
Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Karl-Walter Jauch

Der hepatotrophe Wachstumsfaktor Augmenter of liver regeneration (ALR) wirkt
leberspezifisch protektiv gegenüber metabolischen Noxen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Maren Ilowski
aus
Heilbronn-Neckargartach

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang E. Thasler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Reinhart Zchoval

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. S. M. Lee

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2013

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	2
1.1.	Die Pathophysiologie der Leber	3
1.2.	Die klinische Problematik	3
1.3.	Die Leberregeneration	5
1.4.	Der Wachstumsfaktor Augmenter of Liver Regeneration	6
1.5.	Therapieansätze zur Verbesserung der Leberregeneration	7
2.	Spezifische Fragestellungen.....	8
3.	Ergebnisse	8
4.	Diskussion wesentlicher Ergebnisse der Arbeit.....	9
5.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	10
6.	Zusammenfassung	12
7.	Summary.....	14
8.	Literaturverzeichnis.....	16
9.	Publikationen für die kumulative Dissertation.....	21

1. Einleitung

Die Leber ist mit einem Gewicht von ca. 1,5 kg das größte Stoffwechselorgan des Körpers und hat neben vielen essentiellen metabolischen, exokrinen und endokrinen Funktionen ein einzigartiges Regenerations- und Differenzierungspotential [1]. Deshalb ist sie in der Lage, nach Resektion, Schädigung durch Toxine oder Trauma die Funktionsfähigkeit zu kompensieren und diese über komplexe Mechanismen mittels Zellhypertrophie und Zellhyperplasie funktionell im Sinne von *restitutio ad integrum* wiederherzustellen [2; 3]. Bereits in der griechischen Mythologie gab es dazu in der Prometheus Sage nach Berichten von Hesiod (8. Jh. v. Chr.) erste Hinweise auf die Regenerationsfähigkeit der Leber. Darin bestraft der Göttervater Zeus den Titanen Prometheus indem er ihn an einen Felsen fesseln lässt und jede Nacht einen Adler schickt, der sich von der sich stetig regenerierenden Leber ernährt.

Zu den Aufgaben der Leber gehört neben der Bildung der Galle, Speicherung von Fett und Vitaminen auch die Entgiftung, Regulation des Glukosespiegels über die Glykogenspeicherung, sowie die Synthese von Gerinnungsfaktoren und Serumproteinen, wie z.B. Albumin [1]. Neben den leberständigen Makrophagen (Kupffer-Zellen), Endothelzellen und Itozellen zur Speicherung von Fett und Vitamin A, stellen die Hepatozyten 70-80 % des Lebervolumens und übernehmen somit viele der physiologischen Funktionen [4].

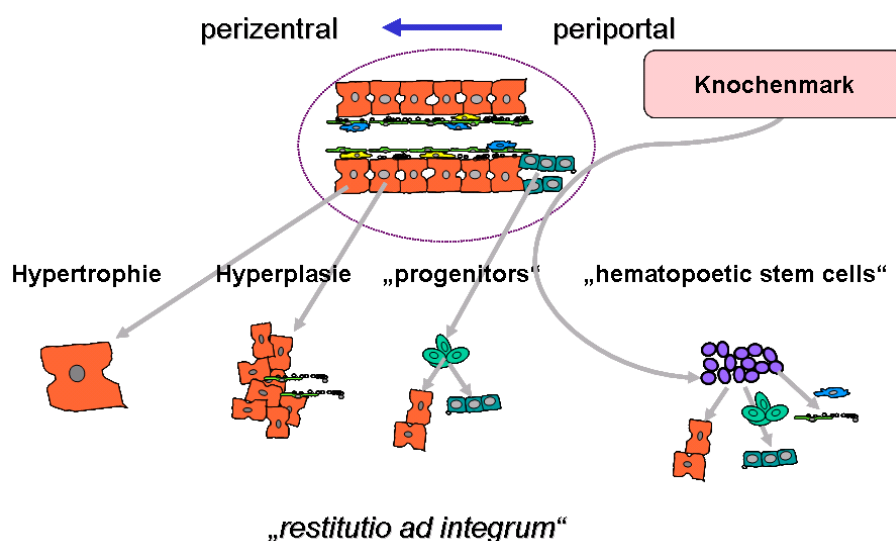


Abb. 1: Regenerationsmechanismen

(zur Verfügung gestellt von PD Dr. W.E. Thasler, Habilitationsschrift (2005), S. 8)

Für die Behandlung von Lebererkrankungen ist das Verständnis um die Aufrechterhaltung der Homöostase in der Leber von fundamentaler Bedeutung. Dieser pathophysiologische Grundsatz beschreibt die Prozesse um das Gleichgewicht der Zellapoptose und Proliferation, die neben der Fähigkeit der Hepatozyten zur Hyperplasie und Hypertrophie auch durch hepatische Progenitorzellen [2] und vermutlich hämatopoetischen Stammzellen [5] unterstützt wird (Abb. 1).

In der gesunden Leber findet eine „physiologische Apoptose“ statt, d.h. Zellaufbau und -abbau befinden sich im Gleichgewicht. Verschiedene Schädigungen der Leber, ausgelöst z.B. durch Cholestase, Viren, Autoimmunerkrankungen und Toxine, können dieses Gleichgewicht verschieben und in einem progredienten Verlust von funktionellem Lebergewebe und Fibrose resultieren. Das Verständnis und die Kontrolle der Apoptose spielt deshalb für die Pathogenese von allen Lebererkrankungen eine wichtige Rolle.

1.1. Die Pathophysiologie der Leber

Als Ursache für eine hepatozelluläre Schädigung kommen neben externen Faktoren auch metabolische Erkrankungen der Leber in Frage. Zu den häufigsten Stoffwechselerkrankungen gehören z.B. die Kupferspeicherkrankheit Morbus Wilson und die hereditäre Hämochromatose, bei der es zu einer Störung des Eisenstoffwechsels kommt. Zu den durch chronischen Alkoholkonsum verursachten Lebererkrankungen zählen die Fettleber ohne (lat. Steatosis hepatis) und mit entzündlichen Veränderungen (Steatohepatitis), welche im Zuge der Entzündungsprozesse ebenfalls zur Fibrose und Zirrhose führen können. Die alkoholische Lebererkrankung (ALE) bzw. die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) stellen mittlerweile die häufigsten Krankheitsbilder der Leber dar, auf deren Basis sich neben fibrotischen und zirrhotischen Veränderungen schließlich ein hepatozelluläres Karzinom entwickeln kann [6]. Die Leberfibrose entsteht dabei aufgrund permanenter Wundheilungsmechanismen als Reaktion auf eine chronische Leberschädigung, hervorgerufen durch Alkohol oder Viren, Autoimmunerkrankungen, Drogen, Cholestase und metabolische Erkrankungen. Ein progredienter Verlauf führt schließlich zu Zirrhose und Leberversagen [7]. Unter chronischem Alkoholkonsum kommt es zu einer vermehrten hepatozellulären Einlagerung von Triglyceriden sowie einer Veränderung des Redoxpotentials [8]. Die Abgrenzung zu einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis ist weder histologisch noch anamnestisch immer zweifelsfrei darzustellen. Die Pathophysiologie der Leberverfettung ist sehr komplex, wobei deren Entstehung und weiterer Verlauf durch verschiedene Risikofaktoren beeinflusst wird. Dazu gehören das Geschlecht, Medikamente und Toxine, virale Lebererkrankungen (Hepatitis B und C), angeborene Stoffwechselstörungen sowie Diabetes mellitus, Adipositas und Hypertonie als Krankheitsbilder des metabolischen Syndroms [9].

1.2. Die klinische Problematik

Die Tatsache, dass sich die Leber im Hinblick auf Größe und Funktion komplett regenerieren kann und somit Resektionen durchgeführt werden können, um benigne und maligne Läsionen zu entfernen, bildet die Grundlage der Leberchirurgie [10]. Die operative Entfernung von erkranktem und verändertem Gewebe stellt meistens die beste und einzige Behandlungsoption dar. Die erfolgreiche Behandlung der Patienten ist dabei vor allem von der Regenerationsfähigkeit des verbleibenden Lebergewebes abhängig. Diese ist häufig eingeschränkt, da es sich vermehrt um ältere Menschen mit langer Krankengeschichte, sowie, aufgrund von chronischem Alkoholmissbrauch oder neoadjuvanter Therapie wie der Chemotherapie, um vorbehandelte Patienten handelt.

Auch Ischämie-Reperfusionsschäden stellen bei Resektionen und Transplantationen ein erhöhtes Risiko dar. Um ausgedehnten Blutverlust während leberchirurgischer Eingriffe zu vermeiden, werden die *Vena portae* und *Arteria hepatica propria* beim sogenannten „Pringle-Manöver“ durch eine Gefäßklemme vorübergehend abgedrückt. Diese Gewebhypoxie führt während der ischämischen Phase zu einer Depletion von Adenosintriphosphat und Zellschwellung durch die Akkumulation intrazellulären Natriums [11]. Durch die spätere Wiederherstellung des Blutflusses werden Reperfusionsschäden verursacht, für die freigesetzte Sauerstoffradikale und proinflammatorische Zytokine von aktivierten Kupffer-Zellen verantwortlich sind. Die besondere klinische Relevanz besteht deshalb in der Gefahr, dass durch diese vaskuläre Beeinträchtigung mit perioperativer Ischämie und Reperfusion postoperative Leberdysfunktionen bis hin zum Leberversagen entstehen können.

Kolorektale Karzinome sind die am häufigsten vorkommende Krebsart in Europa [12] und die Leber ist dabei der häufigste und in einem Drittel der Fälle auch der einzige Ort für Metastasen [13]. Die häufigste Todesursache bei bis zu 70% der Patienten mit kolorektalen Karzinomen stellt nach neuesten Studien das Auftreten von Lebermetastasen dar [14]. Bei den primären Lebertumoren gehört das hepatozelluläre Karzinom (HCC) weltweit zu den fünf häufigsten Krebsleiden [15]. Die meisten hepatozellulären Karzinome entwickeln sich aufgrund einer Zirrhose oder beeinträchtigten Leberfunktion, hervorgerufen durch Hepatitiden. Diese Tatsache schließt viele der Patienten für eine Resektion aus, auch wenn eine Operation die optimale Behandlung wäre [16]. In manchen Fällen können insbesondere die neueren Chemotherapeutika, wie beispielsweise Oxaliplatin und Cetuximab, die Metastasen derart verkleinern, dass sie resektabel werden. Inzwischen werden dafür häufig mehrere Wirkstoffe in einer Kombinationstherapie eingesetzt.

Wird der Tumor eines Patienten nach Behandlung durch Chemotherapie resektabel, besteht für die nachfolgende Operation immer noch ein gewisses Komplikationsrisiko. In den vergangenen Jahren konnte die Sicherheit von Leberoperationen jedoch durch verbesserte bildgebende und Radiologietechniken, wie der Pfortader- und Chemoembolisation [17; 18], verfeinerte Operationstechniken [19] und vor allem durch die optimierte Auswahl der Patienten aufgrund genauerer präoperativer Beurteilung deutlich verbessert werden. Das Auftreten von postoperativen Komplikationen ist dabei direkt abhängig von der Anzahl der verbleibenden Segmente [20]. Die moderne Leberchirurgie hat sich durch Techniken wie der Split-Leber Transplantation [21] und multimodale Ansätzen zur Behandlung von primärer und sekundärer Malignität verändert und konnte so insgesamt die Möglichkeiten der Resektabilität bei Patienten erhöhen [22]. So wird bei der chirurgischen Behandlung von Lebermetastasen mittlerweile eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 30-40% erreicht [23]. Bei multimodalen Ansätzen werden mehrere Behandlungsmaßnahmen miteinander kombiniert, so dass Tumore z.B. durch eine vorangestellte Bestrahlung oder Chemotherapie für eine spätere chirurgische Behandlung in Frage kommen. Die steigende Anzahl von Vorbehandlungen führt allerdings auch zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Regenerationsfähigkeit des verbleibenden Gewebes. So ist beispielsweise bekannt, dass durch eine Chemotherapie eine Steatohepatitis induziert werden kann [24]. Trotz kontinuierlicher Verbesserung der Operationstechniken und der perioperativen Intensivpflege, kommt es daher bei einigen Patienten immer noch zu einer

unzureichenden Regeneration des Lebergewebes oder aufgrund des sogenannten „Small-for-Size“-Syndroms zu einer Fehlfunktion nach Lebertransplantation. Diese wird durch eine zu geringe Transplantatgröße (Transplantatgewicht/Körpergewicht < 0.8%) [25] oder zu geringem Restgewebe (< 24%) nach einer erweiterten Hepatektomie [22] hervorgerufen.

Somit sind immer noch Behandlungsstrategien nötig, um defekte und kranke Organe zu unterstützen oder die Regenerationsfähigkeit eines „small-for-size“ Transplantats oder Restgewebes nach Hepatektomie, mit oder ohne neoadjuvanter Chemotherapie, verbessern zu können. Durch eine verbesserte Leberregeneration könnte neben einer möglichen Therapierbarkeit von Risikopatienten auch das Überleben kurz- und langfristig sowie das Organüberleben nach Transplantation verbessert werden. Es ist bekannt, dass auf Signaltransduktionsebene über die Aktivierung von extracellulär-signal-regulated kinases1/2 (ERK1/2) die Proliferation getriggert werden kann [26] und es sich bei dem Akt/Proteinkinase b (Akt/PKB)-Signalweg um einen Survival Signalweg handelt. Aus diesem Grund wurden in den hier vorliegenden Arbeiten der Akt/PKB- und ERK1/2- Signalweg sowie deren Nutzen für eine mögliche Unterstützung und Verbesserung der Leberregeneration nach Schädigung durch unterschiedliche Noxen untersucht.

1.3. Die Leberregeneration

Der Prozess der Leberregeneration findet als Antwort auf eine Resektion oder Schädigung der Leber mit dem Ziel der Wiederherstellung der Funktionalität und Aufrechterhaltung der Homöostase statt [27]. Dabei handelt es sich um einen komplexen mehrstufigen Prozess, bei dem sich die Lebermasse und -funktion über die Aktivierung durch verschiedene Zytokine sowie Signalwege mittels Hypertrophie und anschließender Hyperplasie wiederherstellen kann. In einer gesunden, ungeschädigten Leber befinden sich beinahe alle Zellen in der G₀ oder Ruhephase des Zellzyklus. In dieser Phase gehen in einer adulten Rattenleber z.B. nur bis zu 0,01% der Hepatozyten in die Mitose über [28]. Nach einer Schädigung oder Resektion kann jedoch ein großer Teil der Leberzellen aus der Ruhephase in den Zellzyklus eintreten, um den Verlust des Lebervolumens zu kompensieren. Dieser Prozess wird durch das Zusammenspiel vieler Zytokine und Aktivierung diverser Signalwege, unter anderem dem ERK1/2-Signalweg, reguliert [29]. Die Leberregeneration wird in die Phasen Priming, Proliferation und Terminierung eingeteilt. Die Dauer des Prozesses ist mit 7-10 Tagen in der Ratte und 3-6 Monaten beim Menschen relativ kurz, wobei bereits nach zwei bis drei Wochen die normale Funktionalität wiederhergestellt ist [30]. Die Proliferation der Hepatozyten und der Start der DNA Replikation beginnt sehr schnell nach einer Leberschädigung und zeigt nach 24 Stunden bereits seinen Höhepunkt [31]. Die Priming Phase wird vor allem durch die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 bestimmt, die von nicht-parenchymalen Zellen, wie Kupffer-Zellen und sinusoidalen Zellen freigesetzt werden [32; 33]. Innerhalb einer Stunde wird die Transkription von sogenannten immediate-early Genen, wie zum Beispiel der Proto-Onkogene c-fos, c-myc und c-jun, induziert, die an der Signaltransduktion zum Wiedereintritt der ruhenden Hepatozyten in den Zellzyklus beteiligt sind [34]. Nachdem die Hepatozyten in der Priming Phase aktiviert wurden, können sie auf die Signale der Wachstumsfaktoren reagieren und in die proliferative Phase übergehen [14]. Zu den wichtigsten

Wachstumsfaktoren während der Leberregeneration gehören der hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF) und transforming growth factor- α (TGF- α) [35; 36]. Ist die Hepatozyten-Replikation während einer Lebererkrankung nicht ausreichend, werden für die Regeneration zusätzlich Progenitorzellen aktiviert [37; 38]. Sobald die Lebermasse wiederhergestellt wurde, wird in der letzten Phase durch die Freisetzung von Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Activin und Inhibin die Mitose über die Interaktion mit dem jeweiligen Rezeptor terminiert [39]. Als Serin/Threonin Kinasen sorgen die TGF- β Rezeptoren vor allem dafür, dass die Hepatozyten wieder in die Ruhephase übergehen [40; 41] und somit ein unkontrolliertes Wachstum der Leber und die Entstehung von Tumoren verhindert und die Lebermasse über Apoptose-Induktion reduziert wird [42].

1.4. Der Wachstumsfaktor Augmenter of Liver Regeneration

Die Untersuchungen zur Leberregeneration begannen im Jahre 1877 als Eck über portocavale Shunts („Ecks fistula“) in Hunden berichtete und zu dem Schluss kam, dass die Leberhomöostase nicht von der portalen Blutperfusion abhängig war [42]. Nachdem die Bedeutung von Insulin als Comitogen für die Lebererhaltung und –regeneration bekannt war, hat sich der Fokus der Forschung auf die Untersuchung anderer potentiell hepatotropher Substanzen im portalen Blut gerichtet [42]. Man weiss, dass Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- α und HGF die DNA Synthese, den Zellzyklus und die Proliferation von Hepatozyten *in vivo* und *in vitro* stimulieren und somit einen großen Einfluss auf das Leberwachstum haben [43]. EGF ist dem TGF- α zu 35% homolog, so dass beide an den EGF-Rezeptor binden und diesen aktivieren können [39]. Dagegen bindet HGF, dessen α -Ketten zu 40% dem Plasminogen homolog sind, an den HGF Rezeptor c-Met [39]. EGF ist ein endokriner Faktor, der von verschiedenen Zellen produziert wird und für die Leberregeneration essentiell ist [40]. HGF wird nicht von Hepatozyten, sondern von Endothelzellen der Leber, hepatischen Sternzellen und Kupffer-Zellen produziert [44].

Neben diesen bekannten Wachstumsfaktoren, deren Signalwege und Wirkungsweise bereits ausführlich untersucht wurden, handelt es sich bei Augmenter of Liver Regeneration (ALR) um einen relativ neuen Faktor. Das humane ALR ist ein Homolog des Hefe-Gens Essential for Respiration and Viability (ERV1), die beide zu einer Genfamilie mit einer konservierten FAD-Bindedomäne und einem redoxaktivem Cysteinmotiv (CXXC) gehören [45]. Als mögliches Oxidans konnte *in vivo* Cytochrom C identifiziert werden [46]. Die ALR Sequenz ist unter Säugetieren zu über 90% und zu 40% mit ERV1 homolog, welches für das Wachstum und Überleben von *Saccharomyces cerevisiae* wichtig ist [47]. Das Polypeptid ALR ist auch unter den Synonymen Hepatopietin (HPO), hepatic stimulator substance (HSS) und growth factor erv1-like (Gfer) bekannt und gehört zu der Gruppe der „Zytozyme“. Damit hat ALR sowohl mitogene als auch enzymatische Eigenschaften, die intra- als auch extrazellulär ihre Wirkung entfalten [48]. Für die enzymatische Aktivität enthält das C-terminale Ende ein 15kDa großes Fragment mit einer Flavinadeninindinukleotid (FAD)-abhängigen Sulfhydryloxidaseaktivität, die bei allen Proteinen der ERV1-Familie nachgewiesen werden kann [48] und eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Mitochondrienmembran und Mitochondrienmorphologie spielt [49], indem sie die Bildung von Disulfidbrücken katalysiert [50]. Bei

der Untersuchung der dreidimensionalen Struktur des ALR Proteins wurden unterschiedliche Formen, vermutlich aufgrund eines mRNA Slicing, gefunden [51]. Die lange Form des ALR kodiert für 205 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 23 kDa [52-54]. Da die N-terminale Domäne des ERV Proteins für den Import in die Mitochondrien notwendig ist, liegt die lange Form des ALR im Intermembranraum der Mitochondrien vor [53]. Mit 15 kDa findet man die kurze Isoform im Zytoplasma, welche als Wachstumsfaktor die Proliferation von Hepatozyten stimulieren und damit die Regeneration fördern kann [55; 56]. Bereits im Jahre 1979 extrahierte Starzl et al. Zytosol von hepatektomierten Kaninchenlebern und konnte nach deren Injektion in die Pfortader von Eck fistulierten Hunden eine proliferative Wirkung feststellen [57]. Ein Jahr später konnte gezeigt werden, dass die pro-proliferative Substanz aus dem zytosolischen Extrakt regenerierender Kaninchenlebern organspezifisch war und keine Effekte nach Injektion in die Nierenarterie zeigte [57].

1.5. Therapieansätze zur Verbesserung der Leberregeneration

Trotz vieler Verbesserungen und Fortschritte in der Leberchirurgie sterben noch immer Patienten, die auf der Warteliste für ein Spenderorgan stehen oder deren Leber für eine Resektion im erforderlichen Umfang zu sehr vorgeschädigt ist. Aus diesem Grund kann eine verbesserte Leberregeneration in vielen Fällen den Therapieausgang entscheidend beeinflussen. Bisher werden verschiedene Ansätze diskutiert, um die Regeneration des Lebergewebes postoperativ oder z.B. bei akutem Leberversagen zu unterstützen. Zum einen bietet die Transplantation von frischen oder kryokonservierten Hepatozyten oder Stammzellen eine Möglichkeit zur zellulären Wachstumsstimulation [58]. Als Quelle der Hepatozyten können nicht transplantierbare Lebern, Gewebe aus Leberteileresektionen und gesunden Spendertieren (z.B. Schweinen) dienen [59]. Problematisch ist dabei die schwankende Anzahl und Qualität der isolierten Leberzellen.

Des Weiteren werden die Eigenschaften von Zytokinen der Leberregeneration auf ihren möglichen therapeutischen Einsatz untersucht. Als mögliche Faktoren kommen dabei, entweder alleine oder in Kombination, vor allem die Zytokine TNF- α , IL-6, HGF, EGF oder ALR in Frage, die im Zusammenspiel den Prozess der Leberregeneration triggern. Für einige der Wachstumsfaktoren wurden bereits *in vitro* oder *in vivo* deren Aktivierung bzw. die Serumlevel untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass nach einer Hepatektomie HGF im Serum von Patienten erhöht [60], der Gehalt in der zirrhotischen Leber allerdings verringert ist [61]. Deshalb ist für einen möglichen späteren klinischen Einsatz sehr wichtig, die mitogene und anti-apoptotische Wirkung, die genaue Wirkungsweise sowie die Zell- oder Organspezifität dieser Faktoren zu untersuchen.

Neben dem bereits gut untersuchten HGF, könnte möglicherweise auch ALR therapeutisch oder diagnostisch zur Unterstützung bzw. Untersuchung der Leberregeneration eingesetzt werden. Bekannt ist bisher, dass ALR neben dem Gehirn, Hoden und der Niere vor allem in der Leber hochexprimiert ist [62]. In zirrhotischem als auch Tumorgewebe ist die Expression von ALR, im Vergleich zu normalem Lebergewebe, erhöht [63]. Neben dem Nachweis einer mitogenen Wirkung von ALR, wurden in verschiedenen Studien bereits anti-apoptotische bzw. protektive Mechanismen

durch ALR beschrieben. Beispielsweise konnte eine exogene ALR-Gabe bei Ratten eine durch Thioacetamid ausgelöste Leberfibrose deutlich reduzieren [64]. Ebenfalls in Ratten konnte eine angewandte ALR Gentherapie die Leber vor der Ausbildung einer Fibrose, ausgelöst durch Tetrachlormethan (CCl₄), schützen. Durch die Injektion eines ALR kodierenden Plasmids konnte der mitochondriale ATP-Verlust gemindert und der oxidative Stress unterdrückt werden [65]. Ebenso konnte in Ratten mit akutem Leberversagen durch die Injektion eines ALR-kodierenden Plasmids die Mortalität gesenkt, die Leberregeneration verbessert und ein verringertes Enzymleakage von Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT) erreicht werden [66]. Aktuelle Untersuchungen zeigen außerdem, dass eine verringerte Expression von ALR zu erhöhter Apoptose sowie größerem oxidativen Stress führt [67] und ALR als Survival-Faktor die anti-apoptotische Genexpression induziert sowie Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies verringert [68]. Des Weiteren übernimmt das intra- bzw. extrazellulär vorkommende ALR im Zusammenhang mit der Bildung von Superoxiden möglicherweise eine Funktion als Signalvermittler [69]. Die mitogene Wirkung scheint nicht EGF-Rezeptor abhängig zu sein – vielmehr bindet ALR möglicherweise als autokriner Faktor an einen eigenen hochaffinen Rezeptor auf der Oberfläche hepatischer Zellen [52; 70]. Diese EGF-R unabhängige Wirkungsweise konnte auch in den hier vorliegenden Untersuchungen zur Signaltransduktion gezeigt werden. Als wichtiger Mediator der Leberregeneration könnte ALR somit z.B. die DNA Synthese in Hepatozyten nach einer partiellen Hepatektomie oder im Zusammenhang mit Leberinsuffizienz und –versagen ausgelöst durch metabolische Noxen signifikant stimulieren, um die Überlebensrate zu verbessern.

2. Spezifische Fragestellungen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die folgenden spezifischen Fragestellungen bearbeitet:

1. Zeigt der Wachstumsfaktor ALR eine vergleichbare pro-proliferative Wirkung zu EGF in Bezug auf die Konzentration und Zeitkinetik?
2. Wird diese mitogene Wirkung über den EGF-Rezeptor vermittelt?
3. Welche Signalwege werden von ALR aktiviert?
4. Besitzt ALR als Zytokin und Enzym neben mitogenen auch anti-apoptotische Eigenschaften?
5. Gegenüber welchen Noxen zeigt ALR eine anti-apoptotische bzw. protektive Wirkung?
6. Wird die anti-apoptotische Wirkung von ALR über den intrinsischen Signalweg vermittelt?
7. Wirkt die mitogene und anti-apoptotische Eigenschaft von ALR leberspezifisch?

3. Ergebnisse

Die hier vorliegende Dissertationsarbeit besteht aus zwei Manuskripten, die in der Zeitschrift Biochemical and Biophysical Research Communications (Impact Factor 2010: 2.595) veröffentlicht wurden. Für beide Veröffentlichungen habe ich in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer die wissenschaftliche Fragestellung aufgestellt, die Versuche betreut oder selber durchgeführt, die Ergebnisse zusammengestellt und ausgewertet sowie die statistischen Analysen durchgeführt. Der erste Entwurf wurde erstellt und nach Rücksprache mit den Co-Autoren wurden deren Kommentare und Vorschläge eingefügt. Das Manuskript wurde letztlich nach Rückmeldung meines Betreuers von

mir in die für das Journal vorgegebene Form gebracht und von meinem Betreuer eingereicht. Nach der Antwort des Journals wurden die letzten Änderungen vorgenommen, so dass beide Publikationen veröffentlicht werden konnten. In beiden Manuskripten werden die verschiedenen Eigenschaften des Wachstumsfaktors Augmenter of Liver Regeneration (ALR), unter anderem im Vergleich zu dem bekannten Wachstumsfaktor EGF, genauer untersucht. Es ist bekannt, dass ALR als Wachstumsfaktor ebenfalls den Prozess der Leberregeneration reguliert und beeinflusst. Die Strukturuntersuchungen von ALR beschrieben das für die enzymatische Funktion verantwortliche Fragment und zeigten, dass ALR in verschiedenen Isoformen in der Zelle vorliegt. Über die genaue Kinetik, das Ausmaß der mitogenen Wirkung und mögliche weitere Eigenschaften war bislang wenig bekannt.

Deshalb wurde in der ersten Publikation die mitogene Wirkung von ALR auf primäre Hepatozyten und Zelllinien in Bezug auf die Konzentration, Zeitkinetik und Signalwege genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zu dem Wachstumsfaktor EGF eine weitaus höhere Dosis von ALR eingesetzt werden musste, um einen vergleichbaren mitogenen Effekt zu erreichen. Des Weiteren zeigte die Zeitkinetik durch ALR einen Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 bzw. Akt/PKB bis zum Maximum nach bereits 10 bzw. 15 min und einem anschließenden Abfall zurück auf den Ausgangswert. Durch EGF konnte hingegen eine sofortige und auch längerfristige Aktivierung von ERK1/2 und eine schnellere und langsamer abnehmende Phosphorylierung von Akt/PKB erreicht werden. Dies spricht vorerst für eine stärkere mitogene Wirkung von EGF, wobei noch unklar ist, ob diese Unterschiede *in vivo* zu verschiedenartigen biologischen Reaktionen führen. Für die mitogene Eigenschaft von ALR konnte im Gegensatz zu EGF eine leberspezifische Wirkung festgestellt werden, was für eine klinische Anwendung von großer Bedeutung ist. Der Effekt von ALR auf hepatische sowie zum Teil auch auf pankreatische Zelllinien, lässt sich durch die gemeinsame entwicklungsbiologische Abstammung aus dem embryonalen Entoderm erklären. Die Tatsache, dass ALR neben ERK1/2 mit Akt/PKB auch einen bekannten Survival-Signalweg aktiviert, waren die Grundlage für weitere Untersuchung zur anti-apoptotischen Wirkung von ALR. Aus diesem Grund wurde in der zweiten Veröffentlichung die protektive Wirkung von ALR gegenüber verschiedenen Apoptose-Induktoren untersucht. Dafür wurden primäre Hepatozyten und Zelllinien mit einem pro-apoptotischen Faktor, Antikörper, Zytokin, Zytostatika oder Alkohol behandelt und mit bzw. ohne ALR Inkubation das Ausmaß der ausgelösten Apoptose bestimmt. Es zeigte sich eine konstante protektive Wirkung gegenüber allen metabolischen Noxen. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass neben der mitogenen auch die anti-apoptotische Wirkung von ALR leberspezifisch ist. Durch diese Eigenschaften wäre ein klinischen Einsatz von ALR als Zytoprotektivum bzw. Induktor der Leberregeneration möglich.

4. Diskussion wesentlicher Ergebnisse der Arbeit

Mit den beiden vorliegenden Publikationen konnten die genaue Wirkungsweise und Eigenschaften des Wachstumsfaktors Augmenter of Liver Regeneration dargestellt werden. Nach der Untersuchung der bekannten mitogenen Wirkung von ALR, wurden Unterschiede in der Wirkungsweise im Vergleich

zu dem bekannten Wachstumsfaktors EGF gefunden. Um diese Ergebnisse richtig interpretieren zu können, müssen weitere Untersuchungen, auch *in vivo*, durchgeführt werden. Bei dem Ergebnis, dass EGF im Vergleich zu ALR eine weitaus stärkere mitogene Wirkung zeigt, muss der gesamte Prozess der Leberregeneration betrachtet werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass ALR im Vergleich zu anderen Wachstumsfaktoren hauptsächlich in der Leber produziert und exprimiert wird und somit für eine Induktion der mitogenen Wirkung eine höhere Dosis benötigt wird. Des Weiteren sind die genauen Aufgaben aller an dem Prozess der Regeneration beteiligten Faktoren noch nicht bekannt, so dass ALR nicht primär für die Induktion sondern z.B. als sog. „second hit“ verantwortlich sein könnte. Neben der Dosis und des zeitlichen Verlaufes der Phosphorylierung des ERK1/2- und Akt/PKB-Signalweges konnte außerdem gezeigt werden, dass die ALR vermittelte Wirkung EGF-Rezeptor unabhängig ist. Es wurde bereits in mehreren Studien vermutet, dass ALR einen eigenen Rezeptor besitzt, was diese Ergebnisse ebenfalls unterstützen. Für einen möglichen klinischen Einsatz von ALR ist die hier gezeigte Leberspezifität von größter Bedeutung. Somit könnte ALR zur schnelleren Geweberegeneration nach Resektion, im Gegensatz zu anderen mitogenen Faktoren, ausschließlich die hepatischen Zellen zur Proliferation anregen. Die hepatotrophe protektive Wirkung von ALR gegenüber verschiedenen metabolischen Noxen ist für den klinischen Einsatz, z.B. als Schutz der gesunden Leberzellen während einer Chemotherapie, ebenfalls vielversprechend. In bisher unveröffentlichten Daten konnte ich eine protektive Wirkung von ALR gegenüber des durch Ethanol ausgelösten oxidativen Stresses mittels Messung der oxidierten und reduzierten Form von Glutathion (GSH/GSSG Ratio) nachweisen. Die Wirkung von ALR als potentielles Antioxidans sollte daher im Rahmen weiterer Modelle, z.B. hinsichtlich der Entstehung von Fibrose und Weiterentwicklung zur Zirrhose, untersucht werden.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie die hier beschriebenen Eigenschaften von ALR einen therapeutischen Einsatz finden können. Wie in aktuellen Veröffentlichungen bereits teilweise untersucht wurde, kann der Nachweis von ALR in Biopsien bzw. die Messung des Serumlevels als diagnostisches Tool zur Vorhersage der Regenerationsfähigkeit [71] oder als möglicher Tumormarker [72] genutzt werden. Im Zusammenhang mit orthotopen Lebertransplantationen leiden viele Patienten in der frühen postoperativen Phase an renaler Dysfunktion, unter anderem hervorgerufen durch das hepatorenale Syndrom. Möglicherweise kann mittels ALR die Expression des Hypoxie-induzierten Faktors-1 α (HIF-1 α) sowie der Kaliumkanäle erhöht werden und somit die Nierenperfusion postoperativ verbessert werden [73]. Des Weiteren sollte die Verwendung von ALR im Zusammenhang mit neuen extrakorporalen bioartifiziellen Lebersystemen oder therapeutischen Infusionen zur Unterstützung der Leberregeneration, z.B. bei Leberversagen, untersucht werden. Für einen diagnostischen Einsatz von ALR zur Unterstützung der Regeneration oder zum Schutz der Leberzellen, müssen somit die vorliegenden vielversprechenden Ergebnisse zuerst in weiteren Modellen bestätigt werden.

Für alle der hier aufgeführten Experimente wurde rekombinantes humanes ALR verwendet, das in einem bakteriellen Expressionsvektor hergestellt wurde. Für eine Verifizierung der Ergebnisse sollte ALR nicht nur als Vergleich in einem eukaryotischen Vektor hergestellt, sondern ebenfalls stabil in Zelllinien transfiziert verwendet werden, um die Versuche damit zu wiederholen. Die Ergebnisse aus den humanen Hepatozytenkulturen unterliegen aufgrund einer hohen interindividuellen Varianz großen Schwankungen. Zusätzlich sollten die Versuche deshalb *in vivo* unter konstanten Bedingungen wiederholt werden, bevor die hier beschriebenen Ergebnisse in der Klinik und Therapie Anwendung finden.

6. Zusammenfassung

Die Leber übernimmt als das größte Stoffwechselorgan des Körpers viele essentielle metabolische, exokrine und endokrine Funktionen. Nach Schädigungen durch Noxen, metabolische Erkrankungen, chronischen Alkoholkonsum, Trauma oder nach einer Resektion besitzt sie die Fähigkeit, sich durch einzigartige und komplexe Mechanismen im Hinblick auf die Zellmasse und Funktion zu regenerieren und letztlich funktionell wiederherzustellen. Bei der Leberregeneration handelt es sich um einen komplexen mehrstufigen Prozess, bei dem durch verschiedene Zytokine der nicht-parenchymalen Zellen sowie die Aktivierung mehrerer Signalwege die Proliferation, Apoptose sowie der Metabolismus gesteuert wird.

Die Tatsache, dass sich die Leber normalerweise nach Parenchymverlust wieder regenerieren kann, macht man sich in der Leberchirurgie zu Nutze. Der Erfolg einer Leberresektion ist neben vielen Faktoren im Wesentlichen von der Regenerationsfähigkeit des Lebergewebes abhängig, da es im Zuge einer gestörten Leberregeneration zur Leberinsuffizienz und dem Leberversagen kommen kann. Um dies zu vermeiden, aber auch um das Indikationsspektrum (im Sinne einer Erweiterung des Resektionsausmaßes) zu erweitern, ist es von klinischer Relevanz, die Leberregeneration therapeutisch verbessern zu können. Experimentelle Ansätze dazu fokussieren sich zum einen auf die Transplantation von Hepatozyten oder Stammzellen als zelluläre Wachstumsstimulation. Zum anderen werden die Eigenschaften von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf ihren möglichen therapeutischen Einsatz untersucht, um die Regeneration des Gewebes zu verbessern. Von bekannten Wachstumsfaktoren wie dem Epidermal Growth Factor (EGF) und Hepatocyte Growth Factor (HGF) sind die Signalwege ausführlich untersucht worden. Ihre Wirkung erstreckt sich auf eine Beeinflussung der DNA-Synthese, des Zellzyklus und der Proliferation der Hepatozyten *in vivo* und *in vitro*. Auch der Wachstumsfaktor Augmenter of Liver Regeneration (ALR), Synonym growth factor *erv1*-like (GFER), könnte sowohl diagnostisch im Monitoring der Leberregeneration als auch im therapeutischen Bereich als „Medikation“ eine hilfreiche Rolle spielen.

Ziel dieser Arbeit war daher, zuerst die Signaltransduktionswege zu untersuchen, die durch die externe Gabe von humanem rekombinanten ALR (rhALR) *in vitro* aktiviert werden, sowie die mitogene Wirkung von ALR auf humane Leberzellen im Vergleich zu bekannten Wachstumsfaktoren wie EGF genauer zu beschreiben. Die Tatsache, dass ALR neben dem ERK1/2- auch den Survival-Signalweg Akt/PKB aktiviert, hatte außerdem den entscheidenden Hinweis gegeben, Versuche zur anti-apoptotischen Wirkung durchzuführen. Der nächste Schritt bei der Erforschung der Besonderheiten von ALR war daher die Untersuchung eines möglichen anti-apoptotischen Effekts von ALR auf Leberzellen gegenüber verschiedenen Substanzen wie Apoptose-Induktoren, Antikörpern, Zytostatika oder Alkohol. Um die Frage zu klären, ob sowohl die mitogene als auch die protektive Eigenschaft von ALR ausschließlich auf hepatische Zellen wirkt, wurden weiterführende Experimente durchgeführt.

Um die mitogene Wirkung von ALR gegenüber Leberzellen zu untersuchen, wurden Zeitkinetiken der Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt/PKB bei primären Hepatozyten nach der Behandlung mit rhALR oder rhEGF erstellt. Mittels MTT und [3H] Thymidin-Assay wurde in primären Hepatozyten und

verschiedenen hepatischen und extrahepatischen Zelllinien die Proliferation gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass für einen vergleichbaren mitogenen Effekt *in vitro* eine höhere Dosis von ALR zugegeben werden musste als von EGF. Die Behandlung der Leberzellen mit ALR bzw. EGF führte zu deutlichen Unterschieden in den Zeitkinetiken der ERK1/2 bzw. Akt/PKB Phosphorylierung. Durch die Inkubation mit ALR zeigte sich ein vorübergehender Anstieg der ERK1/2 Phosphorylierung, wohingegen durch EGF ein permanenter Anstieg im Beobachtungszeitraum ausgelöst wurde. Grundsätzlich zeigte sich durch EGF im Gegensatz zu ALR in der Zeitkinetik ein schnellerer und längerfristiger Effekt sowohl im Bezug auf den ERK1/2- als auch Akt/PKB-Signalweg. Durch die Messung der Proliferation nach Inhibition des EGF-Rezeptor konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die mitogene Wirkung von ALR auch EGF-Rezeptor unabhängig wirken kann. Diese Ergebnisse sprechen vorerst für einen stärkeren mitogenen Effekt durch EGF, lassen jedoch keine Aussage über die möglichen unterschiedlichen Effekte der beiden Wachstumsfaktoren *in vivo* zu. Zusätzlich zu dem Nachweis einer mitogenen Wirkung konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt leberspezifisch ist. Vor diesem Hintergrund wurde im Folgenden die mögliche protektive Wirkung von ALR untersucht, indem hepatische und organotypische Krebszelllinien mit bzw. ohne ALR kultiviert wurden, bevor im Anschluss Apoptose durch tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), anti-Apo, transforming growth factor- β (TGF- β) und Actinomycin D (Act D) ausgelöst wurde. Mittels Messung der Cytochrom C-Abgabe durch die Mitochondrien und Durchflusszytometrie (FACS Analyse) mit Propidiumiodid-Färbung wurde die Apoptose bestimmt. In den hier verwendeten Toxizitätsmodellen konnte ALR die ausgelöste Apoptose signifikant verringern. In weiteren Experimenten wurde die Frage erörtert, welche Zellen durch den Einsatz von ALR im Zusammenhang mit z.B. der Chemotherapie von Lebermetastasen geschützt werden. Die Behandlungen von hepatischen Zellen im Vergleich zu Zelllinien des Pankreas, Kolons, Magens oder der Lunge zeigten eine leberspezifische anti-apoptische Wirkung von ALR.

Zusammenfassend wurden in den beiden vorliegenden Arbeiten die mitogene und anti-apoptische Eigenschaft von ALR genauer beschrieben, die im Rahmen des untersuchten Spektrums auf Tumorzelllinien anderer Organe keine Wirkung zeigte. Auch von anderen Wachstumsfaktoren, wie z.B. HGF, sind sowohl mitogene als auch anti-apoptische Wirkungen, bekannt. Diese wirken jedoch im Gegensatz zu ALR auch auf Zellen anderer Organsysteme. Somit gibt es in den vorliegenden *in vitro* Untersuchungen Hinweise für einen potentiellen therapeutischen Einsatz von ALR als Zytoprotektivum oder als Verstärker der Leberregeneration im eigentlichen Sinne seiner Bezeichnung. Diese vielversprechenden Fähigkeiten des Wachstumsfaktors ALR müssen für zukünftige Anwendungen *in vivo* genauer verifiziert werden.

7. Summary

The liver is the largest gland of the body performing a wide range of essential metabolic, exocrine and endocrine functions. After liver damage caused by different noxa, metabolic diseases, chronic alcohol abuse, trauma or resection, it has the unique capacity to regulate its growth and mass in order to regenerate and restore its function via complex mechanisms. Liver regeneration is a multilevel process driven by a complex system of regulatory signals, such as cytokines of the non-parenchymal cells and activation of several signalling pathways which control proliferation, apoptosis and metabolism.

The fact that the healthy liver has the ability to regenerate after loss of parenchyma provides the basis for liver surgery. The outcome of a liver resection depends on a lot of factors, with the regeneration capacity of the tissue being the essential factor, as impaired liver regeneration leads to hepatic insufficiency and liver failure. The clinical relevance is therefore the primary reason for ongoing research which seeks to both investigate therapeutic methods to improve liver regeneration and to widen surgical indications (in terms of more extensive surgical resection). Initial approaches focus on transplantation of hepatocytes and stem cells as cell growth stimulation. Another possibility that is being investigated is using cytokines and growth factors as a potential therapeutic drug to increase liver regeneration. The signalling pathways and effectiveness of growth factors like epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) have been well studied. It is known how they influence DNA synthesis, cell cycle and proliferation of hepatocytes *in vivo* and *in vitro*. The growth factor augmenter of liver regeneration (ALR), with the synonym growth factor erv1-like (GFER), could also play a key role both as a diagnostic marker in monitoring of liver regeneration and therapeutically as a "medication".

Therefore, the first aim of this thesis was to characterize involved signal transduction pathways which are stimulated after external application of recombinant human ALR (rhALR) *in vitro* and to elaborate the induction of cell proliferation in human liver cells in comparison to well-established growth factors like EGF. The fact that ALR not only activates the ERK1/2 but also the Akt/PKB survival signalling pathway provided the decisive evidence to carry out experiments on anti-apoptotic effects of ALR. Investigating the protection of hepatic cells by ALR administration from apoptosis induced by different agents including apoptosis inducer, antibodies, cytostatic drugs and alcohol was another step in revealing further characteristics of ALR. Further experiments have been carried out to find out whether both the mitogenic and protective feature of ALR can be observed in extrahepatic cells.

To investigate the capacity of ALR to induce proliferation in liver cells, kinetics of ERK1/2 and Akt/PKB phosphorylation were determined in primary human hepatocytes (phh) after stimulation with rhALR and rhEGF. Induction of proliferation was analyzed in phh and several cell lines of hepatic and extrahepatic origin by MTT and [3H]-thymidine assay. The comparison of ALR to EGF showed that a higher concentration of ALR had to be used to accomplish a comparable mitogenic effect as EGF. The kinetics of ERK1/2 and Akt/PKB phosphorylation induced by either EGF or ALR showed clear differences. Incubation with rhALR caused a transient increase of ERK1/2 phosphorylation whereas EGF led to a permanent increase during the observation period. Generally, the incubation of liver cells

with EGF caused a faster and longer effect regarding the phosphorylation of both the ERK1/2 and Akt/PKB signalling pathway as opposed to ALR. The induction of proliferation by rhALR after inhibition of EGF receptor did also prove that ALR can exert its mitogenic effect independent from EGF receptor. These findings appear to demonstrate a stronger mitogenic effect of EGF compared to ALR. However, it remains unclear what the different effects of the two growth factors cause *in vivo*. Therefore it is not possible to draw a conclusion about their final function. In addition to the proof of a mitogenic effect the results also show the liver specificity of this capacity of ALR. To analyze a possible protective effect of ALR, hepatic cells and organotypic cancer cell lines were cultured with and without ALR before apoptosis was induced by tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), anti-Apo, transforming growth factor- β (TGF- β) and actinomycin D (Act D). Apoptosis was evaluated by the release of cytochrome c from mitochondria and by flow cytometry (FACS analysis) with propidium iodide (PI) staining. Using these toxicity models, ALR significantly decreased apoptosis in primary human hepatocytes and a hepatic cell line. Further experiments were needed to clarify which kind of cells would be protected by ALR in combination with e.g. chemotherapy of liver metastases. The treatment of hepatic cells compared to pancreatic, colonic, gastric and bronchial cell lines proved the protective effect of ALR to be liver specific.

To summarize, the features and effects of the mitogenic and anti-apoptotic character of ALR have been specified. The results prove that ALR does not show any effects on cell lines of other organ systems in the examined setup and therefore acts specifically on the liver in a both mitogenic and anti-apoptotic way. Both mitogenic and anti-apoptotic effects have already been found for other growth factors like HGF. However, in contrast to ALR these factors influence not only hepatic cell cultures but also cells of a diversity of organ systems. Consequently, from the *in vitro* results identified in this thesis it is possible to assume that ALR could be used therapeutically to protect liver cells or as an augmenter of liver regeneration in terms of its literal name. The findings of this thesis legitimate the need for further research to verify these promising effects *in vivo* in particular to investigate the use of ALR as a potential inducer of liver regeneration or hepatoprotective cytokin in a clinical setting.

8. Literaturverzeichnis

- [1] A.M.Zorn, Liver development, in: Alexander F.Schier (Ed.), StemBook,The Stem Cell Research Community (2008).
- [2] N.Fausto, Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells *Hepatology* 39, (2004) 1477-1487.
- [3] N.Fausto, J.S.Campbell, The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation *Mech.Dev.* 120, (2003) 117-130.
- [4] C.Xu, X.Chen, C.Chang, G.Wang, W.Wang, L.Zhang, Q.Zhu, L.Wang, F.Zhang, Transcriptome analysis of hepatocytes after partial hepatectomy in rats *Dev.Genes Evol.* 220, (2010) 263-274.
- [5] X.Q.Wang, C.M.Lo, L.Chen, C.K.Cheung, Z.F.Yang, Y.X.Chen, M.N.Ng, W.C.Yu, X.Ming, W.Zhang, D.W.Ho, S.C.Chan, S.T.Fan, Hematopoietic chimerism in liver transplantation patients and hematopoietic stem/progenitor cells in adult human liver *Hepatology*(2012).
- [6] R.Bataller, D.A.Brenner, Liver fibrosis *J.Clin.Invest* 115, (2005) 209-218.
- [7] M.Pinzi, K.Rombouts, Liver fibrosis: from the bench to clinical targets *Dig.Liver Dis.* 36, (2004) 231-242.
- [8] M.Duvnjak, V.Tomasic, M.Gomercic, D.L.Smircic, N.Barsic, I.Lerotic, Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status *J.Physiol Pharmacol.* 60 Suppl 7, (2009) 57-66.
- [9] C.M.Oneta, J.F.Dufour, Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations *Swiss.Med.Wkly.* 132, (2002) 493-505.
- [10] D.Erdogan, O.R.Busch, D.J.Gouma, T.M.van Gulik, Morbidity and mortality after liver resection for benign and malignant hepatobiliary lesions *Liver Int.* 29, (2009) 175-180.
- [11] U.C.Pietsch, M.L.Herrmann, D.Uhlmann, T.Busch, F.Hokema, U.X.Kaisers, L.Schaffranietz, Blood lactate and pyruvate levels in the perioperative period of liver resection with Pringle maneuver *Clin.Hemorheol.Microcirc.* 44, (2010) 269-281.
- [12] S.Goyle, A.Maraveyas, Chemotherapy for colorectal cancer *Dig.Surg.* 22, (2005) 401-414.
- [13] S.R.Alberts, L.D.Wagman, Chemotherapy for colorectal cancer liver metastases *Oncologist.* 13, (2008) 1063-1073.
- [14] S.L.Koh, E.I.Ager, C.Christophi, Liver regeneration and tumour stimulation: implications of the renin-angiotensin system *Liver Int.* 30, (2010) 1414-1426.
- [15] G.D.Kirk, E.Bah, R.Montesano, Molecular epidemiology of human liver cancer: insights into etiology, pathogenesis and prevention from The Gambia, West Africa *Carcinogenesis* 27, (2006) 2070-2082.
- [16] M.Schwartz, S.Roayaie, M.Konstadoulakis, Strategies for the management of hepatocellular carcinoma *Nat.Clin.Pract.Oncol.* 4, (2007) 424-432.
- [17] A.Abulkhir, P.Limongelli, A.J.Healey, O.Damrah, P.Tait, J.Jackson, N.Habib, L.R.Jiao, Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis *Ann.Surg.* 247, (2008) 49-57.
- [18] D.Azoulay, D.Castaing, J.Krissat, A.Smail, G.M.Hargreaves, A.Lemoine, J.F.Emile, H.Bismuth, Percutaneous portal vein embolization increases the feasibility and safety of major liver resection for hepatocellular carcinoma in injured liver *Ann.Surg.* 232, (2000) 665-672.

- [19] S.G.Delis, J.Madariaga, A.Bakoyiannis, C.Dervenis, Current role of bloodless liver resection *World J.Gastroenterol.* 13, (2007) 826-829.
- [20] M.J.Schindl, D.N.Redhead, K.C.Fearon, O.J.Garden, S.J.Wigmore, The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection *Gut* 54, (2005) 289-296.
- [21] D.S.Di, E.Andorno, G.Varotti, U.Valente, Hepatic flow optimization in full right split liver transplantation *World J.Gastrointest.Surg.* 3, (2011) 110-02.
- [22] H.D.Gonzalez, J.Figuera, Practical questions in liver metastases of colorectal cancer: general principles of treatment *HPB (Oxford)* 9, (2007) 251-258.
- [23] G.Tsoufas, M.G.Pramateftakis, I.Kanellos, Surgical treatment of hepatic metastases from colorectal cancer *World J.Gastrointest.Oncol.* 3, (2011) 1-9.
- [24] K.Lehmann, A.Rickenbacher, A.Weber, B.C.Pestalozzi, P.A.Clavien, Chemotherapy before liver resection of colorectal metastases: friend or foe? *Ann.Surg.* 255, (2012) 237-247.
- [25] H.D.Gonzalez, Z.W.Liu, S.Cashman, G.K.Fusai, Small for size syndrome following living donor and split liver transplantation *World J.Gastrointest.Surg.* 2, (2010) 389-394.
- [26] A.B.Carter, G.W.Hunninghake, A constitutive active MEK --> ERK pathway negatively regulates NF-kappa B-dependent gene expression by modulating TATA-binding protein phosphorylation *J.Biol.Chem.* 275, (2000) 27858-27864.
- [27] M.A.Pagano, E.Tibaldi, E.Gringeri, B.A.Maria, Tyrosine phosphorylation and liver regeneration: A glance at intracellular transducers *IUBMB.Life* 64, (2012) spcone.
- [28] L.G.Koniaris, I.H.McKillop, S.I.Schwartz, T.A.Zimmers, Liver regeneration *J.Am.Coll.Surg.* 197, (2003) 634-659.
- [29] G.K.Michalopoulos, Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas *Am.J.Pathol.* 176, (2010) 2-13.
- [30] J.Rozga, Hepatocyte proliferation in health and in liver failure *Med.Sci.Monit.* 8, (2002) RA32-RA38.
- [31] N.Fausto, K.J.Riehle, Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications *J.Hepatobiliary.Pancreat.Surg.* 12, (2005) 181-189.
- [32] N.Fausto, J.S.Campbell, K.J.Riehle, Liver regeneration *Hepatology* 43, (2006) S45-S53.
- [33] B.A.Schotanus, d.van, I, L.C.Penning, J.Rothuizen, T.A.Roskams, B.Spee, Cross-species immunohistochemical investigation of the activation of the liver progenitor cell niche in different types of liver disease *Liver Int.* 29, (2009) 1241-1252.
- [34] R.Pawlowski, J.Jura, ALR and liver regeneration *Mol.Cell Biochem.* 288, (2006) 159-169.
- [35] J.I.Leu, M.A.Crissey, R.Taub, Massive hepatic apoptosis associated with TGF-beta1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice *J.Clin.Invest* 111, (2003) 129-139.
- [36] S.Oe, E.R.Lemmer, E.A.Conner, V.M.Factor, P.Leevee, J.Larsson, S.Karlsson, S.S.Thorgeirsson, R.Malik, C.Selden, H.Hodgson, Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration The role of non-parenchymal cells in liver growth *Hepatology* 40, (2004) 1098-1105.
- [37] R.Malik, C.Selden, H.Hodgson, The role of non-parenchymal cells in liver growth *Semin.Cell Dev.Biol.* 13, (2002) 425-431.

- [38] Z.Dong, H.Weil, R.Sun, Z.Tian, The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration *Cell Mol.Immunol.* 4, (2007) 241-252.
- [39] R.Reinehr, D.Haussinger, CD95 death receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver cell apoptosis and regeneration *Arch.Biochem.Biophys.*(2011).
- [40] G.K.Michalopoulos, Liver regeneration *J.Cell Physiol* 213, (2007) 286-300.
- [41] A.Natarajan, B.Wagner, M.Sibilia, The EGF receptor is required for efficient liver regeneration *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, (2007) 17081-17086.
- [42] K.E.Mortensen, A.Revhaug, Liver regeneration in surgical animal models - a historical perspective and clinical implications *Eur.Surg.Res.* 46, (2011) 1-18.
- [43] A.M.Brues, Y.Subbarow, E.B.Jackson, J.C.Aub, Growth inhibition by substances in liver *J.Exp.Med.* 71, (1940) 423-438.
- [44] A.Zimmermann, Regulation of liver regeneration *Nephrol.Dial.Transplant.* 19 Suppl 4, (2004) iv6-10.
- [45] C.P.Wang, L.Zhou, S.H.Su, Y.Chen, Y.Y.Lu, F.Wang, H.J.Jia, Y.Y.Feng, Y.P.Yang, Augmenter of liver regeneration promotes hepatocyte proliferation induced by Kupffer cells *World J Gastroenterol.* 12, (2006) 4859-4865.
- [46] S.R.Farrell, C.Thorpe, Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity *Biochemistry* 44, (2005) 1532-1541.
- [47] E.Gatzidou, G.Kouraklis, S.Theocharis, Insights on augmenter of liver regeneration cloning and function *World J Gastroenterol.* 12, (2006) 4951-4958.
- [48] C.K.Wu, T.A.Dailey, H.A.Dailey, B.C.Wang, J.P.Rose, The crystal structure of augmenter of liver regeneration: A mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase *Protein Sci.* 12, (2003) 1109-1118.
- [49] Y.Li, K.Weil, C.Lu, Y.Li, M.Li, G.Xing, H.Weil, Q.Wang, J.Chen, C.Wu, H.Chen, S.Yang, F.He, Identification of hepatopoietin dimerization, its interacting regions and alternative splicing of its transcription *Eur.J Biochem.* 269, (2002) 3888-3893.
- [50] J.Lu, W.X.Xu, Y.Q.Zhan, X.L.Cui, W.M.Cai, F.C.He, X.M.Yang, Identification and characterization of a novel isoform of hepatopoietin *World J Gastroenterol.* 8, (2002) 353-356.
- [51] T.Lisowsky, Removal of an intron with unique 3' branch site creates an amino-terminal protein sequence directing the scERV1 gene product to mitochondria *Yeast* 12, (1996) 1501-1510.
- [52] W.E.Thasler, T.Schlott, P.Thelen, C.Hellerbrand, F.Bataille, M.Lichtenauer, H.J.Schlitt, K.W.Jauch, T.S.Weiss, Expression of augmenter of liver regeneration (ALR) in human liver cirrhosis and carcinoma *Histopathology* 47, (2005) 57-66.
- [53] G.Wang, X.Yang, Y.Zhang, Q.Wang, H.Chen, H.Weil, G.Xing, L.Xie, Z.Hu, C.Zhang, D.Fang, C.Wu, F.He, Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1 *J.Biol.Chem.* 274, (1999) 11469-11472.
- [54] Y.Li, G.Xing, Q.Wang, M.Li, H.Weil, G.Fan, J.Chen, X.Yang, C.Wu, H.Chen, F.He, Hepatopoietin acts as an autocrine growth factor in hepatoma cells *DNA Cell Biol.* 20, (2001) 791-795.

- [55] M.Hagiya, A.Francavilla, L.Polimeno, I.Ihara, H.Sakai, T.Seki, M.Shimonishi, K.A.Porter, T.E.Starzl, Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, (1994) 8142-8146.
- [56] V.N.Daithankar, S.R.Farrell, C.Thorpe, Augmenter of liver regeneration: substrate specificity of a flavin-dependent oxidoreductase from the mitochondrial intermembrane space *Biochemistry* 48, (2009) 4828-4837.
- [57] T.E.Starzl, A.F.Jones, J.Terblanche, S.Usui, K.A.Porter, G.Mazzoni, Growth-stimulating factor in regenerating canine liver *Lancet* 1, (1979) 127-130.
- [58] I.J.Fox, J.Roy-Chowdhury, Hepatocyte transplantation *J.Hepatol.* 40, (2004) 878-886.
- [59] Y.Yu, J.E.Fisher, J.B.Lillegard, B.Rodysill, B.Amiot, S.L.Nyberg, Cell therapies for liver diseases *Liver Transpl.* 18, (2012) 9-21.
- [60] T.Tomiya, M.Omata, H.Imamura, K.Fujiwara, Impaired liver regeneration in acute liver failure: the significance of cross-communication of growth associated factors in liver regeneration *Hepatol.Res.* 38, (2008) S29-S33.
- [61] A.Ido, H.Tsubouchi, Translational research to identify clinical applications of hepatocyte growth factor *Hepatol.Res.* 39, (2009) 739-747.
- [62] L.M.Zhang, D.W.Liu, J.B.Liu, X.L.Zhang, X.B.Wang, L.M.Tang, L.Q.Wang, Effect of naked eukaryotic expression plasmid encoding rat augmenter of liver regeneration on acute hepatic injury and hepatic failure in rats *World J.Gastroenterol.* 11, (2005) 3680-3685.
- [63] G.Gribilas, A.Zarros, A.Zira, C.Giaginis, G.Tsourouflis, C.Liapi, C.Spiliopoulou, S.E.Theocharis, Involvement of hepatic stimulator substance in experimentally induced fibrosis and cirrhosis in the rat *Dig.Dis.Sci.* 54, (2009) 2367-2376.
- [64] Y.Cao, Y.L.Fu, M.Yu, P.B.Yue, C.H.Ge, W.X.Xu, Y.Q.Zhan, C.Y.Li, W.Li, X.H.Wang, Z.D.Wang, Y.H.Li, X.M.Yang, Human augmenter of liver regeneration is important for hepatoma cell viability and resistance to radiation-induced oxidative stress *Free Radic.Biol.Med.* 47, (2009) 1057-1066.
- [65] M.Song, X.Yi, W.Chen, Y.Yuan, X.Zhang, J.Li, M.Tong, G.Liu, S.You, X.Kong, Augmenter of liver regeneration (ALR) gene therapy attenuates CCl₄-induced liver injury and fibrosis in rats *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 415, (2011) 152-156.
- [66] C.F.Gao, F.G.Zhou, H.Wang, Y.F.Huang, Q.Ji, J.Chen, Genetic recombinant expression and characterization of human augmenter of liver regeneration *Dig.Dis.Sci.* 54, (2009) 530-537.
- [67] L.Polimeno, B.Pesetti, S.F.De, L.Resta, R.Rossi, P.A.De, B.Girardi, A.Amoroso, A.Francavilla, Decreased expression of the augmenter of liver regeneration results in increased apoptosis and oxidative damage in human-derived glioma cells *Cell Death.Dis.* 3, (2012) e289.
- [68] L.Polimeno, B.Pesetti, E.Annoscia, F.Giorgio, R.Francavilla, T.Lisowsky, A.Gentile, R.Rossi, A.Bucci, A.Francavilla, Alrp, a survival factor that controls the apoptotic process of regenerating liver after partial hepatectomy in rats *Free Radic.Res.* 45, (2011) 534-549.
- [69] V.N.Daithankar, W.Wang, J.R.Trujillo, C.Thorpe, Flavin-linked Erv-family sulfhydryl oxidases release superoxide anion during catalytic turnover *Biochemistry* 51, (2012) 265-272.
- [70] Q.Li, D.W.Liu, L.M.Zhang, B.Zhu, Y.T.He, Y.H.Xiao, Effects of augmentation of liver regeneration recombinant plasmid on rat hepatic fibrosis *World J Gastroenterol.* 11, (2005) 2438-2443.

- [71] S.Hongbo, C.Yu, K.Ming, S.Honglin, H.Yuanping, D.Zhongping, Augmenter of Liver Regeneration may be a Candidate for Prognosis of HBV Related Acute-on-Chronic Liver Failure as a Regenerative Marker *Hepatogastroenterology* 59, (2012).
- [72] R.Dayoub, H.Wagner, F.Bataille, O.Stoltzing, T.Spruss, C.Buechler, H.J.Schlitt, T.S.Weiss, Liver regeneration associated protein (ALR) exhibits antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma *Mol.Med.* 17, (2011) 221-228.
- [73] Y.Chen, F.Luo, S.Luo, Z.Wu, J.Zhou, The augmenter of liver regeneration protects the kidneys after orthotopic liver transplantation possibly by upregulating HIF-1alpha and O₂-sensitive K⁺ channels *Surg.Today* 41, (2011) 382-389.

9. Publikationen für die kumulative Dissertation

1. Augmenter of liver regeneration causes different kinetics of ERK1/2 and Akt/PKB phosphorylation than EGF and induces hepatocyte proliferation in an EGF receptor independent and liver specific manner

Autoren: Maren Ilowski, Christine Putz, Thomas S. Weiss, Stephan Brand, Karl-Walter Jauch, Jan G. Hengstler, Wolfgang Erwin Thasler

Journal: Biochemical and Biophysical Research Communications

Volume: 394

Seitenzahl: 915–920

Jahr: 2010

Link: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10005255>

Impact Factor: 2.595

2. Augmenter of liver regeneration (ALR) protects human hepatocytes against apoptosis

Autoren: Maren Ilowski, Axel Kleespies, Enrico N. de Toni, Barbara Donabauer, Karl-Walter Jauch, Jan G. Hengstler, Wolfgang E. Thasler

Journal: Biochemical and Biophysical Research Communications

Volume: 404

Seitenzahl: 148–152

Jahr: 2011

Link: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10021492>

Impact Factor: 2.484

Teile dieser Arbeiten wurden auf der 88. Jahrestagung Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V. (München), der 25. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber – GASL (Heidelberg) und auf dem 2nd Joint Meeting of Hepatocyte User Group & Medicon Valley Hepatocyte User Forum (Montpellier) präsentiert.

Weitere Publikationen

1. Nussler AK, Zeilinger K, Schyschka L, Ehnert S, Gerlach JC, Yan X, Lee SM, **Ilowski M**, Thasler WE, Weiss TS. Cell therapeutic options in liver diseases: cell types, medical devices and regulatory issues. Journal of Materials Science: Materials in Medicine: Volume 22, Issue 5 (2011), Page 1087-1099



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Augmenter of liver regeneration causes different kinetics of ERK1/2 and Akt/PKB phosphorylation than EGF and induces hepatocyte proliferation in an EGF receptor independent and liver specific manner

Maren Ilowski^a, Christine Putz^a, Thomas S. Weiss^b, Stephan Brand^c, Karl-Walter Jauch^a, Jan G. Hengstler^d, Wolfgang Erwin Thasler^{a,*}

^a Department of Surgery, Ludwig-Maximilians-University of Munich Hospital Grosshadern, Munich, Germany

^b Department of Surgery, University of Regensburg Hospital, Regensburg, Germany

^c Department of Internal Medicine II, Ludwig-Maximilians-University of Munich Hospital Grosshadern, Munich, Germany

^d Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, TU Dortmund University, Dortmund, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2010

Available online 15 March 2010

Keywords:

Augmenter of liver regeneration

Human hepatocytes

Liver regeneration

AKT/PKB

ERK1/2

Liver specificity

ABSTRACT

Background/Aim: Augmenter of liver regeneration (ALR) is a potent growth factor which supports liver regeneration in experimental animals. The aim of this study was to compare proliferation as well as the kinetics of ERK1/2 and Akt/PKB phosphorylation by recombinant human ALR (rhALR) and EGF in human hepatocytes and extrahepatic cells.

Methods: Kinetics of ERK1/2 and Akt/PKB phosphorylation were determined in primary human hepatocytes (pnh) after stimulation with rhALR and EGF. Induction of proliferation was analyzed in pnh and several cell lines of hepatic and extrahepatic origin by the MTT and [³H]-thymidine assay.

Results: The kinetics of ERK phosphorylation showed clear differences, whereby rhALR caused a transient and EGF a permanent increase during the observation period of 60 min. For both, Akt and ERK phosphorylation, EGF caused a faster effect with maximal levels observed already after 2 min, whereas rhALR caused maximal phosphorylation between 10 and 15 min. Using the EGF receptor inhibitor AG1478 we provide evidence of an EGF receptor independent induction of proliferation by rhALR. Furthermore, rhALR induced proliferation only in pnh and the human liver derived cell lines HepG2 and Chang. In contrast, EGF enhanced proliferation in all analyzed cell types including cell lines of colon, bronchial, pancreatic and gastric origin (SW480, BC1, L36PL and GC1).

Conclusion: rhALR and EGF induce different kinetics of ERK and Akt phosphorylation in human hepatocytes. The mitogenic effect of rhALR is liver specific and seems to be at least partially independent from EGF receptor mediated signaling.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The liver has the unique capacity to regulate its growth and mass and is a well characterized biological system for studying cell proliferation and differentiation. Although adult hepatocytes are

quiescent cells, they retain their ability to proliferate and regenerate damaged hepatic tissue after toxic injury and infections [1]. Liver regeneration is driven by a complex system of regulatory signals which control proliferation, apoptosis and metabolism. Many growth factors such as TGF α , EGF, heparin-binding EGF and HGF are highly expressed after partial hepatectomy and are thought to be important in driving liver regeneration [2–4]. EGF is a low-molecular-weight mitogenic protein that stimulates proliferation of mesenchymal, glial and epithelial cells. ALR belongs to a novel family called “cytozymes”, which comprises properties of both cytokines and enzymes as a flavin-linked sulfhydryl oxidative activity [5]. Together with the *Saccharomyces cerevisiae* homologue Erv1p4, it is a member of the new ALR/Erv1 protein family [6]. Compared to EGF not much is known about both the pathways and mechanisms activated by ALR and which cell types or organs are regulated by ALR. So far it is known that ALR is mainly

Abbreviations: AP-1, activator protein-1; rhALR, recombinant human augmenter of liver regeneration; EGF, epidermal growth factor; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FCS, fetal calf serum; HGF, hepatocyte growth factor; JAB1, Jun activation domain-binding protein 1; LPS, lipopolysaccharide; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; MAPKK/MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium; PH, partial hepatectomy; pnh, primary human hepatocytes; AKT/PKB, protein kinase B; TGF α , Transforming growth factor alpha

* Corresponding author at: Ludwig-Maximilians-University of Munich Hospital Grosshadern, Marchioninistraße 15, D-81377 Munich, Germany. Fax: +49 89 7095 6436.

E-mail address: wolfgang.thasler@med.uni-muenchen.de (W.E. Thasler).

produced and stored in hepatocytes and acts as an autocrine factor. Mammalian ALR is found in a short form of 15 kDa, mainly present in the cytoplasm, and a longer isoform (23 kDa), which is localized in the intermembrane space of mitochondria. Mechanisms of recombinant hALR signaling have been shown in triggering the MAPK pathway by binding its receptor on the cell surface. It is known that ALR leads to an activation of transcription factor activator protein-1 (AP-1) via the MAPK pathway [7]. Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1), a co-activator of AP-1, which is essential for liver regeneration, specifically interacts with intracellular ALR. Furthermore, ALR modulates hepatic metabolism by reduction of cytochrome P450 activity in human hepatocytes *in vitro* via NF κ B [8]. The aim of this study was to characterize involved signal transduction pathways which are stimulated after external application of recombinant human ALR *in vitro* and to elaborate the induction of cell proliferation in human liver cells in comparison to well-established growth factors like EGF. Investigating the influence of ALR and other common growth factors on proliferation of cell lines of different origins was another step in characterizing new features of ALR.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Recombinant human ALR (rhALR) was prepared as described recently [6]. Fractions containing rhALR protein were combined and dialyzed against dialysis buffer (25 mM Hepes, 0.1% Tween 20, and 1 mM EDTA, pH 8.2) at 4 °C, with a threefold buffer change. Afterwards, rhALR protein was concentrated using a 5 kDa cut-off ultra-free-15 centrifugal filter device (Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) [9]. Recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) was obtained from Biomol GmbH, Germany [10]. All antibodies were purchased from Cell Signaling Technology, Beverly, MA.

2.2. Isolation of primary human hepatocytes

Tissue samples from human liver resections were obtained from patients undergoing partial hepatectomy. Experimental procedures were performed according to the guidelines of the charitable state-controlled foundation Human Tissue and Cell Research (HTCR) with informed patient's consent approved by the local ethical committee of the Ludwig-Maximilians-University of Munich [10]. Human hepatocytes were isolated using a modified two-step EGTA/collagenase perfusion procedure as described previously [11]. Viability of isolated hepatocytes was determined by trypan blue exclusion. Cells with a viability >80% were used for cell culture.

2.3. Primary hepatocytes culture

Cells were plated on collagen gel layer (BD biocoated Collagen I) 6-well plates for Western blots, 12-well plates for FACS analysis and 96-well plates for proliferation assays in appropriate volume of culture media. The medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 5% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1.7 mU/ml insulin, 3.75 ng/ml hydrocortisone, 100 μ g/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin. Cells were incubated at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. Viability of hepatocytes during culture period was monitored by cell morphology (light microscopy, image analysis).

2.4. Cell lines and culture conditions

The bronchial (BC1 Tu) and gastric (GC1 LN-Tu) cell lines were kindly provided by Dr. N. van den Engel, Ludwig-Maximilians-Uni-

versity, Munich [12]. All cell lines were plated on 12-well plates for FACS analysis and 96-well plates for proliferation assays in appropriate volumes of culture media. Human hepatic cell lines (HepG2) were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum, 4 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin. Bronchial (BC1 Tu), colon (SW480), and gastric (GC1 LN-Tu) cell lines were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids (NEAA) and 50 μ g/ml gentamycin. Pancreatic (L3.6PL) carcinoma cell lines were cultured in DMEM including 1 g/ml glucose, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 12% FBS, 2.4 \times MEM vitamine mixture, 2.4 \times MEM non-essential amino acids, 120 U penicillin/ml and 20 μ g/ml streptomycin. All cell lines were cultivated in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Gel electrophoresis and immunoblotting was performed as previously described [13].

2.5. Proliferation assay (MTT)

All cells were allowed to attach overnight. The cells were stimulated with ALR and EGF as indicated or with cytokine-free medium (negative control). The cell proliferation rate was determined by MTT assay after 24/48 h incubation using the CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Proliferation assay (³H]-thymidine assay)

The rate of proliferation of cells was measured by the incorporation of [³H]-thymidine into cellular nucleic acids. Therefore primary hepatocytes or HepG2 cells were plated on 96-well-plates and incubated with or without growth factors for 24 h. The cells were labelled by incubation with 2 μ Ci of [³H]-thymidine (Amersham, Little Chalfont, UK) for 16 h. Using a cell harvester (Skatron, Sterling, VA), the cells were collected and then washed on filters (Dunn, Ansbach, Germany). The amount of radiolabeled [³H]-thymidine incorporated into DNA was analyzed with a beta counter (LKB/Pharmacia, Uppsala, Sweden). The cultures were assayed in triplicates and the results expressed as mean counts per minute. The stimulation index was calculated as the ratio of counts per minute obtained in the presence of ALR or EGF as indicated to that obtained without cytokine.

2.7. Western blot analysis

After 16 h attachment, medium was replaced by FCS free medium for 24 h. Afterwards pre-starvation medium was added for 12–16 h and finally replaced by starvation medium for 3 h [14]. Protein concentrations were measured using BCA Protein Assay[®] (Pierce, Rockford, IL). The proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked for 1 h in TBS-T 5% milk-solution, incubated overnight with the primary antibody (phosphor-Erk, phosphor-Akt, Erk1/2 and Akt/PKB), for 1 h with the secondary antibody (anti-rabbit-HRP) and incubated for 1 min with the chemiluminescent reagent LumiGlo[™]. Densitometric analysis was carried out using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). The effect on phosphorylation of Akt was investigated after inhibition of EGF receptor phosphorylation, MEK or PI3K with rhALR treatment in pphs. After 24 h serum starvation primary human liver cells were pre-incubated for 20 min with 15 μ mol/l Wortmannin, 10 μ mol/l AG1478 and 50 μ mol/l PD98059, respectively and either untreated or treated with 750 ng/ml rhALR thereafter.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using two-tailed Student's *t*-test. *P* levels <0.05 were considered as significant.

3. Results

3.1. ALR enhances cell proliferation in a dose-dependent manner *in vitro*

ALR has been shown to be highly expressed during liver cell proliferation [6]. Performing MTT-assays with rhALR, concentrations of 300 ng/ml or more significantly increased cell proliferation in HepG2 cell line and primary human hepatocytes ($p < 0.05$, compared to unstimulated controls, data not shown). Similar results were obtained using the [³H]-thymidine incorporation assay with primary human hepatocytes (phh) and HepG2 cells which demonstrated a significant increase of cell proliferation at a low cell number using 750 ng/ml rhALR ($p < 0.021$) in primary human hepatocytes and 300 ng/ml rhALR ($p < 0.031$) in HepG2 cells, respectively (data not shown). This proliferation stimulating effect was up to 49% compared to control with phh and up to 31% with HepG2 cells which is comparable to the effect triggered by established hepatic growth factors such as EGF.

3.2. ALR acts via phosphorylation of ERK1/2 and Akt/PKB in a time-dependent manner

It is known that ERK1/2 activation can mediate proliferation [15–19]. Stimulation of cultivated human hepatocytes with rhALR caused an increase of pERK1/2, whereby the kinetics of pERK1/2 showed two key features: (i) considering the observation period of 60 min the increase was transient with a maximum after approximately 10 min followed by a decrease to control levels after approximately 60 min, (ii) the increase in pERK1/2 was relatively slow, whereby the maximum was not reached before 10 min incubation with rhALR (Fig. 1A). In contrast, stimulation with EGF caused an increase in phosphorylation of ERK1/2 characterized by (i) a permanent increase over the 60 min observation period

and (ii) a rapid increase, which was maximal already after 2 min (Fig. 1B). Similar kinetics of ERK1/2 phosphorylation was found in HepG2 cells (data not shown). The phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway has been shown to regulate numerous cellular processes such as growth, proliferation, cell cycle progression, adhesion and angiogenesis [20–22]. Our data show an increase in phosphorylation of Akt with a maximum after 15 min incubation with rhALR (Fig. 2A). In contrast, EGF caused maximal phosphorylation of Akt/PKB already after 2 min, steadily decreasing thereafter (Fig. 2B).

3.3. ALR shows EGF receptor independent effects on proliferation

Stimulation of human hepatocytes with rhALR caused significant increase of proliferation compared to controls. Blocking EGF receptor and MEK phosphorylation by 10 μ mol/l AG1478 and 50 μ mol/L PD98059 caused a 0.4- and 0.3-fold decrease of pERK1/2, respectively. In presence of AG1478 or PD98059, rhALR did no longer cause an increase of ERK phosphorylation (data not shown). A different scenario was obtained for analysis of proliferation. Blocking pEGF-R or MEK decreased basal levels. However, rhALR was still able to induce proliferation even in presence of AG1478 or PD98059 (Fig. 3). This suggests at least partially an EGF receptor independent mechanism for rhALR induced proliferation in human hepatocytes.

3.4. ALR – a hepatotropic growth factor

As ALR might possess some features applicable in a therapeutic way, we investigated the influence on non-hepatic cells. ALR stimulates proliferation of primary human hepatocytes to a similar extent as EGF. In order to investigate whether that is a cell type specific effect, various cell lines established from hepatic and extrahepatic tissues were analyzed. rhALR did not cause a significant change ($p > 0.5$) in proliferation in non-hepatic cells, such as colon, gastric and bronchial cell lines. In contrast to rhALR significant increases were induced by EGF ($p < 0.023$ compared to unstimulated controls, Fig. 4). Thus, compared to EGF, the proliferative effect of rhALR seems to be liver specific. In contrast, growth

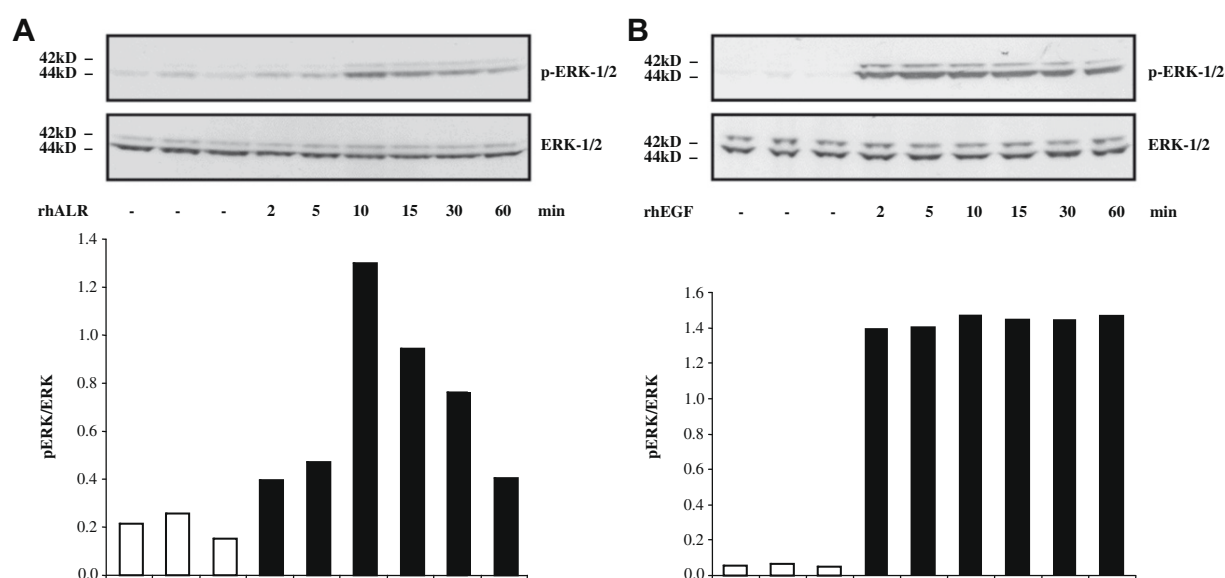


Fig. 1. Effect on phosphorylation of ERK after growth factor treatment in primary human liver cells. (A) Phh were either untreated or treated with 750 ng/ml rhALR for 2, 5, 10, 15, 20, 30 and 60 min after 24 h serum starvation. (B) Phh were either untreated or treated with 20 ng/ml EGF for 2, 5, 10, 15, 20, 30 and 60 min after 24 h serum starvation. Western blot was performed with antibodies for ERK (lower panel) and phospho-ERK (upper panel). Time-dependent effects on phosphorylation of ERK compared to total ERK are shown. One representative gel and appending quantitative analysis for the densitometry of the results from three separate experiments is presented.

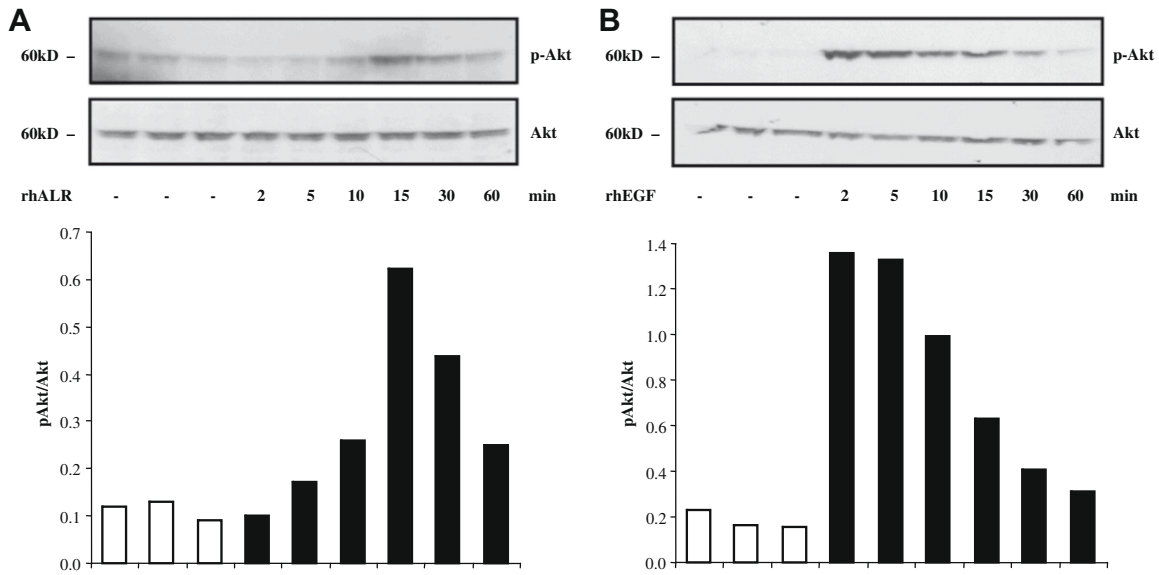


Fig. 2. Effect on phosphorylation of Akt after growth factor treatment in primary human liver cells. (A) Phh were either untreated or treated with 750 ng/ml rhALR for 2, 5, 10, 15, 20, 30 and 60 min after 24 h serum starvation. (B) Cells were either untreated or treated with 20 ng/ml EGF for 2, 5, 10, 15, 20, 30 and 60 min after 24 h serum starvation. Western blot was performed with antibodies for Akt (lower panel) and phospho-Akt (upper label). Time-dependent effects on phosphorylation of Akt compared to total Akt are shown. One representative gel and appending quantitative analysis for the densitometry of the results from three separate experiments is presented.

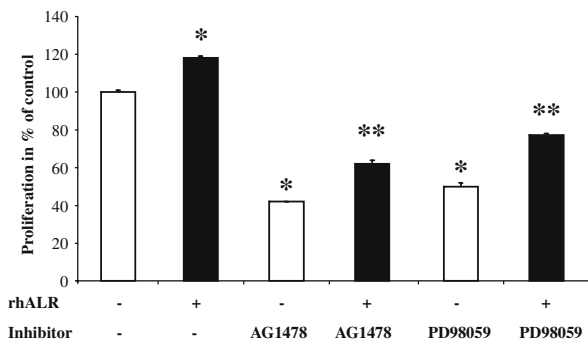


Fig. 3. Change in proliferation after inhibition of EGF receptor and MEK respectively of primary human liver cells. After 24 h serum starvation phh were pre-incubated for 20 min with 10 μmol/l AG1478 and 50 μmol/l PD98059, respectively and either treated with 750 ng/ml rhALR (black bars) or untreated thereafter. MTT assay was performed in triplicates. $p < 0.05$ vs. non-treated cells using students *t*-test. $p < 0.05$ vs. ALR-treated cells using students *t*-test.

factors like EGF or HGF show mitogenic activity in a wide range of cell types.

4. Discussion

Human hepatocytes represent a generally accepted *in vitro* system for studies of liver metabolism. Using adequate culture conditions most enzymes responsible for hepatic metabolism remain active. However, a disadvantage working with human hepatocytes is limited availability since hepatocytes have to be isolated from resected tissues. Despite of great efforts taken it is not yet possible to efficiently proliferate human hepatocytes in culture [23]. Primary cells show relatively high levels of baseline apoptosis and cell death. Therefore, all experiments were additionally performed with a human hepatic cell line (HepG2).

The aim of this study was to characterize signal transduction pathways which are induced by recombinant human ALR *in vitro* and to compare the situation after rhALR stimulation to that of recombinant human EGF. EGF and ALR activate an exten-

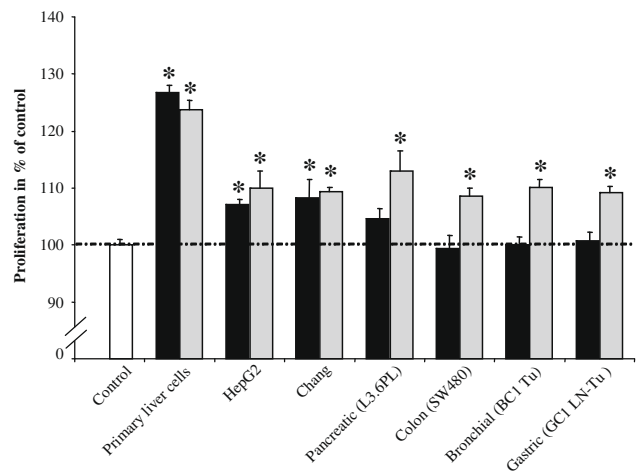


Fig. 4. Liver specificity of rhALR. Change in proliferation of hepatic cells and cell lines of extrahepatic tissues after dosing with rhALR and rHEGF. After treatment with 750 ng/ml rhALR (black bars) and EGF 20 ng/ml (grey bars), respectively and cultivation under serum-free medium condition, MTT assay was performed in triplicates. $p < 0.05$ vs. control using students *t*-test.

sive network of signal transduction pathways, including PI3K/AKT, RAS/ERK and JAK/STAT. It has been shown that several growth factors induce proliferation via the MEK/ERK pathway [7]. Here, we compared the stimulation of ERK1/2 phosphorylation by rhALR and rHEGF and observed striking differences. rHEGF caused a rapid increase in ERK1/2 phosphorylation which was maximal already 2 min after exposure. In contrast, rhALR required approximately 10 min until ERK1/2 phosphorylation reached maximal levels. Another striking difference between rHEGF and rhALR was that rHEGF caused a permanent and rhALR a transient increase of ERK1/2 phosphorylation. The time course of ERK phosphorylation may be of high relevance, because different kinetics may lead to completely different biological responses. For example, EGF induces a transient increase in ERK1/2 phosphorylation in PC12 cells leading to proliferation, whereas NGF induces a

permanent increase in ERK1/2 phosphorylation which triggers neuronal differentiation of the same cells [24]. Differences in feedback loops have been shown to be responsible for the distinct phosphorylation kinetics after EGF and NGF stimulation. Whether differences in ERK1/2 activation kinetics in human hepatocytes after stimulation with rhEGF and rhALR also lead to different biological responses still has to be elucidated.

A new finding of this study is the fact that ALR also stimulates the phosphorylation of PI3K/AKT in a time-dependent manner. Phosphorylation of PI3K/AKT by rhALR peaked after 15 min whereas rhEGF caused maximal phosphorylation much earlier followed by a decrease thereafter. For PI3K/AKT phosphorylation different time courses were observed after stimulation with rhEGF and rhALR as well. As the PI3K/AKT pathway triggers anti-apoptotic signals this possible new feature of ALR needs to be further investigated. In our study, the phosphorylation of GSK-3 β , a downstream protein of the Akt/PKB survival pathway, showed the same time response like Akt and therefore strengthens the hypothesis of a pro-survival effect of ALR (data not shown). Furthermore, our results demonstrate that ALR can induce proliferation in an EGF receptor independent way.

The ALR gene may play an important role in relieving acute hepatic injury and hepatic failure by promoting hepatic cell proliferation and reducing levels of AST and ALT which has already been shown in CCl₄-intoxicated rats [25]. In hepatoma cells, ALR gene expression protects cells against H₂O₂ injury [26]. This effect is likely to be associated with preservation of mitochondria. Current studies also showed a protective effect of ALR on ROS-induced apoptosis in human neuroblastoma cells [27]. Taken together, a possible role of ALR as an antioxidant needs to be further investigated.

ALR has already been reported to represent a potent growth factor and a mitogen for hepatocytes [25]. Originally purified from weanling rat livers [28,29], ALR significantly improved liver regeneration after resection or liver damage [30]. Our results show that in contrast to other growth factors influencing liver regeneration, ALR exhibits its action exclusively on hepatocytes and hepatoma cells [30–32]. Many factors known to induce or support hepatocyte proliferation, such as EGF, hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF-1) and transforming growth factor (TGF- α) and insulin can also stimulate proliferation of a wide variety of other cell types than hepatocytes [7,33,34]. In contrast ALR exclusively stimulated hepatocytes and hepatoma cells in the present study. This liver specificity suggests that ALR might be useful for the treatment of liver diseases, e.g. resection of liver metastasis with colorectal cancer or in support of liver regeneration after hepatectomy. Our results show a slight influence of ALR on pancreatic cell lines as well, which can be interpreted by the common embryological origin from the endoderm of liver and pancreas [35–37].

In summary, we have demonstrated that rhEGF and rhALR lead to different ERK1/2 phosphorylation kinetics. rhALR also activates the PI3K/AKT signaling pathway, which has not been described before. The clinically most important finding is that ALR specifically acts on hepatocytes, and therefore might be used to support liver regeneration without stimulating the growth of micrometastasis.

Acknowledgments

We thank B. Donabauer and M. Kussmaul (all University of Munich) for excellent technical support, F. Stadler for great support and J. Dambacher for technical assistance with Western blot. We acknowledge the Foundation Human Tissue and Cell Research (HTCR) for supporting our research by making human liver tissue available as well as hepacult GmbH for supplying cell isolation and cultivation technology.

Appendix A. Supplementary data

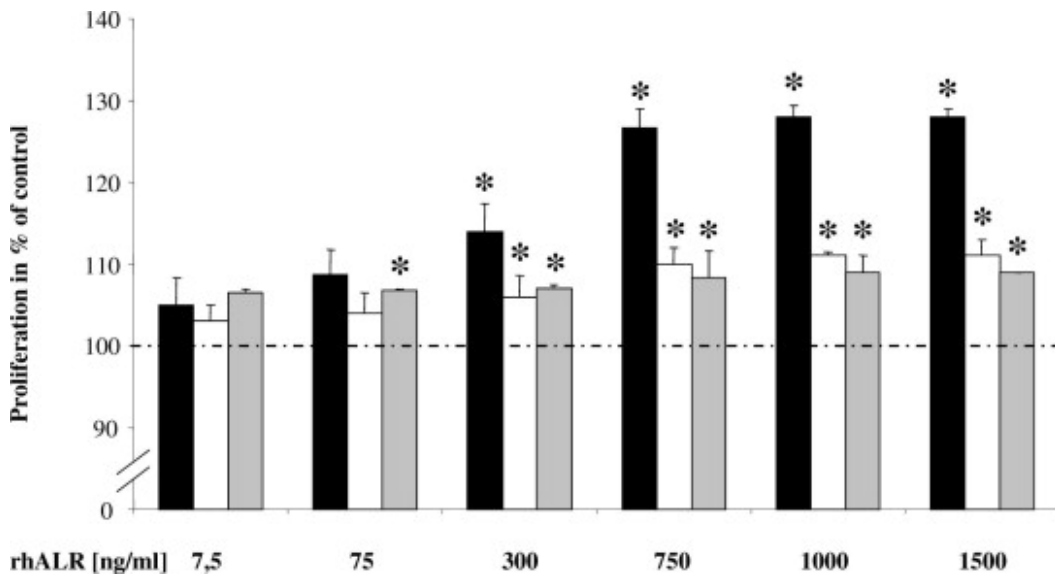
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.074.

References

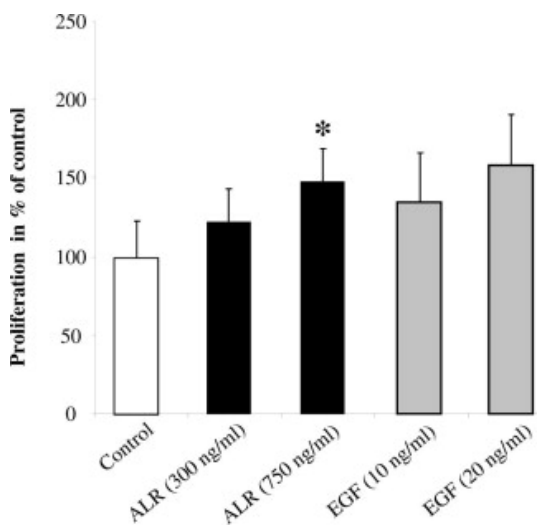
- [1] A. Natarajan, B. Wagner, M. Sibilio, The EGF receptor is required for efficient liver regeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 17081–17086.
- [2] A. Fraschini, M.G. Bottone, A.I. Scovassi, M. Denegri, M.C. Risueno, P.S. Testillano, T.E. Martin, M. Biggiogera, C. Pellicciari, Changes in extranuclear transcription during actinomycin D-induced apoptosis, *Histol. Histopathol.* 20 (2005) 107–117.
- [3] D. Shim, H.Y. Kang, B.W. Jeon, S.S. Kang, S.I. Chang, H.Y. Kim, Protein kinase B inhibits apoptosis induced by actinomycin D in ECV304 cells through phosphorylation of caspase 8, *Arch. Biochem. Biophys.* 425 (2004) 214–220.
- [4] Y. Okada, M. Kato, H. Minakami, Y. Inoue, A. Morikawa, K. Otsuki, H. Kimura, Reduced expression of flippase-inhibitory protein (FLIP) and NF κ B is associated with death receptor-induced cell death in human aortic endothelial cells (HAECs), *Cytokine* 15 (2001) 66–74.
- [5] S.R. Farrell, C. Thorpe, Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity, *Biochemistry* 44 (2005) 1532–1541.
- [6] W.E. Thasler, T. Schlott, P. Thelen, C. Hellerbrand, F. Bataille, M. Lichtenauer, H.J. Schlitt, K.W. Jauch, T.S. Weiss, Expression of augmenter of liver regeneration (ALR) in human liver cirrhosis and carcinoma, *Histopathology* 47 (2005) 57–66.
- [7] Y. Li, M. Li, G. Xing, Z. Hu, Q. Wang, C. Dong, H. Wei, G. Fan, J. Chen, X. Yang, S. Zhao, H. Chen, K. Guan, C. Wu, C. Zhang, F. He, Stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by hepatopoietin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 37443–37447.
- [8] W.E. Thasler, R. Dayoub, M. Muhlbauer, C. Hellerbrand, T. Singer, A. Grabe, K.W. Jauch, H.J. Schlitt, T.S. Weiss, Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by a novel hepatotrophic factor, augmenter of liver regeneration, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316 (2006) 822–829.
- [9] R. Dayoub, W.E. Thasler, A.K. Bosserhoff, T. Singer, K.W. Jauch, H.J. Schlitt, T.S. Weiss, Regulation of polyamine synthesis in human hepatocytes by hepatotrophic factor augmenter of liver regeneration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 181–187.
- [10] W.E. Thasler, T.S. Weiss, K. Schillhorn, P.T. Stoll, B. Irrgang, K.W. Jauch, Charitable state-controlled foundation human tissue and cell research: ethical and legal aspects in the supply of surgically removed human tissue for research in the academic and commercial sector in Germany, *Cell Tissue Bank.* 4 (2003) 49–56.
- [11] T.S. Weiss, S. Pahernik, I. Scheruebl, K.W. Jauch, W.E. Thasler, Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid, *J. Hepatol.* 38 (2003) 476–482.
- [12] N.K. van den Engel, H. Winter, D. Ruttinger, I. Shau, M. Schiller, B. Mayer, T. Moudgil, G. Meimarakis, M. Stolte, K.W. Jauch, B.A. Fox, R.A. Hatz, Characterization of immune responses in gastric cancer patients: a possible impact of *H. pylori* to polarize a tumor-specific type 1 response?, *Clin Immunol.* 120 (2006) 285–296.
- [13] S. Brand, T. Sakaguchi, X.B. Gu, S.P. Colgan, H.C. Reinecker, Fractalkine-mediated signals regulate cell-survival and immune-modulatory responses in intestinal epithelial cells, *Gastroenterology* 122 (2002) 166–177.
- [14] U. Klingmüller, A. Bauer, S. Bohl, K. Breitkopf, S. Dooley, S. Zellmer, C. Kern, I. Merfort, T. Sparna, J. Donauer, G. Walz, M. Geyer, C. Kreutz, M. Hermes, D. Walter, L. Egger, K. Neubert, C. Borner, M. Brulport, W. Schormann, C. Sauer, F. Baumann, R. Preiss, P. Illes, P.J. Nickel, S. MacNelly, P. Godoy, E. Wiercinska, L. Ciucian, K. Zeilinger, M. Heinrich, U.M. Zanger, M. Reuss, A. Bader, R. Gebhardt, T. Maiwald, J. Timmer, F. von Weizsacker, J.G. Hengstler, Primary mouse hepatocytes for systems biology approaches: a standardized in vitro system for modeling of signal transduction pathways, in: Anonymous, 2006.
- [15] W. An, X.J. Liu, T.G. Lei, J. Dai, G.G. Du, Growth induction of hepatic stimulator substance in hepatocytes through its regulation on EGF receptors, *Cell Res.* 9 (1999) 37–49.
- [16] A.B. Carter, G.W. Hunninghake, A constitutive active MEK-ERK pathway negatively regulates NF- κ B-dependent gene expression by modulating TATA-binding protein phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27858–27864.
- [17] M. Dixon, L. Agius, S.J. Yeaman, C.P. Day, Inhibition of rat hepatocyte proliferation by transforming growth factor beta and glucagon is associated with inhibition of ERK2 and p70 S6 kinase, *Hepatology* 29 (1999) 1418–1424.
- [18] W.E. Fleig, P. Frank, H. Ditschuneit, Epidermal growth-factor (Egf) and hepatic stimulator substance (Hss) cooperatively stimulate normal hepatocyte growth in primary culture, *Hepatology* 8 (1988) 1296.
- [19] C.M. Schmidt, I.H. McKillop, P.A. Cahill, J.V. Sitzmann, Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 (1997) 54–58.
- [20] G. Song, G. Ouyang, S. Bao, The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival, *J. Cell. Mol. Med.* 9 (2005) 59–71.
- [21] E.C. Kim, B.S. Yun, I.J. Ryoo, J.K. Min, M.H. Won, K.S. Lee, Y.M. Kim, I.D. Yoo, Y.G. Kwon, Complestatin prevents apoptotic cell death: inhibition of a

- mitochondrial caspase pathway through AKT/PKB activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 193–204.
- [22] Y. Li, D. Dowbenko, L.A. Lasky, AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11352–11361.
- [23] V. Mersch-Sundermann, S. Knasmüller, X.J. Wu, F. Darroudi, F. Kassie, Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents, *Toxicology* 198 (2004) 329–340.
- [24] S.D. Santos, P.J. Verveer, P.I. Bastiaens, Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 324–330.
- [25] L.M. Zhang, D.W. Liu, J.B. Liu, X.L. Zhang, X.B. Wang, L.M. Tang, L.Q. Wang, Effect of naked eukaryotic expression plasmid encoding rat augmenter of liver regeneration on acute hepatic injury and hepatic failure in rats, *World J. Gastroenterol.* 11 (2005) 3680–3685.
- [26] Y. Wu, L. Chen, H. Yu, H. Liu, W. An, Transfection of hepatic stimulator substance gene desensitizes hepatoma cell to H₂O₂-induced cell apoptosis via preservation of mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.* 464 (2007) 48–56.
- [27] L. Polimeno, B. Pesetti, T. Lisowsky, F. Iannone, L. Resta, F. Giorgio, R. Mallamaci, M. Buttiglione, D. Santovito, F. Vitiello, M.E. Mancini, A. Francavilla, Protective effect of augmenter of liver regeneration on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Free Radic. Res.* 43 (2009) 865–875.
- [28] A. Francavilla, M. Barone, D.H. Van Thiel, V. Mazzaferro, J.G. Prelich, T.E. Starzl, Further steps of hepatic stimulatory substance purification, *Dig. Dis. Sci.* 36 (1991) 674–680.
- [29] A. Francavilla, P. Ove, L. Polimeno, M. Coetzee, L. Makowka, J. Rose, D.H. Van Thiel, T.E. Starzl, Extraction and partial purification of a hepatic stimulatory substance in rats, mice, and dogs, *Cancer Res.* 47 (1987) 5600–5605.
- [30] A. Francavilla, M. Hagiya, K.A. Porter, L. Polimeno, I. Ihara, T.E. Starzl, Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors, *Hepatology* 20 (1994) 747–757.
- [31] C.R. Gandhi, R. Kuddus, V.M. Subbotin, J. Prelich, N. Murase, A.S. Rao, M.A. Nalesnik, S.C. Watkins, A. DeLeo, M. Trucco, T.E. Starzl, A fresh look at augmenter of liver regeneration in rats, *Hepatology* 29 (1999) 1435–1445.
- [32] Y. Li, G. Xing, Q. Wang, M. Li, H. Wei, G. Fan, J. Chen, X. Yang, C. Wu, H. Chen, F. He, Hepatopoietin acts as an autocrine growth factor in hepatoma cells, *DNA Cell Biol.* 20 (2001) 791–795.
- [33] G. Wang, X. Yang, Y. Zhang, Q. Wang, H. Chen, H. Wei, G. Xing, L. Xie, Z. Hu, C. Zhang, D. Fang, C. Wu, F. He, Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 11469–11472.
- [34] N. Fausto, A.D. Laird, E.M. Webber, Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration, *FASEB J.* 9 (1995) 1527–1536.
- [35] K.S. Zaret, M. Grompe, Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas, *Science* 322 (2008) 1490–1494.
- [36] T. Pieler, Y. Chen, Forgotten and novel aspects in pancreas development, *Biol. Cell* 98 (2006) 79–88.
- [37] G. Deutsch, J. Jung, M. Zheng, J. Lora, K.S. Zaret, A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm, *Development* 128 (2001) 871–881.

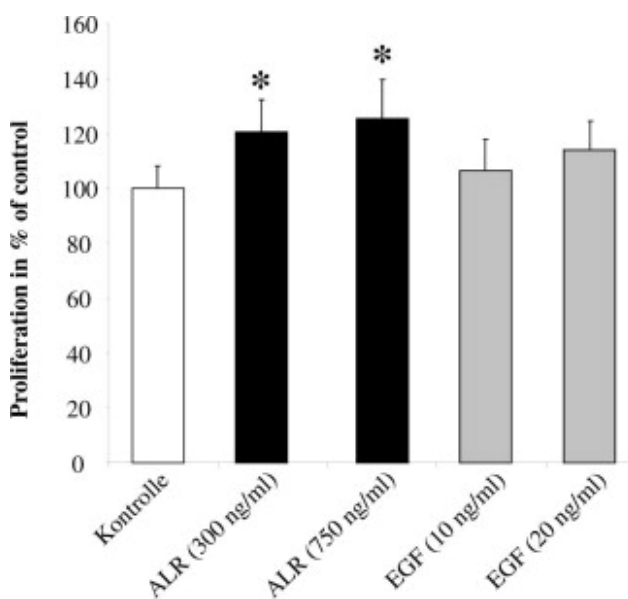
Appendix A. Supplementary data



Supplementary Fig. 1.. ALR enhances cell proliferation in a dose-dependent manner in vitro. Change in proliferation of primary human liver cells (black), HepG2 cell line (white) and Chang cell line (grey) after dosing with recombinant human ALR. After cultivated under serum-free medium condition, cells were incubated with escalating doses of rhALR (7.5, 75, 300, 750 and 1500 ng/ml), MTT assay was performed as described in Section 2. Proliferation was increased by 128% after ALR challenge at a maximum dose of 750 ng/ml. Data were obtained as triplicates. $p < 0.05$ vs. control using students t-test



Supplementary Fig. 2.. Increase in proliferation of primary human hepatocytes (phhs) after dosing with rhALR and rhEGF. After 24 h cultivation under serum-free medium condition, cells were treated with rhALR (black bars) and rhEGF (grey bars), respectively. [³H]-thymidine assay was performed after labelling the cells by incubation with 2 μCi of [³H]-thymidine for 16 h. The amount of radiolabeled [³H]-thymidine incorporated into DNA was analyzed with a beta counter. Data were obtained as triplicates. *p* < 0.05 vs. control using students t-test.



Supplementary Fig. 3.. Increase in proliferation of HepG2 cells after dosing with rhALR and rhEGF. After 24 h cultivation under serum-free medium condition, cells were treated with rhALR (black bars) and rhEGF (grey bars), respectively. [³H]-thymidine assay was performed after labelling the cells by incubation with 2 μCi of [³H]-thymidine for 16 h. The amount of radiolabeled [³H]-thymidine incorporated into DNA was analyzed with a beta counter. Data were obtained as triplicates. *p* < 0.05 vs. control using students t-test.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Augmenter of liver regeneration (ALR) protects human hepatocytes against apoptosis

Maren Ilowski^{a,1}, Axel Kleespies^{b,1}, Enrico N. de Toni^c, Barbara Donabauer^a, Karl-Walter Jauch^b, Jan G. Hengstler^d, Wolfgang E. Thasler^{a,b,*}

^a Liver Regeneration Group, Department of Surgery, Grosshadern Hospital, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

^b Department of Surgery, Grosshadern Hospital, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

^c Department of Medicine II, Grosshadern Hospital, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

^d Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, Technical University, Dortmund, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2010

Available online 23 November 2010

Keywords:

Augmenter of liver regeneration

Human hepatocytes

Hepatotrophic growth factor

Anti-apoptosis

Liver regeneration

Liver cell protection

ABSTRACT

Augmenter of liver regeneration (ALR) is known to support liver regeneration and to stimulate proliferation of hepatocytes. However, it is not known if ALR exerts anti-apoptotic effects in human hepatocytes and whether this protective effect is cell type specific. This is relevant, because compounds that protect the liver against apoptosis without undesired effects, such as protection of metastatic tumour cells, would be appreciated in several clinical settings. Primary human hepatocytes (phH) and organotypic cancer cell lines were exposed to different concentrations of apoptosis inducers (ethanol, TRAIL, anti-Apo, TGF- β , actinomycin D) and cultured with or without recombinant human ALR (rhALR). Apoptosis was evaluated by the release of cytochrome *c* from mitochondria and by FACS with propidium iodide (PI) staining.

ALR significantly decreased apoptosis induced by ethanol, TRAIL, anti-Apo, TGF- β and actinomycin D. Further, the anti-apoptotic effect of ALR was observed in primary human hepatocytes and in HepG2 cells but not in bronchial (BC1), colonic (SW480), gastric (GC1) and pancreatic (L3.6PL) cell lines.

Therefore, the hepatotrophic growth factor ALR acts in a liver specific manner with regards to both its mitogenic and its anti-apoptotic effect. Unlike the growth factors HGF and EGF, rhALR acts in a liver specific manner. Therefore, ALR is a promising candidate for further evaluation as a possible hepatoprotective factor in clinical settings.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The liver has a regenerative potential, which permits recovery from functional disorders induced by hepatic injury [1]. During liver regeneration, regenerative factors released from parenchymal and non-parenchymal liver cells stimulate the proliferation of

hepatocytes by induction of immediate early genes and stimulating the release of growth factors [2].

Besides well-known growth factors like hepatocyte growth factor (HGF) or epidermal growth factor (EGF), augmenter of liver regeneration (ALR) is another cytokine of vital importance. For both EGF and HGF, mitogenic effects on not only hepatic cells but also trophoblasts and myoblasts, respectively have been shown [3,4]. ALR belongs to a novel group of so called cytozymes as it acts as a growth factor and a sulfhydryl oxidase enzyme, that binds FAD containing a redox-active CxxC disulfide proximal to a flavin ring [5]. ALR is known to support liver regeneration in experimental animals [6,7]. Previous studies have shown that ALR activates the ras/Mek/Erk as well as the PI3K/Akt pathways [8]. The influence of ALR on signaling pathways differs from that of other growth factors, such as EGF. For instance, ALR causes a transient and EGF a permanent increase in ERK phosphorylation [8]. Although an activation of the PI3K/Akt signaling pathway has recently been shown, an anti-apoptotic effect of ALR on human hepatocytes has not been studied yet. This possible new feature of ALR was tested

Abbreviations: rhALR, recombinant human augmenter of liver regeneration; EGF, epidermal growth factor; ERK-1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FCS, fetal calf serum; HGF, hepatocyte growth factor; LPS, lipopolysaccharide; MAP kinase, mitogen-activated protein-kinase; MAPKK/MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; TRAIL, tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand; TGF- β , transforming growth factor beta; act D, actinomycin D; NEAA, non essential amino acids; FACS, fluorescence activated cell sorting; phH, primary human hepatocytes.

* Corresponding author. Address: Grosshadern Hospital, Ludwig Maximilians University, Marchioninistraße 15, D-81377 Munich, Germany. Fax: +49 89 7095 6436.

E-mail address: wolfgang.thasler@med.uni-muenchen.de (W.E. Thasler).

¹ Both authors contributed equally to this study.

by examining ALR's protective effects against various apoptotic inducers. Particularly in the field of cancer treatment, either of primary liver cancer or liver metastases, a therapy that protects the liver against apoptosis would be highly welcome [9].

For HGF, as one of the growth factors influencing the liver metabolism, anti-apoptotic and [10–13] protective effects [14,15] have already been found. However, cytokines or growth factors, such as EGF, HGF or IL-6 are problematic in this context, because they influence a diversity of organ systems [8]. For example, EGF activated ERK and stimulated proliferation not only in liver but also in cell lines of colonic, bronchial, pancreatic and gastric origin [8]. In contrast, ALR induced proliferation only in liver cell systems. However, to our knowledge the cell type specific anti-apoptotic effects of ALR have not yet been studied. Therefore the aim of this study was to investigate the promising characteristics of ALR regarding a possible liver-specific anti-apoptotic effect *in vitro*.

The aim of this study was to show a protection of hepatic cells by ALR administration from apoptosis induced by ethanol, tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), anti-Apo, transforming growth factor β (TGF- β) and actinomycin D (Act D) and that this protection occurs in primary human hepatocytes but not in pancreatic, colonic, bronchial and gastric cell lines. This would imply a possible medical usage of ALR regarding protection of liver cells during apoptosis inducing therapies.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Recombinant human ALR (rhALR) was prepared as described previously [16]. Briefly, fractions containing rhALR protein were combined and dialyzed against dialysis buffer (25 mM HEPES, 0.1% Tween 20, and 1 mM EDTA, pH 8.2) at 4 °C, with three buffer changes. Afterwards, rhALR protein was concentrated using a 5 kDa cut-off ultrafree-15 centrifugal filter device (Millipore GmbH, Schwalbach, Germany) [17]. All antibodies used were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). TRAIL and TGF- β were obtained from Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany). Actinomycin D was purchased from AppliChem (Darmstadt, Germany) and anti-Apo from Alexis (San Diego, CA, USA).

2.2. Isolation of primary human hepatocytes

Remnant liver samples were obtained from patients with informed consent through the Grosshadern Tissue Bank after partial hepatectomy. This tissue bank is regulated according to the guidelines of the non-profit state-controlled HTCR (Human Tissue and Cell Research) foundation following study approval [18] according to the local ethical committee of the Ludwig Maximilians University. Human hepatocytes were isolated using a modified two-step EGTA/collagenase perfusion procedure as described previously [19]. Viability of isolated hepatocytes was determined by trypan blue exclusion. Cell suspensions with viabilities more than 80% were plated and cultured for further experiments.

2.3. Primary hepatocytes culture

Cells were plated on biocoated collagen I 6-Well plates (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) for Western Blots and 12-Well plates for FACS analysis in 1–2 ml of culture media. The medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza, Cologne, Germany) with 5% fetal calf serum (FCS, Biochrom, Berlin, Germany), 2 mM L-glutamine (Biochrom, Berlin, Germany) and supplements as follows: 1.7 mU/ml insulin (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany), 3.75 ng/ml hydrocortisone (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany), 100 μ g/ml streptomycin and

100 U/ml penicillin (Lonza, Cologne, Germany) and 1 μ g/ml glucagon (Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz, Germany). For starvation media, the mixture of supplements was reduced to: 0.5 U/l insulin, 100 kU/l penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine. Cells were incubated at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. Viability of hepatocytes during the culture period was monitored by cell morphology (light microscopy, image analysis).

2.4. Cell lines and culture conditions

The bronchial (BC1) and gastric (GC1) cell lines were kindly provided by Dr. N. van den Engel, Ludwig Maximilians University, Munich [20]. Human hepatic cell lines (HepG2, Chang) were cultured in RPMI medium (Lonza, Cologne, Germany) supplemented with 10% FCS, 4 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin. Bronchial (BC1), colonic (SW480), and gastric (GC1) cell lines were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non essential amino acids (NEAA) and 50 μ g/ml gentamycin. Pancreatic (L3.6PL) carcinoma cell lines were cultured in DMEM with 1 g/ml glucose, 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 12% FCS, 2x MEM vitamin mixture, 0.2 mM MEM NEAA (Lonza, Cologne, Germany), 120 U/ml penicillin and 20 μ g/ml streptomycin. All cell lines were cultivated in 5% CO₂ at 37 °C.

2.5. Cell treatment

After 16–20 h attachment of primary human hepatocytes or plating of cell lines, medium was changed to starvation medium and media with 1% FCS, respectively for the next 12–19 h [21]. Primary human hepatocytes and cell lines were incubated with 750 ng/ml rhALR for 4 h. Subsequently, apoptosis was induced in the presence or absence of rhALR by 24 h incubation with 100 mM ethanol, 20 ng/ml TRAIL, 100 ng/ml anti-Apo, 10 ng/ml TGF- β or 10 μ g/ml act D.

2.6. Western blot analysis

The cells were washed with PBS and lysed in cell lysis buffer (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany) containing 20 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml leupeptin. Cell lysates were sonicated briefly, centrifuged at 14,000g (10 min/4 °C) and supernatants (10–20 μ g protein) were subjected to electrophoresis through a 4–15% polyacrylamide gel. Proteins were then transferred to PVDF membranes. After electro-transfer, the blots were blocked for 1 h at room temperature in blocking buffer containing 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20 and 5% milk (pH 7.6). The blots were then incubated with primary antibodies (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany) with 1:1000 dilutions (cytochrome c) in blocking buffer overnight. Following several washes in buffer containing 20 mM Tris–HCl, 137 mM NaCl and 0.1% Tween 20 (pH 7.6), the blots were incubated in 1:2000 dilution of anti-rabbit IgG HRP-linked as secondary antibody (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany) diluted in blocking buffer 1 h at room temperature. Following several washes in buffer, the immunoreactive proteins were visualized and quantified by densitometric analysis using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). For all western blots, GAPDH was used as a reference gene.

2.7. Isolation of mitochondrial and cytosolic fraction

For analyzing the compartmentalization of cytochrome c protein, subcellular fractions such as mitochondria and cytosol were

isolated using a mitochondrial isolation kit for cultured cells (Pierce, Rockford, USA). The mitochondrial pellets were lysed with 2% CHAPS in Tris buffered saline. The cytosolic fraction was desalted using Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassettes 7KD (Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Germany) according to manufacturer's instructions.

2.8. FACS analysis

All cell lines and primary cells were plated on 12-well plates for FACS analysis. Both primary human hepatocytes and hepatic cell lines were stained with propidium iodide after treatment to measure the percentage of apoptotic nuclei in hypotonic buffer [22]. After incubation with propidium iodide overnight at 4 °C, stained cells were analyzed using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, NJ, USA).

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using two-tailed Student's *t*-test. *P* levels <0.05 were considered as significant.

3. Results

3.1. ALR decreases cytochrome *c* release from mitochondria

As an early sign of apoptosis, administration of ethanol resulted in an increase in cytochrome *c* release into the cytosol in primary human hepatocytes (Fig. 1). When treated with ethanol, cells cultured in the presence of rhALR exhibited a clear decrease in cytosolic cytochrome *c* compared to the cells incubated with ethanol alone (Fig. 1). The influence of ALR on the release of cytochrome *c* from mitochondria into the cytosol suggests that the anti-apoptotic effect of ALR is at least partially mediated via the intrinsic pathway.

3.2. ALR protects hepatocytes against apoptosis induction by different stress signals

To analyze the protective effect of ALR against apoptosis, different hepatic cells were treated with apoptosis inducing agents. Apoptosis caused by different mechanisms, such as ligand-receptor signaling via CD 95 (TRAIL, anti-Apo), transmembrane serine/threonine kinase receptors (TGF- β) and inhibition of RNA-synthesis (act D), was measured using FACS analysis with propidium iodide staining (Fig. 2). Co-incubation with rhALR significantly decreased TRAIL induced apoptosis in primary human hepatocytes (Fig. 2A). Similarly, the hepatic cell line HepG2 showed a significant increase in apoptosis after incubation with 100 ng/ml anti-Apo, whereas co-incubation with rhALR reduced apoptosis significantly (Fig. 2B). A similar anti-apoptotic effect by rhALR was obtained for TGF- β induced apoptosis in chang cells (Fig. 2C). Also actinomycin D induced apoptosis was antagonized by rhALR in HepG2 cells (Fig. 2D).

3.3. ALR exerts a liver-specific anti-apoptotic effect

Since ALR shows a protective effect on hepatic cells against apoptosis induced by ethanol, TRAIL, anti-Apo, TGF- β and act D, it was of interest to analyze whether this effect is hepatocyte specific or can be observed in different cell types. For this purpose, cultivated primary human hepatocytes, the human hepatoma cell line HepG2, as well as bronchial (BC1), colonic (SW480), gastric (GC1) and pancreatic (L3.6PL) cell lines were tested. Interestingly, rhALR ameliorated TRAIL induced apoptosis only in human hepatocytes and in HepG2 cells (Fig. 3). In contrast, apoptosis was not significantly reduced in BC1, SW480, GC1 and L3.6PL cells. Therefore, ALR shows a protective effect on liver cells but not on cells of bronchial, colon, gastric and pancreatic origin. This feature may offer the possibility of a selective liver protection, which could be helpful in several clinical settings.

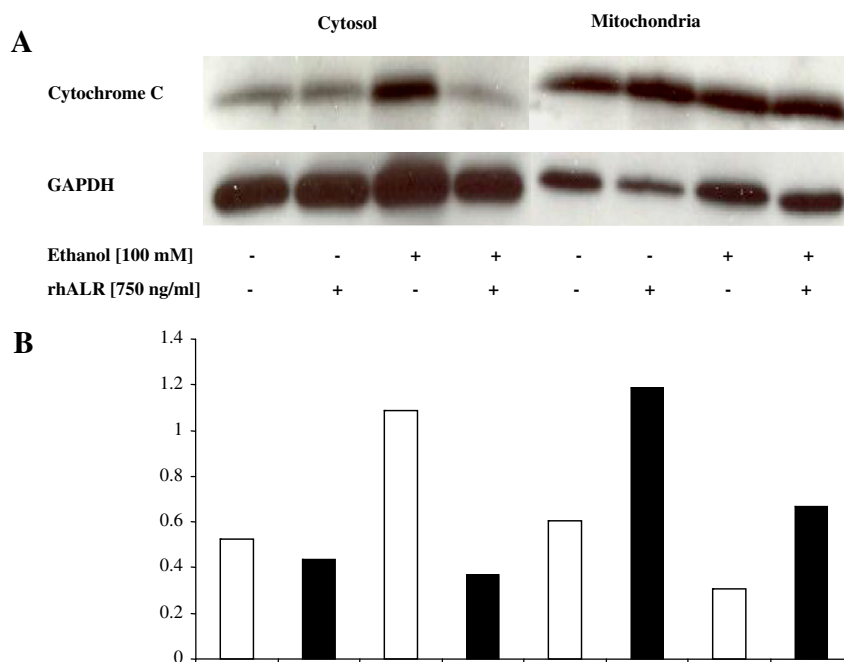


Fig. 1. Western blot analysis showing subcellular cytochrome *c* compartmentalization of in primary human hepatocytes after treatment with or without ethanol (100 mM) in the presence or absence of rhALR (750 ng/ml). Cells were incubated with recombinant human ALR (rhALR) 4 h before treatment with ethanol and ALR was kept in the culture media for the duration of the treatment (24 h). (A) Representative western blot, (B) quantitative analysis of the western blot.

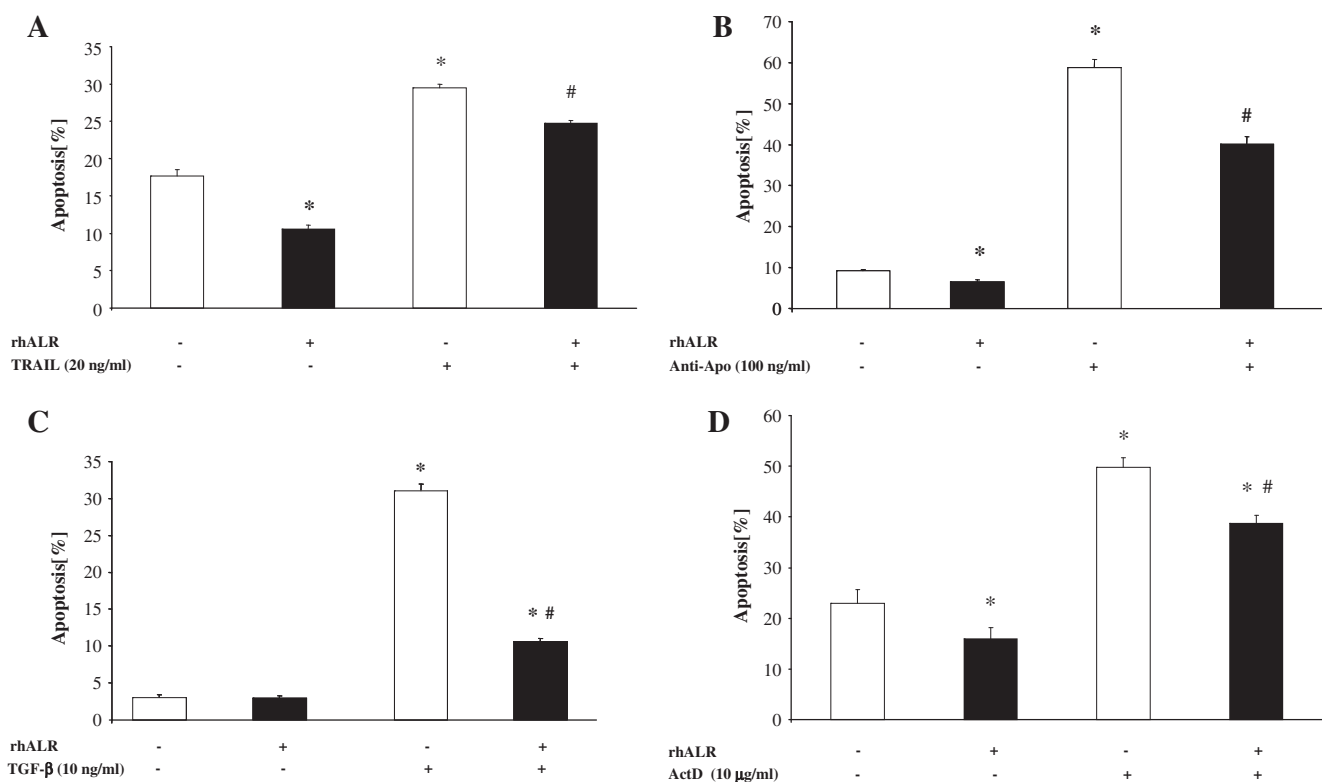


Fig. 2. Apoptosis (%) induced in (A) primary human hepatocytes by TRAIL (20 ng/ml), (B) HepG2 cells by anti-Apo (100 ng/ml), (C) Chang cells by TGF- β (10 ng/ml) and (D) HepG2 cells by actinomycin D (10 μ g/ml). The treatments shown are with or without apoptosis inducers in the presence or absence of rhALR (750 ng/ml). * p < 0.05 vs. untreated cells using students t -test. # p < 0.05 vs. cells treated with apoptosis inducer using students t -test.

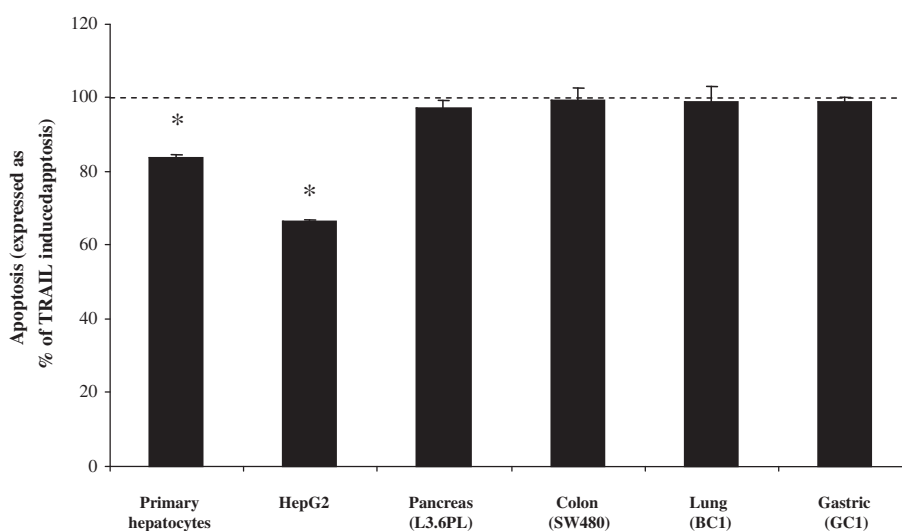


Fig. 3. Apoptosis (%) induced by TRAIL (20 ng/ml) in the presence of recombinant human ALR (750 ng/ml) in cells (primary human hepatocytes, HepG2 cells, pancreatic cells, colonic cells, bronchial cells and gastric cells) expressed as percent of apoptosis caused by TRAIL treatment alone. Cells treated were incubated with rhALR 4 h before treatment with the apoptosis inducer and ALR was kept in the culture media for the duration of the treatment (24 h). * p < 0.05 vs. cells treated with TRAIL using students t -test.

4. Discussion

Therapeutic options stimulating anti-apoptotic mechanisms in hepatocytes would be highly welcome in several clinical settings, e.g. non-alcoholic steatohepatitis (NASH), alcohol mediated hepatitis and cholestatic liver diseases, to retard fibrotic progression and potentially prevent cirrhosis [23]. As hepatocyte cell death pro-

motes hepatic fibrosis, therapeutic hepatoprotective strategies focusing on protection of hepatocytes and prevention of hepatocytic apoptosis are important. However, systemic administration of cytokines or non-specific growth factors may be problematic because of undesired effects on other cell types. Examples like EGF and HGF that have anti-apoptotic effects on hepatocytes also show a stimulation of proliferation in numerous other cell types [3,4].

Recently, ALR has been described as a hepatocyte specific mitogen [8]. However, its influence on apoptosis in human hepatocytes and its cell-type specificity concerning anti-apoptotic effects is still unknown. In the present study we show that ALR clearly decreases ethanol-induced cytochrome *c* release from mitochondria of human hepatocytes. Similarly, apoptosis induced by TRAIL, a proapoptotic factor in human hepatocytes [24], was antagonized by ALR. Also the agonist antibody anti-Apo, which recognizes the epitope on the extracellular domain of CD 95 [25], the proapoptotic cytokine TGF- β [26] and actinomycin D caused apoptosis in human hepatocytes which could be ameliorated by ALR. In contrast to human hepatocytes, no anti-apoptotic effect of ALR was observed in bronchial (BC1), colonic (SW480), gastric (GC1) and pancreatic (L3.6PL) cell lines. This suggests that similar to the already observed hepatocyte specific mitogenic effect of ALR, the anti-apoptotic effect of ALR may also be hepatocyte specific.

As a possible limitation regarding liver specificity, it should be considered that a protective effect of ALR against hydrogen peroxide was found in human neuroblastoma cells [27] and in rats protecting kidneys from ischemia/reperfusion injury [28]. In contrast the effect of hydrogen peroxide has not been tested in hepatocytes *in vitro* yet as well as the effect of ALR administration with ischemia/reperfusion injury in the liver needs to be further investigated. Positive effects of ALR on hepatic liver diseases and hepatic failure or survival after antisense oligonucleotide transfection was shown already [29–31] but to our knowledge no anti-apoptotic effect of ALR has been reported on primary human cells. Our observation that ALR protects human hepatoma cells corresponds to the results obtained by Cao et al. regarding radiation-induced oxidative stress [32]. Therefore, ALR besides having anti-apoptotic effects in primary hepatocytes seems to also protect tumour cells. That is why research on possible clinical applications of ALR should be limited to treatment in the presence of secondary metastasis in the liver or non-tumour diseases.

In conclusion, it is shown that ALR protects only cells of hepatic lineage against apoptosis and not pancreatic, colonic, bronchial or gastric cells. These are promising findings for further evaluation of ALR as a possible hepatoprotective cytokine in clinical settings.

Acknowledgments

We thank C. Putz for excellent technical assistance and Dr. S.M.L. Lee for great support in finishing this manuscript. We acknowledge the Human Tissue and Cell Research (HTCR) Foundation for supporting our research by making human liver tissue available as well as hepacult GmbH for supplying cell isolation and cultivation technology. This study was supported in part by a grant from the BMBF (Virtual Liver, 0315759) and a grant from the Bohneward Foundation.

References

- [1] V. Gazit, A. Weymann, E. Hartman, et al., Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice, *Hepatology* 52 (2010) 2109–2117.
- [2] Y. Iimuro, J. Fujimoto, TLRs, NF- κ B, JNK and liver regeneration gastroenterol. Res. Pract. (2010), doi:10.1155/2010/598109.
- [3] N. Hambruch, J.D. Haeger, M. Dilly, et al., EGF stimulates proliferation in the bovine placental trophoblast cell line F3 via Ras and MAPK, *Placenta* 31 (2010) 67–74.
- [4] J. Li, S.A. Reed, S.E. Johnson, Hepatocyte growth factor (HGF) signals through SHP2 to regulate primary mouse myoblast proliferation, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 2284–2292.
- [5] V.N. Daithankar, S.R. Farrell, C. Thorpe, Augmenter of liver regeneration: substrate specificity of a flavin-dependent oxidoreductase from the mitochondrial intermembrane space, *Biochemistry* 48 (2009) 4828–4837.
- [6] X. Yang, A. Wang, P. Zhou, et al., Protective effect of recombinant human augmenter of liver regeneration on CCl4-induced hepatitis in mice, *Chin. Med. J. (Engl.)* 111 (1998) 625–629.
- [7] K.N. Tzirogiannis, G.K. Papadimas, K.T. Kourentzi, et al., The role of hepatic stimulator substance (HSS) on liver regeneration arrest induced by cadmium, *In Vivo* 19 (2005) 695–704.
- [8] M. Iłowski, C. Putz, T.S. Weiss, et al., Augmenter of liver regeneration causes different kinetics of ERK1/2 and Akt/PKB phosphorylation than EGF and induces hepatocyte proliferation in an EGF receptor independent and liver specific manner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394 (2010) 915–920.
- [9] H. Malhi, M.E. Guicciardi, G.J. Gores, Hepatocyte death: a clear and present danger, *Physiol. Rev.* 90 (2010) 1165–1194.
- [10] H. Schulze-Bergkamen, D. Brenner, A. Krueger, et al., Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt, *Hepatology* 39 (2004) 645–654.
- [11] B. Li-juan, L. Bing, L. Zhi, et al., Hepatocyte growth factor suppresses tumor cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma by upregulating Bcl-2 protein expression, *Pathol. Res. Pract.* 205 (2009) 828–837.
- [12] W. Li, S. Cai, L. Cai, et al., Anti-apoptotic effect of hepatocyte growth factor from actinomycin D in hepatocyte-derived HL7702 cells is associated with activation of PI3K/Akt signaling, *Toxicol. Lett.* 165 (2006) 142–148.
- [13] H. Yang, N. Magilnick, M. Xia, et al., Effects of hepatocyte growth factor on glutathione synthesis, growth, and apoptosis is cell density-dependent, *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 398–412.
- [14] A. Valdes-Arzate, A. Luna, L. Bucio, et al., Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 424–430.
- [15] N. Tei, M. Tsujihata, K. Tsujikawa, et al., Hepatocyte growth factor has protective effects on crystal–cell interaction and crystal deposits, *Urology* 67 (2006) 864–869.
- [16] W.E. Thasler, T. Schlott, P. Thelen, et al., Expression of augmenter of liver regeneration (ALR) in human liver cirrhosis and carcinoma, *Histopathology* 47 (2005) 57–66.
- [17] R. Dayoub, W.E. Thasler, A.K. Bosserhoff, et al., Regulation of polyamine synthesis in human hepatocytes by hepatotrophic factor augmenter of liver regeneration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 181–187.
- [18] W.E. Thasler, T.S. Weiss, K. Schillhorn, et al., Charitable state-controlled foundation human tissue and cell research: ethic and legal aspects in the supply of surgically removed human tissue for research in the academic and commercial sector in Germany, *Cell Tissue Bank* 4 (2003) 49–56.
- [19] T.S. Weiss, S. Pahernik, I. Scheruebl, et al., Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid, *J. Hepatol.* 38 (2003) 476–482.
- [20] N.K. van den Engel, H. Winter, D. Ruttinger, et al., Characterization of immune responses in gastric cancer patients: A possible impact of H. pylori to polarize a tumor-specific type 1 response?, *Clin Immunol.* 120 (2006) 285–296.
- [21] U. Klingmüller, A. Bauer, S. Bohl, et al., Primary mouse hepatocytes for systems biology approaches: a standardized *in vitro* system for modeling of signal transduction pathways, *Systems Biol.* (Stevenage) 153 (2006) 433–477.
- [22] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, et al., A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J. Immunol. Methods* 139 (1991) 271–279.
- [23] M.E. Guicciardi, G.J. Gores, Apoptosis as a mechanism for liver disease progression, *Semin. Liver Dis.* 30 (2010) 402–410.
- [24] M. Jo, T.H. Kim, D.W. Seol, et al., Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, *Nat. Med.* 6 (2000) 564–567.
- [25] I.N. Lavrik, A. Golks, D. Riess, et al., Analysis of CD95 threshold signaling: triggering of CD95 (FAS/APO-1) at low concentrations primarily results in survival signaling, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 13664–13671.
- [26] P. Godoy, J.G. Hengstler, I. Ilkavets, et al., Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis, *Hepatology* 49 (2009) 2031–2043.
- [27] L. Polimeno, B. Pesetti, T. Lisowsky, et al., Protective effect of augmenter of liver regeneration on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Free Radic. Res.* 43 (2009) 865–875.
- [28] X.H. Liao, L. Zhang, Q. Liu, et al., Augmenter of liver regeneration protects kidneys from ischaemia/reperfusion injury in rats, *Nephrol. Dial. Transplant.* 25 (2010) 2921–2929.
- [29] L.M. Zhang, D.W. Liu, J.B. Liu, et al., Effect of naked eukaryotic expression plasmid encoding rat augmenter of liver regeneration on acute hepatic injury and hepatic failure in rats, *World J. Gastroenterol.* 11 (2005) 3680–3685.
- [30] K. Tanigawa, I. Sakaida, M. Masuhara, et al., Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases, *J. Gastroenterol.* 35 (2000) 112–119.
- [31] C. Thirunavukkarasu, L.F. Wang, S.A. Harvey, et al., Augmenter of liver regeneration: an important intracellular survival factor for hepatocytes, *J. Hepatol.* 48 (2008) 578–588.
- [32] Y. Cao, Y.L. Fu, M. Yu, et al., Human augmenter of liver regeneration is important for hepatoma cell viability and resistance to radiation-induced oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 1057–1066.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Karl-Walter Jauch möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Promotionsarbeit in der Forschungsabteilung der Chirurgischen Klinik durchführen zu dürfen sowie für seine freundliche Unterstützung und Förderung während der vergangenen Jahre.

Meinem Doktorvater PD Dr. Wolfgang E. Thasler gilt mein besonderer Dank für die Überlassung dieses interessanten Forschungsthemas und die Betreuung der Arbeit sowie die vielen hilfreichen Hinweise und Anregungen bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit. Ich danke ihm auch für die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen Konferenzen und das Vertrauen zur Präsentation vieler unserer Forschungsergebnisse.

Für die freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung von Experimenten danke ich dem gesamten Team der Arbeitsgruppe für Leberregeneration und den Mitarbeitern der Gewebebank i.A. HTCR recht herzlich. Ohne ihre Einarbeitung und Hilfe zur Schaffung von Freiräumen für die Bearbeitung meines Themas sowie technischer Hilfestellungen wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die Unterstützung, die Bereitstellung humaner Hepatozyten sowie die Möglichkeit der Mitarbeit im pharmazeutischen Umfeld danke ich der hepacult GmbH sowie dem gesamten Team in Regensburg und München.

Ich danke PD Dr. rer. nat. Thomas Weiss für fachliche Hilfestellungen bei wissenschaftlichen Fragen sowie für die Bereitstellung des rekombinanten humanen ALR.

Weiterhin danke ich Univ.-Prof. Dr. med. Jan G. Hengstler und Dr. med. Enrico de Toni für ihre fachliche Unterstützung und wissenschaftliche Expertise. Frau Antonia Rizzani und dem Team der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Christian Rust danke ich für die praktische Hilfestellung und Bereitstellung der Messgeräte zur Durchführung der Experimente.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Natasja van den Engel für ihre unermüdlichen Hilfestellungen bei der Lösung von fachlichen und persönlichen Fragen, ihrem großen Engagement und vieler konstruktiver Gespräche.

Für viele gute Ratschläge und anregende fachliche Diskussionen sowie private Gespräche und ihrer uneingeschränkten Unterstützung danke ich ganz besonders Frau Anne Wagner und Frau Nina Schupp.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden bin ich für die unentwegte moralische wie auch tatkräftige Unterstützung während meiner Dissertationsarbeit zu tiefstem Dank verpflichtet. Sie haben mich immer wieder ermutigt und für die erforderliche Abwechslung gesorgt.

Von ganzem Herzen danke ich Sebastian González Schmitz für seine unermüdliche Unterstützung, sehr viel Verständnis und Rücksicht während dieser Zeit sowie für seine Motivation und Liebe.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Maren Ilowski, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Ich habe mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen. Ich habe bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen, und die vorliegende Dissertation wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, 25. März 2013

(Maren Ilowski)