wu & Chen, 2014) stellt sich die Frage, ob in den MAVS/STING-defizienten Mäusen eine verminderte oder vollständig fehlende IRF3 Aktivierung vorliegt, die trotz der chirurgischen Intervention zu einer Aufhebung der IKK β Blockade führt, welche via NF- κ B in einer erhöhten IL-6 Produktion mündet und die gemessenen IL-6 Level im Serum der MAVS/STING (-/-) Mäuse erklärt (Abb. 19). Dass IL-6 Produktion, neben RIG-I Produktion, STING abhängig ist, konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden. Gleichzeitig aber wird RIG-I und IL-6 auch eine Rolle als negative Feedback Regulatoren zugesprochen, da Ausschaltung von RIG-I oder Blockade des IL-6 Signalwegs den Abbau von STING teilweise zurückhalten und dessen Stabilität regulieren (X. Wu et al., 2017). Ungeklärt bleibt jedoch, welche Konsequenz die erhöhte IL-6

Produktion in Abwesenheit von MAVS/STING hat, da ein negativer Feedback Mechanismus, der möglicherweise den Abbau von STING oder MAVS fördert, überflüssig erscheint. Eine weitere Überlegung wäre, dass die erhöhte IL-6 Produktion dabei helfen könnte, der exzessiven Inhibition der Leberregeneration bei kombinierten MAVS/STING Defizienz gegenzusteuern.

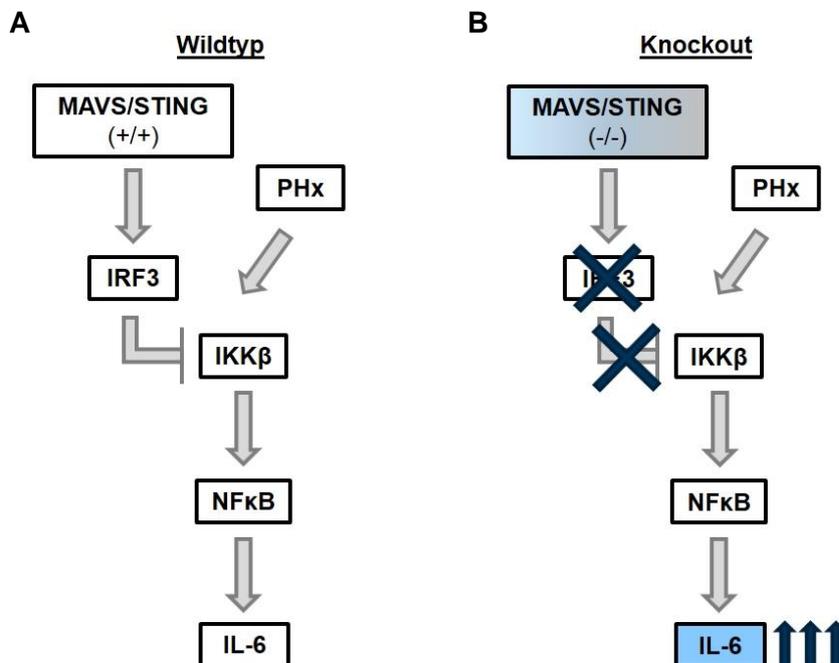


Abb. 19: Erhöhte IL-6 Produktion durch fehlende IRF3-bedingte IKK β Blockade in MAVS/STING (-/-) Mäusen

(A) Die MAVS/STING-Signalkaskade aktiviert den Transkriptionsfaktor IRF3, welcher die Kinasedomäne von IKK β blockiert, wodurch es zu einer gehemmten NF- κ B Aktivierung kommt. (B) In MAVS/STING (-/-) Mäusen könnte durch fehlende IRF3-Aktivierung eine aufgehobene IKK β Blockade zu einer erhöhten NF- κ B Aktivierung führen, welche die als erhöht gemessene IL-6 Produktion erklären könnte.

Nachdem die zytosolische Nukleinsäureerkennung durch die Signaladaptor MAVS/STING und deren Auswirkung auf die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie ausführlich beleuchtet wurden, bleibt zu klären, ob sich die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit auch auf Zellteilung im Rahmen von malignem Geschehen übertragen lassen. Eine entsprechend konkordante Annahme wäre, dass der Zellzyklus von Tumorzellen in Abwesenheit von MAVS/STING unvollständig oder komplett inhibiert wäre. Folglich müsste eine verminderte Expression von MAVS/STING mit einem für den Patienten vorteilhaften prognostischen Wert bei maligner Neoplasie einhergehen und die Ausschaltung der zytosolischen

Nukleinsäureerkennung zum Ziel für zukünftige therapeutische Optionen werden. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch bereits veröffentlichte Ergebnisse, die zeigen konnten, dass STING (TEM173) Expression in Leberzellkarzinom- und Magenkarzinomgewebe deutlich vermindert ist (Bu et al., 2016; Song et al., 2017). Bei widersprüchlichen Ergebnissen bleibt folglich zu klären, welche Rolle MAVS/STING im Rahmen der Tumorgenese zukommt. Letztendlich ist es die Proliferation von maligne entarteten Zellen, die zur Karzinogenese beiträgt und auch diese Proliferation könnte durch MAVS/STING-abhängige Kaskaden beeinflusst werden.

6 Zusammenfassung

Damit DNA Sensoren des Zytosols eine Immunreaktion generieren können, wird das Adapterprotein STING benötigt, während zytosolische RNA Sensoren MAVS für ihre Signaltransduktion benutzen. Obwohl es nachweislich pathogen-assoziierte Nukleinsäuren sind, die durch die Stimulation von zytosolischen Nukleinsäuresensoren eine anti-mikrobielle Abwehr auslösen, könnten auch wirtseigene Nukleinsäuren eine entsprechende Entzündungsreaktion vermitteln. In der hier vorliegenden Arbeit wird erstmalig die zuvor unbekannte Rolle der Nukleinsäuresensoren bei der Leberregeneration beschrieben. Analysen der Leberregeneration mit Hilfe des Modells der 2/3-Hepatektomie in Mäusen mit kombiniertem Gendefekt für MAVS und STING zeigten, dass defekte zytosolische Nukleinsäureerkennung die Hepatozytenproliferation beeinträchtigt und die Wiederherstellung der Organmasse verzögert. Während kombinierte MAVS/STING-Abwesenheit die Hochregulation der G1-Phasen Cycline D1 und E1 nicht beeinflusste, reduzierte sie die Hyperphosphorylierung des RB Proteins wesentlich, schwächte die aktivierende Phosphorylierung von CDK2 ab und beeinträchtigte sowohl die CDK1 Hochregulation als auch den hepatozytären BrdU Einschluss. Bedeutsam ist auch, dass die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 deutlich erhöht war in den mutierten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Dysfunktion der Signalkaskade der zytosolischen Nukleinsäureerkennung die Expression von p21 fördert und die Progression der Hepatozyten durch den Zellzyklus nach G1/S Kontrollpunkt beeinträchtigt, sodass es zu einer ausgeprägten Verzögerung der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie kommt.

7 Summary

Generation of immune response through DNA sensors localized in the cytosol requires the adapter protein STING, while cytosolic RNA sensors use MAVS for signal transduction. Although stimulation of cytosolic nucleic acid sensors by pathogen-derived nucleic acids was found to be important for initiating anti-microbial defense, inadvertent stimulation through self-derived nucleic acids may contribute to autoinflammation and cancer. Here, we report a previously unrecognized role of cytosolic nucleic acid sensors for organ regeneration. Analysis of liver regeneration in mice harboring a combined deficiency of MAVS and STING using a model of two-third hepatectomy directly demonstrate that defective cytosolic nucleic acid sensing impairs hepatocyte proliferation and delays the recovery of organ mass. Whereas combined MAVS and STING deficiency did not influence upregulation of the G1 phase cyclins D1 and E1, it substantially reduced the hyperphosphorylation of RB protein, attenuate the activating phosphorylation of CDK2, and impaired both CDK1 upregulation and hepatocyte BrdU incorporation. Importantly, expression of the cell cycle inhibitor p21 was markedly elevated in mutant as compared with wildtype mice. Thus, these findings suggest that deficiency of cytosolic nucleic acid sensing pathways enhances expression of p21 and impairs hepatocyte cell cycle progression beyond the G1/S checkpoint leading to a marked delay of liver regeneration after partial hepatectomy.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: An der Leberregeneration beteiligte Zellen und sezernierte Faktoren	6
Abb. 2: Die IL-6 Signalkaskade	8
Abb. 3: MAVS (CARDIF) als zentrales Adapterprotein für die RNA-Detektion.....	11
Abb. 4: STING als zentrales Adapterprotein für DNA-Erkennung	13
Abb. 5: Auswirkung der PHx auf die Leberregeneration mit Beteiligung des innate Immunsystems	17
Abb. 6: Gestörte Regeneration der Lebermasse bei CARDIF/STING (-/-) Mäuse nach PHx	41
Abb. 7: Verringerte Proliferation bei CARDIF/STING (-/-) Mäuse 32h und 40h nach PHx	42
Abb. 8: Erhöhte IL-6 Produktion bei unveränderter TNF- α Expression im murinen Serum in Abwesenheit von MAVS/STING.....	44
Abb. 9: Induktion von pSTAT3 sowohl in Wildtyp als auch in MAVS/STING (-/-) Mäusen 4h nach PHx.....	45
Abb. 10: Signifikant erhöhte Expression von pSTAT3 in MAVS/STING (-/-) Tieren 2h nach PHx	46
Abb. 11: Verminderte mRNA Expression an SOCS3 4h nach PHx bei wiederum signifikant erhöhter Expression zum 8h Zeitpunkt.....	47
Abb. 12: Verminderte Expression von pERK1/2 gleichermaßen in Wildtyp und MAVS/STING (-/-) Kohorte zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx.....	48
Abb. 13: Unveränderte Proteinexpression von TRAF5 4h nach PHx in WT und KO Mäusen	49
Abb. 14: Zu Serumspiegeln äquivalente IL-6 Genexpression bei vergleichbar exprimierten IL- 6 Rezeptoren.....	50
Abb. 15: Vergleichbare c-Myc Expression bei erhöhter Cyclin D1 Expression 24h nach PHx in Kontrolltieren und defizienten Mäusen.....	51
Abb. 16: Vergleichbare Cyclin D1 und E1 Proteinlevel bei signifikant abweichender Expression von p-RB, p-CDK2 und CDK1 32h und 40h nach PHx.....	54
Abb. 17: Assoziation von MAVS/STING Defizienz mit erhöhter Expression des Zellzyklusinhibitors p21 ^{Cip1}	55
Abb. 18: Modell der Zellzyklusregulation in Wildtyp und MAVS/STING (-/-) Mäusen.....	59
Abb. 19: Erhöhte IL-6 Produktion durch fehlende IRF3-bedingte IKK β Blockade in MAVS/STING (-/-) Mäusen	62

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der intrahepatischen Zellen.....	3
Tabelle 2: Stammlösungen, Puffer und Gele	20
Tabelle 3: Erstantikörper	21
Tabelle 4: Zweitantikörper	22

9 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2012). Cellular and Molecular Immunology (Vol. 7, pp. 15-173). Philadelphia, Pa.: Elsevier.
- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 400-414.
- Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surg Clin North Am*, 90(4), 643-653.
- 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*, 263(4 Pt 1), G579-585.
- Albrecht, J. H., Meyer, A. H., & Hu, M. Y. (1997). Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1/Sdi1) gene expression in hepatic regeneration. *Hepatology*, 25(3), 557-563.
- Albrecht, J. H., Poon, R. Y., Ahonen, C. L., Rieland, B. M., Deng, C., & Crary, G. S. (1998). Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene*, 16(16), 2141-2150.
- Alexander, W. S., & Hilton, D. J. (2004). The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*, 22, 503-529.
- Barber, G. N. (2015). STING: infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*, 15(12), 760-770.
- Barrat, F. J., Elkon, K. B., & Fitzgerald, K. A. (2016). Importance of Nucleic Acid Recognition in Inflammation and Autoimmunity. *Annu Rev Med*, 67, 323-336.
- Bismuth, H., & Majno, P. E. (2000). Hepatobiliary surgery. *J Hepatol*, 32(1 Suppl), 208-224.
- Bu, Y., Liu, F., Jia, Q. A., & Yu, S. N. (2016). Decreased Expression of TMEM173 Predicts Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*, 11(11), e0165681.
- Castoldi, M., Kordes, C., Sawitza, I., & Haussinger, D. (2016). Isolation and characterization of vesicular and non-vesicular microRNAs circulating in sera of partially hepatectomized rats. *Sci Rep*, 6, 31869.
- Chen, T. S., & Chen, P. S. (1994). The myth of Prometheus and the liver. *J R Soc Med*, 87(12), 754-755.
- 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(5291), 1379-1383.

- Dahm, F., Georgiev, P., & Clavien, P. A. (2005). Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant*, 5(11), 2605-2610.
- Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(5), 297-306.
- Ding, B. S., Nolan, D. J., Butler, J. M., James, D., Babazadeh, A. O., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Kobayashi, H., Shido, K., Lyden, D., Sato, T. N., Rabbany, S. Y., & Rafii, S. (2010). Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*, 468(7321), 310-315.
- Duncan, A. W., Dorrell, C., & Grompe, M. (2009). Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*, 137(2), 466-481.
- Fausto, N. (2000). Liver regeneration. *J Hepatol*, 32(1 Suppl), 19-31.
- Fausto, N., Campbell, J. S., & Riehle, K. J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1), S45-53.
- Fausto, N., Campbell, J. S., & Riehle, K. J. (2012). Liver regeneration. *J Hepatol*, 57(3), 692-694.
- Garcea, G., & Maddern, G. J. (2009). Liver failure after major hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 16(2), 145-155.
- Greenbaum, L. E., & Wells, R. G. (2011). The role of stem cells in liver repair and fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(2), 222-229.
- Guegan, J. P., Fremin, C., & Baffet, G. (2012). The MAPK MEK1/2-ERK1/2 Pathway and Its Implication in Hepatocyte Cell Cycle Control. *Int J Hepatol*, 2012, 328372.
- Gyorgy, B., Szabo, T. G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., & Buzas, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68(16), 2667-2688.
- Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A., & Dean, D. C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 98(6), 859-869.
- Hardy, K. J. (1990). Liver surgery: the past 2000 years. *Aust N Z J Surg*, 60(10), 811-817.
- Hatano, E., Bennett, B. L., Manning, A. M., Qian, T., Lemasters, J. J., & Brenner, D. A. (2001). NF-kappaB stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology*, 120(5), 1251-1262.
- Herold, G. (2015). Innere Medizin (pp. 547-557). Köln: Gerd Herold.

- Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q. X., & Chen, Z. J. (2011). MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*, *146*(3), 448-461.
- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol*, *7*(1), 40-48.
- Ishikawa, H., & Barber, G. N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, *455*(7213), 674-678.
- Juza, R. M., & Pauli, E. M. (2014). Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. *Clin Anat*, *27*(5), 764-769.
- Kang, L. I., Mars, W. M., & Michalopoulos, G. K. (2012). Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells*, *1*(4), 1261-1292.
- Kim, J. S., Broering, D. C., Tustas, R. Y., Fischer, L., Ganschow, R., Burdelski, M., & Rogiers, X. (2004). Split liver transplantation: past, present and future. *Pediatr Transplant*, *8*(6), 644-648.
- Lehmann, K., & Clavien, P. A. (2010). History of hepatic surgery. *Surg Clin North Am*, *90*(4), 655-664.
- Malato, Y., Naqvi, S., Schurmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M. A., Grimm, D., & Willenbring, H. (2011). Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest*, *121*(12), 4850-4860.
- Marubashi, S., Sakon, M., Nagano, H., Gotoh, K., Hashimoto, K., Kubota, M., Kobayashi, S., Yamamoto, S., Miyamoto, A., Dono, K., Nakamori, S., Umeshita, K., & Monden, M. (2004). Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. *Surgery*, *136*(5), 1028-1037.
- McClusky, D. A., 3rd, Skandalakis, L. J., Colborn, G. L., & Skandalakis, J. E. (1997). Hepatic surgery and hepatic surgical anatomy: historical partners in progress. *World J Surg*, *21*(3), 330-342.
- Meirelles Junior, R. F., Salvalaggio, P., Rezende, M. B., Evangelista, A. S., Guardia, B. D., Matiolo, C. E., Neves, D. B., Pandullo, F. L., Felga, G. E., Alves, J. A., Curvelo, L. A., Diaz, L. G., Rusi, M. B., Viveiros Mde, M., Almeida, M. D., Pedroso, P. T., Rocco, R. A., & Meira Filho, S. P. (2015). Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*, *13*(1), 149-152.
- Michalopoulos, G. K. (2017). Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology*, *65*(4), 1384-1392.

- Mitchell, C., Nivison, M., Jackson, L. F., Fox, R., Lee, D. C., Campbell, J. S., & Fausto, N. (2005). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem*, *280*(4), 2562-2568.
- Moh, A., Iwamoto, Y., Chai, G. X., Zhang, S. S., Kano, A., Yang, D. D., Zhang, W., Wang, J., Jacoby, J. J., Gao, B., Flavell, R. A., & Fu, X. Y. (2007). Role of STAT3 in liver regeneration: survival, DNA synthesis, inflammatory reaction and liver mass recovery. *Lab Invest*, *87*(10), 1018-1028.
- Nagashima, H., Okuyama, Y., Asao, A., Kawabe, T., Yamaki, S., Nakano, H., Croft, M., Ishii, N., & So, T. (2014). The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4(+) T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. *Nat Immunol*, *15*(5), 449-456.
- Nelsen, C. J., Rickheim, D. G., Timchenko, N. A., Stanley, M. W., & Albrecht, J. H. (2001). Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo. *Cancer Res*, *61*(23), 8564-8568.
- Nevzorova, Y. A., Hu, W., Cubero, F. J., Haas, U., Freimuth, J., Tacke, F., Trautwein, C., & Liedtke, C. (2013). Overexpression of c-myc in hepatocytes promotes activation of hepatic stellate cells and facilitates the onset of liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, *1832*(10), 1765-1775.
- Nojima, H., Freeman, C. M., Schuster, R. M., Japtok, L., Kleuser, B., Edwards, M. J., Gulbins, E., & Lentsch, A. B. (2016). Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate. *J Hepatol*, *64*(1), 60-68.
- Nowarski, R., Gagliani, N., Huber, S., & Flavell, R. A. (2013). Innate immune cells in inflammation and cancer. *Cancer Immunol Res*, *1*(2), 77-84.
- Paranjpe, S., Bowen, W. C., Bell, A. W., Nejak-Bowen, K., Luo, J. H., & Michalopoulos, G. K. (2007). Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference. *Hepatology*, *45*(6), 1471-1477.
- Paulsen, F., & Waschke, J. (2010). Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen *Innere Organe* (Vol. 23, pp. 102-109): Urban & Fischer Verlag.
- Power, C., & Rasko, J. E. (2008). Whither prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration. *Ann Intern Med*, *149*(6), 421-426.
- Rademacher, S., Oppert, M., & Jorres, A. (2011). Artificial extracorporeal liver support therapy in patients with severe liver failure. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, *5*(5), 591-599.

- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2012). Biochemie *Duale Reihe* (Vol. 3, pp. 654-662). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Riehle, K. J., Campbell, J. S., McMahan, R. S., Johnson, M. M., Beyer, R. P., Bammler, T. K., & Fausto, N. (2008). Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3. *J Exp Med*, *205*(1), 91-103.
- Riehle, K. J., Dan, Y. Y., Campbell, J. S., & Fausto, N. (2011). New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol*, *26 Suppl 1*, 203-212.
- Roers, A., Hiller, B., & Hornung, V. (2016). Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity*, *44*(4), 739-754.
- Rosario, M., & Birchmeier, W. (2003). How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*, *13*(6), 328-335.
- Russell, W. E., Coffey, R. J., Jr., Ouellette, A. J., & Moses, H. L. (1988). Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(14), 5126-5130.
- 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*(2), 403-411.
- Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol*, *64*(6), 1403-1415.
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*, *18*(2), 175-189.
- Song, S., Peng, P., Tang, Z., Zhao, J., Wu, W., Li, H., Shao, M., Li, L., Yang, C., Duan, F., Zhang, M., Zhang, J., Wu, H., Li, C., Wang, X., Wang, H., Ruan, Y., & Gu, J. (2017). Decreased expression of STING predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Sci Rep*, *7*, 39858.
- Sun, Q., Sun, L., Liu, H. H., Chen, X., Seth, R. B., Forman, J., & Chen, Z. J. (2006). The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity*, *24*(5), 633-642.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*(6), 805-820.
- Taub, R. (2003). Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest*, *112*(7), 978-980.
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*(10), 836-847.
- Thenappan, A., Shukla, V., Abdul Khalek, F. J., Li, Y., Shetty, K., Liu, P., Li, L., Johnson, R. L., Johnson, L., & Mishra, L. (2011). Loss of transforming growth factor beta adaptor

- protein beta-2 spectrin leads to delayed liver regeneration in mice. *Hepatology*, 53(5), 1641-1650.
- Ulfig, N. (2010). *Kurzlehrbuch Histologie* (Vol. 3, pp. 137-142). Rostock: Georg Thieme Verlag.
- Vaquero, J., Campbell, J. S., Haque, J., McMahan, R. S., Riehle, K. J., Bauer, R. L., & Fausto, N. (2011). Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88 provide mechanistic insights into the cause and effects of interleukin-6 activation in mouse liver regeneration. *Hepatology*, 54(2), 597-608.
- Wang, X., DeFrances, M. C., Dai, Y., Padiaditakis, P., Johnson, C., Bell, A., Michalopoulos, G. K., & Zarnegar, R. (2002). A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell*, 9(2), 411-421.
- Wang, X. A., Zhang, R., She, Z. G., Zhang, X. F., Jiang, D. S., Wang, T., Gao, L., Deng, W., Zhang, S. M., Zhu, L. H., Guo, S., Chen, K., Zhang, X. D., Liu, D. P., & Li, H. (2014). Interferon regulatory factor 3 constrains IKKbeta/NF-kappaB signaling to alleviate hepatic steatosis and insulin resistance. *Hepatology*, 59(3), 870-885.
- Webber, E. M., Bruix, J., Pierce, R. H., & Fausto, N. (1998). Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology*, 28(5), 1226-1234.
- Wu, J., & Chen, Z. J. (2014). Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol*, 32, 461-488.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*, 339(6121), 826-830.
- Wu, X., Yang, J., Na, T., Zhang, K., Davidoff, A. M., Yuan, B. Z., & Wang, Y. (2017). RIG-I and IL-6 are negative-feedback regulators of STING induced by double-stranded DNA. *PLoS One*, 12(8), e0182961.
- Wu, Y., Guo, F., Liu, J., Xiao, X., Huang, L., & He, D. (2011). Triple labeling with three thymidine analogs reveals a well-orchestrated regulation of hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology Res*, 41(12), 1230-1239.
- 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. *J Biol Chem*, 278(13), 11281-11288.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, 5(7), 730-737.

Zorde-Khvaleyevsky, E., Abramovitch, R., Barash, H., Spivak-Pohis, I., Rivkin, L., Rachmilewitz, J., Galun, E., & Giladi, H. (2009). Toll-like receptor 3 signaling attenuates liver regeneration. *Hepatology*, *50*(1), 198-206.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bedanken, bei all denjenigen, die mich bei diesem Projekt unterstützt und zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Norbert Hüser, der mir durch seine stetige Unterstützung und organisatorische Leistung diese Arbeit ermöglicht und wesentlich zum Erfolg dieses Promotionsvorhabens beigetragen hat. Seine ansteckende Motivation und Begeisterung machen ihn in wissenschaftlicher und klinischer Hinsicht zu einem großen Vorbild für mich.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernhard Holzmann bedanken, ohne den dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Die regelmäßigen wissenschaftlichen Diskussionen zu experimentellen Ansätzen, molekularen Vorgängen und Ergebnisdarstellung waren von unschätzbarem Wert für diese Arbeit. Besonders möchte ich ihm auch für seine Bemühungen hinsichtlich Mausezucht und Vorantreiben der Publikation danken und dafür, dass ich die Experimente unter optimalen Voraussetzungen durchführen konnte.

Ein großer Dank gilt auch meinem Mentor Dr. Dr. Daniel Hartmann, der mich in die chirurgische Forschungsgruppe einführte und mich durch außerordentliches Engagement im Rahmen des Projektes, aber auch auf Kongressen und im Hinblick auf meine weitere Zukunft stetig unterstützt hat.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Helmut Friess möchte ich dafür danken, dass ich als Cand. med. in der wissenschaftlichen Abteilung der Klinik und Poliklinik für Chirurgie arbeiten konnte.

Für die großartige Einweisung in den Laboralltag und die methodischen Ratschläge zum Gelingen der Experimente möchte ich mich ganz besonders bei Felicitas Altmayr, Gabriela Holzmann und Widya Johannes bedanken. Durch ihre herzliche und hilfsbereite Art wurde die Zeit im Labor für mich zu einer sehr schönen Erfahrung.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern Bettina und Jürgen sowie meiner Schwester Franziska für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung in jedem meiner Vorhaben bedanken. Ihr Stolz und ihre Fürsorge waren mein Rückenwind, mit dem ich jede noch so große Hürde meistern konnte. Dankeschön auch an meinen Partner Sebastian für all das Verständnis und die liebevolle Unterstützung während der letzten Jahre.

Publikationen

Manuskript

Schulze, S., Stoss, C., Lu, M., Wang, B., Laschinger, M., Steiger, K., Altmayr, F., Friess, H., Hartmann, D., Holzmann, B., & Huser, N. (2018). Cytosolic nucleic acid sensors of the innate immune system promote liver regeneration after partial hepatectomy. *Sci Rep*, 8(1), 12271.

Kongressbeiträge

Schulze, S., Hartmann, D., Lu, M., Friess, H., Holzmann, B., Hüser, N. (2016) 93. Jahrestagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V., Chirurgisches Forum 1: Experimentelle Forschung, Vortrag: „Die Nukleinsäuresensoren CARDIF und STING erhöhen die Regenerationsfähigkeit der Leber nach partieller Hepatektomie“ (Klinikum Großhadern, München).

Schulze, S., Lu, M., Holzmann, B., Friess, H., Hüser, N., Hartmann, D. (2016) 24th United Gastroenterology Week, Poster: „The absence of the adaptor proteins CARDIF/STING negatively regulates the proliferation of liver regeneration after partial hepatectomy in mice“ (Vienna, Austria).

Hartmann, D., Schulze, S., Lu, M., Holzmann, B., Hüser, N., Friess, H. (2017) 94. Jahrestagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V., Walter Brendel-Preisträgersitzung, Vortrag: „Zytosolische Nukleinsäuresensoren erhöhen die Regenerationsfähigkeit der Leber nach Leberschädigung“ (Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg).