
UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Björn Nashan FACS, FRCSC

Stellv. Direktor der Klinik: Priv.-Doz. Dr. med. Lutz Fischer

Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. X. Rogiers

Onkologische Aspekte der zytoprotektiven Response im atrophischen Lebergewebe nach einer Pfortaderastligatur

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Awad Abdulgawad

aus

Damanhour / Ägypten

Uetersen 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
am: 01.02.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Priv.-Doz. Dr. med. Lutz Fischer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gisa Tiegs

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Lars Müller

Inhaltsverzeichnis

1. Einführungstheorie	5
2. Einleitung	6
2.1. Das präklinische Modell der Pfortaderastligatur	6
2.2. Klinische Bedeutung der Pfortaderastokklusion	6
2.3. Onkologische Aspekte der Pfortaderastokklusion	7
2.4. Molekulare Steuerung von Leberregeneration und Leberatrophie nach einer partiellen Hepatektomie bzw. einer Pfortaderastokklusion	9
2.5. Hämodynamische Veränderungen nach Pfortaderastligatur und partieller Hepatektomie	9
2.6. Systemische Auswirkungen der Pfortaderastligatur und partieller Hepatektomie	10
2.7. Charakterisierung der in der Arbeit untersuchten Faktoren	11
2.7.1. <i>Early-growth-response-1 (egr-1)</i>	11
2.7.2. <i>Heme oxygenase-1 (hmx-1)</i>	12
2.7.3. <i>Heat shock protein (hsp-70)</i>	13
2.7.4. Das Plasminogen-Aktivator-Inhibitorsystem	14
2.7.4.1. <i>Urokinase-typeplasminogen activator (uPA)</i>	15
2.7.4.2. <i>Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR)</i>	15
2.7.4.3. <i>Plasminogen activator-inhibitor (pai-1)</i>	15
2.8. Entwicklung der Fragestellung	16
2.9. Experimenteller Ansatz	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Materialien	19
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien	19
3.1.2. Lösung und Puffer	20
3.1.3. Primer	21
3.2. Tiere	22
3.3. Operationsverfahren	23
3.3.1. Partielle Hepatektomie (PH)	23
3.3.2. Pfortaderastligatur (PAL)	23
3.3.3. Scheinoperation (SO)	23
3.3.4. Kontrolltiere (K)	24

3.4. Probenentnahme	24
3.5. RNA-Isolation	24
3.6. Herstellung der Digoxigenin (DIG)-markierten cDNA-Einzelstrang-Sonden	25
3.6.1. Polymerase-Kettenreaktion revers-transkribierter Gesamt-RNA (RT-PCR)	26
3.6.2. Standard-PCR	27
3.6.3. Sequenzierung	27
3.6.4. DIG-PCR	28
3.7. Northern Blot	29
3.8. Hybridisierung	30
3.9. Detektion der DIG markierten Nucleinsäuren	32
3.10. Rehybridisierung	33
3.11. Statistische Methoden	33
4. Ergebnisse	34
4.1. Makroskopische Veränderungen im Lebergewebe nach Pfortaderastligatur (PAL)	34
4.2. Mikroskopische Veränderungen im Lebergewebe nach Pfortaderastligatur (PAL)	36
4.3. Expression des Histon-Protein 2B	37
4.4. Expression von egr-1	38
4.5. Expression von hmox-1	39
4.6. Expression von hsp-70	41
4.7. Expression von uPA und uPAR	43
4.8. Expression des pai-1	44
5. Diskussion	45
6. Zusammenfassung	56
7. Abkürzungen	58
8. Literaturverzeichnis	61
9. Danksagung	76
10. Lebenslauf	77
11. Eidesstattliche Versicherung	78

1. Einführungstheorie

Die präoperative Pfortaderastokklusion wird in der onkologischen Leberchirurgie eingesetzt zur Induktion einer Hypertrophie des nach Resektion verbleibenden, nicht-okkludierten Restlebergewebes, wobei der portal-okkludierte Leberanteil atrophiert. Die hämodynamischen und molekularen Grundlagen dieser Volumenverschiebung sind noch wenig erforscht. Klinische Daten legen nahe, dass als unerwünschter Nebeneffekt dieser Prozedur ein stärkeres Wachstum von Tumoren, die im geplanten Resektionsbereich lokalisiert sind, auftritt. Hierdurch könnte das rezidivfreie Überleben nach der späteren Leberresektion beeinträchtigt sein.

Man kann die Hypothese aufstellen, dass die Pfortaderastembolisation einen massiven Stress in der Leber auslöst, der zur gesteigerten Aktivierung von zellulären und molekularen Faktoren führt, welche wiederum einen Einfluss auf die Entwicklung des Tumors haben könnten.

Die Tumordinvasion und Angiogenese wird sowohl durch intra- und extrazelluläre Faktoren der Tumorzellen, als auch durch solche des umgebenden Wirtsgewebes moduliert. Ziel dieser Arbeit ist dabei die Untersuchung, ob es im Rahmen der Leberatrophy zu molekularen Veränderungen von Tumordinvasions- und Angiogenesefaktoren im Wirtsgewebe kommt. Hierzu wurde die Expression der *early-growth-response* (*egr-1*), *heat-shock-protein-70* (*hsp-70*) und *heme-oxygenase-1* (*hmox-1*) im Lebergewebe nach Pfortaderastokklusion in einem Kleintiermodell untersucht. Zusätzlich wurde das Plasminogen-Aktivator-Inhibitorsystem, bestehend aus urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA), seinem zellulären Rezeptor (uPAR) und seinem Inhibitor (*pai-1*), im Pfortaderastokklusionsmodell evaluiert. Alle genannten Faktoren wurden als bedeutsam im Rahmen der Tumorprogression und Angiogenese charakterisiert.

2. Einleitung

2.1. Das präklinische Modell der Pfortaderastligatur

Die ausgeprägte Fähigkeit der Leber zur Regeneration nach einer Schädigung oder einer Teilentfernung wurde erstmals durch das Modell der partiellen Hepatektomie (PH) an Nagern bewiesen (Higgins u. Anderson 1931). Dabei wurde 70 % der Leber reseziert. Innerhalb von zwei Wochen wurde das entfernte Lebergewebe durch die kompensatorische Regeneration ersetzt. Schalm et al. zeigten 1956 anhand eines Kaninchenmodells, dass die partielle Ligatur sowohl der Gallengänge, als auch der Pfortaderäste zu einer Atrophie des ligierten Anteils und gleichzeitig zu einer Hypertrophie des kontralateralen, nicht ligierten Anteils der Leber führten. Die Bedeutung dieser Entdeckung wurde jedoch lange nicht erkannt.

1990 wurde durch Makuuchi et al. eine präoperative Pfortaderastembolisation (PAE) des mit einem Tumor befallenen Leberlappens entwickelt mit dem Ziel einer präoperativen, kompensatorischen Hypertrophie des kontralateralen, tumorfreien Leberlappens, um dem Risiko des postoperativen Leberversagens nach der Leberresektion entgegen zu wirken.

Im analogen Modell der Pfortaderastligatur (PAL) der Ratte kommt es durch die Unterbindung der Durchblutung eines Pfortaderastes zur Regeneration des nicht ligierten Leberlappens (PAL-nlig) und zu gleichzeitiger Schrumpfung des ligierten Leberlappens (PAL-lig). Die Atrophie im okkludierten Areal entsprach einer Reduktion der Lebermasse auf ein Viertel ihres ursprünglichen Ausgangsgewichtes mit entsprechender Regeneration des nicht okkludierten Anteils, wobei sich diese Volumenverschiebung innerhalb von zwei Wochen abspielt (Müller et al. 2002 und 2003).

2.2. Klinische Bedeutung der Pfortaderastokklusion

In der onkologischen Chirurgie wird das Potential der Leber, ihr Gesamtvolumen zu regulieren, genutzt. So kann man beispielsweise beim Menschen relativ problemlos bis zu 60% des Lebergewebes resezieren, wobei das residuelle Lebergewebe durch Regeneration innerhalb einiger Wochen bis Monate den Verlust kompensiert (Fausto et al. 1995, Gertsch et al. 1997, Müller et al. 2002, Hillert et al. 2003, Zimmermann et al. 2004, Topaloglu et al. 2005). Im Falle einer

ausgedehnten kritischen Leberresektion, bei der etwa 70-80% des Lebergewebes, also zum Beispiel beim rechten Leberlappen und das zum linken Leberlappen gehörende Segment IV entfernt werden (Trisegmentektomie rechts), besteht aufgrund des geringen Restlebertumens ein hohes Risiko des postoperativen Leberversagens (Broering et al. 2002, Yigitler et al 2003). Gleichzeitig stellt die chirurgische Entfernung eines malignen Lebertumors wie zum Beispiel das hepatozelluläre Karzinom, das cholangiozelluläre Karzinom, oder Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms die derzeit einzige potentiell-kurative Therapieoption dar. Daher wird derzeit intensiv an Methoden geforscht, um die Grenzen der Resektibilität zu verschieben.

Die präoperative Pfortaderastokklusion (PAO) durch radiologisch-interventionelle Pfortaderastembolisation analog zum Rattenmodell der Pfortaderastligatur ist eine Strategie zur Vergrößerung des prospektiven Restlebertumens. Hierbei wird der tumortragende Leberabschnitt durch Embolisation seiner portalen Äste von der Versorgung mit Pfortaderblut genommen. Es kommt dann innerhalb von 4 bis 6 Wochen zu einer Vergrößerung des nicht-okkludierten Leberareals. Folgend wird eine Leberteileresektion durchgeführt, bei der der portal-okkludierte Leberanteil entfernt wird (Makuuchi et al. 1990, Azoulay et al. 2000, Chijiwa et al. 2000, Miyagawa et al. 2001, Broering et al. 2002, Jaeck et al. 2003, Nagano et al. 2004, Sirichindakul et al. 2005, Shimada et al. 2006). Bei der Beteiligung an der Atrophie und der kompensatorischen Hypertrophie durch Proliferation der Hepatozyten und Endothelzellen werden Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone als Mediatoren diskutiert.

2.3. Onkologische Aspekte der Pfortaderastokklusion

Es hat in den letzten Jahrzehnten wiederholt Ansätze über eine Modulation der Blutversorgung von Lebertumoren gegeben, um einzelne günstige Effekte für das Wachstumsverhalten zu erzielen. So wurden sowohl eine Pfortaderastligatur des tumortragenden Leberabschnitts, als auch der Verschluss der arteriellen Blutversorgung zur Palliation evaluiert. Bei den Ansätzen ist gemeinsam, dass keine durchschlagende Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte (Kanematsu et al. 1984). Der arterielle Verschluss findet in Form der Chemoembolisation beim hepatozellulärem Karzinom immer noch Anwendung. Als Ursache für die weitgehende Ineffektivität beider Ansätze

wird die Tatsache diskutiert, dass Lebertumore sowohl arteriell, als auch portal perfundiert werden, und der Ausfall einer Komponente durch das jeweils verbleibende System kompensiert werden kann (Nagino et al. 1998, Denys et al. 2000).

Das Leberparenchym wird sowohl vom sauerstoffreichen arteriellen Blut, als auch vom portalen Blut gemischt perfundiert. Die in der Leber befindlichen Tumore sind von der Durchblutung des Organs abhängig, wobei die Bedeutung der einzelnen Durchblutungskomponenten in der Entwicklung des Tumors zunimmt. Mikrometastasen beispielsweise wachsen bis zum Erreichen einer bestimmten Größe. Ihre Versorgung erfolgt aus dem umgebenen Gewebe durch Diffusion. Mit weiterer Größenzunahme des Tumors im Lebergewebe ändert sich auch die Versorgung. Größere Tumore bilden ihre eigenen Gefäße aus, so dass ihr Zentrum hauptsächlich arteriell versorgt wird, während ihre Peripherie über ein kapillares Netzwerk mit dem sinusoidalen System der Leber kommuniziert. Demnach ist die Peripherie solider Tumore der Leber sowohl von der arteriellen als auch von der portalen Blutversorgung abhängig (Takeda et al. 2002, Mareel et al. 2002).

Mehrere klinische Daten legen nahe, dass als unerwünschter Nebeneffekt der Pfortaderastokklusion ein stärkeres Wachstum von Tumoren durch bisher unbekannte biologische Faktoren im geplanten Resektionsbereich auftreten könnte. In einer klinischen Studie konnte gesagt werden, dass es bei ca. 32% der Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen nach einer Pfortaderastembolisation zu einem beschleunigten Wachstum der lokalisierten Metastasen von 223+/- 89 ml auf 270+/- 97 ml innerhalb von drei Wochen in portalen okkludierten Leberarealen gekommen ist. Zusätzlich kam es bei dieser Patientengruppe zu einem höheren Ki-67-labeling-Index, sowie zu verkürzten tumorrezidivfreien Intervallen. Damit könnte das rezidivfreie Überleben nach der späteren Leberresektion beeinträchtigt werden (Kokudo et al. 2001). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass es nach Pfortaderastembolisation bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom zu einer erhöhten Fernmetastasierungsrate kam (Wakabayashi et al. 2001). Ebenso wurde in einer anderen Studie berichtet, dass 37% der Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms, hauptsächlich wegen des Tumorprogresses, nicht mehr reseziert werden konnten (Azoulay et al. 2000). Eine weitere Serie von 87 Patienten mit hepatozellulärem und

cholangiozellulärem Karzinom, sowie Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms, die präoperativ einer Pfortaderastokklusion unterzogen wurden zeigte, dass 27 Patienten (31%) nicht mehr reseziert werden konnten (Müller et al. 2003).

Diese Daten deuten darauf hin, dass durch eine Pfortaderastokklusion die Tumorerkrankung ungünstig beeinflusst wird, wobei die genauen Mechanismen derzeit noch unbekannt sind. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang eine kompensatorische arterielle Hyperperfusion, von der der Tumor letztlich profitiert, sowie der Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche im Rahmen einer Pfortaderastokklusion und der kompensatorischen Regeneration freigesetzt werden.

2.4. Molekulare Steuerung der Leberatrophie nach Pfortaderastokklusion

Die molekulare Steuerung der Leberatrophie im portal okkludierten Leberanteil nach einer Pfortaderastokklusion ist bislang unvollständig erforscht. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass es im Modell der Pfortaderligatur der Ratte sowohl im atrophierten, als auch im regenerierten Leberanteil zu einer vergleichbaren „*immediate-early-response*“, also dem molekularen *Priming* kommt. Wobei einige der im Rahmen der Regeneration als bedeutsam erachtete molekularen *Priming*-Mechanismen, z. B. die Induktion von Interleukin-6 (IL-6), ist demnach nicht spezifisch für die Regeneration (Starkel et al. 1999).

Während der Regression durch Atrophie im ligierten Lebergewebe des PAL-Modells wurden mikroskopisch durch HE-Färbung Apoptosen und nekrotische Arealen nachgewiesen. Diese nekrotischen Areale verliefen erst zentrolobulär, später dann lobulär in fast allen Acini. Interessanterweise behält der ligierte Leberanteil seine spezifische Architektur als Zeichen einer physiologischen Anpassung der Leber mit den neuen hämodynamischen Veränderungen bei (Müller et al. 2002).

2.5. Hämodynamische Veränderungen nach Pfortaderastligatur und partieller Hepatektomie

Die veränderte Hämodynamik und das chirurgische Trauma wurden als mögliche auslösende Faktoren bzw. Triggermechanismen für die Leberregeneration und Atrophie diskutiert (Niiya et al.

1999, Sato et al. 1999). Sowohl nach einer partiellen Hepatektomie, als auch nach einer Pfortaderastligatur, wurde ein Anstieg des Pfortaderflusses vom ersten bis zum siebten Tag postoperativ in der Restleber bzw. im nicht-ligierten Anteil gemessen (Kanematsu et al. 1985, Lee et al. 1987, Yamamoto et al. 1992). Dieser wird offenbar durch eine massive Reduktion des portalen Gefäßwiderstandes in der verhältnismäßig hyperperfundierten Leber und durch eine Dilatation der sinusoidalen Strombahn ermöglicht. Ein Indiz für erhöhten Druck und Scherkräfte nach 70% Hepatektomie zeigt sich anhand charakteristischer morphologischer Veränderungen des Lebergewebes. Neben erweiterten Sinusoiden wurden ödematös geschwollene Hepatozyten gefunden (Morsiani et al. 1998).

Somit wirken vermutlich vermehrt Druck- und Scherkräfte auf das relativ stärker perfundierte Restleberareal. Dies könnte ein möglicher Stimulus für die Initialisierung von Regenerationsprozessen sein. Zusammengefasst legen diese Ergebnisse die Einwirkung vom bedeutsamen hämodynamischen Einfluss auf das residuelle Lebergewebe nahe. Dieser Einfluss ist jedoch noch nicht hinreichend auf zellulärer und molekularer Ebene erforscht.

2.6. Systemische Auswirkungen der Pfortaderastligatur und partiellen Hepatektomie

Der Parenchymverlust und die veränderte Expression von Funktionsproteinen nach ausgedehnter Leberteileresektion gefährden das Vermögen der Leber, die metabolische Homöostase aufrecht zu erhalten (Ito et al. 1991, Makuuchi et al. 1990, Milland et al. 1990, Okochi et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die präoperative Durchführung einer Pfortaderastokklusion durch Embolisation oder Ligatur eine Hypertrophie des zukünftigen Restlebervolumens induziert, und somit einen geeigneten Mechanismus darstellt, um einem postoperativen Leberversagen entgegen zu wirken. Klinische und experimentelle Studien deuten darauf hin, dass die Gesamtleberfunktion nach einer PAL oder PAE in der Regel stabil bleibt (Kubo et al. 2002, Tanaka et al. 1994, Uesaka et al. 1996).

Dabei ist noch nicht vollständig geklärt, wie die Aufgaben zwischen dem hypertrophierenden und dem atrophierenden Teil der Leber verteilt sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass die schnelle regenerative Antwort in den nicht ligierten Lappen nach der PAL der Ratte mit einem Abfall der

Transkription von Leberfunktionsproteinen verbunden ist (Urayama et al. 1999). Deswegen könnte man spekulieren, dass die dennoch gute Verträglichkeit von einer PAL oder PAE in der Klinik durch die persistierende Leberfunktion des ligierten Lappens zustande kommt. Allerdings weiß man, dass die portale Deprivation in der Ratte zu einer progressiven Destruktion des betroffenen Lebergewebes durch Nekrose und Apoptose führt. Zusammengenommen legt dies nahe, dass der portale ligierten Lappen großem Stress ausgesetzt ist, der möglicherweise die Leberfunktion beeinflusst.

2.7. Charakterisierung der in der Arbeit untersuchten Faktoren

2.7.1. *Early-growth-response-1 (egr-1)*

Egr-1 ist ein Transkriptionsfaktor der Zinkfinger-Klasse. Er wurde erstmals 1987 isoliert und ist auch als Krox-24 bekannt (Milbrandt et al. 1987). Das humane egr-1 besteht aus 533 Aminosäuren und liegt auf Chromosom 5q23-31 (Nguyen H. Q. et al. 1993, Marsh et al. 1999). Aufgrund seiner raschen Induktion in zahlreichen Zelltypen nach Wachstums-, Differenzierungs- und Apoptosereizen ist es als ein Immediate-Early-Gen (IEG) charakterisiert (Gashler et al. 1993, Kilbourne et al. 1995, Sukhatme et al. 1988).

Das egr-1-Protein bindet an spezifischen GC-reichen Sequenzen in der Promotor-Region von vielen Genen, um deren Expression zu regulieren (Huang et al. 1995). Die bekanntesten Zielgene des Transkriptionsfaktors sind Ketten des platelet-derived growth factor (PDGF), Tumornekrosefaktor TNF- α , Fas, FasL, p53 oder der vascular endothelial growth factor (Gashler et al. 1995, Khachigian et al. 1997, Silverman et al. 1999). Der Transkriptionsfaktor egr-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese (Khachigian et al. 2004, Wilson et al. 2006). Nach einer partiellen Hepatektomie konnte ein Anstieg der egr-1- Expression zusammen mit anderen IEG wie c-myc, c-jun, c-fos beobachtet werden (Haber et al. 1993, Li et al. 2001, Peng et al. 1999). In Studien an einigen Modellen wurde eine Aktivierung von egr-1 durch Barotraumen und mechanische Belastungen festgestellt (Morawietz et al. 1999, Niiya et al. 1999, Sato et al. 1999).

2.7.2. Heme oxygenase-1 (hmox-1)

Heme oxygenase-1 (hmox-1) ist ein membrangebundenes, 32kD großes Protein, das bei Säugetieren ubiquitär im Gewebe verteilt ist. Extrem wird er durch verschiedene Stressoren, wie z.B. Hypoxie, Hyperoxie, inflammatorische Zytokine, Endotoxin, Häm, Hyperthermie, portale Hypertension sowie Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), Platelet-derived growth factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) und NO hochreguliert (Applegate et al. 1991, Rizzardini et al. 1993, Choi et al. 1996, Morse et al. 2002). Neben seinem proangiogenetischen Effekt übt hmox-1 antioxidative, antiinflammatorische, antifibrotische und antiapoptotische Wirkung aus.

In der Angiogenese spielt hmox-1 eine bedeutende Rolle, wobei seine Überexpression die Proliferation von Endothelzellen unterstützt (Deramautd et al. 1998, Nishie et al. 1999). In einer Studie wurde bestätigt, dass die hmox-1 eine geordnete Rolle zur Erhaltung der hepatischen Perfusion nach Gefäßschäden durch Trauma oder Ischämie z.B. nach einer PAE spielt (Nie et al. 2002).

In der Tumorbilogie wurde eine Korrelation zwischen hmox-1 und Tumorwachstum von mehreren Autoren beschrieben. Es wurde gezeigt, dass in humanen Adenokarzinomen die hmox-1 mRNA Expression erhöht ist, und dass die Überexpression das Tumorwachstum fördert (Goodman et al. 1997). Eine weitere Studie beschreibt ebenfalls, dass die Aktivität der hmox-1 in Pankreaskarzinomen deutlich erhöht ist, und seine Inhibition das Tumorwachstum senkt (Sunamura et al. 2003). Durch eine Reduzierung der hmox-1 Aktivität konnte die Tumorprogression von Ratten-Hepatomen nachgewiesen werden (Tanaka et al. 2003). Das Entstehen oxidativer Substanzen während einer chemotherapeutischen Behandlung führt zu einer Steigerung der Expression von hmox-1. Hierbei führt eine gezielte Inhibition von hmox-1 zu einem besseren Ansprechen auf eine Chemotherapie (Berberat et al. 2005, Fang et al. 2004). Die Hemmung der hmox-1 mit Zink Protoporphyrin (ZnPP IX) könnte eine inhibierende Wirkung auf die Neuvaskularisierung im Tumorgewebe haben (Liu et al. 1998, Willis et al. 1996). Außerdem dokumentieren experimentelle Beweise, dass hmox-1 einen positiven Effekt in der neoplastischen und nicht-neoplastischen zellulären Migration hat (Sunamura et al. 2003).

In Fibroblasten konnte durch seine Überexpression TNF- α induziert werden und die durch CO modulierte Apoptose verhindert werden (Kim et al. 2006). Eine Überexpression der hmx-1 verhindert zudem eine TNF- α vermittelte Apoptose (Terry et al. 1998, Chen et al. 2004, Tanaka et al. 2003). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass das Enzym Hämoxigenase-1 die Angiogenese durch Induktion der VEGF-Synthese fördert (Dulak et al. 2002, Loboda et al. 2005).

2.7.3. Heat shock protein (hsp-70)

Hsp-70 ist eines der Hitzeschockproteine, die bei zellulärem Stress durch Hyperphosphorylierung und Trimerisierung gebildet werden (Morimoto et al. 1992, Angelidis et al. 1991). Die Hitzeschockproteine gehören zu den hochkonservierten Proteinen. Hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion werden sie als molekulare Chaperone bezeichnet (Lindquist et al. 1988, Arrigo et al. 1998, Ellis et al. 1996). Sie umfassen mehrere Familien mit unterschiedlichem Molekulargewicht.

Das hsp-70 hat zytoprotektive Aktivität und ist empfindlich u. a. gegenüber Hitze, verschiedenen Zytostatika, Bestrahlung und oxidativem Stress (Jäättelä et al. 1999). *Heat shock protein-70* enthält drei für die Chaperonaktivität wichtige funktionelle Strukturen: Eine ATPase-Domäne, eine Substrat-bindende Domäne und ein C-terminales EEVD-Motiv, das die ATPase-Aktivität, die Substratbindung und die Wechselwirkung mit Cochaperonen reguliert (Bukau and Horwich 1998, Freeman et al. 1995). Unter Normalbedingungen hemmen hsp-70-Chaperone die Aggregation und unterstützen die Faltung und Zusammensetzung von Polypeptiden. Das *Heat shock protein-70* kann die Aggregation von denaturierten Proteinen hemmen und ihre Rückfaltung unterstützen.

Experimentielle Studien bewiesen, dass hsp-70 bei der Invasion vieler Tumore, einschließlich des hepatozellulären Karzinoms eine bedeutende Rolle spielt. Es ist oft in menschlichen Tumoren überexprimiert. Bei vielen Tumorpatienten (einschließlich Kolonkarzinompatienten) geht die Expression von hsp-70 mit einer schlechten Prognose und einem erhöhten Widerstand des Tumors zur Chemotherapie und Bestrahlung einher (Nollen et al. 1999, Rashimi et al. 2004, Nylandsted et al. 2002). Rashmi et al. 2004 haben gezeigt, dass die Blockierung des hsp-70 in den Zellen des Kolonkarzinoms die Empfindlichkeit zu Chemotherapie erhöht. Das hsp-70 besitzt eine starke zytoprotektive Funktion, außerdem führt eine Überexpression dieses Proteins zur Verringerung der

Apoptose. Die Überexpression kann durch eine Vielzahl an Stimuli ausgelöst werden, wie z.B. Hyperthermie, oxidativer Stress, Inhibition von Tyrosinkinasen und diverse zytotoxische Substanzen (Parcellier et al. 2003). Andere Arbeiten konnten zeigen, dass hsp-70 mit proapoptischen Proteinen wie c-myc, p53 oder *Bcl-2 interacting protein-1* (Bag-1) interagiert, so dass es die Apoptose-Kaskade an vielen Stellen blockieren kann (Garrido et al. 2001).

2.7.4. Das Plasminogen-Aktivator-Inhibitorsystem

Das Plasminogen-Aktivator-Inhibitorsystem besteht aus dem Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ (uPA), seinem physiologischen Inhibitor (pai-1), Gewebeaktivator von Plasminogen (t-PA) und dem Urokinase-Rezeptor uPAR. Durch Aktivierung des Plasmins aus seiner inaktiven Form (Plasminogen) an der Zelloberfläche, zeigt dieses System eine verstärkte proteolytische Aktivität (Ellis et al. 1991). Die klassische Rolle des Plasmins ist der Fibrinabbau, somit übt er eine antithrombotische, fibrinolytische Wirkung aus. Außerdem kann Plasmin zahlreiche extrazelluläre Matrixproteine abbauen, in dem es abbauende Proteasen aktiviert.

Diese proteolytische Aktivität können Tumorzellen aus ihrem Verband auslösen und an andere Orte im Organismus ausstreuen, um dort Metastasen zu bilden (Andreasen et al. 2000). In mehreren Studien konnten Hinweise auf eine Aktivierung dieses Enzymsystems bei der Tumorprogression, speziell durch die tumorbedingte Expression des Urokinasesystems erbracht werden (Allgayer et al. 1995, Blasi et al. 1988, Blasi et al. 1993, Blasi et al. 1997, Pappot et al. 1995, Dano et al. 1985, Dano et al. 1994).

Für die Behandlung zahlreicher Tumore z.B. Mammakarzinom, Hepatozellulärekarzinom, Bronchialkarzinom, Kolorektalkarzinom und Magenkarzinom hat die Bestimmung von uPA und pai-1 eine prognostische Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von uPA und/oder pai-1 im Primärtumor mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko und einem kürzeren Gesamtüberleben einhergehen. (De Petro et al. 1998, Jänicke et al. 2001, Konno et al. 2001, Salden et al. 2000, Kaneko et al. 2003).

2.7.4.1. Urokinase-type plasminogen activator (uPA)

Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) ist eine Serinprotease, die u. a. von Hepatozyten, Tumorzellen und Hämatopoesezellen gebildet wird (Wilson et al. 1983, Wilson and Francis 1987). Das uPA-Molekül weist in seiner Sequenz eine dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) homologe Region auf. Die Aktivierung kann z.B. durch Kallikrein, Thermolysin, Trypsin, aber auch durch Plasmin selbst erfolgen. Die Überführung in die aktive Form erfolgt durch hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung (uPAR), wodurch die zweikettige Form von uPA entsteht. Seine Hauptaufgabe ist die zellassozierte, perizelluläre Hydrolyse uPA-Rezeptor exprimierender Zellen. Es spielt dadurch eine entscheidende Rolle bei Vorgängen der Tumordinvasion und der Wundheilung (Andreasen et al. 1990, Dano et al. 1985, Pollanen et al. 1991).

2.7.4.2. Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR)

Der *Urokinase plasminogen activator receptor* (uPAR) ist ein Glykoprotein aus 313 Aminosäuren und einem MG von 55-60 kD (Roldan et al. 1990). An seiner Bindungsstelle kann er sowohl pro-uPA, als auch uPA binden, um Plasminogen in enzymatisch aktives Plasmin umzuwandeln. An uPAR gebundenes uPA können auch die Plasminogenaktivator-Inhibitoren (pai-1) binden und dessen Wirkung durch Bildung des uPA-uPAR-pai-1-Komplexes beenden (Andreasen et al. 1990, Dano et al. 1985, Cubellis et al. 1990).

2.7.4.3. Plasminogen activator-inhibitor (pai-1)

Der *Plasminogen activator-inhibitor-1* (pai-1) ist ein aus 379 Aminosäuren bestehendes einkettiges Glykoprotein mit einem MG von 52 kD. Er wird u. a. von Endothelzellen, Hepatozyten und vielen Tumorzellen produziert und besitzt eine große Verteilung im Gewebe (Loskutoff et al. 1989). Seine physiologische Funktion besteht hauptsächlich in der Inhibition der Plasminogen-Aktivatoren t-PA (tissue plasminogen activator) und u-PA (urokinase plasminogen activator). Somit nimmt er eine zentrale Funktion in der Regulation der Formation stabiler Thromben ein. Durch die direkte Bindung an Vitronektin kann pai-1 stabilisiert werden, wobei seine

Halbwertszeit dadurch um das 2- bis 4-fache verlängert wird. Die Wirkung von Vitronektin kann durch Integrine unterbunden werden. Die Balance zwischen dem α PAR/Integrin-Gehalt einer Tumorzelle auf der einen und dem pai-1-Gehalt auf der anderen Seite scheint für eine kontrollierte Anheftung bzw. Loslösung der Zelle von der extrazellulären Matrix und deren Migration verantwortlich zu sein (Loskutoff et al. 1999).

Einige Studien zeigten, dass pai-1 bei der Vaskularisierung von Tumoren aber auch bei der physiologischen Angiogenese, z.B. in der Retina eine essentielle Rolle spielt (Lambert et al. 2001). Darüber hinaus zeigten andere Studien, dass die Expression von pai-1 bei der Regulation der Zellmigration sowie der Tumormetastasierung und -Angiogenese erhöht ist (Lijnen und Collen 1988, Kohler und Grant 2000).

Vermutlich wird auch eine pai-1-Induktion durch oxidativen Stress ausgelöst (Cheng et al. 1996).

2.8. Entwicklung der Fragestellung

Die molekulare Steuerung der Leberatrophie ist derzeit noch unzureichend untersucht. Gleichwohl stellt die Atrophie eine adaptive Leistung des Lebergewebes dar, welches einer komplexen molekularen und zellulären Steuerung unterliegt. Es wird vermutet, dass nach der Pfortaderastembolisation das Tumorgewebe überwiegend arteriell versorgt wird. Dadurch könnte die kompensatorische Erhöhung der arteriellen Perfusion zu erhöhtem Tumorwachstum führen. Eine Korrelation zwischen Ausmaß der Parenchymhypertrophie und der Tumorprogredienz ließ sich bisher nicht bestätigen.

Der Rand zwischen Tumor und Lebergewebe wird durch lokale Änderungen wie Entzündung, Fibrogenese und Angiogenese gekennzeichnet. Außerdem zeigten morphologische Studien Kommunikationen zwischen hepatischer Sinusoide und den peripheren Tumorgefäßen als eine allgemeine Eigenschaft, sogar in den großen soliden Tumoren. Nach der Ligatur des Portalzustroms durch eine PAE oder eine PAL, wird eine Atrophie im Lebergewebe induziert, vermutlich resultierend aus milder Hypoxie und metabolischem Entzug. Wir vermuten, dass das beobachtete Tumorwachstum nach der Pfortaderastligatur durch Interaktionen zwischen Tumorrand und lokalem Stress-Response begünstigt wird. Da die Pfortaderastokklusion in der

Klinik bei Tumorpatienten angewendet wird, erscheint die Erfassung der molekularen Vorgänge bei einer Leberatrophie besonders gerechtfertigt. Aufgrund der oben dargestellten Beziehung zwischen Lebertumoren und Pfortaderperfusion ist es theoretisch möglich, dass eine Okklusion der Pfortaderdurchblutung direkt oder indirekt über verschiedene molekulare Mechanismen das Tumorwachstum und die Invasion oder die Neoangiogenese beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit ist deswegen die Aktivierung verschiedener hepatischer Faktoren unter dem Einfluss chirurgischer Traumata wie Scheinoperation (SO), sowie Leberregeneration und -atrophie am Modell der partiellen Hepatektomie (PH) und der Pfortaderastligatur (PAL) als alternative Methode der klinischen Pfortaderastokklusion untersucht worden. Es sind insbesondere solche Faktoren geprüft worden, die eine Rolle bei der Leberregeneration spielen, oder die als Stress-Response vermutet werden. Auch Faktoren, die bekanntermaßen Tumorwachstum und -Invasion begünstigen wurden untersucht.

Das Ziel dieser Studie ist die molekulare Antwort der Hepatozyten nach Pfortaderastligatur zu untersuchen, um festzustellen,

- ob die Pfortaderastligatur zur gesteigerten Induktion der Genexpression der obengenannten Stress-Response im ligierten Lappen führt.
- ob diese Faktoren für die Leberatrophie nach der Pfortaderastembolisation spezifisch sind.
- ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression dieser Faktoren und den chirurgischen Traumen gibt.
- ob die Verteilungsmuster dieser Faktoren im Verlauf der Regenerations- und Atrophiephasen eine Aussage über die portalen hämodynamischen Veränderungen nach der PAL erlauben.
- und ob es Hinweise über mögliche Beteiligungen anderer Stressoren mit ähnlichen molekularen Antworten gibt.

2.9. Experimenteller Ansatz

Zur Analyse des individuellen Einflusses der Leberatrophie auf die Expression der Faktoren egr-1, hmox-1, hsp-70, pai-1, u-PA, und uPAR wurden experimentelle Vergleichversuche gewählt, indem wir auf mRNA-Ebene die hepatische Expression dieser Faktoren zu definierten Zeitpunkten postoperativ (3, 6, 12, 24, 48, 96, 192 Stunden und 2 Wochen) untersuchten. Als Modelle wurden Pfortaderastligatur, partielle Hepatektomie und Scheinoperation verwendet, um sowohl Leberatrophie bzw. Leberregeneration ohne akuten Parenchymverlust (Modell der Pfortaderastligatur PAL) und Leberregeneration mit akutem Parenchymverlust (Modell der partiellen Hepatektomie PH), sowie den chirurgischen Stress als physiologische Einflussgrößen modellhaft abzubilden (Modell der Scheinoperation SO). Die Operationen wurden an Wistar-Ratten durchgeführt. Vergleichende Genexpressionsanalysen im Lebergewebe erfolgten mit RT-PCR und Northern-Blot-Hybridisierung.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien und Reagenzien:

- Nylon Hybond[®]-N+Nukleinsäure-Transfermembran: Amersham Biosciences UK Limited (Little Chalfont, GB).
- ABI Prism[®] Big Dye[™] Terminator Kit: Applied Biosystem (Foster City, CA, USA).
- Aqua ad injectabilia: Baxter GmbH (Unterschleißheim, Deutschland).
- NuSieve[®] 3:1 Agarose: BMA (Rockland, ME, USA).
- DAKO[®] Biotin Blocking System, Livamisol: DAKO Corporation (Carpinteria, CA, USA).
- Sodium Salt Citrat (SSC), TrisBrot-EDTA (TBE)-Puffer: Gibco BRL (Life Technologies, Paisly, Schottland).
- Ethanol 70%, Ethidiumbromid, Natriumchlorid, Trinatriumcitrat, Natronlauge, Salzsäure: Merck (Darmstadt, Deutschland).
- QIAquick Spin PCR Purification Kit, Rneasy Midi Kit: Qiagen (Hilden, Deutschland).
- 1st strand cNDA Synthesis Kit for RT-PCR Nukleotide Mix, Taq DNA-Polymerase und dazugehörige Reaktionspuffer, Hybridisierungspuffer DIG Easy Hyb, DIG Wash- und Blockierungspuffer- Set, Anti Digoxigenin AP conjugate, Fab- Fragmente, CDP-Star[™] ready to use: Roche diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland).
- β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Ethylendiaminetetraacetat (EDTA), Tris-EDTA, Ficoll, Formaldehyd, Formamid, 3-N-[Morpholino]propanesulfonic acid (MOPS), Natriumacetat, Phosphate buffered saline (PBS), Wasser: Sigma (Taufkirchen, Deutschland).
- Vectastain[®] ABC-AP Kit (Alkaline Phosphatase Mouse IgG, AK-5002, Alkalische Phosphatase Kit I: Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

3.1.2. Lösungen und Puffer

2% Agarosegel

- 5 g Agarose
- + 250 ml 1 fach TBE-Buffer
- + 10 µl Ethidiumbromid

1% Agarosegel

- 2g Agarose (steriler 500 Erlmeyerkolben)
- + 176 ml RNase free H₂O
- + 20 ml Formaldehyd
- + 24 ml 10 fach RB
- + 5 µl Ethidiumbromid

10 x RB (*running buffer*)

- 40 g MOPS (200 mM)
- + 25 ml Natriumacetat (50 mM)
- + 20 ml 0,5 M EDTA (10 mM)
- + 1000 ml RNase free H₂O
- + NaOH bei ph von 7,0
- + Dunkellagerung bei 4°

1,33 x *sample buffer*

- 500 µl deionisiertes Formamid
- + 169 µl Formaldehyd
- + 100 µl 10 fach RB
- + Dunkellagerung bei -20°

5 x RNA- loading buffer

- 5 ml 10 x RB
- + 3 ml RNase free H₂O
- + 1,5 g Ficoll 400
- + 10 mg Bromphenolblau

3- Zielgen:	hsp70, Ratte
Sequenz Sense Primer	5' CACAAGAAGGACATCAGCCA 3'
Sequenz Antisense Primer	5' TGATGCTCTTGTTTCAGGTCG 3'
4- Zielgen:	pai-1, Ratte
Sequenz Sense Primer	5' TGAGATCAGTACTGCGGACG 3'
Sequenz Antisense Primer	5' GAGGGGCACATCTTTTCAA 3'
5- Zielgen:	uPAR, Ratte
Sequenz Sense Primer	5' GAAGGACGAACCCTACACCA 3'
Sequenz Antisense Primer	5' CAGGGAGGCAATGAGGATAA 3'
6- Zielgen:	uPA, Ratte
Sequenz Sense Primer	5' AATACTGACACCAAAGGCCG 3'
Sequenz Antisense Primer	5' GCTGCTCCACCTCAA ACTTC 3'

3.2. Tiere

Die Operationen erfolgten an insgesamt 136 männlichen Wistar-Ratten in einem Alter von 2-3 Monaten und einem Gewicht von 200-250 Gramm. Die Versuchstiere wurden von Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Ganz besonders wurden alle Experimente unter Beachtung der geltenden Richtlinien für die Haltung und die Behandlung von Labortieren durchgeführt. Die Versuche wurden zuvor von der Tierschutzkommission der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt. Die Tiere hatten während des gesamten Verfahrens freien Zugang zu Wasser und Ratten/Mäuse- Standardnahrung. Ebenso wurden sie in klimatisierten Räumen unter einem konstanten 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gehalten.

3.3. Operationsverfahren

Die Operationen wurden in Äther-Narkose und unter sauberen Bedingungen durchgeführt. Das Abdomen wurde mit einem medianen Längsschnitt eröffnet und die Leber aus ihren ligamentären Adhäsionen gelöst. Die Operation erfolgte unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (10fache Vergrößerung). Nach Durchführung der unten erwähnten Verfahren wurde das Abdomen nach den Operationen mit 4-0 Nähten verschlossen. Postoperativ hatten die Ratten freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

3.3.1. Partielle Hepatektomie (PH)

Nach Higgins und Anderson 1931 wurden die links-lateralen und medialen Leberlappen von ihrer arteriellen und portalen Versorgung abgeklemmt. Anschließend erfolgte die Präparation der Lebervenenäste. Nach der Ligatur des arteriellen und portalen Zustroms und dem Abbinden der entsprechenden Lebervenenäste wurde der mediale und der links-laterale Leberlappen (etwa 70% des Lebergewebes) entfernt.

3.3.2. Pfortaderastligatur (PAL)

Hier wurde der linke Ast der Pfortader, der den links-lateralen und mittleren Leberlappen versorgt, mit einer 6-0 Naht ligiert. Dadurch waren etwa 70% des Lebergewebes von der portalen Blutzufuhr abgeschnitten. Die Analyse der hier eingesetzten Pfortaderastligatur der Ratte präsentiert die klinisch eingesetzte Pfortaderastembolisation beim Menschen. Das makroskopische und histologische Profil des menschlichen Lebergewebes liefert nämlich nach der Pfortaderastembolisation bei den Vergleichsproben der pfortaderastligierten Ratten einen ähnlichen Ausdruck in der Atrophie, Nekrose und Apoptose (Fujii et al. 2000).

3.3.3. Scheinoperation (SO)

In der Scheinoperation (SO) wurden die portalen Äste lediglich dargestellt.

3.3.4. Kontrolltiere (K)

Zusätzlich gab es eine Kontroll-Gruppe (K), in der das Lebergewebe ohne vorausgehenden chirurgischen Eingriff entnommen wurde.

3.4. Probenentnahme

Für die Gewinnung des Probenmaterials nach Intervallen wurden die Tiere erneut gewogen und anschließend mit Äther narkotisiert. Das Abdomen wurde wiederum mit einem medialen Längsschnitt eröffnet. Die Aorta abdominalis wurde oberhalb des Truncus coeliacus abgeklemmt und die Vena cava inferior eröffnet. Über Punktion der Aorta wurde die Leber mit physiologischer Kochsalzlösung blutleer gespült und anschließend für die weitere Aufarbeitung entnommen und gewogen. Das entnommene Gewebe wurde nach dem Abwiegen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80°C asserviert. Die Probenentnahme erfolgte jeweils 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 96, 192 Stunden nach der Operation.

Zur Beurteilung der regenerativen und atrophierenden Prozesse im zeitlichen Verlauf wurden jeweils das Körpergewicht und die Lebersegmentgewichte bestimmt. Direkt im Anschluss an die Probenentnahmen wurden die Lebersegmente getrennt voneinander abgewogen, das absolute und das relative Gewicht zur Bestimmung des Lebersegments zum Körpergewicht-Index ermittelt.

Alle angewandten Operationsverfahren wurden von den Tieren problemlos toleriert. Die aufgetretene Gesamtmortalität von $n = 5$ (3,5%) begründete sich auf Narkosezwischenfälle. Im Bezug auf Mobilisation und Fressverhalten der Tiere zeigten die Versuchstiere der PH-Gruppe einen geringfügigen Nachteil gegenüber den Versuchstieren der anderen Operationsgruppen.

3.5. RNA-Isolierung

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte zunächst die Isolierung von der gesamten RNA aus den Gewebeproben. Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurden 200-250 mg der gefrorenen Lebergewebe mit 500 μl RLT homogenisiert und in 4 ml RLT-Puffer 40 μl β -Mercaptoethanol lysiert, in ein 15 ml Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 4000 rpm und

Raumtemperatur zentrifugiert (Rotana /RP Zentrifuge, Firma Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues 15 ml-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden 4 ml 70% Ethanol hinzugefügt, sofort geschüttelt und 1 Minute gevortext (Minishaker, IKA Werke, Staufen), dann im rosa Membranröhrchen bei 4000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Hiernach erfolgten die entsprechenden Waschschrirte mit RW1- und RPE-buffer in enger Anlehnung an das Kit-Protokoll. Um die RNA aus der Membran zu lösen, wurde der Filter in ein neues 15 ml Sammelröhrchen überführt und 200 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran geträufelt, das Röhrchen 5 Min. stehen gelassen und schließlich 3 Min. zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde mit weiteren 200 µl RNase-freiem Wasser wiederholt, so dass die RNA in 400 µl RNase –freiem Wasser gelöst vorlag. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration konnte dann ein Aliquot der jeweiligen Probe 1:60 verdünnt in Aqua dest. im Photometer bei 260 und 280 nm gemessen und somit die Konzentration ermittelt werden. RNA ist im Vergleich zur DNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. Ribonucleasen (RNasen) kommen ubiquitär vor, sind sehr stabil und können nach Denaturierung wie z.B. durch Autoklavieren schnell wieder renaturieren. Daher sind besondere Vorkehrungen beim Arbeiten mit RNA zu treffen. Alle Materialien waren autoklaviert und die Lösungen und Puffer unter strengsten sterilen Bedingungen angesetzt.

3.6. Herstellung der Digoxigenin-markierten cDNA-Einzelstrang-Sonden

Für die Gewinnung von cDNA-Sonden werden kleinste Mengen isolierter RNA benötigt. Dann mit Hilfe einer Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) wird aus einem mRNA Strang als Matrize den gesamten komplementären DNA-Strang (cDNA) hergestellt. Der gebildete cDNA/RNA-Doppelstrang wird durch eine Standard-PCR mit spezifischen Primern ein ca. 200 bp langer Abschnitt innerhalb der Ziel-Sequenz hoch amplifiziert. In einem dritten Schritt wurden die Sonden schließlich markiert. Hierfür wurde 1 µl des spezifischen PCR-Produkts in eine neue PCR-Reaktion eingesetzt, bei der DIG (Digoxigenin-markiertes)-dUTP anstatt des dTTP direkt in die cDNA eingebaut wurde. In der Neukleotidmischung war ein Drittel des dTTP durch DIG-dUTP ersetzt. Das Besondere an diesem Schritt war, dass nur derjenige Primer eingesetzt wurde, der den zur RNA-Zielsequenz komplementären Strang („Antisense-Strang“) herstellt. Durch diese

asymmetrische PCR-Methode in Anlehnung an Yamaguchi (Yamaguchi et al. 1994) konnte eine konzentrierte Einzelstrang-cDNA hergestellt werden, die komplementär zu den m-RNA-Transkripten auf der Membran, und deswegen hoch spezifisch war. Bei den üblicherweise gebrauchten Doppelstrang-DNA-Sonden besteht eine Konkurrenzreaktion: Einerseits kann die DNA-Sonde mit der auf der Membran befindlichen Zielsequenz hybridisieren und andererseits mit sich selbst. Zur Vermeidung einer Konkurrenz von Sonden-Reassoziaton und Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz wurden in der vorliegenden Arbeit Einzelstrang-Sonden benutzt. In den meisten Hybridisierungen wird die Sonde im Überschuss eingesetzt. Dadurch wird die o.g. Konkurrenzreaktionsproblematik noch verschärft.

3.6.1. Polymerase-Kettenreaktion revers-transkribierter Gesamt-RNA (RT-PCR)

In dieser Reaktion wurde mit Hilfe einer Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) aus einem mRNA Strang der gesamte komplementäre DNA-Strang (cDNA) hergestellt. Um sicher zu stellen, dass die RNA in ihrer Primärstruktur vorliegt, wird die RNA 15 Min. bei +65°C denaturiert und 5 Min. auf Eis gestellt. Mit Hilfe des 1. Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) werden folgende Komponenten in einem sterilen verschließbaren 0,5 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg) gemischt:

2 µl 10 x Reaktionspuffer,

4 µl 25 mM MgCl₂,

2 µl Desoxynukleotid Mischung,

2 µl Oligo-p(dT)15 Primer,

1 µl Rnase Inhibitor,

0,8 µl AMV Reverse Transkriptase und

8,2 µl Gesamt-RNA.

Dann wird die Probe kurz durchmischt und im Thermocycler (Biometra, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) bei einem zuvor eingestellten Programm (10 Min. bei + 25°C, 60 Min. bei +42°C, 5 Min. bei +99°C, 5 Min. bei +4°C) inkubiert.

3.6.2. Standard-PCR

Das gebildete RT-Produkt (cDNA/RNA-Doppelstrang) wurde hier mit spezifischen Primern ein ca. 200 bp langer Abschnitt innerhalb der Ziel-Sequenz hoch amplifiziert. In einem sterilen 0,5 ml Safe Lock Reaktionsgefäß (Eppendorf) wurde der Reaktionsansatz durch Zugabe der Reagenzien in der folgenden Reihenfolge hergestellt:

40,75 µl Aqua dest.,

5 µl 10 x Puffer,

1 µl NTP,

1 µl RT-Produkt,

1 µl Primer sense,

1 µl entsprechender Primer antisense und

0,25 µl Taq Polymerase.

Die Probe wurde gevortext, abzentrifugiert und im Thermocycler dem PCR-Programm unterzogen: zu Beginn 3 Min. Denaturierung bei +95° C, dann 40 Zyklen bestehend aus jeweils 1 Min. bei 95° C, 1 Min. 20 Sek. bei 60 °C Anlagerung, 2 Min. bei 72 °C Polymerisation, abschließend 10 Min. bei 72 °C.

Die hier amplifizierte cDNA wurde anhand einer elektrophoretischen Auftrennung in Bezug zur Molekülgröße identifiziert.

3.6.3. Sequenzierung

Die Identität des vorher entstandenen Produkts wurde durch eine Sequenzanalyse mit dem ABI Prism[®] Big Dye[™] Terminator Kit (Applied Biosystems, USA) zusätzlich verifiziert.

Zuerst fand eine Sequenzierung-PCR statt:

6,7 µl Aqua dest.,

4 µl Big Dye Terminator,

4 µl HAT (Genpak),

5 µl Probe,

0,3 µl Primer sense,

0,3 µl Primer antisense wurden vermischt.

Das PCR-Programm bestand aus 30 Zyklen: je 2 Min. bei 95°C, 30 Sek. bei 95°C, 10 Sek. bei 50°C und 4 Min. bei 60°C. Anschließend erfolgte eine Sequenzierungsreinigung mit dem DyeEx Spin Dit 250 (Qiagen, Hilden).

Im Anschluß daran wurde es entweder bei -20°C gelagert oder direkt in das Servicelabor (Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Sequenzanalyse gegeben.

3.6.4. DIG-PCR

Aus den entstandenen DNA-Doppelsträngen konnten in einem nächsten Schritt unter Verwendung von nur einem Primer DNA-Einzelstränge synthetisiert werden, die komplementär zu der RNA waren. Außerdem wurde durch den Einbau von DIG-dUTP in das PCR-Produkt die Sonde markiert. In einem sterilen 0,5 ml Röhrchen wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

32,25 µl Aqua dest.,

5 µl 10 x Puffer,

5 µl PCR-Mix

2 µl Primer antisense,

5 µl Template DNA und

0,75 µl Enzymmischung.

Anschließend wurde die Mischung im Thermocycler unter diesen Bedingungen weiterverarbeitet: 3 Min. bei +95°C vor dem ersten Zyklus, dann 40 Zyklen mit jeweils 1 Min. bei +95°C Denaturierung, 1 Min. bei +59°C Annealing und 2 Min. Elongation bei +72°C. Der letzte Elongationsschritt wurde 10 Min. bei 72°C durchgeführt. Nach der Amplifikation wurden 5 µl des PCR-Ansatzes durch 2% Agarosegelelektrophorese analysiert.

Wegen des mehrfachen Einbaus von DIG-dUTP während des PCR-Prozesses war das Molekulargewicht im Vergleich zum unmarkierten Produkt erhöht.

3.7. Northern Blot

Hier wird die isolierte RNA elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Zunächst wurde ein 1%iges Agarosegel wie oben erwähnt hergestellt. Zur Inaktivierung der RNasen wurde die Gelelektrophoresekammer, der Schlitten und die Kämmen für 20 Min. mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Zur Probenvorbereitung wurden 10 µg RNA eingesetzt, mit 7 µl Probenpuffer durchmischt, 10 Min. bei 65°C im Thermoblock inkubiert und 2-3 Min. auf Eis gekühlt. Anschließend wurde jede Probe mit 3 µl Ladungspuffer versetzt, kurz abzentrifugiert (1 Min. bei 10000 rpm) und auf Eis gelagert. Die Gelelektrophoresekammer wird mit 1 x RB gefüllt. Nach Entfernung der Kämmen aus dem Gel wurden die Proben vorsichtig senkrecht in die durch die Kämmen entstandenen Kanälchen einpipettiert. Die Elektrophorese wird im Horizontallaufträger (Sub-Cell GT, Bio-Rad Laboratorien GmbH, München) unter einer Spannung von 80 V durchgeführt. Nach ca. 2 Stunden wurde unter UV-Licht eine Fotografie des Gels angefertigt (Gelprinter, MWG-Biotech GmbH, Ebersberg).

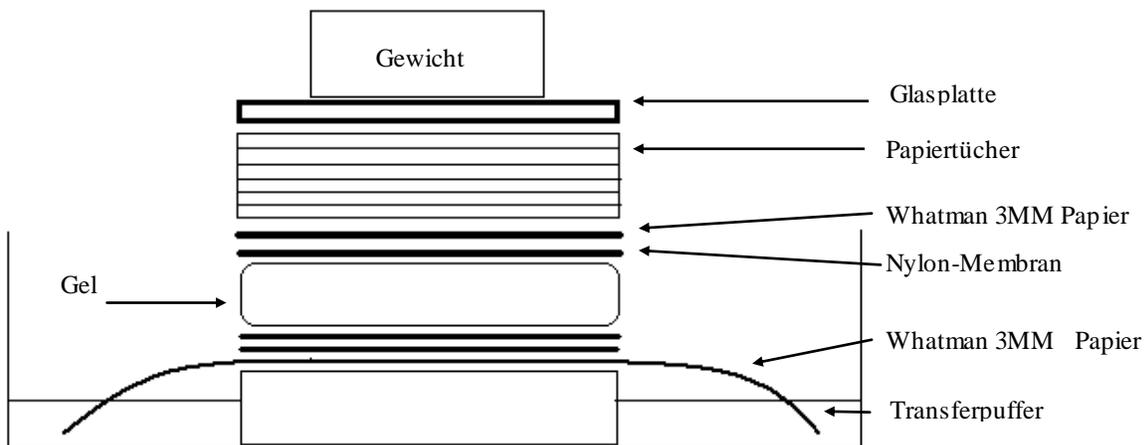


Abb. Aufbau eines Northern Blot

Die rRNA stellt mit etwa 80-90% den Hauptteil der Gesamt-RNA einer Zelle. Deswegen kann man die 18S und 28S rRNA-Untereinheiten im Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht nachweisen und als Ladekontrolle verwenden, um sicherzustellen, dass in den verschiedenen

Spuren des Agarosegels gleich viel RNA aufgetragen wurde.

Dann wurde das Gel 1 x 15 Min. in Aqua dest. und 2 x 15 Min. in 20 x SSC bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend wurden die Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Filter Hybond-N+, Amersham Pharmacia, Freiburg) übertragen: Eine Wanne wurde mit 20 x SSC gefüllt und eine kleine Glasplatte quer darüber gelegt. Zwei längliche Streifen Whatman-Papier (Whatman Chromatography Paper, Merck Eurolab, Hamburg) übereinander wurden in 20 x SSC getränkt und über die Glasscheibe gelegt, so dass sie vorne und hinten in den Puffer eintauchten. Im Anschluss daran wurde das zurechtgeschnittene Gel mit den Taschen nach unten und auf das Papier in die Mitte der Glasplatte gelegt, mit Parafilm umgeben und die Nylonmembran in der Größe des Gels aufgebracht. Auf die Membran wurde eine doppelte Lage Whatman-Papier in der gleichen Größe, die vorher in 2 x SSC getränkt wurde und ein Stapel Zellstoff von ca. 10 cm Höhe gelegt. Dann wurde der Stapel mit einer großen Glasplatte bedeckt, die mit einem Gewicht von 750 g beschwert wurde. Der Transfer-Puffer SSC wurde durch die Kapillarkräfte durch das Gel gesaugt, dabei übertrug er die RNA aus dem Gel auf die Membran. Nach 20 Stunden wurde der Transfer abgebrochen. Die Membran musste nun vor Austrocknung geschützt werden und wurde auf ein mit 20 x SSC getränktes Whatman-Papier gelegt, um mit Hilfe eines UV-Crosslinkers (Hoefer™ UVC 500 UV Crosslinker, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) die RNA auf der Nylonmembran zu fixieren. Zur späteren Größenordnung der Banden wurden unter UV-Licht die 18S und 28S rRNA-Untereinheiten markiert. Der Filter wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder in 20 x SSC in Sarafolie (Dow Chemical, Midland, Michigan) geschützt bei +4°C im Dunkeln gelagert.

3.8. Hybridisierung

Bei dieser Methode sollen die vorher hergestellten Digoxigenin-markierten cDNA-Einzelstrang-Sonden vollständig an die bereits auf die Nylonmembran fixierte RNA aus der Leberprobe gelabelt werden, um die strukturelle Verwandtschaft nachzuweisen. Hier werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den jeweils komplementären Nukleinbasen ausgebildet. Entscheidend dabei ist die benötigte Temperatur. Je höher der Anteil an korrekter komplementärer

Basenpaarung in dem DNA-Hybrid ist, desto höher ist für die Trennung in den Einzelsträngen benötigte Temperatur. Bevor das markierte spezifische PCR-Produkt als Hybridisierungsprobe verwendet werden konnte, wurde es mit Hilfe des QIA Quick PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) von unspezifischen Nebenprodukten gereinigt. Anschließend wurde eine Aliquote von 5 µl in der Gel-Elektrophorese analysiert. Die fertige Hybridisierungsprobe wurde in ein 15 ml Röhrchen mit 10 ml Hybridisierungspuffer (DIGEasy-Hyb, Roche Diagnostics, Mannheim) pipettiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

Zur Durchführung der Hybridisierung wurde die mit RNA fixierte Nylonmembran zunächst vorsichtig in ein Hybridisierungsröhrchen mit 10 ml Hybridisierungspuffer (DIG Easy-Hyb, Roche Diagnostics, Mannheim) überführt und 1 Std. bei +50°C im Hybridisierungs-Ofen (Hybridisierungs-Ofen / Shaker, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) prähybridisiert. Die in 10 ml Puffer gelöste Hybridisierungsprobe wurde 10 Min. bei +68°C im Wasserbad denaturiert. Nach Ablauf der Prähybridisierungszeit wurde der 10 ml Hybridisierungspuffer aus dem Hybridisierungsröhrchen der Nylonmembran verworfen und die in Hybridisierungspuffer gelöste Hybridisierungsprobe dazu gegeben. Das Ganze wurde über Nacht bei 50°C unter ständiger Rotation hybridisiert.

Der Hybridisierungspuffer enthielt noch ungebundene DIG-markierte Proben und konnte deswegen in weiteren Hybridisierungsexperimenten wiederverwendet werden. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die Sonden bei -20°C eingefroren. Danach wurde die Membran zweimal 15 Min. bei Raumtemperatur in 2 x Waschpuffer (2 x SSC + 0,1 % SDS) und zweimal 15 Min. bei +68°C in 0,5 x Waschpuffer (0,5 x SSC + 0,1 % SDS) gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA zu beseitigen. Im Gegensatz zu standardmäßig verwendeter radioaktiver ³²Phosphor-Markierung von Yamaguchi wurde die Northern-Blot-Hybridisierung in dieser vorliegenden Arbeit mit Digoxigenin-Methoden durchgeführt (Yamaguchi et al. 1994). Bei den üblicherweise gebrauchten Doppelstrang-DNA-Sonden besteht eine Konkurrenzreaktion: Einerseits kann die DNA-Sonde mit der auf der Membran befindlichen Zielsequenz hybridisieren und andererseits mit sich selbst. Zur Vermeidung einer Konkurrenz von Sonden-Reassoziations- und Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz wurden in der vorliegenden Arbeit Einzelstrang-Sonden benutzt. In den meisten

Hybridisierungen wurden die Sonden im Überschuss eingesetzt. Dadurch wird die o.g. Konkurrenzreaktionsproblematik noch verschärft. Weiterhin weist die Northern-Blot-Hybridisierungen-Methode eine Reihe wichtiger Vorteile gegenüber der standardmäßig verwendeten ³²Phosphor-Markierung auf, wie eine fehlende Strahlenbelastung, die einfachere Entsorgung der Abfälle, geringere Kosten, die Langzeitstabilität und die Möglichkeit, die markierten Sonden wieder zu verwenden. Die zunächst aufgetretenen starken unspezifischen Hintergrundphänomene konnten durch Modifizierungen der Protokolle eliminiert werden, so dass die Methode hinsichtlich ihrer Sensitivität als mindestens gleichwertig gegenüber radioaktiven Methoden angesehen wird. (Engler-Blum et al. 1993, Holtke et al. 1992, Sato et al. 1993).

3.9. Detektion der DIG markierten Nukleinsäuren

Die Detektion wurde mit dem DIG Wasch und Block Set (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Bei dem DIG-System wird das Steroid Digoxigenin verwendet, welches über einen Brückenarm an die Sonde gebunden ist. An die markierte Sonde bindet ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Digoxigenin Antikörper. Das Signal wird durch Chemolumineszenz erzeugt. Die zur Chemolumineszenz-Detektion erforderliche drei Schritte wurden bei Raumtemperatur in einer sauberen Plastikschaale durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Membran 60 Min. in Blockierungslösung leicht geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Anti-DIG Antikörper (Anti digoxigenin-AP konjugate, Fab fragmente, Roche, Mannheim) wurde 1:20.000 in 50 ml Blockierlösung verdünnt und die Membran weitere 30 Min. in der Antikörperlösung inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte nach einer zweiminütigen Äquilibrierung der Membran in Detektions-Puffer die Zugabe des Substrates CDP (CDP-Star™ready to use, Roche, Mannheim) zur Signalerzeugung. Das Chemolumineszenz-Signal konnte mit dem Phosphor-Imager (Fluor-S™ MultiImager, BioRad, München) gemessen werden. Die Belichtungszeiten lagen hierbei zwischen 1 Min. und 20 Min. Der Ladungsgehalt pro Spur, den man an den rRNA Banden mit Ethidiumbromid bestimmen konnte, wurde mit den Ergebnissen der Rehybridisierungen gegen Albumin, einem *house-keeping-gen* verglichen und die Werte der unterschiedlichen Ladungen entsprechend korrigiert.

3.10. Rehybridisierung

Die Filter konnten 2 x 15 Min. in +90°C heißem 1 x TE (Tris-EDTA-Puffer, Sigma) ausgewaschen und anschließend in eine neue Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

3.11. Statistische Methoden

Für jedes Experiment zu jedem Zeitpunkt wurden die Ergebnisse von 6 Tiergruppen gesammelt. Alle Parameter, einschließlich des Lebergewichts und der densitometrischen Auswertung der Signale, wurden durch Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung (SD) dargestellt. Auf Signifikanz wurde mit Hilfe der *one-way analysis of variance* (ANOVA) und Bonferroni Adjustierung geprüft. Als signifikant eingestuft wurden p-Werte < 0,05.

4. Ergebnisse

4.1. Makroskopische Veränderung im Lebergewebe nach der Pfortaderastligatur (PAL)

Makroskopisch wurde im Verlauf in den nicht-ligierten Lappen des PAL-Modells eine progressive Größenzunahme beobachtet, während gleichzeitig im ligierten Lappen eine rasch fortschreitende Atrophie bemerkt wurde. Zur Beurteilung der atrophierenden und regenerativen Prozesse wurden die Lebersegmentgewichte bestimmt und in Relation zum Körpergewicht gesetzt.

Der ligierte Anteil betrug ca. 70% der Leber. Sein Volumen und -gewicht schrumpfte nach ca. 72 Stunden der PAL auf die Hälfte. 8 Tage später verringerte es sich auf ca. 25 % seiner ursprünglichen Masse. Nach 14 Tagen waren nur noch ca. 18% vorhanden. Das Gewicht des nicht-ligierten 30%igen Anteils verdoppelte sich nach der PAL innerhalb der ersten 96 Stunden. Nach 8 Tagen nahm sein Volumen auf ca. 75% seiner ursprünglichen Masse durch die kompensatorische Regeneration zu. Bis zum 14. Tag wurde lediglich ein weiterer Zuwachs von 23% festgestellt (Abb. 1a und b).

Durch diese kompensatorische Schrumpfung auf der einen Seite und dem Wachstum auf der anderen Seite blieb das Gesamtlebergewicht zu jedem Zeitpunkt auf dem gleichen Niveau oder geringfügig unterschritten im Vergleich mit den scheinoperierten Tieren.

Das Restlebergewebe im PH-Modell präsentierte eine kontinuierliche Volumenzunahme. Im Gegensatz zum Ligaturmodell konnte beim PH-Modell bereits nach ca. 80 Stunden eine Verdoppelung des Leberrestvolumens gemessen werden. Der maximale Zuwachs betrug am 14. Tag das 2,6-fache des Ausgangsgewichts.

Im Vergleich zwischen PH- und PAL-Modell zeigten sich unterschiedliche Anstiege nach 24 und 48 Stunden mit einer schnelleren Antwort nach PH. Diese Unterschiede erreichten keine statistische Signifikanz. Die Kinetik der Lebergewichtsreduktion in den portal ligierten Lappen zeigt, dass der maximale Gewichtsverlust zwischen 48 und 96 Stunden nach operativem Eingriff stattfand. Nach 6 Stunden stellten wir jedoch eine geringere Reduktion in dem Lebervolumen der ligierten Lappen fest.

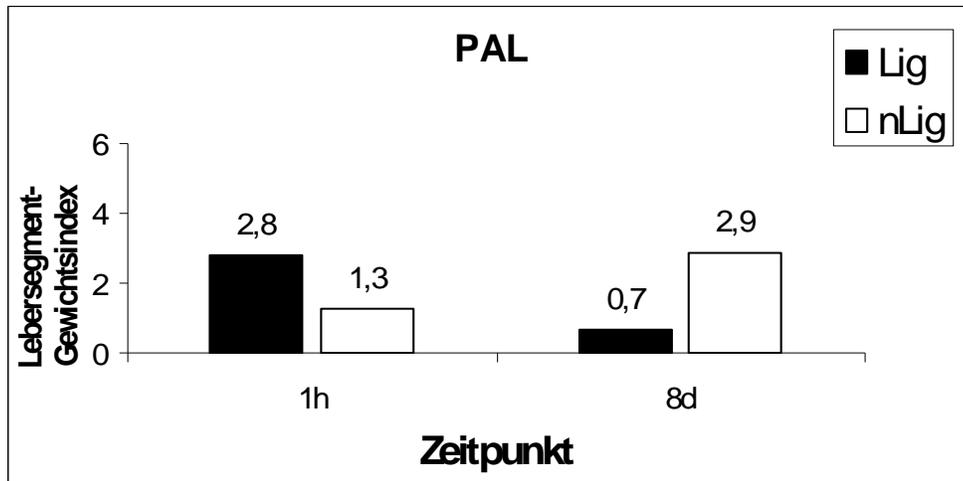


Abb. 1a- Veränderung des Ausgangsvolumens der Lebergewebe im ligierten (PAL lig) und nicht ligierten Lappen (PAL nlig) nach 8 Tagen post PAL. Das Gewicht der einzelnen Lappen wurde mit dem Körpergewicht relativiert.

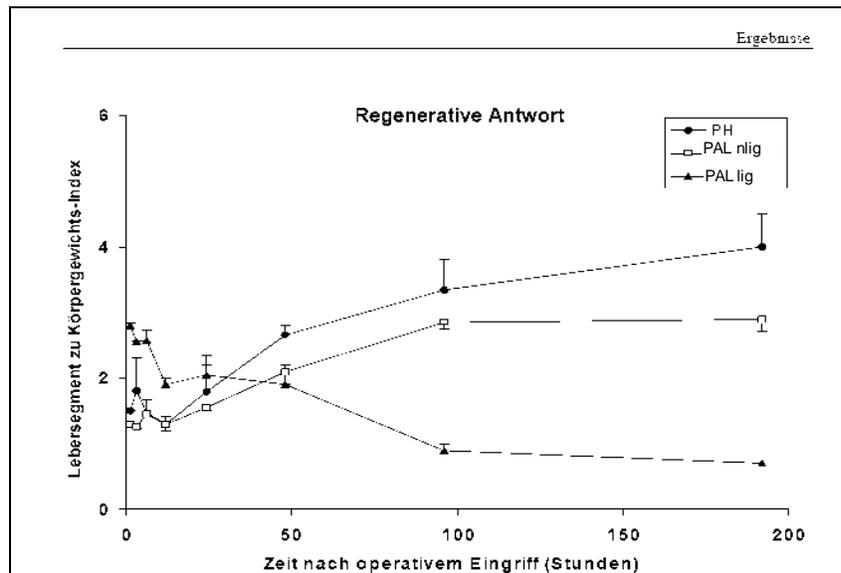


Abb. 1 b- Die Atrophie nach der Pfortaderastligatur in den ligierten Leberlappen (PAL) wird mit der regenerativen Antwort nach partieller Hepatektomie (PH) und der in den nicht-ligierten Lappen (PAL nlig) verglichen. Die Darstellung der Quantifizierung der Lebersegmentgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht wurde von allen Tieren nach PH und PAL im Zeitraum zwischen 1 Stunde und 192 Stunden ausgewertet. Die Werte repräsentieren den Mittelwert +/- SEM.

4.2. Mikroskopische Veränderungen im Lebergewebe nach der Pfortaderastligatur (PAL)

Die histologischen Veränderungen im ligierten Lebergewebe wurden in einer früheren Studie dokumentiert (Müller et al. 2003). Mikroskopisch wurden durch HE-Färbung während der Progression der Atrophie infolge der PAL im ligierten Leberlappen blasse Areale von späteren Nekrosen erst nach 12 Stunden ermittelt. Diese Areale wurden nur unregelmäßig in wenigen Abschnitten beobachtet. 24 Stunden postoperativ traten zentrolobulär Nekrosen in fast allen Acini (Abb.1c, links) und nach 48 Stunden viele lobuläre Nekrosen auf (Abb.1c, rechts). Hämorrhagische oder konfluent-nekrotische Bereiche waren nicht vorhanden.

Die hepatische Mikroarchitektur blieb intakt. Apoptose der Hepatozyten, die durch dichten, geschrumpften, zellularen Körper gekennzeichnet ist, wurden zwischen 24 und 96 Stunden innerhalb der gesamten Läppchen beobachtet. Signifikante postnekrotisch-fibrotische Veränderungen konnten mittels Trichrom-Färbung nicht festgestellt werden.

Die Tatsache, dass der ligierte Anteil der Leber seine spezifische Architektur behält, deutet auf eine physiologische Atrophie hin, die nach der PAL als anpassungsfähige Antwort verstanden werden muss. Dieser Vorgang schützt den Organismus vor einer Schädigung, die aus übermäßiger Nekrose resultieren würde (Yamasaki et al. 1999, Müller et al. 2003)

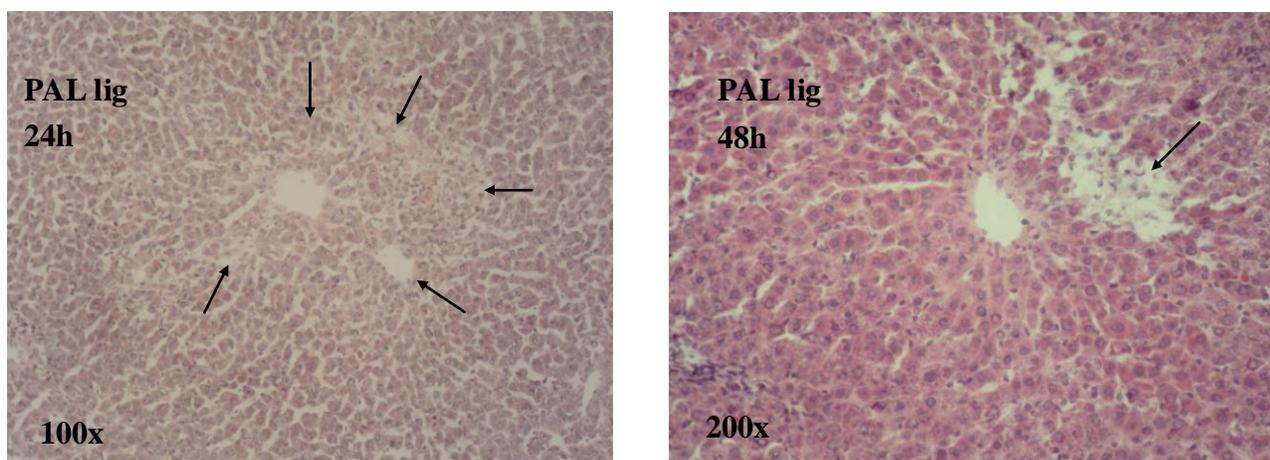


Abb.1c- Histologische Veränderung 24 und 48 Stunden nach PAL im ligierten Lebergewebe mit Hämatoxylin-eosin Färbung. Die Pfeile zeigen Areale von beginnender zentrolobulärer Nekrose bei 100 x Vergrößerung links, sowie begrenzende lobuläre Nekrose bei 200 x Vergrößerung rechts.

4.3. Expression des Histon-Protein 2B

Histon H2B wird überwiegend während der S-Phase des Zellzyklus von proliferierenden Zellen gebildet und kann daher im Sinne eines Replikationsmarkers verwendet werden (Urayama et al. 1999). Die mRNA Expressionsanalysen dieses Proteins sollen Aufschluss darüber geben, inwieweit zum einen das Expressionsmuster der IEG und zum anderen die Lebergewichtsveränderungen, die mit dem Zellzyklus zusammenhängen.

Die beiden Modelle wiesen in den Spitzenwerten ihrer H2B-mRNA deutliche Unterschiede auf. Ein erster Anstieg der H2b-mRNA im PH-Modell konnte bereits nach 12 Stunden festgestellt werden (5,1 + / - 1,4-fach gegenüber der Kontrolle). Die maximale replikative Aktivität nach PH fanden wir 24 Stunden postoperativ, nach 96 Stunden waren die Werte auf ein basales Niveau zurückgekehrt. Im Vergleich dazu war nach der PAL in den nicht ligierten Lappen nach 12 Stunden noch keine Induktion der H2B-Expression nachweisbar. Die erste Signalintensität der H2B-mRNA war 24 Stunden nach der PAL in den regenerierenden Lappen weniger ausgeprägt als nach der PH (5,5 + / - 1,7-fach versus 15,6 + / - 4,0-fach nach PH; $P < 0,05$). Der höchste Anstieg wurde nach 48 Stunden erreicht. 96 Stunden postoperativ konnten wieder Normalwerte gemessen werden (Abb. 2a und 2b).

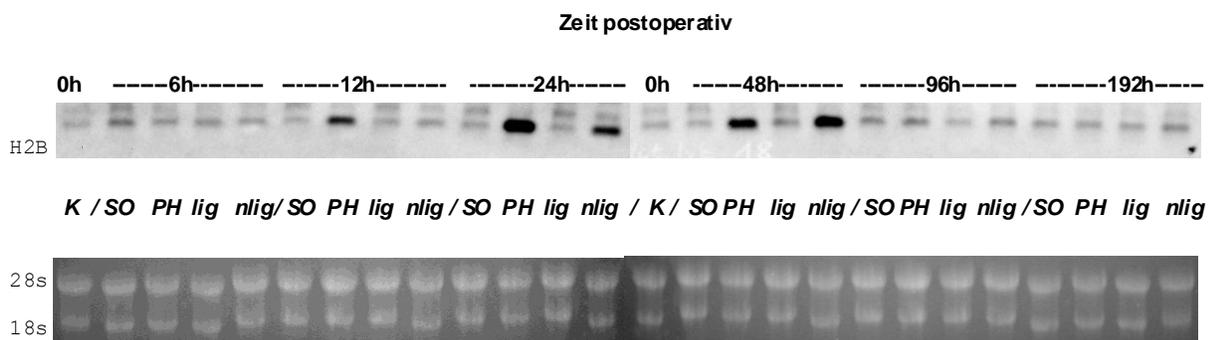
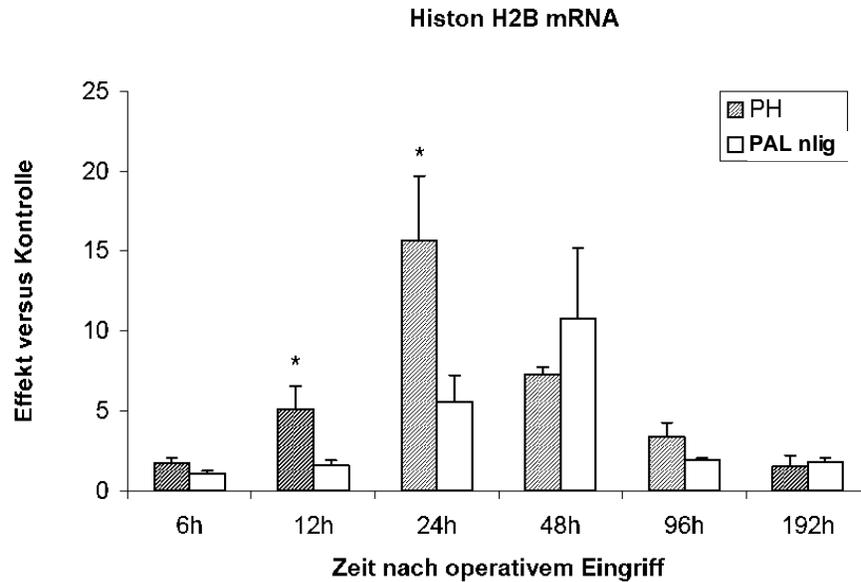


Abb.2a- Repräsentation von Histon Protein H2B-mRNA bei der Northern Blot-Methode von 6 bis 192 h nach einer Scheinoperation (SO), Partieller Hepatektomie (PH), Pfortaderastligatur in den ligierten (lig) und nicht-ligierten (nlig) Lappen. In diesem Verfahren wurden Gesamt-RNA Proben (10µg) eingesetzt, mit Dig- markierter cDNA hybridisiert, und die Chemolumineszenz-Signale detektiert und analysiert. Die Ladungs- und Qualitätskontrolle der 18S- und 28S-rRNA sind unten gezeigt.



*Abb.2b- Densitometrische Analysen der Blots von Partieller Hepatektomie (PH) und PAL in den nicht-ligierten Lappen (PAL nlig). Die Werte von H2B wurden nach Re-Hybridisierung mit dem jeweiligen Albumin Signal normalisiert. Das mRNA-Niveau der unbehandelten Kontrolltiere (K) wurde als 1 betrachtet und die Werte als x-facher Anstieg gegenüber der Kontrolle ausgedrückt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- SEM (n = 4). (*P<0,05 P VS. PAL nlig)*

4.4. Expression von egr-1

In einer vorherigen Arbeit ließ sich die spezifische mRNA des egr-1 in allen Modellen 1 Stunde postoperativ nachweisen. Nach der PH und der PAL im nicht ligierten Leberlappen waren die spezifischen Transkripte des egr-1 im Vergleich mit den Kontrollproben, Scheinoperationen und der PAL im ligierten Lappen deutlich gestiegen. Dieser Anstieg blieb bis zu 3 Stunden erhalten und fiel nach 6 Stunden auf den Ausgangswert zurück (Müller et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die weitere Beobachtung der molekularen Veränderung besonders im atrophierten ligierten Lebergewebe. Im Vergleich mit der Scheinoperation, partiellen Hepatektomie und dem nicht ligierten Leberlappen wurde im weiteren postoperativen Verlauf eine bedeutende selektive Expression von egr-1 mRNA im ligierten Leberlappen dargestellt. Nach 3 Stunden ließ sich das Ergebnis der vorherigen Arbeit bestätigen.

Die Expression von mRNA des *egr-1* im ligierten Lebergewebe war nach 6, 12, 48 und 192 Stunden besonders deutlich erhöht. Nur nach 96 Stunden stellten wir eine geringere Erhöhung fest. Nach 24 Stunden gab es keine offensichtlichen Unterschiede zu den anderen Modellen (Abb. 2). Eine konstitutive Expression der *egr-1*-mRNA war auch bei Kontrolltieren nachweisbar.

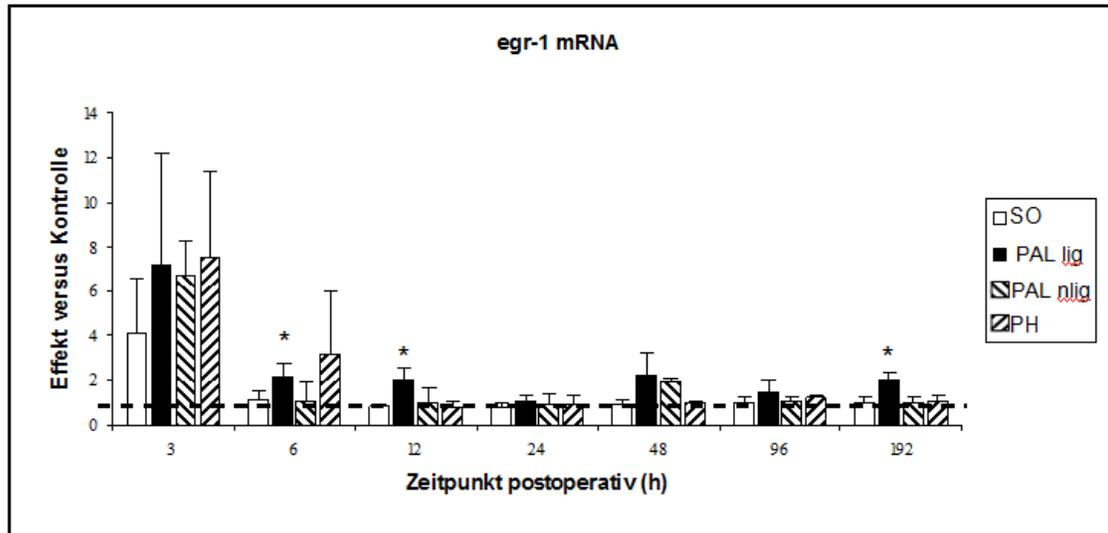


Abb.2- Darstellung der selektiven *egr-1* mRNA Expression unter Einfluss der Pfortaderastligatur im dem ligierten Leberlappen (PAL-lig) im Vergleich mit dem nicht ligierten Leberlappen (PAL-nlig), partielle Hepatektomie (PH) und Scheinoperation (SO) zu unterschiedlichen Zeiten postoperativ. Durch die Densitometrie wurden die Mittelwerte +/- berechnet und auf der Ordinate gezeigt. Der Mittelwert wurde in Proben aus den Kontrolltieren auf 1 bewertet. (* $P < 0.05$ VS. SO)

4.5. Expression von *hmx-1*

Das Lebergewebe von unbehandelten Kontrolltieren zeigte nur minimale Signalintensitäten für *hmx-1* im Northern Blot. Wie in der Abbildung 3b gezeigt wurde, war die Expression von mRNA der *hmx-1* 3 Stunden nach der PAL im nicht ligierten Leberlappen, sowie nach der partiellen Hepatektomie (PH) erhöht induziert, aber etwas geringer im ligierten Lappen des PAL-Modells. In der Scheinoperation (SO) war die Expression von mRNA der *hmx-1* relativ gering. Nach 6 Stunden wurde eine selektive Induktion von *hmx-1*-spezifischer mRNA nach der PAL in den ligierten Leberlappen im Vergleich zu den anderen Modellen festgestellt. Nach 12, 24, 48 und 96

Stunden ging das Niveau des mRNA der *hmx-1* in allen Modellen etwas zurück. Trotzdem war das Niveau im ligierten Lappen des PAL-Modells im Vergleich zu den anderen Verfahren immer noch erheblich erhöht. An der 192-Stunden-Marke gab es kaum signifikante Unterschiede zu den anderen Modellen, und die Expression der mRNA sank auf das Ausgangsniveau zurück. Während der kompensatorischen Leberregeneration nach der PH und der PAL im nicht-ligierten Leberlappen wurde die Expression des mRNA der *hmx-1* im ganzen postoperativen Verlauf im Vergleich zur Scheinoperation oder den Kontrollproben nicht signifikant geändert.

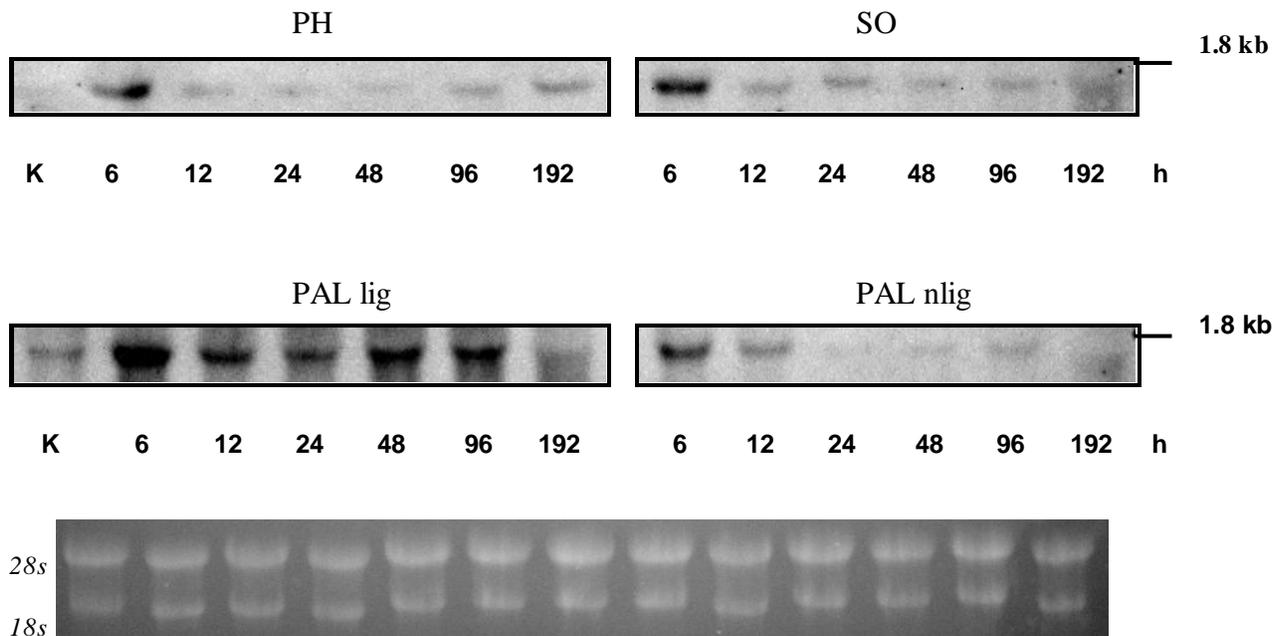


Abb. 3a- Das Ergebnis der Northern Blot- Rehybridisierung von *hmx-1* mRNA in den ligierten Leberlappen (PAL lig) nach 6-192 h im Vergleich mit dem nicht ligierten Leberlappen (PAL nlig), Scheinoperation (SO), partieller Hepatektomie (PH) und den unbehandelten Kontrolltieren (K). Die 18S- und 28S-rRNA als Lade- und Qualitätskontrolle sind unten gezeigt.

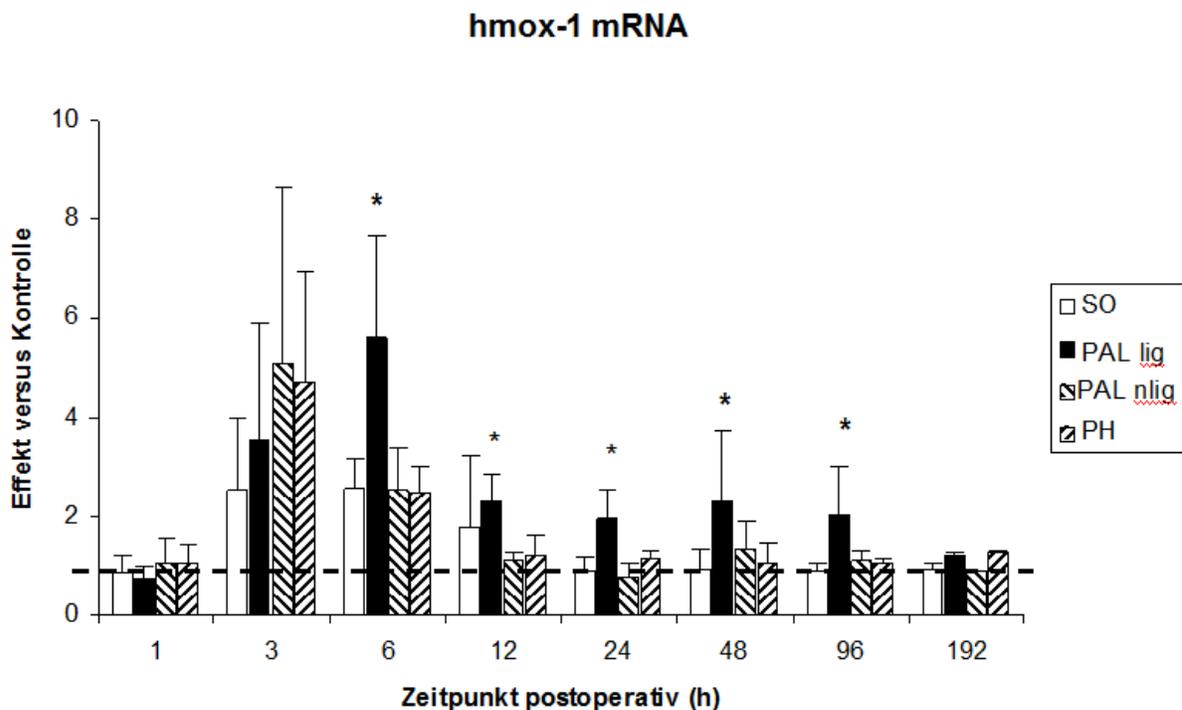


Abb. 3b- Quantifizierung der Expression von hmoX-1mRNA mittels densitometrischen Analysen nach Northern Blot-Hybridisierung. Die Balken präsentieren den Mittelwert (+/-) des Niveaus der Expression von hmoX-1mRNA. Dies stellt einen deutlichen Effekt der Pfortaderastligatur im ligierten Leberlappen (PAL lig) innerhalb 192 Stunden postoperativ im Vergleich zu dem im nicht ligierten Leberlappen (PAL nlig), Scheinoperation (SO) und partieller Hepatektomie dar. (* $P < 0.05$ VS. SO)

4.6. Expression von hsp-70

Bei der Expression von mRNA des hsp-70 gab es eine bedeutende selektive Induktion während der Leberatrophie im PAL-Modell nach 6, 12 und 48 Stunden. Wie in der Abbildung 4 gezeigt wurde, war die Expression von mRNA des hsp-70 3 Stunden nach der PAL im ligierten und nicht ligierten Leberlappen, sowie nach der partiellen Hepatektomie (PH) im Vergleich mit der Scheinoperation (SO) erhöht induziert. Nach 6 Stunden war die selektive Induktion von hsp-70 spezifischer mRNA nach der PAL in den ligierten Leberlappen im Vergleich zu den anderen Modellen am stärksten erhöht. Nach 12 und 48 Stunden ging das Niveau der mRNA des hsp-70 in allen Modellen etwas zurück. Trotzdem war das Niveau im ligierten Lappen des PAL-Modells im

Vergleich zu den anderen operativen Verfahren immer noch erheblich erhöht.

Nach 48 Stunden war das Niveau des hsp-70 mRNA 2,3-fach erhöht verglichen mit der Scheinoperation. An der 24- und 192-Stunden-Marke gab es kaum signifikante Unterschiede zu den anderen Modellen, und seine Expression sank auf das Ausgangsniveau zurück. Im Modell der PH und der PAL im nicht-ligierten Leberlappen, in dem die kompensatorische Leberregeneration stattgefunden hat, wurde keine erhebliche Veränderung der Expression des mRNA der hsp-70 im ganzen postoperativen Verlauf im Vergleich zur Scheinoperation oder den Kontrollproben festgestellt.

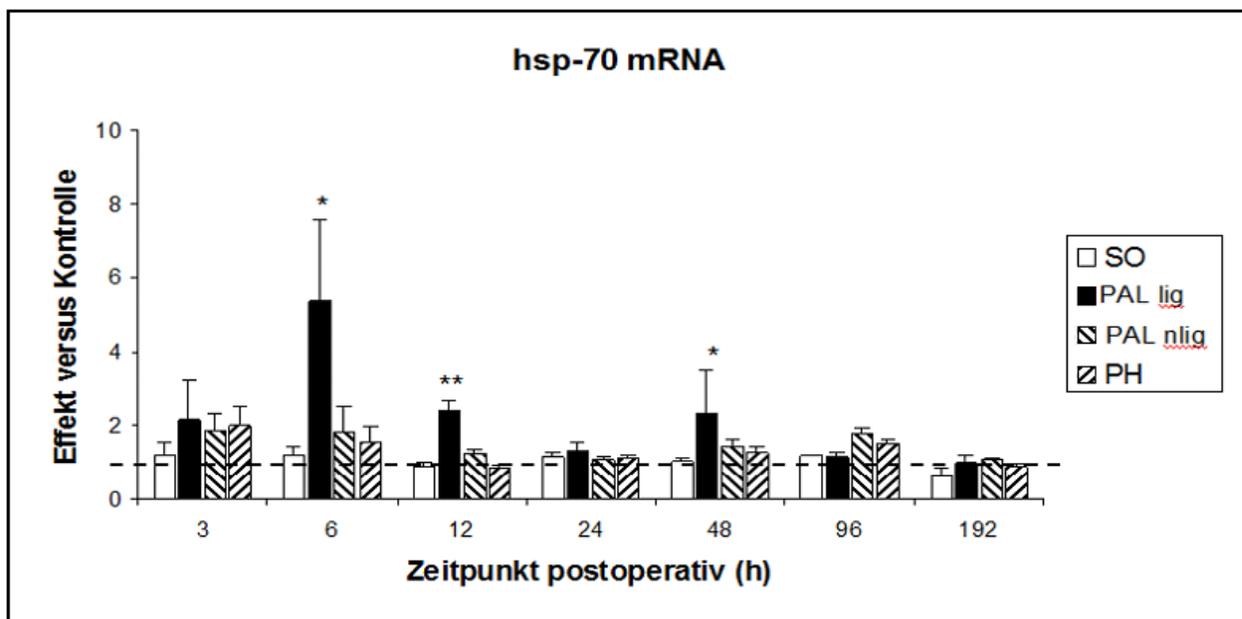


Abb. 4- Densitometrische Quantifizierung des Expressionsniveaus des hsp-70. Der Effekt der Pfortaderastligatur in dem ligierten Leberlappen (PAL lig) wurde mit der Scheinoperation (SO), Partieller Hepatektomie (PH) und dem nicht ligierten Leberlappen (PAL nlig) zu unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Die Balken präsentieren den Mittelwert (+/-) von hsp-70 mRNA Expression. Der Mittelwert in Kontrolltieren wurde als 1 berechnet. Dies zeigt eine selektive Induktion von hsp-70 spezifischer mRNA nach der PAL in den ligierten Leberlappen nach 6, 12, und 48 Stunden. (* $P < 0.05$ VS. SO)

4.7. Expression von uPA und uPAR

Die Resultate in der Abbildung 5a und 5b zeigen, dass sich keine signifikanten Veränderungen in der uPA- und uPAR-Expression nach der PAL in beiden Lappen, sowie nach der partiellen Hepatektomie und der Scheinoperationsgruppe darstellten. In den Kontrollproben waren die Signale der Transkripte etwas erhöht vorhanden. Da die mRNA Expression von uPA und uPAR nach der Chirurgie im Vergleich zu Kontrollen nur ein wenig erhöht waren, gab es keinen statistisch bedeutenden Unterschied unter den experimentell geprüften Bedingungen.

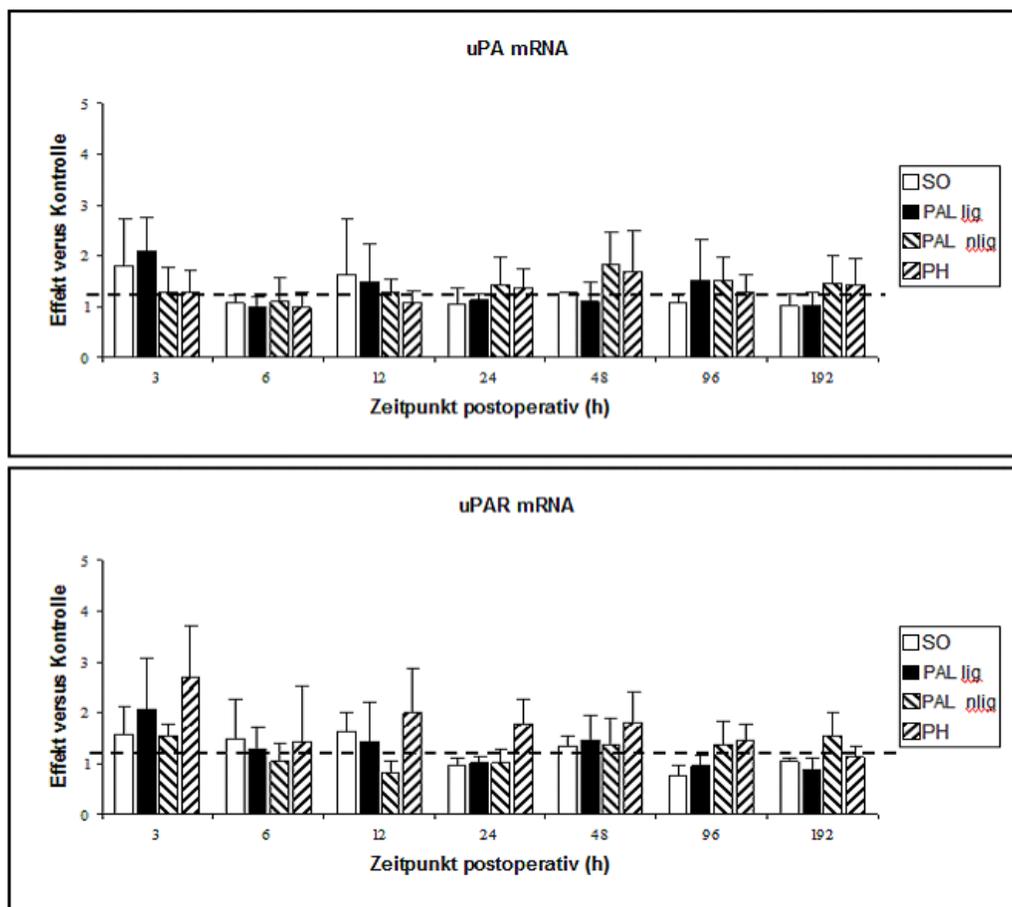


Abb. 5- Quantifizierte Darstellung der mRNA Expression von Urokinase-Plasminogen-Activator und seines Rezeptors mittels Northern Blot-Hybridisierung. Das Ergebnis wurde hier an Hand des Densitometrie-Mittelwerts +/- durch die markierten Balken dargestellt. Der Mittelwert in Kontrolltieren wurde als 1 berechnet. Der Einfluss der Pfortaderastligatur in dem ligierten Lappen im Vergleich zu der Scheinoperation zeigt keine signifikanten Veränderungen. (* $P < 0.05$ VS. SO)

4.8. Expression des pai-1

Die spezifische mRNA von pai-1 in den Kontrollproben (nicht dargestellt) war kaum erkennbar. Das regenerierte Lebergewebe besonders nach der PH und der PAL im nicht ligierten Lappen stellte eine sofortige frühe Induktion von mRNA der pai-1 nach 3 Stunden dar. Im ligierten Lappen des PAL-Modells wurde die Expression von mRNA des pai-1 nach 3, 6, 12 48 und 96 Stunden im Vergleich zu dem nicht ligierten Lappen erheblich erhöht dargestellt (Abbildung 6). Das Niveau war im Gegensatz zu den Kontrollproben und der Scheinoperation 6,3-fach erhöht. Die Transkription von pai-1 nach der PAL im ligierten Lappen postoperativ verringerte sich nach 24 Stunden, während sie wieder nach 48 Stunden erhöht war. Danach blieb pai-1 im regenerierten Gewebe der PH in den späteren Stadien erheblich erhöht, während seine Expression 6 Stunden nach der PAL im nicht ligierten Gewebe gesunken ist. Nach 192 Stunden fielen die Expressionen aller Modelle auf die Ausgangsniveaus zurück (Abbildung 6).

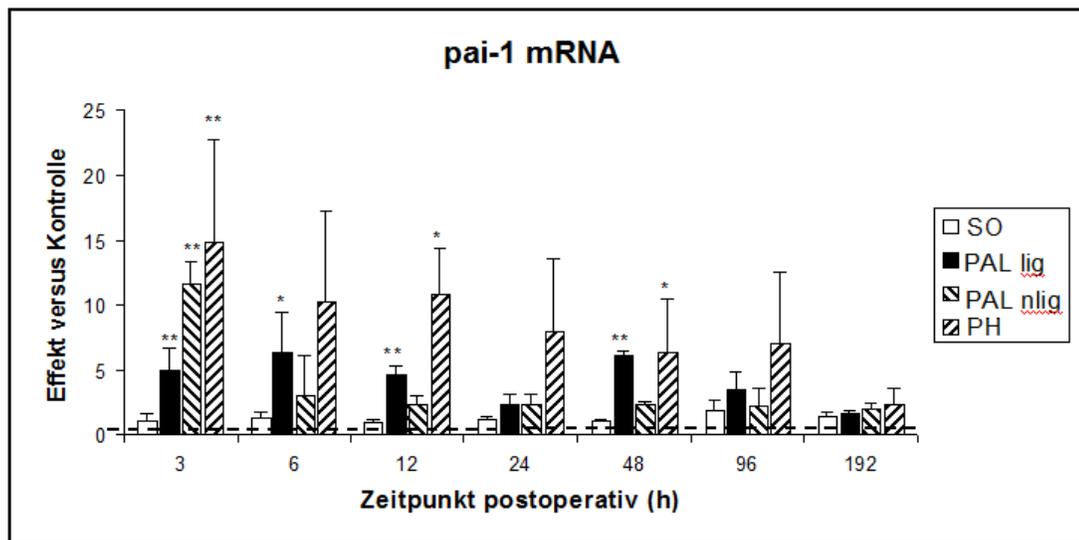


Abb. 6- Das Ergebnis vom Northern Blot der Urokinase plasminogen Inhibitor (pai-1): Quantifizierung der pai-1 mRNA binnen 192 Stunden nach der Pfortaderastligatur im ligierten Leberlappen (PAL lig) im Vergleich zum ligierten Lappen (PAL nlig), zur Scheinoperation (SO) und zur partiellen Hepatektomie (PH). Die Balken zeigen den Mittelwert +/- SEM des mRNA- Gehalts. Der Mittelwert des pai-1 mRNA in Kontrolltieren wurde als 1 bewertet. Dies zeigt eine deutliche Erhöhung der Genexpression der pai-1 bei 6, 12, 48 und 96 Stunden im ligierten Gewebe nach PAL. (* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ VS. SO)

5. Diskussion

Um das Risiko des Leberversagens nach ausgedehnter Leberresektion bei der Behandlung maligner Lebertumore zu minimieren, wurde die präoperative PAL zur Vergrößerung des perspektiven Restlebertumors eingeführt (Makuuchi et al. 1990). Hierbei wird vor geplanter Hepatektomie der tumortragende Leberabschnitt durch Okklusion seiner portalen Äste von der Versorgung mit Pfortaderblut genommen. Es kommt dann innerhalb einiger Wochen zu einer Vergrößerung des nicht-okkludierten tumorfreien Leberareals. Folgend wird eine Leberteilresektion durchgeführt, bei der der portal-okkludierte Leberanteil entfernt wird (Azoulay et al. 2000, Chijiwa et al. 2000, Miyagawa et al. 2001, Broering et al. 2002, Jaeck et al. 2003, Nagano et al. 2004, Sirichindakul et al. 2005, Shimada et al. 2006). Allerdings legen mehrere klinische Arbeiten nahe, dass als unerwünschter Nebeneffekt dieser Prozedur ein stärkeres Wachstum von Tumoren durch bisher unbekannte biologische Faktoren im geplanten Resektionsbereich auftreten könnte. Eine Studie von Elias et al. 1999 bestätigt, dass die Lebermetastasen nach durchgeführter PAE eine deutlich stärkere Wachstumsrate als die des Leberparenchyms aufweisen. In einer anderen Studie wurde berichtet, dass 37% der Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms, hauptsächlich wegen des Tumorprogresses, nicht mehr reseziert werden konnten (Azoulay et al. 2000). Ebenso konnte in einer weiteren klinischen Studie gezeigt werden, dass es bei ca. 32% der Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen nach einer PAE zu einem beschleunigten Wachstum der lokalisierten Metastasen von 223+/- 89 ml auf 270+/- 97 ml innerhalb von drei Wochen in portalen okkludierten Leberarealen gekommen ist. Zusätzlich kam es bei dieser Patientengruppe zu einem höheren Ki-67-labeling-Index, sowie zu verkürzten tumorrezidivfreien Intervallen. Damit konnte das rezidivfreie Überleben nach der späteren Leberresektion beeinträchtigt werden (Kokudo et al. 2001). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass es nach PAE bei Patienten mit fortgeschrittenen hepatozellulärem Karzinom zu einer erhöhten Fernmetastasierungsrate kam (Wakabayashi et al. 2001). Eine weitere Serie von 87 Patienten mit hepatozellulärem und cholangiozellulärem Karzinom, sowie Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms, die präoperativ einer PAO unterzogen wurden zeigte, dass 27 Patienten

(31%) wegen der Tumorprogression nicht mehr reseziert werden konnten (Müller et al. 2003). Diese Daten legen somit nahe, dass durch eine PAO die Tumorerkrankung ungünstig beeinflusst wird, wobei die genauen Mechanismen derzeit noch unbekannt sind.

Im Rahmen der pathophysiologischen Veränderungen im Lebergewebe nach einer PAL lassen sich einige Hypothesen zu einer Förderung von Tumorwachstum im portal-deprivierten Leberanteil erörtern:

Erstens ist zu spekulieren, ob verschiedene Zytokine die Regeneration des kontralateralen, nicht-ligierten Leberanteils regulieren und gleichzeitig die Invasion und Proliferation der Tumorzellen im portal-okkludierten Leberareal über kompensatorische Blutzirkulation stark anregen können. Gegen dieses Konzept sprechen jedoch die Beobachtungen von Kokudo und Mitarbeitern, wonach es keine offensichtliche Korrelation zwischen Tumorwachstumsrate und Leberregeneration des nicht-okkludierten Anteils nach der PAE in ihrer eigenen Serie gab (Kokudo et al. 2001). In mehreren Studien konnten während der Leberregeneration verschiedene Zytokine wie Hepatocyte Growth Factor (HGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Interleukine (IL-6, IL-1), die Hormone Insulin und Glukagon identifiziert werden, die eine entscheidende Rolle für die transkriptionelle Steuerung des Wiedereintritts der Zellen in den Zellzyklus spielen (Caruana et al. 1981, Cressman et al. 1996, Fausto et al. 1995, Michalopoulos et al. 1997, Naldini et al. 1991, Webber et al. 1998). Interessanterweise konnte in einer Studie dargestellt werden, dass es im Modell der PAL der Ratte sowohl im atrophierten, als auch im regenerierten Leberanteil zu einer vergleichbaren „*immediate-early-response*“, also dem molekularen *Priming* kommt. Zu diesen zählen Nuklear Faktor kappa- β (NF- $\kappa\beta$), c-fos, c-myc, c-jun und Interleukin-6 (IL-6) (Starkel et al. 1999). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die gesteigerte Proliferation von Tumorzellen mit einer vermehrten Expression der VEGF, HGF und TGF- α an dem tumorangrenzenden ligierten Gewebe einhergeht. Ebenfalls wurde in derselben Studie beobachtet, dass es zur einer gesteigerten HGF-Expression im regenerierten nicht ligierten Gewebe kam (Barbaro et al. 2003). Desweiteren ließ sich in einer anderen Arbeit eine erhöhte Induktion von HGF im regenerierten Gewebe nach ausgedehnter Hepatektomie nachweisen (Baier et al. 2006). Nach den Angaben von Kusaka et al. 2006 stieg die TGF- α Expression sowohl im

okkludierten als auch im nicht-okkludierten Leberlappen nach der PAE an. In einer weiteren Studie ging die gesteigerte VEGF-Expression mit der signifikanten sinusoidalen Erweiterung im Bereich des Tumorrandes einher (Xiong et al. 2004). Noch eine Studie ließ weitere „*immediate-early-response*“ wie Transforming Growth Faktor (TGF- β 1), Interleukin-1 β (IL-1 β), K-6, c-myc, c-jun, und c-fos im atrophierten Leberlappen nach der PAL während der ersten sieben Tage sehr stark exprimiert erkennen (Uemura et al. 2000). Wieder in anderen Studien konnte eine gesteigerte Expression von c-myc, c-jun, c-fos im regenerierten Gewebe nach einer partiellen Hepatektomie zusammen mit egr-1 beobachtet werden (Haber et al. 1993, Li et al. 2001, Peng et al. 1999). Anhand dieser vielen Angaben könnte man davon ausgehen, dass die Induktion von den „*immediate-early-response*“ nicht für die Leberregeneration oder Leberatrophie spezifisch ist und allgemein im Rahmen von Gewebeumbauprozessen eine Rolle spielt.

Zweitens ist bekannt, dass es durch den Entzug des portalen Flusses zu einer kompensatorischen Erhöhung des arteriellen Flusses im portal-deprivierten Lebergewebe kommt, um den hepatischen Blutfluss gleichmäßig aufrecht zu halten (Lautt et al. 1983, Richter et al. 2001). Dieses als *hepatic arterial buffer response* bezeichnetes Phänomen könnte möglicherweise zur Angiogenese und Invasion des dort vorhandenen malignen Gewebes führen (Nagino et al. 1998, Denys et al. 2000). Diese Hypothese ließ sich durch die Angaben von Ackermann nachvollziehen. Hier deutet er mit seiner Hypothese offensichtlich an, dass der Hauptteil der soliden hepatischen Tumore überwiegend durch die hepatische Arterie versorgt wird (Ackermann et al. 1986). Es hat in den letzten Jahrzehnten wiederholt Ansätze über eine Modulation der Blutversorgung von Lebertumoren gegeben, um einzelne günstige Effekte für das Wachstumsverhalten zu erzielen. So wurden sowohl eine PAL des tumortragenden Leberabschnitts, als auch der Verschluss der arteriellen Blutversorgung des Lebertumors zur Palliation evaluiert. Beide Okklusionsansätze haben als Gemeinsamkeit, dass keine durchschlagende Wirkung nachgewiesen werden konnte. Als Ursache für die weitgehende Ineffektivität beider Ansätze wird die Tatsache diskutiert, dass Lebertumore sowohl arteriell, als auch portal perfundiert werden, und der Ausfall einer Komponente durch das jeweils verbleibende System kompensiert werden kann (Nagino et al. 1998,

Denys et al. 2000). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass das Leberparenchym sowohl vom arteriellen Blut, als auch vom portalen Blut gemischt perfundiert wird. Die kompensatorische Erhöhung des arteriellen Flusses im ligierten Anteil nach einer PAL führt zu einer unvollständigen sinusoidalen Kapillarisation, die durch eine Umwandlung der sinusoidtypischen in kapillartypische Endothelzellen entsteht (Yamasaki et al. 1999). Andere morphologische Studien zeigen, dass die Blutgefäße in den hepatischen Tumoren durch sinusoidförmige Verbindungen des Nachbargewebes mit den peripheren spezifischen Tumorgefäßen entstehen (Nikfarjam et al. 2003, Kan et al. 1996). Perfusionscomputertomographisch konnte beobachtet werden, dass es eine positive Wechselbeziehung zwischen arterieller und portaler Perfusion im umgebenden Lebergewebe des Tumors gibt. Hier vermuteten die Autoren, dass der Tumor teilweise über die Pfortader perfundiert wird (Miles et al. 1998). Die in der Leber befindlichen Tumore sind gleichzeitig von der Durchblutung des Organs abhängig, wobei die Bedeutung der einzelnen Durchblutungskomponenten in der Entwicklung des Tumors zunimmt (Takeda et al. 2002, Mareel et al. 2002). Mikrometastasen beispielsweise wachsen bis zum Erreichen einer bestimmten Größe. Ihre Versorgung erfolgt aus dem umgebenen Gewebe durch Diffusion. Mit weiterer Größenzunahme des Tumors im Lebergewebe ändert sich auch die Versorgung. Größere Tumore bilden ihre eigenen Gefäße aus, so dass ihr Zentrum hauptsächlich arteriell versorgt wird, während ihre Peripherie über ein kapillares Netzwerk mit dem sinusoidalen System der Leber kommuniziert. Demnach ist die Peripherie solider Tumore der Leber sowohl von der arteriellen als auch von der portalen Blutversorgung abhängig (Nikfarjam et al. 2003, Kan et al. 1996).

Die nach einer PAO entstehende Gewebeatrophie ist laut Yamasaki et al. 1999 wahrscheinlich als Folge der milden Hypoxie und der metabolischen Deprivation vorgegeben. Histologisch konnte in einer früheren Studie nachgewiesen werden, dass der ligierte Anteil der Leber nach einer PAL seine spezifische Mikroarchitektur behält (Müller et al. 2003). Dies deutet auf eine physiologische Atrophie hin, die nach der PAL als anpassungsfähige Antwort verstanden werden muss. Einige Studien deuten darauf hin, dass die tumorumgebenden Gewebe an der Regulation des Wachstums und der Invasion maligner Zellen beteiligt sind (Takeda et al. 2002, Mareel et al. 2002).

Abgesehen von diesen Theorien könnten wir spekulieren, dass bislang uncharakteristisch lokal zelluläre und molekulare Mechanismen als Interaktionen an der Grenze zwischen Tumorperipherie und dem umgebenden Lebergewebe im ligierten Leberanteil die Invasion und Angiogenese von soliden Tumoren fördern. Laut Takeda et al. 2002 zeichnet sich dieses Gebiet durch lokale Veränderungen wie Entzündungen, Fibrogenese, und Angiogenese nach einer PAE aus. Gleichzeitig ist die Tumordinvasion direkt oder indirekt von sinusförmiger Blutversorgung seiner Peripherie abhängig (Kan et al. 1996, Takeda et al. 2002, Mareel et al. 2002, Nikfarjam et al. 2003).

Zunehmende Beweise liegen vor, dass die intra- und extrazelluläre Regulation des Tumorwachstums auf komplexen Vorgängen beruht. In zahlreichen Studien wurde bewiesen, dass die Induktion von intrazellulären *stress response proteine* und *immediate-early* Gene wie hsp-70, hmx-1 und egr-1 zum Tumorwachstum durch Stimulation der Angiogenese und sogar die Verstärkung der Therapieresistenz von soliden Tumoren beitragen (Raschmi et al. 2004, Nylandsted et al. 2002, Mitchell et al. 2004, Tanaka et al. 2003, Sunamura et al. 2003, Worden et al. 2005). Andere experimentelle Daten implizieren, dass uPA, uPAR und pai-1 durch Vermittlung perizellulärer Proteolyse und Matrix-Umbau an der Progression einiger Tumore beteiligt sind (Bajou et al. 1997). Hier stellten wir die Hypothese auf, dass es im Rahmen der Leberatrophie nach einer PAL durch massiven Stress in der Leber zur gesteigerten Aktivierung von zellulären und molekularen Faktoren kommt, wobei diese Faktoren als bedeutsam im Rahmen der Tumorprogression und Angiogenese in mehreren Studien charakterisiert wurden. Hierzu wurde die Expression der *early-growth-response* (egr-1), *heat-shock-protein-70* (hsp-70) und *hemoxygenase-1* (hmx-1) im Lebergewebe nach PAO in einem Kleintiermodell untersucht. Zusätzlich wurde das Plasminogen-Aktivator-Inhibitorsystem, bestehend aus urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA), seinem zellulären Rezeptor (uPAR) und seinem Inhibitor (pai-1), im Pfortaderokklusionsmodell evaluiert.

Um die selektiven Effekte der PAL auf die Genexpression in der Leber zu überprüfen, wurden hier durch vergleichbare tierexperimentell-chirurgische Versuchsansätze klinisch relevante pathophysiologische Zustände der Leber erzeugt, und die vorher erwähnten Response betrachtet.

Im Modell der PAL wurde die parallel zueinander laufende Leberregeneration (im nicht ligierten Leberlappen) und -Atrophie (im ligierten Leberlappen) präsentiert. In der PH wird die Leberregeneration nach Parenchymverlust dargestellt. Darüber hinaus wurde das chirurgische Trauma in den Experimenten abgebildet, indem eine Versuchsgruppe lediglich einer SO unterzogen wurde. Hierbei wurden die pathophysiologischen Veränderungen der Lebergewebe auf molekularer Ebene verglichen.

Aufgrund der speziellen Anatomie der Rattenleber, bei der die Leberlappen getrennt voneinander mit jeweils gut zugänglichen Gefäßen vorliegen, hat sich das Rattenmodell insbesondere für molekularbiologische Grundlagenforschung bewährt und ist für diese Art von Operationen gut geeignet. Außerdem weist das Genom von Nagetieren eine sehr hohe Parallelität zu dem des Menschen auf. Studien an Großtiermodellen würden die Situation am Menschen wahrscheinlich besser reflektieren, diese sind jedoch kosten- und zeitintensiver. Die Physiologie der Ratte unterscheidet sich deutlich von der des Menschen, beispielsweise durch eine abweichende Leberperfusion oder die viel schnellere Regenerationsgeschwindigkeit. Der Interaktion zwischen Parenchym- und nicht Parenchymzellen der Leber wurde eine entscheidende Rolle in der Regeneration und Atrophie zugeschrieben (LaBrecque et al. 1994). In dieser vorliegenden Arbeit werden die Leberzellpopulationen mit ihrer intakten Mikroarchitektur nicht getrennt erforscht, damit spiegeln die gewonnenen Ergebnisse die natürlichen Bedingungen wider. Darüber hinaus wurde bisher das *in-vivo*-Modell, insbesondere das 70%-PH-Modell für die Erforschung von Leberregeneration angewandt, wie auch in der vorliegenden Arbeit. Im Vergleich zu anderen Methoden wie z.B. dem Einsatz von Lebertoxinen ist das PH-Modell nicht mit Gewebsschaden oder Entzündungsreaktionen assoziiert.

Mit den vorher erwähnten unterschiedlichen operativen Bedingungen erfolgte die Probenentnahme jeweils nach 1, 3, 6, 12, 24, 48, 96 und 192 Stunden. Dann wurde aus jeder Probe die m-RNA mit dem RNeasy Midi Kit nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Um eine spezifische m-RNA zu detektieren, wurde die Gesamt-RNA elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran

transferiert. Parallel wurde mit Hilfe einer Reverse-Transkriptase-PCR aus einem mRNA Strang den gesamten komplementären DNA-Strang (cDNA) hergestellt, durch eine Standard-PCR mit spezifischen Primern hoch amplifiziert und Digoxigenin-markierten cDNA-Einzelstrang-Sonden hergestellt. Dann wurden Sonden zum Nachweis der zu untersuchenden mRNA in die Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt. Damit wurden die Genexpression der o.g. Faktoren bzw. die pathophysiologischen Veränderungen der Lebergewebe auf molekularer Ebene bestimmt, analysiert und verglichen.

Die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit sind:

Erstens, dass die Expression von *egr-1*, *hmx-1* und *hsp-70* im atrophierten ligierten Lebergewebe im Gegensatz zum regenerierten nichtligierten Lebergewebe nach der PAL und nach der PH zur SO selektiv verstärkt war.

Zweitens zeigt *pai-1* eine selektive Induktion sowohl im atrophierten Gewebe nur nach der PAL, als auch im regenerierten Lebergewebe nach der PH.

Drittens zeigten die Resultate der uPA- und uPAR-Expression im atrophierten und im regenerierten Lebergewebe keine signifikanten Veränderungen.

Die *early-growth-response-1* (*egr-1*) wurde aufgrund seiner raschen Induktion in zahlreichen Zelltypen nach Wachstums-, Differenzierungs- und Apoptosereizen als ein Immediate-Early-Gen (IEG) charakterisiert (Gashler et al. 1993, Kilbourne et al. 1995, Sukhatme et al. 1988). Seine rasche Induktion wurde in einer vorhergehenden Arbeit in den ersten zwei Stunden im regenerierten Lebergewebe nach einer partiellen Hepatektomie und nach einer PAL im hypertrophierten Lappen als selektiv dargestellt (Müller et al. 2003). In dieser vorliegenden Arbeit war die Expression der *egr-1* mRNA im PH-Modell sowohl im atrophierten- als auch im regenerierten Gewebe der PAL im Vergleich mit der SO nach 3 Stunden erhöht induziert. Diese Ergebnisse deuten einerseits darauf hin, dass die chirurgischen Traumata auch die Basalwerte der *egr-1* mRNA Expression ohne signifikanten Effekten beeinflussen, andererseits könnte die schnelle Änderung der portalen Hämodynamik nach der PAL und PH möglicherweise als ein Trigger-

Mechanismus für die Induktion der egr-1 wirken. Nach 6, 12, 48 und 192 Stunden war die egr-1 mRNA Expression im ligierten Gewebe im Vergleich mit dem nicht ligierten Gewebe besonders deutlich erhöht. Nur nach 96 Stunden stellten wir eine geringere Erhöhung fest. Bei 24 Stunden wurde ein Rückgang der egr-1-spezifischen mRNA ohne offensichtliche Unterschiede zu den anderen Modellen beobachtet. Die persistierende Erhöhung der egr-1 Expression in den späteren Stadien nach der PAL im ligierten Lappen im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen bestätigt einerseits die Angaben von Starkel und Uemura und deutet andererseits daraufhin, dass die erhöhte egr-1 Expression im atrophierten Lebergewebe selektiv zu betrachten ist. Diese selektive Induktion wird möglicherweise aufgrund heterogener Stressoren, z.B. der kompensatorische Anpassung des portal deprivierten Lebergewebes an die milde Hypoxie und das veränderte Nährstoff- und Metabolitmilieu erklärt. Diese Stressoren lösen ähnliche molekulare Antworten aber mit definitiv biologisch entgegengesetzten Resultaten aus. Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor egr-1 eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielt (Khachigian et al. 2004, Wilson et al. 2006). Die unerwartete Abnahme der Expression des egr-1 24 Stunden nach der PAL im ligierten Lappen bleibt jedoch unverständlich. Es lässt vermuten, dass andere heterogene Stressoren z.B. die arterielle kompensierte Perfusion im ligierten Gewebe nach der PAL im Zusammenhang mit der Atrophie dabei eine Rolle spielen.

Die Expression spezifischer mRNA von hmox-1 war eine Stunde postoperativ in allen geprüften experimentellen Bedingungen vergleichbar rasch induziert. Nach 3 Stunden stieg das Niveau in allen Modellen besonders im nicht ligierten Gewebe und im PH-Modell an. Anhand der Beobachtung, dass die Expression der hepatischen hmox-1-mRNA nach 3 Stunden postoperativ in allen geprüften experimentellen Bedingungen induziert ist, könnte man vermuten, dass der chirurgische Stress als ein effektiver Stimulus seiner Expression, analog zur egr-1 Expression, zu werten ist. Ebenfalls könnte die schnelle Änderung der portalen Hämodynamik nach der PAL und PH als ein Trigger-Mechanismus für die Induktion der hmox-1 sein. Erst nach 6 Stunden im PAL-Modell waren die hmox-1 Signale in den ligierten Leberlappen im Vergleich zu allen anderen Modellen hoch selektiv zu betrachten. Nach 12, 24, 48 und 96 Stunden ging die Expression der

mRNA der *hmx-1* in allen Modellen etwas zurück. Trotzdem war das Niveau im ligierten Lappen des PAL-Modells im Vergleich zu den anderen operativen Verfahren immer noch erheblich erhöht. In einer Studie wurde bestätigt, dass die *hmx-1* eine geordnete Rolle zur Erhaltung der hepatischen Perfusion nach Gefäßschäden durch Trauma oder Ischämie z.B. nach einer PAE spielt (Nie et al. 2002). Andere Studien bewiesen, dass die Induktion von *hmx-1* einen zytoprotektiven Effekt gegen oxydierende Stressoren z.B. inflammatorische Zytokine, Endotoxin, Häm, Hyperthermie und NO sowie antiapoptische Vorgänge hat (Applegate et al. 1991, Rizzardini et al. 1993, Choi et al. 1996, Morse et al. 2002).

Ähnlich wurde die rasche Expression von *hsp-70* spezifischer mRNA während der ersten 3 Stunden in allen Modellen beobachtet. Nach 6, 12 und 48 Stunden wurde eine selektive Expressionssteigerung im ligierten Leberlappen des PAL-Modells im Vergleich zu den anderen Modellen gefunden. Seine molekularen Antworten während der Leberregeneration in unseren Experimenten waren relativ gering, da das Gewebe des PH-Modells und des nicht-ligierten PAL-Modells, in denen die kompensatorische Leberregeneration stattgefunden hat, keine erheblichen Veränderungen der Expression des mRNA der *hsp-70* im ganzen postoperativen Verlauf im Vergleich zur SO oder den Kontrollproben zeigten. Im Gegensatz zu der Studie von Konishi et al. 1995, in der eine erhöhte Expression von *hsp-70* nach der PH beobachtet wurde, war seine Expression 12 und 24 Stunden nach der PH in unserem Ergebnis relativ niedrig.

Die erhaltene Induktionen von *hmx-1* zusammen mit *egr-1* und *hsp-70* im portalen ligierten Lebergewebe im PAL-Modell in späteren Stadien legen nahe, dass diese Proteine bei den regulatorischen Anpassungen des Lebergewebes an die neuen unphysiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle spielen.

Die Fähigkeit von *egr-1*, *hsp-70* und *hmx-1* die Zellen vor stressvollen Anregungen zu schützen, kann für die Tumorzellbiologie wichtig sein. Infolgedessen ist es möglich, dass die Hepatozyten, die innerhalb des ligierten Portalgewebes liegen, eine regulierte Induktion von diesen *stress-*

response als Abwehrmechanismus gegen lokale unphysiologische Bedingungen an der Grenzregion zwischen Tumor- und Lebergewebe veranlassen, um ihren Widerstand zu verbessern aber wohl gleichzeitig die Tumorzellen zur Invasion anregen.

Für die uPA- und uPAR-Expression waren keine signifikanten Veränderungen sowohl nach der PAL in beiden Lappen, als auch der PH und der SO zu sehen. In den Kontrollproben waren die Signale der Transkripte etwas erhöht vorhanden. Da die mRNA Expression von uPA und uPAR nach der Chirurgie im Vergleich zu Kontrollen nur ein wenig erhöht war, gab es keinen statistisch bedeutenden Unterschied unter den experimentell geprüften Bedingungen, somit wurden keine Regulationen beobachtet. Diese fehlende Regulation der mRNA für uPA nach der PH stimmt mit einem vorhergehenden Bericht (Mars et al. 1995) überein. In einer anderen Studie lies sich eine Erhöhung der mRNA von uPA und uPAR in dem veränderten Gewebe in Verbindung mit dem hepatozellulären Karzinom nachweisen (De Petro et al. 1998). Hier kann man auch vermuten, dass diese unspezifische Induktion von uPA und uPAR nur im Rahmen der Gewebe-Remodellierung unter unphysiologischen Bedingungen verursacht wird. Da uPA und uPAR im ligierten Gewebe nach der PAL unspezifisch induziert waren, spekulierten wir, dass der Inhibitor (pai-1) auch hier induziert ist.

Die sofortige frühe Induktion von pai-1 während der Leberregeneration nach der PH und der PAL im nicht-ligierten Gewebe ist in früheren Arbeiten von beschrieben worden (Müller et al. 2002, Schneidermann et al. 1993). In dieser Arbeit war die spezifische mRNA von pai-1 sowohl im ligierten Lappen des PAL-Modells als auch im regenerierten Gewebe des PH-Modells nach 6, 12, 48 und 96 Stunden im Vergleich zum regenerierten des nicht ligierten Lappens des PAL-Modells und zu den SO-Proben erheblich erhöht dargestellt. In den Kontrollproben war die Expression von mRNA des pai-1 kaum erkennbar. Die Bestätigung, dass der pai-1 eine entscheidende Rolle in der Modulierung des Lebergewebes spielt (Andreasen et al. 1997, Bajou et al. 1998, De Petro et al. 1998) deutet zusammen mit der Erhöhung seiner Expression im atrophierten Gewebe des PAL-Modells und im regenerierten Gewebe nach der PH darauf hin, dass dieses Protein an der Regulation der Umbauprozesse beteiligt ist. In verschiedenen Studien konnten Hinweise auf eine

Aktivierung des Urokinasesystems bei der Tumorprogression erbracht werden (Allgayer et al. 1995, Pappot et al. 1995, Dano et al. 1994). Für die Behandlung zahlreicher Tumore z.B. Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Hepatozellulärekarzinom, Kolorektalkarzinom und Magenkarzinom hat die Bestimmung von uPA und pai-1 laut mehrerer Daten eine prognostische Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von uPA und/oder pai-1 im Primärtumor mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko und einem kürzeren Gesamtüberleben einhergehen. (Jänicke et al. 1993, De Petro 1998, Konno et al. 2001, Salden et al. 2000, Kaneko et al. 2003). Obgleich seine definitive Rolle für die Progression dieser Tumore unklar ist, vermuten wir, dass die Hemmung der übermäßigen Plasminproteolyse durch pai-1 möglicherweise die Neoangiogenese des Tumorgewebes unterstützt.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine selektiv verstärkte Expression von egr-1, hmox-1 und hsp-70 im atrophierten Lebergewebe im Gegensatz zum regenerierten nach der PAL und der PH sowie der SO festgestellt. Pai-1 zeigte eine selektive Induktion nur im atrophierten Gewebe nach der PAL und im regenerierten Lebergewebe nach der PH. Die Resultate der uPA- und uPAR-Expression zeigten im atrophierten und im regenerierten Lebergewebe keine signifikanten Veränderungen.

Anhand dieser Ergebnisse stellen wir die Hypothese auf, dass die durch die PAL induzierte Leberatrophie Abwehrmechanismen wie die gesteigerte Expression von egr-1, hmox-1, hsp-70 und pai-1 auslöst, um eine Neovaskularisierung als Antwort auf die unphysiologischen Bedingungen zu stimulieren, die wiederum die Regulierung der Proliferations- und Wiederherstellungsprozesse fördert.

Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass diese genannten Faktoren als bedeutsam im Rahmen der Tumorprogression und Angiogenese charakterisiert wurden, könnte man davon ausgehen, dass es in den Lebertumoren im Rahmen des Atrophieprozesses auch hier zu einer Hochregulation dieser molekularen Mechanismen kommt. Hierdurch könnte die Therapieresistenz, das Wachstum und die Angiogenese begünstigt werden.

6. Zusammenfassung

Die Leberresektion gilt als einzige kurative Möglichkeit bei der Behandlung von malignen Lebertumoren. Aufgrund der ausgeprägten Regenerationsfähigkeit der Leber könnte problemlos bis zu 60% seines gesamten Volumens ohne Beeinträchtigung der gewebespezifischen Funktionen entfernt werden. Bei kritischer erweiterter Leberteileresektion wird in der Klinik eine präoperative Pfortaderastembolisation durchgeführt, um einem möglichen postoperativen Leberversagen entgegenzuwirken.

Das Ziel dieser Technik ist die Induktion einer Hypertrophie des tumorfreien Leberanteils und einer Atrophie des befallenen Leberanteils. Als unerwünschte Nebeneffekte nach der Durchführung dieser Methode konnte nach vorhandenen klinischen Daten eine Tumorinvasion und die Verkürzung des Metastasierungsintervals beobachtet werden.

Als mögliche Ursachen dafür wurden verschiedene Faktoren diskutiert, die einerseits als Unterstützungs- bzw. Anpassungsreaktion des Lebergewebes auf die entstandenen hämodynamischen Veränderungen bzw. die unphysiologischen hypoxischen Bedingungen nach der Pfortaderastokklusion betrachtet werden, und andererseits bei der Tumorinvasion, -angiogenese und -immunresistenz potentiell eine Rolle spielen.

In dieser vorliegenden Studie wurde die Genexpression von *egr-1*, *hmx-1*, *hsp-70*, sowie *uPA*, sein Rezeptor *uPAR* und sein Inhibitor *pai-1* im Lebergewebe als Vertreter solcher zytoprotektiver tumorwachstumsfördernder Faktoren bestimmt.

Um die zeitlichen, örtlichen und situativen Bedingungen der Induktion dieser Faktoren im Lebergewebe selektiv zu bestimmen, haben wir Leberproben aus scheinoperierten Ratten als Analogmodell der chirurgischen traumatischen Bedingungen, Proben aus dem ligierten Lebergewebe der Ratten nach einer Pfortaderastligatur als Analogmodell zu atrophischen Bedingungen, sowie Proben aus nicht ligierten Lebergewebe der Ratten nach einer Pfortaderastligatur und Proben aus Lebergewebe der Ratten nach einer Leberteileresektion als Analogmodell zu regenerativen Bedingungen in bestimmten zeitlichen Abständen entnommen. Aus den Proben wurde die mRNA isoliert und anhand von RT-PCR und Northern-Blot-

Hybridisierung die Genexpression der o.g. Faktoren bestimmt.

Nach Durchführung der Versuche wurde im ligierten Lebergewebe nach der Pfortaderastligatur eine selektive Induktion von *egr-1*-mRNA, *hmox-1*, und *hsp-70* in späteren Stadien der Leberatrophie im Gegensatz zur Leberregeneration und Scheinoperation festgestellt. Die Resultate der uPA- und uPAR-Expression zeigten im atrophierten und im regenerierten Lebergewebe keine signifikanten Veränderungen. *Pai-1* zeigte eine selektive Induktion sowohl im regenerierten Lebergewebe nur nach der partiellen Hepatektomie, als auch im atrophierten Gewebe nach der Pfortaderastligatur.

Da die Pfortaderastembolisation in der Klinik zur einer Atrophie des mit Metastasen bzw. Tumoren besiedelten Lebergewebes führt, und die Leberatrophie mit einer erhöhten Expression der oben untersuchten Faktoren verbunden ist, könnte man davon ausgehen, dass diese auch in Tumoren bzw. Metastasen verstärkt expremiert werden und dadurch Wachstums, Angiogenese und Invasion fördern.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP 1	Adaptor-Komplex 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
Bag-1	BCL2-associated athanogene 1
Bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CO	Kohlenmonoxid
c-fos	FBJ osteosarcoma oncogene
c-Jun	c-Jun protein
c-myc	c-myc protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	Early growth factor
egr-1	early growth response gene-1
et al.	et alii
Fas	fatty acid synthase
FasL	Fas antigen ligand
G	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
hmo x-1	Hämoxygenase-1
hsp-70	Heat-shock-protein
H2B	Histon H2B

IEG	Immediate early genes
Il-6	Interleukin-6
K	Kontrolle
Kb	Kilo-Basenpaare
kD	Kilo-Dalton
MG	Molekular Gewicht
Min	Minuten
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MOPS	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
NF-κβ	Nuklear Faktor kappa-β
nm	Nanometer
NO	Stickstoff-Monoxid
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-1
PAE	Pfortaderastembolisation
PAL	Pfortaderastligatur
PAL-lig	ligierter Leberlappe
PAL-nlig	nicht ligierter Leberlappe
PAO	Pfortaderastokklusion
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PH	Partielle Hepatektomie
PDGF	Platelet-derived growth factor
p53	tumor suppressor protein p53
RB	Running Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase

SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SO	Scheinoperation
SSC	Sodium salt citrate
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
Tab.	Tabelle
TGF β 1	Transforming growth factor β 1
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor
uPA	urokinase-Plasminogenaktivator
uPAR	urokinase-plasminogenaktivator-rezeptor
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZnPP IX	Zink Protoporphyrin

8. Literaturverzeichnis

Ackerman N. B. Experimental studies on the role of the portal circulation in hepatic tumor vascularity. *Cancer* 1986; 58: 1653-7.

Allgayer H., Heiss M. M., Babic R., Grützner K. U., Jauch K. W., Löhns U., Schildberg F. W. Expression of tumor-associated proteases and their inhibitors in gastric cancer: Impact on prognosis. *AACR Proceeding* 1995; 36: 93.

Andreasen P. A., Georg B., Lund L. R., Riccio A., Stacey S. N. et al. Plasminogen activator inhibitors hormonally regulated serpins. (Review) (171 refs). *Molecular & Cellular Endocrinology* 1990; 68: 1-19.

Andreasen P. A., Kjoller L., Christensen L. and Duffy M. J. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 1997; 72: 1-22.

Angelidis C. E., Lazaridis I., Pagoulatos G. N. et al. Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. *Eur. J Biochem.* 1991; 199: 35-39.

Applegate L.A., Luscher P., Tyrrell R.M. et al. *Cancer Res.* Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress stimuli in cultured mammalian cells. 1991; 51: 974-8

Arrigo A. P. and Kretz-Remy C. Regulation of mammalian gene expression by free radicals. In: O.I. Aruoma and B.Halliwell (Hrsg) *Molecular Biology of free radicals in human diseases.* OICA International, Santa Lucia, London. 1998; S. 183-223

Azoulay D., Castaing D., Smail A. et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg.* 2000; 231: 480-86.

Baier P., Wolf-Vorbeck G., Hempel S., Hopt U. T., von Dobschuetz E. Effect of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy and Ischemia-Reperfusion on Expression of Growth Factor Receptors. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12: 3835-3840.

Bajou K., Noel A., Gerard R. D. et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998; 4: 923-28.

Barbaro B., Di Stasi C., Nuzzo G., Vellone M., Giuliante F., Marano P. Preoperative Right Portal Vein Embolization in Patients with Metastatic Liver Disease. *Metastatic Liver Volumes after RPVE. Acta Radiologica* 2003; 44: 98-102.

Berberat P. O., Dambrauskas Z., Gulbinas A., Giese T., Giese N., Kunzli B., Autschbach F., Meuer S., Buchler M. W., Friess H. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3790-3798.

Blasi F. Surface receptors for urokinase activator.; *Fibrinolysis* 1988; 2: 73-84.

Blasi F. Urokinase and urokinase receptor: A paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness.; *BioEssays* 1993; 15: 105-111.

Blasi F. u-PA, u-PAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways?; *Immunology Today* Vol.18, 1997; 9: 415-417.

Broering D. C., Hillert C., Krupski G., Fischer L., Müller L., Achilles E. G., Schulte am Esch J., Rogiers X. Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 905-913.

Bukau B. and Horwich A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998; 92: 351-366.

Caruana J. A., Goldman J. K., Camara D. S., Gage A. A. Insulin, glucagon and glucose in the regeneration response of the liver. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1981; 153: 626-630.

Chen G. G., Liu Z. M., Vlantis A. C., Tse G. M., Leung B. C., van Hasselt C. A. et al. Heme oxygenase-1 protects against apoptosis induced by tumor necrosis factor- alpha and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. *J Cell Biochem* 2004; 9: 1246-56.

Cheng J., Chao Y. J., Wung B. S., Wang D. L. et al. Cyclic strain-induced plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) release from endothelial cells involves reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 225: 100-105.

Chijiwa K., Saiki S., Noshiro H., Kameoka N., Nakano K. et al. Effect of Preoperative Portal Vein Embolization on Liver Volume and Hepatic Energy Status of the Nonembolized Liver Lobe in Humans. *European Surgical Research* 2000; 32: 94-99;

Choi A. M. and Alam J. Heme-oxygenase-1: function, regulation and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Cell Respir Mol Biol* 1996; 15: 9-19

Cressman D. E., Greenbaum L. E., DeAngelis R. A., Ciliberto G., Furth E. E., Poli V., Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996; 274: 1379-1383.

Cubellis M. V., Wun T. C., Blasi F. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *Embo J.* 1990; 9: 1079-85.

Dano K., Andreasen P. A., Grondahl-Hansen J., Kristensen P., Nielsen L. S., Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. [Review] [1000 refs]. *Advances in Cancer Research* 1985; 44: 139-266.

Dano K., Behrendt N., Brünner N., Ellis V., Ploug M., Pyke C. The urokinase receptor Protein structure and role in plasminogen activation and cancer invasion. *Fibrinolysis* 1994; 8: 189-203.

De Petro G., Tavian D., Copeta A. et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), u-PA Receptor, and tissue-type PA messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 2234-39.

Denys A. I., Abehsera M., Leloutre B. et al. Intrahepatic hemodynamic changes following portal vein embolization: a prospective Doppler study. *Eur Radiol* 2000; 10: 1703-7.

Deramaudt B. M., Braunstein S., Remy P., Abraham N. G. Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 1998; 68: 1: 121-7.

Dulak J., Jozkowicz A., Foresti R., Kasza A., Frick M., Huk I., Green C.J., Pachinger O., Weidinger F., Motterlini R. Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 229-40.

Elias D., De Baere T., Roche A., Ducreux M., Leclere J., Lasser P. During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. *Br J Surg* 1999; 86: 784-788.

Ellis V., Behrendt N., Dano K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem*, 1991; 266: 12752-8.

Ellis R. J. et al. Discovery of molecular chaperones” *Cell Stress & Chaperones* 1996; 1: 155-60.

Engler-Blum G., M. Meier, J. Frank, G. A. Muller et al. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal. Biochem.* 1993; 210: 235-244.

Fang J., Sawa T., Akaike T., Greish K. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* 2004; 109: 1-8.

Fausto N., Laird A. D., Webber E. M. Liver regeneration. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995; 1527-1536.

Freeman B. C., Myers M. P., Schumacher R., Morimoto R. I. Identification of a regulatory motif in HSP70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.* 1995; 14: 2281-2292.

Fujii Y., Shimada H., Endo I. et al. Changes in clinicopathological findings after portal vein embolization. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1560-63.

Garrido C., Gurbuxani S., Ravagnan L., and Kroemer G.. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 433-442.

Gashler A. L., Swaminathan S., and Sukhatme V. P. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol. Cell Biol.* 1993; 13: 4556-4571.

Gashler A. L., Sukhatme, V. P. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors, *Prog. Nucleic. Acid Res Mol Biol.* 1995; 50: 191-224.

Gertsch P., Stipa F., Ho J., Yuen S. T., Luk I. Changes in hepatic portal resistance and in liver morphology during regeneration: in vitro study in rats. *Eur J Surg* 1997; 163: 297-304.

Goodman A. I., Choudhury M., da Silva J. L., Schwartzman M. L. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214: 54-61.

Haber B. A., Mohn K. L., Diamond R. H., Taub R. et al. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J. Clin. Invest* 1993; 91: 1319-1326.

Higgins G. M, Anderson R. M. Experimental pathology of the liver; Restoration of the liver by the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202.

Hillert C., Lenk C., Müller L., Krupski G., Rogiers X., Broering D.C. Chirurgische Therapie von Lebermetastasen: Protektive Maßnahmen bei kleiner Restleber. *Chirurgische Gastroenterologie Interdisziplinär* 2003; 19: 340-348.

Holtke, H. J., G. Sagner, C. Kessler, G. Schmitz. et al. Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its applications. *Biotechniques* 1992; 12: 104-113.

Huang R. P., Liu C., Fan Y., Mercola D., Adamson E. D. Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain. *Cancer Res.* 1995; 55: 5054-5062

Ito Y., Hayashi H., Taira M., Tatibana M., Tabata Y., Isono K. Depression of liver-specific gene expression in regenerating rat liver: a putative cause for liver dysfunction after hepatectomy. *J. Surg. Res.* 1991; 51: 143-147.

Jaeck D., Bachellier P., Nakano H., Oussoultzoglou E., Weber J. C., Wolf P., Greget M. One or Two-Stage Hepatectomy Combined with Portal Vein Embolization for Initially Nonresectable Colorectal Liver Metastases. *The American Journal of Surgery* 2003; 185: 221-229.

Jäättelä M. et al. Escaping cell death, survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999; 248: 30-43.

Jänicke F., Schmitt M., Pache L. Urokinase (u-PA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node negative breast cancer., *Breast Cancer Res* 1993; 24195-208.

Jänicke F., Prechtel A., Thomssen C., Harbeck N., Meisner C., Untch M. adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor. Type 1. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93: 913-920.

Kan Z. et al. Dynamic study of iodised oil in the liver and blood supply to hepatic tumors. an experimental investigation in several animal species. *Acta Radiol Suppl* 1996; 408: 1-25.

Kanematsu T., Takenaka K., Matsumata T., Furuta T., Sugimachi K. and Inokuchi K. Limited hepatic resection effective for selected cirrhotic patients with primary liver cancer. *Ann Surg.* 1984; 199: 51-56.

Kanematsu T., Takenaka K., Furuta T., Ezaki T., Sugimachi K., and Inokuchi K. Acute portal hypertension associated with liver resection. Analysis of early postoperative death. *Arch. Surg.* 1985; 120: 1303-1305.

Kaneko T., Konno H., Baba M., Tanaka T., Nakamura S. Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer; *Cancer Sci* 2003; 94: 43-49.

Khachigian M. L., Anderson K. R., Halnon N. J., Gimbrone M. A., Resnick N., Collins T., Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shearstress response element in the PDGF A chain promotor. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1997; 17: 2280-2286.

Khachigian, L. M., Early growth response-1: Blocking Angiogenesis by Shooting the messenger. *Cell Cycle* 2004; 3: 10-11.

Kilbourne E. J., Widom R., Harnish D. C., Malik S., Karathanasis S. K. Involvement of early growth response factor Egr-1 in apolipoprotein AI gene transcription. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 7004-7010.

Kim, Hong Pyo, Ryter, Stefan W., Choi, Augustine M.K. Co as a cellular signalling molecule. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 411-449.

Kokudo N., Tada K., Seki M. et al. Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology* 2001; 34: 267-72.

Kohler H. P., Grant P. J. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1792-801.

Konno H. et al. Urokinase Receptor and Vascular Endothelial Growth Factor Are Synergistically Associated with the Liver Metastasis of Colorectal Cancer; *Jpn J Cancer Res.* 2001; 92:516-523.

Kubo, S., Shiomi S., Tanaka H., Shuto T., Takemura S., Mikami S., Uenishi T., Nishino Y., Hirohashi K., Kawamura E. Evaluation of the effect of portal vein embolization on liver function by (99m)tc-galactosyl human serum albumin scintigraphy. *J. Surg. Res* 2002; 107: 113-118.

Kusaka K., Imamura H., Tomiya T., Takayama T., Makuuchi M. Expression of Transforming Growth Factor- α and - β in Hepatic Lobes after Hemihepatic Portal Vein Embolization. *Digestive Diseases and Sciences* 2006; 51: 1404-1142.

LaBrecque D. et al. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am. J. Gastroenterol* 1994; 89: 86-96.

Lambert C. A., Colige A. C., Munaut C., Lapiere C. M., Nusgens B. V. Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biol.* 2001; 20: 397-408.

Lautt, W. W. Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed. Proc.* 1983; 42: 1662-1666.

Lee S., Hadengue A., Girod C., Braillon A., Lebrec D. Reduction of intrahepatic vascular space in the pathogenesis of portal hypertension. In vitro and in vivo studies in the rat. *Gastroenterology* 1987; 93: 157-161.

Li W., Liang X., Leu J. I., Kovalovich K., Ciliberto G., Taub R. Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 2001; 33:1377-1386.

Lijnen H. R., Collen D. Mechanisms of plasminogen activation by mammalian plasminogen activators. *Enzyme* 1988; 40: 90-6

Lindquist S., Craig E. A. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-677.

Loboda, A., Jazwa A., Wegiel B., Jozkowicz A. and Dulak J. Heme oxygenase-1-dependent and -independent regulation of angiogenic gene expression: effect of cobaltprotoporphyrin and cobalt chloride on VEGF and IL-8 synthesis in human microvascularendothelial cells. *Cell. Mol. Biol.* 2005; 51: 347-355.

Loskutoff D. J., Sawdey M. and Mimuro J. Type 1 plasminogen activator inhibitor. [Review] [191 refs]. *Progress in Hemostasis & Thrombosis* 1989; 9: 87-115.

Loskutoff D. J., Curriden S. A., Hu G. Regulation of cell adhesion by PAI-1 1999; 107: 54-61.

Makuuchi M., Thai B. L., Takayasu K., Takayama T., Kosuge T., Gunven P., Yamazaki S., Hasegawa H., Ozaki H. Preoperative portal vein embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma. A preliminary report. *Surgery* 1990; 107: 521-27.

Mareel M., Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol. Rev.* n. 2002; 83: 337-76.

Mars W. M., Liu M. L., Kitson R. P. et al. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implication for initiation of liver regeneration. *Hepatology* 1995; 21: 1695-1701.

Marsh D. G. et al. Approaches toward the genetic analysis of complex traits: asthma and atopy. *Allergy* 1999; 54: 198-205.

Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66.

Milbrandt J. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor, *Science* 1987; 238: 797-799.

Miles K. A., Leggett D. A. C., Kelley B. B. et al. In vivo assessment of neovascularization of liver metastases using perfusion CT. *Br J. Radiol.* 1998; 71: 276-281.

Milland J., Tsykin A., Thomas T., Aldred A. R., Cole T. and Schreiber G.. Gene expression in regenerating and acute-phase rat liver. *Am. J. Physiol* 1990; 259: 340-347.

Mitchell A., Dass C. R., Sun L. Q., Khachigian L. M. Inhibition of Human Breast Carcinoma Proliferation, Migration, Chemoinvasion and Solid Tumour Growth by DNazymes Targeting the Zinc Finger Transcription Factor EGR-1. *Nucleic Acids Research* 2004; 32: 3065-3069.

Miyagawa S., Kawasaki S. et al. Präoperative portale Embolisation zur Induktion von Leberhypertrophie. *Der Chirurg* 2001; 72: 770-774.

Morawietz H., Ma Y. H., Vives F., Wilson E., Sukhatme V. P., Holtz J., and Ives H. E.. Rapid induction and translocation of Egr-1 in response to mechanical strain in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1999; 84: 678-687.

Morimoto R. I., Sarg K. D. and Abravaya K. Transcriptional regulation of heat shock genes. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 21978-21990.

Morse D. and Choi A. M. Heme oxygenase-1. The “emerging molecule” has arrived. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 27: 8-16.

Morsiani E., Aleotti A., Ricci D. et al. Haemodynamic and ultrastructural observations on the rat liver after two-thirds partial hepatectomy. *J. Anat.* 1998; 192: 507-515.

Müller L., Broering D. C., Meyer J., Vashist Y., Goettsche J., Wilms C., and Rogiers X. The induction of the immediate-early-genes Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. *J Hepatol* 2002; 37: 606-1.

Müller L., Grotelueschen R., Meyer J. et al. Sustained function in atrophying liver tissue after portal branch ligation in the rat. *J Surg Res* 2003; 114 : 146-55.

Nagano Y., Nagahori K., Yoshiro F. et al. Gene expression profile analysis of regenerating liver after portal vein ligation in rats by a cDNA microarray system. *Liver Int.* 2004; 24: 253-8.

Nagino M., Nimura Y., Kamiya J. et al. Immediate increase in arterial blood flow in embolized hepatic segments after portal vein embolization: CT demonstration. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 171: 1037-39.

Naldini L., Weidner K. M., Vigna E., Gaudino G., Bardelli A. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO* 1991; 10: 2867-2878.

Nguyen H. Q., Hoffman-Liebermann B., Liebermann D. A. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 1993; 72: 197-209.

Nie R. G., Mccarter S. D., Harris K. A. et al. The role of endogenous heme oxygenase in the initiation of liver injury following limb ischaemia/reperfusion. *J Hepatol* 2002; 36: 624-30.

Niiya T., Murakami M., Aoki T., Murai N., Shimizu Y., Kusano M. Immediate increase of portal pressure, reflecting sinusoidal shear stress, induced liver regeneration after partial hepatectomy. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* 1999; 6: 275-280.

Nikfarjam M., Muralidharan V., malcontenti-wilson C., Christophi C. Scanning electron microscopy study of the blood supply of human colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 856-61.

Nishie A., Ono M., Shono T., Fukushi J., Otsubo M., Onoue H., Ito Y., Inamura T., Ikezaki K., Fukui M., Iwaki T., Kuwano M. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer* 1999; 5: 1107-13.

Nollen E. A., Brunsting J. E., Roelofsen H., Weber L. A. and Kampinga H. H. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19: 2067-2079.

Nylandsted J., Wick W., Hirt U. A. et al. Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res* 2002; 62: 7139-142.

Okochi O., Kaneko T., Sugimoto H., Inoue S., Takeda S., Nakao A. ICG pulse spectrophotometry for perioperative liver function in hepatectomy. *J. Surg. Res.* 2002; 103:109-113.

Pappot H., Gårdsvoll H., Rømer J., Pedersen A.N., Grøndahl-Hansen J., Pyke Ch., Brüner N. Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Cancer: Therapeutic and Prognostic Implications. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1995; 376: 259-27.

Parcellier A., Gurbuxani S., Schmitt E., Solary E., Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 505-12.

Peng Y., Du K., Ramirez S., Diamond R. H., Taub R. Mitogenic upregulation of the PRL-1 protein-tyrosine phosphatase gene by Egr-1. Egr-1 activation is an early event in liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 4513- 4520.

Pollanen J., Stephens R. W. and Vaheri A. Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells. [Review] [442 refs]. *Advances in Cancer Research*, 1991; 57: 273-328.

Rashmi R., Kumar S., Karunagaran D. Ectopic expression of Hsp70 confers resistance and silencing its expression sensitizes human colon cancer cells to curcumin-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 179-87.

Richter S., Vollmar B., Mücke I., Post S., Menger M. D. Hepatic Arteriole- Portal Venular Shunting Guarantees Maintenance of Nutritional Microvascular Supply in Hepatic Arterial Buffer Response of Rat Liver. *Journal of Physiology* 2001; 531: 193-201.

Rizzardini M., Terao M., Falciani F., Cantoni L. Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver: Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. *Biochem J* 1993; 290: 343-347.

Roldan A. L., Cubellis M. V., Masucci M. T., Behrendt N., Lund L. R., Dano K., Appella E. and Blasi F. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis [published erratum appears in *EMBO J* 1990; 5: 1674]. *EMBO Journal*, 9:467-474.

Salden M., Splinter T. A. et al. The urokinase-type plasminogen actiator system in resected non small-cell lung cancer. *Rotterdam Oncology Thoracic Group; Ann Oncol* 11 2000; 3: 327-323.

Sato M., Murao K., Mizobuchi M., Takahara J. Quantitative and sensitive northern blot hybridization using PCR-generated DNA probes labeled with digoxigenin by nick translation. *Biotechniques* 1993; 15: 880-882.

Sato Y., Tsukada K., Hatakeyama K. Role of shear stress and immune responses in liver regeneration after a partial hepatectomy. *Surg. Today* 1999; 29: 1-9.

Schalm L., Bax H. R., Mansens B. J. Atrophy of the liver after occlusion of the bile ducts or portal vein and compensatory hypertrophy of the unoccluded portion and its clinical importance. *Gastroenterology* 1956; 31:131-155.

Schneidermann J., Sawadey M., Craig H. et al. Type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression following partial hepatectomy. *Am J Pathol* 1993; 143: 753-62.

Shimada H., Tanaka K., Matsuo K., Togo S. Treatment for Multiple Bilobar Liver Metastases of Colorectal Cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2006; 391: 130-142.

Silverman E. S., Collins T. et al. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol.* 1999; 1543: 665-670.

Sirichindakul B., Nonthasoot B., Thienpaitoon P., Nivatvongs S., Janchai A. Preoperative Portal Vein Embolization in Hepatobiliary Tract Malignancy: an Experience at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2005; 88: 1115-1119.

Starkel P., Horsmans Y., Sempoux C. et al. After portal branch ligation in rat, nuclear factor kappa β , interleukin-6, signal transducers and activators of transcription 3, c-fos, c-myc, and c-jun are similarly induced in the ligated and nonligated lobes. *Hepatology* 1999; 29: 1463-70.

Sukhatme V. P., Cao X. M., Chang L. C., Tsai-Morris C. H., Stamenkovich D., Ferreira P. C., Cohen D. R., Edwards S. A., Shows T. B. zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 1988; 53: 37- 43.

Sunamura M., Duda D. G., Ghattas M. H., Lozonchi L., Motoi F. Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 2003; 6: 15-24.

Takeda A., Stoeltzing O., Ahmed S. A. et al. Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis. *Ann. Surg. Oncol.* 2002; 9: 610-16.

Tanaka H., Kinoshita H., Hirohashi K., Kubo S., Lee K. C. Increased safety by two-stage hepatectomy with preoperative portal vein embolization in rats. *J. Surg. Res.* 1994; 57: 687-692.

Tanaka S., Akaike T. Fang J. et al. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-I induced by nitric oxide in experimental solid tumor. *Br J Cancer* 2003; 88: 902-9.

Terry C. M., Clikeman J. A., Hoidal J. R., Callahan K. S. Effect of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 α on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol*; 274 (heart circ physiol 43) 1998; H: 883-91.

Topaloglu S., Izci E., Ozel H., Topaloglu E., Avsar F. M. et al. Effects of TVE application during 70% hepatectomy on regeneration capacity of rats. *J Surg Res* 2005; 124: 139-145.

Uemura T. Miyazaki M., Mirai R. et al. Different expression of positive and negative regulators of hepatocyte growth in growing and shrinking hepatic lobes after portal vein branch ligation in rats. *Int J Mol. Med.* 2000; 5: 173-79.

Uesaka, K., Nimura Y., Nagino M. Changes in hepatic lobar function after right portal vein embolization. An appraisal by biliary indocyanine green excretion. *Ann. Surg.* 1996 ; 223: 77-83.

Urayama, M., Ishiyama S., Kuzumaki T., Ishikawa K., Fuse A. et al. Change of liver function in hypertrophying lobe of rabbit liver after portal branch ligation. *J. Surg. Res.* 1999; 86: 55-61.

Wakabayashi H., Ishimura K., Okano K. et al. Is preoperative portal vein embolization effective in improving prognosis after major hepatic resection in patients with advanced-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 2384-90.

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

Wilson E. L., Jacobs P., Dowdle E. B. The secretion of plasminogen activators by human myeloid leukemic cells in vitro. *Blood* 1983; 61: 568-574.

Wilson E. L. and Francis G. E. Differentiation-linked secretion of urokinase and tissue plasminogen activator by normal human hemopoietic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1987; 165: 1609-1623.

Wilson J. W., Hii S. The importance of the airway microvasculature in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006; 6: 51-55.

Worden B., Yang X. P., Lee T. L., Bagain L., Yeh N. T., Cohen J. G. et al. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Differentially Regulates Expression of Proangiogenic Factors Through Egr-1 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research* 2005; 65: 7071-7080.

Xiong Z. P., Yang S. R., Liang Z. Y. et al. Association between Vascular Endothelial Growth Factor and Metastasis after Transcatheter Arterial Chemoembolization in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International* 2004; 3: 386-390.

Yamamoto, H., Nimura Y., Yasui A., Moriura S. et al. Changes in hepatic hemodynamics and oxygen consumption after partial hepatic congestion in dogs. *Eur. Surg. Res.* 1992; 24: 169-179.

Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S. An alternative pathway for nitric oxide production: New features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* 1999; 4: 128-129.

Yigitler C., Farges O., Kianmanesh R., Regimbeau J. M., Abdalla E. K. The small remnant liver after major liver resection: How common and how relevant? *Liver Transpl* 2003; 9: 18–25.

Zimmermann A. et al. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 6-10

9. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. X. Rogiers (Ehemaliger Direktor der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie) bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellten Arbeitsbedingungen und die wissenschaftliche Förderung am Fortgang meiner Arbeit. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Björn Nashan (Direktor der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie) sowie Herrn PD. Dr. med. Lutz Fischer (Stellv. Direktor der Klinik) für die weitere Betreuung.

Außerdem bedanke ich mich bei Juliane Götsche und Mitarbeiter des Labors der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie ganz besonders Frau Sigrid Himpel für die freundliche und umfassende Hilfe bei der Einarbeitung zur Durchführung der Versuche.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die geduldige und emotionale Unterstützung bedanken, besonders bei meiner Frau Lydia Abdulgawad zusätzlich für die grammatikalische Korrektur meiner Arbeit. Meinem Sohn Pady Abdulgawad gilt mein weiterer Dank, der mich sehr gut mit seinen EDV-Kenntnissen unterstützt hat.

Mein ganz herzlicher und besonderer Dank geht an meinem Betreuer Herrn PD. Dr. med. Lars Müller, der jederzeit für mich ansprechbar war und mich in allen Belangen persönlich und fachlich unterstützte.

10. Lebenslauf

Name: Awad Mohamed Abdulgawad

Geburtsdaten: geb. am 24.12.1963 in Damanshour/ Ägypten

Wohnort: Heinrich-Schröder-Straße 16, 25436 Uetersen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schule: 1969 - 1975 Karakas Primary School in Damanshour
1975 - 1978 Karakas Prep School in Damanshour
1978 - 1982 Omar Makram Secondary School in Damanshour
1992 - 1993 Fremdsprachenschule in Hamburg

Studium 1982 - 1986 Faculty of Science an der University of Alexandria
1995 - 1996 2 Semester Biochemie an der Universität Hamburg
1997 - 2000 Studium der Medizin an der Universität Rostock
2000 - 2004 Studium der Medizin an der Universität Hamburg
2005 - 2007 Stationsarzt und medizinischer freier Mitarbeiter auf der Station für
Internationale Patienten des Universitätsklinikums Hamburg-
Eppendorf
seit 01/2008 Assistenzarzt in der Fachklinik Aukrug, Aukrug

Uetersen, den 15.02.2010

11. Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgaben (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: