Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin I. Medizinischen Klinik und Poliklinik

Direktor : Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Die Wirkung von Follistatin auf die Leberregeneration im Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

> vorgelegt von Francis Jessica Huber, geb. Hoetomo aus Hamburg

> > Hamburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 09.10.2014 Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg Prüfungsausschuss: der Vorsitzende: Prof. Dr. C. Schramm Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. G. Tiegs Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD. Dr. J. Aberle

Meinen Eltern

Inhaltverzeichnis

Ab	okürzı	ungsve	rzeichnis	iii
1	Arbe	itshyp	othese und Fragestellung	5
2 Einleitung			6	
	2.1	Leber	regeneration	6
	2.2	Zytoki	ne	8
		2.2.1	TNF- α und IL-6	8
	2.3	Activir	n/ Follistatin System	8
		2.3.1	Activin	8
		2.3.2	Follistatin	9
		2.3.3	Die Rolle von Activin und Follistatin in der Leberbiologie	11
	2.4	Rolle	des unspezifischen Immunsystems	12
	2.5	Wach	stumsfaktoren	13
		2.5.1	Hepatozyten Wachstumsfaktor	13
		2.5.2	EGF und TGF-α	14
	2.6	Metab	oolische Faktoren	14
		2.6.1	Norepinephrin	15
		2.6.2	Insulin	15
	2.7	Partie	lle Hepatektomie	16
3	Mate	rial un	d Methoden	18
	3.1	Materi	ial	18
		3.1.1	Geräte	18
		3.1.2	Software	19
		3.1.3	Verbrauchsmateralien	19
		3.1.4	Chemikalien	20
		3.1.5	Puffer und Lösungen	20
		3.1.6	Antikörper, CBA- und sonstige Kits	21
		3.1.7	Oligonukleotide	22
		3.1.8	Wasser	22
		3.1.9	Sonstige Verbrauchsmittel	22
		3.1.10	Versuchstiere	23
	3.2	Metho	ode	23
		3.2.1	Zucht und Selektion transgener Tiere	23
		3.2.2	DNS Isolierung aus Gewebe	23
		3.2.3	Polymerasekettenreaktion	24
		3.2.4	DNS-Gelelektrophorese	24
		3.2.5	Partielle Hepatektomie	25
		3.2.6	RNS-Isolation	26

		3.2.7	Herstellung von cDNS	. 27
		3.2.8	Analyse der Growth Factor-Expression	. 27
		3.2.9	TUNEL-Färbung	. 27
		3.2.10) Ki-67 Färbung	. 28
		3.2.11	I Lebervolumenbestimmung	. 29
		3.2.12	2 CBA-FACS	. 29
		3.2.13	3 TGF-beta1 ELISA	. 29
		3.2.14	Statistiche Auswertung	. 30
		3.2.15	5 Graphische Darstellung	. 30
4	Erge	bnisse		31
	4.1	Unter: Leber	suchung des Einflusses von Follistatin auf das physiologis wachstum	che 31
	4.2	Unter nach	suchung des Einflusses von Follistatin auf die Leberregenera PHx	tion 33
		4.2.1	Volumenbestimmung mittels MRT	. 33
		4.2.2	Untersuchung der Leberarchitektur mittels HE-Färbung	. 34
		4.2.3	Bestimmung der Proliferationsrate mittels Ki-67 Färbung	. 35
		4.2.4	Bestimmung der Apoptoserate mittels TUNEL-Färbung	. 36
		4.2.5	Analyse der Growth Factor-Expression mittels RT-PCR	. 37
		4.2.6	Bestimmung der Zytokinenkonzentration im Serum mit Cytometric Bead Assay	tels 38
		4.2.7	Bestimmung der TGF-beta1 Serumkonzentration mittels ELI	SA39
5	Disk	ussior	۱	. 40
	5.1	Die W Wach	/irkung der Überexpression von Follistatin auf das physiologis stum der Leber	che 40
	5.2	Die Lo transg	eberregeneration nach partieller Hepatektomie in K14-Follist genen Mäusen	atin 41
		5.2.1	Volumenbestimmung mittels MRT	41
		5.2.2	Proliferations- und Apopotoseratebestimmung	. 42
		5.2.3	Analyse der Wachstumsfaktor-Expression	. 42
		5.2.4	TGF-β1 Serumspiegel nach PHx	. 43
		5.2.5	Erhöhte TNF- α Serumspiegel in K14-Follistatin transge Mäusen nach PHx	nen 44
6	Zusa	ammen	ıfassung	45
7	Liter	aturve	rzeichnis	. 46
Da	nksa	gung		55
Lebenslauf				
Eidesstattliche Versicherung				

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBA	cytometric bead assay
d	Таде
cDNS	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	endothel growth factor
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FST	Follistatin
FSTL	Follistatin-like
GDF	growth and differentiation factor
h	Stunde
HGF	hepatozyten growth factor
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LPS	Lipopolysaccharid
Μ	molar
min	Minute
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomograph
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	plateted derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE	Prostaglandin E

PHx	partielle Hepatektomie
PI	Propidium Jodid
R	Rezeptor
RNA	ribonucleid acid
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell Rezeptor
TG	transgen
TGF-α	transforming growth factor alpha
TGF-β	transforming growth factor beta
Th	T-Helfer Zelle
TNF	Tumor nekrose factor
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
TUNEL	terminal transferase dUTP nick end labeling
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Es ist bekannt, dass Activin A *in vitro* einen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum von Hepatozyten hat. Die Gabe von Follistatin, einem Protein, das Activin A binden und neutralisieren kann, verursachte *in vivo* ein Leberwachstum in gesunden Ratten. Ausserdem ist bekannt, dass 12 Stunden nach PHx die Activin beta A mRNS um bis zu 50% erniedrigt ist. Im Gegensatz hierzu stieg 168 Stunden nach PHx die Activin beta A mRNS um das dreifache an, was vermuten lässt, dass dies zu einer Terminisierung der Leberregeneration dient. Diese Daten sprechen zusammenfassend für einen inhibitorischen Effekt von Activin A auf die Leberzellregeneration, der durch Follistatin antagonisiert werden könnte.

Neben den Effekten auf die DNS Synthese und Zellwachstum scheint Activin A aber auch die Herstellung der normalen Leberarchitektur nach PHx zu fördern, indem es die Kollagenprodukton durch HSC und die Tubulogenese der Sinusoidalen Endothelzellen fördert. Passend hierzu führte die Gabe von Follistatin nach PHx zu einer schnelleren Regeneration, aber gestörten Restauration der normalen Leberarchitektur und somit zu einer gestörten Leberfunktion in Ratten.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Follistatin auf das Leberwachstum in einem Mausmodell mit kontinuierlich erhöhten Follistatin Serumspiegel zu untersuchen. Hierfür wurden transgene Mäuse, die Follistatin in Keratinozyten überexprimieren, und deshalb erhöhte Follistatin-Serumspiegel haben, verwendet. Insbesonders sollte die Rolle von Follistatin auf die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie untersucht werden.

2 Einleitung

2.1 Leberregeneration

Die Leberregeneration ist eine essentielle Antwort des Organismus auf den Verlust funktionellem Lebergewebe, z.B. nach Verletzungen oder toxischen von Schädigungen. Die Studien, in denen eine Leber-Resektion in größeren Tieren (Hunden und Primaten) oder in Menschen durchgeführt wurde, haben gezeigt, dass das Maß der Regeneration proportional zu dem entfernten Lebergewebe ist. Sogar kleinere Resektionen (<10%) werden durch eine Regeneration der Leber auf die Ausgangsmasse kompensiert. Interessanterweise reduziert sich aber auch die Lebermasse, wenn man eine Leber von beispielsweise einem größeren einem transplantiert, die kleineren Hund bis Masse proportional zu dem "neuen" Körpergewicht ist (Francavilla et al., 1988; Kawasaki et al., 1992). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass beispielsweise die Affenleber, die in einen Menschen transplantiert worden ist, wächst, bis sie die Größe einer humanen Leber erreicht (Starzl et al., 1993). Die Lebermasse scheint folglich hoch reguliert zu sein.

Im Gegensatz zu anderen Organen hängt die Leberregeneration nicht von einer kleinen Gruppe von Vorläufer- oder Stammzellen ab. Nach einer partiellen Hepatektomie (PHx) findet eine Leberregeneraton durch eine Proliferation aller ausgereifter Leberzellen (Hepatozyten, billiäre Epithelzellen, Kupferzellen, etc.) des intakten Organs statt (Gressner, 1995). Wobei man schon sehr früh erkannte, dass die Hepatozyten als erstes anfangen zu proliferieren (Grisham, 1962). Die Kinetik der Zellproliferation variiert hierbei je nach Spezies. Der erste Peak der DNS Synthese ist nach ca. 36 Stunden beobachtet worden. Interessanterweise erfolgt der Eintritt der Zellen, die ihre DNS repliziert haben, in die Mitose immer zur selben Tageszeit. Hieraus folgerte man, dass ein zirkadianer Rhythmus in der Leberregeneration besteht, wobei die DNS Replikation ein autonomer Prozess zu sein scheint, der durch intrinsische Signale gesteuert wird (Matsuo et al., 2003; Schibler, 2003).

Die Leberregeneration läuft hierbei in verschiedenen Schritten ab. Dies wurde ausführlich in der Ratte untersucht. Zuerst scheinen die Hepatozyten zu proliferieren (Abb. 1), was dazu führt, dass am 3. bis 4. Tag nach PHx Cluster von kleinen Hepatozyten, die die Kapillaren umgeben, zu erkennen sind. Die typische Leberhistologie wird dann in verschiedenen Schritten wieder hergestellt (MartinezHernandez and Amenta, 1995), bis die Leber ungefähr an Tag 7 wieder eine normale Histologie, jedoch mit größeren und mehreren Lobuli als vor der Regeneration aufweist.

Die Potenz der Leberregeneration ist hierbei außerordentlich groß. Eine einzige Leberzelle kann mindestens 34 Zellteilungen durchführen, was zu einer Zellzahl von 1.7×10^{10} Zellen führt (Overturf et al., 1996).

wichtige Frage ist. Eine welche Stimuli den gesamten Vorgang der Leberregeneration steuern. In einem parabiotischen Modell, in dem die Blutzirkulation zweier Ratten miteinander verbunden wurde, konnte gezeigt werden, dass eine totale Hepatektomie der einen Rate zu einer Regeneration der intakten Leber des zweiten Tieres führt (Moolten and Bucher, 1967). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass mitogene Signale oder Signale für Hepatozytenproliferation während der Leberregeneration im Blut zirkulieren. Leberregeneration erfordert die Aktivierung von verschiedenen Signalwegen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wobei die einzelnen Signalwegen miteinander zu interagieren scheinen. Es können drei Hauptwege unterschieden werden, die die Leberfunktion, Zellwachstum und proliferation beeinflussen: Zytokine, Wachstumsfaktoren und metabolische Faktoren (Fausto et al., 2006). Ein charakteristisches Merkmal dieses Netzwerkes scheint die Redundanz zwischen den einzelnen Faktoren zu sein, so dass der Verlust eines einzelnen Gens kaum zu einer vollständigen Inhibition der Leberregeneration führt. Bisher konnte kein Gen identifiziert werden, das alleine essentiell für die Leberregeneration ist.

Eine große Anzahl von Genen wird während der ersten Stunden nach PHx in der sogenannten "Priming Phase" exprimiert. Hierzu gehören vor allem Zytokine, wie TNF- α und IL-6.



Abbildung 1: Kinetik der DNS Synthese in verschiedenen Leberzellen nach PHx. (verändert nach Michalopoulos et DeFrances, Science 1997)

2.2 Zytokine

2.2.1 TNF- α und IL-6

Die mRNA Expression in der Leber und die Serumkonzentration von TNF- α und IL-6 steigt sehr schnell nach PHx an (Akerman et al., 1992; Iwai et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Injektion von TNF- α Antikörper vor PHx die DNS Synthese reduziert wird (Diehl et al., 1994). Passend hierzu ist, dass die DNS Synthese in Mäusen mit defizientem TNF- α Typ I Rezeptor reduziert ist, und die normalerweise erwartete STAT3 und NFkB Aktivierung ausbleibt (Yamada et al., 1997). Diese Effekte konnten durch Injektion von IL-6 revidiert werden, und so scheint eine Aufgabe von TNF- α die Regulation von IL-6 zu sein. Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass IL-6 KO Mäuse eine gestörte aber dennoch vollständige Leberregeneration haben (Cressman et al., 1996; Wuestefeld et al., 2003). IL-6 scheint folglich nicht essentiell für den Prozess der Leberregeneration zu sein.

2.3 Activin/ Follistatin System

2.3.1 Activin

Activine sind dimere Proteine der TGF- β Superfamilie (Ling et al., 1986). Biologisch aktives Activin besteht aus zwei Activin beta Polypetiden, die durch Disulfidbrücken vernetzt sind. Vier Activin-beta Untereinheiten konnten bisher identifiziert werden: beta A, B, C, E. Activin A ist ein Homodimer aus zwei Activin beta A Untereinheiten.

Der Signalweg geht über transmembranöse Serin / Threonin Kinasen (ten Dijke and Hill, 2004). Nach der Bindung von Activin A an den Activin A Typ II Rezeptor (ActRII oder ActRIIB) werden die Typ I Activin Rezeptoren (ActRIB=Alk4, ActRIA=Alk3 oder Alk7) in den Rezeptorkomplex rekrutiert, was dann zu einer Phosphorylierung von Smad2/3 (Attisano et al., 1996), oder alternativ der MAP Kinasen führt (Chen et al., 2006; de Guise et al., 2006).

Ähnlich wie TGF-beta ist Activin A ein pleiotropes Zytokin, das Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Wundheilung, endokrine Funktion und inflammatorische Prozesse beeinflussen kann (Chen et al., 2006; Werner and Alzheimer, 2006). Dementsprechend scheint Activin A eine Rolle in der Embryonalentwicklung, der Reproduktion, Entzündung und Regeneration zu spielen (Phillips et al., 2001).

Activin A kann von einer Vielzahl von Zellen, wie Makrophagen (Ogawa et al., 2000), Monozyten (Abe et al., 2002), Mastzellen (Cho et al., 2003) und T-Zellen produziert werden (Ogawa et al., 2006; Werner and Alzheimer, 2006). Activin A kann eine Stunde nach LPS-Injektion im Serum nachgewiesen werden (Jones et al., 2000; Jones et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Activin A die IL-6 induzierte Proliferation von 7TD1 B-Zellen, die phagozytische Aktivität von M1 Monozyten und die Fibrinogenproducktion HepG2 hemmen von kann. Aufgrund dieser nachgewiesenen Effekte auf IL-6 induzierte inflammatorische Prozesse (Yu et al., 1998), wurde eine immunsuppressive Wirkung von Activin A vermutet; trotzdem kann Activin A auch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1beta durch Makrophagen stimulieren (Nusing and Barsig, 1999). Passend hierzu wurde festgestellt, dass Activin A in inflammatorischen Prozessen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Hubner et al., 1997), rheumatoider Arthritis (Yu et al., 1998) oder Asthma (Karagiannidis et al., 2006) exprimiert wird, so dass die genaue Rolle von Activin A bei inflammatorischen Prozessen noch geklärt werden muss (Jones et al., 2000; Ogawa et al., 2006).

2.3.2 Follistatin

Die biologischen Effekte von Activin A können durch Follistatin, einem natürlich vorkommendem Glykoprotein mit hoher Affinität zu Activin neutralisiert werden (de Winter et al., 1996; Harrington et al., 2006; Krummen et al., 1993). Follistatin kann von einer Vielzahl von Zellen (Plazenta, Ovarien, Testis, Gehirn, Knochenmark, Pankreas, Leber, etc.) während allen Stadien des post-natalen Lebens gebildet

werden, und scheint sogar während der Embryonalentwicklung eine bedeutende Rolle zu spielen (Patel, 1998). Follistatin wurde anfangs als ein Protein identifiziert, das im Gegensatz zu Activin die FSH Sekretion inhibiert, indem es Activin neutralisiert (Nakamura et al., 1990). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Follistatin neben Activin auch andere TGF-beta Familienmitglieder wie BMP-2, BMP-4 und BMP-7 neutralisieren kann (Fainsod et al., 1997), nicht aber TGF-beta1 (Nakamura et al., 1990). Bisher konnte aber kein Follistatin Rezeptor identifiziert werden, so dass die Hauptfunktion von Follistatin die Bindung und Neutralisierung von Zytokinen der TGF-beta Familie zu sein scheint (Patel, 1998).

Es gibt neben FST auch einige strukturverwandte Proteine, welche Follistatin-like 1, 2, 3, 4, 5 (FSTL1, 2, 3, 4, 5) genannt wurden.

Diese Proteine sind unterschiedlich gut beschrieben. So wurde FSTL1 mit Entzündungsvorgängen in Verbindung gebracht. FSTL-1 Transfektion in Fibroblasten Makrophagen oder führte zu einer Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, TNF- α und IL-6. Dementsprechend führte eine Überexpression von FSTL-1 in der Mauspfote via Gen-Transfer zu einer hochgradigen Schwellung und Arthritis (Miyamae et al., 2006).

FSTL2 scheint bei der Embryonalentwicklung von Zebrafischen relevant zu sein (Dal-Pra et al., 2006). Das "insulin-like growth factor binding protein 7" (*IGFBP7*) ist auch als FSTL2 bekannt, wird jedoch nicht mit Follistatin in Zusammenhang gebracht (www.genecards.org).

FSTL3 wurde erstmals 1998 in Zusammenhang mit einer Form der B-Zell Leukämie beschrieben. Es trägt mehrere Namen, unter anderem "follistatin-related gene" (FLRG) und "Follistatin-related gene protein" (FSRP). FSTL3 besitzt eine Strukturdomäne weniger als FST und keine "heparin-binding sequence" (HBS) (Schneyer et al., 2001). Aus diesem Grund ist es auch nicht in der Lage wie FST an Zelloberflächen zu binden (Schneyer et al., 2004). Jedoch zeigt es ähnliche Bindungseigenschaften zur TGF-beta Superfamilie wie FST (Schneyer et al., 2004). FSTL3^{-/-} Mäuse sind überlebensfähig und zeigen vor allem Änderungen in der Glucosehomöostase und im Herzmuskel. Diese sind auf die fehlende Inhibition von INHBA und GDF8 zurückgeführt worden (Mukherjee et al., 2007).

Weitere Gene mit Sequenzhomologien zu FST sind FSTL4 und FSTL5 (www.genecards.org), jedoch konnten diese Gene, bzw. die Genprodukte bis jetzt noch nicht in funktionellen Zusammenhang gebracht werden.

2.3.3 Die Rolle von Activin und Follistatin in der Leberbiologie

Es gibt verschiedene Hinweise, dass Activin A ein bedeutender Negativ-Regulator des Leberwachstums unter physiologischen Bedingungen darstellen könnte. Außerdem scheint Activin A wichtig für die Terminierung der Leberregeneration zu sein:

Es konnte gezeigt werden, dass Activin A in vitro und in vivo, wie auch TGF-beta1, die mitogen induzierte DNS Synthese inhibieren und Apoptose in Hepatozyten induzieren kann (Hully et al., 1994; Schwall et al., 1993; Yasuda et al., 1993). Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung humaner Hepatomzelllinien mit Activin A Antisense Oligonucleotiden zu einer Stimulation der Proliferation, was einen inhibitorischen Effekt von Activin A auf das Zellwachstum vermuten lässt (Takabe et al., 1999). Außerdem zeigten Inhibin α -defiziente Mäuse, die zehnfach erhöhte Activin A Serumspiegel haben, ein Kachexie ähnliches Krankheitsbild, das durch eine Zerstörung von Hepatozyten verursacht war (Matzuk et al., 1994). Die Gabe von Follistatin, entweder intraportal oder durch adenoviralen Gentransfer, verursachte eine DNS Synthese und Leberwachstum in normaler Rattenleber (Kogure et al., 2000; Takabe et al., 2003). Passend hierzu führte die ektope Expression eines dominant negativen Activin oder TGF-beta Typ II Rezeptors zu einer hepatischen DNS Synthese, was vermuten lässt, dass deren jeweilige Liganden zu einer tonischen Inhibition des Leberwachstums beitragen (Ichikawa et al., 2001). Zwölf Stunden nach PHx in der Ratte fiel die Activin betaA mRNS um 50% verglichen mit Kontrollen und blieb bis mindestenes 96 Stunden nach PHx erniedrigt (Gold et al., 2005). Nach 168 Stunden stieg die Activin betaA mRNS um das dreifache an, was vermuten lässt, dass dies zur Terminierung der Leberregeneration dient. Die Expression des ActRIIB verhielt sich parallel zur Activin betaA expression (Gold et al., 2005). Im Gegensatz hierzu fanden andere Gruppen, dass die Activin betaA mRNS Expression zu früheren Zeitpunkten nach PHx steigt (Date et al., 2000; Takamura et al., 2005; Zhang et al., 1997). Die Follistatin Expression hatte Ihren Gipfel 24-48 Stunden nach PHx passend zum Maximum der Hepatozytenreplikation (Gold et al., 2005). Diese Daten sprechen zusammenfassend für einen inhibitorischen Effekt von Activin A auf die Leberzellregeneration, der durch Follistatin antagonisiert werden kann.

Neben den Effekten auf die DNS Synthese und Zellwachstum scheint Activin A aber auch die Herstellung der normalen Leberarchitektur nach PHx zu fördern, indem es die Kollagenprodukton durch HSC und die Tubulogenese der Sinusoidalen Endothelzellen fördert (Endo et al., 2004; Wada et al., 2004). Passend hierzu führte die Gabe von Follistatin nach PHx zu einer schnelleren Regeneration, aber gestörten Restauration der normalen Leberarchitektur und somit zu einer gestörten Leberfunktion in Ratten (Kim et al., 2004; Kogure et al., 1995; Kogure et al., 1998).

Activin A und Follistatin Serumspiegel steigen aber auch im Rahmen eines akuten Leberausfalls, beispielsweise nach Paracetamolintoxikation stark an. Die genaue Funktion im Rahmen eines Leberausfalls ist aber noch unklar (Hughes and Evans, 2003; Palmes et al., 2005).

Aufgrund seiner inhibitorischen Effekte bezüglich des Zellwachstums und seiner proapoptotischen Effekte auf viele epitheliale Zellen, wie auch Hepatozyen könnte Activin A auch eine Rolle als Tumorsuppressor spielen (Risbridger et al., 2001). Es konnten erhöhte Activin A und aber auch Follistatin Serumspiegel in Patienten mit Leberzirrhose und HCC fetsgestellt werden (Pirisi et al., 2000; Yuen et al., 2002). Außerdem exprimieren humane Hepatomzellinien Follistatin, aber weniger Activin A verglichen mit normalen Hepatozyten (Mashima et al., 1995; Rossmanith et al., 2002; Vejda et al., 2003). Die ektope Expression von Activin A in Hepatomzellen führte zu einer Reduktion der Zellzahl und induzierte Apoptose (Mashima et al., 1995; Vejda et al., 2003). Follistatin stimulierte und Activin inhibierte die DNS Synthese *in vitro* in normalen und präneoplastischen Hepatozyten aus Ratten (Grusch et al., 2006), was vermuten lässt, dass eine Dysregulation der Balance zwischen Activin und Follistatin an der Karzinogenese beteiligt ist.

Es gibt nur wenige Publikationen zur Rolle der anderen Activin beta Untereinheiten, so dass deren Funktion in der Leberregeneration noch weitgehend unklar ist (Rodgarkia-Dara et al., 2006).

2.4 Rolle des unspezifischen Immunsystems

Da Zytokine eine Rolle in der Leberregeneration zu spielen scheinen, ist es wichtig die Mechanismen, die dieses Netzwerk triggern zu verstehen. Ein Faktor hierbei ist LPS, das von enteralen Bakterien produziert wird und über die portale Zirkulation in die Leber gelangen kann (Cornell, 1985a). Tatsächlich zeigten Experimente, dass eine geringere LPS Produktion oder eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber LPS zu einer verzögerten Regeneration nach PHx führen kann (Cornell, 1985a, b). Es wurde vermutet, dass hierbei der Toll Like Rezeptor 4 eine Rolle spielt. LPS kann an

TLR4 binden und verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden anschalten, von denen einige von MyD88 abhängen (Akira et al., 2001; Schnare et al., 2001). Allerdings zeigten TLR4 KO Mäuse keine gestörte Leberregeneration. Im Gegensatz dazu zeigten MyD88 KO Mäuse eine gestörte TNF- α , IL-6 und STAT3 Aktivierung (Seki et al., 2005).

Des Weiteren scheinen die Komponenten C3 und C5 eine Rolle in der Leberregeneration zu spielen (Strey et al., 2003). C3 und C5 defiziente Mäuse zeigen ebenfalls eine gestörte TNF- α und IL-6 Sekretion, und konsekutiv eine verminderte STAT3 Aktivierung. Wie und ob diese beiden Aspekte zusammenhängen, ist bisher noch unklar.

2.5 Wachstumsfaktoren

Das Zytokin-Netzwerk ist vor allem in der ersten Phase der Leberregeneration wichtig. Wachstumsfaktoren, wie HGF und EGF Rezeptor Liganden, steuern vor allem den Zellzyklusprogress während der Leberregeneration.

2.5.1 Hepatozyten Wachstumsfaktor

Der Hepatozyten growth factor (HGF) wird vor allem von mesenchymalen Zellen produziert (Michalopoulos et al., 1984; Nakamura et al., 1984; Naldini et al., 1991) und wirkt para- oder endokrin auf Hepatozyten. HGF und sein Rezeptor c-MET stellten sich als Schlüsselfaktoren für Leberwachstum und –regeneration heraus. Homozygote Deletionen von HGF oder c-MET führten zu embryonaler Letalität (Schmidt et al., 1995). Die Plasmakonzentration von HGF im Menschen bei Verlust von intaktem Lebergewebe steigt (Tomiya et al., 1992). In Ratten ist die Serum-HGF Konzentration 1 Stunde nach PHx um das 20fache erhöht (Lindroos et al., 1991). Die HGF Serumkonzentration sinkt dann diskret innerhalb von 24 Stunden, bleibt jedoch mehr als 72 Stunden erhöht. Ausserdem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass HGF ein potentes Mitogen für Hepatozyten darstellt (Nakamura et al., 1989). Interessanterweise führt jedoch die Injektion von HGF in Ratten ohne Leberschaden nur zu einer relativ geringen Proliferation von Hepatozyten, was vermuten lässt, dass die Hepatozyten in einer normalen Leber nicht bereit sind, auf HGF zu reagieren, wenn sie nicht durch bestimmte Signale geprimt worden sind (Webber et al., 1994a).

2.5.2 EGF und TGF- α

EGF und TGF-α sind Liganden des EGF Rezeptors und Mitogene für Hepatozyten *in vitro*. Andererseits steigt die Plasma-EGF Konzentration nach PHx nur leicht (<30%) an (Jones et al., 1995). EGF könnte jedoch eine Rolle in der Leberregeneration spielen, da die lokalen Konzentrationen nach PHx stark steigen können. EGF wird kontinuierlich von den Brunnerschen Drüsen im Doudenum sezerniert, und gelangt durch portale Zirkulation in die Leber. Eine 2/3 Reduktion der Lebermasse kann deshalb zu einer lokalen Erhöhung der Konzentration um den Faktor 3 führen. Zusätzlich kann Norepinephrin, das nach PHx stark steigt, die Sekretion von EGF durch die Brunnerschen Drüsen stimulieren (Olsen et al., 1985).

TGF- α scheint im Gegensatz zu EGF eine spätere Rolle während der Leberregeneration zu spielen. Die TGF- α mRNS Expression wird 2-3 Stunden nach PHx hochreguliert, mit einem Peak nach 12-24 Stunden. TGF- α bleibt weiterhin mindestens für 48h nach PHx erhöht (Mead and Fausto, 1989). TGF- α wird von Hepatozyten produziert, und scheint eine autokrine mitogene Wirkung zu haben. Transgene Expression von TGF- α unter dem Albuminpromoter in der Leber führt zu einem anhaltend hohen Maß an DNS Synthese in der Leber und eventuell zu einer Tumorformation (Webber et al., 1994b). TGF- α scheint aber nicht unbedingt notwendig für eine Leberregeneration zu sein, da TGF- α ^{-/-} Knockout Mäuse eine ungestörte Leberregeneration aufweisen (Russell et al., 1996). Dies könnte durch eine kompensatorische Erhöhung anderer Faktoren begründet sein. Im Gegensatz hierzu scheint TGF- α die Progression von hepatischen preneoplastischen Läsionen in hepatozelluläre Karzinome zu fördern (Russell et al., 1996).

2.6 Metabolische Faktoren

Die Leberregeneraton nach PHx scheint eine genau gesteuerte Antwort auf die Bedürfnisse des Körpers zu sein. Durch Gabe von Aminosäure Mixturen in Ratten konnte eine Welle hepatischer Replikation und durch Protein Restriktion eine Blockierung der Leberregeneration ausgelöst werden (McGowan et al., 1979; Mead et al., 1990).

Neben dem direkten Angebot an Nährstoffen scheinen andere Faktoren, wie Insulin und Norepinephrin ebenfalls eine Rolle zu spielen.

2.6.1 Norepinephrin

In Kultur von primären Hepatozyten kann Norepinephrin die mitogenen Signale von EGF und HGF via α 1 adrenerge Rezeptoren amplifizieren (Cruise et al., 1985). Die Norepinephrin Plasmakonzentration steigt schnell innerhalb einer Stunde nach PHx an (Cruise et al., 1987). Neben einem verstärkenden Effekt auf den Signalweg kann Norepinephrin die EGF Sekretion der Brunnerschen Drüsen steigern (Olsen et al., 1985). Außerdem kann Norepinephrin die mitoinhibitorischen Effekte von TGF-beta1 ausgleichen (Houck and Michalopoulos, 1989). Für eine Rolle von Norepinephrin spricht auch, dass Prazosin, ein α 1 adrenerger Rezeptor Blocker, so wie auch eine sympathische Denervation die DNS Synthese 24 Stunden nach PHx dramatisch reduziert, obgleich sie sich 48 -72 Stunde nach PHx wieder normalisiert (Cruise et al., 1987).

2.6.2 Insulin

Durch die Inselzellen des Pankreas wird die Leber über die Portalvenen kontinuierlich mit Insulin versorgt. Wird die portale Zirkulation beispielsweise durch einen portocavalen Shunt reduziert, kann dies zu einer Leberatrophie führen (Starzl et al., 1973). Durch Injektion von Insulin konnte dieser Prozess revidiert werden (Starzl et al., 1978). Insulin konnte in vitro die Proliferation von Hepatozyten zusammen mit Wachstumsfaktoren steigern. Im Gegensatz dazu hat Insulin alleine keinen primär mitogenen Effekt auf Hepatozyten.

Eine weitere wichtige Frage ist, welche Faktoren die Leberregeneration stoppen. Ein wichtiger Faktor hierbei scheint TGF-beta1 zu sein. TGF-beta1 kann die Proliferation von Hepatozyten in der Zellkultur inhibieren (Carr et al., 1986). In der Leber ist TGFbeta1 mRNS 3 bis 4 Stunden nach PHx nachweisbar, mit einem Plateau zwischen 48 und 72 Stunden (Braun et al., 1988). Da die DNS Synthese in Hepatozyten zu diesem Zeitpunkt stoppt, liegt es Nahe, dass dies durch einen parakrinen Effekt von TGF-beta1 verursacht wird. Allerdings sind Hepatozyten, die 12 bis 48 Stunden nach PHx isoliert worden sind, resistent gegenüber den inhibitorischen Efekten von TGF-beta1 (Houck and Michalopoulos, 1989). Dies könnte daran liegen, dass in demselben Zeitraum der TGF-beta Rezeptor auf Hepatozyten herunterreguliert wird (Chari et al., 1995) und die Hepatozyten so unempfindlicher gegenüber TGF-beta1 sind. Dies könnte erklären, weshalb die Leberregeneration in Mäusen, die TGF-beta1 in der Leber überexprimieren nur verlangsamt aber dennoch vollständig abläuft (Kopp et al., 1996). Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem leberspezifischem TGF-beta RII Rezeptor Knockout eine gesteigterte DNS Synthese nach PHx haben. Jedoch war ein intakter TGF-beta Signalweg nicht essentiell für die Terminierung der Leberregeneration. Dies könnte durch einen kompensatorischen Effekt von Activin A begründet sein (Oe et al., 2004).

2.7 Partielle Hepatektomie

Große abdominelle Eingriffe in der Maus sind aufgrund der Größe der Strukturen, fehlendem Monitoring und in Ermangelung einer intravenösen Flüssigkeitssubstitution sehr schwierig. Trotzdem wird für viele wissenschaftliche Fragestellungen, wie im Bereich der Leberregeneration, Lebermetastasen oder Leberfunktion eine zumindest partielle Leberresektion benötigt. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie in der Maus. Es ist bekannt, dass die Leber in der Maus nach einer 2/3 Resektion innerhalb von ungefähr 8 Tagen ihr Ausgangsvolumen wieder erreicht (Michalopoulos and DeFrances, 1997).

Die klassische Methode der 2/3 Hepatektomie wurde ursprünglich bereits 1931 von Higgins und Anderson publiziert. Die Autoren entfernten 2 der 4 Leberlappen in der ungefähr 2/3 des Gewichts der Leber entsprach, um die Rate. was Leberregeneration zu untersuchen. Da Ratten größer als Mäuse sind und deshalb eine Resektion technisch einfacher ist, benutzen noch heute viele Arbeitsgruppen Ratten und nicht Mäuse für diese Methode. Jedoch gibt es in der Maus die Möglichkeit, bestimmte Faktoren durch transgene Manipulation zu untersuchen. Ratten- und Maus-Modelle sind ähnlich geeignet, um Schlüssse auf die humane Leberregeneration zu ziehen: In Ratten und auch in der Maus ist die Leber das grösste viszerale Organ, das vorhanden ist. Beide Spezies haben die gleiche Anzahl von den Leberlappen. Die Regenerationsdauer con circa 8 Tagen ist bei beiden Spezies auch identisch. Im Vergleich benötigt humane Leber nach partieller Hepatektomie circa sechs Wochen zur kompleten Regeneration. Nur im Gegensatz zu Ratte hat die Maus, wie auch der Mensch, eine Gallenblase. Eine 2/3 Leberresektion in der Maus wurde erstmalig von Greene und Pudder beschrieben (Greene and Puder, 2003). Es wurden die vordersten 3 Leberlappen entfernt, da sie leicht zugänglich sind, und ungefähr 68% des Lebergewichts entsprechen. Die Operationszeit betrug circa 10-15 Minuten bei einer 24 Tage Überlebensrate von 96%. An Komplikationen kamen Pneumothorax, Darmverletzungen und Blutungen vor.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Auflichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
Computer	Power Mac G4, Apple, Ismaning
	Fujitsu Siemens
	DELL
	ACER Travelmate 290LCi
Durchlichtmikroskop CK 2	Olympus, Hamburg
Drucker	HP Laser Jet 1200 series, HP,
	Böblingen
Durchflusszytometer	FACSCanto, Becton Dickinson,
	Heidelberg
Infrarot Lampe	Petra electric
Kamerasystem	Canon Powershot A95
	Cybertech CS1 mit Hitachi VM920E-
	Monitor
Kryotom Frigocut N2800	Reichert Jung
MRT	Philips
Netzgerät, Power supply 1000/500	Bio Rad
Schüttler Certomat R	B.Braun, Melsungen
Spektralphotometer	9423 Uvg 1002 E, Fischer, Niederau
Sterilbank Microflow	
	Nunc, Wiesbaden
Thermocycler Techne Genius	Nunc, Wiesbaden Thermo-Dux, Wertheim
Thermocycler Techne Genius Trockenofen WTC	Nunc, Wiesbaden Thermo-Dux, Wertheim WTB Binder Labortechnik GmbH,
Thermocycler Techne Genius Trockenofen WTC	Nunc, Wiesbaden Thermo-Dux, Wertheim WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Thermocycler Techne Genius Trockenofen WTC UV-Transilluminator	Nunc, Wiesbaden Thermo-Dux, Wertheim WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen 312nm, Renner, Dannstadt
Thermocycler Techne Genius Trockenofen WTC UV-Transilluminator Waagen	Nunc, Wiesbaden Thermo-Dux, Wertheim WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen 312nm, Renner, Dannstadt BP1200
Thermocycler Techne Genius Trockenofen WTC UV-Transilluminator Waagen	Nunc, Wiesbaden Thermo-Dux, Wertheim WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen 312nm, Renner, Dannstadt BP1200 ISO9001,Sartorius, Göttingen
Thermocycler Techne Genius Trockenofen WTC UV-Transilluminator Waagen Zentrifugen	Nunc, Wiesbaden Thermo-Dux, Wertheim WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen 312nm, Renner, Dannstadt BP1200 ISO9001,Sartorius, Göttingen 5417R, Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Techne Genius Trockenofen WTC UV-Transilluminator Waagen Zentrifugen	Nunc, Wiesbaden Thermo-Dux, Wertheim WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen 312nm, Renner, Dannstadt BP1200 ISO9001,Sartorius, Göttingen 5417R, Eppendorf, Hamburg Jovan C422

3.1.2 Software

Adobe Photoshop 6.0. Axiovision LE Rel. 4,5 FlowCytomix Pro 1.0.4 Graph Pad Prism 5.0b ImageJ 1.46r MS Office Slicer 2.5.1-dev-win32 SPSS 9.0

3.1.3 Verbrauchsmateralien

Deckgläser 22 x 22mm Einmalinjektionskanülen Microlance[™] 0,45x13mm Einmalskalpelle Nr.11 steril

Metallklammer Nahtmaterial

OP-Klammer Reflex 9mm Applier Objektträger Polysine™ Petrischalen 94/16 mm, steril

Pinzetten Scheren Stieltupfer Raucotupf

Tuberkulinspritzen Luer 1 ml

Adobe, USA Carl Zeiss MicroImaging, Jena Bender MedSystems, Wien, Österreich GraphPad Software Inc., USA National Institutes of Health, USA Microsoft®, USA www.slicer.org, USA SPSS Inc., Chicago, USA

Menzel-Gläser, Braunschweig BD Labware, New Jersey, USA Feather über Produkte für Medizin. Köln Fine Science Tools, Heidelberg Dagrofil 3x45cm, 3x18", B.Braun, Melsungen Ethibond 6-0, 75 cm, Johnson&Johnson, Norderstedt Premilene 5/0, 75 cm, B.Braun, Melsungen Prolene 3/0, Johnson&Johnson, Norderstedt Fine Science Tools, Heidelberg Menzel-Gläser, Braunschweig Cellstar® über Greiner Bio-One, Frickenhausen Fischer Scientific, Schwerte Fischer Scientific, Schwerte Lohmann-Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied am Rhein B.Braun, Melsungen

3.1.4 Chemikalien

Agarose	Invitrogen, Paisley, Schottland, UK
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung mind. 37%	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol reinst	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Salzsäure rauchend 37%	Merck, Darmstadt
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle anderen Chemikalien wurden über die Firmen Boehringer, Mannheim; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Steinheim und Riedel-de Häen, Selze bezogen.

3.1.5 Puffer und Lösungen

4% Formalin, gepuffert	9,07 g KH ₂ PO ₄
	11,86 g Na₂HPO₄
	in 860 ml Aqua dest. lösen
	add 140 ml 37% Formalin; pH 7,4
1 x PBS	2,7mM KCI
	1,5mM KH ₂ PO ₄
	137mM NaCl
	6,5mM Na₂HPO₄
	add 1 I Aqua dest.; pH 7,4
10 x PBS	80 g NaCl
	11,6 g Na ₂ HPO ₄
	2 g KH ₂ PO ₄
	2 g KCl
	add 1 I Aqua dest.; pH 7,0
Permeabilisation-Lösung	0,1% Triton X-100
	0,1% Sodium citrate (0,1 g sodium

	citrate in 100 ml 0,1% Triton X-100)
Proteinase K-Puffer	10 ml 2M Tris (pH 7,6)
	20 ml 0,5M EDTA
	5 ml 20% SDS
	165 ml Aqua dest.
50 x TAE-Elekrophorese-Puffer	242 g Tris Base Tris-Acetat
	57,1 ml Eisessig
	100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
	add 1 I Aqua dest.; pH 8,0
1 x TBS	12,1 g Tris-HCl
	8,8 g NaCl
	add 1 I Aqua dest. ; pH 7,4

3.1.6 Antikörper, CBA- und sonstige Kits

DAPI-Färbung	Hoechst 33258 (bis-benzimide),
	Moleculer Probes Eugene, Oregon,
	USA
Ki-67-Färbung	Ki-67 Rat Anti-Mouse,
	DakoCytomation, Dudingen
Th1/Th2-Kit, 10plex, mouse	mGM-CSF, mIFN-γ, mIL-1α, mIL-2,
	mlL-4, mlL-5, mlL-6, mlL-10, mlL-17,
	mTNF-α
	PE Positive Control Beads
	PE Negative Control Beads
	Fluoreszens-Beads
	Standards
	Reagent Dilution Buffer
	Streptavidin-Phycoerythrin
	Bender MedSystems, Wien, Österreich
RNA-/Proteinisolations-Kit	RNAlater®-ICE, Ambion INC., USA
	Nucleospin®RNA/Protein, Macherey-
	Nagel GmbH&Co.KG., Düren
RT-PCR Kit	first Strand cDNA Synthesis Kit for RT-
	PCR, Roche, Indianapolis;

	RevertAid™ H Minus first Strand cDNA
	Synthesis Kit, MBI Fermentes,
	St.Leon-Rot
TUNEL-Kit	In Situ Cell Death Detection Kit,
	Fluorescein, Roche, Mannheim

3.1.7 Oligonukleotide

ß Globin 3	5'-CAG CAC AAT AAC CAG CAC GTT GCC-3'
ß Globin 5	5'-GGA TCC TGA GAA CTT CAG GGT GAG-3
EGF Fw	5'-ATC TGA CTT CAT GGA GAC AG-3'
EGF Rev	5'-AAC TGG CTC TGT CTG CCG TG-3'
HGF Fw	5'-GGG CTG AAA AGA TTG GAT CA-3'
HGF Rev	5'-TCG AAC AAA AAT AAC AGG ACG-3'
TCR1	5'-CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG-3'
TCR2	5'-GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT-3'
TGF-alpha Fw	5'-GGA CAG CTC GCT CTG CTA GCG-3'
TGF-alpha Rev	5'-CTT CTC GTG TCT GCA GAC GAG-3'
VEGF Fw	5'-GGA CCC TGG CTT TAC TGC-3'
VEGF Rev	5'-CGG GCT TGG CGA TTT AG-3'

Die Synthese der o.g. Oligonukleotide wurde durch Metabion, Martinsried, durchgeführt.

3.1.8 Wasser

Wasser wurde mit einer Reinstwasseranlage (MilliQ plus, Millipore, Eschborn) deionisiert und anschließend autoklaviert.

Für RNA-Isolierungen, PCRs und wurde Wasser von B.Braun, Melsungen verwendet.

3.1.9 Sonstige Verbrauchsmittel

Aqua ad iniectabilia Braun	B.Braun, Melsungen
100 ml / 1000 ml	
Betäubungsmittel	Ketamin Gräub, Dr. E. Gräub AG.,
	Bern
	Rompun [®] 2%, Bayer, Leverkusen

BSA	Serva, Heidelberg
DNA-Polymerase RED Taq	Sigma, Steinheim
DNase I	Roche, Manheim
Ethidiumbromid	Fluka Chemie über Sigma-Aldrich,
	Steinheim
Eindeckmedium Entellan	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Sucofin, TSI GmbH&Co.KG., Zeven
PBS Dulbecco's	GIBCO™ über Invitrogen, Karlsruhe
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Tissue – Tex® O.C.T Compound	Sakura Finetek Europe, Heppenheim
Trypanblau 0,4%	GIBCO™ über Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Steinheim

3.1.10 Versuchstiere

Für alle in-vivo Studien wurden Mäuse im Alter von 15-17 Wochen verwendet. Dabei entstammten die Mausstämme C57/BL6 der Zucht der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Zusätzlich wurden die folgenden transgenen Tiere verwendet:

K14-Follistatin (M. Wankell et al. 2001)

Sämtliche Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen bei einer konstanten Raumtemperatur (RT) von 20°C gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Alle hier beschriebenen Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung G17/05 "Einfluss von Zytokinen sowie von regulatorischen T-Zellen auf die Homöostase von Leber und Lunge" durchgeführt.

3.2 Methode

3.2.1 Zucht und Selektion transgener Tiere

Die K14-Follistatin transgenen Tiere wurden mit CL57/BL6-wildtyp Tieren verpaart und die Nachkommen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) genotypisiert.

3.2.2 DNS Isolierung aus Gewebe

Als Ausgangmaterial zur Isolierung genomischer DNS wurden Ohr- oder Schwanzbiopsien der Mäuse in 15 μl Proteinase K (Boehringer, Mannheim) über

Nacht bei 55°C verdaut. Die Proteinase K Stocklösung (10 mg/ml in Proteinase K-Puffer) wurde hierzu 1:50 mit Proteinase K Puffer verdünnt. Nach dem Verdau wurden die Proben mit 200 µl autoklaviertem, deionisiertem Wasser verdünnt. Für eine PCR-Analyse wurden 2 µl dieser Lösung pro Reaktion eingesetzt.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation mittels PCR wurden 2µl aus dem Proteinase K Gewebeverdau bei einem Gesamtvolumen von 15µl pro Probe eingesetzt. Für die Reaktion wurde standardmäßig der ReadyMix REDtaq zusammen mit einer 0,1µM Konzentration an Primern verwendet und die so amplifizierten Produkte durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und visualisiert.

Als Standard PCR-Protokoll diente diese Vorlage:

- Nach einer Denaturierungsphase von 5 min bei 94°C folgten 35 Zyklen mit:
 - Denaturierung: 30 sec bei 94°C
 - Annealing: 30 sec bei 60°C
 - Elongation: 30 sec bei 72°C
- Finale Elongation: 5 min bei 72°C

3.2.4 DNS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNS-Moleküle nach ihrer Größe wurden 1%ige Agarose Gele (Invitrogen, Paisley, Schottland, UK) verwendet. Als Puffer für Gele und Kammer (OWL Scientific über Labotec, Wiesbaden) diente TAE-Puffer, als Marker wurde eine 100bp oder 1Kb DNA Leiter verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 Volt pro cm Elektrodenabstand (Netzgerät, Power supply 1000/500, Bio Rad). Das Gel wurde anschließend auf einem UV-Transilluminator (312 nm, Renner, Dannstadt), mit einem digitalen Kamerasystem (Cybertech CS1 mit Hitachi VM920E-Monitor und Mitsubishi P67E Drucker) dokumentiert.



Abbildung 2: PCR zu Genotypisierung. Das PCR-Produkt ist 600 bp groß. Positivkontrolle, WT-Kontrolle und Wasser sind rechts aufgetragen. TCR-Kontrolle ist mit 150 bp groß aufgetragen.

3.2.5 Partielle Hepatektomie

Bei der 68% igen partiellen Hepatektomie wurden die drei anterioren Leberlappen (RUL= right upper lob, LUL= left upper lob, und LLL= left lower lob) von insgesamt 7 Lappen reseziert. Unter einer adäguaten Anästhesie (Rompun : Ketamin : PBS = 0.8:1:1) des Versuchtiers wurde ein ca.1.5 cm langer Schnitt inferior vom Xyphoid durch die Mittellinie des Fells mit einer Schere durchgeführt. Das freigelegte Peritoneum wurde mittels Pinzette aufgehoben, um die Verletzung darunter gelegener Organe zu vermeiden, und mit der Schere aufgeschnitten. Mit einem befeuchteten Stieltupfer wurden vorsichtig der rechte und linke obere Lappen aufgehoben (Abb.3). Die Lappen wurden mit einem Faden (Dagrofil 3x45cm, 3x18", B.Braun, Melsungen) festgebunden und danach reseziert. Der gleiche Vorgang wurde mit dem linken unteren Lappen durchgeführt. Nachdem alle drei Lappen abgetrennt wurden, wurde das Peritoneum genäht (Premilene 5/0, 75 cm, B.Braun, Melsungen). Das Fell wurde mittels OP-Klammer (Reflex 9mm Applier, Fine Science Tools, Heidelberg) zusammen geklammert. Für die MRT-Untersuchung wurde das Fell mit einem Faden (Prolene 3/0, Johnson&Johnson, Norderstedt) statt mit Klammern befestigt. Den Versuchstieren wurden 1 – 2 ml 0,9% NaCl subkutan injiziert, um eine Exsikkose zu vermeiden. Danach wurden die Versuchstiere unter einer Wärmelampe bis zum Ende der Sedierung gelagert.



Abbildung 3: Schema der PHx. A: Leberlappen vor PHx (zu resezierende Lappen mit X gekennzeichnet). **B:** Leberlappen nach Regeneration. (RML= right middle lobe, OL= omental lobe, LLL= lower left lobe, LUL= left upper lobe, RUL= right upper lobe, RLL= right lower lobe, RML= right middle lobe)

3.2.6 RNS-Isolation

Die Präparation der Gesamt-RNS aus der Leber der Maus erfolgte mittels RNA-/Proteinisolations-Kit Nucleospin®RNA/Protein der Firma Macherey-Nagel GmbH&Co. KG., Düren, gemäß den Angaben des Herstellers. Die Leber wurden nach Gabe von RNAlater®-ICE, Ambion INC., USA mit einem Mörser zerkleinert. Danach wurden 350 µl Buffer RP1 (Nucleospin®RNA/Protein-Kit) und 3,5 µl beta-Mercaptoethanol addiert. Die Lysate wurde durch Nucleospin Filterunit (violett) filtriert. anschließend für 1 min. mit 11.000x g zentrifugiert. Nachdem die Filterunit entfernt wurde, wurde 350 µl 70% EtOH dazu pipettiert und gut durchmischt. Die Lysate wurde auf die Nucleospin RNA/Protein Säule pipettiert und für 30s bei 11.000x g zentrifugiert. Die RNS und DNS werden hierbei in der Säule gebunden. 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) wurde in die Säule pipettiert und danach für 1 min. bei 11.000x g zentrifugiert. 95 µl DNase Reaction Mix (10 µl DNase I und 90 µl DNase reaction Buffer) wurde direkt in die Säule addiert und bei RT für 15 min inkubiert. Die Säule wurde 3x mit 200 µl Buffer RA2, 600 µl Buffer RA3 und 250 µl Buffer RA3 gewaschen (2x30s und 1x2min bei 11.000x g zentrifugiert). Die Säule mit der gebundenen RNS wurde in ein Nuclease freies 1,5 ml Eppendorf tube plaziert. Nach Gabe von 60 µl RNase freiem H₂O wurde die Säule für 1 min. bei 11.000x g zentrifugiert.

Die RNS-Konzentration wurde mit einem Spektralphotometer (9423 Uvg 1002 E, Fischer, Niederau) bei 260nm bestimmt.

3.2.7 Herstellung von cDNS

Für die Herstellung von cDNS aus RNS der Leber wurde das RevertAid[™] H Minus first Strand cDNS Synthesis Kit der Firma MBI Fermenta, St.Leon-Rot verwendet. 5µg RNS wurden mit 1µl oligo(dt)₁₈ primer (0,5µg/µl) versetzt und mit deionisiertem, Nuklease freiem Wasser auf 12 µl Gesamtvolumen eingestellt. Nach 5 min Inkubationszeit bei 70°C wurde die Mischung auf Eis gekühlt. Auf Eis wurden 4µl 5x Reaktions-Puffer, 1µl Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl) und 2µl 10mM dNTP's dazugegeben, vorsichtig gemischt, zentrifugiert (200g, 30s, RT) und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl (200 U/µl) RevertAid[™] H Minus M-MuLV RT hinzugefügt, bei 42°C für 60 min inkubiert und die Reaktion durch eine Temperaturerhöhung auf 70°C für 10 min beendet. Die so gewonnene cDNS wurde bei –20°C gelagert.

3.2.8 Analyse der Growth Factor-Expression

Analysiert wurden die Growth-Factors HGF, EGF, TGF- α und VEGF. Die Expression wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR mit Primern spezifisch für die jeweiligen Faktoren untersucht. Als HGF Primer wurden HGF Fw: 5'-GGG CTG AAA AGA TTG GAT CA-3' und HGF Rev: 5'-TCG AAC AAA AAT AAC AGG ACG-3' verwendet. Als EGF Primer wurden EGF Fw: 5'-ATC TGA CTT CAT GGA GAC AG-3' und EGF Rev: 5'-AAC TGG CTC TGT CTG CCG TG-3' verwendet. Als TGF- α Primer wurden TGF-alpha Fw: 5'-GGA CAG CTC GCT CTG CTA GCG-3' und TGF-alpha Rev: 5'-CTT CTC GTG TCT GCA GAC GAG-3' verwendet. Und als VEGF Primer wurden VEGF Fw: 5'-GGA CCC TGG CTT TAC TGC-3' und VEGF Rev: 5'-CGG GCT TGG CGA TTT AG-3' verwendet. Als relativer Bezugspunkt diente das Haushaltsgen beta-Globin. Hierfür wurde folgendes Primerpaar verwendet: beta-Globin 3: 5'-CAG CAC AAT AAC CAG CAC GTT GCC-3' und beta-Globin 5: 5'-GGA TCC TGA GAG-3'.

Um eine quantitative Auswertung zu erlangen wurde anschließend eine Densitometrie-Messung von dem Blot mit Hilfe vom Programm ImageJ durchgeführt.

3.2.9 TUNEL-Färbung

Um die Apoptose von den Zellen zu untersuchen, wurde eine TUNEL-Färbung (Terminal transferase dUTP nick end labeling) durchgeführt. Dafür wurde das In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein der Firma Roche, Mannheim verwendet. Die tiefgefrorene Leber wurde bei -20°C mit dem Kryotom Frigocut N2800 frisch geschnitten, dann direkt in 4% PAF, pH 7,4 für 20 min. bei RT fixiert. Nachdem die Kryoschnitte in PBS für 30 min. gewaschen worden waren, wurden sie in der Permeabilisation-Lösung für 2 Minuten auf Eis (2-8°C) inkubiert. Für die positive Kontrolle wurden Schnitte mit DNase I (3000 U/ml – 3 U/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mg/ml BSA) bei RT für 10 Minuten behandelt. Danach wurden die Schnitte 2x in PBS gewaschen. Anschließend wurde 100 μl TUNEL Reaction Mixture (Label Solution und Enyzme Solution) auf die Schnitte und die positive Kontrolle pipettiert. Für die negative Kontrolle wurden die 37°C für 60 min. inkubieren und danach 3x in PBS gewaschen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Hoechst 33258 (bis-benzimide) von der Firma Moleculer Probes Eugene, Oregon, USA gefärbt (DAPI-Färbung). Nach dem Eindeckeln wurde Mithilfe des Durchlichtmikroskops CK 2 (Olympus, Hamburg) und Axiovision LE Rel. 4,5 (Carl Zeiss Microlmaging, Jena) die Zellen gezählt und dokumentiert.

3.2.10 Ki-67 Färbung

Ki67 ist ein nukleäres zellproliferations-assoziiertes Antigen, das in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Verwendet wurde Rat anti-mouse KI67-Antikörper von der Firma DakoCytomation, Dudingen und als sekundär Antikörper PE-konjugierter anti-Rat Antikörper. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Hoechst 33258 (bis-benzimide) von der Firma Moleculer Probes Eugene, Oregon, USA gefärbt (DAPI-Färbung). Die tiefgefrorene Leber wurden bei -20°C mit dem Kryotom Frigocut N2800 frisch geschnitten, dann direkt in 4% PFA, pH 7,4 für 20 min. bei RT fixiert. Nachdem die Kryoschnitte in PBS für 30 min. gewaschen worden waren, wurden sie übernacht bei -80°C gelagert. Die Schnitte wurden in 10mM Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat-Puffer, pH 6,0 erhitzt bis die Lösung kocht (in der Mikrowelle mit voller Leistung), dann für 30 s. bei 30% Leistung weiterhin warm gehalten. Danach kühlten sie bei RT in der Lösung ab. Nach 3x waschen in PBS wurden die Schnitte mit 200 µl Rat anti-mouse KI67-Antikörper (1:50 mit PBS verdünnt) bedeckt und übernacht bei 4°C gelagert. Als positive Kontrolle wurde Schnitte von Mausmilz genommen. Als negativ Kontrolle wurde PBS statt AK verwendet. Anschliessend wurden die Schnitte erneut 3x in PBS gewaschen, mit 200 µl 2. AK bedeckt, 1 h. in Dunkel bei RT inkubiert, und anschließend wieder 3x in PBs gewaschen. Als Kontrolle wurde die Zellen mit Hoechst 33258 (bis-benzimide) von der Firma Moleculer Probes Eugene, Oregon, USA gefärbt (DAPI-Färbung) gefärbt. Nach dem eindeckeln wurde Mithilfe des Durchlichtmikroskops CK 2 (Olympus, Hamburg) und Axiovision LE Rel. 4,5 (Carl Zeiss MicroImaging, Jena) die Zellen gezählt und dokumentiert.

3.2.11 Lebervolumenbestimmung

Der Verlauf der Leberregeneration nach PHx wurde mittels Lebervolumenbestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach PHx durch MRT-Messung in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf visualisiert. Eine Sedierung der Tiere während der Untersuchung erfolgte mittles Ketamin / Rompun. Die Auswertung erfolgte verblindet mit dem Programm Slicer 2.5.1-devwin32 (www.slicer.org, USA).

3.2.12 CBA-FACS

Im Serum der hepatektomierten Mäuse wurden die Konzentrationen von IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IFN-gamma, GM-CSF, IL-4, IL-17A und TNF- α mittels Th1/Th2-Kit, (10plex, mouse) von der Firma Bender MedSystems, Wien, Österreich gemäß den Angabe des Herstellers bestimmt.

3.2.13 TGF-beta1 ELISA

96 well Platten (Nunc, Wiesbaden) wurden über Nacht bei 4°C mit TGF- β 1 Antikörper 0,8 µg/ml in PBS mit 100 µl/well beschichtet. Anschließend wurden die Platten 1h mit Block-Puffer (300 µl/well) bei Raumtemperatur geblockt, 3x mit Wasch-Puffer gewaschen (200 µl/well), 100 µl Probe pro well hinzugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde dann 3x mit Wasch-Puffer gewaschen und mit 100 µl/well biotinylierter Huhn anti-human TGF- β 1 Antikörper in einer Konzentration von 0,8 µg/ml in PBS bestückt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Streptavidin-HRP wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Platte 3x mit Wasch-Puffer gewaschen und anschließend 100 µl Substratlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationzeit von 20-30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden 50 µl 1M H₂SO₄ / well hinzugefügt. Durch diesen ELISA wurde nur die Menge an aktivem TGF- β 1 erfasst. Zur Messung der Gesamtmenge an TGF- β 1 wurden 0,5 ml Serum mit 0,1 ml 1N HCl aktiviert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann durch Zugabe von 0,1 ml 1,2N NaOH neutralisiert. Als Standard diente rekombinantes humanes TGF- β 1 (R&D Systems, Wiesbaden). Die Menge an latentem TGF- β 1 wurde aus der Differenz von gesamter und aktiver Menge an TGF- β 1 berechnet.

3.2.14 Statistiche Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism 5.0b und SPSS 9.0 durchgeführt. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der Nicht-parametrische Mann-Whitney-Test durchgeführt. Für multiple Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis Test (one way ANOVA für nicht parametrische Daten) mit anschließender post-hoc Analyse durchgeführt. Zum Testen der Interaktion zwischen Zeit und Gruppen bei der MRT-Messung des Lebervolumens wurde das Random Coefficient Model verwendet. Ein p-Wert ≤ 0,05 wurde als signifikanter Unterschied angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Frau A. Daubmann vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

3.2.15 Graphische Darstellung

Die Abbildungen und Diagramme wurden mit Adobe Photoshop 6.0. und Graph Pad Prism 5.0b erstellt. Axiovision LE Rel. 4,5 wurde für die histologische Abbildungen verwendet. Für die Abbildungen der MRT-Messungen wurde das Programm Slicer 2.5.1-dev-win32 verwendet. Mittelwert und SEM sind dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung des Einflusses von Follistatin auf das physiologische Leberwachstum

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Follistatin auf die Leberregeneration und das Leberwachstum in der Maus zu untersuchen. Zuerst untersuchten wir den Einfluss von Follistatin auf das physiologische Leberwachstum von Mäusen. Hierzu bestimmten wir die Relation des Lebergewichts zu dem Körpergewicht von Wildtypen und K14-Follistatin transgenen Tieren unterschiedlichen Alters.



Abbildung 4: Relation Lebergewicht zu Körpergewicht bei 1,2,4,6,8 und 40 Wochen alten Mäusen. Die Mäuse wurden gewogen und anschließend total hepatektomiert. Danach wurde die Leber gewogen und die Relation Lebergewicht/Körpergewicht berechnet. Mittelwert und SEM sind dargestellt. Es wurden mindestens 4 Mäuse pro Gruppe und Zeitpunkt analysiert.



Abbildung 5: Untersuchung der Leberarchitektur in unbehandelten Mäusen mittels HE-Färbung. Die Balken entsprechen 20µm in der hohen und 100µm in der geringeren Vergrösserung (n=3).

In unbehandelten Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied des Verhältnisses Leber- zu Körpergewicht im zeitlichen Verlauf zwischen den transgenen Tieren und Wildtypen festgestellt werden. Des Weiteren zeigten sich histologisch keine Auffälligkeiten in der Leberarchitektur in unbehandelten transgenen Tieren. In den nächstfolgenden Versuchen analysierten wir den Einfluss von Follistatin auf die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx).

4.2 Untersuchung des Einflusses von Follistatin auf die Leberregeneration nach PHx

4.2.1 Volumenbestimmung mittels MRT

Der Verlauf der Leberregeneration wurde mittels MRT zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach PHx bestimmt. Hierzu wurden 15-17 Wochen alte Mäuse verwendet. Am Tag -1 wurden native Bilder vor PHx mittels MRT aufgenommen. Anschließend wurden die Mäuse partiell hepatektomiert und das Restlebervolumen direkt danach mittels MRT bestimmt. Die Messung mittels MRT wurde täglich bis zum 6. Tage post-op durchgeführt.



Abbildung 6: Lebervolumenbestimmung mittels MRT. A+B: Graphischer Verlauf des Leberwachstums relativ (A) und absolut (B) nach PHx. Tag 0, der Zustand gemessen direkt nach der PHx, diente als Bezugspunkt der Analyse. Es wurden 5 WT und mindestens 5 TG Tiere zu allen Zeitpunkten gemessen. An Tag 0, 1, 3 und 4 untersuchten wir 6 TG Mäuse. **C:** Transversaler Schnitt der Leber bei der T1-Wichtung vor PHx, am Tag der PHx, am 3.Tag und 4. Tag nach der PHx.

Transgene Tieren zeigten hierbei eine signifikant stärkere und schnellere Zunahme des Lebervolumens nach PHx verglichen mit Wildtypen (Abb. 6). Das Lebervolumen nach PHx nahm bei den transgenen Tieren durchschnittlich um 11,3% und bei den Wildtypen um 7,8% pro Tag zu (p=0,008). Ein Problem bei diesen Untersuchungen war die hohe Sterblichkeit der Mäuse während dieser Untersuchungen: 15 % der transgenen Mäuse und der Wildtypen starben peri-, bzw. unmittelbar postoperativ. Von den überlebenden Tieren starben jedoch ca. 80% der Wildtypen und der transgenen Tiere typischerweise während der Narkose bei der dritten MRT Untersuchung (wildtyp 19 von 24; transgen 13 von 18); Am ehesten ist dies auf eine mangelnde Verstoffwechslung der Narkosemittel durch die Leber zurückzuführen. Ein weiterer Faktor könnte der Transport zwischen dem Tierstall und der Radiologie darstellen. Da das Leberwachstum bei den K14-Follistatin transgenen Tieren höher war als bei den Wildtypen, analysierten wir Proliferation und die Apoptose der Hepatozyten nach PHx im Verlauf. Hierbei wurden die Tiere nicht rezidivierend anästhesiert.

4.2.2 Untersuchung der Leberarchitektur mittels HE-Färbung

Die Leberarchitektur nach PHx wurde mittels HE-Färbung von Parafinschnitten untersucht.



Abbildung 7: Untersuchung der Leberarchitektur nach PHx (Tag 8) mittels HE-Färbung. Die Balken entsprechen 20µm in der hohen und 100µm in der geringeren Vergrösserung (n=3).

Es konnten keine erkennbaren Unterschiede in der Leberhistomorphologie nach partieller Hepatektomie zwischen Wildtypen und transgenen Tieren gefunden werden.

4.2.3 Bestimmung der Proliferationsrate mittels Ki-67 Färbung

Die Proliferation der Hepatozyten nach der PHx wurde histologisch mittels Ki67-Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach PHx untersucht.



Abbildung 8: Proliferationsbestimmung mittels Ki67-Färbung. A: Graphischer Verlauf der histologisch untersuchten Proliferationsrate der Hepatozyten 8h, 20h, 40h und 4d nach PHx von TGund WT-Mäusen. **B:** Repräsentative histologische Leberschnitte nach Ki67- (obere Reihe) und DAPI-Färbung (untere Reihe). Als positive Kontrolle für die Ki67 Färbung diente eine Milzhistologie. Mean und SEM sind dargestellt. Es wurden mindestens 4 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt untersucht.

Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl Ki67 positiver Zellen zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen gemessen werden. Jedoch waren in der Leber der K14-Follistatin transgenen Mäuse 40 Stunden nach PHx tendenziell mehr Zellen Ki67 positiv.

4.2.4 Bestimmung der Apoptoserate mittels TUNEL-Färbung

Des Weiteren wurde die Apoptoserate der Hepatozyten nach PHx zu verschiedenen Zeitpunkten mittels TUNEL-Färbung histologisch untersucht.



Abbildung 9: Apoptoseratebestimmung mittels TUNEL-Färbung. A: Graphischer Verlauf der Apoptoserate in der Leber nach PHx von mindestens 5 TG- und 5 WT-Mäuse je Zeitpunkt. B: Beispiele der Leberhistologie nach TUNEL- (obere Reihe) und DAPI-Färbung (untere Reihe). Die positive Kontrolle wurde mit DNase präinkubiert.

Zu keinem Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der TUNEL positiven Zellen zwischen transgenen Mäusen und Wildtypen gemessen werden. Jedoch war die Apoptoserate in den Wildtypen 4 Tage nach PHx tendenziell höher als in den transgenen Tieren.

4.2.5 Analyse der Growth Factor-Expression mittels RT-PCR

Die Expression von HGF, TGF- α , und VEGF nach PHx wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht.



Abbildung 10: Analyse von Growth Factor-Expressionen mittels semiquantitativer RT-PCR. A: Jede Bande repräsentiert ein Versuchstier. Actin diente als RNA-Normalisierung. **B:** Graphischer Verlauf der Dichtemessung von den RT-PCR Bände (Densitometrie). Jeder Kreis (WT) und jedes Dreieck (TG) repräsentiert ein Versuchtier (p=0,008).

Der Expressions-peak von HGF lag in Wildtyp Mäusen 40 Stunden post-partieller Hepatektomie. Zu diesem Zeitpunkt war die HGF-Expression in den transgenen Mäuse signifikant niedriger. Die Expression des Housekeeping Gens Actin war zu den untersuchten Zeitpunkten zwischen Wildtypen und transgenen Tieren gleich.

Es konnte kein signifikanter Unterschied sowohl in der Expression von VEGF, als auch in der Expression von TGF- α zwischen transgenen und Wildtyp Mäusen gesehen werden. Allerdings ist ein Tendez erkennbar, dass TGF- α Expression bei Wildtypen bereits 20 Stunden nach PHx erhöht war. Im Gegensatz dazu zeigten die

transgenen Mäuse tendenziell eine verzögerte Hochregulation von TGF- α . Wie bereits schon erwähnt, waren diese Unterschiede jedoch nicht signifikant.

4.2.6 Bestimmung der Zytokinenkonzentration im Serum mittels Cytometric Bead Assay

Die Serumkonzentration der Zytokine IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IFN-gamma, GM-CSF, IL-4, IL-17 und TNF- α wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach PHx mittels CBA (cytometric bead assay) bestimmt.



Abbildung 11: Bestimmung der Zytokinenkonzentration im Serum mittels CBA-FACS. Serumspiegel von IL-6 (A), TNF- α (B) und IL-2 (C) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach PHx zwischen Wildtyp und transgenen Mäusen. (*p=0.03)

Die TNF-α Serumspiegel 40 Stunden nach PHx waren in transgenen Mäusen signifikant erhöht verglichen mit Wildtypen. Der Unterschied in IL-2 und IL-6 Serumspiegeln war nicht signifikant. Die Serumspiegel der anderen Zytokine (IL-4, IL5, IL-6, IL-10, IL-17A, GM-CSF) wurden nicht dargestellt, da sie unter der Bestimmungsgrenze lagen.

4.2.7 Bestimmung der TGF-beta1 Serumkonzentration mittels ELISA

Zur Bestimmung der TGF-beta1 Spiegel wurde Serum der hepatektomierten Mäuse mittels ELISA untersucht. Die gesamt-TGF-beta1 Konzentration wurde nach Säureaktivierung gemessen.



Abbildung 12: Bestimmung der TGF- β **1 Konzentration mittels ELISA.** Serumspiegel von aktiven TGF- β (A) und gesamt-TGF- β (B) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach PHx. (*p=0,048)

Transgene Mäuse zeigten 20 Stunden nach PHx höhere Serumspiegel von aktivem TGF- β 1 und auch von gesamt-TGF- β 1 verglichen mit Wildtypen.

5 Diskussion

5.1 Die Wirkung der Überexpression von Follistatin auf das physiologische Wachstum der Leber

Kogure et al. konnten nachweisen, dass die einmalige intraportale Gabe von Follistatin die Leberregeneration in partiell hepatektomierten Ratten beschleunigt (Kogure et al., 1995). Es wurde auch gezeigt, dass die Gabe von Follistatin die DNS Synthese nach partieller Hepatektomie in Ratten induziert (Kogure et al., 1998). Deshalb war es interessant, den Einfluss von Follistatin auf das physiologische Leberwachstum in einem Mausmodell mit kontinuierlich erhöhten Follistatin Serumspiegeln zu untersuchen. Hierzu verwendeten wir K14-Follistatin transgene Mäuse (Wankell et al., 2001). Wir konnten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (1, 2, 4, 6, 8, und 40 Wochen) Unterschiede in der Relation des Leber-/ Körpergewichts zwischen Wildtypen und K14-Follistatin transgenen Tieren finden. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Überexpression von Follistatin in K14-Follistatin transgenen Mäusen keinen Einfluss auf das physiologische Leberwachstum hat.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Activin- und Follistatin-Serumspiegel im Rahmen eines akuten Leberausfalls steigen, wobei die genaue Funktion und Regulation in diesem Fall noch unklar ist (Hughes and Evans, 2003; Palmes et al., 2005). Es könnte also möglich sein, dass die positive Wirkung von Follistatin auf das Leberwachstum bzw. -regeneration via Neutralisierung von Activin zusätzlicher Stimuli, wie eine mechanische oder toxische Schädigung des Lebergewebes bedarf. Es könnte also folglich sein, dass die Activin Spiegel in unbehandelten Mäusen zu gering sind, sodass eine Überexpression von Follistatin in der Maus nur einen zeitlich limitierten Einfluss auf das physiologische Leberwachstum hat.

Es ist bekannt, dass die Gabe von Follistatin nach PHx zu einer schnelleren Regeneration, aber gestörten Restauration der normalen Leberarchitektur und somit zu einer gestörten Leberfunktion in Ratten führt (Kim et al., 2004; Kogure et al., 1995; Kogure et al., 1998). Aus diesem Grunde untersuchten wir als nächstes, ob die Überexpression von Follistatin die Leberregeneration nach PHx beeinflusst.

5.2 Die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie in K14-Follistatin transgenen Mäusen

5.2.1 Volumenbestimmung mittels MRT

Der Einfluss von Follistatin auf die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie wurde bisher im Rattenmodell mit Gabe von Follistatin untersucht (Kim et al., 2004; Kogure et al., 1995; Kogure et al., 1998). Der Vorteil des Rattenmodells ist, dass die Operationsprozedur aufgrund der Größe des Tieres technisch einfacher als bei der Maus ist. Jedoch gibt es in der Maus die Möglichkeit, bestimmte Faktoren durch transgene Manipulation zu untersuchen. Ratten- und Maus-Modelle sind ähnlich geeignet, um Schlüsse auf die humane Leberregeneration zu ziehen: In Ratten und auch in der Maus ist die Leber das grösste viszerale Organ, das vorhanden ist. Beide Spezies haben die gleiche Anzahl von den Leberlappen. Die Regenerationsdauer von sieben Tagen ist bei beiden Spezies auch identisch. Im Vergleich benötigt die humane Leber nach partieller Hepatektomie circa sechs Wochen zur kompletten Regeneration. Im Gegensatz zur Ratte hat die Maus, wie auch der Mensch, eine Gallenblase. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss einer kontinuierlichen Überexpression von Follistatin auf die Leberregeneration zu untersuchen. Hierzu verwendeten wir K14-Follistatin transgene Mäuse.

Der Verlauf der Leberregeneration wurde mittels Volumenmessung durch MRT-Untersuchungen bestimmt. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen und den wildtyp Tieren bei der Leberregeneration nach PHx gefunden werden. Das Volumenwachstum nach partieller Hepatektomie war bei den transgenen Tieren stärker und schneller als bei den Wildtypen. Hierbei zeigten sich trotz der schnelleren Regeneration nach PHx keine Leberarchitekturstörungen in den K14-Follistatin transgenen Tieren. Ein Problem dieser Experimente stellte die hohe Sterblichkeit der Mäuse während dieser Untersuchungen dar. Die hohe Sterblichkeit ist am ehesten auf die verwendeten Anesthetika (Ketamin/Rompun) zurückzuführen, die bei den MRT Untersuchungen verwendet wurden. Aus technischen Gründen hatten wir allerdings keine andere Alternative für die Narkose, so z.B. eine inhalative Narkose mit Isofluran. Es könnte sein, dass die tägliche intraperitonieale Gabe der Narkotika eine zusätzliche Belastung für die hepatektomierte Leber darstellt, da diese durch die Leber metabolisiert werden.

5.2.2 Proliferations- und Apopotoseratebestimmung

Da wir einen Unterschied zwische Wildtypen und K14-Follistatin transgenen Tieren in der Leberregeneration nach PHx festgestellt hatten, wollten wir als nächstes untersuchen, ob es einen Unterschied in der Proliferations- und Apotoserate der Hepatozyten nach PHx zwischen Wildtypen und transgenen Tieren gibt. Für die histologischen Untersuchungen wurde keine repetitive i.p. Narkose bei den Versuchstieren mit Rompun/Ketamin durchgeführt, sondern nur eine einmalige Gabe zur Durchführung der Hepatektomie. Deshalb konnten wir hier die hohe Sterblichkeitsrate reduzieren. Diese lag bei 15%. Passend zu den MRT-Messungen waren in der Leber der K14-Follistatin transgenen Mäuse 40 Stunden nach PHx tendeziell mehr Hepatozyten Ki67 positiv verglichen mit Wildtypen. Und auch die Apopotoserate war in den Wildtypen 4 Tage nach PHx tendenziell höher als in den transgenen Tieren. Jedoch waren diese Unterschiede der Proliferations- und der Apoptoserate der Hepatozyten nach PHx zwischen den transgenen und den wildtyp Tieren nicht signifikant. Es könnte jedoch sein, dass die Messung der Ki67-Expression zu ungenau ist. Die Messung der BrdU-Aufnahme von proliferierenden Zellen wäre eine weitere, potentiell genauere Methode zur histologischen Untersuchung der Proliferation gewesen. BrdU kann über einen bestimmten Zeitraum injiziert werden. Dies ermöglicht die genaue Bestimmung der Zellen, die sich in diesem Zeitraum in der Synthesephase befunden haben. Im Gegensatz hierzu wird Ki67 von allen Zellen, die sich nicht in der Ruhephase (G0) befinden exprimiert.

5.2.3 Analyse der Wachstumsfaktor-Expression

Es ist bekannt, dass der Hepatozyten growth factor (HGF) ein essentieller Faktor für Leberwachstum und –regeneration ist (Nakamura et al., 1989). Lindroos et al. konnten bei Ratten zeigen, dass die Serum-HGF Konzentrationen bereits 1 Stunde nach PHx steigen und mehr als 72 Stunden erhöht bleiben. Hier haben wir das Expressionsmuster von HGF in hepatektomierten Lebern untersucht, und zwischen Wildtypen und K14-Follistatin transgenen Mäusen verglichen. Unerwarteterweise fanden wir, dass Wildtypen eine höhere HGF-Expression 40 Stunden nach PHx hatten, so dass die schnellere Leberregeneration in den transgenen Tieren nicht durch eine Modulation von HGF bedingt sein kann.

Diskussion

Es ist jedoch unklar, ob Activin HGF direkt induziert, oder ob die Unterschiede in der HGF-Expression indirekt durch die schnellere Regeneration der Lebern in K14-Follistatin transgenen Mäusen bedingt ist. Im Gegensatz dazu wurde tendeziell ein verzögerter Anstieg der TGF- α Expression nach PHx bei transgenen verglichen mit wildtyp Mäusen beobachtet. Jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Es könnte folglich sein, dass eine wechselseitige Regulation zwischen Follistatin und TGF- α besteht, was diesen verzögerten Anstieg in K14-Follistatin transgenen Tieren erklären könnte. TGF- α ist nicht essentiell notwendig für eine Leberregeneration, da TGF- α defiziente Mäuse eine normale Leberregeneration nach PHx aufweisen. In weiteren Untersuchungen mit TGF- α Antikörpern oder rekombinatem TGF- α könnte die Rolle von TGF- α in Follistatintransgenen Mäusen genauer analysiert werden.

5.2.4 TGF-β1 Serumspiegel nach PHx

TGF-beta1 scheint, ähnlich wie Activin A, einen inhibitorischen Einfluss auf die Leberregeneration zu haben (Kopp et al., 1996), kann jedoch nicht von Follistatin neutralisiert werden. Es ist bekannt, dass TGF-beta1 und Activin A den gleichen Signalweg (SMAD2/3, p38 MAP Kinase) verwenden und sich auch z.B. bei der Konversion von naiven T-Zellen in regulatorische T-Zellen gegenseitig teilweise kompensieren können (Huber et al., 2009). Folglich bestimmten wir die TGF-beta1 Serumspiegel in Wildtypen und transgenen Tieren nach PHx. Es zeigte sich tatsächlich, dass transgene Tiere zu frühen Zeitpunkten nach PHx erhöhte TGFbeta1 Serumspiegel haben verglichen mit Wildtypen. Dies läst eine wechselseitige Regulation von Activin A und TGF-beta1 vermuten. Die erhöhten TGF-beta1 Serumspiegel, könnten folglich die Blockade von Activin in den K14-Follistatin transgenen Tieren zumindest teilweise ausgleichen. In nachfolgenden Experimenten könnte die Rolle von TGF-beta1 in Follistatin transgenen Tieren mittels neutralisierender TGF-beta1 Antikörper untersucht werden. Basierend auf unseren Daten würde man vermuten, dass K14-Follistatin transgenen Tiere nach PHx eine noch schnellere Leberregeneration nach Neutralisation von TGF-beta1 zeigen. Jedoch könnten dies zu einer überschießende Leberregeneration und eventuell zu einer gestörte Leberarchitektur führen.

5.2.5 Erhöhte TNF- α Serumspiegel in K14-Follistatin transgenen Mäusen nach PHx

Es ist bekannt, dass Activin A die Produktion von IL-6 (Yu et al., 1998), TNF- α und IL-1beta beeinflussen kann (Nusing and Barsig, 1999). Interessanterweiser sind die Serumspiegel von TNF- α und IL-6 nach PHx in der Maus erhöht. Es wurde des Weiteren gezeigt, dass TNF- α Rezeptor KO Mäuse eine gestörte Leberregeneration aufweisen, wobei die Effekte durch IL-6 Gabe revidiert werden konnten (Cressman et al., 1996). Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass IL-6 KO Mäuse eine gestörte, aber dennoch vollständige Leberregeneration haben (Cressman et al., 1996; Wuestefeld et al., 2003). Aus diesen Gründen analysierten wir die Serumspiegel von IL-6 und TNF- α in Wildtypen und K14-Follistatin transgenen Mäusen nach PHx.

Passend zu den oben erwähnten Studien fanden wir erhöhte IL-6 und TNF- α Serumspiegel nach PHx. Die IL-6 Serumspiegel waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen Wildtypen und transgenen Tieren. Jedoch zeigte sich die TNF- α Konzentration in den K14-Follistatin transgenen Tieren 40 Stunden nach PHx signifikant erhöht verglichen mit Wildtypen (p=0,03). Dies ist interessant, weil zuvor gezeigt wurde, dass die Blockade von Activin durch Follistatin-Gabe zu erniedrigten TNF- α Serumspiegeln nach LPS Injektion in der Maus führte (Jones et al., 2007). Die konträren Ergebnisse könnten durch die Verwendung unterschiedlicher Modelle (PHx vs. LPS) begründet sein. Unsere Daten lassen vermuten, dass die Neutralisation von Activin durch Follistatin in den K14-Follistatin transgenen Mäusen die Expression von TNF- α steigern könnte. Dies könnte tendenziell zu einer schnelleren Regeneration nach PHx beitragen. Hier könnte die Gabe von TNF- α Antikörpern nach PHx in K14-Follistatin transgenen Mäusen weitere Aufschlüsse geben.

6 Zusammenfassung

Follistatin ist ein endogener Inhibitor von Activin, da Follistatin Activin hochaffin binden und neutralisieren kann. Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Follistatin auf das physiologische und das regenerative Leberwachstum nach 2/3 Resektion der Leber im Mausmodell zu untersuchen. Hierzu wurden K14-Follistatin transgene Mäuse verwendet, die Follistatin unter einem humanen Keratinozyten-spezifischen Promotor überexprimieren, und dadurch auch systemisch erhöhte Follistatinspiegel aufweisen. Im Rattenmodell konnte bisher gezeigt werden, dass Activin A das regenerative Leberwachstum inhibiert, während die Gabe von Follistatin das Leberwachstum zu beschleunigen scheint, jedoch auf Kosten einer gestörten Leberarchitektur. Untersuchungen im Mausmodell waren bisher nicht durchgeführt worden. Wir fanden, dass eine transgene Überexpression von Follistatin keinen Einfluss auf das physiologische Leberwachstum hat. Transgene Mäuse hatten verglichen mit Wildtypen eine stärkere und schnellere Leberregeneration nach partieller Hepatektomie. Die Expression des Wachstumsfaktors HGF war in den Lebern der transgenen Tieren niedriger als in den Wildtypen. Die TNF- α Serumspiegel waren in transgenen Mäusen nach partieller Hepatektomie erhöht. Dies lässt vermuten, dass Activin A einen stimulierenden Einfluss auf die HGF Expression und einen inhibitorischen Einfluss auf die TNF- α Expression hat. Es ist jedoch unklar, ob es sich hierbei um einen direkten oder indirekten Effekt handelt. Interessanterweise hatten transgene Tiere erhöhte TGF-beta1 Serumspiegel zu frühen Zeitpunkten nach PHx, was einen Einfluss von Activin A auf die TGF-beta1 Produktion vermuten lässt. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Steigerung des regenerativen Leberwachstums durch transgene Überexpression von Follistatin beobachtet werden. In weiteren Untersuchungen sollten, beispielsweise durch die Verwendung eines Mausmodels mit hepatozytenspezifischer Blockade des Activinsignalwegs, die Zielzelle von Activin untersucht werden. Des Weiteren werden in künftigen Studien die Follistatin und Activin Serumspiegel nach Leberlebendspende und Leberresektion untersucht werden, um Änderungen der Serumspiegel im Verlauf der humanen Leberregeneration zu analysieren.

7 Literaturverzeichnis

Abe, M., Shintani, Y., Eto, Y., Harada, K., Kosaka, M., and Matsumoto, T. (2002). Potent induction of activin A secretion from monocytes and bone marrow stromal fibroblasts by cognate interaction with activated T cells. J Leukoc Biol *72*, 347-352.

Akerman, P., Cote, P., Yang, S.Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G.J., and Diehl, A.M. (1992). Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. Am J Physiol *263*, G579-585.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2, 675-680.

Attisano, L., Wrana, J.L., Montalvo, E., and Massague, J. (1996). Activation of signalling by the activin receptor complex. Mol Cell Biol *16*, 1066-1073.

Braun, L., Mead, J.E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G.I., and Fausto, N. (1988). Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. Proc Natl Acad Sci U S A *85*, 1539-1543.

Carr, B.I., Hayashi, I., Branum, E.L., and Moses, H.L. (1986). Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor. Cancer Res *46*, 2330-2334.

Chari, R.S., Price, D.T., Sue, S.R., Meyers, W.C., and Jirtle, R.L. (1995). Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. Am J Surg *169*, 126-131; discussion 131-122.

Chen, Y.G., Wang, Q., Lin, S.L., Chang, C.D., Chuang, J., and Ying, S.Y. (2006). Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. Exp Biol Med (Maywood) *231*, 534-544.

Cho, S.H., Yao, Z., Wang, S.W., Alban, R.F., Barbers, R.G., French, S.W., and Oh, C.K. (2003). Regulation of activin A expression in mast cells and asthma: its effect on the proliferation of human airway smooth muscle cells. J Immunol *170*, 4045-4052.

Cornell, R.P. (1985a). Gut-derived endotoxin elicits hepatotrophic factor secretion for liver regeneration. Am J Physiol *249*, R551-562.

Cornell, R.P. (1985b). Restriction of gut-derived endotoxin impairs DNA synthesis for liver regeneration. Am J Physiol *249*, R563-569.

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

Cruise, J.L., Houck, K.A., and Michalopoulos, G.K. (1985). Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine. Science *227*, 749-751.

Cruise, J.L., Knechtle, S.J., Bollinger, R.R., Kuhn, C., and Michalopoulos, G. (1987). Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration. Hepatology *7*, 1189-1194.

Dal-Pra, S., Furthauer, M., Van-Celst, J., Thisse, B., and Thisse, C. (2006). Noggin1 and Follistatin-like2 function redundantly to Chordin to antagonize BMP activity. Dev Biol 298, 514-526.

Date, M., Matsuzaki, K., Matsushita, M., Tahashi, Y., Sakitani, K., and Inoue, K. (2000). Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. J Hepatol *32*, 251-260.

de Guise, C., Lacerte, A., Rafiei, S., Reynaud, R., Roy, M., Brue, T., and Lebrun, J.J. (2006). Activin inhibits the human Pit-1 gene promoter through the p38 kinase pathway in a Smad-independent manner. Endocrinology *147*, 4351-4362.

de Winter, J.P., ten Dijke, P., de Vries, C.J., van Achterberg, T.A., Sugino, H., de Waele, P., Huylebroeck, D., Verschueren, K., and van den Eijnden-van Raaij, A.J. (1996). Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. Mol Cell Endocrinol *116*, 105-114.

Diehl, A.M., Yin, M., Fleckenstein, J., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Brenner, D.A., Westwick, J., Bagby, G., and Nelson, S. (1994). Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. Am J Physiol *267*, G552-561.

Endo, D., Kogure, K., Hasegawa, Y., Maku-uchi, M., and Kojima, I. (2004). Activin A augments vascular endothelial growth factor activity in promoting branching tubulogenesis in hepatic sinusoidal endothelial cells. J Hepatol *40*, 399-404.

Fainsod, A., Deissler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H., and Blum, M. (1997). The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. Mech Dev *63*, 39-50.

Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. Hepatology *43*, S45-53.

Francavilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Coetzee, M., Makowka, L., Barone, M., Van Thiel, D.H., and Starzl, T.E. (1988). Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. Transplant Proc *20*, 494-497.

Gold, E.J., Zhang, X., Wheatley, A.M., Mellor, S.L., Cranfield, M., Risbridger, G.P., Groome, N.P., and Fleming, J.S. (2005). betaA- and betaC-activin, follistatin, activin receptor mRNA and betaC-activin peptide expression during rat liver regeneration. J Mol Endocrinol *34*, 505-515.

Greene, A.K., and Puder, M. (2003). Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. J Invest Surg *16*, 99-102.

Gressner, A.M. (1995). Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. J Hepatol 22, 28-36.

Grisham, J.W. (1962). A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. Cancer Res *22*, 842-849.

Grusch, M., Drucker, C., Peter-Vorosmarty, B., Erlach, N., Lackner, A., Losert, A., Macheiner, D., Schneider, W.J., Hermann, M., Groome, N.P., *et al.* (2006). Deregulation of the activin/follistatin system in hepatocarcinogenesis. J Hepatol *45*, 673-680.

Harrington, A.E., Morris-Triggs, S.A., Ruotolo, B.T., Robinson, C.V., Ohnuma, S., and Hyvonen, M. (2006). Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin. EMBO J *25*, 1035-1045.

Houck, K.A., and Michalopoulos, G.K. (1989). Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. J Cell Physiol *141*, 503-509.

Huber, S., Stahl, F.R., Schrader, J., Luth, S., Presser, K., Carambia, A., Flavell, R.A., Werner, S., Blessing, M., Herkel, J., and Schramm, C. (2009). Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells. J Immunol *182*, 4633-4640.

Hubner, G., Brauchle, M., Gregor, M., and Werner, S. (1997). Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease? Lab Invest 77, 311-318.

Hughes, R.D., and Evans, L.W. (2003). Activin A and follistatin in acute liver failure. Eur J Gastroenterol Hepatol *15*, 127-131.

Hully, J.R., Chang, L., Schwall, R.H., Widmer, H.R., Terrell, T.G., and Gillett, N.A. (1994). Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A. Hepatology *20*, 854-862.

Ichikawa, T., Zhang, Y.Q., Kogure, K., Hasegawa, Y., Takagi, H., Mori, M., and Kojima, I. (2001). Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver. Hepatology *34*, 918-925.

Iwai, M., Cui, T.X., Kitamura, H., Saito, M., and Shimazu, T. (2001). Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. Cytokine *13*, 60-64.

Jones, D.E., Jr., Tran-Patterson, R., Cui, D.M., Davin, D., Estell, K.P., and Miller, D.M. (1995). Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration. Am J Physiol *268*, G872-878.

Jones, K.L., Brauman, J.N., Groome, N.P., de Kretser, D.M., and Phillips, D.J. (2000). Activin A release into the circulation is an early event in systemic inflammation and precedes the release of follistatin. Endocrinology *141*, 1905-1908.

Jones, K.L., Mansell, A., Patella, S., Scott, B.J., Hedger, M.P., de Kretser, D.M., and Phillips, D.J. (2007). Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 16239-16244.

Karagiannidis, C., Hense, G., Martin, C., Epstein, M., Ruckert, B., Mantel, P.Y., Menz, G., Uhlig, S., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C.B. (2006). Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma. J Allergy Clin Immunol *117*, 111-118.

Kawasaki, S., Makuuchi, M., Ishizone, S., Matsunami, H., Terada, M., and Kawarazaki, H. (1992). Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. Lancet *339*, 580-581.

Kim, B.C., van Gelder, H., Kim, T.A., Lee, H.J., Baik, K.G., Chun, H.H., Lee, D.A., Choi, K.S., and Kim, S.J. (2004). Activin receptor-like kinase-7 induces apoptosis through activation of MAPKs in a Smad3-dependent mechanism in hepatoma cells. J Biol Chem 279, 28458-28465.

Kogure, K., Omata, W., Kanzaki, M., Zhang, Y.Q., Yasuda, H., Mine, T., and Kojima, I. (1995). A single intraportal administration of follistatin accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats. Gastroenterology *108*, 1136-1142.

Kogure, K., Zhang, Y.Q., Maeshima, A., Suzuki, K., Kuwano, H., and Kojima, I. (2000). The role of activin and transforming growth factor-beta in the regulation of organ mass in the rat liver. Hepatology *31*, 916-921.

Kogure, K., Zhang, Y.Q., Shibata, H., and Kojima, I. (1998). Immediate onset of DNA synthesis in remnant rat liver after 90% hepatectomy by an administration of follistatin. J Hepatol *29*, 977-984.

Kopp, J.B., Factor, V.M., Mozes, M., Nagy, P., Sanderson, N., Bottinger, E.P., Klotman, P.E., and Thorgeirsson, S.S. (1996). Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. Lab Invest *74*, 991-1003.

Krummen, L.A., Woodruff, T.K., DeGuzman, G., Cox, E.T., Baly, D.L., Mann, E., Garg, S., Wong, W.L., Cossum, P., and Mather, J.P. (1993). Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. Endocrinology *132*, 431-443.

Lindroos, P.M., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G.K. (1991). Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. Hepatology *13*, 743-750.

Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., and Guillemin, R. (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. Nature *321*, 779-782.

Martinez-Hernandez, A., and Amenta, P.S. (1995). The extracellular matrix in hepatic regeneration. FASEB J *9*, 1401-1410.

Mashima, H., Kanzaki, M., Nobusawa, R., Zhang, Y.Q., Suzuki, M., Mine, T., and Kojima, I. (1995). Derangements in the activin-follistatin system in hepatoma cells. Gastroenterology *108*, 834-840.

Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., and Okamura, H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. Science *302*, 255-259.

Matzuk, M.M., Finegold, M.J., Mather, J.P., Krummen, L., Lu, H., and Bradley, A. (1994). Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 8817-8821.

McGowan, J., Atryzek, V., and Fausto, N. (1979). Effects of protein-deprivation on the regeneration of rat liver after partial hepatectomy. Biochem J *180*, 25-35.

Mead, J.E., Braun, L., Martin, D.A., and Fausto, N. (1990). Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. Cancer Res *50*, 7023-7030.

Mead, J.E., and Fausto, N. (1989). Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 1558-1562.

Michalopoulos, G., Houck, K.A., Dolan, M.L., and Leutteke, N.C. (1984). Control of hepatocyte replication by two serum factors. Cancer Res *44*, 4414-4419. Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. Science *276*, 60-66.

Miyamae, T., Marinov, A.D., Sowders, D., Wilson, D.C., Devlin, J., Boudreau, R., Robbins, P., and Hirsch, R. (2006). Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule. J Immunol *177*, 4758-4762.

Moolten, F.L., and Bucher, N.L. (1967). Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. Science *158*, 272-274.

Mukherjee, A., Sidis, Y., Mahan, A., Raher, M.J., Xia, Y., Rosen, E.D., Bloch, K.D., Thomas, M.K., and Schneyer, A.L. (2007). FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 1348-1353.

Nakamura, T., Nawa, K., and Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. Biochem Biophys Res Commun *122*, 1450-1459.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature *342*, 440-443.

Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K., and Sugino, H. (1990). Activinbinding protein from rat ovary is follistatin. Science *247*, 836-838. Naldini, L., Vigna, E., Narsimhan, R.P., Gaudino, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K., and Comoglio, P.M. (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. Oncogene *6*, 501-504.

Nusing, R.M., and Barsig, J. (1999). Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. Br J Pharmacol *127*, 919-926.

Oe, S., Lemmer, E.R., Conner, E.A., Factor, V.M., Leveen, P., Larsson, J., Karlsson, S., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. Hepatology *40*, 1098-1105.

Ogawa, K., Funaba, M., Chen, Y., and Tsujimoto, M. (2006). Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages. J Immunol *177*, 6787-6794.

Ogawa, K., Funaba, M., Mathews, L.S., and Mizutani, T. (2000). Activin A stimulates type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) production in mouse peritoneal macrophages. J Immunol *165*, 2997-3003.

Olsen, P.S., Poulsen, S.S., and Kirkegaard, P. (1985). Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. Gut *26*, 920-927. Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Tanguay, R., Brantly, M., Ou, C.N., Finegold, M., and Grompe, M. (1996). Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. Nat Genet *12*, 266-273.

Palmes, D., Skawran, S., and Spiegel, H.U. (2005). Acute liver failure: from bench to bedside. Transplant Proc *37*, 1628-1631.

Patel, K. (1998). Follistatin. Int J Biochem Cell Biol 30, 1087-1093.

Phillips, D.J., Jones, K.L., Scheerlinck, J.Y., Hedger, M.P., and de Kretser, D.M. (2001). Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response. Mol Cell Endocrinol *180*, 155-162.

Pirisi, M., Fabris, C., Luisi, S., Santuz, M., Toniutto, P., Vitulli, D., Federico, E., Del Forno, M., Mattiuzzo, M., Branca, B., and Petraglia, F. (2000). Evaluation of circulating activin-A as a serum marker of hepatocellular carcinoma. Cancer Detect Prev *24*, 150-155.

Risbridger, G.P., Schmitt, J.F., and Robertson, D.M. (2001). Activins and inhibins in endocrine and other tumors. Endocr Rev *22*, 836-858.

Rodgarkia-Dara, C., Vejda, S., Erlach, N., Losert, A., Bursch, W., Berger, W., Schulte-Hermann, R., and Grusch, M. (2006). The activin axis in liver biology and disease. Mutat Res *613*, 123-137.

Rossmanith, W., Chabicovsky, M., Grasl-Kraupp, B., Peter, B., Schausberger, E., and Schulte-Hermann, R. (2002). Follistatin overexpression in rodent liver tumors: a possible mechanism to overcome activin growth control. Mol Carcinog *35*, 1-5.

Russell, W.E., Kaufmann, W.K., Sitaric, S., Luetteke, N.C., and Lee, D.C. (1996). Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. Mol Carcinog *15*, 183-189.

Schibler, U. (2003). Circadian rhythms. Liver regeneration clocks on. Science *302*, 234-235.

Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. Nature *373*, 699-702.

Schnare, M., Barton, G.M., Holt, A.C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nat Immunol *2*, 947-950.

Schneyer, A., Sidis, Y., Xia, Y., Saito, S., del Re, E., Lin, H.Y., and Keutmann, H. (2004). Differential actions of follistatin and follistatin-like 3. Mol Cell Endocrinol *225*, 25-28.

Schneyer, A., Tortoriello, D., Sidis, Y., Keutmann, H., Matsuzaki, T., and Holmes, W. (2001). Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family. Mol Cell Endocrinol *180*, 33-38.

Schwall, R.H., Robbins, K., Jardieu, P., Chang, L., Lai, C., and Terrell, T.G. (1993). Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. Hepatology *18*, 347-356.

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

Starzl, T.E., Francavilla, A., Halgrimson, C.G., Francavilla, F.R., Porter, K.A., Brown, T.H., and Putnam, C.W. (1973). The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. Surg Gynecol Obstet *137*, 179-199.

Starzl, T.E., Francavilla, A., Porter, K.A., and Benichou, J. (1978). The effect upon the liver of evisceration with or without hormone replacement. Surg Gynecol Obstet *146*, 524-532.

Starzl, T.E., Fung, J., Tzakis, A., Todo, S., Demetris, A.J., Marino, I.R., Doyle, H., Zeevi, A., Warty, V., Michaels, M., and et al. (1993). Baboon-to-human liver transplantation. Lancet *341*, 65-71.

Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E., and Lambris, J.D. (2003). The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. J Exp Med *198*, 913-923.

Takabe, K., Lebrun, J.J., Nagashima, Y., Ichikawa, Y., Mitsuhashi, M., Momiyama, N., Ishikawa, T., Shimada, H., and Vale, W.W. (1999). Interruption of activin A autocrine regulation by antisense oligodeoxynucleotides accelerates liver tumor cell proliferation. Endocrinology *140*, 3125-3132.

Takabe, K., Wang, L., Leal, A.M., Macconell, L.A., Wiater, E., Tomiya, T., Ohno, A., Verma, I.M., and Vale, W. (2003). Adenovirus-mediated overexpression of follistatin enlarges intact liver of adult rats. Hepatology *38*, 1107-1115.

Takamura, K., Tsuchida, K., Miyake, H., Tashiro, S., and Sugino, H. (2005). Activin and activin receptor expression changes in liver regeneration in rat. J Surg Res *126*, 3-11.

ten Dijke, P., and Hill, C.S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. Trends Biochem Sci 29, 265-273.

Tomiya, T., Tani, M., Yamada, S., Hayashi, S., Umeda, N., and Fujiwara, K. (1992). Serum hepatocyte growth factor levels in hepatectomized and nonhepatectomized surgical patients. Gastroenterology *103*, 1621-1624.

Vejda, S., Erlach, N., Peter, B., Drucker, C., Rossmanith, W., Pohl, J., Schulte-Hermann, R., and Grusch, M. (2003). Expression of activins C and E induces apoptosis in human and rat hepatoma cells. Carcinogenesis 24, 1801-1809.

Wada, W., Kuwano, H., Hasegawa, Y., and Kojima, I. (2004). The dependence of transforming growth factor-beta-induced collagen production on autocrine factor activin A in hepatic stellate cells. Endocrinology *145*, 2753-2759.

Wankell, M., Munz, B., Hubner, G., Hans, W., Wolf, E., Goppelt, A., and Werner, S. (2001). Impaired wound healing in transgenic mice overexpressing the activin antagonist follistatin in the epidermis. Embo J *20*, 5361-5372.

Webber, E.M., Godowski, P.J., and Fausto, N. (1994a). In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. Hepatology *19*, 489-497.

Webber, E.M., Wu, J.C., Wang, L., Merlino, G., and Fausto, N. (1994b). Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. Am J Pathol *145*, 398-408.

Werner, S., and Alzheimer, C. (2006). Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. Cytokine Growth Factor Rev *17*, 157-171.

Wuestefeld, T., Klein, C., Streetz, K.L., Betz, U., Lauber, J., Buer, J., Manns, M.P., Muller, W., and Trautwein, C. (2003). Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. J Biol Chem *278*, 11281-11288.

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

Yasuda, H., Mine, T., Shibata, H., Eto, Y., Hasegawa, Y., Takeuchi, T., Asano, S., and Kojima, I. (1993). Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. J Clin Invest *92*, 1491-1496.

Yu, E.W., Dolter, K.E., Shao, L.E., and Yu, J. (1998). Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies. Clin Exp Immunol *112*, 126-132.

Yuen, M.F., Norris, S., Evans, L.W., Langley, P.G., and Hughes, R.D. (2002). Transforming growth factor-beta 1, activin and follistatin in patients with hepatocellular carcinoma and patients with alcoholic cirrhosis. Scand J Gastroenterol *37*, 233-238.

Zhang, Y.Q., Shibata, H., Schrewe, H., and Kojima, I. (1997). Reciprocal expression of mRNA for inhibin betaC and betaA subunits in hepatocytes. Endocr J *44*, 759-764.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Schramm danke ich für die Überlassung des Themas sowie ausgezeichnete und freundschaftliche Betreuung.

Allen Mitarbeitern der AG Schramm, besonders Marko Hilken und Dorothee Schwinge, die bei allen technischen Schwierigkeiten, besonders bei dem Umgang mit Mäusen geholfen haben, möchte ich danken.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Katrin Presser, die mir bei der technischen Einarbeitung eine große Hilfe war.

Für die Beistehung und Hilfe bei der Durchführung der MRT-Untersuchungen danke ich Dr. med. Kersten Peldschuss von der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie.

Frau Anne Daubmann von dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie danke ich für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Herrn Prof. Dr. Ansgar Lohse möchte ich danken für die Bereitstellung des Arbeitplatzes sowie für die wertvollen Anregungen während der Laborseminare.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann für die ständige Motivation und Korrekturlesen während des Verfassens dieser Arbeit.

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

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 Ausgabe (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 vergelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: Francis J. Huber