

Untersuchungen zur Leberregeneration nach Leberteileresektion

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Jan-Peter Sowa

aus München
25.06.2010

Angaben zur Prüfung

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt, eine Einrichtung der Universität Duisburg-Essen.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Betram Opalka**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg F. Schlaak**

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hering

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xi
1. Einleitung	12
1.1 Die Leber – Funktion und Aufbau.....	12
1.2 Leberteilresektion und Leberlebendspende	14
1.3 Leberregeneration	16
1.4 Das TLR-System und der Transkriptionsfaktor NF-KB.....	18
1.5 Glycin als zytoprotektives Agens.....	24
1.6 Bortezomib	25
1.7 NF-KB und TLR in der Leberregeneration	26
1.8 Ziele	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte	29
2.1.2 Verbrauchsmaterial	30
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien.....	32
2.1.4 Enzyme	34
2.1.5 Antikörper.....	34
2.1.6 Kompetente Zellen	34
2.1.7 Kits	34
2.1.8 Pufferzusammensetzungen.....	35
2.2 Methoden	37
2.2.1 Tiermodell und operative Technik	37

2.2.2	Liver body weight ratio (LBW-r).....	40
2.2.3	ALT, AST, LDH und Bilirubin.....	40
2.2.4	Isolation primärer Leberzellen aus Mäusen	40
2.2.5	Isolation primärer humaner Hepatozyten	44
2.2.6	MACS-Markierung zur Isolation humaner KC	46
2.2.7	<i>In-vitro</i> -Stimulation verschiedener Zellpopulationen.....	47
2.2.8	Gesamt-RNA-Isolation mit Trizol/QIAzol und RNeasy	47
2.2.9	Quantitative RT-PCR	50
2.2.10	Protein-Isolation	54
2.2.11	Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)	55
2.2.12	Isolation von Gesamtprotein.....	56
2.2.13	ELISA.....	56
2.2.14	NF- κ B Reporter-Assay	57
2.2.15	Terminal-transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling (TUNEL)-Assay zum Nachweis des Zelltodes im Lebergewebe	61
2.2.16	Statistische Auswertung.....	62
3.	Ergebnisse	63
3.1	R70-Leberresektion vs. R90-Leberresektion.....	63
3.1.1	LBW-r Entwicklung nach R70- und R90-Hepatektomie.....	64
3.1.2	Serumparameter nach Leberteileresektion unterschiedlichen Umfangs	65
3.1.3	Aktivierung von Transkriptionsfaktoren	68
3.1.4	Genexpression von wesentlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren der Leberregeneration.....	71
3.1.5	Zelltodrate nach R70- bzw. R90-Leberteileresektion ermittelt durch TUNEL-Assay.....	75
3.1.6	Zusammenfassung der Ergebnisse des Teilprojekts „differentielle Hepatektomie“	77

3.2	Modulation der molekularen und zellulären Reaktion auf R90-Leberresektion durch präoperative Glycingabe	78
3.2.1	LBW-r und Serum-Parameter der Leberschädigung nach 90%iger Hepatektomie mit Glycin-Supplementation.....	78
3.2.2	Aktivierung von Transkriptionsfaktoren	79
3.2.3	mRNA-Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.....	81
3.2.4	Zelltodrate nach R90- und G90-Leberresektion	84
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur pharmakologischen Beeinflussung 90%iger Leberresektion durch Glycinfütterung	85
3.3	In-vitro-Experimente an Maus-KC und humanen Hepatozyten zur Modulation TLR-4 induzierter Signalwege mittels Bortezomib	85
3.3.1	Zell-Morphologie nach Behandlung mit LPS und/oder Bortezomib	87
3.3.2	mRNA-Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren <i>in vitro</i> nach LPS Stimulation mit und ohne Bortezomib-Vorbehandlung.....	88
3.3.3	Messung von kNF-KB	92
3.4	Leberresektion mit kombinierter Bortezomib-Gabe	93
3.4.1	Überleben nach Resektion mit und ohne Bortezomib-Behandlung	93
3.4.2	LBW-r nach Resektion mit oder ohne Bortezomib-Applikation.....	95
3.4.3	Leberspezifische Serumparameter nach Bortezomib-Gabe und Leberteileresektion	95
3.4.4	kNF-KB-Konzentration nach H70- bzw. VC70-Leberteileresektion	97
3.4.5	Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.....	99
3.4.6	Expression apoptoserelevanter Gene	101
3.4.7	Serum M30-Freisetzung nach Resektion und Bortezomib-Behandlung	104
3.4.8	Hypoxie-bezogene Genexpression	105
3.4.9	HIF-Aktivierung	106
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	108

4. Diskussion	109
4.1 Kritische Betrachtung der verwendeten experimentellen Modelle und Nachweismethoden.....	110
4.2 Auswirkung des Resektionsumfanges auf molekulare Prozesse in der Leberregeneration	116
4.3 Pharmakologische Modulation der postoperativen Entwicklung durch Glycin bei 90% Hepatektomie	122
4.4 Modulation der TLR-4 Reaktion durch Bortezomib.....	125
4.5 Ausblick.....	132
5. Zusammenfassung.....	135
6. Literatur	137
7. Anhang	158

Abkürzungsverzeichnis

°C:	Grad Celsius
µg:	Mikrogramm
µl:	Mikroliter
CCC:	cholangiozelluläres Karzinom (Gallengangskarzinom)
CD:	Cluster of differentiation
d:	Tag
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethyldiamin-Tetraessigsäure
EGTA:	Ethylglycol-Tetraessigsäure
FACS:	fluorescence-activated cell sorting
G90:	Tiere / Gruppe mit Glycin-reicher Diät und 90%iger Hepatektomie
HBSS:	Hank's buffered salt solution
HCC:	hepatozelluläres Karzinom
HGF:	hepatocyte growth factor
HIF:	hypoxia inducible factor
HSC:	hepatische Sternzellen
IFN-α:	Interferon alpha
IFN-β:	Interferon beta
IL-6:	Interleukin-6
IL-10:	Interleukin-10
KC:	Kupfferzellen
kNF-KB:	NF-KB in der Kernfraktion von Proteinisolaten aus Gewebe oder Zellkultur
LPS:	Lipopolysaccharid (Bestandteil gram-negativer Bakterienzellwand)
LSEC:	liver sinusoidal endothelial cells
mg:	Milligramm
min:	Minute(n)
ml:	Milliliter
n:	Anzahl an Versuchstieren bzw. Ansätzen pro Gruppe
NF-KB:	nuclear factor Kappa B

Pamp: pathogen associated molecular pattern
 PBS: phosphatgepufferte Saline
 PE: Phycoerythrin
 pVHL : Von-Hippel-Lindau-Protein
 R70 : Tiere / Gruppe mit 70%iger Hepatektomie; 70%ige
 Hepatektomie/Leberteilresektion
 R90 : Tiere / Gruppe mit 90%iger Hepatektomie; 90%ige
 Hepatektomie/Leberteilresektion
 RNA: Ribonukleinsäure
 rpm: Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
 RT: Raumtemperatur
 sec: Sekunde(n)
 TLR: Toll-like-Rezeptor
 U: Units
 VC : Bortezomib (Handelsname Velcade®)
 VC70: Tiere / Gruppe mit 70%iger Hepatektomie mit Bortezomib-Applikation
 24h präoperativ
 TNF- α : tumor-necrosis-factor alpha
 TGF- α : transforming growth factor-alpha
 TGF- β : transforming growth factor-beta
 VEGF: vascular endothelial growth factor

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Anatomie der Leber als Übersicht.....	14
Abb. 1-2: TLR-Signalwege.....	20
Abb. 1-3: Röntgenkristall-Strukturen von NF-KB als 3D Modell.	22
Abb. 1-4: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Bortezomib auf NF-KB.	26
Abb. 2-1: Funktionsprinzip der Elutriation.....	43
Abb. 3-1: Leber-Körpergewicht-Verhältnis (LBW-r) in Versuchstieren nach unterschiedlichen operativen Eingriffen.....	65
Abb. 3-2: Serum-Parameter der Leberschädigung.....	68
Abb. 3-3: Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.....	70
Abb. 3-4: mRNA-Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren mit Relevanz für Leberregeneration im Lebergewebe nach R70- bzw. R90-Leberteilresektion.....	74
Abb. 3-5: TUNEL-Indices nach Leberteilresektion.....	76
Abb. 3-6: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener Dünnschnitte nach TUNEL-Färbung.....	76
Abb. 3-7: Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF-KB und STAT3 nach R90- und G90-Leberresektion.....	80
Abb. 3-8: Modulation der mRNA-Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen nach Glycinfütterung bei 90%iger Hepatektomie.....	83
Abb. 3-9: TUNEL-Indices für regenerierende Rattenlebern nach R90- und G90-Leberteilresektion.....	85
Abb. 3-10: Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in murinen KC.....	89
Abb. 3-11: Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in humanen Hepatozyten nach LPS-Stimulation und Bortezomib-Behandlung.....	91
Abb. 3-12: Mortalität nach 30%iger bzw. 70%iger Hepatektomie mit Bortezomib-Behandlung.....	94

Abb. 3-13: Serum-Parameter als Marker für Leberschädigung.	96
Abb. 3-14: Bilirubin im Serum nach H70- bzw. VC70-Hepatektomie.	97
Abb. 3-15: kNF- κ B-Konzentration nach Leberresektion mit Bortezomib-Vorbehandlung.	98
Abb. 3-16: Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren nach H70- bzw. VC70-Hepatektomie.	101
Abb. 3-17: mRNA-Expression für Apoptose-relevante Gene in Ratten nach H70- bzw. VC70-Leberteileresektion.	103
Abb. 3-18: Expression von HIF1 α und VEGF nach H70- bzw. VC70-Resektion. ...	106
Abb. 3-19: Western Blot für Phospho-HIF1 α	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufteilung der Versuchsgruppen und Gruppengrößen für das Leberresektionsmodell.	39
Tabelle 2: Ätiologien für Resektate bzw. explantierte Empfängerlebern, die zur Präparation humaner Hepatozyten verwendet wurden.....	45
Tabelle 3: Oligonukleotidsequenzen für die Amplifikation von cDNA murinen Ursprungs.....	53
Tabelle 4: Oligonukleotidsequenzen für die Amplifikation von cDNA aus Rattengewebe.	53
Tabelle 5: Oligonukleotidsequenzen für die Amplifikation von cDNA aus humanem Gewebe.	53
Tabelle 6: Übersicht eines typischen Transfektionsexperiments mit Kontrollen.	60

1. Einleitung

1.1 *Die Leber – Funktion und Aufbau*

Als zentrales Organ zur Regulation der Stoffwechselaktivität in höheren Wirbeltieren trägt die Leber mit unterschiedlichsten Funktionen zu Verdauung und Speicherung von Nährstoffen bei. Sie reguliert den Stoffwechsel von Proteinen, Kohlenhydraten, Fetten, Mineralien und Vitaminen. Gerinnungsfaktoren werden ebenso in der Leber produziert wie Albumin und die Gallensäure. Letztere wird im Darm zur Verdauung von Fetten benötigt. Ferner wandelt die Leber überschüssigen Zucker in Glykogen um, welches dann in der Leber gespeichert wird. Eine weitere Aufgabe der Leber ist die Metabolisierung von Toxinen aber auch von körpereigenen Abbauprodukten, die in der Leber weiter verstoffwechselt werden und entweder über die Galle oder über das Blut und später die Nieren ausgeschieden werden. Zum Beispiel wird Hämoglobin zu Bilirubin abgebaut und über die Gallengänge in den Darm geleitet. Eine Störung des Bilirubinmetabolismus äußert sich z.B. bei Leberversagen in der charakteristischen Gelbfärbung von Augen und Haut, die durch den Rückstau von Bilirubin in den Körper entsteht. Die genannten metabolischen Prozesse und die Synthesefunktionen werden von den parenchymalen Zellen der Leber, den Hepatozyten, geleistet.

Während des Entgiftungsprozesses kommt es relativ häufig zum apoptotischen Zelltod der Hepatozyten, so dass ein hoher Umsatz von Zellen auch in einer gesunden Leber auftritt. Sterbende Zellen werden durch proliferierende Hepatozyten der Umgebung und in geringerem Ausmaß aus residenten Stammzellen der Leber (hepatic stem cells) ersetzt. Auf diesem relativ hohen Grundumsatz an Zellen basiert die außergewöhnliche regenerative Kapazität der Leber, die man sich bei schweren Lebererkrankungen zu Nutze macht, da hier eine chirurgische Intervention oft als einzige Therapieoption zur Verfügung steht. Die regenerative Kapazität ermöglicht hierbei, dass die Restleber nach Resektion wieder zu einer Größe heranwächst, die für den jeweiligen Patienten eine ausreichende Organfunktion bietet.

Anatomisch betrachtet, stellt sich die Leber als größte Drüse des Organismus dar, die beim Menschen im Schnitt ca. 1,5 kg wiegt. Sie erhält ca. 25% ihrer Blutversorgung von der hepatischen Arterie (A. hepatica propria) und 75% aus den Verdauungsorganen über die Portalvene (V. portae). Physiologisch teilt sich die Leber in einen linken Lappen mit den Segmenten I – IV und einen rechten Leberlappen mit den Segmenten V – VIII (Abb. 1-1, S.14). Hierbei nimmt der rechte Lappen ca. 6-mal soviel Volumen ein, wie der linke. Die Lappen sind aus einzelnen, nur wenige Millimeter großen Läppchen (Lobuli hepatici) aufgebaut, in denen die Hepatozyten (Leberzellen) ringförmig um eine Arteria interlobularis (Ast der A. hepatica propria) und eine Vena interlobularis (Ast der V. portae) sowie einen kleinen Gallengang angeordnet sind. Je drei Lobuli stoßen in einem Periportalfeld aneinander, welches die drei erwähnten Gefäße enthält. Gallenkapillaren sind in Leberläppchen nur als Vertiefungen der Hepatozyten ausgeprägt. Erst außerhalb der Läppchen werden die Gallengefäße von einem einschichtigen Epithel ausgekleidet, wo sie als Gallengänge bezeichnet werden. Kleinere Gallengänge mehrerer Läppchen vereinigen sich zu größeren Gängen, die dann zu den Ducti hepatici und schließlich zum Ductus hepaticus communis zusammenlaufen. Der Ductus hepaticus communis führt zur Gallenblase und mündet schließlich in den Zwölffingerdarm.

Im Zentrum wird jedes Läppchen von einer Zentralvene (Vena centralis) versorgt, welche sich zu immer größeren venösen Gefäßen (Venae sublobulares) vereinigen und schließlich zu den drei großen Lebervenen (Vv. Hepaticae) konvergieren. Diese münden letztlich in die untere Hohlvene (Vena cava inferior). Zwischen dem Zufluss von Arteria und Vena interlobularis und dem Abfluss durch die Zentralvene strömt das Blut innerhalb der Lobuli hepatici durch Sinusoide, die durch den Disse-Raum von den Hepatozyten abgegrenzt werden. Die Sinusoide sind, wie Blutgefäße und Gallengänge, von Endothelzellen ausgekleidet. Des Weiteren sind in den Lebersinusoiden Kupfferzellen (KC) zu finden, die als residente Makrophagen einen wesentlichen Teil des Immunsystems in der Leber darstellen. Einen relativ geringen Anteil der Lebermasse machen die hepatischen Sternzellen (HSC) aus, deren Funktion Vitamin A und Fettspeicherung ist, die aber auch an regulativen Prozessen in Regeneration und Leberschädigung (Fibrogenese) beteiligt sind. Hepatische Sternzellen sind hauptsächlich innerhalb des Disse-Raums zu finden. Sowohl

Kupfer- als auch hepatische Sternzellen spielen eine Rolle bei diversen Lebererkrankungen, da sie als residenter Teil des Immunsystems modulatorische Aufgaben erfüllen (Malik et al. 2002).

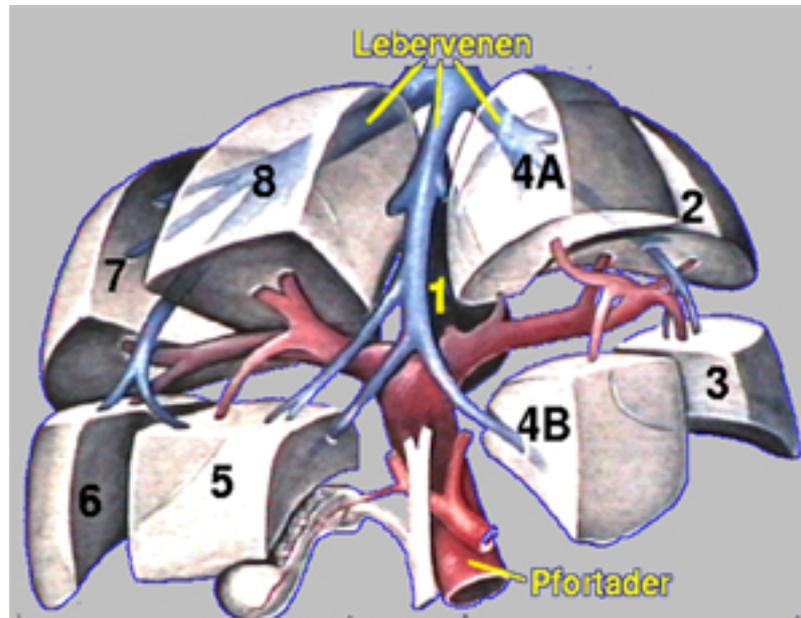


Abb. 1-1: Anatomie der Leber als Übersicht.

Gezeigt ist die klassische Einteilung in Segmente, die zuführenden (Pfortader, Arterien) sowie abführenden (Lebervenen) Gefäße und die Gallenblase mit abführendem Gallengang, links hinter Segment 5 dargestellt.

1.2 *Leberteilresektion und Leberlebendspende*

Lebererkrankungen können verschiedenste Ursachen haben, die von viralen, parasitären und bakteriellen Infektionen, Autoimmunerkrankungen, genetischen Defekten über Schädigungen durch Alkoholkonsum, ungesunde (westliche) Ernährungsgewohnheiten oder Intoxikation (z.B. Pilzvergiftungen, Acetaminophen) bis hin zu Krebserkrankungen des Lebergewebes selber reichen. Hierbei führen oftmals Vorschäden durch virale Hepatitis oder Zirrhose zur Bildung von Tumoren.

Sowohl die Erkennung als auch die Therapie dieser Erkrankungen ist dank moderner Medizintechnik, hochauflösender Bildgebungsverfahren und molekularbiologischen Standardtests erleichtert. Dennoch bestehen für Patienten im Endstadium chronischer Lebererkrankungen oder bei einem akuten Leberversagen oft nur Heilungschancen, wenn ein Spenderorgan als Ersatz zur Verfügung steht.

Gerade bei Krebserkrankungen, nicht nur ausgehend von Leberzellen (hepatozelluläres Karzinom, HCC; cholangiozelluläres Karzinom, CCC), sondern auch bei Metastasen anderer Abdominalkarzinome, ist eine der wichtigsten therapeutischen Methoden die Leberresektion (Haglund et al. 2008; Hasegawa et al. 2007; Wang et al. 2008) oder, sofern die Leberschädigung zu einem akuten oder chronischen Versagen führt, die Lebertransplantation (Kassahun et al. 2006; Malhi et al. 2008). Bei einer Resektion oder Hemihepatektomie werden Teile der Leber entfernt, die durch Zellschäden oder Tumorbildung nicht mehr die eigentliche Funktion erfüllen können. Die restliche Leber ist dann in der Lage, durch kompensatorische Hypertrophie das fehlende Gewebe wiederherzustellen. Auch wenn eine echte Regeneration des Organs zur ursprünglichen, gelappten Anatomie der Leber nicht auftritt, so erreicht die regenerierende Leber eine Größe und ein Gewicht, die zur Erfüllung der Aufgaben des Organs ausreichend ist (Fausto et al. 2006). Die vollständige Wiederherstellung der Lebermasse und die anschließende Revaskularisierung dauert beim Menschen ca. 8-10 Monate, bei entsprechenden Tiermodellen in Nagern (Ratten, Mäuse) ist bereits nach einer Woche 80-95% der ursprünglichen Lebermasse wiederhergestellt (Michalopoulos et al. 1997).

Auch bei der Transplantation einer kleineren Leber für einen erwachsenen Patienten findet im Transplantat eine kompensatorische Hypertrophie statt, um den Bedarf des neuen Trägers zu erfüllen. Diesen Umstand macht man sich sowohl für die Splitlebertransplantation (ein Spenderorgan wird für 2 Empfänger geteilt) als auch bei der Leberlebenspende zu Nutze (Marcos et al. 1999; Trotter et al. 2002; Florman et al. 2006). Bei diesem Verfahren spendet ein Verwandter des Erkrankten einen Teil der eigenen, gesunden Leber, welcher dem Empfänger transplantiert wird. Die Entnahme des Spenderorgans entspricht in diesem Fall in etwa einer Leberteilektomie bzw. Hemihepatektomie. Nach dem äußerst komplexen und aufwändigen operativen Eingriff muss nun sowohl bei Empfänger als auch Spender das Organ wieder zur ursprünglichen Größe wachsen, um die vom jeweiligen Organismus benötigte Leistung erbringen zu können. Bei dem Organspender kann dieses Wachstum bereits nach einigen Wochen oder wenigen Monaten abgeschlossen sein (Middleton et al. 2006).

Besonders interessant erscheint der Umstand, dass bei der Transplantation eines zu großen Organs für relativ kleine Empfänger gezielt Gewebe durch apoptotische Prozesse eliminiert wird, bis eine optimale Kapazität für den jeweiligen Patienten erreicht ist. Eine derartige Situation tritt z.B. bei der Lebendspende für einen Empfänger im Kindesalter auf, bei dem die Leber von einem der Elternteile für das Kind überdimensioniert ist.

Offensichtlich gibt es in der Leber Mechanismen, die auf Grund der Leistungsfähigkeit des Organs eine Hypertrophie bzw. Vergrößerung verursachen oder Gewebe gezielt durch Apoptose abbauen. Sofern die entsprechende Größe erreicht ist, vermitteln diese Mechanismen dann auch eine Begrenzung des Wachstums bzw. beenden die Abbauprozesse.

Wie dies funktioniert und welche molekularen und zellulären Prozesse dabei eine Rolle spielen ist bislang nur ansatzweise klar. Die grundlegenden Mechanismen der Regeneration sind allerdings durchaus bekannt.

1.3 *Leberregeneration*

Im gesunden Gewebe sind die Hepatozyten in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert. Bei einer Schädigung des Gewebes wird diese Arretierung durch Zytokine nicht-parenchymaler Leberzellen (KC, HSCs) aufgehoben und die Hepatozyten können proliferieren (Fausto et al. 1995; Fausto et al. 2006). Hierbei wird zunächst Leberparenchym gebildet, bis die erforderliche Zellmasse wiederhergestellt ist, was als kompensatorische Hypertrophie angesehen werden kann. Kompensatorisches Wachstum ist auf schlichte Vergrößerung des Gewebes beschränkt, was durch Vermehrung im Gewebe verbliebener, bereits differenzierter Zellen erfolgt (Fausto et al. 2003; Fausto et al. 2006). Im Gegensatz dazu wird bei echter Regeneration, z.B. zur Wiederherstellung einer Gliedmaße bei Molchen, ein Blastem aus undifferenzierten Zellen gebildet, aus denen dann Knochen, Muskeln und Haut neu entstehen (Brockes et al. 2005; Kragl et al. 2009).

Im späteren Verlauf der Leberregeneration findet eine Revaskularisierung statt, wodurch sowohl die Versorgung mit Blutgefäßen als auch die Abführung von Flüssigkeit durch die Gallengänge und Venen wieder hergestellt wird.

Auf molekularer und zellulärer Ebene ist der grundsätzliche Ablauf der Signalkette bekannt, die ein Leberwachstum nach Resektion oder anderweitiger Organschädigung einleitet. KC werden durch einen bislang nicht endgültig geklärten Mechanismus aktiviert. Untersuchungen an verschiedenen Knock-Out (KO) Modellen haben gezeigt, dass Lipopolysaccharid (LPS)-freie Mäuse eine signifikant verlangsamte Regeneration zeigen (Cornell et al. 1990; Cornell 1985a). Eine Interpretation dieser Daten weist darauf hin, dass der *Toll-Like-Rezeptor 4* (TLR-4)-Ligand LPS möglicherweise das zentrale Steuerungsmolekül für den Beginn der Leberregeneration darstellt (Su et al. 2004; Zhai et al. 2008). Andererseits führt der KO von TLR-4, TLR-2 oder TLR-9 nicht in jedem Versuchsaufbau zu einer Beeinträchtigung der Regeneration (Laurent et al. 2005; Shen et al. 2007; Carrera-Silva et al. 2008; Hritz et al. 2008). Außerdem wird diskutiert, dass Probleme im experimentellen Design zu fehlerhaften Ergebnissen und Schlussfolgerungen geführt haben könnten, die endogenes Endotoxin aus leberresidenten Bakterien bzw. aus den Verdauungsorganen als Auslöser für das Leberwachstum identifiziert hatten (Tsan et al. 2004; Tsan et al. 2007). Wie aber weitere KO-Studien zeigen konnten, scheint Myd88 unabdingbar für den Beginn der Regeneration (Su et al. 2004; Seki et al. 2005; Campbell et al. 2006), wobei Myd88 als zentrales Adaptermolekül in TLR-Systemen gilt (Silverman et al. 2001; Yang et al. 2005; Atkinson 2008; Seki et al. 2008). Nach wie vor ist der initiale Stimulus also nicht endgültig ermittelt. Die möglicherweise über das TLR-System aktivierten KC produzieren zunächst *Tumor-necrosis-factor- α* (TNF- α) (Yamada et al. 1997) wodurch die KC selbst wiederum zur Ausschüttung von Interleukin-6 (IL-6) angeregt werden (Jin et al. 2006; Zimmers et al. 2003). Dieses Zytokin ermöglicht es den normalerweise in der G₀-Phase des Zellzyklus arretierten Hepatozyten in die G₁-Phase einzutreten und zu proliferieren (Webber et al. 1998; Fausto et al. 2005). Hepatozyten produzieren dabei sowohl *hepatocyte growth factor* (HGF) als auch *vascular endothelial growth factor* (VEGF), um den Status der Teilungsbereitschaft aufrecht zu erhalten, wobei das

Eingangssignal ausgehend von den KC notwendig ist, um die Hepatozyten für diese Wachstumsfaktoren empfänglich zu machen (Fausto 1991; Yamada et al. 1997; Fausto et al. 2006). Weitere wichtige Signalmoleküle sind *transforming growth factor- α* (TGF- α) und *transforming growth factor- β* (TGF- β). TGF- β trägt vor allem dazu bei, regenerative Prozesse im benötigten Rahmen zu halten bzw. sie zu beenden, wenn weitere Regeneration nicht mehr nötig ist. Allerdings spielt TGF- β auch eine Rolle in der Aktivierung von HSC und damit in der Fibrogenese (Bataller et al. 2005).

1.4 Das TLR-System und der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Wie bereits zuvor erwähnt, steht das TLR-System nach wie vor als auslösendes Signal für die Leberregeneration zur Debatte. Unabhängig davon spielen TLR eine Rolle in der Aktivierung Leber-residenter Zellen des Immunsystems. Speziell bakterielles Endotoxin bzw. LPS der Zellwand Gram-negativer Bakterien aktivieren KC durch das TLR-System (Su et al. 2002; Su et al. 2000). TLR sind Teil des angeborenen Immunsystems, das unabhängig vom adaptiven Immunsystem eine generelle und initiale Reaktion gegen Pathogene vermittelt. Toll-Rezeptoren wurden zuerst bei *Drosophila* entdeckt, finden sich jedoch in vielen Organismen von simplen Toll-ähnlichen Molekülen bei Pflanzen bis hin zu einem komplex regulierten System von 9 verschiedenen TLR bei Säugetieren (Silverman & Maniatis 2001; Heine et al. 2003; Schwabe et al. 2006; Atkinson 2008; Seki & Brenner 2008). Die Rezeptoren des Toll-Like-Systems erkennen sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (pamps; Abb. 1-2, S.20). Hierbei handelt es sich um molekulare Bestandteile, die bei mehreren oder allen Spezies bestimmter Pathogentypen vorhanden sind, z.B. Endotoxin der Gram-negativen Bakterien, doppelsträngige RNA im Replikationszyklus von Viren, Flagellin, Glykolipide und noch diverse weitere molekulare Strukturen.

Durch die Bindung eines Liganden an den jeweiligen TLR wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die letztlich zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt. Hierbei stellt der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B) einen wesentlichen Endpunkt diverser TLR-Signalwege dar (Abb. 1-2, S.20), durch den die Expression von

Zytokinen wie auch Inhibitoren der Apoptose sowie vielen weiteren Genen reguliert wird.

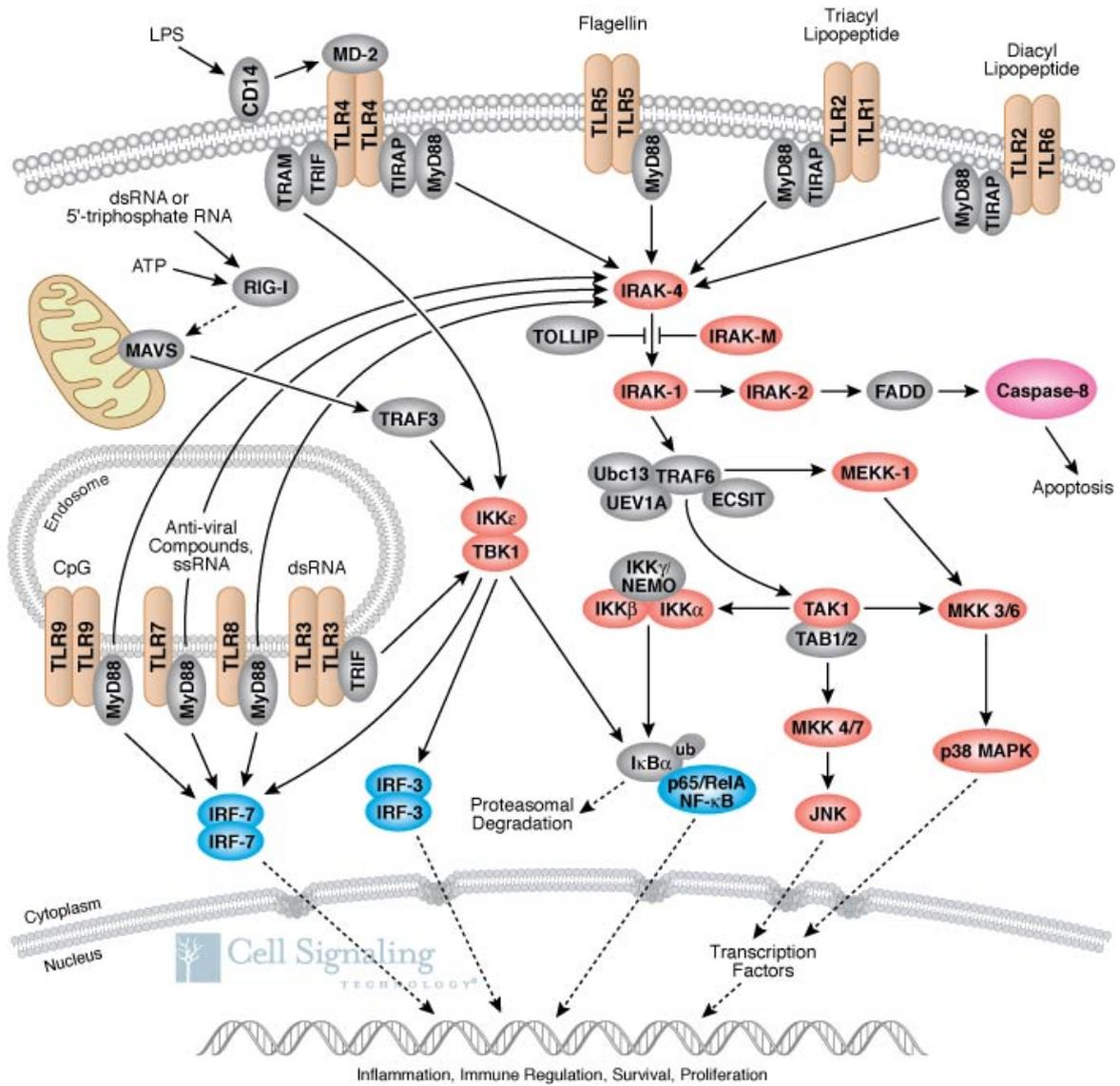


Abb. 1-2: TLR-Signalwege.

Verschiedene TLR-Liganden können über eine Kaskade von Effektormolekülen zur Aktivierung bzw. Phosphorylierung des IKK Komplexes führen. Dieser wiederum phosphoryliert IκBa, dessen Abbau durch das Proteasom NF-κB ermöglicht in den Zellkern zu migrieren. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Cell Signaling Technology Inc (http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Toll_Like.html).

Bei Stimulation von TLR-4, dem Rezeptor für bakterielles Endotoxin, produzieren Zellen anscheinend vermehrt Zytokine, die einerseits Zellen des adaptiven Immunsystems zu einer infizierten Stelle locken sollen (Li, Carpio et al. 2001; Naumann 2000; Murillo et al. 2003), aber, wie oben erwähnt, durchaus auch zur Anregung der Leberregeneration zwingend erforderlich sind. Der zentrale Transkriptionsfaktor NF- κ B ist hierbei ein wesentlicher Endpunkt der Signalkaskade, die sich an die Bindung eines TLR-4-Liganden anschließt.

Weitere Faktoren, die Auswirkungen auf das Endergebnis einer Leberresektion bzw. Lebertransplantation haben sind einerseits Ischämie/Reperfusionsschäden, hier spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle, sowie der Portalvenendruck, der durch verschlechterte Abflussmöglichkeiten nach einer Resektion ansteigt und das Gewebe schädigt (Schemmer et al. 2004; Muriel 2009). Nach der Neuversorgung mit Blut und damit auch Sauerstoff werden in Geweben, die eine Zeit lang keinen Sauerstoff erhalten haben vermehrt ROS produziert. Es wurde gezeigt, dass ROS unter anderen Faktoren zur Aktivierung von NF- κ B führen kann und dass eine Hemmung der ROS-induzierten NF- κ B Aktivierung entzündliche Prozesse in der Leber vermindert (Park et al. 2004; Giakoustidis et al. 2010).

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in vielen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. NF- κ B besteht aus unterschiedlich konfigurierten Dimeren von fünf verschiedenen Genprodukten, die alle eine homologe Sequenz besitzen, die Rel-Region. Der C-terminale Bereich dieser Sequenz ist sowohl für Dimerisierung als auch die Bindung des Inhibitors I- κ B verantwortlich. Die DNA-Bindung wird durch den N-terminalen Anteil der Rel-Homologiesequenz vermittelt (Gilmore 2006; Hayden et al. 2006). Die bei Säugetieren bekannten Proteine, die an der Bildung von NF- κ B beteiligt sein können sind NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel. Während verschiedene Hetero- und Homodimere möglich sind, wobei RelA ausschließlich Heterodimere bilden kann, treten vorwiegend Heterodimere zwischen einem Rel-Protein und einem nicht-Rel-Protein auf. Die am häufigsten in Zellen auftretende, aktive Form ist ein Dimer aus p65 (bzw. RelA) und p50, welches im

Allgemein als NF- κ B bezeichnet wird. Auch in der vorliegenden Arbeit ist die Benennung NF- κ B auf das p65-p50-Dimer bezogen.

Wie oben beschrieben können über TLR vermittelte Signale zu einer NF- κ B-Aktivierung führen, allerdings münden auch Signalkaskaden, die durch freie Radikale, UV-Strahlung, MAP-Kinasen oder Zytokine angeregt werden, zum Teil in der Aktivierung von NF- κ B (Mayo et al. 2001; Ozes et al. 1999; Gilmore 2006).

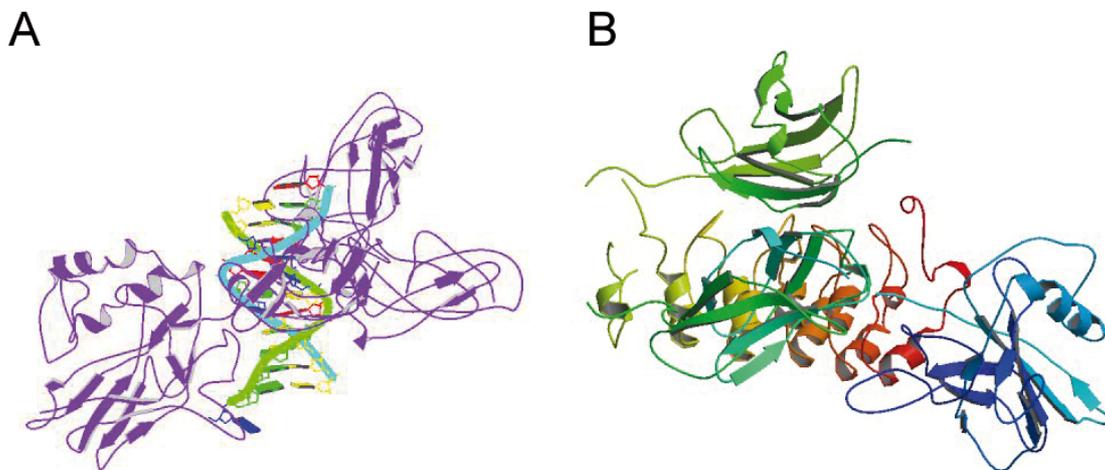


Abb. 1-3: Röntgenkristall-Strukturen von NF- κ B als 3D Modell.

A) In den meisten Zellen ist NF- κ B in Form des hier gezeigten p50/p65 Heterodimers vorhanden. Allerdings sind jeweils auch Homodimere von p50 und p65 bekannt. B) NF- κ B ist hier an den natürlichen Inhibitor I κ B gebunden.

Sofern ein Ligand an Toll-Like-Rezeptoren bindet, findet meist eine Dimerisierung der Rezeptoren statt, auch der CD14-Rezeptor (*Cluster of differentiation 14*) scheint an der Bindung beteiligt zu sein, der auf Monozyten und Makrophagen als Membran gebundenes Glykoprotein vorhanden ist. Intrazellulär sind TRIF und TIRAP an TLR-4 gebunden, an diese wiederum sind TRAM bzw. MyD88 gebunden (Abb. 1-2, S.20). MyD88 phosphoryliert nach Bindung eines Liganden IRAK4, welches wiederum IRAK1 phosphoryliert. Dieses wirkt auf einen Komplex, der unter anderem TRAF6 enthält. Das Effektormolekül TRAF6 phosphoryliert den I κ B Kinase (IKK)-Komplex

bestehend aus IKK α , IKK β und IKK γ /NEMO. IKK wiederum phosphoryliert I κ B Proteine, welche physiologische Inhibitoren von NF- κ B sind. Bekannt sind die Inhibitoren I κ B- α und I κ B- β . I κ B- α enthält eine Zellkern-Exporter-Domäne. Hierdurch unterliegt an I κ B- α gebundenes NF- κ B einer permanenten Translokation zwischen Nukleus und Cytosol, wobei der größte Anteil sich im Cytosol befindet. Zusätzlich bindet I κ B- α an die Regionen von NF- κ B, die für eine DNA-Bindung notwendig sind, wodurch auch im Zellkern eine NF- κ B induzierte Transkription verhindert wird. Im Gegensatz hierzu verhindert I κ B- β vollständig die Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Unabhängig vom Wirkmechanismus der Inhibition, werden I κ B Proteine durch Phosphorylierung markiert, ubiquitinyliert und dadurch dem Abbau durch das Proteasom zugeführt. Wird I κ B abgebaut, kann NF- κ B aus dem Cytosol in den Zellkern migrieren und dort die Transkription verschiedener Gene induzieren.

Im Gegensatz zu vielen bekannten Transkriptionsfaktoren ist der wesentliche Aspekt bei der Aktivierung von NF- κ B nicht die Phosphorylierung des Effektors sondern die Ubiquitinylierung und der anschließende proteasomale Abbau des physiologischen Inhibitors.

NF- κ B reguliert die Expression einer großen Bandbreite an Genen. Hierzu zählen Zytokine (z.B. CCL5, IL-6, TNF- α), Zelladhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1), Apoptose-Regulatoren (Bcl-2, Caspase 11), Transkriptionsfaktoren (IRF-1, junB, HIF1 α) und ein breites Spektrum weiterer Zielgene (Gilmore 2006). Insgesamt werden möglicherweise über 300 Gene von NF- κ B reguliert. Gleichzeitig wird auch I κ B- α Expression von NF- κ B induziert. Durch diese Rückkopplung wird die NF- κ B Aktivierung in einem relativ kleinen Zeitfenster beendet, da der Inhibitor direkt nukleär lokalisiertes NF- κ B in das Cytosol transloziert. In vielen Zelltypen ist bereits 30-60min nach der initialen Translokation von NF- κ B keine Aktivität mehr messbar.

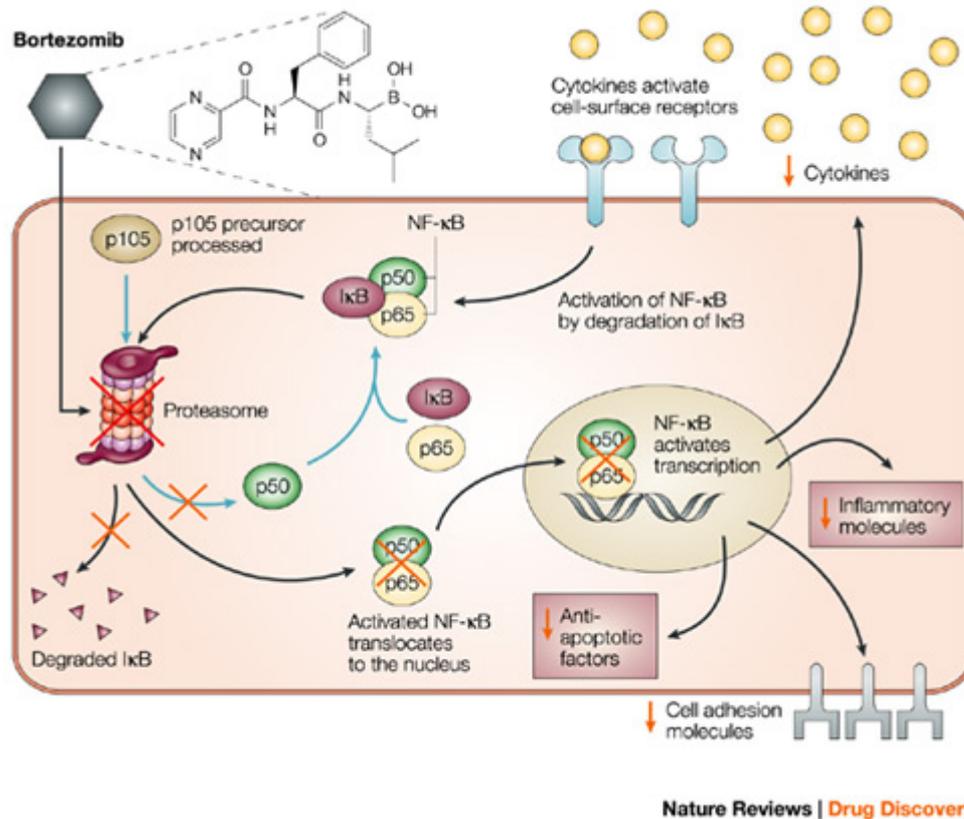
1.5 *Glycin als zytoprotektives Agens*

Die Glycin-Supplementation wird seit einiger Zeit als Möglichkeit in Betracht gezogen, auf die oben beschriebenen Signalketten Einfluss zu nehmen und dadurch die Leberregeneration positiv zu modulieren. Sowohl generell zytoprotektive Agenzien wie Glycin, wie auch Modulatoren einzelner Signalwege stehen hier im Fokus der Forschungen (Gu et al. 2004; Oltean et al. 2007). In Konservierungslösungen für Transplantorgane wird seit einiger Zeit Glycin als Additivum eingesetzt (Bahde et al. 2008). Glycin reduziert den Ischämie/Reperfusionsschaden im Gewebe des Organs möglicherweise durch eine Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms (Schemmer et al. 1999; Warnecke et al. 2006; Schemmer et al. 1998). Durch Unterversorgung mit Sauerstoff nach der Explantation kommt es in Organen für die Transplantation zu einem Ischämie-Schaden. Sobald das Organ in den Empfänger transplantiert wurde und eine Reperfusion der Blutgefäße im Transplantat erfolgt ist, führt die kurzfristige Neuversorgung mit Sauerstoff in dem bereits ischämischen Gewebe zur Bildung von ROS. Diese schädigen Zellen und führen zu initialen Entzündungen, die sich nachteilig auf die Akzeptanz des Transplantats auswirken können. Wie oben beschreiben führen ROS auch zur Aktivierung von NF- κ B, was in diesem Fall eher die Verstärkung der Entzündungsprozesse durch vermehrte Produktion von Zytokinen zur Folge hat (Serracino-Inglott et al. 2001; Zhai et al. 2008; Tacke et al. 2009). Glycin scheint möglicherweise einen chloridabhängigen Ca^{2+} Kanal zu regulieren, wodurch ein vermehrter Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen und dadurch die Initiierung der Apoptose unterbunden wird (Ikejima et al. 1997; Ito et al. 2008). Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die Wirkung von Glycin auch in Lösungen ohne Chlorid-Ionen auftritt (Frank et al. 2000), was auf einen anderen oder zumindest zusätzlichen Wirkmechanismus schließen lässt, der jedoch bislang gänzlich unbekannt ist.

1.6 *Bortezomib*

Bortezomib ist ein pharmakologischer Proteasom-Inhibitor, der sich strukturell als dipeptidyl Mannitol-Borester darstellt. Bortezomib wird bereits zur Behandlung des multiplen Myeloms und des Mantelzelllymphoms eingesetzt (Blade et al. 2005; Laura et al. 2006; Adams 2002; Kane et al. 2003) und unter dem Handelsnamen Velcade® (VC) vertrieben. Schnell wachsende Zellen produzieren viele Proteine, wodurch parallel eine große Menge an fehlgefalteten, unbrauchbaren oder nicht weiter benötigten Proteinen anfällt. Die Aufspaltung dieser überschüssigen Proteine in Aminosäuren und somit eine Wiederverwertung dieser Ressourcen wird durch eine Blockierung des Proteasoms verhindert. Gleichzeitig sammeln sich in der Zelle unbrauchbare Proteine an, wodurch die Zelle keine gesteuerten Prozesse mehr durchführen kann. Dies führt letztendlich zum Tod der Tumorzellen. Gleichzeitig werden jedoch Signalwege blockiert, die von der Funktion des Proteasoms abhängig sind. Hierzu zählt, wie oben erwähnt, der NF- κ B Signalweg, da IKK vom Proteasom abgebaut werden muss, damit NF- κ B in den Zellkern migrieren und dort als Transkriptionsfaktor wirken kann (Abb. 1-4, S.26). Es wird durchaus diskutiert, dass die zentrale Wirkung von Bortezomib auf Tumore durch die NF- κ B Inhibition verursacht wird (Armeanu et al. 2008; Hideshima et al. 2002; Sunwoo et al. 2001). Allerdings ist der Wirkmechanismus noch nicht endgültig im Detail geklärt.

Es wird intensiv am Einsatz von Bortezomib bei anderen Tumorerkrankungen gearbeitet (Papageorgiou et al. 2006; Calvaruso et al. 2006; Adams et al. 2000); speziell im Rahmen von Lebererkrankungen wäre der Einsatz dieses Medikaments von großem Interesse (Calvaruso et al. 2006; Anan, Baskin-Bey, Bronk et al. 2006; Anan, Baskin-Bey, Isomoto et al. 2006). So ermöglicht eine kombinierte Bortezomib-TRAIL-Verabreichung das gezielte Abtöten von Tumorzellen (Koschny et al. 2007; Ganten et al. 2005). Es ist aber auch eine gewisse Hepatotoxizität bekannt, und Nebenwirkungen wie Fatigue und periphere Neuropathie sind durchaus zu beobachten (Cavaletti et al. 2007; Rosinol et al. 2005). Hierzu sind Studien an Ratten durchgeführt worden, die eine Dosisabhängigkeit der Nebenwirkungen festgestellt haben (Cavaletti et al. 2007).



Nature Reviews | Drug Discovery

Abb. 1-4: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Bortezomib auf NF-κB.

Bortezomib blockiert das Proteasom, wodurch der physiologische Inhibitor von NF-κB nicht abgebaut werden kann. Trotz aktivierender Signale, z.B. durch Zytokine, kommt es nicht zu einer Aktivierung von NF-κB (Peter Kirkpatrick (Editor) 2004).

1.7 NF-κB und TLR in der Leberregeneration

Die Aktivierung von NF-κB ist im Rahmen der Leberregeneration bislang unterschiedlich interpretiert worden. Es gibt Arbeiten, aus denen zu schließen ist, dass NF-κB keinen oder eher einen negativen Einfluss auf regenerative Prozesse hat, da die induzierte Expression von Zytokinen Entzündungen und Ischämie/Reperfusionsschäden verstärkt (Xu et al. 2004; Luedde et al. 2005; Laurent et al. 2005). Andererseits existieren experimentelle Daten, die NF-κB als unerlässlich für die Leberregeneration darstellen, wobei TLR-Systeme als aktivierendes Signal diskutiert werden (Freedman et al. 1992; Rai et al. 1996; Su et

al. 2004; Luedde et al. 2005; Seki et al. 2005; Yang et al. 2005; Yang et al. 2005). Letzteres ist allerdings ebenfalls nicht endgültig geklärt.

1.8 Ziele

Bislang ist unklar, ob sich Unterschiede im Resektionsumfang auf die molekularbiologischen Mechanismen der Regeneration auswirken. Vorläufige Experimente unserer Arbeitsgruppe deuten jedoch darauf hin, dass der Resektionsumfang in dem von uns verwendeten Tiermodell einen Einfluss auf die Regeneration nach Leberresektion hat. Vor allen Dingen die Beteiligung des TLR-Systems und von NF- κ B an den regenerativen Prozessen sind allerdings nicht eindeutig. Diese könnten jedoch interessante Ansatzpunkte für pharmakologische Intervention bieten, da hier bereits Wirkstoffe - wie Bortezomib – zugelassen sind, mit denen eine derartige Therapie denkbar wäre. Grundsätzlich ist nicht gesichert, ob eine pharmakologische Unterstützung von Resektionen sinnvoll ist.

Daher sollen die folgenden Fragestellungen und Ziele in verschiedenen Projekten beantwortet werden:

- Beeinflusst eine Leberteilresektion unterschiedlichen Umfangs die zellulären und molekularen Prozesse der Regeneration und Leberschädigung? Speziell sollte die Aktivierung von NF- κ B und die Expression der hierdurch induzierten Zytokine und Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit des Ausmaßes der Leberresektion charakterisiert werden.
- Ist eine generelle pharmakologische Modulation, konkret eine Verbesserung der Regeneration und eine Verringerung des Gewebes Schadens, nach Resektion möglich?
- Kann der Proteasominhibitor Bortezomib die TLR-4-vermittelte NF- κ B-Aktivierung beeinflussen?
- Ist die NF- κ B-Inhibition im Rahmen der Leberteilresektion eine sinnvolle Möglichkeit pharmakologisch den Heilungsverlauf zu verbessern?

In der Zusammenschau sollten molekulare und zelluläre Prozesse nach Hemihepatektomie unter unterschiedlichen Bedingungen charakterisiert werden, die jeweils eine andere klinische Situation nachbilden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob eine pharmakologische Modulation bzw. Unterstützung des Regenerationsprozesses realisierbar ist, einerseits zur erhöhten Sicherheit von Patienten, die eine Leberteilresektion oder Leberlebendspende erhalten, andererseits um Patienten mit Kontraindikationen eine chirurgische Intervention zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Aesculap chirurgische Pinzette	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aesculap chirurgische Schere	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aesculap mikrochirurgische Pinzette (gerade)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aesculap chirurgische Schere (gerade)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aesculap Mosquito-Klemme (gebogen)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aesculap Mosquito-Klemme (gerade)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aesculap Favorita II Kleintierschermaschine	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Autoklav 2540 EL	Systemec GmbH, Wetzlar, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Blotkammer XCell II Blot Module	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
CO ₂ Inkubatoren Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
ELISA Reader ELx808	BIO-TEK Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
Elutriator JE-65 zur Nutzung in Zentrifuge CH-AVJ25	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Feinwaage AT261 DeltaRange	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Gelkammer XCell SureLock™	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
iCycler iQ™ Real-Time Detection	Bio-Rad, München, Deutschland
Inkubationsschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific Co.Inc., Edison, NJ, USA
Inverses Gewebekulturmikroskop TMS-F	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
LaminAir® Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Luminometer Fluorostar Optima	BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Peristaltikpumpe Masterflex 77200-50	Cole Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA

pH-Meter 765 Calimetric	Knick, Berlin, Deutschland
Schüttler Certomat TC3	B.Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Schwämme für Blotkammer XCell II	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Spectrolinker™ XL-1000 UV Crosslinker	Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA
Sterilwerkbank (Biological Safety Cabinet Class II)	NuAire, Plymouth, USA
Stromquelle BioRad PowerPAC 300	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermoblock Dri-Block DB-2A	Techne, Stone, Staffordshire, UK
Ultra-Turrax, Dispergiergerät	IKA, Staufen, Deutschland
Waage MP-3000	Chyo Balance Corp., Komatsu, Japan
Wasserbad Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zählkammer Neubauer improved	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge CH-AVJ25	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge 5810 R und 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
15ml Falcon™ Röhrchen Polystyrene (für Dichtegradientenzentrifugation)	Beckton Dickinson / BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
15ml Röhren	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1ml Spritze (Syringe without needle)	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
50ml Röhren	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Adhäsive Verschlussfolie (Klebefolie) für PCR-Platten	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
BD Microlance 3 (0,4 x 19 mm) Kanülen	Beckton Dickinson / BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
BD Microlance 3 (0,9 x 40 mm) Kanülen	Beckton Dickinson / BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Cellstar 6 well -, 12 well -, 24 well Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen (10 mm)	Marienfeld, Königshofen, Deutschland
Einwegskalpelle Fig.10, Fig. 11 und Fig. 21	Ratiomed, Deutschland
Filterpapier, Elektrodenpapier Novablot („Whatman-Papier“)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Metallsiebe	Sigma Cell Culture Reagents, St. Louis, MO, USA
Mopylen® Polypropylen Sterile Nadel-Faden-Kombination, Stärke 3-0	RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Mopylen® Polypropylen Sterile Nadel-Faden-Kombination, Stärke 6-0	RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Novex® DNA Retardation Gels	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Menzel GmbH & CO KG, Braunschweig, Deutschland
OptiPlate™-96HB, White	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Parafilm®	American National Can, Greenwich, CT, USA
PCR-Platte, PP natur, 96 *x 0,2	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Petrischalen für die Zellkultur	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PharmAssure (0,45µm)-Sterilfilter	Pall GmbH, Dreieich, Deutschland
Pipetten (2, 5, 10 und 25ml), Cellstar ®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (0,1 - 10µl; 1 – 20µl, 10 - 100µl, 101 – 1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen (2µl; 200µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1ml, 2ml)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Spritzen 2ml, 5ml, 10ml (BD Discardit II)	Beckton Dickinson / BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Vasofix® Safety 20G und 22G Sicherheitsvenenverweilkatheter	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zellkulturflaschen, 25 cm ²	Nunc GmbH & CO KG, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturschalen, 24 Well-Platten	Nunc GmbH & CO KG, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturschalen, 8,8 cm	Nunc GmbH & CO KG, Wiesbaden, Deutschland
Zellschaber, 24cm, schwenkbare Klinge	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Pharmazeutika und Medien

Substanz	Herstellernachweis
AB-Serum, human	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Aqua B.Braun Spüllösung (steriles, pyrogenfreies Wasser)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bortezomib (vertrieben als Velcade®)	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA, Pasching, Österreich
CaCl ₂	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroform	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Collagen G, 0,4%ige Collagenlösung in HCl	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Grenzach, Deutschland
complete,mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Grenzach, Deutschland
DEPC treated Water	Ambion / Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
DMEM	PAA, Pasching, Österreich
DMEM/Ham's F12	PAA, Pasching, Österreich
EDTA	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
EGTA	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
EGTA	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (99.9% p.a.)	Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich Chemie Gm, Seelze, Deutschland
External Well Factor Solution	BioRad, München, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA, Pasching Österreich
GBSS	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Gelatine Lösung	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Gentamycin	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
HBSS	PAA, Pasching, Österreich
HCl	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe, Deutschland
Heparin	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Histoacryl® Gewebekleber	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Imidazol	Fluka / Sigma-Aldrich, Burcha, Schweiz
Interferin™	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Isofluran	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ketamin	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Lipofectamin™	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
MCBD 131 Medium	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
MEM	ATCC, Manassas, VA, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NaCl	Fluka, Sigma-Aldrich, Burcha, Schweiz
NaCl 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumziträt	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PBS	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Penicilin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
ProLong® Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
QIAzol Lysis Reagent	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNase ZapWipes	Ambion / Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Röntgen-Entwicklerkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, Deutschland
Röntgen-Fixier-Konzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, Deutschland
S.O.C. Medium	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
SDS	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Silicone Solution SERVA	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris base	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Triton X-100	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trizol Reagent	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich

Xfect™	Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich
Xylazin	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland

2.1.4 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Collagenase	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dispase	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DNase I	Roche, Grenzach, Deutschland
Liberase Blendzyme 3	Roche, Grenzach, Deutschland

2.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-LSEC MicroBeads mouse; clone: ME-9F1	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Human CD163 Phycoerythrin MAb (Clone 215927), Mouse IgG1	R&D Systems, minneapolis, MN, USA
Monoclonal Antibody to Mouse F4/80 Antigen-APC	Acris, Herford, Deutschland
Mouse IgG1 Phycoerythrin Isotype Control (Clone 11711), Mouse IgG1	R&D Systems, minneapolis, MN, USA

2.1.6 Kompetente Zellen

Bezeichnung	Hersteller
One Shot® TOP10 Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
BCA Protein Assay Kit	Pierce / Thermo Fisher Scientific, Bonn,

	Deutschland
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche, Grenzach, Deutschland
Great EscAPe™ SEAP Chemiluminescence it 2.0	Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich
LightShift Chemiluminescent EMSA Kit	Pierce / Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
M30 ELISA Kit, Apoptosense™	Peviva, Bromma, Schweden
M65 cell death detection Kit	Peviva, Bromma, Schweden
NF-KB p65 ELISA KIT	BioSource™, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Nycoprep	Progen Biotechnik, Heidelberg, Deutschland
Opti-Prep	Axis-Shield, Heidelberg, Deutschland
Pathway Profiling System (SEAP system, broad coverage)	Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich
Percoll	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Plasmidmini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect™ SYBR®Green RT-PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasymini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
STAT3 [pY705] ELISA KIT	BioSource™, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.1.8 Pufferzusammensetzungen

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
Ca ₂ -depr. Medium, pH 7,4	L-Asparaginsäure	0,1 mM
	L-Threonin	0,2 mM
	L-Serin	0,3 mM
	Glycin	0,5 mM
	L-Alanin	0,6 mM
	L-Glutaminsäure	0,9 mM
	L-Glutamin	0,9 mM
	D (+)-Glukose	20 mM
	Fruktose	20 mM
	Sucrose	197 mM
	KCL	3 mM
	NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	0,7 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	Hepes	10 mM
	NaHCO ₃	24 mM

Extraktionspuffer zur Isolation der Kernfraktion aus Proteinpräparationen von <i>In-vitro</i> -Kulturen / Geweben	HEPES NaCl EDTA DTT NP-40 Completemini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (PIC) von Roche	20 mM 400 mM 1 mM 1 mM 0,2% 1 Tablette
Krebs-Ringer- Lösung	NaCl NAHCO ₃ Glukose 1 M HEPES Solution C	3,5 g 1,0 g 1,9 g 2,5ml (pH 7,45) 5ml
Lysepuffer zur Isolation der zytosolischen Fraktion aus Proteinpräparationen von <i>In-vitro</i> -Kulturen / Geweben	HEPES NaCl EDTA DTT NP-40 Completemini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (PIC) von Roche	10 mM 10 mM 0,1 mM 1 mM 0,4% 1 Tablette
PBS, pH 7,3 - Ca ²⁺ - Mg ²⁺	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O KH ₂ PO ₄	137 mM 3 mM 6,5 mM 1,5 mM
Perfusionslösung für murine KC	Ca ₂ -Depr.Medium Liberase Blendzyme 3	7 mg/ml
Perfusionslösung 1 für humane Hepatozyten	HBSS EGTA	0,05 M
Perfusionslösung 2 für humane Hepatozyten	HBSS CaCl ₂ Collagenase	0,5 M 0,05%
Perfusionslösung 1 für murine Hepatozyten	Krebs-Ringer-Lösung Glucose EGTA	250ml 1% 50 mM
Perfusionslösung 2 für murine Hepatozyten	Krebs-Ringer-Lösung Glucose CaCl ₂ Liberase	250ml 1% 1 M 23µg/ml
RIPA Lysepuffer (modifiziert, mRIPA)	Tris-HCL, pH 7,5 NaCl Igepal (NP40) Deoxycholic Acid Completemini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (PIC) von Roche	50 mM 150 mM 0,5% 0,25% 1 Tablette
Solution C	KCl MgSO ₄ KH ₂ PO ₄	480 mM 120 mM 120 mM

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell und operative Technik

Die Experimente zum differentiellen Resektionsumfang, zur Glycin-Behandlung sowie Bortezomib-Behandlung wurden in sechs bis acht Wochen alten, männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Zur Isolation von KC wurden männliche C57/BL6-Mäuse im Alter von sechs Wochen verwendet. Eine Beschränkung auf männliche Tiere wurde eingeführt, um Einflüsse des Östrus bei weiblichen Tieren ausschließen zu können. Alle Versuchstiere wurden unter künstlicher Beleuchtung mit 12h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten Nahrung und Wasser nach Belieben. Entsprechende Anträge für Tierversuche wurden bei der Landesregierung Nordrhein-Westfalen eingereicht und von den Behörden unter den Aktenzeichen Az. 50.05-230-50/05 und Az. 9.93.2.10.34.07.311 genehmigt. Tiere wurden sowohl durch die Versuchsdurchführenden als auch durch die Tierpfleger im Tierlabor des Universitätsklinikums Essen pfleglich behandelt und über den Versuchsverlauf genau beobachtet. Bei unzumutbaren Schmerzen oder Belastungen wurden die Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen.

Für die unterschiedlichen Resektionsexperimente wurden die männlichen Wistar-Ratten mit Isofluran betäubt und einer 70%igen bzw. 90%igen Hepatektomie unterzogen (im Folgenden als R70- bzw. R90-Hepatektomie / -Resektion bezeichnet), wie von Andersson und Higgins (Higgins et al. 1931) sowie Emond *et al* (Emond et al. 1989) beschrieben. Unter Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde ein Einschnitt durch die abdominale Mittellinie vorgenommen und die Leber von ihren Ligamenten befreit. Zuführende Gefäße zum linkslateralen sowie linken medianen Leberlappen wurden jeweils mit einer Mosquito-Klemme ligiert und die entsprechenden Lappen anschließend entfernt. Der rechte mediane Lappen wurde mit einer Mosquito-Klemme abgeklemmt und durch eine kontinuierliche Naht (6-0 Polypropylen-Faden) abgetrennt, die unterhalb und durch die Klemme geführt wurde. Hierdurch ergab sich ein Restlebervolumen von ca. 30% der ursprünglichen Lebermaße. Für die R90-Resektion wurden zusätzlich der obere und untere

rechtslaterale Lappen entfernt, so dass nur der caudale Lappen verblieb. Nach dem chirurgischen Eingriff wurde der Einschnitt im Abdomen mit einer kontinuierlichen Naht (3-0 Polyester-Faden) verschlossen (Benko et al. 2010; Sowa et al. 2008).

Die Ratten wurden in insgesamt 8 Gruppen eingeteilt: Kontrollen ohne chirurgischen Eingriff, Spezialfutter oder medikamentöse Behandlung; R70- oder R90-Leberresektion; R90 mit vorheriger Fütterung mit 5% Glycin in der Nahrung (Standardfutter enthält ca. 0,14% L-Glycin), im Folgenden als G90 bezeichnet; einmalige Bortezomib-Injektion (150ng in 100µl NaCl, i.p.) ohne chirurgischen Eingriff; R70-Resektion 1 Woche bzw. 24h nach Bortezomib-Injektion, im Folgenden als VC70 bezeichnet; R70-Hepatektomie mit einer Bortezomib-Injektion 24h postoperativ; sowie R70-Tiere ohne Bortezomib-Behandlung bezeichnet als H70. Anhand einer Studie zu Nebenwirkungen von Bortezomib in Ratten (Cavaletti et al. 2007) wurde für die vorliegende Arbeit eine Einzeldosis gewählt, die unterhalb der dort verwendeten Mengen (2 Dosen pro Woche je 2 - 75mg über 4 Wochen) lag, um den Wirkungszeitpunkt besser eingrenzen zu können und negative Effekte durch Nebenwirkungen für die Tiere zu minimieren.

Operationen sowie Asservierung von Lebergewebe und Serum wurden für die Gruppen R70, R90 und G90 von Dr.med. Tamas Benko, Abteilung Chirurgie und Transplantation der Semmelweis-Universität Budapest, für die Gruppen H70 und VC70 von Dr.med. Yanli Gu, Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Uniklinikums Essen, durchgeführt.

Serum und Lebergewebeproben wurden während der Operation sowie 2 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 7 d nach Resektion entnommen ($n = 4$ zu jedem Zeitpunkt bei jeder Versuchsgruppe, außer R70 2h mit $n = 3$). Für die Tiere mit Bortezomib-Behandlung wurden Serum und Gewebeproben nur 2h ($n = 6$) und 6h ($n = 6$) postoperativ asserviert. Die exakte Gruppenaufteilung ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Aufteilung der Versuchsgruppen und Gruppengrößen für das Leberresektionsmodell.

Gruppenbezeichnung	Resektionsumfang	Behandlung	Tötungszeitpunkt nach OP										
			0h	2h	6h	12h	24h	48h	72h	7d			
Kontrollen	k.R. ¹	Nein	N=4										
R70	70% ²	Nein	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4
R90	90% ²	Nein	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4
G90	90% ²	Glycin	N=4	N=4									
-	k.R. ¹	Bortezomib	N=5										
H70	70% ³	Nein		N=6	N=6								
VC70	70% ³	Bortezomib		N=6	N=6								

¹: keine Resektion.

²: Operateur: Herr Dr. med. Tamas Benko.

³: Operateurin: Frau Dr. med. Yanli Gu.

2.2.2 Liver body weight ratio (LBW-r)

Am Ende des Versuchszeitraums wurde die Restleber bzw. regenerierende Leber entnommen und vom durchführenden Operateur bzw. der Operateurin gewogen (A), zuvor wurde das Körpergewicht des Tieres bestimmt (B). Die erhaltenen Daten wurden als Prozent des Verhältnisses zwischen Gewicht der Restleber und Körpergewicht mal 100 angegeben. Leber-Körpergewicht-Verhältnis: Liver body weight ratio (LBW-r; %) = $A/B \times 100$ (Bockhorn, Goralski et al. 2007; Bockhorn, Schollmann et al. 2007).

2.2.3 ALT, AST, LDH und Bilirubin

Die Serum-Konzentrationen wichtiger Leberparameter wurden mittels Festphasen-Immunofluoreszenz Chromatographie im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen nach Standardmethoden [ALT (GPT) FS (IFCC mod.); AST (GOT) FS (IFCC mod.); Bilirubin Auto Direct FS; LDH FS IFCC; DiaSys Diagnostic Systems; Holzheim, Germany] bzw. mittels der gleichen Standardmethoden im Labor des Instituts für physiologische Chemie, Uniklinikum Essen, bestimmt (Benko et al. 2010).

2.2.4 Isolation primärer Leberzellen aus Mäusen

2.2.4.1 Isolation von murinen Hepatozyten

Sechs bis 8 Wochen alte, männliche C57/BL6 Mäuse wurden zur Zellisolation mit Ketamin/Xylazin (1,6% / 0,3% in 0,2 bis 0,25ml 0,9% NaCl i.p.) betäubt und der Bauchraum mit einer Schere eröffnet. Ein Vasofix® Safety 22G-Katheter wurde in die Vena cava posterior appliziert und mit einem Perfusionsschlauch (L/S 18) verbunden. Die Leber wurde kurz mit Perfusionslösung 1 (vgl. 0, S.35) bei einer Flussgeschwindigkeit von 3ml/min für ca. 2sec perfundiert, dann wurde die Pfortader durchtrennt und die Flussgeschwindigkeit auf 7ml/min erhöht. Eine Entfärbung der Leber zeigte eine optimale Perfusion an. Nach ca. 1minute Perfusion wurde das

Zwerchfell durchtrennt und die Vena cava anterior mit einer Klemme ligiert, so dass es zu einem Rückstau des Perfusionspuffers in der Leber kam, was an Hand einer geringen Volumenzunahme kontrolliert wurde. Das Tier wurde anschließend durch einen Herzschnitt getötet. Nachdem ein Gesamtvolumen von 50ml Perfusionslösung 1 durch die Leber gepumpt wurde, wurde auf Perfusionslösung 2 (vgl. 0, S.35) gewechselt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen in das Schlauchsystem gelangen. Hiervon wurden wiederum 50ml durch die Leber geleitet. Die Liberase spaltet enzymatisch die extrazelluläre Kollagenmatrix auf und ermöglicht somit im weiteren Verlauf die Präparation von Einzelzellen. Anschließend wurde die Leber entfernt und in Perfusionslösung bei 4°C dispergiert. Durch einen Zellfilter mit 70µm Maschenweite wurde die Zellsuspension filtriert und mit 30ml Medium (MEM + 10% FCS) bei 4°C aufgefüllt. Nach Zentrifugation bei 50xg, 4°C für 2min wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 30ml Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und die Zellen in 15ml frischem, 4°C kaltem Medium aufgenommen. Nach Trypanblau-Färbung und Zählen der Zellen wurde die Suspension mit einer Dichte von ca. 1 Mio. Zellen pro 5 cm² Kulturfläche ausgesät und bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung inkubiert.

2.2.4.2 Isolation von murinen KC

Sechs bis 10 Wochen alte C57/BL6 Mäuse wurden zur Präparation nicht-parenchymaler Leberzellen (Kupfferzellen, KC; *liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC) durch Genickbruch getötet und die Leber freigelegt. Über eine 0,4mm Kanüle wurde via der Pfortader restliches Blut aus der Leber gespült (Pumpe: Masterflex, 4ml/min), hierzu wurden 10ml eines Ca²⁺-freien Puffers verwendet. Die Leber (von bis zu 10 Mäusen) wurde anschließend entnommen, in einer Petrischale mit GBSS platziert (bzw. gesammelt) und bei 37°C ohne CO₂-Versorgung für 15 min. inkubiert. Anschließend wurde die Leber 30ml GBSS mit 0,07 mg/ml Liberase Blendzyme3 überführt, mechanisch zerkleinert und für 20 min bei 37°C (ohne CO₂ Einleitung) und einer Rotation von 300rpm (Inkubator innova 400) inkubiert. Die entstandene Zellsuspension wurde dann über ein Sieb (60µm Maschenweite) gefiltert um unverdautes Gewebe zu entfernen. Weitere 170ml GBSS wurden den Geweberesten

im Sieb zugefügt und mit einem Mörser durch das Sieb gepresst. Die Zellsuspension wurde in einem Messbecher aufgefangen. Alle bei der Präparation verwendeten Glasbehältnisse, wurden zuvor mit Silikon (Silicone Solution) beschichtet, über Nacht getrocknet und autoklaviert. Anschließend wurde die Suspension in vier 50ml Polystyren-Röhrchen überführt, bei 300rpm für 10min bei 24°C zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf) und die Pellets wieder. Das Zellpellet wurde in zwei Waschschritten in GBSS resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Zur weiteren Auftrennung der Zellen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurde OptiPrep bis zu einem Iodixanol Gehalt von 40% mit GBSS verdünnt und davon jeweils 4,25ml in 15ml Polystyren Röhrchen vorgelegt. Es wurden 5,75ml der Zellsuspension dazugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Suspension mit 0,5ml GBSS überschichtet, um ein Austrocknen der Zellen während der Zentrifugation zu verhindern. Zentrifugiert wurde der Gradient bei 400xg für 15min bei 24°C, wobei sowohl die Beschleunigung der Zentrifuge reduziert (von 9 auf 5) und die Bremse deaktiviert wurden. Die entstandene Zellschicht in den Röhrchen wurde vorsichtig mit einer Einwegpipette abgenommen, in ein 50ml Röhrchen überführt und mit DPBS auf 50ml aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300g für 10 min und 24°C pelletiert, in zwei weiteren Waschschritten in DPBS aufgenommen und erneut zentrifugiert, um die Gradientenlösung zu entfernen, die die anschließende Elutriation behindern würde. Das Pellet wurde dann in 7ml DPBS aufgenommen, resuspendiert. Die weitere Isolation von KC erfolgte mittels Elutriation, wohingegen, LSEC mit anti-LSEC-Antikörpern beschichteten MicroBeads, entsprechend den Angaben des Hersteller-Protokolls, aus der Zellsuspension isoliert wurden. Hierzu wurden die LS-Säulen des MACS-Systems verwendet. Die durch Antikörper vermittelte Isolation der LSEC über den endothelspezifischen Antikörper ME-9F1 (Harder et al. 1991) ermöglicht die Präparation einer LSEC Population mit einer Reinheit von $\geq 95\%$ (Berg et al. 2006; Diehl et al. 2008). Anschließend wurden die Zellen in DMEM High Glucose (+1% P/S, +1% L-Glut, +10% inaktiviertes FCS) aufgenommen und in einer Dichte von 1Mio Zellen/4cm² ausgesät.

Bei der Elutriation handelt es sich um einen Zentrifugationsvorgang mit einem gleichzeitig entgegengesetzten, kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom. Die Zentrifugalkräfte der Rotation führen zu einer Sedimentation der Zellen, der

Flüssigkeitsstrom wirkt als Zentripetalkraft in entgegengesetzter Richtung. Jede Zelle ordnet sich in der Separationskammer in einer Zone an, in der auf die Zelle ein Gleichgewicht der Kräfte herrscht. Die Zellen trennen sich so nach Größe und Dichte auf und werden durch die spezielle Konstruktion der Separationskammer in einem Fließgleichgewicht gehalten. Durch die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums können so relativ homogene Zellfraktionen gewonnen werden.

Bei der Elutriation handelt es sich um einen Zentrifugationsvorgang mit einem gleichzeitig entgegengesetzten, kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom (Abb. 2-1). Die Zentrifugalkräfte der Rotation führen zu einer Sedimentation der Zellen, der Flüssigkeitsstrom wirkt als Zentripetalkraft in entgegengesetzter Richtung. Jede Zelle ordnet sich in der Separationskammer in einer Zone an, in der auf die Zelle ein Gleichgewicht der Kräfte herrscht. Die Zellen trennen sich so nach Größe und Dichte auf und werden durch die spezielle Konstruktion der Separationskammer in einem Fließgleichgewicht gehalten. Durch die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums können so relativ homogene Zellfraktionen gewonnen werden.

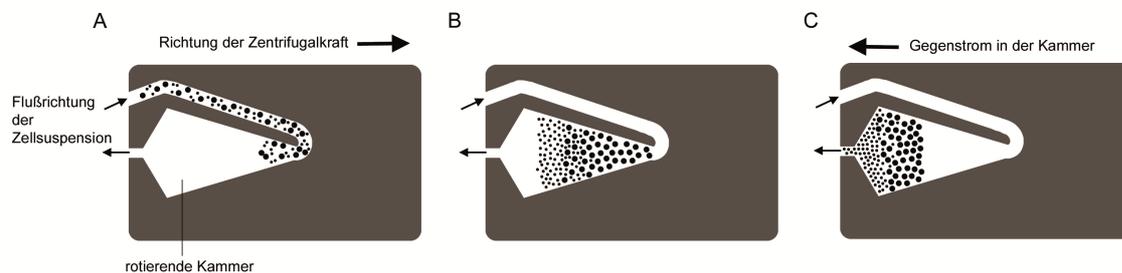


Abb. 2-1: Funktionsprinzip der Elutriation.

Eine Zellsuspension wird in eine rotierende Kammer gespült, wobei die Flussrichtung der Zentrifugalkraft entgegengesetzt ist (A). Bei konstanter Fließrate ordnen sich die Zellen in der Kammer nach Dichte, da der Flüssigkeitsstrom der Sedimentation der weniger dichten Zellen oder Partikel durch die Zentrifugalkraft entgegenwirkt (B). Durch schrittweise Erhöhung der Fließgeschwindigkeit werden Zellen abhängig von ihrer Dichte aus der Kammer elutriert (C). Abbildung verändert nach Dorin, M. Developing Elutriation Protocols, Technical Information, Beckmann Instruments Inc. 1994.

Der Elutriator (J-25) wurde entsprechend den Herstelleranweisungen aufgebaut und mit PBS, 75%-igem unvergälltem Ethanol und erneut mit PBS gespült, wobei darauf geachtet wurde, das System frei von Luftblasen zu halten. Anschließend wurde

GBSS an die Pumpe angeschlossen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 16ml/min durch den Elutriator gepumpt. Die aufzutrennende Zellsuspension wurde dann über eine 0,9 mm Kanüle in das Schlauchsystem überführt. Anschließend wurden 100ml des Durchlaufs fraktioniert und die Fließgeschwindigkeit schrittweise auf 23ml/min, 32ml/min und schließlich auf 56ml/min erhöht und jeweils ca. 100ml der durchgelaufenen Flüssigkeit fraktioniert. Die KC befanden sich nun in der Fraktion, die bei 56ml/min Flussgeschwindigkeit ausgespült wurden. Diese Fraktion wurde anschließend bei 300xg für 10min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in Zellkultur-Medium (DMEM high Glucose mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Pen/Strep) resuspendiert. Die Zellzahlen der KC oder LSEC wurden in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer kollagenisierten 6-Lochplatte in jeweils 3ml Medium ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (CO₂-Auto-Zero) inkubiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden entfernt, die Zellen einmal mit Medium überspült und erneut in 3ml Medium aufgenommen und bis zur Einführung in den Versuch, wie zuvor beschrieben, inkubiert. Stichprobenartig wurde mittels FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) die Reinheit der KC (Monoclonal Antibody to Mouse F4/80 Antigen-APC) und LSEC (Anti-LSEC MicroBeads mouse; clone: ME-9F1) bestimmt (Dr. rer. nat. Bröring 2008).

2.2.5 Isolation primärer humaner Hepatozyten

Humane Leberstücke wurden von Resektionen zur Entfernung von hepatozellulären Karzinomen (HCC), cholangiozellulären Karzinomen (CCC) oder Lebermetastasen anderer Abdominalkarzinome (häufig Colonkarzinom) erhalten. Eine explantierte Leber eines Patienten mit schwerer Zirrhose nach Alkoholabusus, der ein Transplantat erhielt, diente ebenfalls zur Zellisolation. Eine exakte Aufteilung des verwendeten Patientengewebes nach Ätiologien und Operation ist in Tabelle 2 (s.S.45) zu finden. Alle Patienten wurden darüber informiert, dass Teile des entnommenen Gewebes zu Forschungszwecken verwendet werden und hatten ihr schriftliches Einverständnis hierzu erteilt. Alle aus Patientenmaterial gewonnenen oder damit assoziierten Daten werden ausschließlich in anonymisierter Form

veröffentlicht. Alle Vorgehensweisen befinden sich im Einklang mit der Schlussakte von Helsinki von 1975.

Gewebestücke zur Zellisolation wurden aus einem Teil des Resektats bzw. Explantats entnommen, das möglichst weit entfernt von Schnittkante, Tumorgewebe oder Metastasen war und durch makroskopische Beurteilung gesund bzw. nativ erschien.

Tabelle 2: Ätiologien für Resektate bzw. explantierte Empfängerlebern, die zur Präparation humaner Hepatozyten verwendet wurden.

Ätiologie	Gesamt	Resektate	Explantate
HCC (hepatocelluläres Karzinom)	4	4	0
CCC (cholangiozelluläres Karzinom)	2	2	0
Kolorektale Lebermetastasen	2	2	0
Lebermetastasen bei Sigma-Karzinom	2	2	0
Klatskin Tumor Typ IV	1	1	0
Embryonales Lebersarkom	1	1	0
Schwere Zirrhose (Child B), Alkohol-Intoxikation	1	0	1
Gesamt	13	12	1

Für die Perfusion wurden eine Peristaltikpumpe, ein Wasserbad und ein adaptierter Liebigkühler verwendet. Das Resektat bzw. Explantat wurde zunächst in einer Petrischale (\varnothing 15 cm) platziert und über ein geeignetes Gefäß (Aa. hepatici) durch eine 20G Venenverweilkanüle mit HBSS (mit 0,2M HEPES und 0,02M Gentamycin; im Folgenden als HBSS bezeichnet) perfundiert. Sobald ein für die Perfusion adäquates Gefäß angeschlossen war, wurden alle Schnittkanten am Gewebe bzw. Oberflächen, die nicht mehr durch die Leberkapsel bedeckt waren, mit Histoacryl® verklebt, um zu schnelles Austreten der Lösungen aus dem Leberstück zu vermeiden. Alle im Folgenden beschriebenen Perfusionsschritte wurden bei 40°C durchgeführt, um das Organ auf der optimalen Temperatur für die Enzymaktivität der Kollagenase zu halten. Zunächst wurde das in der Leber verbliebene Blut mit HBSS ausgespült, bis die austretende Lösung möglichst klar war. Anschließend wurde mit 120ml HBSS / 0,5mM EGTA perfundiert, wobei 40ml fortlaufend abgesaugt wurden. Das restliche Volumen wurde für 20min zirkulär durch die Leber gepumpt. Nachfolgend wurde genauso mit 120ml HBSS mit CaCl₂ und 240-250U/ml Kollagenase verfahren. Vor ihrer Verwendung wurde die frisch gelöste Kollagenase durch 0,45µm PharmAssure Filter sterilfiltriert. Sobald kleine Stückchen aus der

Leber heraus gespült wurden und das Gewebe eine schwammige Konsistenz annahm, wurde die Perfusion beendet. Das Leberstück wurde auf ein Sieb mit 4µm Maschenweite überführt und mittels eines Skalpell zerkleinert. Durch Kollagenase verdautes Gewebe wurde mit HBSS und sanftem Druck eines Pistills durch das Sieb gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde dreimal bei RT, 18xg für 10min mit HBSS gewaschen und das Pellet in frischem Medium aufgenommen (DMEM/HAM'sF12 mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin). Die Zellzahlen bzw. die Anzahl toter Zellen wurde durch Trypanblau-Färbung und Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zellen mit einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Innerhalb der ersten Stunde nach Aussaat wurden die Platten ca. alle 10min geschwenkt, um das Absetzen toter Zellen zu verhindern. Nach der ersten Stunde erhielten die Zellen frisches Medium und wurden anschließend für mindestens 24h nicht mit Reagenzien behandelt, transfiziert oder einem Mediumwechsel unterzogen.

Für die Aussaat wurden Platten verwendet die mit Kollagen beschichtet wurden. Hierzu wurden 5ml Collagen G mit 45ml PBS gemischt und die Vertiefungen der Zellkulturplatten jeweils so gefüllt, dass der Boden komplett bedeckt war. Nach 1 – 3h Inkubation bei RT wurde die Kollagenlösung entfernt und einmalig mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen auf die kollagenisierten Platten gesät und bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung inkubiert.

2.2.6 MACS-Markierung zur Isolation humaner KC

Nach Separation der Zellen durch Kollagenase, Filterung und mehrmaligem Waschen (siehe 2.2.4.2, S.41 bzw. 2.2.5, S.44), wurde die erhaltene Zellzahl mittels einer Neubauerzählkammer bestimmt, um die erforderlichen Volumina an Puffer und Antikörper zu ermitteln. 1×10^5 Zellen wurden in 25µl MACS-Puffer aufgenommen (PBS, 0,5% BSA) und 10µl Human CD163 Phycoerythrin MAb zugegeben. Die Zellen wurden bei 4°C für 45min inkubiert und anschließend bei 500xg, 4°C für 5min mit MACS-Puffer gewaschen. 45µl Anti-PE MicroBeads in 450µl MACS-Puffer wurden zugegeben und die Zellen nach kurzem Vortexen für 15min bei 4°C inkubiert.

LS-Säulen wurden währenddessen in den MACS-Magneten eingespannt und je 3 mal mit 1ml MACS-Puffer gespült. Die Zellen wurden mit der 10-fachen Puffermenge (4,5ml) suspendiert und bei 300xg, 4°C für 10min pelletiert. Das erhaltene Pellet wurde je nach Größe in 5-15ml MACS-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension auf die LS-Säulen geladen. Anschließend wurde dreimal mit je 3ml MACS-Puffer gespült und nach vollständigem Durchlaufen der Flüssigkeit die Säulen aus dem Magnethalter entnommen. Die Elution der Zellen erfolgte mit 5ml Medium (zellabhängig), die erhaltene Suspension wurde mit ca. 1×10^6 Zellen pro 1cm^2 ausgesät.

2.2.7 *In-vitro*-Stimulation verschiedener Zellpopulationen

Murine sowie humane Zellen, die wie oben beschrieben isoliert wurden, wurden nachmindestens 24h Ruhezeit zunächst mit frischem Medium versehen und nachmindestens 4h (um Effekte durch den Mediumwechsel zu minimieren) zunächst mit 8µl NaCl 0,9% oder 8ng Bortezomib gelöst in NaCl 0,9% pro 1ml Kulturmedium behandelt. Eine Stunde nach Vorbehandlung mit Bortezomib bzw. Lösungsmittel wurden 100ng LPS in 4µl Medium pro 1ml Kulturmedium zugegeben. Sechs Stunden, 12h und 24h nach LPS-Stimulation wurden die Zellen geerntet und RNA bzw. Proteine isoliert, wie unten beschrieben (2.2.8.1, S.47; 2.2.10.1, S.54). LPS-Behandlung wurde durchgeführt, um eine Aktivierung des TLR-4-Systems und dadurch NF-κB zu erreichen (S.1.4, S.18). Die Blockierung des Proteasoms durch Bortezomib sollte die TLR-4-vermittelte NF-κB-Aktivierung aufheben.

2.2.8 Gesamt-RNA-Isolation mit Trizol/QIAzol und RNeasy

2.2.8.1 Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Nach Abschluss des jeweiligen Versuches wurde das Kulturmedium abgenommen und 500µl Trizol bzw. Qiazol pro 5cm^2 Kulturfläche auf die Zellen pipettiert. Alle folgenden Volumenangaben beziehen sich auf die angegebene Fläche, bei kleineren Flächen/Ausgangsvolumina wurden entsprechend angepasste Mengen der

jeweiligen Substanz verwendet. Mit einem Plastikspatel wurden am Kulturboden anhaftende Zellen vorsichtig gelöst und die Lysate in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. 100µl Chloroform wurde zugegeben, das Lysat für ca. 15sec durch kräftiges Schütteln gemischt und anschließend 2-3min bei RT inkubiert. Eine Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 12.000xg, 4°C für 15min erreicht. Die obere, klare Phase (ca. 400µl) wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß mit 350µl Ethanol (75%) überführt, ohne Bestandteile der Grenzschicht mitzuführen. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde die Lösung durchgemischt und dann auf RNeasy-Mini-Kit-Säulchen geladen. Nach Zentrifugation für ca. 15sec bei 10.000xg wurde der Durchfluss verworfen, 350µl RW1 Puffer auf die Säule pipettiert und diese erneut zentrifugiert (15 sec, 10.000xg). Anschließend wurden 80µl DNase-Lösung (10µl DNase-Stocklösung + 70µl RDD Puffer, RNase free DNase Set) direkt auf die Membran der Säule pipettiert und 15min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden nochmals 350µl RW1-Puffer zugegeben und die Säule bei 10.000xg 15sec zentrifugiert. Um Kontamination mit verbliebenen DNA-Fragmenten aus dem Durchfluss zu vermeiden, wurde das Auffanggefäß mit dem Durchfluss verworfen und ein frisches Auffanggefäß verwendet. Auf die Säule wurden 500µl RPE-Puffer geladen und wiederum bei 10.000xg für 15sec zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden wiederum 500µl RPE-Puffer hinzugegeben und für 2min bei 13.000xg zentrifugiert. Auffanggefäß und Durchfluss wurden verworfen und die Säulchen in frischen Auffanggefäßen nochmals 1min bei 10.000xg zentrifugiert, um verbliebene Puffermengen zu entfernen. Eluiert wurde die RNA mit 30µl destilliertem, RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 10.000xg für 1min. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Eluat wiederum auf die Säulenmembran geladen und ein weiteres Mal zentrifugiert.

Die Reinheit sowie die Konzentration der RNA wurden photometrisch bestimmt, wobei der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} zur Abschätzung der Reinheit diente und je 1 OD_{260} als 40µg/ml RNA gerechnet wurde. Ausbeuten schwankten zwischen 0,05 und 0,8µg/µl RNA je nach ursprünglichem Zelltyp und -dichte. Die $OD_{260/280}$ -Quotienten lagen zwischen 1,78 und 2,05. Gewonnene RNA wurde aliquotiert (10µl), bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert und ausschließlich bei 4°C aufgetaut.

2.2.8.2 Gesamt-RNA-Isolation aus Gewebe

Explantierte Gewebestücke (ca. 2-5g) der regenerierenden Rattenlebern wurden mit einem Ultra-Turrax Dispergiergerät in 3ml Trizol bzw. Qiazol homogenisiert. 1ml des Homogenisats wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, und bei 12.000xg, 4°C für 10min wurden zelluläre Bruchstücke sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß mit 200µl Chloroform überführt, die Lösung für ca. 15sec durch kräftiges Schütteln gemischt und anschließend 2-3min bei RT inkubiert. Eine Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 12.000xg, 4°C für 15min erreicht. Die obere, klare Phase (ca. 600µl) wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß mit 500µl Isopropanol überführt, ohne Bestandteile der Grenzschicht mitzuführen. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde die Lösung durchmischt und 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10min bei 12.000xg, 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1ml frisch angesetztem 75% Ethanol aufgenommen und bei 7.500xg für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet für 30min unter Vakuum bei RT getrocknet. Durch Zugabe von 100µl RNase freiem, destilliertem Wasser und Inkubation bei 55°C für 10min wurden die gewonnenen Nukleinsäuren resuspendiert und anschließend für ca. 5min auf Eis gekühlt.

Je 100µl der erhaltenen Lösung wurden mit 350µl RLT-Puffer (346,5µl RLT-Puffer + 3,5µl β-Mercapto-Ethanol) und 250µl Ethanol (99.9% p.a.) versetzt und auf RNeasymini Kit Säulchen geladen. Der weitere Ablauf entsprach dem Protokoll für die RNA-Isolation aus Zellen (2.2.8.1, S.47). Zur Elution wurden jedoch 35µl RNase freies, destilliertes Wasser verwendet und der zweite Elutionsschritt wurde nicht durchgeführt.

Die photometrisch bestimmten Konzentrationen und OD_{260/280}-Quotienten lagen zwischen 0,2 und 1,8µg/µl RNA bzw. 1,7 und 2,15.

2.2.9 Quantitative RT-PCR

2.2.9.1 Durchführung

Um die Genexpression anhand der mRNA zu quantifizieren, wurden One-Step-reverse-Transkriptase-real-time-PCRs durchgeführt. Da aus Gewebe und *In-vitro*-Experimenten Gesamt-RNA isoliert wurde, waren die verwendeten Oligonukleotide so gewählt, dass die Bindungssequenz sich über die Grenzen zweier Exons erstreckte, so dass ein Intron überspannt wurde. Hierdurch wurde gewährleistet, dass ausschließlich revers transkribierte mRNA amplifiziert wurde und verunreinigende, genomische DNA nicht als mögliches Template dienen konnte.

Es wurden jeweils 2µl, entsprechend der RNA-Ausbeute aus ca. $6,6 \times 10^4$ Zellen, der wie unter 2.2.8.1 und 2.2.8.2 beschrieben präparierten RNA-Lösung für jede Reaktion eingesetzt und mit 15µl QuantiTect SYBR-Green-RT-PCR-Master-Mix, 6,7µl RNase freiem, destilliertem Wasser, 3µl forward und reverse Primer (5µM) sowie 0,3µl RT-Mix mit der Polymerase versetzt. Im Fall von Quantitect-Primer-Assays wurden 3µl Primer-Mix mit forward und reverse Primer eingesetzt und das Reaktionsgemisch mit 3µl RNase freiem, destilliertem Wasser auf ein Volumen von 30µl aufgefüllt. Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 bis Tabelle 5 (s.S.53-53) alphabetisch nach Bezeichnung des Gens aufgelistet. Sofern die Nukleotide keine von Qiagen bereitgestellten und evaluierten Primer waren, wurde die Sequenz über die Pubmed Nukleotid-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) ermittelt, die dazugehörigen Primer mittels dem Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) erstellt und von MWG Biotech (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Die Reaktionen wurden im 96-Well-Format angesetzt und in einem iCycler-System durchgeführt und gemessen. Vor Ablauf der eigentlichen Reaktion wurde zur Normalisierung der Grundfluoreszenz eine mit 30µl External-Well-Factor-Solution pro Vertiefung befüllte 96-Well-Platte gemessen. Das eigentliche Reaktionsprogramm setzte sich aus 3 Abschnitten zusammen: 1. Reverse Transkription mit Aktivierung

des Enzyms für 5min bei 52°C, RT-Reaktion für 45min bei 52°C, Deaktivierung des RT-Enzyms und Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95°C für 5min 2. Polymerase Kettenreaktion über 35 Zyklen mit jeweils 95°C für 15sec (Denaturierung der DNA-Stränge), 55°C für 20sec (Anlagerung der Oligonukleotide an die getrennten DNA-Stränge), 75°C für 20sec (Elongation des unvollständigen DNA-Stranges durch die Polymerase) sowie einer finalen Elongationsreaktion bei 75°C für 5min 3. Schmelzkurve für 95 Zyklen, wobei in jedem Zyklus die Temperatur um 1°C ausgehend von 95°C abgesenkt wurde. Die Schmelzkurve diente zur Evaluierung der Spezifität der durchgeführten Reaktion. Jede Nukleotidsequenz hat abhängig von Länge und G-C-Anteil eine spezifische Schmelztemperatur, so dass alle PCR-Produkte, die mit identischen Primern und gleicher Ausgangs-DNA amplifiziert wurden, identische Schmelzkurven zeigen. Schmelzkurven von Produkten, die durch unspezifische Reaktionen entstehen, weichen von der des gewünschten Produktes ab. Alle in den vorliegenden Experimenten gezeigten Daten wurden auf Spezifität der Schmelzkurven geprüft und bei Auftreten einer unspezifischen Schmelzkurve nochmals durchgeführt, um eine Konzentrations-Messung des korrekten Produktes darstellen zu können. Unspezifische Schmelzkurven waren unvermeidbar bei PCR-Produkten von sehr niedrig exprimierten Genen, entsprechende Daten werden hier nicht gezeigt und als zu niedrig exprimiert für eine Auswertung benannt.

2.2.9.2 Prinzip

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green interkaliert ausschließlich mit doppelsträngiger DNA, so dass die Fluoreszenzintensität in jedem Reaktionsgefäß abhängig von der vorhandenen Menge an doppelsträngiger DNA ist. Die Fluoreszenz wird einmal pro Zyklus ermittelt und für jedes Reaktionsgefäß in Abhängigkeit gegen die Zeit aufgezeichnet. Zwischen einem nicht messbaren Signal und einer Signalintensität, die sich auf Grund der Sättigung mit DNA Molekülen kaum verändern kann, da die Reaktion keine wesentliche Zunahme an doppelsträngigen DNA-Molekülen mehr erzeugt, liegt ein Bereich mit exponentieller Zunahme der Fluoreszenzintensität. Der früheste Reaktionszyklus, zu dem das Fluoreszenzsignal die Grenze (*threshold*) zwischen Hintergrund und exponentiellem Zuwachs übersteigt

wird als *ct-(cycle threshold)* Wert bezeichnet. Anhand des *ct*-Wertes kann die Menge an ursprünglich vorhandener DNA extrapoliert werden.

2.2.9.3 Auswertung

Für jede Reaktion wurde außer dem Ziel-Gen zusätzlich die mRNA-Expression von β -Aktin ermittelt, welches in allen Zellen zur Aufrechterhaltung des Zytoskeletts benötigt und daher kontinuierlich in etwa gleichen Mengen exprimiert wird (sog. *House Keeping Gen*) (Slagboom et al. 1990; Bustin 2000). Obwohl es Hinweise gibt, dass die β -Aktin-Expression abhängig vom Alter der Versuchstiere bzw. von bestimmten experimentellen Konditionen ist (Ruan et al. 2007; Slagboom et al. 1990), konnte in der vorliegenden Arbeit keine wesentliche Änderung der *ct*-Werte von β -Aktin über die unterschiedlichen Versuchsgruppen beobachtet werden.

In Bezug auf die β -Aktin-Expression lässt sich die Expression der jeweiligen Zielgene normieren. Hierzu wird jeweils der *ct*-Wert für β -Aktin und einem Zielgen einer Kontrolle (z.B. unbehandelte Zellen oder Versuchstiere) von den *ct*-Werten der Versuchssprobe subtrahiert, ein Quotient gebildet ($\text{Ziel-Gen } ct\text{-Differenz} / \beta\text{-Aktin } ct\text{-Differenz}$) und 2 wird damit potenziert (Pfaffl 2001). Der erhaltene Wert gibt die Änderung der Ziel-Gen-Expression durch das Experiment gegenüber der Kontrolle in Bezug auf die jeweilige β -Aktin Expression an. Dieser so genannte *fold change* trägt keine Einheit und ist als relativer Wert zu verstehen. Eine absolute Bestimmung der mRNA-Expression muss immer in Bezug auf Effizienzen von reverser Transkription, Ablauf der PCR sowie interexperimentellen Varianzen erfolgen und ist daher mit großer Ungenauigkeit behaftet oder ermöglicht keinen Vergleich von verschiedenen Experimenten. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine relative Methode zur Bestimmung der mRNA-Expression gewählt, so dass alle Versuche bezüglich einer Spezies und eines Genes miteinander vergleichbar sind.

Tabelle 3: Oligonukleotidsequenzen für die Amplifikation von cDNA murinen Ursprungs.

Gen-Bezeichnung	Sequenz oder Bestellnummer (Quantitect Primer Assays)	Hybridisierungstemperatur
β-Aktin	F: AAATCGTGCGTGACATCAAA R: CAAGAAGGAAGGCTGGAAAA	55°C
TNF-alpha	QT00104006	55°C
IL-6	QT00098875	55°C
IL-10	QT00106169	55°C
IFN-alpha	QT00327656	55°C
IFN-beta	QT00249662	55°C
TGF-alpha	QT00133539	55°C
TGF-beta	QT00145250	55°C
HGF	QT00158046	55°C

Tabelle 4: Oligonukleotidsequenzen für die Amplifikation von cDNA aus Rattengewebe.

Gen-Bezeichnung	Sequenz oder Bestellnummer (Quantitect Primer Assays)	Hybridisierungstemperatur
β-Aktin	F: GAGGCCAGAGCAAGAGAG R: TGGCCTTAGGGTTCAGAGG	55°C
TNF-alpha	QT00178717	55°C
IL-6	QT00182896	55°C
IL-10	QT00177618	55°C
IFN-alpha	QT00469532	55°C
IFN-beta	QT01081542	55°C
TGF-alpha	QT00183449	55°C
TGF-beta	QT00187320	55°C
HGF	QT00177289	55°C
TNFreceptor superfamily 10b	QT01814561	55°C
Fas	QT00196595	55°C
NOXA	QT01826370	55°C
PUMA	QT00401303	55°C
Bcl2	QT00184863	55°C
HIF-1-alpha	QT00182532	55°C
VEGF	QT00198954	55°C

Tabelle 5: Oligonukleotidsequenzen für die Amplifikation von cDNA aus humanem Gewebe.

Gen-Bezeichnung	Sequenz oder Bestellnummer (Quantitect Primer Assays)	Hybridisierungstemperatur
β-Aktin	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACGA R: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	55°C
TNF-alpha	QT01079561	55°C
IL-6	QT00083720	55°C
IL-10	QT00041685	55°C
IFN-alpha	QT00201964	55°C
IFN-beta	QT00203763	55°C
TGF-alpha	QT00033887	55°C
TGF-beta	QT00000728	55°C
HGF	QT01758988	55°C

2.2.10 Protein-Isolation

2.2.10.1 *Protein-Isolation aus Zellkulturen*

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit 4°C temperiertem PBS gewaschen und daraufhin 200µl Lysepuffer (vgl. 0, S.35) pro 5cm² Kulturfläche in die Kulturgefäße pipettiert. Mit einem Plastikspatel wurden adhärierende Zellen vom Kulturboden abgelöst und mit dem Lysat mehrfach die Kulturschale gespült. Das Zelllysate mit intakten Zellkernen wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, für ca. 30min auf Eis inkubiert und für 5min bei 800xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei 20.000xg, 4°C für 30min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in frische Reaktionsgefäße überführt und im Folgenden als cytosolische Protein-Fraktion bezeichnet.

Das Pellet aus der ersten Zentrifugation, bestehend aus intakten Zellkernen und lysierten Zellmembranen, wurde in 60µl Extraktionspuffer (vgl. 0, S.35) aufgenommen und über 30min bei 4°C wiederholt mit einem Vortexer durchmischt. Anschließend wurde die Suspension für 20min bei 4°C und 20.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und im Folgenden als Kernfraktion bezeichnet.

Das Prinzip dieser Auftrennung beruht auf einer höheren Salzkonzentration und veränderten Zusammensetzung der Detergenzien im Extraktionspuffer. Unter den Bedingungen des Lysepuffers bleibt die Kernmembran intakt und darin enthaltenen Proteine können nicht in die Lösung gelangen. Durch Erhöhung der Salzkonzentration und der Konzentration des Chelators EDTA, bei gleichzeitiger Verringerung der Konzentration des Detergenz NP-40, wurden die im Kern verbliebenen Proteine durch Inkubation mit mehrmaligem Vortexen in Lösung gebracht.

Alle Proteinlysate aus Zellkulturexperimenten wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.10.2 *Protein-Isolation aus Gewebe*

Gewebestücke von explantierten Rattenlebern (ca. 2-5 g) wurden in 3ml Lysepuffer (vgl. 0, S.35) mittels Ultra Turrax dispergiert. 1ml des Homogenisats wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei 800xg, 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bei 20.000xg, 4°C für 30min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Im Folgenden wird diese Fraktion als zytosolische Proteinfraction bezeichnet. Das Pellet aus der ersten Zentrifugation wurde in 350µl Extraktionspuffer (vgl. 0, S.35) resuspendiert, für 30min auf Eis inkubiert und dabei wiederholt gevortext. Nach Zentrifugation bei 20.000xg, 4°C für 20min wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und wird im Folgenden als Kernfraktion bezeichnet. Alle Proteinlysate aus Gewebe wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.11 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration von Proteinlysaten wurde ein kommerziell erhältlicher BCA (Bicinchoninsäure)-Test verwendet (BCA Protein assay). Grundsätzlich wurde der Test nach Herstellerangaben durchgeführt.

Das Prinzip des Tests beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen durch die Peptidbindungen in Proteinen zu Cu^{1+} -Ionen. Die Menge der im ersten Reaktionsschritt generierten Cu^{1+} -Ionen ist direkt proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung. In einem zweiten Reaktionsschritt werden die Cu^{1+} -Ionen durch die Bicinchoninsäure chelatisiert, wobei ein blau-violetter Farbstoff entsteht, dessen Konzentration kolorimetrisch bestimmt werden kann. Anhand eines Standards mit bekannter Proteinkonzentration kann die Konzentration unbekannter Proteinlösungen ermittelt werden.

Je 5µl der zu messenden Proteinlösung, unter Umständen verdünnt mit PBS, bzw. eines frisch präparierten BSA-Standards (2mg/ml bis 0,03125mg/ml BSA in PBS) wurden mit 25µl Reagenz A (hergestellt aus 25µl Lösung S und 1ml Lösung A) und 200µl Reagenz B versetzt. Unter Schütteln wurden die Reaktionsansätze für 15min

bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die OD bei 660nm gemessen und an Hand der Standardwerte die Konzentration der unbekanntem Proteinlysate ermittelt.

2.2.12 Isolation von Gesamtprotein

Zur Gewinnung nicht fraktionierter Proteinlysate wurde ein modifizierter RIPA Puffer (mRIPA) verwendet (vgl. 0, S.35).

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach Entfernen des Zellkulturmediums wurden die Zellen einmal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. 200µl mRIPA pro 5cm² Kulturfläche wurden zugegeben, die Zellen mit einem Plastikspatel vom Kulturboden gelöst und mehrfach mit einer Pipette suspendiert. Die Zelllysate wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, für 20min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000rpm, 4°C für 6min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Protein-Konzentrationsbestimmung mittels BCA bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.13 ELISA

ELISA zum Nachweis von NF-KB, STAT3 und M30 wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Kern- bzw. cytosolische Fraktion, Überstände von Zellkulturmedien sowie Serum von Versuchstieren wurden so verdünnt, dass die Messwerte innerhalb des linearen Bereichs der jeweiligen Eichkurven lagen. Angemessene Negativ- und Positivkontrollen wurden eingesetzt und zu jedem Assay eine Standardkurve bestimmt. Zur Interassay-Standardisierung wurden jeweils identische Volumina der Proteinisolate eingesetzt und die ermittelten Konzentrationen auf die mittels BCA-Assay (2.2.11, S.55) bestimmten Gesamt-Proteinkonzentrationen bezogen.

2.2.14 NF- κ B Reporter-Assay

Da in den *In-vitro*-Experimenten zur Bortezomib-modulierten TLR-4-Reaktion sowohl bei murinen KC als auch humanen Hepatozyten die Proteinausbeute zu gering war, um mittels EMSA oder ELISA ein auswertbares Signal für NF- κ B zu erhalten, wurde versucht ein SEAP-Reporter-Plasmid in humane Hepatozyten zu transfizieren, um damit die Modulation der TLR-4-Antwort über NF- κ B durch Bortezomib direkt nachzuweisen. Das Prinzip beruht auf einem Plasmidvektor, der ein SEAP(sekretierte alkalische Phosphatase)-Gen unter der Kontrolle eines NF- κ B-reaktiven Promotors trägt. Zellen, die erfolgreich mit dem Plasmid transfiziert wurden, produzieren die alkalische Phosphatase in Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivität und sezernieren sie in das Zellkulturmedium. Dieses kann entnommen werden und auf die vorhandene SEAP-Konzentration untersucht werden, ohne die Zellen zu ernten oder zu töten. Im Folgenden sind die hierzu durchgeführten Einzelschritte beschrieben.

2.2.14.1 Expansion des Kontrollplasmids und Reporterplasmid in One Shot® *Top10F'* kompetenten *E. coli*

Die kommerziell erhältlichen Plasmide, pSEAP2-Control und pNF- κ B-SEAP, wurden mittels Transformation in One Shot® TOP10F' kompetente *E. coli* Zellen eingebracht und in den Bakterien vermehrt. Hierzu wurden jeweils 10pg des Plasmid zu 50 μ l der Zellsuspension zugegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Reaktionsgefäße wurden dann in ein auf 42°C vorgeheiztes Wasserbad überführt, für 30sec inkubiert und wiederum auf Eis gestellt. 250 μ l SOC-Medium wurden zugegeben und die Reaktionen unter Schütteln (225rpm) bei 37°C für 1h inkubiert. Transformierte Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit 50 μ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je 3 Einzelkolonien pro Transfektionsreaktion wurden ausgewählt, einzeln in je 5ml LB Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin inokuliert und bei 37°C über Nacht bei 300rpm inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 6000xg für 15min bei 4°C sedimentiert und der Überstand verworfen. Zur Aufreinigung der expandierten Plasmide aus den *E.coli*-Zellen wurde das Plasmidmini Kit verwendet,

wobei die Herstellerangaben befolgt wurden. Das Zell-Pellet wurde mit 0,3ml Puffer P1 (mit RNase A) resuspendiert. Die Reaktion wurde mit 0,3ml Puffer P2 versetzt, durch mehrfaches Invertieren gemischt und 5min bei RT inkubiert. Es wurden 0,3ml auf 4°C gekühlter Puffer P3 hinzugefügt, wiederum gemischt und 5min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Reaktionen bei ca. 12.000rpm für 10min zentrifugiert und der klare Überstand auf eine mit 1ml QBT Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip 20 Säule geladen. Die Säule wurde zweimalig mit je 2ml QC-Puffer gewaschen und anschließend die DNA mit 0,8ml QF-Puffer von der Säule eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,56ml Isopropanol präzipitiert und bei 10.000rpm für 30min sedimentiert. Das Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol, bei 10.000rpm für 10min gewaschen, anschließend für ca. 10min luftgetrocknet und in 100µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. DNA-Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bestimmt (Biophotometer). Typische Konzentrationen lagen bei 80 – 130ng/µl, OD_{260/280}-Quotienten (zur Bestimmung der Verunreinigung mit RNA) lagen zwischen 1,7 - 1,85, OD_{260/230}-Quotienten (zur Bestimmung der Verunreinigung mit Proteinen) lagen zwischen 1,9 – 2,2.

2.2.14.2 *Transfektion der Plasmide in humane Hepatozyten mittels Lipofektion*

Primäre humane Hepatozyten wurden wie unter 2.2.5 (S.44) beschrieben isoliert und für 48h in Medium bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung inkubiert. Es wurden jeweils ca. 5x10⁵ Zellen pro Vertiefung einer 24-Well-Platte ausgesät. Verschiedene Transfektionsreagenzien, wie Interferin, Lipofectamin™ sowie Xfect™ in unterschiedlichen Konzentrationen und Verhältnissen zwischen DNA und Transfektionsreagenz wurden getestet. Hierbei wurden grundsätzlich zunächst die Herstellerprotokolle genau befolgt und nach erfolgloser Transfektion adaptiert. Beispielhaft wird im Folgenden nur die Transfektion mit Xfect™ beschrieben.

Für jede Vertiefung einer 24-Well-Platte wurden zwei Reaktionsansätze vorbereitet. Ein Ansatz enthielt 0,3µl Xfect Polymer Reagenz und 24,7µl Polymer Dilution Puffer, der zweite Ansatz enthielt 1µg Plasmid-DNA (ca. 10µl, abhängig von Klon/Präparation) und wurde mit DNA-Dilution-Puffer auf 25µl aufgefüllt. Beide Ansätze wurden vereinigt, 10sec durch Vortexen durchmischt und 10min bei RT

inkubiert. Anschließend wurde der komplette Transfektionsansatz tropfenweise in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte mit humanen Hepatozyten dem Medium zugegeben. Nach 4h Inkubation bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung wurde das Medium mit Transfektionsreagenzien entfernt, durch frisches Medium ersetzt und die Zellen weitere 48h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit LPS behandelt, wie unter 2.2.7 (S.47) beschrieben, um eine NF- κ B Aktivierung zu erreichen. 3h, 6h, 12h, 24 und 48h nach Stimulation wurden jeweils 50 μ l Medium aus jeder Vertiefung mit Zellen entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Nachweis der SEAP-Aktivität (siehe 2.2.14.3) bei -80°C gelagert. Ein typischer Versuchsansatz mit angemessenen Kontrollen ist in Tabelle 6 (S.60) dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht eines typischen Transfektionsexperiments mit Kontrollen.

Alle Versuchsbedingungen wurden jeweils im Duplet oder Triplet angesetzt.

Komponente	negative Kontrolle	LPS-Stimulation ohne Transfektion	Transfektions-Reagenz alleine	Transfektion I (Basis-Expression)	Transfektion II (Basis-Expression)	Transfektion I (stimuliert)	Transfektion II (stimuliert)
Transfektions-reagenz	-	-	+	+	+	+	+
Kontroll-plasmid (pSEAP2-Control)	-	-	-	+	-	+	-
Reporter-plasmid (pNFKB-SEAP)	-	-	-	-	+	-	+
LPS	-	+	-	-	-	+	+

2.2.14.3 Nachweis der NF- κ B Aktivität mittels Great EscAPe™SEAP Chemiluminescence Kit 2.0

Grundsätzlich wurde der Nachweis der NF- κ B-abhängigen SEAP-Produktion im Zellkulturmedium durchgeführt wie im Herstellerprotokoll des Great EscAPe™SEAP Chemiluminescence-Kit 2.0 beschrieben. Es wurden 25 μ l Zellkulturmedium, jeweils als Doppelansatz in eine Vertiefung einer 96-Well-Microtiterplatte (Opti-Plate™) pipettiert und mit 75 μ l Dilution-Puffer versehen. Die Microtiterplatte wurde mit Klebefolie abgedeckt, mit einem Kunststoff-Deckel versehen und dieser wurde zusätzlich mit Parafilm® abgedichtet. Die so versiegelte Platte wurde für 30min bei 65°C inkubiert, um die native alkalische Phosphatase, die von den Zellen produziert wurde zu denaturieren. Die durch das Reporterplasmid produzierte SEAP ist hingegen hitzeresistent. Anschließend wurde die Platte 3min auf Eis gekühlt und auf RT äquilibriert. In jede Vertiefung mit Reaktionsansatz wurden 100 μ l SEAP Substrat-Lösung pipettiert. Nach 30min Inkubation bei RT wurde in einem Plattenluminometer die Lumineszenz bestimmt. Bei jeder Messung wurde eine frisch präparierte Standardreihe aus rekombinanter AP (8ng/ μ l – 0,125ng/ μ l) mitgeführt, um die Normierung durchzuführen.

2.2.15 Terminal-transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling (TUNEL)-Assay zum Nachweis des Zelltodes im Lebergewebe

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Rattenlebern wurden durch Erhitzen auf 60°C für 30min und anschließendes Waschen in Xylol entwacht. Über eine Alkoholreihe wurden die Schnitte rehydriert (100%, 2x 90%, 70%, PBS), und für 10min permeabilisiert (0,1% Triton X-100, 0,1% Natriumzitat). Anschließend wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen. Das TUNEL-Reagenz wurde entsprechend der Herstellerangaben angesetzt (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein). Positiv- und Negativkontrollen wurden entsprechend des Protokolls vorbereitet und die Färbung ebenfalls nach Protokoll durchgeführt. Alle Schnitte wurden anschließend in einem Schritt mit DAPI gefärbt und zur Konservierung eingebettet (ProLong® Gold antifade reagent with DAPI).

Der Zelltod wurde quantifiziert, indem der Quotient aus TUNEL-positiven Zellen pro Gesichtsfeld geteilt durch Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld gebildet wurde (TUNEL-Index in Prozent). Für jeden Gewebeschnitt wurden vier zufällig ausgewählte Gesichtsfelder bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt, was einer Gesamtzahl von ca. 2500 Zellen pro Versuchstier entsprach. Mittelwerte für jede Gruppe wurden errechnet und von den erhaltenen mittleren TUNEL-Indices wurde der durchschnittliche TUNEL-Index der Negativ-Kontrollen von 0,09% subtrahiert. Angegebene Indices sind damit vom Hintergrundsignal der Färbung bereinigt. Digitalisierte Bilder wurden an einem Eclipse TS-100 Mikroskop mit Kamera erstellt.

2.2.16 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders erwähnt sind Daten als Mittelwert \pm SEM (*standard error of mean*) oder als Median mit 25%/75% Perzentilen und Wertebereich angegeben. Unterschiede zwischen jeweils zwei Gruppen wurden mittels ungepaartem Student'schem T-Test berechnet. Sofern Varianzen zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich waren, ermittelt durch den F-Test, wurde eine Welch-Korrektur durchgeführt. Außergewöhnlich hohe bzw. niedrige Werte wurden bei Verdacht auf Messungenauigkeit oder technische Unklarheiten mittels Grubbs-Test analysiert. Im Falle eines positiven Tests wurden entsprechende Werte als Ausreißer deklariert und von der Auswertung ausgeschlossen. Gruppengrößen (n) sind bereinigt angegeben (nach Entfernen der Ausreißer).

Für alle angegebenen Berechnungen und die graphische Darstellung der Daten wurde das Programm Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

Die im Folgenden beschriebenen Teilprojekte sollten jeweils die unter 1.8 (S.27) beschriebenen Fragestellungen klären. Im ersten Teilprojekt (3.1, S.63) wurde untersucht, ob Leberteilresektion unterschiedlichen Ausmaßes bereits auf molekularer Ebene eine differentiell regulierte Reaktion auslöst; speziell wurden NF-KB und die von diesem Transkriptionsfaktor regulierten Zytokine untersucht. Das zweite Teilprojekt (3.2, S.78) zielte darauf ab, die regenerativen Prozesse nach Leberresektion durch pharmakologische Einwirkung – konkret Fütterung mit hohem Glycingehalt – zu beschleunigen bzw. zu unterstützen. Proteasominhibition durch Bortezomib zur Modulation TLR-4-vermittelter Signalkaskaden *in vitro* zu evaluieren, war das Ziel von Teilprojekt 3 (3.3, S.85). Teilprojekt 4 (3.4, S.93) sollte schließlich aufklären, ob die Blockierung des NF-KB Signalwegs durch Proteasominhibierung mittels Bortezomib einen möglichen pharmakologischen Therapieansatzpunkt für die Leberteilresektion darstellt.

3.1 *R70-Leberresektion vs. R90-Leberresektion*

Um die grundlegenden Mechanismen der Leberregeneration darzustellen und mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen Ausgangssituationen, speziell nach partiellen Hepatektomien unterschiedlichen Umfangs auf molekularer und zellulärer Ebene zu ermitteln, wurden Leberteilresektionen unterschiedlichen Ausmaßes an männlichen Wistar-Ratten durchgeführt (2.2.1, S.37). Männliche Tiere wurden ausgewählt, um hormonelle Einflüsse des Östrus weiblicher Tiere ausschließen zu können. Nach 2h bis 7d postoperativ wurden die Restlebern entnommen und darin die Regeneration an Hand des LBW-r, Ki-67-Färbung sowie mRNA-Expression regenerationsrelevanter Zytokine und Wachstumsfaktoren ermittelt, gleichzeitig wurde die Leberschädigung an Hand klassischer Serum-Parameter und TUNEL-Assays bestimmt. Sowohl nach R70- als auch R90-Hepatektomie überlebten alle Tiere bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 7 Tagen. Aus Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe war ersichtlich, dass zu späteren Zeitpunkten nicht mit Unterschieden zwischen den Gruppen zu rechnen war, da die Leberregeneration

zum größten Teil bereits nach der ersten Woche abgeschlossen war (Michalopoulos & DeFrances 1997; Duncan et al. 2009) und wesentliche molekulare Mechanismen der Regeneration innerhalb der ersten Stunden nach Resektion ablaufen.

3.1.1 LBW-r Entwicklung nach R70- und R90-Hepatektomie

Zum Zeitpunkt der Leberentnahme wurden sowohl Versuchstier als auch die regenerierte Leber gewogen, wie unter 2.2.2 (S.40) beschrieben. Der Quotient aus Lebergewicht und Körpergewicht wird als LBW-r (*Liver-bodyweight ratio*) bezeichnet und als % des Körpergewichts angegeben. Der zeitliche Verlauf des LBW-r nach R70- und R90-Leberresektion ist in Abb. 3-1 dargestellt (S.65). Die Rohwerte der R90-Gruppe wurden freundlicherweise von der AG Rauen (Institut für physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen) nach (Benko et al. 2010) zur Verfügung gestellt. Die Mittelwerte, SEM und Signifikanzen wurden für die vorliegende Arbeit eigenständig berechnet, wodurch sich marginale Differenzen zu den Angaben in (Benko et al. 2010) ergeben können.

Bei R70-Tieren war ein signifikantes Wachstum der Leber bereits zwischen 2h und 12h nach Operation feststellbar. Die Mittelwerte und Standardabweichungen lagen 2h postoperativ bei $0,88 \pm 0,07\%$ ($n = 3$) bzw. 12h nach Resektion bei $1,39 \pm 0,07\%$ ($n = 4$) wobei der Unterschied mit $p = 0,0027$ signifikant war. In der R90-Gruppe war der früheste signifikante Zuwachs, mit $p = 0,0072$, des LBW-r erst zwischen 12h mit einem Mittel von $0,38 \pm 0,02\%$ und 24h mit einem Mittel von $0,57 \pm 0,04\%$ messbar (jeweils $n = 4$). Der Anstieg im LBW-r auf $0,8 \pm 0,03\%$ 48h postoperativ ($p = 0,005$), 72h nach Resektion auf $1,12 \pm 0,09\%$ ($p = 0,02$) sowie auf $1,53 \pm 0,07\%$ nach 7d ($p = 0,01$; jeweils $n = 4$) war in dieser Gruppe ebenfalls signifikant, wobei 7d nach R90-Resektion nur knapp 30% der Lebermasse von Kontrolltieren erreicht wurde. Im Gegensatz hierzu zeigten R70-Tiere ab 48h postoperativ keine signifikanten Wachstumsraten mehr, nachdem etwa 65% der ursprünglichen Lebermasse erreicht waren, was einer LBW-r von $2,45 \pm 0,32\%$ (48h) bzw. $2,7 \pm 0,15\%$ (7d) entsprach. Zusammengefasst war nach R70-Leberteileresektion einerseits Wachstum bereits relativ früh nach dem chirurgischen Eingriff zu beobachten, andererseits schien das Wachstum schneller abzulaufen. Hierbei blieb jedoch noch unklar, ob es sich um

einen reinen Effekt handelte, der von der postoperativ verbliebenen parenchymalen Zellzahl abhängig war.

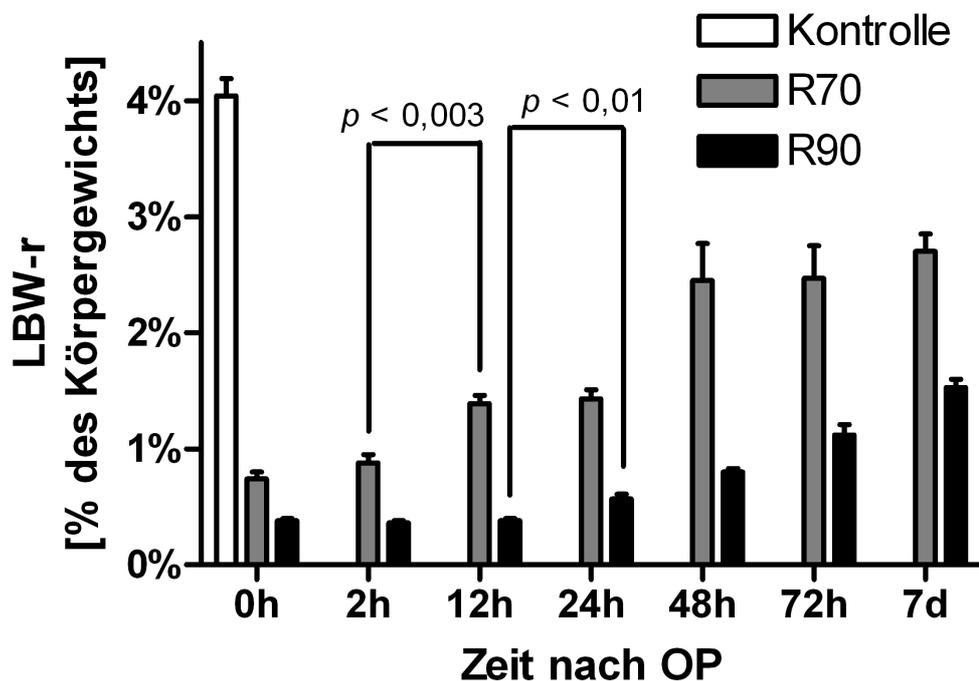


Abb. 3-1: Leber-Körpergewicht-Verhältnis (LBW-r) in Versuchstieren nach unterschiedlichen operativen Eingriffen.

Kontrollen ohne chirurgischen Eingriff zeigten ein LBW-r von ca. 4% LBW-r. Nach R70- bzw. R90-Resektion sank das LBW-r auf 0,74% bzw. 0,38%. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist jeweils nur für den frühesten, signifikanten Anstieg des LBW-r innerhalb einer Gruppe der p -Wert angegeben.

3.1.2 Serumparameter nach Leberteilresektion unterschiedlichen Umfangs

Zur Ermittlung der Leberschädigung wurden klassische Laborparameter im Serum der getöteten Tiere an Hand von Festphasen Assays analysiert. Die Enzymfreisetzung ins Serum wird als U/l, Bilirubin als mg/dl angegeben und ist in Abb. 3-2 auf S.68 gezeigt. Die Werte der R90-Tiere sind nach (Benko et al. 2010) abgebildet (vgl. 2.2.3, S.40 und 3.1.1, S.64). Mögliche Unterschiede zwischen hier gezeigten Daten und (Benko et al. 2010) können durch eigenständige Berechnung in der vorliegenden Arbeit von Mittelwert, SEM und Signifikanzen gegeben sein.

Im Vergleich zu Kontrolltieren mit Mittelwerten von $36,2 \pm 5,2$ U/l (*Alanin-Aminotransferase*, ALT) und $84,0 \pm 31,1$ U/l (*Aspartat-Aminotransferase*, AST) von Serum-ALT und -AST waren in R70- und R90-Tieren bereits 2h nach der Operation

erhöht. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für ALT lagen 2h postoperativ bei $208,4 \pm 102,8$ U/l in der R70-Gruppe und bei $184,8 \pm 9,2$ U/l nach R90-Hepatektomie. Die AST-Serumkonzentration 2h nach Resektion war in R70-Tieren im Mittel $324,3 \pm 127,8$ U/l, in R90-Tieren $350,6 \pm 394,4$ U/l. Die stärkste detektierte Freisetzung dieser Leberenzyme wurde 12h postoperativ gemessen und lag nach R70-Resektion bei $752,6 \pm 109,9$ U/l (ALT) bzw. $1055,4 \pm 54,5$ U/l (AST) und nach R90-Hepatektomie bei $1705,7 \pm 725,3$ U/l (ALT) bzw.; $2203,7 \pm 739,4$ U/l (AST). Die beiden Gruppen unterschieden sich dabei signifikant in den Serumspiegeln von ALT mit $p = 0,025$ und AST mit $p = 0,019$. Sowohl nach R70- als auch R90-Hepatektomie war bis 72h nach dem chirurgischen Eingriff eine signifikant erhöhte Konzentration beider Enzyme gegenüber Kontrolltieren festzustellen.

Für die LDH (*Lactatdehydrogenase*) wurde nur 12h nach der Operation ein Anstieg der Serum-Konzentration gemessen, allerdings war dieser nicht signifikant gegenüber den Kontrollen. Die LDH im Serum 12h nach R90-Resektion war im Vergleich zu Kontrollen mit $2416,5 \pm 1088,2$ U/l auf $7511,0 \pm 3700,0$ U/l erhöht. Zu allen späteren Zeitpunkten wurden reduzierte LDH-Werte gefunden, sowohl gegenüber Kontrollen als auch gegenüber R70-Hepatektomie.

Der Serumspiegel der AP (*alkalische Phosphatase*) war in einigen Gruppen nicht zu ermitteln, so dass keine konsistent vergleichbaren Ergebnisse hierzu vorhanden sind. Für 24h, 48h und 7d nach Operation war jedoch eine stärkere Serumkonzentration in R90-Tieren messbar als nach R70-Hepatektomie. Z.B. lagen die Mittelwerte 24h postoperativ bei $767,50 \pm 75,3$ U/l in R70-Tieren und bei $1149,9 \pm 333,1$ U/l in R90-Tieren, wobei dieser Unterschied mit $p = 0,066$ keinem signifikanten Effekt entsprach.

Die Bilirubin-Serum-Konzentration war zu den Zeitpunkten 12h, 24h und 48h nach R90-Resektion gegenüber R70-Tieren signifikant erhöht, wobei die durchschnittlichen Werte nach R70-Hepatektomie $0,2 \pm 0,2$ mg/dl (12h), $0,1 \pm 0,1$ mg/dl (24h) und $0,3 \pm 0,2$ mg/dl (48h) betragen. In R90-Tieren lagen die Werte bei $1,5 \pm 0,16$ mg/dl (12h; $p < 0,002$), $0,9 \pm 0,36$ mg/dl (24h; $p < 0,003$) und $1,6 \pm 0,2$ mg/dl

(48h; $p = 0,004$). Zu anderen Zeitpunkten waren die Unterschiede zwischen der R70- und der R90-Gruppe nicht signifikant.

Insgesamt war die Freisetzung von Enzymen ins Serum, die auf eine Leberschädigung hinweisen, generell nach R90-Resektion höher als nach R70-Hepatektomie. Hierbei ist zu beachten, dass grundsätzlich weniger Zellmasse bzw. Parenchym nach R90-Resektion vorhanden war, welches zur Produktion dieser Enzyme beitragen kann (vgl. hierzu LBW-r in 3.1.1, S.64).

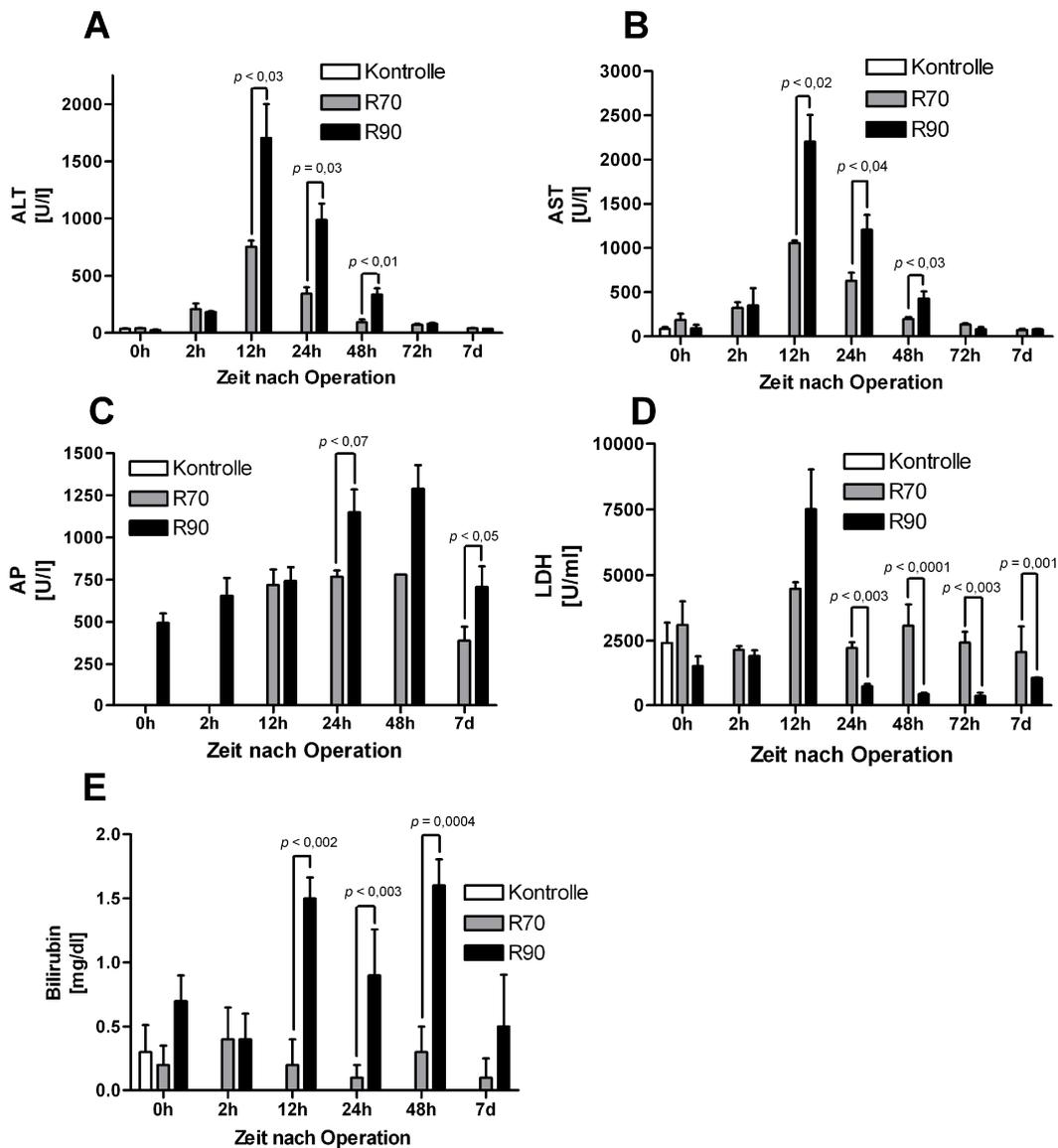


Abb. 3-2: Serum-Parameter der Leberschädigung.

ALT (Alanin-Aminotransferase, A), AST (Aspartat-Aminotransferase, B), AP (alkalische Phosphatase, C) und Bilirubin (E) zeigten eine verstärkte Leberschädigung nach R90-Resektion im Vergleich zu R70-Hepatektomie. Die LDH-(Lactat-Dehydrogenase, D) Freisetzung lag ab 24h postoperativ bei den R90-Tieren unter der in R70-Tieren.

3.1.3 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

Da sich sowohl bei Leberwachstum als auch –schädigung bereits deutliche Unterschiede zwischen R70- und R90-Leberteilresektion ergeben haben, wurde aus den entnommenen Gewebeproben Proteine präpariert (2.2.10.2, S.55), um auch

molekulare Prozesse zu charakterisieren, die nach der Operation ablaufen. NF- κ B gilt als wesentlicher Transkriptionsfaktor, der sowohl an regenerativen Prozessen, aber auch entzündlichen Vorgängen, wie Ischämie/Reperfusionsschäden, beteiligt ist.

Alle NF- κ B Messungen wurden an der Kernfraktion der von uns verwendeten Proteinpräparate mittels ELISA vorgenommen, um nur aktiviertes NF- κ B zu detektieren. Nach dem Abbau des Inhibitors transloziert NF- κ B vom Zytosol in den Zellkern, wo NF- κ B die Expression verschiedener Gene reguliert. Da bei jedem Versuch eine Standardreihe gemessen wurde, kann die NF- κ B-Menge in der Kernfraktion als absolute Menge in pg angegeben werden, die auf die im BCA (2.2.11, S.55) ermittelte Gesamtproteinmenge (μ g) normiert wurde. Im Folgenden wird diese normierte, in der Kernfraktion detektierte Konzentration an NF- κ B als kNF- κ B bezeichnet. Ermittelte Konzentrationen von kNF- κ B sind in Abb. 3-3a gezeigt (S.70).

Bereits zum Zeitpunkt der Operation war in R70-Tieren mit einem Mittelwert von $273,3 \pm 29,9$ pg/ μ g eine geringe, jedoch mit $p = 0,04$ signifikante Erhöhung von kNF- κ B messbar, verglichen mit Kontrollen, deren Mittelwert bei $111,4 \pm 32,7$ pg/ μ g lag. Diese erhöhte kNF- κ B-Konzentration blieb über den beobachteten Zeitraum bis zu 7d postoperativ annähernd konstant mit Mittelwerten von $313,2 \pm 19,9$ pg/ μ g (12h nach R70) und $281,2 \pm 64,6$ pg/ μ g (24h nach R70). Im Gegensatz dazu wurde bei den R90-Tieren keine vermehrte kNF- κ B bis 24h nach OP beobachtet. Mit Mittelwerten von $592,2 \pm 120,0$ pg/ μ g 24h und $747,2 \pm 146,4$ pg/ μ g 48h nach R90-Resektion stieg kNF- κ B deutlich über die Werte in den R70-Tieren an, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren. Sieben Tage postoperativ sank kNF- κ B mit $274,2 \pm 46,0$ pg/ μ g in R90-Tieren auf einen Wert ab, der dem Mittelwert von $262,4 \pm 96,5$ pg/ μ g nach 7d in der R70-Gruppe entsprach.

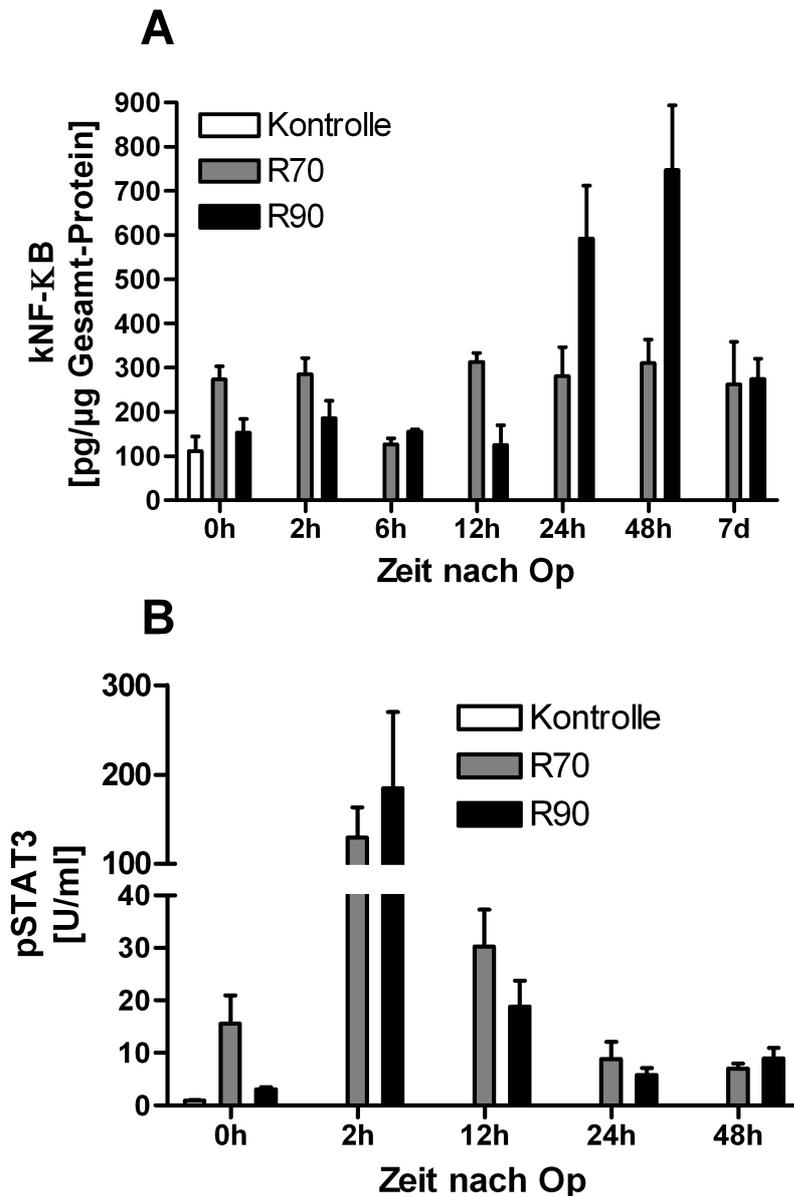


Abb. 3-3: Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

A) kNF-KB war nach R70-Hepatektomie nur geringfügig, jedoch kontinuierlich erhöht. R90-Resektion führte erst ab 24h postoperativ zu einer erhöhten kNF-KB-Konzentration. B) Phosphoryliertes STAT3 war sowohl nach R70- als auch R90-Resektion 2h und 12h postoperativ signifikant gegen Kontrollen erhöht. Zwischen den Resektionsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede messbar.

STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) spielt eine Rolle als anti-apoptotischer Faktor und reguliert Gene, die relevant für regenerative Prozesse sind. Außerdem ist einer der wesentlichen Signalwege, die zu STAT3-Aktivität führen IL-6-abhängig, welches als wesentliches Signalmolekül in der Leberregeneration bekannt ist (Fausto et al. 2006; Yao et al. 2010).

Zur Analyse von aktiviertem STAT3 wurde ein ELISA verwendet, dessen Antikörper spezifisch für phosphoryliertes STAT3 sind. Hierdurch gemessene pSTAT3-Konzentrationen sind in Abb. 3-3b dargestellt.

Die Konzentration an pSTAT3 war 2h postoperativ sowohl nach R70, mit einem Mittelwert von $129,41 \pm 33,89$ U/ml, als auch nach R90-Hepatektomie, mit einem Mittelwert von $184,57 \pm 85,59$ U/ml deutlich erhöht. Die Mittelwerte der pSTAT3-Konzentration lagen 12h nach R70-Resektion bei $30,22 \pm 7,1$ U/ml bzw. bei $18,84 \pm 4,91$ U/ml in R90-Tieren, erreichten aber nach 24h mit $8,84 \pm 3,25$ U/ml in der R70-Gruppe und $5,86 \pm 1,37$ nach R90-Hepatektomie Werte, die sich statistisch nicht von den Kontrollen mit $0,94 \pm 0,17$ U/ml unterschieden. Die Unterschiede zwischen der R70- und R90-Gruppe waren zu keinem der beobachteten Zeitpunkte signifikant.

3.1.4 Genexpression von wesentlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren der Leberregeneration

Da die Regulation zumindest eines zentralen Transkriptionsfaktors differentiell vom Resektionsumfang beeinflusst wurde, analysierten wir als nächstes auf mRNA-Ebene die Expression von Genen, die einerseits für Regeneration bzw. Entzündungen relevant sind und von den analysierten Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

Die Expression von Genen wurde mittels OneStep RT-qrtPCR ermittelt. Die angegebenen Werte beziehen sich auf transkribierte mRNA normiert auf die β -Aktin Expression der Kontrollen und sind als Vielfaches der jeweiligen Zielgen-Expression in Kontrollen (*fold change*, ohne Einheit) angegeben. Zwar werden bei dieser Methode Translation und posttranslationale Modifikation der betrachteten Gene nicht erfasst, jedoch ist die Prozessierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren relativ gering ausgeprägt, so dass sich aus der mRNA-Expression der Einfluss des chirurgischen Eingriffs auf die transkriptionelle Regulation schließen lässt.

RNA wurde wie unter 2.2.8.2 (S.49) beschrieben aus regenerierenden Rattenlebern nach Resektion isoliert. Die untersuchten Gene *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α)

und Interleukin-6 (IL-6) sind Zytokine, die früh nach Resektion die Proliferation von Hepatozyten ermöglichen, *hepatocyte growth factor* (HGF) ist ein von Hepatozyten produziertes Zytokin, welches einen proliferativen Status aufrecht erhält. *Transforming growth factor alpha* (TGF- α) und TGF- β sind antagonistische Modulatoren der Regeneration. Für die genannten Gene berechnete fold changes sind in Abb. 3-4 auf S.74 präsentiert.

Die TNF- α -Expression (Abb. 3-4a) in Kontrollen lag bei einem mittleren fold change von $1,47 \pm 0,72$. In der R70-Gruppe stieg Expression von TNF- α bereits 6h nach OP auf das $22,70 \pm 9,95$ -fache an und erreichte mit einem fold change von $1307,11 \pm 779,86$ das Maximum 24h postoperativ, 7d nach OP fiel die Expression wieder auf $26,89 \pm 11,36$ ab. In den R90-Tieren war mit $15,78 \pm 10,81$ 2h postoperativ bzw. $5,24 \pm 2,37$ 6h nach dem chirurgischen Eingriff ein leichter Anstieg der TNF- α -Expression zu frühen Zeitpunkten zu verzeichnen, jedoch unterschied sich die Expression zu keinem Zeitpunkt signifikant von der in Kontrolltieren, z.B. lag der Mittelwert 24h nach R90-Hepatektomie bei $20,23 \pm 7,27$.

Für IL-6 (Abb. 3-4b) wurde ein biphasisches Expressionsmuster mit Maxima 2h bei $4887,32 \pm 2436,50$ und 12h $7588,98 \pm 2985,66$ postoperativ nach R70-Hepatektomie gefunden, während sich die IL-6-Expression 6h nach OP mit $33,41 \pm 20,05$ statistisch nicht von Kontrollen mit $6,27 \pm 3,84$ unterschied. Zu anderen Zeitpunkten stieg die Expression nicht wesentlich über das Niveau der Kontrolltiere. Nach R90-Hepatektomie war ein Anstieg der IL-6-Expression mit $3697,74 \pm 1676$ nur 2h postoperativ zu beobachten, während der Mittelwert 12h nach R90-Resektion bei $400,44 \pm 258,28$ deutlich niedriger als der Wert in der R70-Gruppe war.

Die HGF-Expression (Abb. 3-4e) war 2h postoperativ sowohl in der R70-, bei $110,82 \pm 45,39$, als auch in der R90-Gruppe, bei $181,77 \pm 124,76$, erhöht gegenüber Kontrolltieren mit $2,28 \pm 1,47$. Mit einem Mittelwert von $34,06 \pm 26,49$, war 6h postoperativ nur in R70-Tieren eine gestiegene Expression messbar, wobei sich der Wert nach R90-Resektion mit $3,47 \pm 1,59$ nicht von Kontrollen unterschied. In der R70-Gruppe wurde 12h nach dem chirurgischen Eingriff die maximale HGF

Expression mit $5713,66 \pm 3061,22$ gemessen, was in R90-Tieren bei einem Mittelwert von $4,15 \pm 3,06$ nicht beobachtbar war.

Die Expression von TGF- α (Abb. 3-4c) nahm in R70-Tieren einen biphasischen Verlauf, mit Spitzen von $24,65 \pm 13,8$ 2h und $117,51 \pm 97,40$ 12h nach der Operation. In R90-Tieren war erst nach 7d postoperativ, bei einem Mittelwert von $11,29 \pm 1,24$, ein minimaler Anstieg der Expression über das Niveau der Kontrollen, mit $7,87 \pm 5,21$, zu verzeichnen.

Bei den R70-Tieren fanden wir eine deutliche Erhöhung der Expression von TGF- β (Abb. 3-4d) 12h postoperativ, mit einem Mittelwert von $67,44 \pm 48,74$, die in der R90-Gruppe, bei einem Mittelwert von $4,15 \pm 3,06$, nicht auftrat. Zu allen späteren Zeitpunkten lag die TGF- β -Expression nach R70-Hepatektomie unterhalb der von Kontrolltieren, die einen Mittelwert von $1,17 \pm 0,26$ aufwiesen. Zwei Stunden bis 12h nach dem chirurgischen Eingriff war auch in R90-Tieren eine Erhöhung der Expression zu verzeichnen, allerdings unterschied sie sich nicht signifikant von den Kontrollen. Ab 24h postoperativ blieb die TGF- β -Expression unterhalb der in Kontrollen gemessenen, diese Suppression war weniger restriktiv, als nach 70% Resektion.

Generell war in R70-Ratten eine stärkere Expression der analysierten Gene messbar, die relevant für Leberregeneration sind, als in Tieren mit 90%iger Hepatektomie. Zu beachten ist hierbei, dass eine Normierung auf ein „house keeping“-Gen stattfand, so dass die Unterschiede nicht auf die unterschiedlich Menge vorhandener Leberzellen zurückzuführen sind.

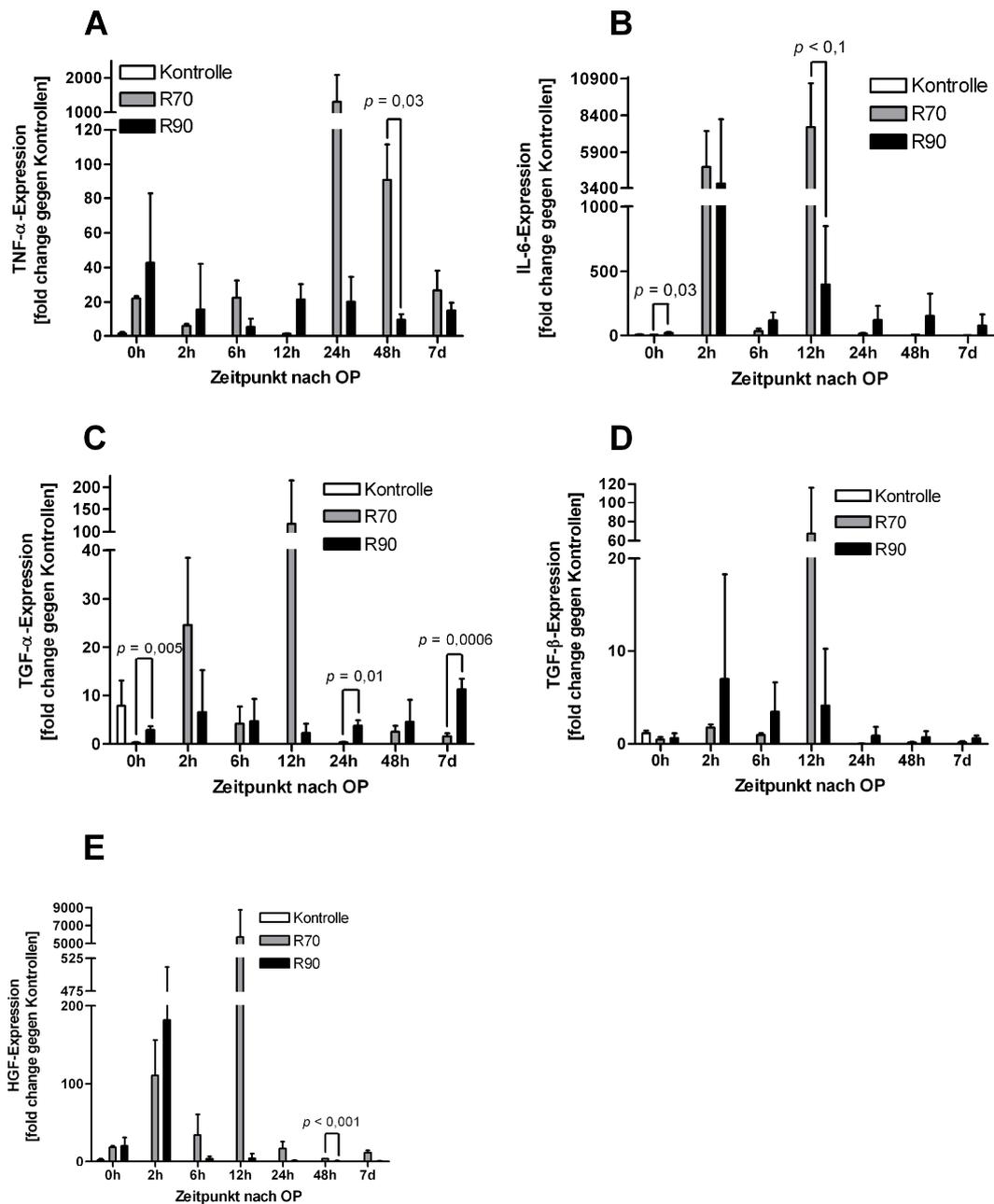


Abb. 3-4: mRNA-Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren mit Relevanz für Leberregeneration im Lebergewebe nach R70- bzw. R90-Leberteilresektion.

A) TNF- α , ein deutlicher Anstieg der Expression war nur nach R70-Resektion messbar; B) IL-6 wurde biphasisch exprimiert; C) TGF- α zeigte ebenfalls einen biphasischen Expressionsverlauf in den R70-Tieren, wurde nach R90-Resektion nicht verstärkt exprimiert; D) Der antiregenerative Faktor TGF- β wurde in R90-Tieren schon früh exprimiert, nach R70-Resektion war nur eine Expressionsspitze 12h postoperativ messbar; E) HGF wurde in beiden Gruppen verstärkt nach 2h exprimiert, eine zweite Spitze nach 12h war jedoch nur in der R70-Gruppe beobachtbar.

3.1.5 Zelltodrate nach R70- bzw. R90-Leberteileresektion ermittelt durch TUNEL-Assay

Sowohl die Aktivierung von NF- κ B als auch die Genregulation der unter 3.1.4 bezeichneten Gene waren abhängig vom Ausmaß der Resektion unterschiedlich ausgeprägt. Um festzustellen, ob der Gewebeschaden nach Hepatektomie bezogen auf verschiedene Resektionsumfänge ebenfalls differentiell auftritt, wurde der Zelltod histologisch in Gewebeschnitten der regenerierenden Lebern bestimmt. Der TUNEL (*TdT-mediated UTP nick end labeling*)-Index stellt die Anzahl TUNEL-positiver Zellen zur Gesamtzellzahl in Prozent dar, wobei die Zählung mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung durchgeführt wurde und pro Tier ca. 2500 Zellen ausgewertet wurden. Die ermittelten TUNEL-Indices sind in Abb. 3-5 gezeigt, repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen werden in Abb. 3-6 präsentiert (S.76).

TUNEL-Indices waren direkt nach R70-Resektion mit durchschnittlich $0,44 \pm 0,03\%$ TUNEL-positiven Zellen gegenüber Kontrollen mit einem mittleren TUNEL-Index von $0,12 \pm 0,08\%$ signifikant erhöht. Im weiteren Zeitverlauf nach R70-Hepatektomie war nur ein leichter Anstieg des TUNEL-Index messbar, z.B. mittlerer TUNEL-Index nach 24h bei $0,27 \pm 0,07\%$, nach 7d bei $0,15 \pm 0,03\%$. Eine R90-Hepatektomie führte zu deutlich erhöhten TUNEL-Indices gegenüber den Werten bei R70-Tieren, z.B. lagen TUNEL-Indices 24h nach R90 bei $0,44 \pm 0,17\%$ bzw. nach 7d bei $0,63 \pm 0,11\%$.

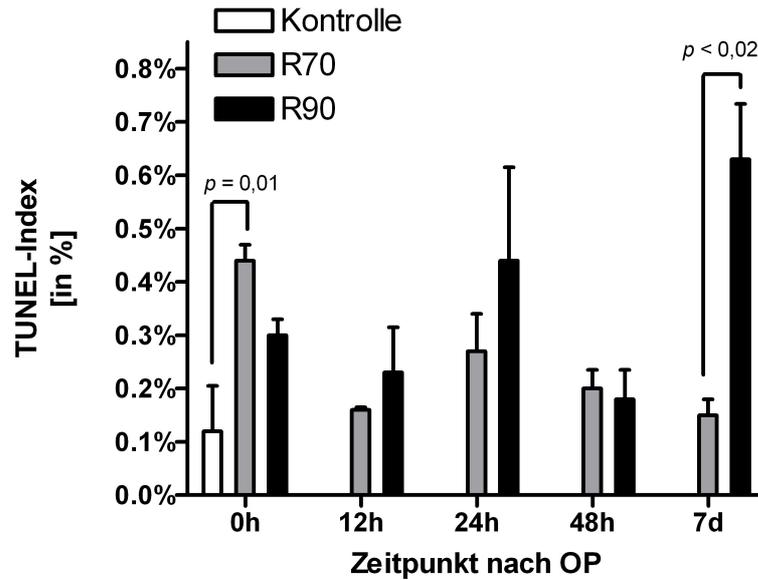


Abb. 3-5: TUNEL-Indices nach Leberteileresektion.

Der TUNEL-Index ist die Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Gesichtsfeld zu Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld bei Verwendung eines Objektivs mit 20-facher Vergrößerung. Jeder Wert wurde über 4 Schnitte und jeweils ca. 2500 Zellen gemittelt. Zu allen Zeitpunkten nach dem operativen Eingriff lag der TUNEL-Index in der R90-Gruppe über dem der R70-Tiere.

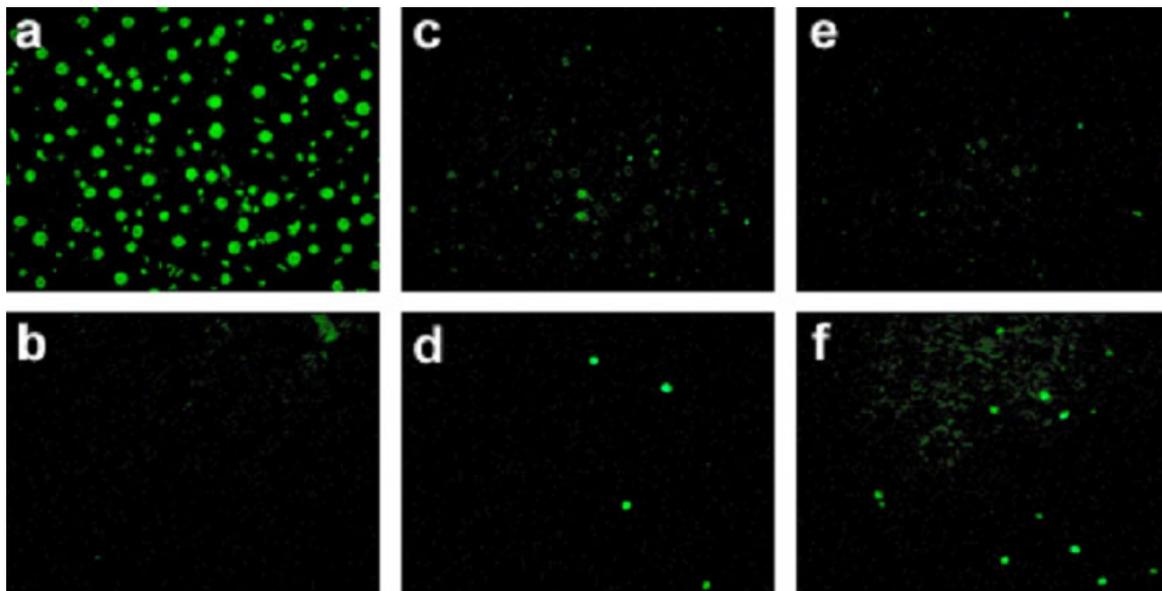


Abb. 3-6: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener Dünnschnitte nach TUNEL-Färbung.

A) Positiv Kontrolle; B) Negativ Kontrolle, C) Restleber 24h nach R70-Resektion; D) Restleber 24h nach R90-Resektion; E) Restleber 7 Tage nach R70-Resektion; F) Restleber 7 Tage nach R90-Resektion. Verwendetes Objektiv: 20-fache Vergrößerung.

3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse des Teilprojekts „differentielle Hepatektomie“

Insgesamt ergab sich ein Bild von stärkerer Leberschädigung durch Resektionen größeren Ausmaßes. Die Wiederherstellung des ursprünglichen Leberparenchyms setzte nach R90-Hepatektomie deutlich später ein als nach R70-Resektion und zeigte eine verlangsamte Kinetik. Hierbei waren nicht nur Leberenzyme im Serum, sondern auch molekulare Mechanismen, wie Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und mRNA-Expression, sowie Zelltod differentiell reguliert. Insofern erscheint es als Fazit sinnvoll, Prozesse der Regeneration bzw. des Leberschadens bereits auf molekularer Ebene zu beeinflussen, um einerseits eine zügige Regeneration, auch nach umfangreichen Resektionen, andererseits eine minimierte Schädigung des Restgewebes zu erreichen.

3.2 Modulation der molekularen und zellulären Reaktion auf R90-Leberresektion durch präoperative Glycingabe

In Abhängigkeit des Resektionsumfangs war eine alterierte Konzentration von kNF-KB sowie von Zytokinen und Wachstumsfaktoren mit Relevanz für die Leberregeneration beobachtbar. Daher sollte getestet werden, ob Glycin als pharmakologischer Wirkstoff einen protektiven bzw. proregenerativen Effekt im Modell der 90%igen Leberresektion hat. Für Glycin konnten in Zellkulturversuchen und als Additivum für Organkonservierungslösungen bereits positive Effekte gezeigt werden, wobei der Mechanismus bislang nicht bekannt ist (Qu et al. 2002; Liu et al. 2006; Lechler et al. 2005; Schemmer et al. 1998). Glycin wurde als Supplement in der Nahrung verabreicht, da einerseits ausreichende Resorption gegeben ist (Froh et al. 2008; Takahashi et al. 2008) und hierdurch die Belastung für die Tiere minimal ist, z.B. im Vergleich zur Injektion i.p.. Versuchstiere der Glycingruppe erhielten 5% Glycin (Standardfutter: 0,14% Glycinanteil) im gesamten Zeitraum der Aufzucht und den postoperativen Zeitraum bis zur Tötung, 6-7 Wochen nach Absetzen. Im Folgenden werden diese Versuchstiere als G90(-Gruppe) bezeichnet. Wie in den bisher untersuchten Resektionsmodellen (vgl. 3.1, S.63) überlebten auch in der mit Glycin behandelten Gruppe alle Tiere bis 7d nach dem chirurgischen Eingriff.

3.2.1 LBW-r und Serum-Parameter der Leberschädigung nach 90%iger Hepatektomie mit Glycin-Supplementation

Benko et al. haben den Einfluss von Glycin auf LBW-r und Serum-Parameter der Leberschädigung nach 90%iger Leberteilresektion beschrieben (Benko et al. 2010).

Zusammengefasst unterschied sich der Verlauf des LBW-r nicht zwischen der R90- und der G90-Gruppe (Benko et al. 2010).

Die Freisetzung der Leber-Enzyme AST und AP ins Serum war zu den Zeitpunkten 12h, 24h und 48h in G90-Tieren signifikant verringert gegenüber der R90-Gruppe.

Nach G90-Resektion waren die Serumspiegel von ALT zu den Zeitpunkten 12h und 24h sowie die Konzentration von Bilirubin zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h postoperativ signifikant niedriger als nach R90-Hepatektomie.

Insgesamt reduzierte eine Glycin-Fütterung Serum-Parameter der Leberschädigung nach 90%iger Resektion (Benko et al. 2010).

3.2.2 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

Bei Serummarkern der Leberschädigung wurden signifikante Änderungen durch die Glycinfütterung von Benko *et al.* beschrieben. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität von Transkriptionsfaktoren mit Bezug zur Leberregeneration ermittelt, um den Einfluss der Glycin-Behandlung auch auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die Messungen wurden wie unter 3.1.3 (S.68) beschrieben durchgeführt, erhaltene Werte sind graphisch in Abb. 3-7 (S.80) dargestellt.

Die kNF-KB-Konzentration (Abb. 3-7a) wurde in der G90-Gruppe bereits zum Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs (0h) signifikant auf $1589,2 \pm 379,4$ pg/mg erhöht. Bis 12h nach Hepatektomie war jedoch unabhängig von der Glycinbehandlung keine Kernlokalisierung von NF-KB beobachtbar. In G90-Tieren war 12h postoperativ ein Anstieg von kNF-KB evident, bei einem Mittelwert von $994,7 \pm 77,6$ pg/mg, der nach R90-Resektion $125,2 \pm 44,4$ pg/mg nicht beobachtbar war. Dieser Unterschied war mit $p = 0,0001$ signifikant. Dagegen unterschied sich kNF-KB 24h nach Resektion nicht zwischen den Gruppen. Während 48h postoperativ kNF-KB in R90-Tieren $747,175 \pm 146,4$ pg/mg betrug, lag die Konzentration von kNF-KB nach G90-Hepatektomie mit $302,5 \pm 39,5$ pg/mg signifikant ($p = 0,03$) niedriger.

Eine gegenüber Kontrollen signifikant auf $184,6 \pm 85,6$ U/ml erhöhte pSTAT3-Konzentration (Abb. 3-7b) wurde 2h nach Operation in R90-Tieren beobachtet, die bei einer G90-Resektion mit $3,9 \pm 1,9$ U/ml ausblieb. Mit $p = 0,12$ erreichte dieser Unterschied jedoch keine Signifikanz. Erst 12h nach dem chirurgischen Eingriff zeigten G90-Tiere einen geringen pSTAT3-Anstieg auf $21,8 \pm 6,5$ U/ml.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass über eine orale Verabreichung von Glycin die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3 nach R90-Hepatektomie moduliert werden konnte. Wobei kNF- κ B nach Glycin-Verabreichung zu einem früheren Zeitpunkt anstieg als im Resektionsmodell ohne Glyzin. Im Gegensatz dazu blieb die erhöhte STAT3-Phosphorylierung, die sowohl nach R70- als auch R90-Resektion beobachtet wurde, in Tieren mit Glycinfütterung aus

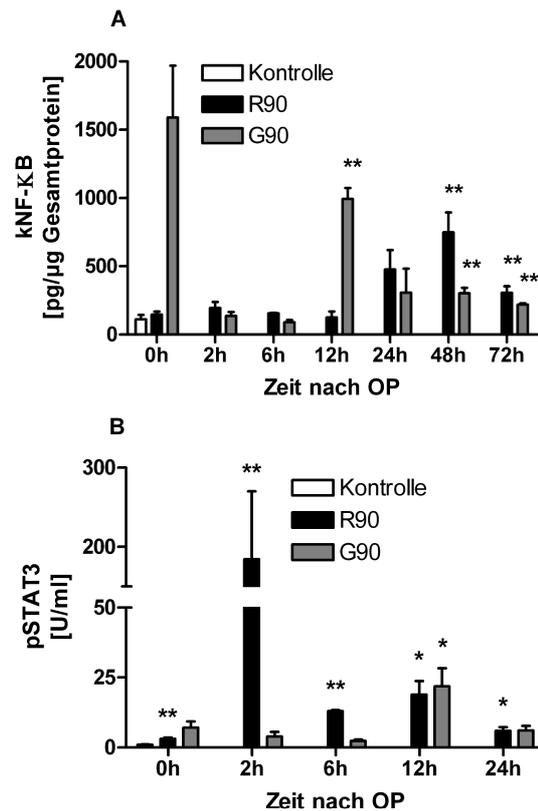


Abb. 3-7: Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3 nach R90- und G90-Leberresektion.

Während die Glycinfütterung bereits vor dem chirurgischen Eingriff zu einem Anstieg der kNF- κ B-Konzentration führte, blieb kNF- κ B auch in der Glycingruppe bis 12h postoperativ auf Kontroll-Niveau. pSTAT3 war erst 12h postoperativ in der G90-Gruppe messbar. Die deutliche Erhöhung der pSTAT3-Menge 2h postoperativ, die sowohl in R70- als auch R90-Tieren auftrat, war nicht nach G90-Hepatektomie messbar. *: R90 vs. R90 + Glycin $p < 0,05$; **: R90 vs. R90 + Glycin $p < 0,01$

3.2.3 mRNA-Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren

Auf Grund der unterschiedlichen Aktivität der von uns betrachteten Transkriptionsfaktoren wurde auch im Glycinmodell die Transkription von Genen mit Relevanz für die Leberregeneration analysiert (siehe 3.1.4, S.71). Gemessene fold changes sind in Abb. 3-8 präsentiert (S.83).

Die TNF- α -Expression (Abb. 3-8a) war intraoperativ in G90-Tieren mit $12,7 \pm 5,9$ niedriger als in der R90-Gruppe bei $42,8 \pm 20,1$. Nach 12h G90-Hepatektomie stieg die Expression deutlich auf $111,7 \pm 7,7$ an, wobei der Wert nach R90-Resektion leicht sank auf $21,5 \pm 5,1$. Dieser Unterschied zwischen R90 und G90 war mit $p = 0,002$ signifikant, wobei sich die Gruppen zu allen anderen Zeitpunkten nur geringfügig unterschieden.

Das biphasische Expressionsmuster für IL-6 (Abb. 3-8b), das bei den R70-Tieren beobachtet wurde (3.1.4, S.71), trat weder nach R90- noch nach G90-Resektion auf. Während die Expressionspitze von IL-6 in der R90-Gruppe mit einem Mittelwert von 6902 ± 3517 2h postoperativ auftrat, lagen die Werte in G90-Tieren im Mittel mit $279,4 \pm 105,3$ deutlich niedriger. Im Gegensatz hierzu war ein stärkerer Anstieg der Expression 12h nach G90-Resektion messbar, bei 8271 ± 3363 , der in der R90-Gruppe mit $400,4 \pm 258,3$ nicht beobachtbar war.

Die Expression von TGF- α (Abb. 3-8c) war nach 90%iger Resektion unabhängig von Glycinbehandlung kaum verändert. Eine deutliche Erhöhung der TGF- α -Expression war nur 12h nach G90-Hepatektomie messbar. Der Mittelwert betrug hier $90,7 \pm 64,6$, wobei sich R90-Tiere mit $2,3 \pm 0,96$ kaum von Kontrollen unterschieden.

Bei den R90-Tieren wurden leicht erhöhte Werte für TGF- β Expression (Abb. 3-8d) 2h, mit $14,8 \pm 8,7$, 6h, mit $3,5 \pm 1,6$ und 12h postoperativ, mit $4,1 \pm 3,06$ ermittelt. In der G90-Gruppe war ein schwacher Anstieg nur 12h nach dem chirurgischen Eingriff messbar, bei einem Mittelwert von $3,1 \pm 1,6$.

Die Expression von HGF (Abb. 3-8e) erreichte in der R90-Gruppe 2h postoperativ eine Spitze mit einem mittleren fold change von $181,8 \pm 124,8$, wobei sich die Werte in G90-Tieren, bei einem Mittelwert von $4,7 \pm 0,1$ nur geringfügig von Kontrolltieren unterschieden. Ein deutlicher Anstieg der HGF-Expression war nach G90-Hepatektomie erst 12h postoperativ messbar, mit $46,5 \pm 25,1$, wobei zu diesem Zeitpunkt keine erhöhte Expression in den R90-Tieren feststellbar war, bei denen der Mittelwert $4,1 \pm 3,1$ betrug.

Insgesamt betrachtet war die mRNA-Expression der untersuchten Gene in G90-Tieren niedriger als in der R90-Gruppe ohne Glycinbehandlung, wobei die Unterschiede nur vereinzelt Signifikanz erreichten, was teilweise auf sehr hohe Standardabweichungen, vor allem bei der Expression von HGF und IL-6 zurückzuführen war. 12h postoperativ stieg die Expression aller untersuchten Zytokine und Wachstumsfaktoren in der G90-Gruppe deutlich an. Möglicherweise ist diese konsistente Erhöhung aller Gene, die analysiert wurden, zu diesem Zeitpunkt auf eine Reduktion der mRNA des Referenzgens zurückzuführen.

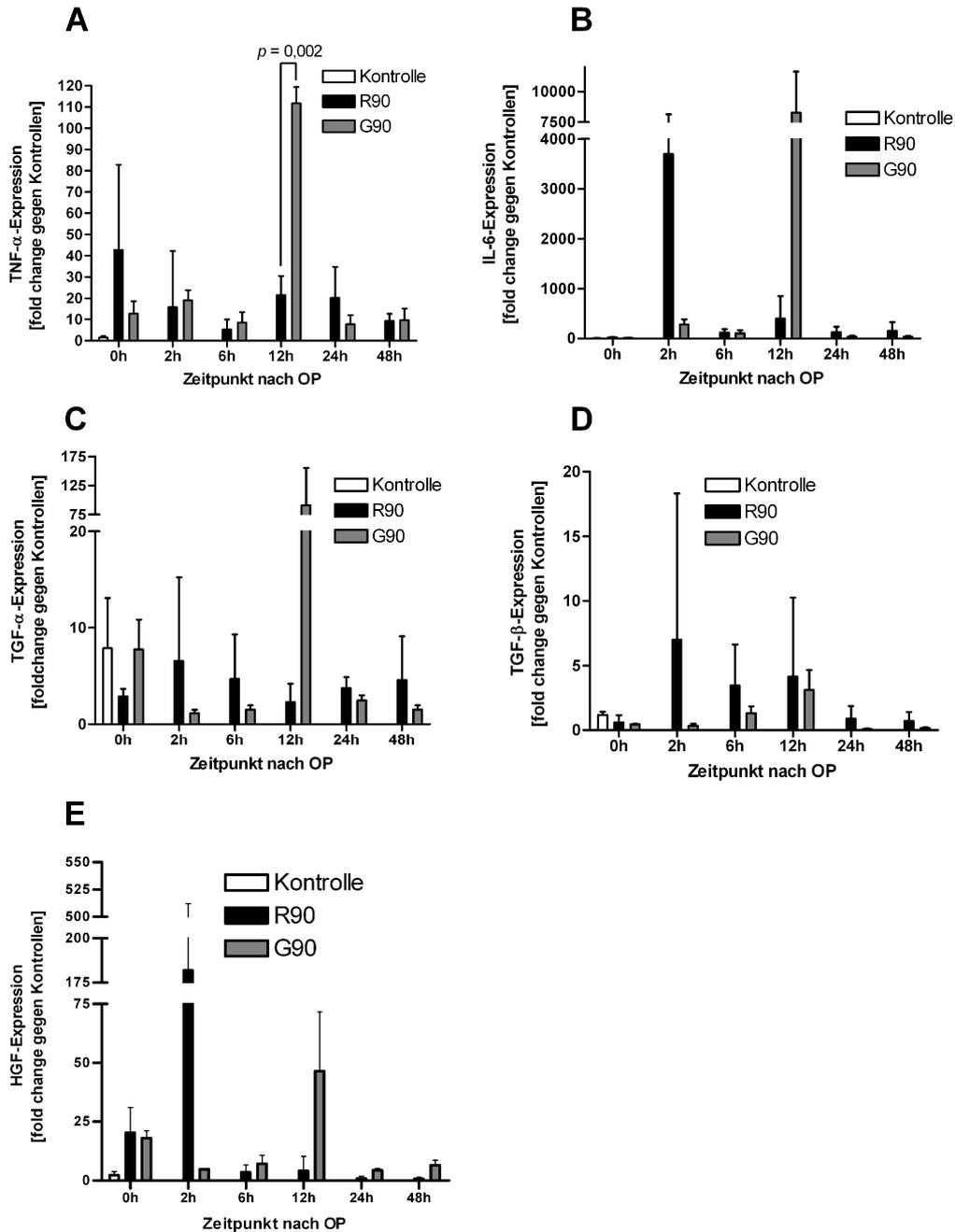


Abb. 3-8: Modulation der mRNA-Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen nach Glycinfütterung bei 90%iger Hepatektomie.

Jeweils zum Zeitpunkt 12h nach R90- bzw. G90-Hepatektomie zeigte sich eine deutliche Spitze in der Expression aller betrachteten Gene: TNF- α (A), IL-6 (B), TGF- α (C), TGF- β (D) und HGF (E).

3.2.4 Zelltodrate nach R90- und G90-Leberresektion

Die Glycinfütterung führte zu veränderter Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sowie zu einer modulierten Genexpression als Reaktion auf 90%ige Hepatektomie. Um zu ermitteln, ob dieser Effekt sich auch auf den Gewebeschaden bzw. Zelltod auswirkt, wurden auch hier von Gewebeschnitten der regenerierenden Lebern TUNEL-Färbungen angefertigt (S.3.1.5, S.75). Die ermittelten TUNEL-Indices sind in Abb. 3-9 (S.85) dargestellt.

Eine Vorbehandlung mit Glycin reduzierte die Anzahl TUNEL-positiver Zellen zu allen Beobachtungszeitpunkten gegenüber R90-Tieren. Besonders deutlich wurde dieser Effekt zum Zeitpunkt der OP, bei dem der mittlere TUNEL-Index nach R90-Resektion bei $0,31 \pm 0,08\%$ lag, wobei dieser nach G90-Hepatektomie $0,17 \pm 0,04\%$ betrug und 24h nach dem chirurgischen Eingriff mit TUNEL-Indices von $0,53 \pm 0,17\%$ (R90) und $0,08 \pm 0,03\%$ (G90). Bemerkenswert ist vor allem die Tatsache, dass der TUNEL-Index in G90-Tieren niedriger als in unbehandelten Kontrollen war, deren durchschnittlicher Index bei $0,22 \pm 0,09\%$ lag. Die beschriebenen Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

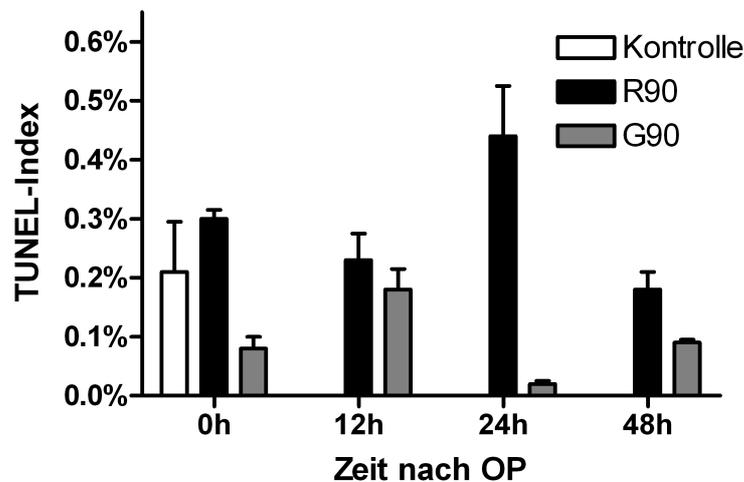


Abb. 3-9: TUNEL-Indices für regenerierende Rattenlebern nach R90- und G90-Leberteileresektion.

Zu allen Beobachtungszeitpunkten lag der TUNEL-Index nach Glycinfütterung deutlich unter den TUNEL-Indices der Tiere mit Standardfutter. Die beobachteten Unterschiede waren nicht signifikant.

3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur pharmakologischen Beeinflussung 90%iger Leberresektion durch Glycinfütterung

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse auf eine Verringerung des Gewebes Schadens nach 90% Hepatektomie durch zusätzliche Fütterung mit Glycin hin. Hierbei waren nach G90-Hepatektomie Serum-Parameter der Leberschädigung geringfügig gegenüber R90-Resektion reduziert, eine Erhöhung von kNF-KB zu früheren Zeitpunkten messbar als nach R90, wobei keine Phosphorylierung von STAT3 beobachtbar war. Expression von Genen mit Relevanz für die Leberregeneration wurden jedoch nur in geringem Umfang durch Glycingabe verändert, wogegen TUNEL-Indices deutlich in G90-Tieren verringert waren.

3.3 In-vitro-Experimente an Maus-KC und humanen Hepatozyten zur Modulation TLR-4 induzierter Signalwege mittels Bortezomib

Die bisher beschriebenen Experimente waren primär deskriptiver Natur, um die Expression und Aktivierung verschiedener Zytokine und Transkriptionsfaktoren nach

Leberresektion zu dokumentieren und die Möglichkeiten zur pharmakologischen Supplementation bei Leberteilresektion zu eruieren. Da sich die Regeneration der Leber sowohl durch den Resektionsumfang (3.1.6, S.77) als auch pharmakologisch durch Glycin beeinflussen ließ (3.2.5, S.85), jedoch weiterhin unklar war, welchen Beitrag NF- κ B in diesem Modell spielt, wurde im Folgenden eine Modulation der Aktivierung von NF- κ B und der hierdurch induzierten Gene vorgenommen. Dieser konkrete Eingriff in den NF- κ B Signalweg sollte dazu dienen den Einfluss von NF- κ B auf die Regeneration zu ermitteln bzw. einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Hierzu wurde der bereits für das multiple Myelom zugelassene Wirkstoff Bortezomib (vertrieben als Velcade®) eingesetzt. Dieser inhibiert die Funktion des Proteasoms, und verhindert damit den Abbau des Inhibitors von NF- κ B (Hideshima et al. 2002). Eine Behandlung mit Bortezomib blockiert somit indirekt NF- κ B-Aktivierung, da NF- κ B durch Bindung an den Inhibitor nicht in den Zellkern translozieren und keine transkriptionelle Regulation vermitteln kann.

Zunächst wurde *in vitro* an murinen und humanen primären Leberzellen getestet ob eine Modulation der durch LPS-induzierten NF- κ B-vermittelten Genexpression, mittels Bortezomib möglich ist. Nach wie vor ist unklar, ob endogenes LPS, z.B. von kommensalen Bakterien aus dem Verdauungstrakt, wesentlich für die Initiierung der Regeneration nach Leberteilresektion ist. Dennoch wurde LPS als Stimulans für die *In-vitro*-Experimente gewählt, da dieser Wirkstoff mit geringem Aufwand applizierbar ist und eine TLR-4 abhängige Reaktion ohne Schädigung der Zellen erreicht werden kann.

Gezeigt sind Ergebnisse für murine KC als Modell leberresidenter Immunzellen sowie für humane Hepatozyten als wesentliche funktionale Zellen des LebergewebeS.KC wurden aus männlichen, 6 Wochen alten C57J/BL6-Mäusen mittels Kollagenase-Verdau und anschließender Elutriation isoliert, wie unter 2.2.4.2 (S.41) beschrieben. Gezeigte Daten sind Mittelwerte von 3 unterschiedlichen Zell-Isolationen mit jeweils 3-fachem Versuchsansatz (n=3).

Humane Hepatozyten wurden aus reseziertem bzw. explantiertem Lebergewebe durch Kollagenase-Perfusion des Gewebes und anschließende Zentrifugation gewonnen, wie unter 2.2.5 (S.44) beschrieben, wobei die deutlich größeren und dichteren Hepatozyten im Sediment von den nicht-parenchymalen Leberzellen in der Suspension getrennt wurden. Eine exakte Aufstellung der Ätiologien, die ursächlich für die chirurgischen Interventionen waren, ist in Tabelle 2 (S.45) angegeben. Insgesamt wurden Zellen von 13 Patienten isoliert und jeweils im Triplet behandelt (n=13). Die Isolation humaner KC und HSC mittels MACS bzw. FACS befand sich zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch in einem frühen experimentellen Stadium. Bislang ist unklar, ob mit den vorhandenen technischen Möglichkeiten reine nicht-parenchymale Zellfraktionen aus humanem Material isoliert werden können.

3.3.1 Zell-Morphologie nach Behandlung mit LPS und/oder Bortezomib

Primäre Zellen waren nach 48h (Hepatozyten) bzw. 72h (KC, HSC) vollständig auf den Kulturplatten angeheftet und morphologisch jeweils als der gesuchte Zelltyp identifizierbar. Insbesondere Hepatozyten sind durch ihre distinkte Form optisch klar von anderen Zelltypen unterscheidbar. Stimulationsexperimente wurden erst nach vollständiger Anheftung an die Kulturplatten begonnen.

Die Reinheit der aus Mäusen isolierten Kupfferzellpopulationen wurde stichprobenartig mittels FACS-Färbung für das Oberflächenantigen F4/80 bestimmt, wobei Reinheiten von ca. 94% erreicht wurden (Dr. rer. nat. Bröring 2008). Für die Isolation humaner Hepatozyten nach der von uns verwendeten Methode liegen laut Literatur erreichte Viabilitäten bei ca. 90% (Berry et al. 1997; Guguen-Guillouzo et al. 1982; Hang et al. 2009). Spezifitäten werden in der Regel nicht angegeben, da Hepatozyten optisch leicht von anderen Zelltypen unterschieden werden können. Bei Aussaat von Hepatozyten mit einer Konfluenz von ca. 80% waren in der Regel keine Zellen eines anderen Typs erkennbar.

Morphologische Veränderungen durch Applikation von LPS oder Bortezomib in das Kulturmedium waren nicht beobachtbar (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 mRNA-Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren *in vitro* nach LPS Stimulation mit und ohne Bortezomib-Vorbehandlung

Um den Einfluss von LPS-Stimulation und/oder Bortezomib-Behandlung auf regulative Prozesse in den Zellen zu analysieren, wurde die RNA-Expression der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- α sowie IFN- β und der Wachstumsfaktoren HGF, TGF- α sowie TGF- β mittels qRT-PCR bestimmt (s. 3.1.4, S.71). Errechnete fold changes für die analysierten Gene sind in Abb. 3-10 (S.89) präsentiert.

In murinen KC konnte mittels LPS die mRNA-Expression von TNF- α (Abb. 3-10a) signifikant ($p < 0,0001$) auf $11,11 \pm 1,87$ gesteigert werden, wobei der Mittelwert für unbehandelte Zellen $0,99 \pm 0,07$ betrug. Expression von IL-6 und IL-10 wurde ebenfalls durch LPS-Stimulation signifikant (jeweils $p \leq 0,0001$) von $1,04 \pm 0,09$ auf $148,5 \pm 25,15$ (IL-6) bzw. von $1,05 \pm 0,09$ auf $23,97 \pm 3,09$ (IL-10) induziert, werden. Für IFN- β war ebenfalls ein schwacher Anstieg der Expression von Kontrollwerten bei $1,28 \pm 0,27$ auf $2,31 \pm 0,56$ mit LPS-Stimulation messbar. Die Expression von IFN- α und TGF- β unterschied sich nicht zwischen unbehandelten Zellen mit Mittelwerten von $1,07 \pm 0,17$ (IFN- α) bzw. $1,24 \pm 0,35$ (TGF- β) und Zellen nach LPS-Behandlung mit $1,9 \pm 0,65$ (IFN- α) bzw. $1,43 \pm 0,40$ (TGF- β). Die HGF mRNA-Expression wurde nach LPS-Gabe signifikant ($p = 0,026$) supprimiert mit einem Mittelwert von $0,27 \pm 0,17$ gegenüber Kontrollen mit einem Mittelwert von $0,92 \pm 0,18$.

Durch Bortezomib-Vorbehandlung konnte die LPS-induzierte Expression von TNF- α , IL-6 und IL-10 jeweils signifikant reduziert werden. Mittelwerte der fold changes lagen bei $4,90 \pm 1,87$ (p vs. LPS = 0,005) für TNF- α , bei $2,68 \pm 0,48$ (p vs. LPS < 0,0001) für IL-6-Expression und bei $2,51 \pm 1,28$ (p vs. LPS = 0,0001) für IL-10. Im Gegensatz hierzu wurde die Expression von IFN- α , IFN- β , sowie HGF nach kombinierter Verabreichung von Bortezomib und LPS signifikant auf $9,11 \pm 1,85$ mit p vs. LPS = 0,004 (IFN- α), $10,50 \pm 3,55$ mit p vs. LPS = 0,04 (IFN- β) bzw. $11,43 \pm 3,64$ mit p vs. LPS = 0,022 (HGF) erhöht.

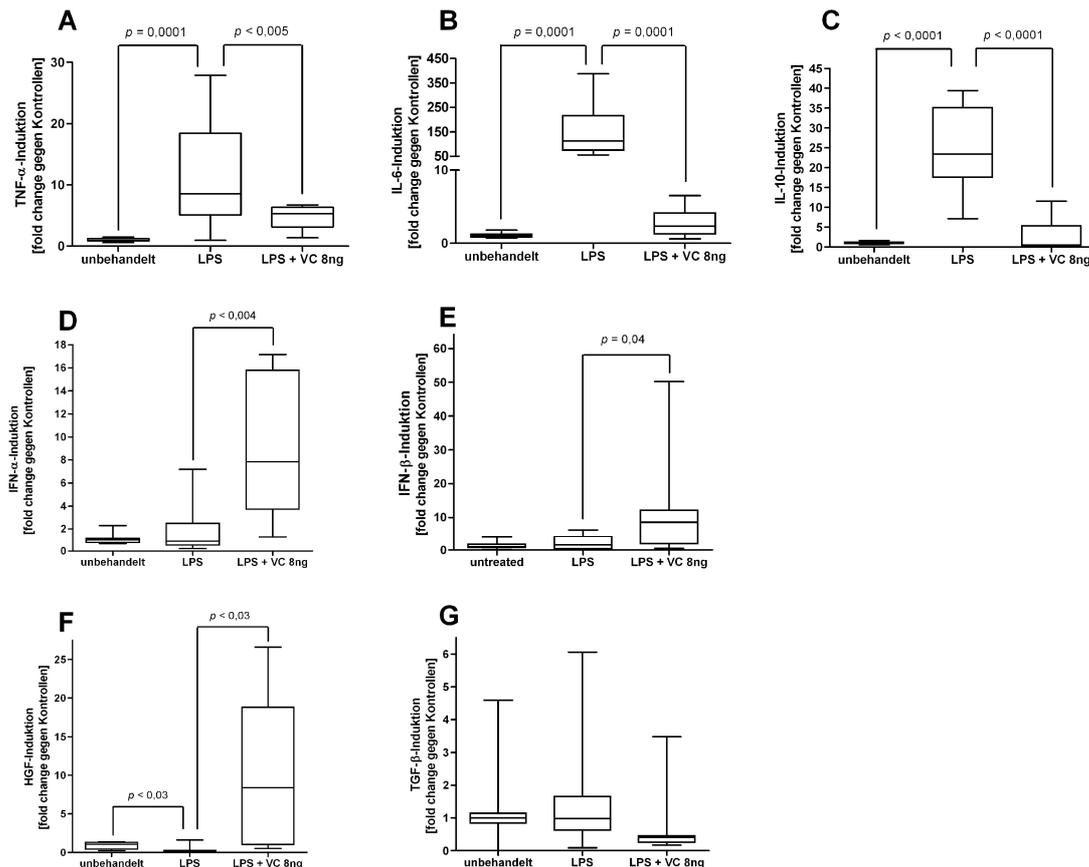


Abb. 3-10: Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in murinen KC.

Bortezomib reduzierte die LPS-induzierte Expression von (A) TNF- α , (B) IL-6 und (C) IL-10, während bei (D) IFN- α , (E) IFN- β und (F) HGF eine erhöhte Genexpression durch Bortezomib zu verzeichnen war. (G) Die TGF- β Expression wurde weder durch LPS noch durch Bortezomib wesentlich beeinflusst. Da bei den *In-vitro*-Experimenten eine großen Anzahl an Einzelwerten ($n=3$, jeweils als Triplet) generiert wurden, sind die Daten als Boxplot (Median, 25%/75%-Perzentil und Wertebereich) dargestellt.

Vergleichbare Resultate konnten in primären humanen Hepatozyten (Abb. 3-11, S.91) für TNF- α und IL-6 erzielt werden. Mittelwerte der fold changes für TNF- α lagen 6h nach LPS-Stimulation bei $83,78 \pm 24,31$ und wurden mit Bortezomib-Gabe bei $14,58 \pm 4,23$ signifikant ($p = 0,003$) reduziert. Expression von IL-6, die 24h nach Zugabe von LPS $26,65 \pm 7,3$ betrug wurde ebenfalls signifikant auf $2,17 \pm 0,3$ ($p = 0,002$) verringert. IL-10 wurde nur in geringen Mengen von humanen Zellen exprimiert. Zum Zeitpunkt 24h nach LPS-Stimulation war dennoch eine Suppression der IL-10-Expression von $2,44 \pm 0,45$ bei reiner LPS-Gabe auf $0,47 \pm 0,16$ ($p < 0,0001$) durch Bortezomib-Applikation möglich.

Entgegen der Experimente in murinen KC wurde die Expression von HGF in humanen Hepatozyten durch Bortezomib gegenüber reiner LPS Stimulation 6h nach Anwendung von $1,57 \pm 0,25$ auf $0,75 \pm 0,1$ ($p = 0,003$) verringert. 24h nach Stimulation war keine Änderung der Expression durch LPS oder Bortezomib erkennbar.

Die TGF- β -Expression wurde durch eine LPS-Stimulation mit einem mittleren fold change von $1,13 \pm 0,11$ (6h) nicht wesentlich gegenüber unbehandelten Kontrollen mit $1,06 \pm 0,07$ beeinflusst. Sechs Stunden nach Stimulation supprimierte Bortezomib signifikant die TGF- β Expression auf $0,73 \pm 0,09$ (p vs. LPS = 0,007), nach 24h Stimulation war dieser Effekt nicht zu beobachten.

Die Interferon-Expression in humanen Hepatozyten war zu schwach ausgeprägt, um eine verlässliche Auswertung mittels qRT-PCR zu ermöglichen (Daten nicht gezeigt).

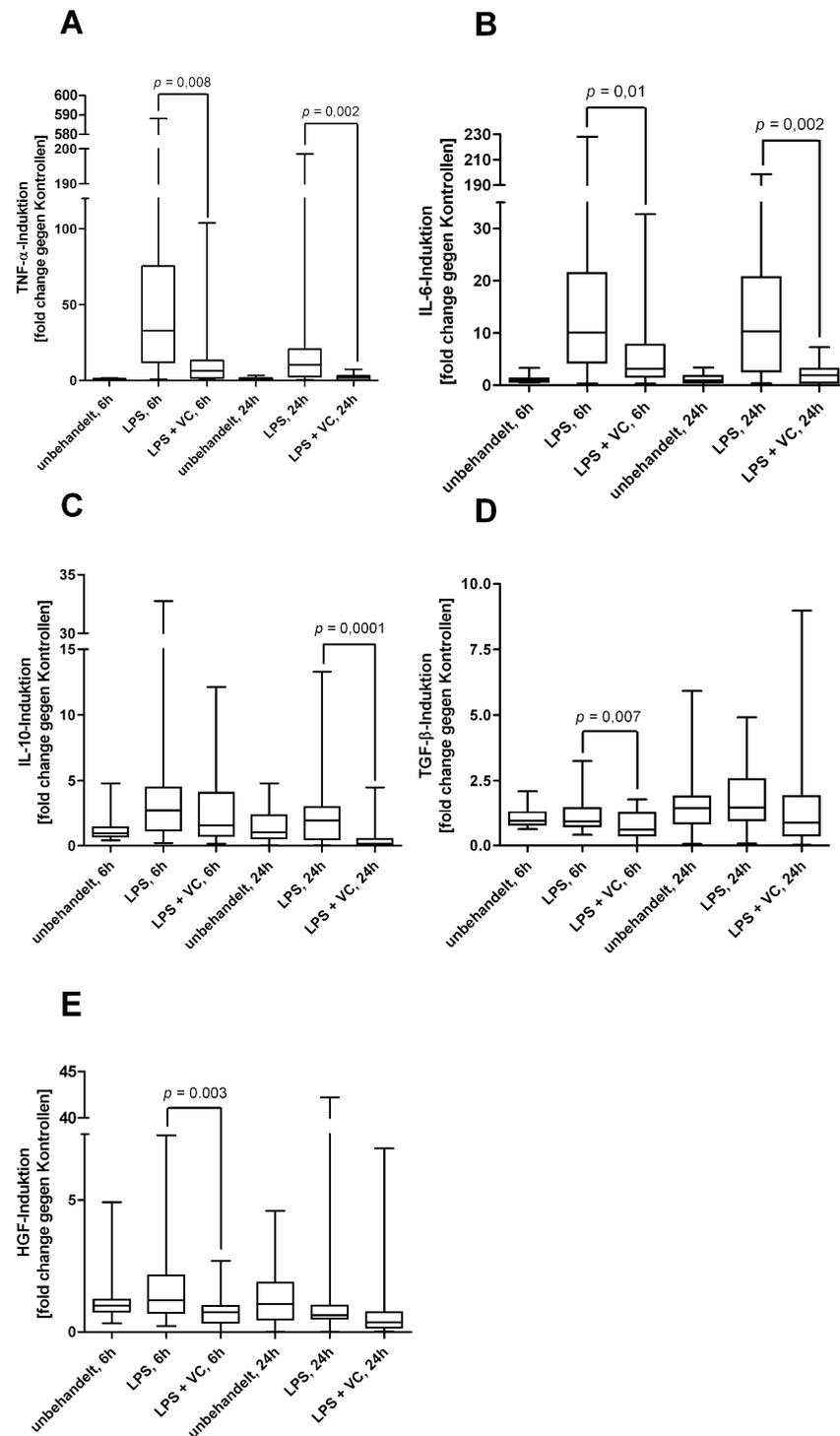


Abb. 3-11: Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in humanen Hepatozyten nach LPS-Stimulation und Bortezomib-Behandlung.

Vergleichbar zu den murinen KC wurden (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-10 und (D) TGF- β nach Bortezomib-Behandlung reduziert exprimiert. Im Gegensatz zu den murinen Zellen zeigte sich eine verringerte Expression von (E) HGF durch Bortezomib.

Zusammenfassend war eine reduzierende Modulation TLR-4-vermittelter, somit NF-KB-abhängiger Genexpression durch Bortezomib evident. Eine Erhöhung der Expression von Interferonen sowie von HGF war nur in KC murinen Ursprungs messbar, nicht jedoch in humanen Hepatozyten.

3.3.3 Messung von kNF-KB

Da der Einfluss von Bortezomib auf die LPS-induzierte mRNA-Expression deutlich ausgeprägt war, sollte die kNF-KB-Konzentration bestimmt werden, die wesentlich für die Regulation TLR-4-vermittelter Genexpression und damit der unter 3.3.2 (S.88) analysierten Gene ist.

Eine Proteinisolation aus murinen Zellen ergab zu geringe Ausbeuten, um über Western Blot, EMSA oder ELISA die Aktivierung bzw. Translokation von NF-KB in den Zellkern verlässlich zu ermitteln (Daten nicht gezeigt).

Obwohl die Menge an humanen Hepatozyten in Kultur deutlich größer war als im Mausmodell, konnten auch hier keine ausreichenden Mengen an Protein für aussagekräftige Untersuchungen isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Um zumindest den Effekt von LPS-Stimulation bzw. Bortezomib-Applikation auf NF-KB indirekt zeigen zu können, wurden daher primäre humane Hepatozyten mit einem Reporterplasmid transfiziert, welches das SEAP-Gen (*secreted alkaline phosphatase*) unter der Kontrolle eines NF-KB-responsiven Promotors enthält.

Ein Kontrollplasmid, welches konstitutiv (also auch ohne LPS-Stimulation) SEAP produziert, wurde in parallel angesetzte Zellkulturen transfiziert, lieferte jedoch im anschließenden Nachweis (Great Escape™ Chemiluminescent Reporter Assay) kein Signal. Die bisherige Datenlage deutet darauf hin, dass die verwendeten Plasmide nicht in die Zellen transfiziert wurden, was an diversen Faktoren, von Plasmidgröße, verwendetem Transfektionsreagenz (Lipofektation) sowie am spezifischen Zelltyp liegen kann. Weitere Versuche, das System zu etablieren sind geplant (z.B. Reporterplasmid, welches konstitutiv fluoreszierende Proteine produziert) und

werden durchgeführt, haben bis zur Fertigstellung dieser Arbeit jedoch keine weiterführenden Ergebnisse erbracht.

3.4 Leberresektion mit kombinierter Bortezomib-Gabe

Da in Zellkultur eindeutig gezeigt werden konnte, dass Bortezomib die Expression NF-KB induzierter Gene reduziert und die Interferon-Expression stimuliert, sollte im Tiermodell der Leberresektion getestet werden, ob ein therapeutischer Ansatz durch Bortezomib-Applikation einen positiven Einfluss auf die Regeneration nehmen kann. Bortezomib wurde den Tieren als Einzeldosis von 150µg in 150µl NaCl 0,9% i.p. injiziert, um eine Inhibierung des NF-KB Signalwegs zu erreichen und hierdurch zu ermitteln, inwiefern eine NF-KB-Aktivität zum Regenerationsprozess nach Leberteileresektion beiträgt.

3.4.1 Überleben nach Resektion mit und ohne Bortezomib-Behandlung

Eine 70%ige Leberresektion führte zu keinerlei Letalität (Abb. 3-12, S.94), während eine Bortezomib-Gabe 24h vor der Operation eine signifikante Mortalität induzierte (12,5% Überleben, n = 8). Eine Verschiebung der Bortezomib-Behandlung auf 1 Woche vor dem chirurgischen Eingriff erhöhte das Überleben der Tiere auf 66,7% (n = 6). Nach Reduktion des Resektionsumfangs auf 30% (83,3% Überleben, n = 5) verbesserte sich die Situation nur marginal. Da die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass Bortezomib den initialen Stimulus zur Regeneration unterbindet, wurde eine Versuchsgruppe erst 24h nach der Operation (70%ige Hepatektomie) mit Bortezomib behandelt. In dieser Gruppe überlebte keines der Tiere (n = 5).

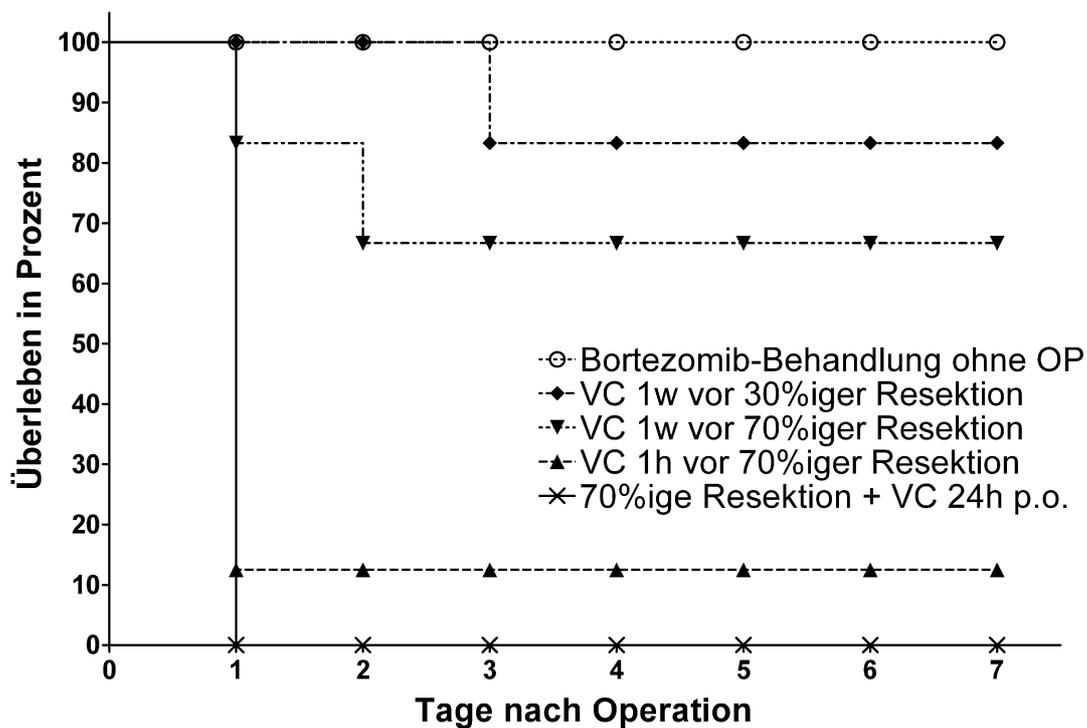


Abb. 3-12: Mortalität nach 30%iger bzw. 70%iger Hepatektomie mit Bortezomib-Behandlung.

Bortezomib erhöhte die Letalität der operativen Eingriffe signifikant. Die Verabreichung einer Einzeldosis Bortezomib ohne Leberresektion war jedoch nicht mit negativen Effekten verbunden. VC: einmalige Bortezomib-Injektion.

Da zum Teil bereits in weniger als 24h nach Operation letale Effekte durch die kombinierte Bortezomib-Applikation und Leberresektion auftraten, waren für weitergehende Untersuchungen statistisch verwertbare Daten nur zu früheren Zeitpunkten nach dem chirurgischen Eingriff ermittelbar. Daher wurden die Untersuchungen zu Serum-Parametern, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und mRNA-Expression an Tieren durchgeführt, die bereits 2h bzw. 6h postoperativ getötet wurden, um Blut sowie Restleber für die Probengewinnung zu entnehmen. Tiere mit 70%iger Hepatektomie ohne Bortezomib-Behandlung werden im Folgenden als H70 bezeichnet (nicht identisch mit R70-Tieren aus 3.1, ab S.63), Tiere mit Bortezomib-Applikation vor 70%iger Leberteilektomie als VC70.

3.4.2 LBW-r nach Resektion mit oder ohne Bortezomib-Applikation

Auf Grund der hohen Sterblichkeit nach Bortezomib-Gabe im Resektionsmodell war eine sinnvolle Auswertung des LBW-r nicht möglich, da der exakte Todeszeitpunkt (zwischen 12h und 24h postoperativ) im Nachhinein nicht feststellbar war und somit eine statistische Auswertung keine verwertbare Aussage erbringen konnte. Zu den frühen Zeitpunkten 2h und 6h nach partieller Hepatektomie war andererseits nicht mit einem messbaren Anstieg des Lebervolumens zu rechnen, wie bereits aus den Versuchen zur Resektion unterschiedlichen Umfangs ersichtlich war (vgl. 3.1.1, S.64).

3.4.3 Leberspezifische Serumparameter nach Bortezomib-Gabe und Leberteileresektion

Um die Leberschädigung zu frühen Zeitpunkten nach einer Resektion zu ermitteln, wurden auch hier Serumparameter analysiert, die spezifisch für einen Gewebsschaden der Leber sind (vgl. 3.1.2, S.65). Nach H70 waren ALT, AST, alkalische Phosphatase, LDH und Bilirubin gegenüber den Kontrolltieren sowohl 2h als auch 6h postoperativ deutlich erhöht (Abb. 3-13, Abb. 3-14, S.96). Serum-ALT betrug in unbehandelten Tieren $46,00 \pm 1,00$ U/ml und stieg in der H70-Gruppe auf $209,7 \pm 23,69$ U/ml (2h) bzw. $630,00 \pm 58,48$ U/ml (6h) an. Nach H70-Hepatektomie lagen AST-Konzentrationen im Serum bei $310,0 \pm 37,63$ U/ml (2h), bzw. $1140,0 \pm 120,6$ U/ml (6h), wobei Kontrollen im Mittel $86,00 \pm 9,00$ U/ml Serum-AST aufwiesen. Sowohl 2h, mit einem Mittelwert von $351,7 \pm 17,57$ U/ml, als auch 6h postoperativ, mit $398,0 \pm 47,27$ U/ml, nach H70-Resektion war für den AP-Serumspiegel nur eine geringfügige Steigerung gegenüber Kontrollen mit $303,5 \pm 4,5$ U/ml messbar. Die Serumkonzentration von LDH war bei Kontrollen durchschnittlich $836,0 \pm 330,0$ U/ml und lag in H70-Tieren 2h nach OP bei $1169,0 \pm 203,6$ U/ml und 6h nach OP bei $2990,0 \pm 841,4$ U/ml. In unbehandelten Kontrolltieren blieben die Serumspiegel von Bilirubin unterhalb der Nachweisgrenze. Zwei Stunden nach H70-Resektion lag die Bilirubin-Konzentration im Mittel bei $0,1 \pm 0,0$ mg/dl, 6h postoperativ bei $1,3 \pm 0,1$ mg/dl. In der VC70-Gruppe waren die Leberenzyme ALT, AST, LDH und Bilirubin im Serum 2h nach dem chirurgischen Eingriff signifikant gegenüber den H70-Tieren

erhöht. Im Einzelnen lagen die Mittelwerte nach VC70-Resektion 2h postoperativ bei $419,6 \pm 70,25\text{U/ml}$ (ALT, p vs. H70 = 0,047), $310,00 \pm 37,63\text{U/ml}$ (AST, p vs. H70 = 0,01), $2119,0 \pm 253,6\text{U/ml}$ (LDH, p vs. H70 = 0,016) und $0,16 \pm 0,024\text{mg/dl}$, (Bilirubin, p vs. H70 = 0,045¹). Sechs Stunden nach der Operation zeigten ALT, AST und LDH ebenfalls eine deutliche Erhöhung in der VC70-Gruppe mit einer mittleren ALT-Konzentration von $922,2 \pm 166,3\text{U/ml}$, $1455,0 \pm 310,4\text{U/ml}$ Serum-AST und einem LDH-Serumspiegel von $3144,0 \pm 630,5\text{U/ml}$. Verglichen mit den H70-Tieren war dieser Unterschied aber jeweils nicht signifikant. Die Bilirubin-Konzentration im Serum war 6h nach VC70-Hepatektomie mit $0,5 \pm 0,084\text{mg/dl}$ signifikant verringert im Vergleich zu der H70-Gruppe ($p = 0,0005$).

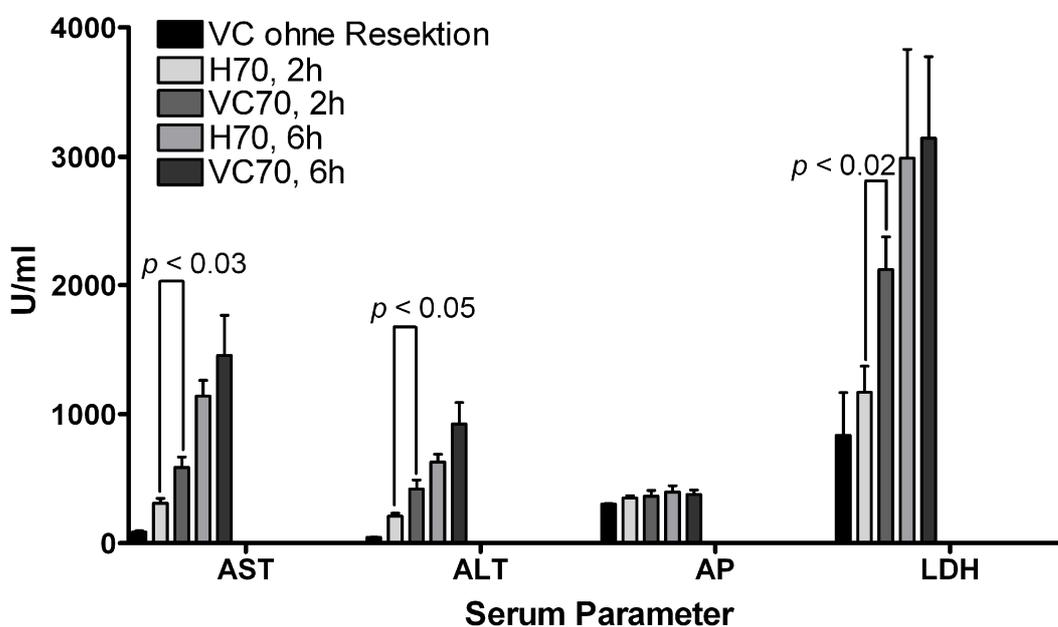


Abb. 3-13: Serum-Parameter als Marker für Leberschädigung.

Bortezomib führte zu einer deutlichen Erhöhung von AST, ALT und LDH nach VC70-Resektion im Vergleich zu H70-Tieren. Der Serum-Spiegel der alkalischen Phosphatase wurde durch Resektion und/oder Bortezomib-Behandlung nicht wesentlich beeinflusst.

¹ Dieser P -Wert wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt, da alle Werte für 2h H70 identisch waren (jeweils genau bei $0,1\text{mg/dl}$) und der Student'sche T-Test daher nicht zulässige Werte ergab. Insofern ist die angegebene Signifikanz nicht mit den anderen angegebenen Signifikanzen gleichzusetzen.

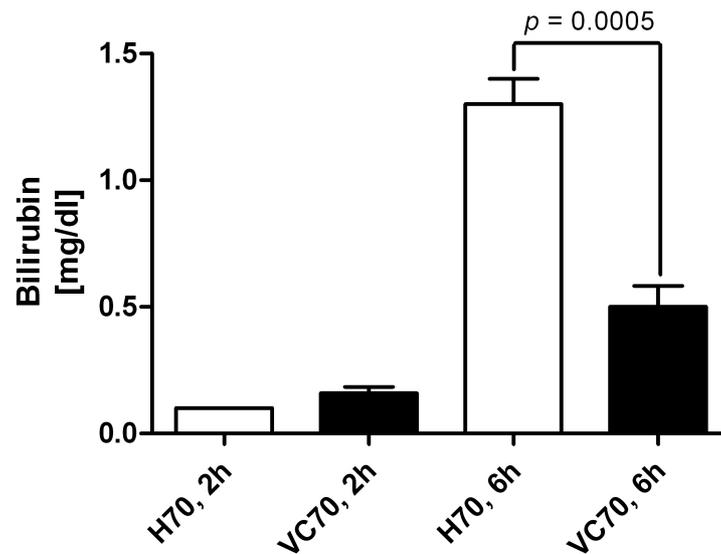


Abb. 3-14: Bilirubin im Serum nach H70- bzw. VC70-Hepatektomie.

6h postoperativ war der Bilirubingehalt im Serum nach VC70- im Vergleich zu H70-Leberresektion signifikant gesenkt.

Zusammengefasst weisen die erhaltenen Daten auf eine verstärkte Gewebeschädigung nach partieller Hepatektomie bei zusätzlicher Verabreichung von Bortezomib hin.

3.4.4 kNF-KB-Konzentration nach H70- bzw. VC70-Leberteileresektion

Nachdem einerseits ein deutlicher Effekt bezüglich des Überlebens VC70-Leberteileresektion durch Bortezomib beobachtbar war und auch eine verstärkte Freisetzung von Markern der Leberschädigung ins Serum messbar war, wurde die Aktivität von NF-KB als mögliche Ursache für die erhöhte Schädigung analysiert. Für die Untersuchung von NF-KB wurde wiederum die Kernfraktion der Proteinpräparate herangezogen, um nur den Anteil von NF-KB zu erfassen, der in den Kern transloziert war (siehe 3.1.3, S.68), im Folgenden als kNF-KB bezeichnet. Gemessene Konzentrationen sind in Abb. 3-15 (S.98) dargestellt.

Die Konzentration von kNF-KB war in H70-Tieren, mit mittleren Werten von $172,9 \pm 68,99 \text{ pg}/\mu\text{g}$ (2h) bzw. $78,6 \pm 53,7 \text{ pg}/\mu\text{g}$ (6h) gegenüber Kontrollen, mit einem Mittelwert von $111,4 \pm 32,7 \text{ pg}/\mu\text{g}$ nicht verändert. VC70-Resektion führte entgegen

den Ergebnissen aus *In-vitro*-Experimenten (3.3, S.85) zu einer geringfügig erhöhten kNF- κ B-Konzentration von $308,0 \pm 167,1 \text{ pg}/\mu\text{g}$ 2h und $184,0 \pm 93,8 \text{ pg}/\mu\text{g}$ 6h nach OP. Durch Verabreichung von Bortezomib vergrößerte sich das Wertespektrum der kNF- κ B-Konzentration zum Zeitpunkt 2h postoperativ auf 0 bis $1021 \text{ pg}/\mu\text{g}$ und 6h postoperativ auf 0 bis $556 \text{ pg}/\mu\text{g}$, wodurch keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte, ob Bortezomib reduzierend oder intensivierend für die Konzentration von kNF- κ B wirkte. Nach Bortezomib-Behandlung ohne chirurgischen Eingriff war eine Erhöhung der kNF- κ B-Konzentration auf $278,9 \pm 103,3 \text{ pg}/\mu\text{g}$ war messbar. Die hier genannten Unterschiede zwischen der H70- und VC70-Gruppe sowie zu den unbehandelten Kontrollen und Tieren mit Bortezomib-Applikation ohne Resektion waren statistisch nicht signifikant. Dies ist vermutlich auf die hohen Standardabweichungen zurückzuführen.

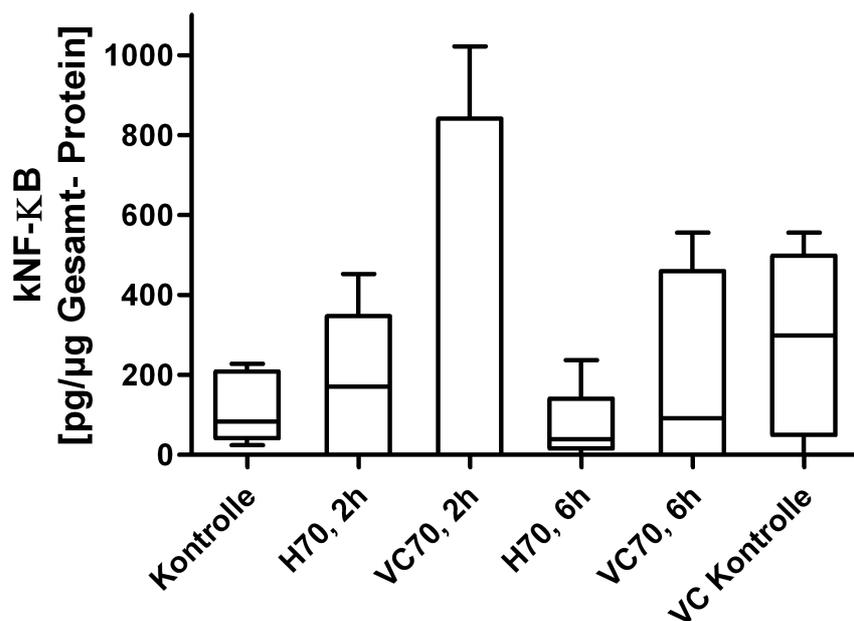


Abb. 3-15: kNF- κ B-Konzentration nach Leberresektion mit Bortezomib-Vorbehandlung.

Wie in den Versuchen zum Resektionsumfang war eine leichte Erhöhung der Konzentration von kNF- κ B nach Resektion messbar. Eine Bortezomib-Behandlung hatte keinen eindeutigen Einfluss auf die kNF- κ B-Menge. Allerdings wurde die Bandbreite der Messwerte deutlich erweitert zu einerseits sehr niedrigen und andererseits sehr hohen Werten.

3.4.5 Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren

Da der Einfluss von Bortezomib-Applikation auf die NF- κ B-Translokation nach Leberresektion unklar blieb, wurde die Expression der bereits in Kapitel 3.1 (S.63) analysierten Gene untersucht, um indirekt Aufschluss über die regulative Aktivität von NF- κ B zu erhalten. Messungen wurden wie unter 3.1.4 (S.71) beschrieben durchgeführt und ausgewertet, erhaltene fold changes sind in Abb. 3-16 (S.101) gezeigt.

Wie bereits in den Experimenten zum Resektionsumfang festgestellt wurde, war 2h und 6h nach H70-Hepatektomie keine Veränderung in der Expression von TNF- α (Abb. 3-16a) erkennbar. Unbehandelte Kontrollen lagen bei $1,12 \pm 0,29$, wobei die Mittelwerte 2h $0,96 \pm 0,29$ bzw. 6h nach H70 $1,18 \pm 0,38$ betragen. Nach VC70 wurde die TNF- α Expression 2h postoperativ auf $4,14 \pm 2,22$ induziert, war jedoch nicht signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Zum Zeitpunkt 6h nach VC70-Resektion wurde mit einem mittleren fold change von $1,5 \pm 0,32$ kein Anstieg der Expression beobachtet.

Für IL-6 (Abb. 3-16b) war wiederum eine schwache Erhöhung der Expression zum Zeitpunkt 2h auf $32,2 \pm 17,2$ und 6h auf $19,4 \pm 7,3$ nach H70 messbar, wobei Kontrollen durchschnittlich bei $0,92 \pm 0,11$ lagen. Eine VC70-Resektion führte 2h postoperativ, mit einem mittleren Wert von $151,8 \pm 43,4$, zu einer signifikant ($p = 0,023$) stärkeren Induktion der IL-6 Expression. Sechs Stunden nach VC70-Hepatektomie war die mittlere Expression von IL-6 weiter erhöht auf $306,9 \pm 121,5$, mit $p = 0,065$ jedoch nicht signifikant gegenüber H70-Tieren.

Nach H70-Resektion wurde die Expression von IL-10 2h nach dem chirurgischen Eingriff induziert auf $20,4 \pm 7,1$, wobei der Mittelwert in Kontrollen $1,1 \pm 0,3$ betrug. Nach 6h war in der H70-Gruppe mit $2,1 \pm 0,5$ keine Erhöhung gegen Kontrollen beobachtbar. Eine VC70-Hepatektomie führte zu einer deutlichen Zunahme der IL-10-Expression auf $94,7 \pm 77,0$, wobei dieser Effekt nicht signifikant war. Sechs

Stunden postoperativ war ebenfalls ein schwacher Anstieg der IL-10-Expression in VC70-Tieren messbar, mit einem Durchschnitt von $6,8 \pm 1,5$.

Die Expression von IFN- α unterschied sich sowohl 2h, mit $0,7 \pm 0,2$, als auch 6h nach H70-Resektion, mit $0,68 \pm 0,19$, nicht von Kontrolltieren, mit einem Mittelwert von $1,1 \pm 0,3$. Eine VC70-Hepatektomie führte zu einem signifikanten Anstieg der IFN- α -Expression zum Zeitpunkt 2h, auf $1,98 \pm 0,36$ (p vs. H70 = 0,018) und zum Zeitpunkt 6h auf $1,53 \pm 0,26$ (p vs. H70 = 0,047).

HGF wurde gegenüber Kontrollen mit $1,03 \pm 0,14$ nach H70-Resektion leicht erhöht auf $1,9 \pm 0,3$ exprimiert ($p = 0,048$). Sechs Stunden postoperativ war dieser Anstieg mit $6,8 \pm 3,7$ deutlicher, jedoch nicht signifikant. In VC70-Tieren war die HGF-Expression 2h nach dem chirurgischen Eingriff bei $2,1 \pm 0,33$ unverändert verglichen mit H70, während 6h postoperativ eine geringfügige Reduktion auf messbar war $3,1 \pm 1,15$ (n.s.).

Die TGF- β -Expression war 2h nach H70-Resektion leicht erhöht auf $4,2 \pm 0,5$, 6h nach Resektion mit $2,0 \pm 0,6$ allerdings nicht von der Expression in Kontrolltieren unterscheidbar, deren Mittelwert bei $1,1 \pm 0,3$ lag. Durch VC70-Hepatektomie wurde die Expression von TGF- β 2h nach dem chirurgischen Eingriff signifikant auf $7,4 \pm 1,1$ ($p = 0,03$), 6h danach tendenziell ($p = 0,06$) auf $8,1 \pm 2,5$ verstärkt.

Weiterhin wurde versucht, die Expression von TGF- α sowie IFN- β zu ermitteln. TGF- α und IFN- β wurden jedoch in so geringem Ausmaß exprimiert, dass eine sinnvolle Auswertung nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

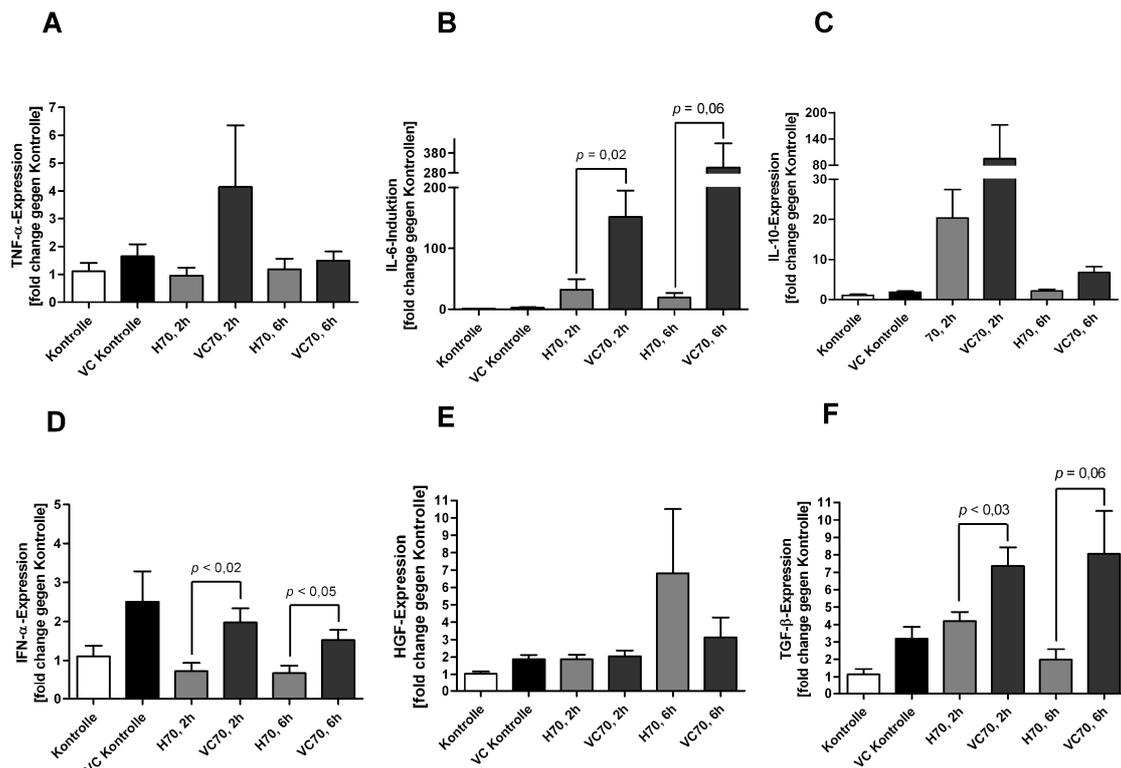


Abb. 3-16: Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren nach H70- bzw. VC70-Hepatektomie.

(B) IL-6, (C) IL-10, (D) IFN- α und (F) TGF- β Expression wurden durch Bortezomib nach Resektion signifikant erhöht. (A) TNF- α und (E) HGF Expression wurden sowohl durch Leberteilresektion als auch durch Bortezomib kaum beeinflusst. Wie aus Abb. 3-4 (S.74) ersichtlich wurde, änderte sich die Expression dieser Gene verstärkt zu späteren Zeitpunkten.

Entgegen den *In-vitro*-Ergebnissen war im Tiermodell der Leberresektion keine Verringerung der Expression der progenerativen Gene (TNF- α , IL-6, IL-10) durch Bortezomib-Behandlung messbar. Ein Anstieg dieser mRNAs, genauso wie bei TGF- β und IFN- α , weist auf verstärkte Gen-Induktion hin, die dem erwarteten inhibierenden Effekt von Bortezomib entgegenlief. Dies ist konsistent mit Ergebnissen, die in einem Mausmodell des Myocard-Infarktes mit NF- κ B-Blockierung ermittelt wurden (Kawano et al. 2006). Hier war eine Zunahme der Zytokin-Expression durch NF- κ B-Inhibition beobachtet worden.

3.4.6 Expression apoptoserelevanter Gene

Nachdem die beschriebenen negativen Effekte beobachtet wurden, sollte nach Hinweisen auf die Ursache der erhöhten Mortalität gesucht werden. In Patienten ist

ein akutes Versagen der Leber meist mit massivem Zelltod und bei Vergiftungen z.B. durch Paracetamol oder Amanita besonders mit vermehrten apoptotischen Prozessen verbunden (Bechmann et al. 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Bortezomib Hepatomzelllinien für apoptotische Signale über TRAIL sensibilisiert (Koschny et al. 2007). Daher wurden zunächst Marker für Apoptose auf Ebene der mRNA-Expression im Lebergewebe untersucht. Im Einzelnen waren dies die Todesrezeptoren CD95/FAS, DR5 (in *Rattus norvegicus* als TNFR1b bezeichnet), die Gene PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) und NOXA (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*), welche bei intrinsischer Apoptose bereits früh nach Induktion der Apoptose als mRNA messbar sind (Nakano et al. 2001; Oda et al. 2000), sowie der anti-apoptotische Faktor Bcl-2. Berechnete fold changes sind in Abb. 3-17 (S.103) dargestellt.

Im Vergleich zu Kontrollen, bei $1,5 \pm 0,2$, wurde die CD95/Fas-Rezeptor-Expression (Abb. 3-17a) sowohl in H70- als auch VC70-Tieren 2h nach der Resektion signifikant supprimiert auf $0,27 \pm 0,05$ (H70, $p = 0,02$) bzw. $0,29 \pm 0,07$ (VC70, $p = 0,0002$). Sechs Stunden postoperativ war die Expression in der H70-Gruppe mit einem Mittelwert von $1,2 \pm 0,6$ nur leicht verringert, wobei in der VC70-Gruppe weiterhin eine signifikante Suppression gegenüber Kontrollen, bei $0,5 \pm 0,14$ (p vs. Kontrolle = 0,004), beobachtet wurde.

Die Expression von TNFR1b (entspricht dem humanen Death Receptor 5, Abb. 3-17b) war mit mittleren Werten von $2,3 \pm 0,3$ nach H70-Resektion unverändert gegenüber Kontrolltieren, mit einem Mittelwert von $1,8 \pm 0,3$. VC70-Hepatektomie führte zu einem deutlichen, allerdings nicht signifikanten Anstieg der Expression 2h postoperativ auf $6,0 \pm 2,6$. Diese erhöhte Expression nach VC70 war auch 6h nach Resektion zu beobachten, allerdings in geringerem Ausmaß und ebenfalls nicht signifikant, bei $4,3 \pm 1,8$. H70-Tiere zeigten ebenfalls einen geringen, nicht signifikanten Anstieg 6h postoperativ, bei durchschnittlichen Werten von $3,1 \pm 0,8$.

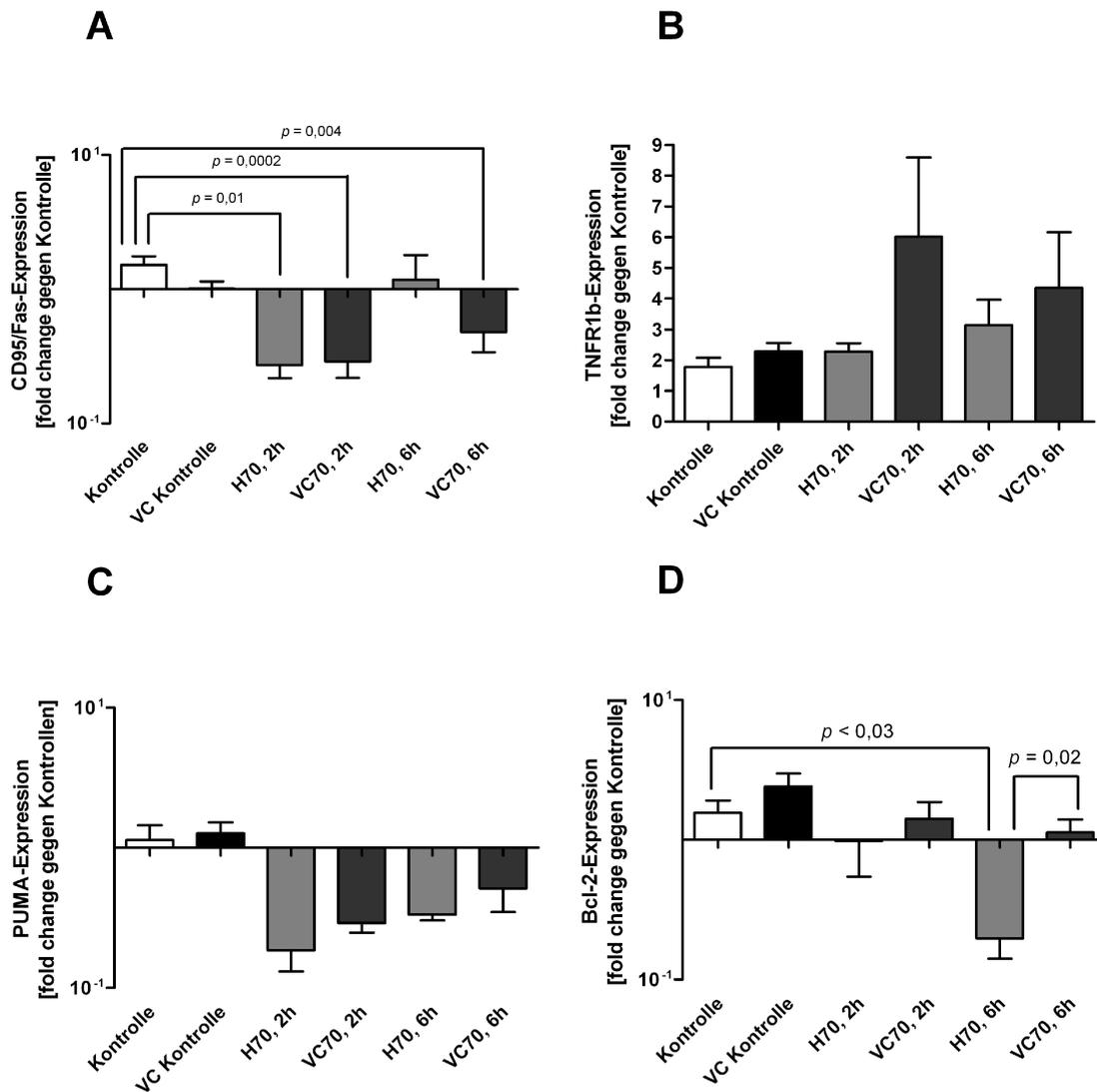


Abb. 3-17: mRNA-Expression für Apoptose-relevante Gene in Ratten nach H70- bzw. VC70-Leberteilresektion.

Angegeben sind jeweils fold changes in der Expression gegenüber unbehandelten Tieren. Bortezomib-Kontrolle: Tiere erhielten Bortezomib, jedoch keine Resektion; 70%: 70% Resektion ohne Bortezomib-Behandlung; 70% + Bortezomib: Leberteilresektion mit Bortezomib-Behandlung 1h pre-operativ.

Zu den untersuchten Zeitpunkten wurde die PUMA-Expression (Abb. 3-17c) in H70-Tieren, mit Mittelwerten von $0,19 \pm 0,05$ (2h) bzw. $0,33 \pm 0,03$ (6h), im Vergleich zu den Kontrolltieren supprimiert, die bei $1,1 \pm 0,3$ lagen. Nach VC70-Resektion unterschied sich die PUMA-Expression mit $0,29 \pm 0,04$ (2h) bzw. $0,5 \pm 0,17$ (6h) nicht wesentlich von der H70-Gruppe.

Die Bcl-2-Expression (Abb. 3-17d) war 6h nach H70-Hepatektomie bei durchschnittlich $0,2 \pm 0,06$ im Vergleich zu Kontrolltieren $1,6 \pm 0,3$ reduziert ($p = 0,02$). Nach VC70-Resektion entsprach Expression von Bcl-2 mit einem Mittelwert von $1,1 \pm 0,3$ 6h postoperativ der in Kontrolltieren. Zwei Stunden nach H70- oder VC70-Resektion war keine Veränderung der Bcl-2-Expression gegenüber Kontrollen erkennbar, wobei die Mittelwerte bei $0,98 \pm 0,44$ (H70) bzw. $1,4 \pm 0,45$ (VC70) lagen.

Die für NOXA gemessene Expression war generell zu gering, um eine verlässliche Auswertung durchzuführen (Daten nicht gezeigt).

Grundsätzlich wurden alle genannten Gene, die für Apoptoseprozesse relevant sind, nur in sehr geringen Mengen exprimiert. Beobachtete Veränderungen in der Expression von Todesrezeptoren und frühen Apoptosemarkern durch VC70-Hepatektomie sprechen gegen eine wesentliche Beteiligung apoptotischer Mechanismen an der hohen Mortalität der Versuchstiere.

3.4.7 Serum M30-Freisetzung nach Resektion und Bortezomib-Behandlung

Da die Expression von Todes-Rezeptoren und frühen Genen der intrinsischen Apoptose (PUMA, NOXA) nur ein möglicher Hinweis für eine ablaufende Apoptose ist, wurde zusätzlich die M30-Konzentration im Serum der Tiere ermittelt. M30 stellt ein Caspase-3 oder -8 gespaltenes Cytokeratin-18 [CK-18]-Fragment dar, wobei das vom Antikörper gebundene Epitop nur durch Caspase-Spaltung zugänglich wird. Eine Freisetzung dieses CK-18-Fragmentes ins Serum tritt nur bei Apoptose auf, somit kann M30 bzw. Caspase gespaltenes CK-18 als indirekter Marker ablaufender Apoptose bestimmt werden (Feldstein et al. 2009; Wieckowska et al. 2006).

Im verwendeten M30-ELISA war die Konzentration des CK-18-Fragments aller Seren, unabhängig von Bortezomib-Applikation unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

Zusammengenommen weisen die Expression Apoptose-relevanter Gene und der systemische Apoptosenachweis über M30 darauf hin, dass die Apoptose für eine Leberschädigung durch Bortezomib eine untergeordnete Rolle spielt.

3.4.8 Hypoxie-bezogene Genexpression

Nachdem die Apoptose für die Bortezomib-induzierte Mortalität anscheinend keine oder nur geringe Relevanz hatte, sollte als nächstes ein möglicher Hypoxie-Schaden untersucht werden. HIF (*hypoxia inducible factor*)-Aktivität wird durch Phosphorylierung, Ubiquitinylierung durch das Von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) und anschließenden Abbau von HIF1 α über das Proteasom determiniert. Eine Blockade des Proteasoms kann daher zu HIF Akkumulation und damit zu konstitutiver Aktivität von HIF führen, trotz normoxischer Bedingungen, Phosphorylierung und anschließender Ubiquitinylierung durch das pVHL. Andererseits wird die Expression von HIF1 α durch NF-KB reguliert. Eine reduzierte Verfügbarkeit von HIF nach Resektion durch die Bortezomib-Behandlung wäre eine weitere mögliche Erklärung für die geringe Überlebensrate der Versuchstiere. Daher wurde die Expression von HIF1 α selbst sowie die von VEGF untersucht, einem der wichtigsten durch HIF1 α regulierten Wachstumsfaktoren.

Nach H70-Resektion war eine leicht erhöhte Expression von HIF1 α (Abb. 3-18a) von $1,5 \pm 0,13$ (2h) bzw. $3,4 \pm 1,3$ (6h) gegenüber Kontrollen mit $1,0 \pm 0,08$ detektierbar. Ein Anstieg der HIF1 α -Expression auf $3,2 \pm 0,4$ war auch durch Bortezomib-Gabe ohne Resektion beobachtbar. VC70-Hepatektomie führte nicht zu einer Änderung der HIF1 α -Expression, mit Mittelwerten von $2,0 \pm 0,6$ 2h postoperativ bzw. $3,5 \pm 0,8$ 6h postoperativ, im Vergleich zur H70-Gruppe.

Die VEGF-Expression war weder nach H70- noch nach VC70-Resektion mit und ohne Bortezomib-Behandlung nicht von der Expression in Kontrolltieren, die bei $1,0 \pm 0,12$ lag, zu unterscheiden. Die Mittelwerte der VEGF-Expression für H70 waren $1,3 \pm 0,24$ (2h) bzw. $1,0 \pm 0,12$ (6h). Die durchschnittliche Werte in VC70-Tieren betragen $1,12 \pm 0,27$ 2h postoperativ und $0,94 \pm 0,25$ 6h postoperativ. Nach einer

Bortezomib-Gabe ohne Resektion war die VEGF-Expression auf $3,2 \pm 0,37$ erhöht, dieser Anstieg war hochsignifikant gegenüber Kontrollen ($p = 0,005$).

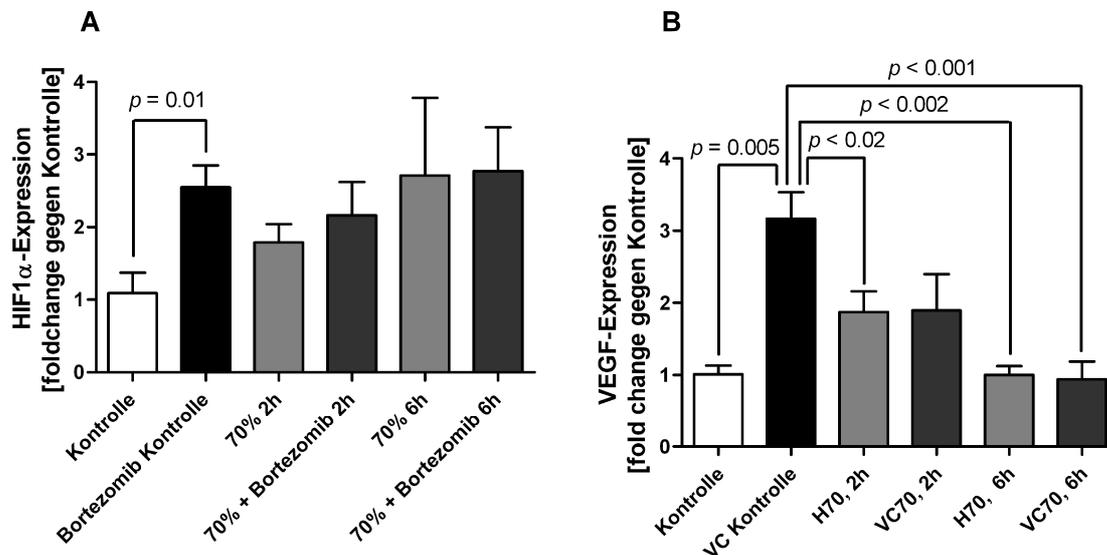


Abb. 3-18: Expression von HIF1 α und VEGF nach H70- bzw. VC70-Resektion.

HIF1 α -Expression änderte sich nur in geringem Ausmaß durch H70- oder VC70-Hepatektomie. (A) Eine Bortezomib-Applikation alleine erhöhte die HIF1 α -Expression signifikant gegen Kontrollen. (B) Weder H70- noch VC70-Resektion hatte einen wesentlichen Einfluss auf die VEGF Expression. Bortezomib alleine induzierte VEGF in signifikantem Umfang.

3.4.9 HIF-Aktivierung

Die HIF1 α -Aktivität kann nicht ausschließlich über Expression nachgewiesen werden. Da jedoch sowohl die HIF1 α -Expression als auch ein wesentliches Zielgen HIF-regulierter Genexpression, VEGF, alteriert waren, wurde versucht, den Status des HIF1 α -Proteins zu ermitteln. Hierzu wurden Proteinpräparate aus Lebergewebe der Versuchstiere mittels Western Blot auf HIF1 α und die phosphorylierte Form von HIF1 α untersucht (Abb. 3-19, S.107). Es war jedoch keine Akkumulation von HIF1 α oder phospho-HIF1 α in H70- oder VC70-Tieren detektierbar.

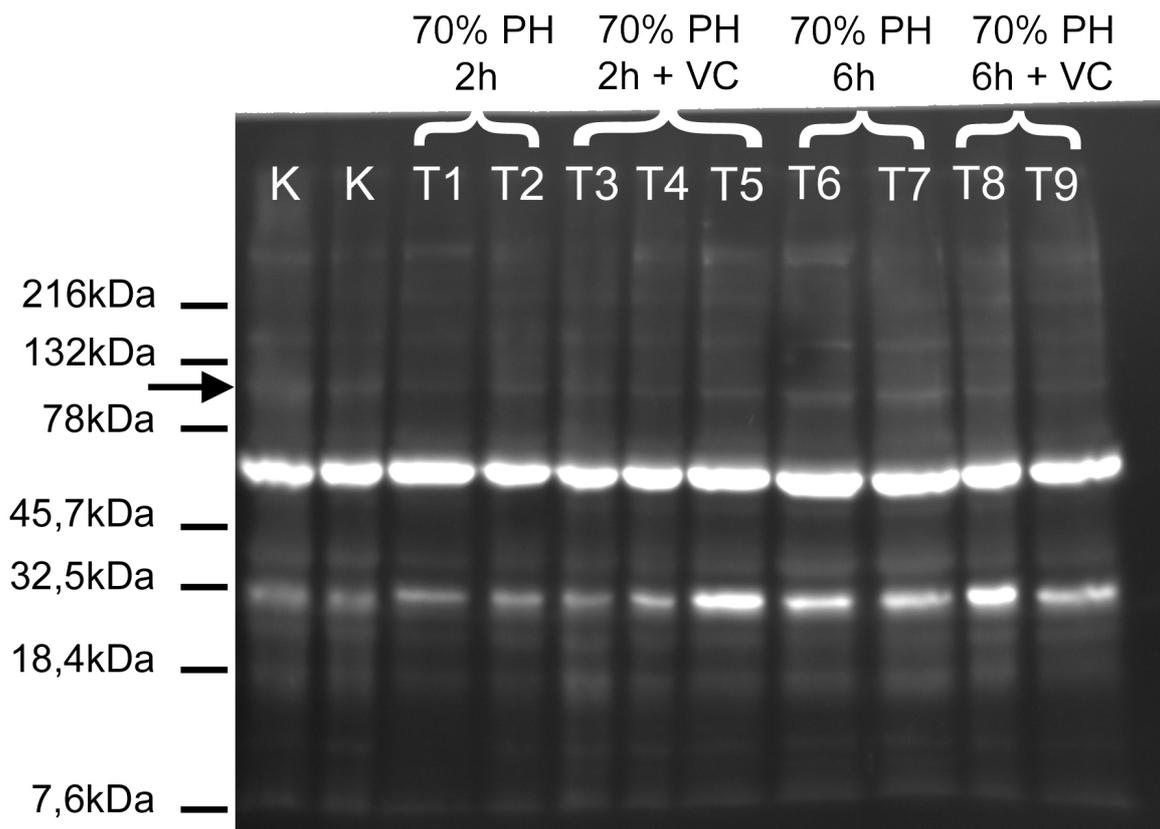


Abb. 3-19: Western Blot für Phospho-HIF1 α .

Gezeigt sind Proteinisolate nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE), anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran und Inkubation mit phospho-HIF1 α -Antikörper. Sofern das HIF-Protein selber gebunden würde, wäre ein Signal auf Höhe des Pfeils erkennbar. Die beiden deutlichen Banden bei 60kDa und 30kDa sind unspezifische Signale. K: Kontrolltiere; T1-9: Versuchstiere; VC: Bortezomib-Applikation; 2h/6h: Zeitpunkt nach OP.

Abschließend kann auch eine HIF-Regulation als wesentlicher Faktor für die Mortalität nach VC70Hepatektomie ausgeschlossen werden, da offensichtlich keine Akkumulation von HIF durch die Blockierung des Proteasoms auftritt. Bemerkenswert ist vor allem, dass HIF induzierte Expression ausschließlich bei Tieren ohne Resektion durch Bortezomib moduliert wird, während dieser Effekt nach Hepatektomie ausbleibt.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass einerseits der Resektionsumfang bei Leberteilresektionen einen Einfluss auf die molekularen und zellulären Mechanismen der Regeneration hatte. Dies schloss die Kernlokalisierung bzw. Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die Genregulation der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- β und der Wachstumsfaktoren HGF, TGF- α und TGF- β sowie generellen Zelltod ein. Eine pharmakologische Modulation dieser Prozesse durch eine orale Glycinapplikation war möglich, wobei die Schädigung der Leber vermindert und die STAT3-Phosphorylierung unterbunden wurden, wobei nur eine geringe Auswirkungen auf die Zytokin-Expression auftrat. Der exakte Mechanismus durch den die Glycin-abhängigen Effekte vermittelt wurden blieb jedoch unklar.

Weiterhin konnten TLR-4-vermittelte Reaktionen durch Proteasom-Inhibition mittels Bortezomib *in vitro* moduliert werden. Eine entzündungsfördernde wie auch proregenerative Zytokinproduktion konnte unterbunden werden.

Im Tiermodell der Leberteilresektion war die Bortezomib-Applikation letal, wobei weder eine Verminderung proregenerativer Zytokinproduktion, verstärkte Apoptose oder Hypoxie-Schädigung in der Leber als zentraler Mechanismus messbar war. Der Einfluss von NF- κ B abhängiger Regulation im Rahmen der Leberteilresektion war durch die Bortezomib-vermittelte Proteasom-Inhibition nicht aufzuklären.

4. Diskussion

Die Leberresektion stellt eine wesentliche kurative Option für verschiedene Tumoren der Leber wie das hepatozelluläre Karzinom (HCC) oder das cholangiozelluläre Karzinom (CCC), sowie für Leber-Metastasen anderer Tumor-Entitäten dar. Hierbei wird die außerordentliche Fähigkeit der Leber ausgenutzt, Gewebe zu regenerieren und damit die Organleistung an den Bedarf des Organismus anzugleichen. Vergleichbar einer 50%igen Hepatektomie ist der chirurgische Eingriff, der für eine Leberlebendspende beim Spender durchgeführt wird (Trotter et al. 2002; Florman & Miller 2006). Auch hier muss sowohl bei Spender, wie auch Empfänger das Organ durch kompensatorische Hypertrophie der verbliebenen bzw. transplantierten Leberlappen die individuell notwendige Masse an Gewebe regenerieren.

Grundsätzliche Mechanismen der Regeneration sind bekannt und wurden bereits Ende der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts beschrieben (Fausto 1991; Fausto et al. 2006). Hierzu zählen die Zytokinsekretion von KC und Hepatozyten und die Aufhebung des Zellzyklus Arrests in der G₀-Phase der Hepatozyten, so dass diese proliferieren können (1.3, S.16). Allerdings fehlt nach wie vor ein Verständnis der exakten molekularen Abläufe unter verschiedenen Bedingungen der Leberschädigung. So ist z.B. der initiale Stimulus unbekannt, der für die Zytokinproduktion und -sekretion der KC entscheidend ist, wobei endogenes Endotoxin von kommensalen Bakterien, das aus den Verdauungsorganen in die Leber gelangt zur Debatte steht. Die Daten hierzu sind jedoch widersprüchlich (Cornell 1985b; Cornell et al. 1990; Shiratori et al. 1995; Webber et al. 1998; Campbell et al. 2006; Xu et al. 2008; Zhai et al. 2008). Darüber hinaus ist unklar, welchen Anteil das angeborene Immunsystem in der Leberregeneration hat, insbesondere TLR-4 und der hiervon aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B, auf denen das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag. Auch hier existieren Daten, die auf der einen Seite NF- κ B-Aktivierung für essentiell zur Regeneration ansehen (Yamada et al. 1997; Fausto et al. 2006; Abshagen et al. 2007), andererseits scheint

NF- κ B zu intensivierter Leberschädigung nach Ischämie/Reperfusion bzw. im Modell der CCL4-vermittelten Leberschädigung beizutragen (Shen et al. 2007; Zhai et al. 2004; Luedde et al. 2005; Serracino-Inglott et al. 2001; Beraza et al. 2007; Xu et al. 2005; Son et al. 2007) und nicht zwingend für Leberregeneration erforderlich zu sein (Laurent et al. 2005).

Des Weiteren stellen bereits geringfügige Leberschäden bei Resektionspatienten ein zum Teil erhebliches Risiko dar, das Morbidität und Mortalität nach derartigen Eingriffen deutlich erhöht. Zirrhosen und Steatosen gelten gemeinhin als Ausschlusskriterien sowohl für Resektionen, wie auch für Leber-Lebendspender. Die Mechanismen, die zu dem deutlich verschlechterten klinischen Verlauf in diesen Fällen führen, sind bislang kaum verstanden. In derartigen Situationen wäre eine pharmakologische bzw. medikamentöse Unterstützung der Leberregeneration wünschenswert, um den postoperativen Verlauf zu verbessern oder um den operativen Eingriff bei Patienten durchführen zu können, die für diesen auf Grund von Gewebeschäden oder Lebererkrankungen in fortgeschrittenen Stadien nicht in Frage kämen. Allerdings wurden hierzu bislang nur wenige Studien durchgeführt.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, einen näheren Einblick in die der Leberregeneration zu Grunde liegenden Prozesse zu erhalten und die möglichen Optionen einer pharmakologischen Supplementation der Regeneration zu evaluieren. Hierzu wurden verschiedene Resektionsmodelle mit und ohne pharmakologische Behandlung herangezogen und molekulare Prozesse analysiert, wobei der Fokus auf dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, den hiervon regulierten Zytokinen sowie dem TLR-4-System lag.

4.1 Kritische Betrachtung der verwendeten experimentellen Modelle und Nachweismethoden

Bei den verwendeten Resektionsmodellen handelt es sich einerseits um etablierte Systeme, um Hepatektomien darzustellen (Higgins & Andersson 1931), andererseits

stellt speziell das 90%ige Resektionsmodell eine sehr umfangreiche Beeinträchtigung der Organintegrität dar (Bockhorn, Schollmann et al. 2007; Sowa et al. 2008), die bei Patienten in dieser Form nicht durchgeführt werden könnte. Ein wesentlicher Unterschied ist hierbei, dass Nagetiere, wie die von uns verwendeten Ratten, auch umfangreiche Resektionen ohne größere gesundheitliche Probleme überstehen können, was unter anderem aus dieser Arbeit ersichtlich wurde. Im Gegensatz dazu stellt selbst eine 50%ige Resektion ein nicht unerhebliches Risiko für gesunde Menschen dar (Erim et al. 2006; Florman & Miller 2006; Kassahun et al. 2006). Die deutlich erweiterten Resektionsmodelle in Ratten sind daher eingeführt worden, um dem erhöhten Risiko von Morbidität und Mortalität in humanen Patienten bei Vorschädigung der Leber durch Erkrankungen Rechnung zu tragen. Allerdings stellen sie kein genaues Abbild der bei Patienten verwendeten Resektionsmethoden dar. Im Gegensatz hierzu sind Messungen zu Leberfunktion und Leberschädigung über etablierte Serum-Parameter als Äquivalent zu betrachten. Es wird davon ausgegangen, dass Serum-Konzentrationen von ALT und AST sowohl bei Nagern als auch im humanen Organismus den Gewebeschaden in der Leber abbilden, wohingegen Bilirubin und AP Aufschluss über die Synthese-Leistung der Leber geben können (Fevery et al. 1972; Kuramitsu et al. 1985; Pol et al. 1988; Yang et al. 2009). Unterschiedliche Regulation und Struktur, trotz vermutlich hoher Konservierung der genannten Enzyme (Kuramitsu et al. 1985), zwischen den Spezies könnten hier dennoch zu falschen Schlüssen führen, wenn Tiermodelle nicht in einen sinnvollen Bezug zum humanen System gesetzt werden. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass die Bestimmung der Serum-Konzentrationen an Hand diagnostischer Standardmethoden im Universitätsklinikum Essen valide Messungen, auch im Rattenmodell, erlauben (Benko et al. 2010).

Der relativ kurz erscheinende Beobachtungszeitraum von 7 Tagen wurde gewählt, da vor allem bezüglich der molekularen Prozesse keine wesentlichen Erkenntnisse zur Regeneration nach Tag 5 erwartet wurden, was die initialen Mechanismen anlangt. Die initialen Signalkaskaden und die Zytokinproduktion laufen bereits wenige Stunden nach Resektion ab und Proliferation von Hepatozyten setzt 12-24h postoperativ ein (Fausto et al. 2006) wodurch in Nagetieren ca. 5 Tage nach Operation ein Großteil der ursprünglichen Lebermasse wiederhergestellt ist

(Michalopoulos & DeFrances 1997; Duncan et al. 2009). Dies war auch in vorher durchgeführten Studien im verwendeten Resektionsmodell zu beobachten (Bockhorn, Goralski et al. 2007; Bockhorn, Schollmann et al. 2007). Die ursprüngliche Lebermasse war, vor allem im R90-Modell, 7d postoperativ noch nicht erreicht und vermutlich waren die Prozesse zur Wiederherstellung der Leberarchitektur noch nicht abgeschlossen. Da jedoch aus oben genannten Gründen wesentliche Erkenntnisse zu den Fragestellungen der vorliegenden Arbeit aus einem verlängerten Beobachtungszeitraum nicht erwartet wurden, wurde darauf verzichtet Tiere länger als 7 Tage zu beobachten. Weiterhin sind die erhaltenen Daten jeweils als kurzer Ausschnitt der ablaufenden Prozesse zu betrachten. Eine vollständige Kinetik der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, Zytokinexpression, Zelltod und weiterer Parameter nach Leberteileresektion war jedoch nicht zu erreichen, da die verfügbare Anzahl an Versuchstieren begrenzt war.

Als Kontrollen zu den Resektionsexperimenten dienten unbehandelte Tiere, die keine Resektion, keine pharmakologische oder anderweitige Behandlung erhielten. Es wurden auch Sham-Operationen durchgeführt, wobei die Leber vom Operateur mobilisiert wurde, um die Bewegungen während einer Resektion zu imitieren. Dies erwies sich insofern problematisch, als die Mobilisierung zu deutlich verstärkter Zytokin-Expression und erhöhten Konzentrationen der Serum-Parameter für Leberschädigung führte, ein Effekt der bereits früher beschrieben wurde (Schemmer, Enomoto et al. 2001; Schemmer et al. 1998). Eine Verwendung dieser Daten als Kontrolle musste daher ausgeschlossen werden.

Um die Regeneration nach Leberteileresektion besser zu verstehen, wurden die Aktivität ausgewählter Transkriptionsfaktoren, die Expression bekannter Zytokine und Wachstumsfaktoren, Zelltod bzw. Apoptose sowie Serumparametern der Leberfunktion bzw. der Leberschädigung untersucht. Speziell wurden die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3 analysiert, die relativ kurz nach dem chirurgischen Eingriff aktiviert werden und wesentliche Zytokine sowie Wachstumsfaktoren für den Ablauf der Regeneration regulieren (Fausto 1991; FitzGerald et al. 1995; Seki et al. 2005; Fausto et al. 2006). Zielgene dieser

Transkriptionsfaktoren beinhalten u.a. die Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- β sowie die Wachstumsfaktoren HGF, TGF- α und TGF- β deren Transkription ebenfalls in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Einerseits bietet die Analyse dieser Zielgene mittels quantitativer Real-time-PCR die Möglichkeit, die transkriptionelle Regulation zu erfassen, was einen Rückschluss auf die beteiligten Signaltransduktoren in der Leberregeneration zulässt, andererseits hingegen wird die Regulation auf translationaler Ebene nicht erfasst und auch posttranslationale Modifikationen werden nicht berücksichtigt. Allerdings werden die meisten der untersuchten Zytokine und Wachstumsfaktoren nur in geringem Umfang posttranslational modifiziert und auch eine Regulation der Translation, z.B. durch miRNAs, ist bislang nicht bekannt. Folglich erschien die qRT-PCR als valide Methode zur Bestimmung der Zytokin-Expression. Da die Messungen in Homogenisaten des Lebergewebes stattfanden, war eine exakte Bestimmung, welcher Zelltyp zur Expression eines spezifischen Gens beiträgt nicht durchführbar. Andererseits konnten durch die relativ große Menge an eingesetzten Zellen und die hohe Sensitivität der qRT-PCR-Methode bereits eine schwach ausgeprägte Expression und somit auch geringfügige Unterschiede zwischen Versuchsgruppen detektiert werden, die möglicherweise nicht durch immunhistochemische Färbungen erfasst werden könnten. Um sicher zu stellen, dass ausschließlich cDNA von isolierter mRNA amplifiziert wurde, wurde während der RNA-Isolation ein DNase-Verdau durchgeführt, um verunreinigende genomische DNA zu zerstören, so dass diese nicht als PCR-Template dienen kann. Des Weiteren wurden Primer verwendet, deren Bindungs-Sequenz mehrere Exons umfasste, so dass eine Amplifikation nur von gespleißter mRNA nach reverser Transkription erfolgen konnte.

Die Messung der beteiligten Transkriptionsfaktoren mittels ELISA bzw. phospho-ELISA erlaubte eine Bestimmung deutlich geringerer Protein-Mengen als in Western Blot oder EMSA möglich wäre, was insbesondere wegen der niedrigen Proteinausbeuten nach *In-vitro*-Experimenten sehr vorteilhaft war. Darüber hinaus ist durch den Einsatz von Standardreihen des Zielproteins eine quantitative Normierung unterschiedlicher ELISA-Ansätze möglich, wobei sowohl EMSA als auch Western Blot nur semi-quantitative Aussagen zulassen und ein direkter Vergleich

verschiedener Blots nicht immer sinnvoll oder durchführbar ist. Der Nachweis von NF- κ B in Kernfraktionen sowohl aus Gewebe als auch aus *In-vitro*-Experimenten stellt damit keinen direkten Nachweis der transkriptionellen Aktivität dar, sondern spiegelt die Translokation von NF- κ B in den Zellkern wider. Grundsätzlich ist jedoch davon auszugehen, dass NF- κ B, sobald es einmal in den Zellkern migrieren konnte auch transkriptionell aktiv ist, da die Bindung an einen Inhibitor immer die Assoziation mit einer Exporter-Domäne des Inhibitors einschließt (Gilmore 2006; Hayden et al. 2006).

In-vitro-Experimente an primären humanen Zellen wurden durchgeführt, um einen ersten Überblick zu gewinnen, ob mittels Bortezomib auf TLR-4-induzierte Prozesse eingewirkt werden kann. Hierzu ist einerseits zu erwähnen, dass Bortezomib sicherlich keine präzise Blockade des TLR-4-Signalwegs bzw. von NF- κ B herbeiführt, sondern nur indirekt über die Inhibierung des Proteasoms, welches bekanntlich in diversen Signalwegen und zellulären Prozessen eine Rolle spielt. Andererseits sind Methoden, NF- κ B selektiv zu inhibieren rar, wobei siRNA-Knockdown sowie IKK-Inhibitoren (Luedde et al. 2005; Luedde et al. 2007; Wullaert et al. 2007) in der Entwicklung noch nicht für klinische Versuche geeignet sind. Bekannte Knockout-Modelle von NF- κ B sind bedingt durch die embryonale Letalität problematisch im Einsatz (Beg et al. 1995) und auch KO-Systeme von regulativen Elementen des NF- κ B-Signalweges, z.B. NEMO oder I κ B, führen zu Phänotypen, die mit Organschäden einher gehen (Hou et al. 2008; Beraza et al. 2007; Rudolph et al. 2000). Hingegen ist Bortezomib bereits als Medikament zugelassen und wird bereits experimentell in hepatozellulären Karzinom-Linien getestet, so dass hier eine direkte klinische Relevanz gegeben ist. Vor allem da der Einsatz von Bortezomib und anderen Proteasom-Inhibitoren in HCC angestrebt wird, jedoch bis dato keine Daten zur Wirkung bei Leberteilektomie vorhanden waren, erschien es sinnvoll, das Medikament unter den Bedingungen einer Hepatektomie zu evaluieren. Die verwendeten humanen Hepatozyten wurden aus Resektaten und einer explantierten Leber verschiedener Patienten isoliert. Problematisch ist hier, dass es nahezu unmöglich ist, Gewebe zu erhalten, das als Gesundheitskontrolle dienen könnte, da Biopsien nur im Falle von bekannten Lebererkrankungen indiziert sind. Des Weiteren

stellt die Blutungsgefahr bei der Biopsie-Entnahme ein nicht unerhebliches Gesundheitsrisiko für Patienten dar, so dass Biopsierung gesunder Individuen aus ethischen Gründen nicht durchführbar ist. Isolierte Hepatozyten können also jeweils von der zu Grunde liegenden Erkrankung des Patienten betroffen sein (insbesondere bei HCC oder CCC), wobei jeweils versucht wurde, die Präparation aus einem makroskopisch „gesund“ erscheinenden Stück des Gewebes durchzuführen. Vor allem bei Resektionen auf Grund von Lebermetastasen anderer Abdominalkarzinome war dies vermutlich erfolgreich, da sich das Tumorgewebe vom Leberparenchym leicht visuell unterscheiden lässt. Die Steigerung der Zytokin-Expression durch TLR-4-Stimulation sowie die Reduktion dieser Induktion durch Bortezomib war über alle Präparationen hinweg konsistent, unabhängig von der Ätiologie des verwendeten Lebergewebes. Dies deutet darauf hin, dass in den durchgeführten Isolationen hauptsächlich Zellen mit einer nativen Funktion des TLR-4-Systems erhalten wurden und der Einfluss der jeweiligen Grunderkrankung auf das Experiment vernachlässigbar war.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mechanismen und Parameter wurden gezielt mit Bezug auf Leberregeneration sowie auf den Zusammenhang zur Signalgebung zwischen KC und Hepatozyten in der Regeneration ausgewählt. Weitergehende Analysen schlossen nur oberflächlich Leberschädigung bzw. Zelltod / Apoptose ein. Die in 3.1.5 (S.75) und 3.2.4 (S.84) verwendete Methode der TUNEL-Färbung zeigt dabei unspezifisch nekrotischen, wie auch apoptotischen Zelltod. Entscheidend für diese Untersuchung war ein Mangel an verfügbarem Lebergewebe sowie Serum nach R90-Resektionen. Sowohl mRNA als auch die Dünnschnitte wurden jeweils aus der Restleber präpariert, was nur eine begrenzte Anzahl an Untersuchungen erlaubte. Auch eine Messung weiterer Parameter im Serum, wie M30 als spezifischen Marker für Apoptose, war nicht mehr möglich. Da Gewebeschnitte in größeren Mengen vorhanden waren, konnte TUNEL-Färbung durchgeführt werden, wobei eine Färbung für M30 in Rattengewebe technisch bislang nicht realisierbar ist. Daher war die Aussage zu Zelltodmechanismen in R70-, R90- und G90-Tieren auf generellen Zelltod beschränkt. Da nach den 70%igen Resektionen in der H70- und VC70-Gruppe deutlich mehr Restleber und Serum

verfügbar war, konnten hier zusätzliche Parameter, wie Expression von Genen mit Relevanz für apoptotische Prozesse und die Serum-M30-Konzentration bestimmt werden, so dass eine konkrete Aussage zu Apoptose unabhängig von nekrotischem Zelltod getroffen werden konnte.

Wie aus der Literatur und der vorliegenden Arbeit ersichtlich sein dürfte, ist die Leberregeneration ein überaus komplexer Vorgang, der abhängig von vielen Faktoren ist, empfindlicher Regulation unterliegt und unterschiedliche Zelltypen involviert. Beispielsweise wurden Einflüsse des erhöhten Portalvenendrucks nach Leberresektion (Yao et al. 2010; Mortensen et al. 2010; Yang et al. 2005), Sauerstoffradikalen welche nach Ischämie/Reperfusion zu oxidativem Stress von Zellen führen (Serracino-Inglott et al. 2001; Tacke et al. 2009), regulativen Zellkollektiven wie den hepatischen Sternzellen (Bataller et al. 2001; Breitkopf et al. 2006; Cassiman et al. 2002), Leberresidenten NK-Zellen sowie die Beteiligung hepatischer Stammzellen am Regenerationsprozess (Duncan et al. 2009) – im Gegensatz zu der primär auftretenden Proliferation von Hepatozyten – nicht untersucht. Allerdings ist durchaus davon auszugehen, dass alle diese Faktoren einen nicht unerheblichen Einfluss auf den postoperativen Verlauf nach Leberteileresektion haben, so dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit letztlich in einem größeren Kontext beurteilt werden müssen, der auch die aktuelle Problematik steigender Zahlen steatotischer Vorerkrankungen der Leber einschließt.

4.2 Auswirkung des Resektionsumfanges auf molekulare Prozesse in der Leberregeneration

Die vorliegenden Daten stellen erstmals die Prozesse nach einer 90%igen Leberresektion auf molekularer Ebene dar, da zu Grunde liegende Mechanismen in diesem Versuchsaufbau bislang kaum bekannt sind. Die Abläufe nach 70%iger bzw. Zwei-Drittel-Resektion sind zwar hinreichend untersucht worden, jedoch gewinnt auch das Modell 90%iger Hepatektomie immer mehr an Bedeutung, um umfangreichere Operationen bzw. Leberschäden zu simulieren. Insbesondere war

bislang unklar, ob der Resektionsumfang eine Auswirkung auf die molekularen Mechanismen der Leberregeneration hat. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit demonstriert werden. Im Einzelnen hat der Resektionsumfang Einfluss auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, auf die Expression diverser Zytokine und Wachstumsfaktoren, sowie auf den Zelltod.

Die ermittelten LBW-r zeigten, dass in der R70-Gruppe bereits 12h nach dem chirurgischen Eingriff ein signifikanter Anstieg des LBW-r zu verzeichnen war und bereits zum Zeitpunkt 7d postoperativ 65% der ursprünglichen Lebermasse erreicht wurden. In der R90-Gruppe war das Leberwachstum bis 24h nach Resektion verzögert und am siebten postoperativen Tag wurden nur 30% der ursprünglichen Lebermasse erreicht. Anhand des LBW-r konnte gezeigt werden, dass die Regeneration nach R90-Resektion bis zu 12h später initiiert wurde als nach R70-Hepatektomie.

Serum-Parameter für Leberschädigung wiesen nur geringfügige Unterschiede zwischen 70%iger und 90%iger Resektion auf, was den zeitlichen Verlauf anlangt. Allerdings waren AST und ALT ab 12h nach dem chirurgischen Eingriff deutlich in den R90-Tieren erhöht gegenüber der R70-Gruppe. Auch Bilirubin war 12h nach 90% Resektion signifikant erhöht, wobei die R70-Tiere sich in diesem Parameter nicht von den Kontrollen unterschieden.

Insgesamt sprechen die erhöhten die Serumparameter für eine stärkere Leberschädigung nach der R90- als nach R70-Resektion, wobei effektiv weniger Zellen vorhanden waren, welche entsprechende Enzyme abgeben konnten. An dieser Stelle soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass bei beiden Resektionstechniken jeweils komplette Leberlappen entfernt wurden, bei R70-Hepatektomie der linkslaterale, der linke mediane sowie der rechte mediane Lappen, bei R90-Resektion zusätzlich der obere und untere rechtslaterale Lappen, so dass bei beiden Operationsmethoden nur sehr geringe Schnittflächen bzw. Gewebeschäden an den verbliebenen Leberlappen durch den chirurgischen Eingriff entstanden (2.2.1, S.37).

Um nachvollziehen zu können, welche Mechanismen der verzögerten Regeneration nach R90-Hepatektomie zu Grunde lagen, wurde die Aktivität von Transkriptionsfaktoren sowie die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ermittelt, die an der Regeneration beteiligt sind (Fausto & Campbell 2003; Fausto & Riehle 2005).

Bei den R70-Tieren war eine schwache aber über nahezu alle Zeitpunkte kontinuierliche NF- κ B-Lokalisierung im Kern messbar. In R90-Tieren war der Konzentrationsanstieg von kNF- κ B um ca. 24h verzögert, nahm danach jedoch nur für kurze Zeit stark zu und fiel zu späteren Zeitpunkten wieder auf Kontrollniveau ab. Proregenerative Zytokine wie TGF- α und IL-6 wurden stärker nach R70-Hepatektomie exprimiert als nach R90-Hepatektomie. TNF- α , das als essentiell für die Initiierung der Regeneration gilt, wurde von R70-Tieren deutlich hochreguliert, wobei die TNF- α -Expression in der R90-Gruppe nur geringfügig erhöht war und sich nicht signifikant von Kontrollen unterschied. Auch die HGF-Expression war nach R70-Resektion höher als nach R90-Hepatektomie.

Die von uns beobachtete Gen-Aktivierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren war im Vergleich zu dem aus der Literatur bekannten Ablauf verzögert (Fausto et al. 1995; Fausto et al. 2006). Darüber hinaus war allerdings eine klare Reduktion bzw. stärkere Verzögerung der Expression in R90-Tieren im Vergleich zu der R70-Gruppe erkennbar. Wachstumsfaktoren wurden nach 70%iger Resektion verstärkt exprimiert, wogegen nur eine verminderte oder keine Induktion bei R90-Tieren erkennbar war.

Weiterhin beobachteten wir eine erhöhte TGF- β Expression zum Zeitpunkt 12h nach R70-Resektion, die in der R90-Gruppe nicht auftrat. Da TGF- β anti-proliferativ wirkt, wäre hierdurch eine verschlechterte Regeneration in der R70-Gruppe zu erwarten. Andererseits unterliegen regenerative Prozesse einer feinen Gegenregulation pro- und antiregenerativer Faktoren, um unkontrolliertes bzw. übermäßiges Wachstum zu unterbinden. Die ermittelten Daten könnten darauf hinweisen, dass die Regeneration nach R70-Resektion bereits zu diesem frühen Zeitpunkt Gegensteuerung erfordert. Weiter gestützt wird diese These durch die starke Supprimierung von TGF- β zu allen

späteren Zeitpunkten in R70-Tieren. Im Gegensatz dazu blieben anscheinend in der R90-Gruppe die entsprechenden Stimuli für Regeneration aus, so dass der antiregenerative Wachstumsfaktor TGF- β nicht verstärkt exprimiert wurde. Erst zu den Zeitpunkten 48h bzw. 7d nach der Operation wurden Werte erreicht, die über Kontrollniveau lagen und daher möglicherweise erst zu diesem späten Zeitpunkt erforderlich sind.

Die vorliegenden Daten weisen im Überblick darauf hin, dass umfangreiche Resektionen eine stärkere postoperative Schädigung des verbliebenen Lebergewebes verursachen, die mit verringerter Expression von Genen einher ging. Hierzu zählten sowohl die initial notwendigen Zytokine als auch die im weiteren Verlauf produzierten Wachstumsfaktoren. Da alle ermittelten Daten zur Gen-Expression jeweils auf die Expression von β -Aktin als *house keeping*-Gen bezogen wurden, kann dieser Effekt nicht durch die reduzierte Lebermasse erklärt werden, sondern war auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen. Speziell NF-KB, ein Transkriptionsfaktor der in vorangegangenen Studien bereits früh nach Leberresektion aktiviert wurde (FitzGerald et al. 1995; Yang et al. 2005; Salazar-Montes et al. 2006), wurde nach R90-Resektion erst 24h postoperativ im Kern messbar, was eine deutlich Verzögerung darstellt. Interessanter Weise wurde die Phosphorylierung von STAT3, die unter anderem durch IL-6 induziert wird (Kandilis et al. 2010) nicht durch den Resektionsumfang beeinflusst, weder was den zeitlichen Verlauf noch die Intensität der Aktivierung anlangt. STAT3 spielt einerseits eine Rolle bei der Regeneration, indem IL-6-Signalgebung zu Phosphorylierung von STAT3 führt, was unter Anderem die Transkription von HGF induziert (Salazar-Montes et al. 2006). Kürzlich wurden zusätzlich protektive Effekte vor ConA-induzierter Entzündung durch STAT3 (Xu et al. 2009), sowie eine Assoziation mit Myd88 und damit LPS-abhängige Regulation in der Leberregeneration beschrieben (Wang et al. 2010). Des Weiteren ist seit einiger Zeit Interaktion und Ko-Aktivierung von NF-KB und STAT3 in verschiedenen Tumorentitäten bekannt (Grivennikov et al. 2010).

Beobachtete TUNEL-Indices waren sowohl nach R70- als auch nach R90-Hepatektomie gegenüber den Kontrollen bereits direkt nach der Operation erhöht.

Der zeitliche Verlauf weist hier ebenfalls darauf hin, dass Prozesse, die für Regeneration der Leber entscheidend sind, durch den Umfang der Operation beeinflusst wurden. Zelltod spielt nicht nur eine Rolle beim Zelluntergang nach Gewebeschäden, worauf der kurz nach dem chirurgischen Eingriff erhöhte TUNEL-Index bei den R70-Tieren wahrscheinlich zurückzuführen war. Beispielsweis sind apoptotische Prozesse relevant für die Remodellierung des neuen Leberparenchyms. Sieben Tage postoperativ erreichten die TUNEL-Indices nach R90-Resektion einen Höchstwert, der möglicherweise auf eine späte Rekonstruktion der Leberstruktur zurückzuführen war. Im Gegensatz hierzu waren die TUNEL-Werte nach R70-Hepatektomie über den kompletten Beobachtungszeitraum nur leicht erhöht. Hier fand die Remodellierung möglicherweise bereits parallel zur Geweberegeneration statt oder zu einem Zeitpunkt, an dem keine Gewebeproben genommen wurden. Die vorliegenden Daten stellen jedoch generell Zelltod dar und nicht ausschließlich Apoptose, so dass der Anteil gezielter Apoptose zur Remodellierung gegen möglichen nekrotischen Zelltod durch entzündliche Prozesse nicht unterschieden werden kann. Insofern bleibt die Hypothese zu spät erhöhten TUNEL-Indices durch Remodellierung in R90-Tieren spekulativ. In der vorhandenen Literatur wird angenommen, dass die Zellzahl der Hepatozyten bereits 3-4 Tage nach 70%iger Hepatektomie den Ausgangswert erreicht (Duncan et al. 2009; Michalopoulos & DeFrances 1997), folglich wäre in diesem Zeitraum mit erhöhten TUNEL-Indices in R70 Tieren zu rechnen.

Insgesamt zeigen die Daten, dass eine R90-Hepatektomie im Vergleich zu R70-Leberteileresektion zu verringerter oder verzögerter Aktivierung progenerativer Faktoren und Prozesse führt. Hierdurch wird die regenerative Kapazität der Leber verschlechtert, was sich auch in einer verzögerten Wiederherstellung der ursprünglichen Lebermasse niederschlägt. Die kNF-KB-Konzentration und die damit assoziierte Induktion wichtiger Zytokine sowie die hierdurch bedingte Produktion von Wachstumsfaktoren waren abhängig von der resezierten Lebermasse. Die Rolle von NF-KB bleibt zweideutig, da in der R70-Gruppe schwache aber kontinuierlich erhöhte Kernlokalisierung von NF-KB gemessen wurde, in den R90-Tieren jedoch nur kurzzeitig ein stärkerer Anstieg der Menge an kNF-KB beobachtbar war.

Möglicherweise ist die früh eintretende, geringe Translokation in den Kern in der R70-Gruppe ausreichend, um regenerative Prozesse zu initiieren und aufrecht zu erhalten. Hierdurch wären die kompensatorische Hypertrophie und die strukturelle Reformation begünstigt. Eine späte und starke Aktivierung, wie in der R90-Gruppe könnte Entzündungen verstärken und zu vermehrtem Zelltod in den späteren Zeitpunkten führen, was die schnelle Wiederherstellung einer funktionsfähigen Leber verhindern würde. Für diese These sprechen auch die deutlich erhöhten Parameter der Leberschädigung, die vor allem zu den Zeitpunkten 12h bis 48h nach R90-Resektion beobachtet wurden, während 48h nach R70-Resektion AST und ALT bereits auf Kontrollniveau abgesunken waren. Insbesondere Bilirubin, als Marker für verringerte Leberfunktion bzw. Leistung der Hepatozyten, stieg deutlich in R90-Tieren an, was in der R70-Gruppe nicht zu beobachten war.

Der hier dargestellte Einfluss des Resektionsumfangs auf molekulare und zelluläre Prozesse in der Leberregeneration eröffnet die theoretische Möglichkeit, bei erweiterten Hepatektomien durch Aktivierung proregenerativer Transkriptionsfaktoren oder Supplementation der Zytokine und Wachstumsfaktoren den klinischen Verlauf zu verbessern. Hierdurch würden möglicherweise Patienten eine Hepatektomie erhalten können, für die diese Option durch Gegenindikation sonst nicht verfügbar wäre, z.B. wenn ein großer Anteil gesunden Gewebes entfernt werden müsste und die verbleibende Lebermasse unzureichend für die Organfunktion wäre. Vor allem Patienten in fortgeschrittenen Stadien von Lebererkrankungen haben Lebergewebeschäden wie Zirrhose oder Steatose. Diese reduzieren den Anteil der funktionellen Lebermasse zusätzlich, so dass eine Resektion oft kontraindiziert ist und die wesentlich kompliziertere Lebertransplantation als einzige Therapieoption verbleibt und die lebenslange Einnahme von Immunsuppressiva notwendig macht, mit entsprechenden Risiken und Nebenwirkungen.

Weiterhin wäre die Verabreichung von Wachstumsfaktoren für Spender im Rahmen der Leberlebendtransplantation einerseits eine Möglichkeit Komplikationen zu verringern und andererseits die Rekonvaleszenz zu beschleunigen. Gleichzeitig könnte Spendern, die auf Grund von zu geringem Lebervolumen abgelehnt werden,

durch die pharmakologische Behandlung die Möglichkeit gegeben werden, eine Spende durchzuführen. Sofern sowohl bei Spender als auch Empfänger eine Supplementation der nötigen Zytokine und oder Wachstumsfaktoren stattfindet, wäre die Problematik des sogenannten Small-for-size Syndroms vermeidbar.

4.3 *Pharmakologische Modulation der postoperativen Entwicklung durch Glycin bei 90% Hepatektomie*

Glycin hat sich in verschiedenen Studien als zytoprotektiv erwiesen (Carini et al. 1997; Marsh et al. 1993; Frank et al. 2000) und wurde bereits klinisch in ersten Patienten als Additivum zu Perfusionslösungen für Lebertransplantation eingesetzt (Schemmer, Golling et al. 2001; Schemmer et al. 2002). Zurzeit wird die HEGPOL Studie evaluiert, welche eine multizentrische Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie darstellt und den Effekt von postoperativ verabreichtem Glycin auf Empfänger von Lebertransplantaten analysiert (Luntz et al. 2005). Bislang sind jedoch alle wesentlichen Studien über eine Glycin-Supplementation mit Bezug zur Lebertransplantation bzw. Ischämie/Reperfusionsschäden, ohne Resektion, durchgeführt worden (Ito et al. 2008; Schemmer et al. 1998; Marsh et al. 1991). Der Einfluss einer Glycin-reichen Diät auf die Regeneration nach Leberteilektomie sowie auf Marker der Leberschädigung im Serum war in Benko et al. (2010) beschrieben. Eine Modulation der molekularen Prozesse war dabei jedoch nicht analysiert worden.

Zur Vertiefung der gewonnenen Erkenntnisse wurde Lebergewebe aus dieser Studie verwendet, um Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie Zelltod mittels TUNEL zu ermitteln und somit molekulare Grundlagen der beschriebenen Effekte zu beleuchten.

Im Modell der umfangreichen Leberresektion führte die Gabe von Glycin-reichem Futter zu einer merklich verringerten Leberschädigung, messbar an Hand der Serum-Parameter, wobei sich der zeitliche Verlauf der Regeneration nicht änderte (Benko et al. 2010).

Gleichzeitig war auch eine Veränderung des Expressionsmusters von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beobachtbar. Insbesondere wurde eine späte Expression von IL-

6 in Verbindung mit einer wesentlich verringerten Phosphorylierung von STAT3 2h und 6h nach G90-Resektion verglichen mit R90-Tieren gemessen. Dies ist konsistent mit bisherigen Beobachtungen, da eine immunmodulierende Wirkung von Glycin auf KC bekannt ist (Xu et al. 2008; Zhong et al. 2003; Ikejima et al. 1996) und IL-6-Signalgebung zur Phosphorylierung von STAT3 führt (Sakamori et al. 2010; Clementi et al. 2009). Eine erhöhte STAT3-Aktivität ist bislang mit verstärkten Entzündungen und Gewebeschäden in der Leber, hauptsächlich in steatotischen Tiermodellen, assoziiert worden (Sakamori et al. 2010; Shin et al. 2009; Clementi et al. 2009), andererseits schützt Glycin vor Entzündungsreaktionen in Ischämie/Reperfusion-Modellen (Yamanouchi et al. 2007; Liu et al. 2006) doch die Rolle in regenerativen Prozessen scheint nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit unklar, da hier keine negativen Auswirkungen der verringerten STAT3-Phosphorylierung beobachtet wurden. Im Gegensatz hierzu stehen jedoch Daten aus einem weiteren Tiermodell der Leber-Resektion mit steatotischem Hintergrund (Shu et al. 2009) und eine Reduktion entzündlicher Prozesse im Modell der Leberteilesektion (Wang et al. 2010; Xu et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit beobachtete NF- κ B-Translokation in den Zellkern trat in der G90-Gruppe 12h postoperativ auf, während R90-Tiere erst 24h nach Resektion erhöhte NF- κ B-Mengen im Zellkern zeigten. Ein kontinuierlicher, leichter Anstieg der NF- κ B-Konzentration innerhalb der ersten 12h postoperativ, wie in R70-Tieren, trat nicht auf. Weiterhin war in G90-Tieren bereits zum Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs (0h) eine deutliche Erhöhung von NF- κ B messbar, die nach der Operation wieder auf das Niveau der Kontrollen zurückging. Diese Daten stehen im Widerspruch zu Studien, die eine verringerte NF- κ B-Aktivität bzw. reduzierte TLR-4-vermittelte Entzündungen durch Glycin-Behandlung in Tiermodellen des hämorrhagischen Schocks sowie des Endotoxin-verursachten Leberschadens beschrieben haben (Mauriz et al. 2001; Li, Bradford et al. 2001; Xu et al. 2008). Auch wurde ein Zusammenhang von reduzierter Apoptose mit verminderter NF- κ B-Expression in transplantiertem Endometrium und Ovarialfollikeln bei Hamstern mit Glycin-Fütterung beobachtet (Laschke et al. 2008). Vermutlich ist diese Diskrepanz auf die unterschiedlichen Modellsysteme zurückzuführen, da pharmakologische Leberschädigung anscheinend anderen Mechanismen unterliegt, als Prozesse nach einem Resektions-bedingten Gewebeschaden. Grundsätzlich

zeigt die Änderung der Aktivität von zwei wesentlichen Transkriptionsfaktoren für Regeneration und Entzündungen durch orale Applikation von Glycin im Modell der 90%igen Hepatektomie deutlich, dass eine pharmakologische Unterstützung der molekularen Prozesse nach Leberteilresektion realisierbar ist.

Ein weiterer Effekt der Fütterung mit hohem Glycin-Gehalt war eine deutliche Reduktion TUNEL-positiver Zellen in der Leber. TUNEL-Indices in Tieren mit Glycin-Fütterung waren auffällig niedrig und zum Teil geringer als in unbehandelten Kontrollen ohne chirurgischen Eingriff. Auch ist nicht auszuschließen, dass obwohl die Wirkung von Glycin *in vitro* nur partiell abhängig oder sogar unabhängig von Ca^{2+} -Kanälen ist (vgl. 1.5, S.24) (Qu et al. 2002; Marsh et al. 1993) eine *in vivo* Blockade des Ca^{2+} -Einstroms (Nishimura et al. 2001; Qu et al. 2002) Zellen vor intrinsischer Apoptose schützt, die durch Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ausgelöst werden kann (McConkey et al. 1996).

Insgesamt scheint Glycin als protektives Pharmazeutikum bei Leberteilresektionen wirksam zu sein, wobei weiterführende Untersuchungen hierzu notwendig wären, um die genauen Wirkmechanismen aufzuklären, z.B. ob die beobachteten Effekte von Glycin durch STAT3-Blockade mittels JSI-124 reproduzierbar wären (Xu et al. 2009). Unsere Daten deuten allerdings darauf hin, dass der protektive Effekt von Glycin im Rahmen der Leberteilresektion über zwei Prozesse vermittelt wird. Auf der einen Seite wird eine immunregulierende Wirkung auf die KC ausgeübt (Wheeler et al. 1999; Xu et al. 2008), die in dem hier gezeigten Resektionsmodell Entzündungen verringerte, gleichzeitig aber die spätere Produktion der Zytokine ermöglichte, die für den Start der Regeneration essentiell sind. Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die einen geringeren Effekt durch die Zerstörung aller KC mittels Gadolinium-Chlorid im Resektionsmodell erzeugten (Rentsch et al. 2005). Andererseits wirkt der zytoprotektive Effekt des Glycins sowohl auf Hepatozyten (Marsh et al. 1991) als auch auf Endothelzellen (Estacion et al. 2003; Nishimura & Lemasters 2001; Nishimura et al. 1998), z.B. gegen Ischämie/Reperfusionsschäden (Yamanouchi et al. 2007; Ito et al. 2008). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verspätete Initiierung der Regeneration stellte augenscheinlich keine wesentliche

Beeinträchtigung dar, solange das Lebergewebe und die verbliebenen parenchymalen Zellen vor schädlichen Effekten geschützt wurden.

Limitierende Faktoren bezüglich der durchgeführten Untersuchungen und damit der möglichen Erkenntnis über funktionelle Mechanismen der Wirkung von Glycin waren hier die begrenzte Anzahl an Tieren sowie das grundlegende Problem, dass nach 90%iger Resektion nur ca. 10% des Lebergewebes für histologische Untersuchungen, mRNA-Isolation oder Protein-Präparation zur Verfügung standen. Durch diese eingeschränkte Verfügbarkeit von Gewebe der regenerierenden Leber und einer begrenzten Menge an Serum, die aus Ratten gewonnen werden kann, waren weiterführende Untersuchungen an dem von uns operierten Tierkollektiv nicht möglich. Denkbar wären beispielsweise eine Glycin-unabhängige STAT3-Inhibition oder Blockade von Ca^{2+} -Kanälen und mechanistische Untersuchungen zu Signalmolekülen wie Adiponektin oder dem Komplementsystem (He et al. 2009; Shu et al. 2009). Die bisherigen Daten zum verminderten Gewebeschaden nach Leberteilresektion durch orale Glycin-Applikation (Benko et al. 2010) konnten insofern ergänzt werden, als mögliche Wirkmechanismen mit Zelltod und/oder STAT3-Phosphorylierung assoziiert sein könnten.

4.4 Modulation der TLR-4 Reaktion durch Bortezomib

Neben Glycin sind andere pharmakologische Therapeutika als Supplement im Rahmen der Leberteilresektion denkbar. Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib wurde bereits zur Therapie des multiplen Myeloms sowie des Mantelzell-Lymphoms zugelassen (Adams 2004; Voorhees et al. 2006) und weitere Studien werden bereits durchgeführt bzw. angestrebt, um dieses Medikament auch bei anderen Tumor-Entitäten einzusetzen, unter anderem beim HCC (Chen et al. 2008; Armeanu et al. 2008; Chen et al. 2009). Eine Studie wurde bereits in einem Hepatitis B-Modell der Maus durchgeführt (Bandi et al. 2010). Einerseits blockiert Bortezomib das Proteasom (Adams et al. 1998; Adams 2002), so dass fehlgefaltete sowie nicht mehr benötigte Proteine akkumulieren, was möglicherweise proliferierende Zellen beeinträchtigen könnte. Andererseits führt die Blockierung des Proteasoms unter

anderem auch zu einer NF- κ B-Inhibition, was ebenfalls einen denkbaren Mechanismus darstellt, durch den Bortezomib wirkt (Nencioni et al. 2006; Hideshima et al. 2002; Ganten et al. 2005). Des Weiteren sind Studien durchgeführt worden, in denen eine Blockierung von NF- κ B als unproblematisch für die Leber-Regeneration nach Hepatektomie bzw. vorteilhaft für Ischämie/Reperfusion-Schäden festgestellt wurde (Luedde et al. 2005; Laurent et al. 2005). Daher sollte versucht werden, mittels Bortezomib Einfluss auf die molekularen Prozesse bei Leberteilresektion zu nehmen, insbesondere Entzündungen und Ischämie/Reperfusion-Schäden.

Zunächst wurde die Wirkung dieses Medikaments auf die TLR-4-vermittelte Reaktion isolierter Leberzellen *in vitro* analysiert, um einen möglichen Einsatz zur Blockierung von NF- κ B als entzündungsförderndem Transkriptionsfaktor im Modell der Leberresektion vorab zu evaluieren. TLR-4 und die Signalmoleküle, die durch Bindung des Liganden LPS an TLR-4 aktiviert werden, gelten als ein möglicher Mechanismus, wie Regeneration nach Hepatektomie initiiert wird (Slotta et al. 2009; Kandilis et al. 2010; Abreu et al. 2005; Cornell 1985b; Cornell et al. 1990), auch wenn dies noch nicht abschließend geklärt werden konnte (Su et al. 2000; Sun et al. 2004; Seki et al. 2005; Campbell et al. 2006; Imuro et al. 2007). Als *In-vitro*-Modell für die TLR-4-Stimulation und die Beeinflussung dieses Signalweges durch Bortezomib wurden einerseits murine KC, als Leber-residente Immunzellen, andererseits primäre humane Hepatozyten als parenchymale bzw. funktionelle Zellen der Leber, eingesetzt. Die *In-vitro*-LPS-Stimulation wurde verwendet, da hierdurch ausschließlich die TLR-4-Signalgebung aktiviert wird. Grundsätzlich waren Experimente mit murinen Zellen ausschließlich als Vor-Versuche zur Bestimmung optimaler Konzentration und Stimulationszeiträume für LPS bzw. Bortezomib geplant. Da der therapeutische Ansatz letztlich für das humane System angestrebt war, sollten sowohl humane Hepatozyten als auch humane KC im *In-vitro*-Modell zum Einsatz kommen, wobei das TLR-System in Säugetieren grundsätzlich als konserviert gelten kann (Heine & Lien 2003; Schwabe et al. 2006; Imuro et al. 2007). Murine KC konnten nach Kollagenase-Verdau der Leber auf Grund des Dichtunterschiedes zu anderen nicht-parenchymalen Zellen der Leber (sinusoidale Endothelzellen, hepatische Sternzellen, NK-Zellen) mittels Elutriation (2.2.4.2, S.41)

effektiv und mit relativ geringem Aufwand isoliert werden. Die stichprobenhafte Bestimmung der Reinheit dieser Zellpopulation mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper gegen das Makrophagen-spezifische Oberflächenantigen F4/80, der mittels FACS detektiert wurde, ergab Reinheiten von deutlich über 90% (Dr. rer. nat. Bröring 2008). Im Gegensatz hierzu waren humane KC nicht durch Elutriation oder Dichtegradientenzentrifugation von anderen nicht-parenchymalen Leberzellen separierbar. Eine Selektion durch den humanen Makrophagenmarker CD163 mittels MACS bzw. FACS befand sich zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch in einem frühen experimentellen Stadium. Erste *In-vitro*-Experimente zu TLR-4-Stimulation und Bortezomib-Gabe wurden in Mischpopulationen humaner nicht-parenchymaler Leberzellen (KC, hepatische Sternzellen, sinusoidale Endothelzellen, NK-Zellen) durchgeführt. Diese zeigten ein Expressionsmuster für Zytokine, Wachstumsfaktoren und Interferone, das dem in murinen KC ähnelte (Daten nicht gezeigt), wobei es sich – wie erwähnt - um keine reinen Populationen einzelner Zelltypen handelte.

Sowohl in den Versuchen mit murinen KC als auch in denen mit primären humanen Hepatozyten konnte durch Bortezomib-Gabe die Reaktion des angeborenen Immunsystems auf LPS moduliert werden. Nach Bortezomib-Applikation beobachteten wir eine verringerte Expression der von NF- κ B regulierten Zytokine, wie TNF- α , IL-6 und IL-10. Dagegen war ein Anstieg der Interferon-Expression tendenziell in murinen KC erkennbar, der in humanen Hepatozyten nicht auftrat. Auf welchem Mechanismus diese verstärkte Interferon-Expression beruht, konnte nicht ermittelt werden, wobei eine redundante Wirkung anderer Transkriptionsfaktoren, wie IRF-3 oder STAT3, als kompensatorischer Mechanismus denkbar wäre. Es wurden verschiedene Versuche unternommen, sowohl die NF- κ B-DNA-Bindung direkt durch EMSA bzw. Kernlokalisierung und Phosphorylierung mittels Western Blot nachzuweisen, als auch die Aktivität bzw. Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie IRF-3 oder JNK zu bestimmen. Ein wesentliches Problem ergab sich jedoch durch die geringen Ausbeuten an Protein aus den *In-vitro*-Experimenten. Insbesondere Transkriptionsfaktoren und Signaltransduktoren werden nur in geringen Mengen von Zellen produziert, da jeweils schon wenige Moleküle

ausreichend für die Induktion der Gen-Expression sind. Es gelang daher nicht, NF-KB, IRF-3 oder JNK im Western Blot bzw. EMSA zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Um die Problematik zu geringer Proteinmengen zu umgehen, wurde versucht, humane Hepatozyten mit einem Reporter-Plasmid zu transfizieren, welches ein NF-KB-responsives Element trägt, das bei transkriptioneller Aktivität von NF-KB als Reporter alkalische Phosphatase produziert, die wiederum in das Kulturmedium sezerniert wird. Somit wäre ein indirekter Nachweis der NF-KB-Aktivierung über die im Serum messbare Menge an alkalischer Phosphatase möglich gewesen. Allerdings ist es bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht gelungen, eine Transfektion der humanen Hepatozyten mit dem Reporterplasmid bzw. einem Kontrollplasmid durchzuführen (Daten nicht gezeigt).

Dennoch war in murinen KC als auch in primären humanen Hepatozyten eine modulierende Wirkung von Bortezomib messbar, wobei in beiden Zelltypen ähnliche Expressionsmuster für TNF- α , IL-6 und IL-10 beobachtet wurden. Interleukine wurden jedoch in Hepatozyten kaum exprimiert, unabhängig von einer Stimulation mit LPS und/oder Bortezomib. Neben den bereits dargestellten Ergebnissen, wurde die Expression einer Reihe weiterer Gene untersucht, jedoch wurden weder für Apoptose relevante Gene (Sohn et al. 2006) noch Wachstumsfaktoren oder Proliferationsmarker in ausreichenden Mengen exprimiert, um aussagekräftige Messungen zu ermöglichen. Auch eine Steigerung der Expression durch LPS oder Bortezomib war bei diesen Genen jeweils nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Grundsätzlich lassen die vorhandenen Daten darauf schließen, dass Bortezomib gezielt die TLR-4-induzierte Transkription blockiert, welche primär durch NF-KB reguliert wird. Dies entspricht Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine gezielte NF-KB-Inhibition durch Bortezomib beobachtet haben (Calvaruso et al. 2006; Hideshima et al. 2002; Sunwoo et al. 2001).

Während in vorangegangenen Untersuchungen zur Regeneration nach Leberteileresektion im Tiermodell einerseits ein TLR-4-Knockout keinen negativen Einfluss auf die Regeneration hatte (Campbell et al. 2006) oder die Inhibierung von NF-KB (Laurent et al. 2005) keine Verschlechterung der Regeneration zur Folge

hatte, führte eine vollständige Depletion der KC mittels Gadoliniumchlorid zu deutlich verschlechterter Regeneration (Rentsch et al. 2005). Unsere Hypothese war, dass mittels Bortezomib die TLR-4 vermittelte Zytokinproduktion und -sekretion von KC abgeschwächt werden könnte, ohne diese dabei vollständig zu depletieren und somit notwendige Mechanismen zur Initiierung der Regeneration auszuschalten. Gleichzeitig konnten keine nachteiligen Effekte der Bortezomib-Applikation in primären Leberzellen beobachtet werden, so dass wir uns entschieden, Bortezomib im Modell der Leberresektion in der Ratte einzusetzen.

Zunächst ist zu erwähnen, dass die Bortezomib-Behandlung *per se* zu keinen negativen oder schädlichen Effekten auf die Versuchstiere führte. Bekannte Nebenwirkungen wie Fatigue oder periphere Neuropathie (Lu et al. 2006; Cavaletti et al. 2007) waren nicht zu beobachten, alle Tiere waren bis zum Ende des Beobachtungszeitraums augenscheinlich gesund. Die Verabreichung von Bortezomib in Kombination mit einer Leberresektion erwies sich allerdings als letal. Dieser Effekt variierte mit dem Umfang der Resektion und dem Zeitpunkt der Bortezomib-Gabe. Bemerkenswert ist, dass Letalität bereits bei 30%iger Resektion und Bortezomib-Applikation eine Woche vor dem chirurgischen Eingriff auftrat. Die höchste Mortalität wurde bei 70%iger Resektion und Gabe von Bortezomib 24h nach der Operation beobachtet. Ein direkter Einfluss auf die Initiierung der Regeneration erscheint durch den zeitlichen Verlauf sehr unwahrscheinlich. Vierundzwanzig Stunden postoperativ waren in unseren Resektionsmodellen bereits alle Signalwege zur Initiierung der Regeneration aktiviert, was die Produktion von TNF- α sowie IL-6 und die Aktivität von NF-KB bzw. STAT3 einschloss. Da die Bortezomib-Gabe zu diesem postoperativen Zeitpunkt in allen Versuchstieren letal wirkte, ist es unwahrscheinlich, dass die Ursache der hohen Mortalität mit regenerativen Prozessen assoziiert war. Es wurde bereits beschrieben, dass Bortezomib pro-apoptotisch oder synergistisch mit Todes-Rezeptor-Liganden, wie TRAIL, wirkt (Anan, Baskin-Bey, Bronk et al. 2006; Emanuele et al. 2007; Sohn et al. 2006; Chen et al. 2009; Ganten et al. 2005). In verschiedenen Arbeiten, die an humanen Hepatomzelllinien durchgeführt wurden, zeigte sich ein Einfluss auf die TRAIL-Sensitivität und eine Beeinträchtigung der Anti-apoptotischen Wirkung von Bcl-2 (Koschny et al. 2007; Nencioni et al. 2005). Daher wurde vermutet, dass verstärkte

apoptotische Prozesse der Hintergrund für die beobachteten Effekte waren. Eine Analyse der Apoptose-relevanten Genexpression sowie der M30-Konzentration in Seren der Versuchstiere konnte jedoch keine vermehrte Apoptose in Tieren mit Bortezomib-Applikation und Leberteilresektion nachweisen.

Die gezeigten Daten demonstrieren, dass die molekularen und regenerativen Prozesse nach Leberteilresektion komplex sind und vermutlich nur schwer auf einzelne Transkriptionsfaktoren eingegrenzt werden können. NF- κ B ist ein wichtiger Kandidat für eine zentrale Rolle in der Leberresektion, jedoch sicherlich nicht der einzige beteiligte Faktor. In der Zellkultur hatte eine Bortezomib-Gabe die TLR-4-induzierte Expression von solchen Zytokinen moduliert, die von NF- κ B reguliert werden. Andererseits trat in den Tierexperimenten eine große Varianz der Kernlokalisierung von NF- κ B auf, so dass anhand der vorliegenden Daten keine eindeutige Aussage über die Auswirkung von Bortezomib auf NF- κ B getroffen werden kann. Die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren nach Bortezomib-Behandlung ähnelte dem Expressionsprofil, das nach Resektion ohne Bortezomib beobachtet wurde. Eine deutliche Veränderung der Zytokin-Expression, wie in *In-vitro*-Experimenten war nicht zu beobachten. Vor allem die Expression der für die Regeneration wesentlichen Zytokine TNF- α und IL-6 sowie des Wachstumsfaktors HGF war nahezu unverändert, zum Teil sogar leicht erhöht. Redundante Signalwege, die von NF- κ B und dem Proteasom unabhängig sind, könnten hier zur Induktion von Zytokinexpression führen und so die Wirkung von Bortezomib umgehen. Außerdem wurde im Tiermodell des Myocard-Infarktes bereits beschrieben, dass Bortezomib die Zytokinexpression erhöhen kann (Kawano et al. 2006).

Da das Proteasom relevant für die Regulation unterschiedlicher Signalwege ist, wurde neben NF- κ B auch der HIF Signalweg näher untersucht, in dem das Proteasom eine zentrale Rolle spielt und der nach aktuellen Erkenntnissen eng mit NF- κ B assoziiert ist (An & Rettig 2005). HIF1 α wird in nahezu allen Zellen konstitutiv exprimiert (Pugh et al. 2003), allerdings wird dieser Transkriptionsfaktor direkt nach Translation vom Proteasom abgebaut. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1 α an zwei Prolin-Resten hydroxyliert (Wenger 2002), diese hydroxylierten Proline

dienen als Bindungsstelle für das Von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) (Min et al. 2002; Pugh & Ratcliffe 2003), welches an der Ubiquitinylierung von HIF1 α beteiligt ist (Semenza 2002). Hierdurch wird HIF1 α für den Abbau durch das Proteasom markiert. Im Falle einer Hypoxie wird HIF1 α nicht hydroxyliert, was die Bindung von pVHL und somit die Ubiquitinylierung verhindert. Damit ist HIF1 α vor dem Abbau durch das Proteasom geschützt, kann in den Zellkern migrieren und mit HIF1 β ein Heterodimer bilden, welches an regulative Elemente Hypoxie-induzierbarer Gene bindet und deren Transkription initiiert. Hierzu zählen unter anderem VEGF und EPO (Fandrey 2004; Stockmann et al. 2006; Fong 2008). Die Expression von HIF1 α wiederum steht unter der Kontrolle eines NF-KB bindenden Promotors (Taylor et al. 2009), umgekehrt reguliert pVHL über die HIF-Aktivität die Expression von NF-KB (An, Fisher et al. 2005; Qi et al. 2003; An & Rettig 2005). In der Tat wurden Hinweise gefunden, dass eine reduzierte HIF-Aktivität Tumorzellen gegen Bortezomib sensibilisiert, was anscheinend auf eine verminderten NF-KB-Expression zurückzuführen ist (Shin et al. 2008; Veschini et al. 2007). Somit ergibt sich die komplexe Situation, dass die Blockierung des Proteasoms zunächst den Abbau von HIF1 α verhindern und damit eine Migration in den Zellkern gestatten würde. Hierdurch würde NF-KB verstärkt exprimiert und könnte dadurch, trotz Bortezomib-vermittelter Proteasomblockade, konstitutiv in den Zellkern transloziert sein. Dies würde möglicherweise die beobachtete breite Variation der kNF-KB-Konzentration im Resektionsmodell mit Bortezomib-Behandlung erklären. Allerdings wurde diese Hypothese in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht, da die dargestellten Ergebnisse zur Expression von VEGF, HIF1 α -induziert, und von HIF1 α keine Veränderung zwischen Tieren mit und ohne Bortezomib-Applikation zeigten. Interessanterweise beobachteten wir durch Bortezomib-Gabe bei Tieren ohne Resektion eine Erhöhung der VEGF-Expression. Diese trat jedoch nicht bei Tieren auf, die eine Resektion erhielten. Bortezomib erhöht wie zuvor beschrieben die Aktivität von HIF1 α , dieser Effekt wird jedoch anscheinend durch die Auswirkungen der Resektion aufgehoben (Shin et al. 2008).

Zusammengefasst bleibt unklar, über welchen Mechanismus Bortezomib zu den letalen Effekten im Modell der Leberteilresektion führt. Verminderte

Regenerationsleistung, erhöhte Apoptose sowie Hypoxie-Schäden erscheinen auf Grund der Datenlage als untergeordnete oder möglicherweise unbeteiligte Faktoren für die beobachteten Effekte von Bortezomib.

Vor allem in Anbetracht der laufenden Forschung zum Einsatz von Bortezomib im hepatozellulären Karzinom ist es wesentlich, dass im klinischen Betrieb ein Einsatz von Bortezomib innerhalb dieser Tumor-Entität oder auch bei Auftreten von Lebermetastasen als Kontraindikation für zusätzliche oder spätere chirurgische Maßnahmen an der Leber gelten muss. Da eine relativ geringe Dosis von Bortezomib eine Woche vor dem chirurgischen Eingriff bei einer nur 30%igen Leberresektion in Ratten zu deutlich erhöhter Mortalität führte, ist eine exakte Risikoabschätzung bei Patienten von großer Bedeutung, denen eine höhere Dosis über längere Zeiträume verabreicht wird. Bestätigt wird dies durch einen bekannten Fall Bortezomib-induzierter Hepatitis bei Anwendung des Medikaments für das multiple Myelom (Rosinol et al. 2005).

4.5 Ausblick

Leberresektion für verschiedene Indikationen ist bereits seit einiger Zeit eine etablierte Therapie. Es ist umso erstaunlicher, dass nur wenig über die Mechanismen der in der Folge unabdingbaren Regeneration bekannt ist. Vor allem Patienten mit steatotischer oder zirrhotischer Leber können diese chirurgische Therapie nicht erhalten, da bereits kurz nach dem Eingriff ein Versagen der Restleber eintreten kann. Hier wäre ein tieferes Verständnis für die zu Grunde liegenden Prozesse und damit die Möglichkeit darauf Einfluss zu nehmen wünschenswert, z.B. um Regeneration schneller zu initiieren.

Mit der HEPGOL-Studie (Luntz et al. 2005), die den Einsatz von Glycin als pharmakologisches Supplement der Leberresektion in einer groß angelegten multizentrischen Studie untersucht, ist sicherlich ein erster Schritt getan, um bisherige Erkenntnisse in die Klinik zu übertragen.

Vor allem der Beitrag von NF- κ B zu den Prozessen nach Hepatektomie bleibt ungeklärt. Zu vermuten ist, dass NF- κ B je nach den vorliegenden Bedingungen, unterschiedliche Effektorgene reguliert und abhängig von Resektionsumfang, Schwere eines vorhandenen Ischämie/Reperfusionsschadens, Vorschäden des Lebergewebes durch Fett oder Alkohol und vermutlich weiteren Faktoren differenzielle Transkription verschiedener Zielgenkombinationen auslöst. Es existieren einzelne NF- κ B-KO-Modelle (Beg et al. 1995), diese führen jedoch zu gestörter Embryonalentwicklung und pränataler Letalität und auch ein Knockout von regulatorischen Elementen des NF- κ B Signalwegs ist mit nachteiligen Phänotypen verbunden (Beraza et al. 2009; Hou et al. 2008; Rudolph et al. 2000). Erkenntnisse aus diesen Modellen sind begrenzt, da es sich um komplexe und artifizielle Modelle handelt, die sicher Hinweise auf die native Situation geben können, diese aber niemals genau abbilden können. Insgesamt bleiben viele offene Fragen, die vermutlich nur durch weitere Studien an kombinierten Resektions- und Knockout-Modellen beantwortet werden können und deren Transfer in klinische Anwendung, falls möglich, noch geraume Zeit erfordern wird.

Ein wesentliches Problem bei künftigen chirurgischen Eingriffen an der Leber wird die stark steigende Inzidenz der nicht-alkoholischen Lebererkrankungen bzw. der Steatohepatitis sein. Westliche Ernährungsgewohnheiten und zu wenig Bewegung führen zu Übergewicht und in Folge dessen oft zum metabolischen Syndrom, das häufig mit Fettlebererkrankungen assoziiert ist (Bedogni et al. 2005; Angulo 2005; Ford 2005; Johnson et al. 2009; Kotronen et al. 2010). Wie bereits erwähnt stellen Vorschäden wie Steatose ein erhöhtes Risiko bzw. unter Umständen Ausschlusskriterien für eine chirurgische Intervention an der Leber dar. Insbesondere diesen Patienten könnte in Zukunft eine medikamentöse Unterstützung zu Gute kommen. Weiterführende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe schließen daher die in der vorliegenden Dissertation dargestellten Resektionsmodelle in Kombination mit einer hochkalorischen Diät ein. Erste Daten zeigen, dass der ungünstige klinische Verlauf nach Hepatektomie im Steatose-Modell durch die Verabreichung von VEGF

abgemildert werden kann. Hierzu werden jedoch noch zusätzliche Experimente und Analysen durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Die Leberresektion stellt eine wesentliche kurative Therapie für Tumor-Erkrankungen bzw. Metastasen anderer Karzinome innerhalb der Leber dar. Hierbei ist die grundsätzliche Abfolge von zellulärer Aktivierung, Zytokinausschüttung und Produktion von Wachstumsfaktoren bis hin zur Proliferation der verschiedenen Leberzelltypen bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die bisherigen Erkenntnisse erweitert werden, wobei untersucht wurde:

- der Einfluss des Umfangs einer Leberresektion auf den klinischen Verlauf;
- der Beitrag verschiedener Transkriptionsfaktoren und wesentlicher Signalwege, z.B. des angeborenen Immunsystems (TLR-System), vor allem in Bezug auf die Initiierung der Regeneration;
- die Möglichkeiten der medikamentösen bzw. pharmakologischen Intervention nach Leberteileresektion, um z.B. in steatotischen oder anderweitig vorgeschädigten Lebern regenerative Prozesse zu unterstützen.

Zunächst wurde der Einfluss des Resektionsumfangs auf die Leberregeneration mittels 70%igen sowie 90%igen Hepatektomien im Tiermodell ermittelt. Weiterhin wurde im Modell der 90%igen Leberresektion Glycin als mögliches Supplement evaluiert. Schließlich wurde der Proteasominhibitor Bortezomib, zugelassen zur Therapie des multiplen Myeloms und des Mantelzelllymphoms, sowohl in murinen KC als auch humanen Hepatozyten und im Modell der 70%igen Hepatektomie eingesetzt. Die Wirkung von Bortezomib auf die TLR-4-vermittelte Signalgebung *in vitro* sowie auf den postoperativen Verlauf *in vivo* wurde analysiert.

Es zeigte sich, dass der Resektionsumfang in der Tat einen Einfluss auf den postoperativen Verlauf und die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen hatte. Messbar war dies durch verschlechterte Regeneration, verstärkten Gewebeschaden, verringerte Expression wesentlicher Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie veränderter NF- κ B-Kernlokalisation nach 90%iger Hepatektomie verglichen mit 70%iger Leberteileresektion.

Zuvor war gezeigt worden, dass Fütterung einer Glycin-reichen Diät zu einem deutlich verminderten Leberschaden nach 90%iger Leberresektion führte. Diese Daten konnten in der vorliegenden Arbeit ergänzt werden, wobei eine reduzierte Zelltod-Rate und insbesondere eine abgeschwächte STAT3-Phosphorylierung beobachtet wurden, die als wesentlich für regenerative Prozesse angesehen wird. Eine pharmakologische Verbesserung des klinischen Verlaufs durch Einflussnahme auf molekulare Prozesse nach partieller Hepatektomie mittels oraler Glycin-Gabe ist möglich.

Die *in-vitro*-Behandlung muriner KC und humaner Hepatozyten durch Bortezomib reduzierte bzw. modulierte die TLR-4-induzierte Zytokinproduktion. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Proteasominhibition den NF-KB-Signalweg blockiert. Daher wurde Bortezomib eingesetzt, um im Tiermodell der Leberresektion TLR-4-vermittelte NF-KB-Aktivität zu beeinflussen.

In Verbindung mit Hepatektomien erwies sich eine Bortezomib-Applikation als letal. Während die NF-KB-Kernlokalisierung nach Leberresektion eine hohe Varianz aufwies, änderte sich die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die für die Regeneration relevant sind, nur geringfügig. Auch eine vermehrte Zelltod- bzw. Apoptose-Rate war nicht zu beobachten. HIF1 α oder eine generelle Hypoxieschädigung erscheint nach den vorliegenden Daten ebenfalls nicht oder in geringem Ausmaß an der hohen Letalität beteiligt zu sein.

Die gezeigten Daten erweitern die Kenntnisse über bekannte molekulare Mechanismen der Leberregeneration und zeigen mögliche Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen auf.

6. Literatur

Abreu, M., Fukata, M., Arditi, M., 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J.Immunol.*, 174(8), 4453-4460.

Abshagen, K., Eipel, C., Kalff, J.C., Menger, M.D., Vollmar, B., 2007. Loss of NF-kappaB activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(6), G1570-7.

Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A.A., Dick, L.R., Grenier, L., Klunder, J.M., Ma, Y.T., Plamondon, L., Stein, R.L., 1998. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8(4), 333-8.

Adams, J., 2002. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist.*, 7(1), 9-16.

Adams, J., Palombella, V., Elliott, P., 2000. Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Invest New Drugs*, 18(2), 109-121.

Adams, J., 2004. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews. Cancer*, 4(5), 349-360.

An, J., Fisher, M., Rettig, M.B., 2005. VHL expression in renal cell carcinoma sensitizes to bortezomib (PS-341) through an NF-kappaB-dependent mechanism. *Oncogene*, 24(9), 1563-1570.

An, J. Rettig, M.B., 2005. Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Molecular and Cellular Biology*, 25(17), 7546-7556.

Anan, A., Baskin-Bey, E., Bronk, S., Werneburg, N., Shah, V., Gores, G., 2006. Proteasome inhibition induces hepatic stellate cell apoptosis. *Hepatology*, 43(2), 335-344.

Anan, A., Baskin-Bey, E., Isomoto, H., Mott, J., Bronk, S., Albrecht, J., Gores, G., 2006. Proteasome inhibition attenuates hepatic injury in the bile duct-ligated mouse. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, 291(4), G709-G716.

Angulo, P., 2005. Nonalcoholic fatty liver disease. *Revista De Gastroenterología De México*, 70 Suppl 3, 52-56.

Armeanu, S., Krusch, M., Baltz, K.M., Weiss, T.S., Smirnow, I., Steinle, A., Lauer, U.M., Bitzer, M., Salih, H.R., 2008. Direct and natural killer cell-mediated antitumor effects of low-dose bortezomib in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(11), 3520-8.

Atkinson, T.J., 2008. Toll-like receptors, transduction-effector pathways, and disease diversity: evidence of an immunobiological paradigm explaining all human illness? *International Reviews of Immunology*, 27(4), 255-81.

Bahde, R., Palmes, D., Gemsa, O., Minin, E., Stratmann, U., de Groot, H., Rauen, U., Spiegel, H., 2008. Attenuated cold storage injury of rat livers using a modified HTK solution. *The Journal of Surgical Research*, 146(1), 49-56.

Bandi, P., Garcia, M.L., Booth, C.J., Chisari, F.V., Robek, M.D., 2010. Bortezomib inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), 749-756.

Bataller, R., Brenner, D.A., 2001. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, 21(3), 437-51 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11586471>.

Bataller, R., Brenner, D.A., 2005. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209-218.

Bechmann, L.P., Marquitan, G., Jochum, C., Saner, F., Gerken, G., Canbay, A., 2008. Apoptosis versus necrosis rate as a predictor in acute liver failure following acetaminophen intoxication compared with acute-on-chronic liver failure. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 28(5), 713-716.

Bedogni, G., Miglioli, L., Masutti, F., Tiribelli, C., Marchesini, G., Bellentani, S., 2005. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*, 42(1), 44-52.

Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., Baltimore, D., 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*, 376(6536), 167-170.

Benko, T., Frede, S., Gu, Y., Best, J., Baba, H.A., Schlaak, J.F., de Groot, H., Fandrey, J., Rauen, U., 2010. Glycine Pretreatment Ameliorates Liver Injury After Partial Hepatectomy in

the Rat. *Journal of Investigative Surgery*, 23(1), 12-20.

Beraza, N., Lüdde, T., Assmus, U., Roskams, T., Vander Borgh, S., Trautwein, C., 2007. Hepatocyte-specific IKK gamma/NEMO expression determines the degree of liver injury. *Gastroenterology*, 132(7), 2504-2517.

Beraza, N., Malato, Y., Sander, L.E., Al-Masaoudi, M., Freimuth, J., Riethmacher, D., Gores, G.J., Roskams, T., Liedtke, C., Trautwein, C., 2009. Hepatocyte-specific NEMO deletion promotes NK/NKT cell- and TRAIL-dependent liver damage. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(8), 1727-1737.

Berg, M., Wingender, G., Djandji, D., Hegenbarth, S., Momburg, F., Hämmerling, G., Limmer, A., Knolle, P., 2006. Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to tumor-specific CD8+ T cell tolerance. *European Journal of Immunology*, 36(11), 2960-2970.

Berry, M., Grivell, A., Grivell, M., Phillips, J., 1997. Isolated hepatocytes - past, present and future. *Cell Biology and Toxicology*, 13(4), 223-233.

Blade, J., Cibeira, M., Rosinol, L., 2005. Bortezomib: a valuable new antineoplastic strategy in multiple myeloma. *Acta Oncol.*, 44(5), 440-448.

Bockhorn, M., Goralski, M., Prokofiev, D., Dammann, P., Grunewald, P., Trippler, M., Biglarnia, A., Kamler, M., Niehues, E., Frilling, A., Broelsch, C., Schlaak, J., 2007. VEGF is important for early liver regeneration after partial hepatectomy. *J.Surg.Res.*, 138(2), 291-299.

Bockhorn, M., Schollmann, S., Opitz, B., Sotiropoulos, G., Sheu, S., Niehaus, E., Trippler, M., Frilling, A., Broelsch, C., Schlaak, J., 2007. Vascular endothelial growth factor does not improve liver regeneration and survival after 90% subtotal liver resection. *Hepatol.Res.*, 37(5), 353-359.

Breitkopf, K., Godoy, P., Ciucian, L., Singer, M.V., Dooley, S., 2006. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 44(1), 57-66.

Brockes, J.P. Kumar, A., 2005. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5756), 1919-1923.

Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193.

- Calvaruso, G., Giuliano, M., Portanova, P., De, B.A., Vento, R., Tesoriere, G., 2006. Bortezomib induces in HepG2 cells IkappaBalpha degradation mediated by caspase-8. *Mol.Cell Biochem.*, 287(1-2), 13-19.
- Campbell, J., Riehle, K., Brooling, J., Bauer, R., Mitchell, C., Fausto, N., 2006. Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4. *J.Immunol.*, 176(4), 2522-2528.
- Carini, R., Bellomo, G., Grazia De Cesaris, M., Albano, E., 1997. Glycine protects against hepatocyte killing by KCN or hypoxia by preventing intracellular Na⁺ overload in the rat. *Hepatology*, 26(1), 107-112.
- Carrera-Silva, E.A., Carolina, C.R., Natalia, G., Pilar, A.M., Andrea, P., Gea, S., 2008. TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during Trypanosoma cruzi acute infection. *Molecular Immunology*, 45(13), 3580-8.
- Cassiman, D., Libbrecht, L., Desmet, V., Deneef, C., Roskams, T., 2002. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *Journal of Hepatology*, 36(2), 200-209.
- Cavaletti, G., Gilardini, A., Canta, A., Rigamonti, L., Rodriguez-Menendez, V., Ceresa, C., Marmioli, P., Bossi, M., Oggioni, N., D'Incalci, M., De, C.R., 2007. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: a neurophysiological and pathological study in the rat. *Exp.Neurol.*, 204(1), 317-325.
- Chen, K., Yeh, P., Hsu, C., Hsu, C., Lu, Y., Hsieh, H., Chen, P., Cheng, A., 2009. Bortezomib Overcomes Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Resistance in Hepatocellular Carcinoma Cells in Part through the Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(17), 11121-11133.
- Chen, K., Yeh, P., Yeh, K., Lu, Y., Huang, S., Cheng, A., 2008. Down-regulation of phospho-Akt is a major molecular determinant of bortezomib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*, 68(16), 6698-6707.
- Clementi, A.H., Gaudy, A.M., van Rooijen, N., Pierce, R.H., Mooney, R.A., 2009. Loss of Kupffer cells in diet-induced obesity is associated with increased hepatic steatosis, STAT3 signaling, and further decreases in insulin signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1792(11), 1062-1072.

Cornell, R.P., 1985a. Gut-derived endotoxin elicits hepatotrophic factor secretion for liver regeneration. *The American Journal of Physiology*, 249(5 Pt 2), R551-62.

Cornell, R.P., 1985b. Restriction of gut-derived endotoxin impairs DNA synthesis for liver regeneration. *The American Journal of Physiology*, 249(5 Pt 2), R563-9.

Cornell, R.P., Liljequist, B.L., Bartizal, K.F., 1990. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology*, 11(6), 916-22.

Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., Knolle, P.A., 2008. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology*, 47(1), 296-305.

Dr. rer. nat. Bröring, R., 2008. Direkte und indirekte in vitro Suppression der Replikation subgenomischer Hepatitis C Virus Replicons. Available at: <http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/servlets/DocumentServlet?id=18099> [Accessed June 4, 2010].

Duncan, A.W., Dorrell, C., Grompe, M., 2009. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*, 137(2), 466-481.

Emanuele, S., Lauricella, M., Carlisi, D., Vassallo, B., D'Anneo, A., Di, F.P., Vento, R., Tesoriere, G., 2007. SAHA induces apoptosis in hepatoma cells and synergistically interacts with the proteasome inhibitor Bortezomib. *Apoptosis*, 12(7), 1327-1338.

Emond, J., Capron-Laudereau, M., Meriggi, F., Bernuau, J., Reynes, M., Houssin, D., 1989. Extent of hepatectomy in the rat. Evaluation of basal conditions and effect of therapy. *Eur.Surg.Res.*, 21(5), 251-259.

Erim, Y., Beckmann, M., Valentin-Gamazo, C., Malago, M., Frilling, A., Schlaak, J., Gerken, G., Broelsch, C., Senf, W., 2006. Quality of life and psychiatric complications after adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl.*, 12(12), 1782-1790.

Estacion, M., Weinberg, J.S., Sinkins, W.G., Schilling, W.P., 2003. Blockade of maitotoxin-induced endothelial cell lysis by glycine and L-alanine. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 284(4), C1006-1020.

Fandrey, J., 2004. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(6), R977-88.

Fausto, N., 1991. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Prog.Growth Factor Res.*, 3(3), 219-234.

Fausto, N. Campbell, J., 2003. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech.Dev.*, 120(1), 117-130.

Fausto, N., Campbell, J., Riehle, K., 2006. Liver regeneration. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1), S45-S53.

Fausto, N., Laird, A., Webber, E., 1995. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.*, 9(15), 1527-1536.

Fausto, N. Riehle, K., 2005. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J.Hepatobiliary.Pancreat.Surg.*, 12(3), 181-189.

Feldstein, A.E., Wieckowska, A., Lopez, A.R., Liu, Y., Zein, N.N., McCullough, A.J., 2009. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology*, 50(4), 1072-1078.

Feverly, J., Van Damme, B., Michiels, R., De Groote, J., Heirwegh, K.P., 1972. Bilirubin conjugates in bile of man and rat in the normal state and in liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(9), 2482-2492.

FitzGerald, M., Webber, E., Donovan, J., Fausto, N., 1995. Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ.*, 6(4), 417-427.

Florman, S. Miller, C., 2006. Live donor liver transplantation. *Liver Transpl.*, 12(4), 499-510.

Fong, G., 2008. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis*, 11(2), 121-40.

Ford, E.S., 2005. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care*, 28(11), 2745-2749.

Frank, A., Rauen, U., de Groot, H., 2000. Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *Journal of Hepatology*, 32(1), 58-66.

Freedman, A., Sharma, R., Nabel, G., Emerson, S., Griffin, G., 1992. Cellular distribution of nuclear factor kappa B binding activity in rat liver. *Biochem.J.*, 287 (Pt 2), 645-649.

Froh, M., Zhong, Z., Walbrun, P., Lehnert, M., Netter, S., Wiest, R., Conzelmann, L., Gabele, E., Hellerbrand, C., Scholmerich, J., Thurman, R., 2008. Dietary glycine blunts liver injury after bile duct ligation in rats. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(39), 5996-6003.

Ganten, T., Koschny, R., Haas, T., Sykora, J., Li-Weber, M., Herzer, K., Walczak, H., 2005. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology*, 42(3), 588-597.

Giakoustidis, D.E., Giakoustidis, A.E., Iliadis, S., Koliakou, K., Antoniadis, N., Kontos, N., Papanikolaou, V., Papageorgiou, G., Kaldrimidou, E., Takoudas, D., 2010. Attenuation of liver ischemia/reperfusion induced apoptosis by epigallocatechin-3-gallate via down-regulation of NF-kappaB and c-Jun expression. *The Journal of Surgical Research*, 159(2), 720-728.

Gilmore, T.D., 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680-6684.

Grivennikov, S.I. Karin, M., 2010. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(1), 11-19.

Gu, X., Qiu, Y., Xu, F., Jiang, Y., Ding, Y., 2004. In vivo suppressive effect of nuclear factor-kappaB inhibitor on neutrophilic inflammation of grafts after orthotopic liver transplantation in rats. *World J.Gastroenterol.*, 10(24), 3654-3658.

Guguen-Guillouzo, C., Campion, J.P., Brissot, P., Glaise, D., Launois, B., Bourel, M., Guillouzo, A., 1982. High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biology International Reports*, 6(6), 625-628.

Haglund, U.H., Norén, A., Urdzik, J., Duraj, F.F., 2008. Right hemihepatectomy. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 12(7), 1283-1287.

Hang, H., Shi, X., Gu, G., Wu, Y., Ding, Y., 2009. A simple isolation and cryopreservation method for adult human hepatocytes. *The International journal of artificial organs*, 32(10), 720-7.

Harder, R., Uhlig, H., Kashan, A., Schütt, B., Duijvestijn, A., Butcher, E.C., Thiele, H.G., Hamann, A., 1991. Dissection of murine lymphocyte-endothelial cell interaction mechanisms by SV-40-transformed mouse endothelial cell lines: novel mechanisms mediating basal binding, and alpha 4-integrin-dependent cytokine-induced adhesion. *Experimental Cell Research*, 197(2), 259-267.

Hasegawa, K., Kokudo, N., Makuuchi, M., 2007. Surgical management of hepatocellular carcinoma. Liver resection and liver transplantation. *Saudi Medical Journal*, 28(8), 1171-1179.

Hayden, M.S., West, A.P., Ghosh, S., 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*, 25(51), 6758-6780.

He, S., Atkinson, C., Qiao, F., Cianflone, K., Chen, X., Tomlinson, S., 2009. A complement-dependent balance between hepatic ischemia/reperfusion injury and liver regeneration in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(8), 2304-2316.

Heine, H. Lien, E., 2003. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int.Arch.Allergy Immunol.*, 130(3), 180-192.

Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., Anderson, K.C., 2002. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16639-47.

Higgins, G. Andersson, T., 1931. Experimental pathology of the liver: 1. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 12, 186.

Hou, Y., Li, F., Karin, M., Ostrowski, M.C., 2008. Analysis of the IKKbeta/NF-kappaB signaling pathway during embryonic angiogenesis. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 237(10), 2926-2935.

Hritz, I., Mandrekar, P., Velayudham, A., Catalano, D., Dolganiuc, A., Kodys, K., Kurt-Jones, E., Szabo, G., 2008. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology*, 48(4), 1224-31.

Iimuro, Y., Seki, E., Son, G., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Fujimoto, J., 2007. Role of innate immune response in liver regeneration. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22 Suppl 1, S57-8.

Ikejima, K., Imuro, Y., Forman, D.T., Thurman, R.G., 1996. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *The American Journal of Physiology*, 271(1 Pt 1), G97-103.

Ikejima, K., Qu, W., Stachlewitz, R.F., Thurman, R.G., 1997. Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *The American Journal of Physiology*, 272(6 Pt 1), G1581-6.

Ito, K., Ozasa, H., Noda, Y., Koike, Y., Arii, S., Horikawa, S., 2008. Effect of non-essential amino acid glycine administration on the liver regeneration of partially hepatectomized rats with hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 27(5), 773-80.

Jin, X., Zimmers, T., Perez, E., Pierce, R., Zhang, Z., Koniaris, L., 2006. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology*, 43(3), 474-484.

Johnson, W.D., Kroon, J.J.M., Greenway, F.L., Bouchard, C., Ryan, D., Katzmarzyk, P.T., 2009. Prevalence of risk factors for metabolic syndrome in adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2001-2006. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 163(4), 371-377.

Kandilis, A.N., Koskinas, J., Tiniakos, D.G., Nikiteas, N., Perrea, D.N., 2010. Liver regeneration: focus on cell types and topographic differences. *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Européennes*, 44(1), 1-12.

Kane, R.C., Bross, P.F., Farrell, A.T., Pazdur, R., 2003. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *The Oncologist*, 8(6), 508-13.

Kassahun, W., Fangmann, J., Harms, J., Hauss, J., Bartels, M., 2006. Liver resection and transplantation in the management of hepatocellular carcinoma: a review. *Exp.Clin.Transplant*, 4(2), 549-558.

Kawano, S., Kubota, T., Monden, Y., Tsutsumi, T., Inoue, T., Kawamura, N., Tsutsui, H., Sunagawa, K., 2006. Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival after myocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(3), H1337-1344.

Koschny, R., Ganten, T., Sykora, J., Haas, T., Sprick, M., Kolb, A., Stremmel, W., Walczak, H., 2007. TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis within a therapeutic window. *Hepatology*, 45(3), 649-658.

Kotronen, A., Yki-Järvinen, H., Männistö, S., Saarikoski, L., Korpi-Hyövälti, E., Oksa, H., Saltevo, J., Saaristo, T., Sundvall, J., Tuomilehto, J., Peltonen, M., 2010. Non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease - two diseases of affluence associated with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the FIN-D2D survey. *BMC Public Health*, 10, 237.

Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., Tanaka, E.M., 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 460(7251), 60-65.

Kuramitsu, S., Inoue, K., Kondo, K., Aki, K., Kagamiyama, H., 1985. Aspartate aminotransferase isozymes from rabbit liver. Purification and properties. *Journal of Biochemistry*, 97(5), 1337-1345.

Laschke, M.W., Schwender, C., Scheuer, C., Vollmar, B., Menger, M.D., 2008. Dietary glycine does not affect physiological angiogenesis and reproductive function, but inhibits apoptosis in endometrial and ovarian tissue by down-regulation of nuclear factor-kappaB. *Fertility and Sterility*, 90(4 Suppl), 1460-1469.

Laura, R., Cibeira, M., Uriburu, C., Yantorno, S., Salamero, O., Blade, J., Montserrat, E., 2006. Bortezomib: an effective agent in extramedullary disease in multiple myeloma. *Eur.J.Haematol.*, 76(5), 405-408.

Laurent, S., Horsmans, Y., Starkel, P., Leclercq, I., Sempoux, C., Lambotte, L., 2005. Disrupted NF- kappa B activation after partial hepatectomy does not impair hepatocyte proliferation in rats. *World J.Gastroenterol.*, 11(46), 7345-7350.

Lechler, R., Sykes, M., Thomson, A., Turka, L., 2005. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nat.Med.*, 11(6), 605-613.

Li, M., Carpio, D.F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R.M., Beg, A.A., 2001. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *Journal of Immunology*, 166(12), 7128-7135.

Li, X., Bradford, B.U., Wheeler, M.D., Stimpson, S.A., Pink, H.M., Brodie, T.A., Schwab, J.H., Thurman, R.G., 2001. Dietary glycine prevents peptidoglycan polysaccharide-induced reactive arthritis in the rat: role for glycine-gated chloride channel. *Infection and Immunity*, 69(9), 5883-5891.

Liu, Z., Yan, L., Li, S., You, H., Gong, J., 2006. Glycine blunts transplantative liver ischemia-reperfusion injury by downregulating interleukin 1 receptor associated kinase-4. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(11), 1479-86.

Lu, C., Gallegos, R., Li, P., Xia, C., Pusalkar, S., Uttamsingh, V., Nix, D., Miwa, G., Gan, L., 2006. Investigation of drug-drug interaction potential of bortezomib in vivo in female Sprague-Dawley rats and in vitro in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.*, 34(4), 702-708.

Luedde, T., Assmus, U., Wustefeld, T., Meyer, Z., Roskams, T., Schmidt-Supprian, M., Rajewsky, K., Brenner, D., Manns, M., Pasparakis, M., Trautwein, C., 2005. Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury. *J.Clin.Invest.*, 115(4), 849-859.

Luedde, T., Beraza, N., Kotsikoris, V., van Loo, G., Nenci, A., De Vos, R., Roskams, T., Trautwein, C., Pasparakis, M., 2007. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 11(2), 119-132.

Luntz, S.P., Unnebrink, K., Seibert-Grafe, M., Bunzendahl, H., Kraus, T.W., Büchler, M.W., Klar, E., Schemmer, P., 2005. HEGPOL: randomized, placebo controlled, multicenter, double-blind clinical trial to investigate hepatoprotective effects of glycine in the postoperative phase of liver transplantation [ISRCTN69350312]. *BMC Surgery*, 5, 18.

Malhi, H. Gores, G.J., 2008. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology*, 134(6), 1641-1654.

Malik, R., Selden, C., Hodgson, H., 2002. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13(6), 425-431.

Marcos, A., Fisher, R.A., Ham, J.M., Shiffman, M.L., Sanyal, A.J., Luketic, V.A., Sterling, R.K., Posner, M.P., 1999. Right lobe living donor liver transplantation. *Transplantation*, 68(6), 798-803.

Marsh, D.C., Hjelmhaug, J.A., Vreugdenhil, P.K., Belzer, F.O., Southard, J.H., 1991. Glycine prevention of cold ischemic injury in isolated hepatocytes. *Cryobiology*, 28(1), 105-109.

Marsh, D.C., Vreugdenhil, P.K., Mack, V.E., Belzer, F.O., Southard, J.H., 1993. Glycine protects hepatocytes from injury caused by anoxia, cold ischemia and mitochondrial inhibitors, but not injury caused by calcium ionophores or oxidative stress. *Hepatology*, 17(1), 91-98.

Mauriz, J.L., Matilla, B., Culebras, J.M., González, P., González-Gallego, J., 2001. Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(10), 1236-1244.

Mayo, M.W., Norris, J.L., Baldwin, A.S., 2001. Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. *Methods in Enzymology*, 333, 73-87.

McConkey, D.J. Orrenius, S., 1996. Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 14(6), 619-631.

Michalopoulos, G.K. DeFrances, M.C., 1997. Liver regeneration. *Science*, 276(5309), 60-66.

Middleton, P.F., Duffield, M., Lynch, S.V., Padbury, R.T.A., House, T., Stanton, P., Verran, D., Maddern, G., 2006. Living donor liver transplantation--adult donor outcomes: a systematic review. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 12(1), 24-30.

Min, J., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W.G., Pavletich, N.P., 2002. Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*, 296(5574), 1886-1889.

Mortensen, K.E., Conley, L.N., Nygaard, I., Sorensen, P., Mortensen, E., Bendixen, C., Revhaug, A., 2010. Increased sinusoidal flow is not the primary stimulus to liver regeneration. *Comparative Hepatology*, 9, 2.

Muriel, P., 2009. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology International*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941170> [Accessed June 23, 2010].

Murillo, L.S., Morré, S.A., Peña, A.S., 2003. Toll-like receptors and NOD/CARD proteins: pattern recognition receptors are key elements in the regulation of immune response. *Drugs of Today*, 39(6), 415-438.

Nakano, K. Vousden, K.H., 2001. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell*, 7(3), 683-694.

Naumann, M., 2000. Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. *Biochemical Pharmacology*, 60(8), 1109-1114.

Nencioni, A., Schwarzenberg, K., Brauer, K., Schmidt, S., Ballestrero, A., Grunebach, F., Brossart, P., 2006. Proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation. *Blood*, 108(2), 551-558.

Nencioni, A., Wille, L., Dal, B.G., Boy, D., Cirmena, G., Wesselborg, S., Belka, C., Brossart, P., Patrone, F., Ballestrero, A., 2005. Cooperative cytotoxicity of proteasome inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in chemoresistant Bcl-2-overexpressing cells. *Clin.Cancer Res.*, 11(11), 4259-4265.

Nishimura, Y., Lemasters, J.J., 2001. Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death and Differentiation*, 8(8), 850-858.

Nishimura, Y., Romer, L.H., Lemasters, J.J., 1998. Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine. *Hepatology*, 27(4), 1039-1049.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N., 2000. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288(5468), 1053-1058.

Oltean, M., Pullerits, R., Zhu, C., Blomgren, K., Hallberg, E.C., Olausson, M., 2007. Donor pretreatment with FK506 reduces reperfusion injury and accelerates intestinal graft recovery in rats. *Surgery*, 141(5), 667-677.

Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., Donner, D.B., 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401(6748), 82-85.

Papageorgiou, A., Kamat, A., Benedict, W., Dinney, C., McConkey, D., 2006. Combination therapy with IFN-alpha plus bortezomib induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human bladder cancer cells. *Mol.Cancer Ther.*, 5(12), 3032-3041.

Park, H.S., Jung, H.Y., Park, E.Y., Kim, J., Lee, W.J., Bae, Y.S., 2004. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *Journal of Immunology*, 173(6), 3589-93.

-
- Peter Kirkpatrick (Editor), 2004. CANCER. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(7), S6-S10.
- Pfaffl, M., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9), e45.
- Pol, S., Bousquet-Lemerrier, B., Pave-Preux, M., Pawlak, A., Nalpas, B., Berthelot, P., Hanoune, J., Barouki, R., 1988. Nucleotide sequence and tissue distribution of the human mitochondrial aspartate aminotransferase mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157(3), 1309-1315.
- Pugh, C.W. Ratcliffe, P.J., 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine*, 9(6), 677-84.
- Qi, H. Ohh, M., 2003. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Research*, 63(21), 7076-7080.
- Qu, W., Ikejima, K., Zhong, Z., Waalkes, M.P., Thurman, R.G., 2002. Glycine blocks the increase in intracellular free Ca²⁺ due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(6), G1249-56.
- Rai, R., Yang, S., McClain, C., Karp, C., Klein, A., Diehl, A., 1996. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am.J.Physiol*, 270(6 Pt 1), G909-G918.
- Rentsch, M., Puellmann, K., Sirek, S., Iesalnieks, I., Kienle, K., Mueller, T., Bolder, U., Geissler, E., Jauch, K., Beham, A., 2005. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 18(9), 1079-89.
- Rosinol, L., Montoto, S., Cibeira, M., Blade, J., 2005. Bortezomib-induced severe hepatitis in multiple myeloma: a case report. *Arch.Intern.Med.*, 165(4), 464-465.
- Ruan, W. Lai, M., 2007. Actin, a reliable marker of internal control? *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 385(1-2), 1-5.
- Rudolph, D., Yeh, W.C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A.J., Mak, T.W., 2000. Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in

NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes & Development*, 14(7), 854-862.

Sakamori, R., Takehara, T., Tatsumi, T., Shigekawa, M., Hikita, H., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N., 2010. STAT3 signaling within hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo. *Journal of Gastroenterology*, 45(2), 244-248.

Salazar-Montes, A., Ruiz-Corro, L., Sandoval-Rodriguez, A., Lopez-Reyes, A., Mendariz-Borunda, J., 2006. Increased DNA binding activity of NF-kappaB, STAT-3, SMAD3 and AP-1 in acutely damaged liver. *World J.Gastroenterol.*, 12(37), 5995-6001.

Schemmer, P., Bradford, B.U., Rose, M.L., Bunzendahl, H., Raleigh, J.A., Lemasters, J.J., Thurman, R.G., 1999. Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *The American Journal of Physiology*, 276(4 Pt 1), G924-32.

Schemmer, P., Bunzendahl, H., Thurman, R.G., 1998. [Preparing the donor with glycine improves survival after liver transplantation in the animal model]. *Langenbecks Archiv Für Chirurgie. Supplement. Kongressband. Deutsche Gesellschaft Für Chirurgie. Kongress*, 115(Suppl I), 589-93.

Schemmer, P., Enomoto, N., Bradford, B.U., Bunzendahl, H., Raleigh, J.A., Lemasters, J.J., Thurman, R.G., 2001. Activated Kupffer cells cause a hypermetabolic state after gentle in situ manipulation of liver in rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(6), G1076-82.

Schemmer, P., Golling, M., Kraus, T., Mayatepek, E., Herfarth, C., Klar, E., 2001. Glycine reduces reperfusion injury in human liver transplantation: our first patients. *Transplantation Proceedings*, 33(7-8), 3750-3752.

Schemmer, P., Golling, M., Kraus, T., Mehrabi, A., Mayatepek, E., Herfarth, C., Klar, E., 2002. Extended experience with glycine for prevention of reperfusion injury after human liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, 34(6), 2307-2309.

Schemmer, P., Schoonhoven, R., Swenberg, J.A., Bunzendahl, H., Thurman, R.G., 1998. Gentle in situ liver manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation: role of Kupffer cells. *Transplantation*, 65(8), 1015-20.

Schemmer, P., Mehrabi, A., Kraus, T., Sauer, P., Gutt, C., Uhl, W., Büchler, M.W., 2004. New aspects on reperfusion injury to liver--impact of organ harvest. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 19 Suppl 4, iv26-35.

Schwabe, R., Seki, E., Brenner, D., 2006. Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology*, 130(6), 1886-1900.

Seki, E., Tsutsui, H., Iimuro, Y., Naka, T., Son, G., Akira, S., Kishimoto, T., Nakanishi, K., Fujimoto, J., 2005. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology*, 41(3), 443-450.

Seki, E. Brenner, D.A., 2008. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(1), 322-35.

Semenza, G., 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 993-8.

Serracino-Inglott, F., Habib, N., Mathie, R., 2001. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Surg.*, 181(2), 160-166.

Shen, X., Ke, B., Zhai, Y., Gao, F., Tsuchihashi, S., Lassman, C.R., Busuttil, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W., 2007. Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 13(10), 1435-43.

Shin, D.H., Chun, Y., Lee, D.S., Huang, L.E., Park, J., 2008. Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*, 111(6), 3131-3136.

Shin, H., Kim, D., Lee, Y., Yoo, H., Lee, B.J., Kim, J.S., Jang, S., Lim, H., Lee, Y., Oh, S., 2009. Alteration of sphingolipid metabolism and pSTAT3 expression by dietary cholesterol in the gallbladder of hamsters. *Archives of Pharmacal Research*, 32(9), 1253-1262.

Shiratori, Y., Kawase, T., Komatsu, Y., Hikiba, Y., Okano, K., Kamii, K., Omata, M., 1995. Endotoxin induced cellular communication in the liver: murine models for clarification of the role of LPS-responsive macrophages in the pathogenesis of liver diseases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 10 Suppl 1, S97-100.

Shu, R., Zhang, F., Wang, F., Feng, D., Li, X., Ren, W., Wu, X., Yang, X., Liao, X., Huang, L., Wang, Z., 2009. Adiponectin deficiency impairs liver regeneration through attenuating STAT3 phosphorylation in mice. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 89(9), 1043-1052.

Silverman, N. Maniatis, T., 2001. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.*, 15(18), 2321-2342.

Slagboom, P.E., de Leeuw, W.J., Vijg, J., 1990. Messenger RNA levels and methylation patterns of GAPDH and beta-actin genes in rat liver, spleen and brain in relation to aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 53(3), 243-257.

Slotta, J.E., Laschke, M.W., Schilling, M.K., Menger, M.D., Jeppsson, B., Thorlacius, H., 2009. Simvastatin Attenuates Hepatic Sensitization to Lipopolysaccharide After Partial Hepatectomy. *The Journal of Surgical Research*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631345> [Accessed June 7, 2010].

Sohn, D., Totzke, G., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Levkau, B., Jänicke, R.U., 2006. The proteasome is required for rapid initiation of death receptor-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 26(5), 1967-78.

Son, G., Iimuro, Y., Seki, E., Hirano, T., Kaneda, Y., Fujimoto, J., 2007. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(3), G631-9.

Sowa, J., Best, J., Benko, T., Bockhorn, M., Gu, Y., Niehues, E., Bucchi, A., Benedetto-Castro, E., Gerken, G., Rauen, U., Schlaak, J., 2008. Extent of liver resection modulates the activation of transcription factors and the production of cytokines involved in liver regeneration. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(46), 7093-100.

Stockmann, C. Fandrey, J., 2006. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33(10), 968-979.

Su, G., Klein, R., Aminlari, A., Zhang, H., Steinstraesser, L., Alarcon, W., Remick, D., Wang, S., 2000. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology*, 31(4), 932-936.

Su, G., Wang, S., Aminlari, A., Tipoe, G., Steinstraesser, L., Nanji, A., 2004. Impaired hepatocyte regeneration in toll-like receptor 4 mutant mice. *Dig.Dis.Sci.*, 49(5), 843-849.

Su, G.L., Goyert, S.M., Fan, M., Aminlari, A., Gong, K.Q., Klein, R.D., Myc, A., Alarcon, W.H., Steinstraesser, L., Remick, D.G., Wang, S.C., 2002. Activation of human and mouse

Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(3), G640-5.

Sun, R. Gao, B., 2004. Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-gamma). *Gastroenterology*, 127(5), 1525-1539.

Sunwoo, J.B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Crowl Bancroft, C., Sausville, E., Adams, J., Elliott, P., Van Waes, C., 2001. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(5), 1419-28.

Tacke, F., Luedde, T., Trautwein, C., 2009. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 36(1), 4-12.

Takahashi, K., Aoki, A., Takimoto, T., Akiba, Y., 2008. Dietary supplementation of glycine modulates inflammatory response indicators in broiler chickens. *The British Journal of Nutrition*, 100(5), 1019-28.

Taylor, C.T. Cummins, E.P., 2009. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1177, 178-184.

Trotter, J.F., Wachs, M., Everson, G.T., Kam, I., 2002. Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from a living donor. *The New England Journal of Medicine*, 346(14), 1074-1082.

Tsan, M. Baochong Gao, 2007. Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research*, 13(1), 6-14.

Tsan, M. Gao, B., 2004. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(3), 514-9.

Veschini, L., Belloni, D., Foglieni, C., Cangi, M.G., Ferrarini, M., Caligaris-Cappio, F., Ferrero, E., 2007. Hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha determines sensitivity of endothelial cells to the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood*, 109(6), 2565-2570.

Voorhees, P.M. Orłowski, R.Z., 2006. The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 189-213.

Wang, H., Park, O., Lafdil, F., Shen, K., Horiguchi, N., Yin, S., Fu, X., Kunos, G., Gao, B., 2010. Interplay of hepatic and myeloid signal transducer and activator of transcription 3 in facilitating liver regeneration via tempering innate immunity. *Hepatology*, 51(4), 1354-1362.

Wang, W., Tang, X., Yao, M., Liang, T., Jin, J., Jiang, Z., Zheng, S., 2008. Safety and efficiency of left hemihepatectomy combined with hepatic artery resection for hilar cholangiocarcinoma with artery infiltration: report of 2 cases. *Canadian Journal of Surgery. Journal Canadien De Chirurgie*, 51(4), 305-307.

Warnecke, G., Schulze, B., Steinkamp, T., Haverich, A., Klima, U., 2006. Glycine application and right heart function in a porcine heart transplantation model. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 19(3), 218-24.

Webber, E., Bruix, J., Pierce, R., Fausto, N., 1998. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology*, 28(5), 1226-1234.

Wenger, R.H., 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(10), 1151-1162.

Wheeler, M.D., Ikejema, K., Enomoto, N., Stacklewitz, R.F., Seabra, V., Zhong, Z., Yin, M., Schemmer, P., Rose, M.L., Rusyn, I., Bradford, B., Thurman, R.G., 1999. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 56(9-10), 843-56.

Wieckowska, A., Zein, N.N., Yerian, L.M., Lopez, A.R., McCullough, A.J., Feldstein, A.E., 2006. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 44(1), 27-33.

Wullaert, A., Verstrepen, L., Van, H.S., dib-Conquy, M., Cornelis, S., Kreike, M., Haegman, M., El, B.K., Sanders, M., Verhelst, K., Carpentier, I., Cavaillon, J., Heyninck, K., Beyaert, R., 2007. LIND/ABIN-3 is a novel lipopolysaccharide-inducible inhibitor of NF-kappaB activation. *J.Biol.Chem.*, 282(1), 81-90.

Xu, F.L., You, H.B., Li, X.H., Chen, X.F., Liu, Z.J., Gong, J.P., 2008. Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells. *American Journal of Surgery*, 196(1), 139-148.

Xu, M., Shuai, X., Yan, M., Zhang, M., Yan, L., 2005. Nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides attenuates ischemia/reperfusion injury in rat liver graft. *World J.Gastroenterol.*, 11(44), 6960-6967.

Xu, M., Suo, Y., Gong, J., Zhang, M., Yan, L., 2004. Augmented regeneration of partial liver allograft induced by nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides-modified dendritic cells. *World J.Gastroenterol.*, 10(4), 573-578.

Xu, Y., Feng, D., Wang, Y., Luo, Q., Xu, L., 2009. STAT3 mediates protection from liver inflammation after partial hepatectomy. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 23(4-6), 379-386.

Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J., Fausto, N., 1997. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94(4), 1441-1446.

Yamanouchi, K., Eguchi, S., Kamohara, Y., Yanaga, K., Okudaira, S., Tajima, Y., Kanematsu, T., 2007. Glycine reduces hepatic warm ischaemia-reperfusion injury by suppressing inflammatory reactions in rats. *Liver International*, 27(9), 1249-1254.

Yang, L., Magness, S., Bataller, R., Rippe, R., Brenner, D., 2005. NF-kappaB activation in Kupffer cells after partial hepatectomy. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, 289(3), G530-G538.

Yang, R., Park, S., Reagan, W.J., Goldstein, R., Zhong, S., Lawton, M., Rajamohan, F., Qian, K., Liu, L., Gong, D., 2009. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology*, 49(2), 598-607.

Yang, W., Zhang, Q., Yu, Z., Song, Q., Liang, H., Xu, X., Zhu, G., Jiang, F., Shi, H., 2005. Effects of nuclear factor-kappaB on rat hepatocyte regeneration and apoptosis after 70% portal branch ligation. *World J.Gastroenterol.*, 11(43), 6775-6779.

Yao, A.H., Yang, Y., Li, X.C., Pu, L.Y., Zhong, J.W., Liu, X.Z., Yu, Y., Zhang, F., Kong, L.B., Wang, X.H., 2010. Hepatic regenerative response in small-sized liver isografts in the rat. *The Journal of Surgical Research*, 161(2), 328-335.

Zhai, Y., Qiao, B., Shen, X., Gao, F., Busuttil, R.W., Cheng, G., Platt, J.L., Volk, H., Kupiec-Weglinski, J.W., 2008. Evidence for the pivotal role of endogenous toll-like receptor 4 ligands in liver ischemia and reperfusion injury. *Transplantation*, 85(7), 1016-22.

Zhai, Y., Shen, X., O'Connell, R., Gao, F., Lassman, C., Busuttill, R.W., Cheng, G., Kupiec-Weglinski, J.W., 2004. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *Journal of Immunology*, 173(12), 7115-9.

Zhong, Z., Wheeler, M.D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendaul, H., Bradford, B., Lemasters, J.J., 2003. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 6(2), 229-40.

Zimmers, T., McKillop, I., Pierce, R., Yoo, J., Koniaris, L., 2003. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology*, 38(2), 326-334.

7. Anhang

Danksagung

Die vorliegende Arbeit und die zu Grunde liegenden Ergebnisse wurden am Institut für Gastroenterologie und Hepatologie am Universitätsklinikum in Essen angefertigt, daher möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerken, dem Direktor der Abteilung, für seinen finanziellen Beitrag, sowie die Bereitstellung seiner Laboratorien bedanken. Insbesondere möchte ich Prof. Dr. Schlaak danken, der mir die Möglichkeit bot in seiner Arbeitsgruppe die behandelten Fragestellungen zu bearbeiten und die gewonnenen Erkenntnisse adäquat zu publizieren. Durch seine Ideen, Anregungen und präzisen Analysen hat er wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und meinen wissenschaftlichen Werdegang mit großer Kompetenz betreut. Ganz besonderen Dank möchte ich an meinen Betreuer Herrn Prof. Dr. Opalka richten, der viele Stunden in die Diskussion und Korrektur der vorliegenden Arbeit investiert hat und diese mit seiner enormen fachlichen Expertise und organisatorischen Kompetenz geprägt hat.

Überaus dankbar bin ich auch Herrn Prof. Dr. Canbay für sein Vertrauen in meine wissenschaftliche Zukunft und sein Verständnis für die Belange dieser Arbeit, was ich nicht als Selbstverständlichkeit erachte.

Ferner möchte ich den Kooperationspartnern Frau Prof. Dr. Rauen vom Institut für physiologische Chemie und Herrn Prof. Dr. Baba vom Institut für Pathophysiologie und Neuropathologie danken. Sie haben mich sowohl durch interessante Diskussionen als auch technische Expertise unterstützt. Hier sind vor allem die technischen Assistentinnen Frau Buschenko, für die Erhebung von Serumparametern, sowie Frau Möllmann hervorzuheben, die mich bei der Anfertigung von Gewebe-Schnitten unterstützte.

Ganz besonders möchte ich den beiden operierenden Ärzten, Herrn Dr. Tamas Benko von der Abteilung für Chirurgie und Transplantationsmedizin an der Semmelweis-Universität Budapest und Frau Dr. Yanli Gu von der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationsmedizin des Universitätsklinikums Essen, für die exzellente Durchführung der beschriebenen Operationen und die freundliche Zusammenarbeit danken. Weiterhin gilt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. Paul, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationsmedizin des Universitätsklinikums Essen sowie allen seinen Kollegen, deren Kooperation unerlässlich für die Verwendung humanen Materials zur Zellisolation war. Insbesondere Herrn Dr. Treckmann möchte ich hier erwähnen, der die damit verbundene Kommunikation und Logistik mit intensivem Aufwand aufrecht erhalten hat. Ich freue mich auf die weitere Kooperation mit der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationsmedizin und hoffe, dass weitere Publikationen aus diesem fruchtbaren Umfeld entstehen werden.

Allen Kollegen aus der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie möchte ich für das hervorragende Arbeitsklima und die angenehme Zusammenarbeit danken. Insbesondere Frau Dr. Bröring und Herrn Dr. Trippler bin ich für viele technische und theoretische Hinweise und erhellende Diskussionen dankbar. Vielen lieben Dank möchte ich an dieser Stelle an die ehemaligen Kolleginnen Frau Tebartz und Frau Driftmann richten, deren praktische Unterstützung mir ein ums andere mal sehr geholfen hat. Auch an Frau Dr. Niehues, Herrn Dr. Best und Herrn Dr. Bockhorn möchte ich meinen Dank richten, die einige der Vorarbeiten geleistet haben, auf denen die vorliegende Arbeit basiert. Außerdem möchte ich Herrn Dr. Marquitan und Herrn Schlattjan für technische Ratschläge und das Teilen ihrer großen Erfahrung zu Apoptose und RT-PCR danken. Ebenso dankbar bin ich dem ehemaligen Kollegen Herrn Dr. Schreiter, der die Methode der Zellisolation aus Humangewebe in unserem Labor etabliert und mir die Anwendung ausgezeichnet vermittelt hat. Mein Dank gilt auch Frau Kleinehr, Frau Poggenpohl, Frau Real, Frau Sydor und Herrn Metti für deren fröhliche Art und die daraus resultierende angenehme, wie auch fachlich überaus kompetente Zusammenarbeit. Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau

Beste für die technische Unterstützung und Beratung bei den Transfektionsexperimenten bedanken, sowie für ihr organisatorisches Talent, ohne das unser Labor vermutlich noch chaotischer wäre. Ich danke Frau Prof. Dr. Cario für zur Verfügung gestellte Materialien und Diskussionen im gemeinsamen Journal-Club.

Weiterhin möchte ich meine Dankbarkeit an Frau Dr. Galow und Frau Gigel, vom Institut für Hämatologie, sowie Frau Ey und Frau Eyking für viele anregende, mental fordernde, fachübergreifende Diskussionen, für diverse abstrahierte Projektionen und für ihre Freundschaft ausdrücken.

Ferner danke ich allen Kolleginnen, Kollegen und Kooperationspartnern, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, was sicherlich keinen Mangel an Wertschätzung bedeutet, sondern einzig auf ein schlechtes Gedächtnis meinerseits zurückzuführen ist.

Für ihre Unterstützung und ihr Verständnis für meine terminlichen Unpässlichkeiten möchte ich allen meinen Freunden und Verwandten meinen aufrichtigsten Dank aussprechen. Insbesondere möchte ich meinem engen Freund Mario Montag für seine unvergleichliche Art danken, mir und Anderen in Wort und Tat zur Seite zu stehen.

In allergrößter Dankbarkeit und Liebe möchte ich diese Arbeit meiner Mutter widmen, ohne die ich nicht der wäre, der ich bin und ohne die diese Arbeit folglich unmöglich entstanden wäre. Für von ihr erhaltene Unterstützung und Zuspruch kann ich mich gar nicht genug bedanken.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der KFO117 „Optimierung der Leberlebendspende“, Projekt B IV, von der DFG gefördert.