Aus der Klinik und Poliklinik
für Hepatobiliäre Chirurgie und
Viszerale Transplantation des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. Dr. h.c. Xavier Rogiers

---

# Einfluss der portalen Hämodynamik auf die frühe Genexpression bei Leberregeneration

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Jannine Meyer
aus
Hamburg

Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 24.02.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. X. Rogiers

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. H. J. Seitz

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. F. Thaiss

**Inhaltsverzeichnis**


**1. Arbeitshypothese und Fragestellung** **1**

**2. Einleitung** **2**

2.1 Klinische Bedeutung der Leberregeneration 3
2.2 Partielle Hepatektomie als operatives Standardmodell 2
2.3 Das Pfortaderastligatur-Modell 4
2.4 Steuerung der Leberregeneration 4
2.5 Hämodynamik nach PH und PBL 5
2.6 *Immediate-Early Genes* (Egr-1, PRL-1, PAI-1) 6
2.7 Systemische Auswirkungen der Leberregeneration 7
2.8 Fragestellungen 8

**3. Material und Methoden** **9**

3.1 Material 9
3.2 Tiere 9
3.3 Operationsverfahren 9
3.4 Probengewinnung 10
3.5 Lebergewichtsindex 10
3.6 Glukosemessung 10
3.7 Nachweis spezifischer m-RNA 11

3.7.1 RNA-Isolation 11
3.7.2 Northern Blot 12
3.7.3 Herstellung der Digoxigenin(DIG)-markierten cDNA-Einzelstrang-Sonden 13
3.7.4 Hybridisierung 16
3.7.5 Detektion der DIG narkierten Nukleinsäuren 16

3.8 Statistik 17

**4. Ergebnisse** **18**

4.1 Operationsletalität 18
4.2 Bestimmung der Regeneration und Atrophie 18
4.3 Expression des Histon-Protein 2B 19
4.4 Expression von Egr-1 21
4.5 Expression von PAI-1 23
4.6 Expression von PRL- 1 25
4.7 Expression von Albumin und GAPDH 29
4.8 Glukose 31

**5. Diskussion** **32**

5.1 Diskussion der Methodik 32
5.2 Diskussion der Ergebnisse 33
5.3 Ausblick / Klinische Interpretation 40

**6. Zusammenfassung** **41**

**7. Literaturverzeichnis** **42**

**8. Bezugsquellenverzeichnis** **51**

8.1 Chemikalien und Reagenzien 51
8.2 Primer 52
8.3 Lösungen und Puffer 53

**Abkürzungen** **55**

# 1. Arbeitshypothese und Fragestellungen

Das Zusammenspiel der multiplen beteiligten Faktoren bei Leberregeneration ist komplex reguliert, und nach wie vor existieren die verschiedensten Hypothesen zu der Frage, welche äußeren Einflüsse die regenerativen Prozesse triggern. Die kompensatorische Leberregeneration nach 2/3 partieller Hepatektomie (PH) wird als Antwort auf den Parenchymverlust angesehen. Im Modell der Pfortaderastligatur (engl.: portal branch ligation = PBL) kommt es zu einer analogen regenerativen Antwort im nicht-ligierten Leberteil. Im Gegensatz zu PH lassen sich hier frühe molekulare Prozesse für die Leberregeneration bei konstantem Gesamtlebervolumen erforschen. In beiden Verfahren, nach PH im Restlebergewebe und nach PBL in den hyperperfundierten Lappen, kommt es zu einer portalen Mehrdurchblutung. Postuliert, jedoch noch nicht eindeutig bewiesen werden, konnte die Hypothese, dass die Regeneration nach PH durch Erhöhung des portalen Blutflusses im Residuallebergewebe getriggert wird. Der Vergleich beider Modelle eröffnet die Möglichkeit, portale Hämodynamik und akuten Parenchymverlust als potentielle physiologische Trigger isoliert zu betrachten.

Verschiedene Arbeiten anhand von *in-vivo*- und *in-vitro*-Modellen liefern Hinweise dafür, dass Egr-1 und PAI-1 durch mechanischen Stress induzierbar sind. Egr-1, PRL-1 und PAI-1 sind Vertreter der *Immediate-Early Genes* (IEG), die innerhalb von einer Stunde nach PH massiv exprimiert werden, und denen eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstumsprozessen zugeschrieben wird. Ziel der Arbeit ist es, die mögliche Bedeutung der portalen hämodynamischen Überbelastung in der Aktivierung der frühen Gen-Expression dieser Faktoren, sowie deren Einfluss auf das Ausmaß und die Progression einer regenerativen Antwort abzuschätzen.

Es gibt Hinweise dafür, dass einige IEG nicht spezifisch für Regeneration sind, sondern eher Ausdruck einer unspezifischen Stressantwort. Nach Scheinoperation lässt sich im direkten Vergleich zu normalem und regenerierendem Gewebe beurteilen, ob die Genexpression möglicherweise Stress induziert ist.

# 2. Einleitung

## 2.1 Klinische Bedeutung der Leberregeneration

Bei primären und sekundären Malignomen der Leber sind ausgedehnte chirurgische Resektionen die Behandlung der ersten Wahl und bieten die einzige Möglichkeit für einen kurativen Therapieansatz. Derzeit sind Resektionen von über 70% des Lebergewebes möglich. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Parenchymverlust nach Leberteilresektion beim Menschen nach spätestens 6-12 Monaten durch regenerative Prozesse ersetzt worden ist (Nagasue et al. 1987). Auch in der Transplantationsmedizin spielt die Leberregeneration eine wichtige Rolle. Die Knappheit von Leichenspendern führte zur Entwicklung neuer chirurgischer Techniken wie beispielsweise der Split-Liver-Transplantation und der Leberlebendspende (Bismuth et al. 1989, Emond et al. 1996, Pichlmayr et al. 1988, Raia et al. 1989). Bei beiden Verfahren wird lediglich ein Teil des Organs transplantiert. Häufig ist das Transplantat für den Empfänger zu klein im Verhältnis zu seiner Körpergröße (Small-for-Size). Studien zeigen, dass die kleinen Transplantate kontinuierlich wachsen und sich ähnlich wie nach partieller Hepatektomie regenerieren, bis das entsprechende Volumen passend zum neuen Körpergewicht erreicht ist (Francavilla et al. 1994, Kawasaki et al. 1992). Das Verständnis über regenerative Prozesse der Leber ist für die Chirurgie daher von fundamentaler Bedeutung.

Ausgedehnte Leberteilresektionen bei Malignompatienten sind mit einer erheblichen Reduktion von funktionellem Lebergewebe verbunden. In diesem Zusammenhang stellt das postoperative Leberversagen eine gefürchtete Komplikation dar. Um dem Risiko einer postoperativen Leberdysfunktion entgegenzuwirken, führten Makuuchi und Kinoshita, vor erweiterter Hepatektomie, eine Pfortaderastembolisation (PE) durch, mit dem Ziel, eine kompensatorische Hypertrophie des kontralateralen Lappens zu induzieren, und somit das Volumen des zukünftigen Restparenchyms zu vergrößern (Kinoshita et al. 1986, Makuuchi et al. 1990). In der onkologischen Leberchirurgie ist die Erforschung der Leberregeneration von großer Bedeutung, um die physiologischen Grenzen des Resektionsausmaßes zu verstehen und letztlich gegebenenfalls auszuweiten. Die Regenerationsleistung des Lebergewebes könnte zum Beispiel durch Anregung leberspezifischer Protektionsmechanismen verbessert werden (Kaido et al. 1998, Uwagawa et al. 2001). Gleichzeitig wird die Regeneration erforscht, um neue Ansätze für den Ersatz ausgefallener Leberfunktion zu entwickeln, wie Organersatzverfahren für Patienten mit akutem Leberversagen oder Leberausfallkoma, die auf isolierten und kultivierten Hepatozyten basieren. Die Erforschung rege-

nerativer Mechanismen auf molekularbiologischer Ebene stellt darüber hinaus die Basis für das Verständnis zahlreicher Lebererkrankungen (zum Beispiel akute Leberschädigung durch Toxin, fibroproliferative Erkrankungen) und für Verbesserungen in deren Therapie dar.

## 2.2 Partielle Hepatektomie als operatives Standardmodell

Die präklinische Erforschung der Leberregeneration setzt die Verfügbarkeit eines etablierten experimentellen Ansatzes voraus.

Als operatives in-vivo-Modell zur Erforschung der Leberregeneration hat sich das 1931 von Higgins und Anderson eingeführte 2/3 partielle Hepatektomie-Modell (PH) an der Ratte besonders bewährt (Higgins 1931). Bei diesem Verfahren werden 70% der Leber operativ entfernt, ohne das zurückgelassenen Lebergewebe zu beschädigen. Dabei ersetzen die verbleibenden Lappen durch hypertrophische und hyperplastische Vorgänge das verlorene Lebergewebe. In zahlreichen Studien ist belegt, dass die Regeneration bei Nagetieren bereits nach 7-15 Tagen abgeschlossen ist (Michalopoulos et al. 1997, Pistoi et al. 1996).

Die Leber besitzt eine außergewöhnliche Kapazität zu regenerieren. Dieses einzigartige Phänomen unterscheidet die Leberzellen von anderen hochdifferenzierten Zellen. Die Teilungsaktivität der Hepatozyten ist allgemein gering, dennoch kommen selbst in der gesunden, ausgewachsenen Leber einige Hepatozytenreplikationen vor. Histochemische Untersuchungen zeigen, dass durchschnittlich weniger als 1 Mitose auf 1000 Hepatozyten stattfindet. Als Reaktion auf verschiedene Reize einschließlich Parenchymverlust und Zellschaden durch toxische oder virale Substanzen kann sich das Lebergewebe regenerieren (Diehl et al. 1996).

Wenige Minuten nach partieller Hepatektomie als Regenerationsstimulus treten die ruhenden Hepatozyten aus der $G_0$-Phase in die $G_1$-Phase des Zellzyklus ein. In der S-Phase, bei Ratten etwa nach 12-16 Stunden, beginnt die DNS-Synthese, die ihr Maximum an Aktivität 22-24 Stunden nach Leberschädigung erreicht. 6-8 Stunden nach DNS-Synthese erfolgt die mitotische Teilung der Hepatozyten (Grisham 1962). Die meisten Hepatozyten durchlaufen den Replikationszyklus mindestens einmal. Die Regeneration im PH-Modell betrifft alle Zelltypen der Leber (Parenchymzellen und Nicht-Parenchymzellen wie Sinusendothelzellen, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen und Gallengangsepithelzellen), so dass nach Abschluss der Reparationsvorgänge die normale Architektur in dem neugebildeten Areal wiederhergestellt ist (Martinez-Hernandez et al. 1995).

Interessanterweise wird das ursprüngliche Gesamtlebervolumen nicht signifikant überschritten, es kommt zu keinem überschießenden Wachstum, sondern das Ausgangsvolumen wird zu +/–15% erreicht (Francavilla et al. 1988). Dies legt komplexe Steuerungsmechanismen der Leberregeneration auf zellulärer Ebene nahe, welche bislang noch nicht näher identifiziert wurden. Das Ausmaß der Regeneration erscheint proportional zum Umfang der stattgehabten Resektion, wobei offenbar ein Gewebsverlust von mehr als 9-12% des Gesamtlebervolumens erforderlich ist, um den Schwellenwert einer regenerativen Antwort zu überschreiten (Yamanaka et al. 1993).

### 2.3 Das Pfortaderastligatur-Modell

Die kompensatorische Leberregeneration nach Resektion wurde umfangreich am PH-Modell untersucht. Das Modell der Pfortaderastligatur (engl.: portal branch ligation = PBL), bei dem, in Analogie zu dem oben genannten Verfahren von Makuuchi, etwa 70% der Leber von der portalen Blutversorgung durch Ligatur des linken Pfortaderastes im Kleintier abgeschnitten werden, ist ein weiteres wichtiges Leberregenerationsmodell, mit dem grundlegende physiologische Prozesse untersucht werden können. Dieses Modell ist dadurch gekennzeichnet, dass die Ligatur des Pfortaderastes in den unligierten Lappen zu einer vergleichbaren regenerativen Antwort führt, wie nach PH im Restparenchym, während der ligierte Leberanteil atrophiert (Alison et al. 1986, Rous et al. 1920, Rozga et al. 1986, Takeuchi et al. 1996). Der Parenchymverlust im ligierten Teil der Leber setzt erst allmählich ein und führt zu einer in etwa ausgewogenen Hyperplasie des nicht ligierten Lebergewebes. Eine eingehende Erforschung der Wachstums- und Atrophierungsprozesse auf molekularer Ebene ist am PBL-Modell bisher nur unzureichend erfolgt.

### 2.4 Steuerung der Leberregeneration

Die kompensatorische Leberregeneration nach PH ist ein komplex reguliertes Geschehen, welches einer Vielzahl extra- und intrazellulärer Steuermechanismen unterliegt. Bereits innerhalb einer Stunde nach PH der Ratte kommt es zu einer verstärkten Transkription zahlreicher Gene, die in der ruhenden Leber nicht oder nur basal exprimiert werden. Diesen *Immediate-Early Genes* (IEG) wird eine entscheidende Bedeutung für die transkriptionelle Steuerung des Wiedereintritts der Zellen in den Zellzyklus zugeschrieben. Der physiologische Trigger der IEG ist bislang unklar. In einer Arbeit hierzu von Stärkel konnte interessanterweise gezeigt werden, dass auch das chirurgische Trauma einen entscheidenden Stimulus zur Expression bestimmter IEG darstellt (Starkel et al. 1999).

Für den geregelten Zellteilungsprozeß während der Regeneration scheinen zudem einige Mediatoren eine wichtige Rolle einzunehmen. Es konnten verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren identifiziert werden, die mitogen oder komitogen auf den Zellpool der Leber wirken. Zu diesen zählen Hepatocyte Growth Factor (HGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α), Interleukine (Il-6, Il-1), die Hormone Insulin und Glukagon und weitere (Akerman et al. 1992, Caruana, Jr. et al. 1981, Cressman et al. 1996, Fausto et al. 1995, Michalopoulos et al. 1997, Naldini et al. 1991, Webber et al. 1998).

Hinsichtlich der Regulation der Proliferationshemmung konzentriert sich die überwiegende Zahl der Studien auf das Zytokin Transforming Growth Factor-β (TGF-β). Diesbezüglich ist bekannt, dass TGF-β über die Induktion anderer Faktoren die Aktivierung des Zytokins HGF verhindert (Carr et al. 1986). Jedoch ist aufgrund der Komplexität regenerativer Regulationsmechanismen anzunehmen, dass TGF-β nicht als alleiniger Faktor ausreichend ist, regenerative Prozesse zu beenden.

### 2.5 Hämodynamik nach PH und PBL

Obgleich die oben beschriebenen Mediatoren und IEG für die Steuerung der Leberregeneration identifiziert wurden, sind die physiologischen Einflüsse und Triggermechanismen bislang unerforscht und Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Neben metabolischen Faktoren und einem unspezifischen chirurgischen Trauma werden mechanische Kräfte, welche nach PH durch Veränderungen des Pfortaderflusses entstehen, als mögliche physiologische Auslösemechanismen für Leberregeneration diskutiert (Niiya et al. 1999, Sato et al. 1999). Blutflussmessungen zeigen einen Anstieg des Pfortaderdruckes nach PH und nach PBL in den nicht-ligierten Lappen vom 1. bis etwa 7. postoperativen Tag (Kanematsu et al. 1985, Lee et al. 1987, Yamamoto et al. 1992). Sowohl nach PH als auch nach PBL in den nicht ligierten Lappen bleibt ein orthograder Pfortaderfluss erhalten, der offenbar durch eine massive Reduktion des portalen Gefäßwiderstandes in der verhältnismäßig hyperperfundierten Leber und durch Dilatation des sinuidalen Strombahn ermöglicht wird. Ein Indiz für erhöhte Druck- und Scherkräfte nach 70% Hepatektomie zeigt sich anhand charakteristischer morphologischer Veränderungen des Lebergewebes. Neben erweiterten Sinusoiden wurden ödematös geschwolllene Hepatozyten gefunden (Morsiani et al. 1998).

Somit wirken vermutlich vermehrt Druck und Scherkräfte auf das relativ stärker perfundierte Restleberareal, dies könnte ein möglicher Stimulus für die Initialisierung von Regenerationsprozessen sein. Zusammengenommen legen diese Ergebnisse die Einwirkung von

bedeutsamen hämodynamischen Einflüssen auf das residuelle Lebergewebe nahe. Diese Einflüsse sind jedoch noch nicht auf zellulärer und molekularer Ebene erforscht.

### 2.6 *Immediate-Early Genes* (Egr-1, PRL-1, PAI-1)

Mehr als 70 der bereits erwähnten *Immediate-Early Genes* (IEG) sind in regenerierendem Lebergewebe identifiziert worden. Sie werden als bedeutsam im Rahmen der $G_0$-$G_1$ Transition der Hepatozyten angesehen. Diese Gene repräsentieren verschiedenste funktionelle Gruppen wie Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Regulatoren der Signaltransduktion und andere Proteine. Die Induktion der IEG ist per Definitionem unabhängig von einer *de-novo* Proteinsynthese. Das heißt, ihre Expression muss durch Transkriptionsfaktoren vermittelt werden, die bereits in der gesunden Leberzelle als inaktive Vorstufen vorhanden sind. *Early growth response-1* (Egr-1), *phosphatase of regenerating liver-1* (PRL-1) und Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) werden als IEG exprimiert.

Das *early growth response-1*-Gen (Egr-1, auch bezeichnet als NFGI-A, krox-24, zif268, Cef5 und Tis8) kodiert für ein nukleäres 80 kD Zinkfingerprotein, welches an spezifische GC-reiche DNA Sequenzen verschiedener Gene bindet und deren Transkription beeinflusst. Aufgrund seiner raschen Induktion in zahlreichen Zelltypen nach Wachstums-, Differenzierungs- und Apoptosereizen wurde Egr-1 als ein IEG charakterisiert (Gashler et al. 1993, Kilbourne et al. 1995, Sukhatme et al. 1988). Nach PH konnte ein Anstieg der Egr-1 Expression zusammen mit anderen IEG wie c-myc, c-jun, c-fos beobachtet werden (Haber et al. 1993, Li et al. 2001, Peng et al. 1999). Die Egr-1 Expression scheint durch Hypoxie und Inflammation stimulierbar zu sein (Chiu et al. 1999, Khachigian et al. 1996, Yan et al. 1999). In Studien an einigen Modellen wurde eine Aktivierung von Egr-1 durch Barotrauma und mechanische Belastung festgestellt (Morawietz et al. 1999, Niiya et al. 1999, Sato et al. 1999).

Das *phosphatase of regenerating liver-1*-Gen (PRL-1), welches innerhalb weniger Minuten nach PH transkribiert wird, ist wahrscheinlich ein Zielgen für Egr-1 vermittelte Transaktivierung (Peng et al. 1999). PRL-1 verschlüsselt eine nukleäre Protein-Tyrosin Phosphatase mit einer Molmasse von 20 kD, deren Expression verstärkt bei Leberregeneration induziert wird. Außerdem gibt es Hinweise für eine Beteiligung von PRL-1 an Zellwachstumsvorgängen während der Entwicklung und der Onkogenese und bei der Differenzierung von

adulten Organen (Diamond et al. 1994, Gregory et al. 2000, Peng et al. 1998, Rundle et al. 1999, Zeng et al. 2000).

Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) ist ein 50 kD Glykoprotein und der wichtigste physiologische Inhibitor von Plasminogen Aktivatoren (PA). PA fördern die Fibrinolyse durch Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin (Mayer 1990). Das Plasminogen/PA-System und PAI-1 sind offenbar auch in eine Reihe anderer biologischer Vorgänge verwickelt. Ihnen wird eine Beteiligung an Prozessen zugeschrieben, die mit proteolytischer Spaltung der extrazellulären Matrix verbunden sind wie Tumorinvasion, Metastasen, Entzündung, Organogenese und Gewebsumbau während Leberregeneration (Dano et al. 1985, Saksela et al. 1988). *In-vitro*-Studien zeigen, dass PAI-1 von vielen verschiedenen Zelltypen einschließlich Hepatozyten gebildet wird, und dass die PAI-1 Expression durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone reguliert wird (Healy et al. 1994, Heaton et al. 1992). Vermutlich wird eine PAI-1 Sekretion durch oxidativen Stress induziert (Cheng et al. 1996). Auch die PAI-1-Expression scheint durch als Transkriptionsfaktor vorgeschaltetes Egr-1 modulierbar zu sein (Aljada et al. 2002, Hasan et al. 2003, Lu et al. 2003, Okada et al. 2001, Shin et al. 2002). In primär kultivierten Hepatozyten und im PH-Modell ist PAI-1 als ein IEG beschrieben worden (Thornton et al. 1994, Uno et al. 1997).

### 2.7 Systemische Auswirkungen der Leberregeneration

Nach ausgedehnten Leberresektionen gefährden der Parenchymverlust und die veränderte Expression von Funktionsproteinen das Vermögen der Leber, die metabolische Homöostase aufrecht zu erhalten (Ito et al. 1991, Makuuchi et al. 1990, Milland et al. 1990, Okochi et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die präoperative Durchführung einer kontralateralen portalen Okklusion durch Embolisation oder Ligatur, eine Hypertrophie des zukünftigen Restlebervolumens induziert, und somit einen geeigneten Mechanismus darstellt, einem postoperativen Leberversagen entgegen zu wirken. Klinische und experimentelle Studien deuten darauf hin, dass die Gesamt-Leberfunktion nach PBL oder PE in der Regel stabil bleibt (Kubo et al. 2002, Tanaka et al. 1994, Uesaka et al. 1996). Dabei ist noch nicht vollständig geklärt, wie die Aufgaben zwischen dem wachsenden und dem atrophierenden Teil der Leber verteilt sind.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die schnelle regenerative Antwort in den nicht-ligierten Lappen nach PBL der Ratte mit einem Abfall der Transkription von Leberfunktionsproteinen verbunden ist (Urayama et al. 1999). Deswegen könnte man spekulieren, dass

die dennoch gute Verträglichkeit von PBL oder PE in der Klinik, durch die anhaltende Leberfunktion in den ligierten Lappen zustande kommt. Allerdings weiss man, dass portale Deprivation in der Ratte zu einer progressiven Destruktion des betroffenen Lebergewebes durch Nekrosen und Apoptosen führt. Zusammengenommen legt dies nahe, dass der portal ligierte Lappen einem großen Stress ausgesetzt ist, der möglicherweise die Leberfunktion beeinflusst.

## 2.8 Fragestellungen

Mit der vorliegenden Arbeit soll der Effekt von chirurgischem Trauma nach Scheinoperation im Vergleich zu den Effekten nach Parenchymverlust und relativer portaler Mehrperfusion auf die frühe Genexpression untersucht werden, um die Erkenntnisse über Steuerungsmechanismen der Leberregeneration auf molekularbiologischer Ebene zu erweitern. Im wesentlichen werden hierzu folgende Fragestellungen berücksichtigt:

- Wie ist das Expressionsmuster von Egr-1, PRL-1 und PAI-1 im PH-, PBL- und Scheinoperations-Modell?
- Ist die Expression von Egr-1, PRL-1 und PAI-1 in chirurgischen Modellen spezifisch für Leberregeneration?
- Ist die Expression von Egr-1, PRL-1 und PAI-1 vielleicht spezifisch für Leberparenchymverlust?
- Welchen Effekt hat die Scheinoperation auf die Expression von Egr-1, PRL-1 und PAI-1?
- Welchen Einfluss haben PH, PBL und Scheinoperation auf den Serum-Glukose Spiegel?
- Verändert sich die Expression der Haushaltsgene Albumin und GAPDH während Regeneration und Atrophie im Vergleich zur Scheinoperation?

# 3. Material und Methoden

## 3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagentien, Lösungen/Puffer, Antikörper und c-DNAs sind in der alphabetischen Bezugsliste im Anhang (**Kap. 8**) aufgeführt.

## 3.2 Tiere

Insgesamt wurden 145 männliche Albino Wistar-Ratten mit einem Alter von 2-3 Monaten und einem Gewicht von 200-250 g verwendet. Die Versuchstiere wurden von der Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Alle Experimente wurden unter Beachtung der geltenden Richtlinien für die Haltung und die Behandlung von Labortieren durchgeführt. Die Versuche wurden zuvor von der Tierschutzkommission der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Ratten/Mäuse-Standardnahrung und wurden in klimatisierten Räumen unter einem konstanten 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gehalten.

## 3.3 Operationsverfahren

Die Operationen wurden in Äther-Narkose und unter sauberen, aber nicht sterilen Bedingungen durchgeführt.

*Partielle Hepatektomie (PH)*

In der 70%-Hepatektomie-Gruppe (PH) wurde das Abdomen mit einem medianen Längsschnitt eröffnet und die Leber aus ihren ligamentären Adhäsionen gelöst. Die Präparation des Ligamentum hepatoduodenale erfolgte unter dem OP-Mikroskop (10 fache Vergrößerung). Es wurden die anterioren (links-lateraler und medialer) Leberlappen von ihrer arteriellen und portalen Versorgung abgeklemmt. Anschließend erfolgte die Präparation der Lebervenenäste. Nach Ligation des arteriellen und portalen Zustroms und Abbinden der entsprechenden Lebervenenäste wurde der mediane und der links-laterale Leberlappen entsprechend des Verfahrens nach Higgins und Anderson entfernt (Higgins 1931).

*Pfortaderastligatur (PBL)*

In der 70%-Pfortaderastligatur-Gruppe (PBL) wurde die Pfortader präpariert, und deren linker Ast, der den links-lateralen und mittleren Leberlappen versorgt, mit einer 6-0 Naht ligiert. Dadurch waren etwa 70% des Lebergewebes von der portalen Blutzufuhr abge-

schnitten. Die Operation erfolgte unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (10 fache Vergrößerung).

*Scheinoperation (SO)*

Für die Durchführung der Scheinoperation (SO) wurden die portalen Äste lediglich dargestellt. Das Abdomen wurde nach den Operationen mit 4-0 Nähten verschlossen. Postoperativ hatten die Ratten freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

*Kontrolltiere (K)*

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

### 3.4 Probengewinnung

Die Probenentnahmen erfolgten jeweils 1, 2, 3, 6, 12 und 24 Stunden und 2, 4, 8 und 14 Tage nach der Operation.

Für die Gewinnung des Probenmaterials nach Ablauf des Intervalls wurden die Tiere erneut gewogen und anschließend mit Äther narkotisiert. Das Abdomen wurde wiederum mit einem medianen Längsschnitt eröffnet. Die Aorta abdominalis wurde oberhalb des Truncus coeliacus abgeklemmt und die Vena cava inferior eröffnet. Über Punktion der Aorta wurde die Leber mit physiologischer Kochsalzlösung blutleer gespült und anschließend für die weitere Aufarbeitung entnommen und gewogen. Das entnommene Gewebe wurde, nach dem Abwiegen, in flüssigen Stickstoff überführt und bei –80°C asserviert.

### 3.5 Lebergewichtsindizes

Zur Beurteilung der regenerativen und atrophierenden Prozesse im zeitlichen Verlauf wurden jeweils das Körpergewicht und die Lebersegmentgewichte bestimmt. Direkt im Anschluss an die Probenentnahmen wurden die Lebersegmente getrennt voneinander abgewogen und das absolute und das relative Gewicht zur Bestimmung des Lebersegment zu Körpergewichts-Index ermittelt (Abb.1).

### 3.6 Glukosemessung

Die Blutentnahmen erfolgten jeweils vor Versuchsende. Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Serum wurde im Zentrallaboratorium unserer Klinik durchgeführt.

### 3.7 Nachweis spezifischer m-RNA

Hierzu gehört eine Reihe unabhängiger Arbeitsschritte. Im Mittelpunkt stand hierbei zunächst die Isolation von Gesamt-RNA aus den Gewebeproben. Um eine spezifische m-RNA zu detektieren, wurde die Gesamt-RNA elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Parallel benötigte man eine komplementäre DNA-Probe (cDNA). In der vorliegenden Arbeit wurde die Northern-Blot-Hybridisierung im Gegensatz zu standardmäßig verwendeter radioaktiver $^{32}$Phosphor-Markierung mit Digoxigenin-Methoden in Anlehnung an die Arbeiten von Yamaguchi durchgeführt (Yamaguchi et al. 1994). Die Sonde wurde zum Nachweis der zu untersuchenden m-RNA in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

#### 3.7.1 RNA-Isolation

RNA ist im Vergleich zu DNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. Ribonucleasen (RNasen) kommen ubiqutär vor, sind sehr stabil und können nach Denaturierung wie z.B. durch Autoklavieren schnell wieder renaturieren. Daher sind besondere Vorkehrungen beim Arbeiten mit RNA zu treffen. Alle Materialien waren autoklaviert und die Lösungen und Puffer unter strengsten sterilen Bedingungen angesetzt.

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) streng nach dem Protokoll des Herstellers. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 4000 rpm und Raumtemperatur statt. Vor Beginn wurden je 4 ml RLT-Puffer 40 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Für jede Isolation wurden 200-250 mg gefrorenes Lebergewebe in 4 ml RLT-Puffer lysiert, in ein 15ml Röhrchen überführt und 10 Minuten zentrifugiert (Rotanta / RP Zentrifuge, Firma Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues 15 ml-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden 4 ml 70% Ethanol hinzugefügt, sofort geschüttelt und 1 min gevortext (Minishaker, IKA Werke, Staufen). Hiernach erfolgten die entsprechenden Waschschritte in enger Anlehnung an das Kit-Protokoll. Um die RNA aus der Membran zu lösen, wurde der Filter in ein neues 15 ml Sammelröhrchen überführt und 200 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran geträufelt, das Röhrchen 5 min stehen gelassen und schließlich 3 min zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde mit weiteren 200 µl RNase-freiem Wasser wiederholt, so dass die RNA in 400 µl RNase-freiem Wasser gelöst vorlag. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration konnte dann ein Aliquot der jeweiligen Probe 1:60 verdünnt in Aqua dest. im Photometer bei 260 und 280nm gemessen und somit die Konzentration ermittelt werden.

### 3.7.2 Northern Blot

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran im Anschluss an eine gelelektrophoretische Trennung von RNA-Molekülen wird als Northern-Blot bezeichnet.

Zur Inaktivierung der RNasen wurde die Gelelektrophoresekammer, der Schlitten und die Kämme für 20 min mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Es wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Pro Probe wurden 10 µg RNA eingesetzt, mit 7 µl Probenpuffer durchmischt, 10 min bei 65°C im Thermoblock inkubiert und 2-3 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde jede Probe mit 3 µl Ladungspuffer versetzt, kurz abzentrifugiert (1min bei 10000 rpm) und auf Eis gelagert. Die Elektrophorese erfolgte im Horizontallaufträger (Sub-Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gefüllt mit 1 x RB, unter einer Spannung von 80 V.

Nach 1 ½ bis 2 Stunden wurde unter UV-Licht eine Fotografie des Gels angefertigt (Gelprinter, MWG-Biotech GmbH, Ebersberg). Die rRNA stellt mit etwa 80-90% den Hauptteil der Gesamt-RNA einer Zelle, deswegen kann man die 18S und 28S rRNA-Untereinheiten im Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung nachweisen und als Ladekontrolle verwenden, um sicherzustellen, dass in den verschiedenen Spuren des Agarosegels gleich viel RNA aufgetragen wurde.

Dann wurde das Gel 1 x 15 min in Aqua dest. und 2 x 15 min in 20 x SSC bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend wurden die Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Filter Hybond-N+, Amersham Pharmacia, Freiburg) übertragen: Eine Wanne wurde mit 20 x SSC gefüllt und eine kleine Glasplatte quer darüber gelegt. Zwei längliche Streifen Whatman-Papier (Whatman Chromatography Paper, Merck Eurolab, Hamburg) übereinander wurden in 20 x SSC getränkt und über die Glasscheibe gelegt, dass sie vorn und hinten in den Puffer eintauchten. Im Anschluß daran wurde das zurechtgeschnittene Gel mit den Taschen nach unten auf die Papiere in die Mitte der Glasplatte gelegt, mit Parafilm umgeben und die Nylonmembran in der Größe des Gels aufgebracht. Über die Membran kam eine doppelte Lage Whatman-Papier in der gleichen Größe, die vorher in 2 x SSC getränkt wurde, und ein Stapel Zellstoff von ca. 10 cm Höhe. Dann wurde der Stapel mit einer großen Glasplatte bedeckt, die mit einem Gewicht von 750 g beschwert wurde.

Der Transfer-Puffer SSC wurde durch die Kapillarkräfte durch das Gel gesaugt, dabei übertrug er die RNA aus dem Gel auf die Membran. Nach 20 Stunden wurde der Transfer abgebrochen. Die Membran musste nun vor Austrocknung geschützt werden und wurde auf ein mit 20 x SSC getränktes Whatman-Papier gelegt, um mit Hilfe eines UV-Crosslinkers (Hoefer™ UVC 500 UV Crosslinker, Amersham Biosciences Europe GmbH,

Freiburg) die RNA auf der Nylonmembran zu fixieren. Zur späteren Größenzuordnung der Banden wurden unter UV-Licht die 18 S und 28 S rRNA–Untereinheiten markiert.
Der Filter wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder in 20 x SSC in Saranfolie (Dow Chemical, Midland, Michigan) geschützt bei +4°C im Dunkeln gelagert.

### 3.7.3 Herstellung der Digoxigenin(DIG)-markierten cDNA-Einzelstrang-Sonden

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die exponentielle Amplifikation von DNA-Nukleotidsequenzen *in vitro*. Die Reaktion gliedert sich in drei unterschiedliche Temperaturschritte. Zuerst erfolgt eine Denaturierung der zu vervielfachenden Nukleotidsequenz, danach ein Anlagern der sequenzspezifischen Oligonukleotide an die komplementäre Sequenz („Annealing“) und abschließend eine Nukleotidkettenverlängerung („Elongation“).
Zuerst wurde mit Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit einem mRNA Strang als Matrize der gesamte komplementäre DNA-Strang (cDNA) hergestellt. Darauf folgte eine Standard-PCR, in der das zuvor gebildete Produkt, ein cDNA/RNA-Doppelstrang, als Matrize diente. Mit spezifischen Primern wurde ein ca. 200 bp langer Abschnitt innerhalb der Ziel-Sequenz hoch amplifiziert. In einem dritten Schritt wurden die Sonden schließlich markiert. Hierfür wurde 1 µl des spezifischen PCR-Produkts in eine neue PCR-Reaktion eingesetzt, bei der DIG (Digoxigenin-markiertes)-dUTP anstatt des dTTP direkt in die cDNA eingebaut wurde. In der Nukleotidmischung war ein Drittel des dTTP durch DIG-dUTP ersetzt. Das zweite Besondere an diesem Schritt war, dass nur ein Primer eingesetzt wurde. Durch diese asymmetrische PCR-Methode konnte, unter ausschließlicher Verwendung des Rückwärts-Primers, eine konzentrierte Einzelstrang-cDNA hergestellt werden. Sie war komplementär zu den m-RNA-Transkripten auf der Membran, und deswegen hoch spezifisch.

*Polymerase-Kettenreaktion revers-transkribierter Gesamt-RNA (RT-PCR)*

Als erstes wurde mit Hilfe des 1$^{st}$ Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) die RNA revers transkribiert, um einen komplementären DNA-Einzelstrang herzustellen. Folgende Komponenten wurden in einem sterilen verschließbaren 0,5 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg) gemischt:

2 µl 10 x Reaktions Puffer,

4 µl 25 mM $MgCl_2$,

2 µl Desoxynukleotid Mischung,

2 µl Oligo-p$(dT)_{15}$ Primer,

1 µl Rnase Inhibitor,

0,8 µl AMV Reverse Transkriptase und

8,2 µl Gesamt-RNA.

Die RNA wurde 15 min bei +65°C denaturiert und 5 min auf Eis gestellt, bevor sie der Reaktion zugefügt wurde, um sicher zu gehen, dass sie in Primärstruktur vorliegt. Dann wurde die Probe kurz durchmischt und im Thermocycler (Biometra, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) bei diesem Programm inkubiert: 10 min bei +25°C, 60 min bei +42°C , 5 min bei +99°C und am Ende 5 min bei +4°C.

*Standard-PCR*

Die Amplifizierungsmischung wurde in einem sterilen 0,5 ml Safe Lock Reaktionsgefäß (Eppendorf) durch Zugabe der Reagenzien in der folgenden Reihenfolge hergestellt:

40,75 µl Aqua dest.,

5 µl 10 x Puffer,

1 µl NTP,

1 µl Template DNA,

1 µl Vorwärts-Primer,

1 µl entsprechender Rückwärts-Primer und

0,25 µl Taq Polymerase.

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

*Sequenzierung*

Neben der Identitätskontrolle der in der PCR generierten cDNA anhand ihrer elektrophoretischen Auftrennung in Bezug zur Molekülgröße wurde eine Sequenzanalyse mit dem ABI Prism® Big Dye™ Terminator Kit (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Zuerst fand eine Sequenzierungs-PCR der aufgereinigten cDNA statt:

6,7 µl Aqua dest.,

4 µl Big Dye Terminator,

4 µl HAT (Genpak),

5 µl Probe, 0,3 µl Vorwärts-Primer und

0,3 µl Rückwärts-Primer wurden vermischt.

Das PCR-Programm bestand aus 30 Zyklen: Je 2 min bei 95°C, 30 s bei 95°C, 10 s bei 50°C und 4 min bei 60°C. Anschließend erfolgte eine Sequenzierungsreinigung mit dem DyeEx Spin Kit 250 (Qiagen, Hilden. Im Anschluß daran wurde es entweder bei –20°C gelagert oder direkt in das Servicelabor (Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Sequenzanalyse gegeben.

*DIG-PCR*

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

32,25 µl Aqua dest.,

5 µl 10 x Puffer,

5 µl PCR-Mischung,

2 µl Rückwärts-Primer,

5 µl Template DNA und

0,75 µl Enzymmischung.

Anschließend wurde die Mischung im Thermocycler unter diesen Bedingungen weiterverarbeitet: 3 min bei +95°C vor dem ersten Zyklus, dann 40 Zyklen mit jeweils 1 min bei +95°C Denaturierung, 1min bei +59°C Annealing und 2 min Elongation bei +72°C. Der letzte Elongationsschritt wurde 10 min bei 72°C durchgeführt. Nach der Amplifikation wurden 5 µl des PCR-Ansatzes durch 2% Agarosegelelektrophorese analysiert. Wegen des mehrfachen Einbaus von DIG-dUTP während des PCR-Prozesses war das Molekulargewicht im Vergleich zum unmarkierten Produkt erhöht.

*PCR-Aufreinigung*

Bevor das markierte spezifische PCR-Produkt als Hybridisierungssonde verwendet werden konnte, wurde es mit Hilfe des QIA Quick PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) von unspezifischen Nebenprodukten gereinigt. Anschließend wurde ein Aliquot von 5 µl in der

Gel-Elektrophorese analysiert. Die fertige Hybridisierungssonde wurde in ein 15 ml Röhrchen mit 10 ml Hybridisierungspuffer (DIG Easy-Hyb, Roche Diagnostics, Mannheim) pipettiert und bis zum weiteren Gebrauch bei –20°C aufbewahrt.

### 3.7.4 Hybridisierung

Diese Methode diente zum Nachweis spezifischer Transkripte aus der Gesamt-RNA der Leberproben.

Zunächst wurde die Nylonmembran vorsichtig in ein Hybridisierungsröhrchen mit 10 ml Hybridisierungspuffer (DIG Easy-Hyb, Roche Diagnostics, Mannheim) überführt und 1 h bei +50°C im Hybridisierungsofen (Hybridisierungsofen / Shaker, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) prähybridisiert. Die in 10 ml Puffer gelöste Hybridisierungssonde wurde 10 min bei +68°C im Wasserbad denaturiert. Nach Ablauf der Prähybridisierungszeit wurden die 10 ml Hybridisierungspuffer verworfen und die in Hybridisierungspuffer gelöste Sonde in das Röhrchen gegeben. Die Hybridisierung fand unter ständiger Rotation bei +50°C über Nacht statt.

Der Hybridisierungspuffer enthielt noch ungebundene DIG-markierte Proben und konnte deswegen in weiteren Hybridisierungsexperimenten wiederverwendet werden. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Sonden bei –20°C eingefroren. Danach wurde die Membran zweimal 15 min bei Raumtemperatur in 2 x Waschpuffer (2 x SSC + 0,1 % SDS) und zweimal 15 min bei +68°C in 0,5 x Waschpuffer (0,5 x SSC + 0,1 % SDS) gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA zu beseitigen.

### 3.7.5 Detektion der DIG markierten Nukleinsäuren

Die Detektion wurde mit dem DIG Wasch und Block Puffer Set (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Bei dem DIG-System wird das Steroid Digoxigenin verwendet, welches über einen Brückenarm an der Sonde gebunden ist. An die markierte Sonde bindet ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Digoxigenin Antikörper. Das Signal wird durch Chemolumineszenz erzeugt. Die zur Chemolumineszenz-Detektion erforderlichen drei Schritte wurden bei Raumtemperatur in einer sauberen Plastikschale durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Membran 60 min in Blockierungslösung leicht geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Anti-DIG Antikörper (Anti digoxigenin-AP conjugate, Fab fragmente, Roche, Mannheim) wurde 1:20.000 in 50 ml Blockierlösung verdünnt und die Membran weitere

30 min in der Antikörperlösung inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte nach einer zweiminütigen Äquilibrierung der Membran in Detektions-Puffer die Zugabe des Substrates CDP (CDP-Star™ready to use, Roche, Mannheim) zur Signalerzeugung. Das Chemolumineszenz-Signal konnte mit dem Phospho-Imager (Fluor-S™ MultiImager, BioRad, München) gemessen werden. Die Belichtungszeiten lagen hierbei zwischen 1min und 20 min. Der Ladungsgehalt pro Spur, den man an den rRNA Banden mit Ethidiumbromid bestimmen konnte, (und Hybridisierungen mit Albumin als Haushaltsprotein) wurden mit den Ergebnissen verglichen und bei unterschiedlichen Ladungen der Wert entsprechend korrigiert.

*Rehybridisierung*

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

### 3.8 Statistik

Für jedes Experiment zu jedem Zeitpunkt wurden die Ergebnisse von 3-6 Tieren gesammelt. Alle Parameter, einschließlich der Lebergewichte und der densitometrischen Auswertung der Signale, wurden durch Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung dargestellt. Auf Signifikanz wurde mit Hilfe der one-way analysis of variance (ANOVA) und Bonferroni`s post test geprüft. Als signifikant eingestuft wurden p-Werte <0,05.

# 4. Ergebnisse

## 4.1 Operationsletalität

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

## 4.2 Bestimmung der Regeneration und Atrophie

Zur Beurteilung der regenerativen und atrophierenden Prozesse wurden die Lebersegmentgewichte bestimmt und in Relation zum Körpergewicht gesetzt.

Bereits makroskopisch war im Verlauf in den nicht-ligierten Lappen des PBL-Modells eine progressive Größenzunahme zu beobachten. Gleichzeitig imponierten die ligierten Lappen durch eine rasch fortschreitende Atrophie. Nach ca. 72 h wurde eine 50%ige Gewichtsreduktion des ligierten Anteils gesehen. Nach 14 Tagen waren nur noch ca. 18% des ursprünglichen Lebervolumens vorhanden. Das Gewicht der regenerierenden Lappen nach PBL verdoppelte sich innerhalb der ersten 96 Stunden. Bis zum 14. Tag wurde lediglich ein weiterer Zuwachs von 23% festgestellt. Durch diese balancierte Schrumpfung auf der einen Seite und das kompensatorische Wachstum auf der anderen Seite blieb das Gesamtlebergewicht zu jedem Zeitpunkt auf dem Niveau der scheinoperierten Tiere oder unterschritt dieses nur geringfügig (Abb.1).

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

Im Vergleich zwischen PH und PBL zeigten sich unterschiedliche Anstiege nach 24 und 48 Stunden mit einer schnelleren Antwort nach PH (Abb.1). Diese Unterschiede erreichten keine statistische Signifikanz. Die Kinetik der Lebergewichtsreduktion in den portal ligierten Lappen zeigt, dass der maximale Gewebsverlust zwischen 48 und 96 Stunden nach operativem Eingriff stattfand. Nach 6 Stunden stellten wir jedoch eine geringere Reduktion in dem Lebervolumen der ligierten Lappen fest.

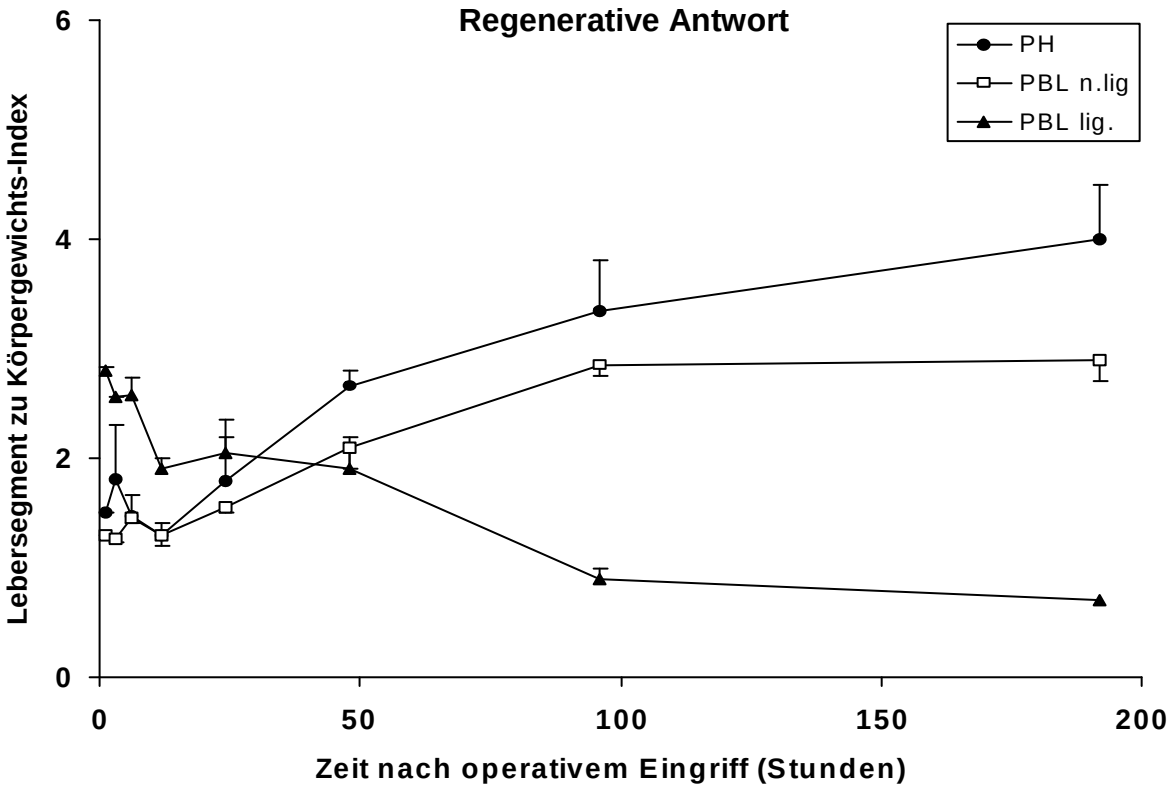



*Abb. 1 Vergleich der regenerativen Antwort nach partieller Hepatektomie (PH) und Pfortaderastligatur in den ligierten (PBL lig) und nicht-ligierten Lappen (PBL n.lig). Die Lebersegmentgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht wurden von allen Tieren nach PH und PBL in dem Zeitraum zwischen 1 h und 192 h quantifiziert. Die Werte repräsentieren Mitttelwerte +/− SEM.*

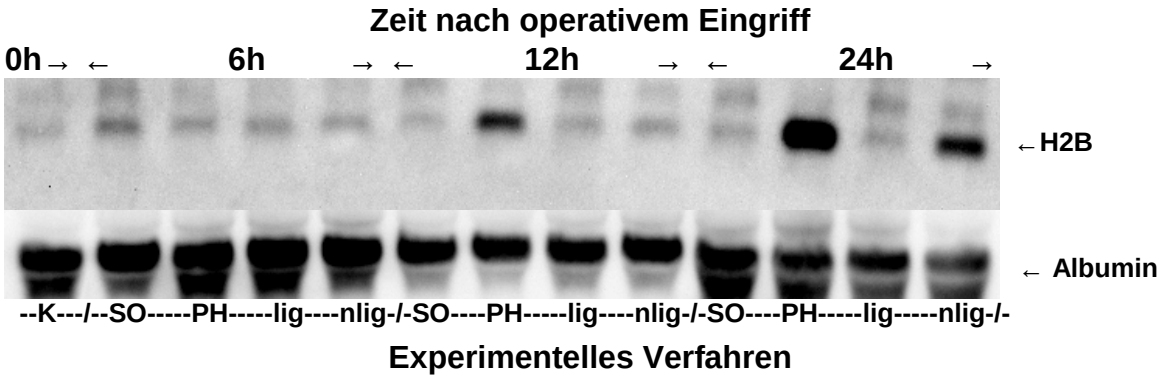
### 4.3 Expression des Histon-Protein 2B

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

Die beiden Modelle wiesen in den Spitzenwerten ihrer H2B-mRNA deutliche Unterschiede auf. Ein erster Anstieg der H2B-mRNA im PH-Modell konnte bereits nach 12 Stunden festgestellt werden (5,1 + / –1,4-fach gegenüber der Kontrolle). Die maximale replikative Aktivität nach PH fanden wir 24 Stunden postoperativ, nach 96 h waren die Werte auf ein basales Niveau zurückgekehrt. Im Vergleich dazu war nach PBL in den nicht-ligierten Lappen nach 12 Stunden noch keine Induktion der H2B-Expression nachweisbar. Die erste Signalintensität der H2B-mRNA 24 Stunden nach PBL in den regenerierenden Lappen war weniger ausgeprägt als nach PH (5,5 + / –1,7-fach versus 15,6 + / – 4,0-fach nach PH;

P<0,05) (Abb.), der höchste Anstieg wurde nach 48 Stunden erreicht. 96 Stunden postoperativ konnten wieder Normalwerte gemessen werden.

**A**



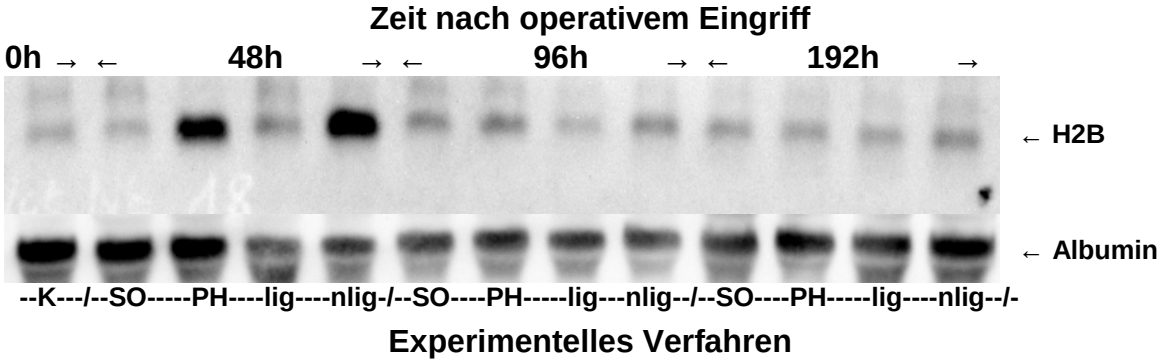




*Abb. 2 (A) Repräsentativer Northern Blot von Histon Protein H2B- und Albumin-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 12, 24, 48, 96 und 192 h) nach Scheinoperation (SO), Partieller Hepatektomie (PH), Pfortaderastligatur in den ligierten (lig) und nicht-ligierten (nlig) Lappen. Im Northern Blot wurden Gesamt-RNA Proben (10 µg) eingesetzt, mit DIG-markierter cDNA hybridisiert, und die Chemolumineszenz-Signale detektiert und analysiert wie in Kapitel 3 beschrieben.*

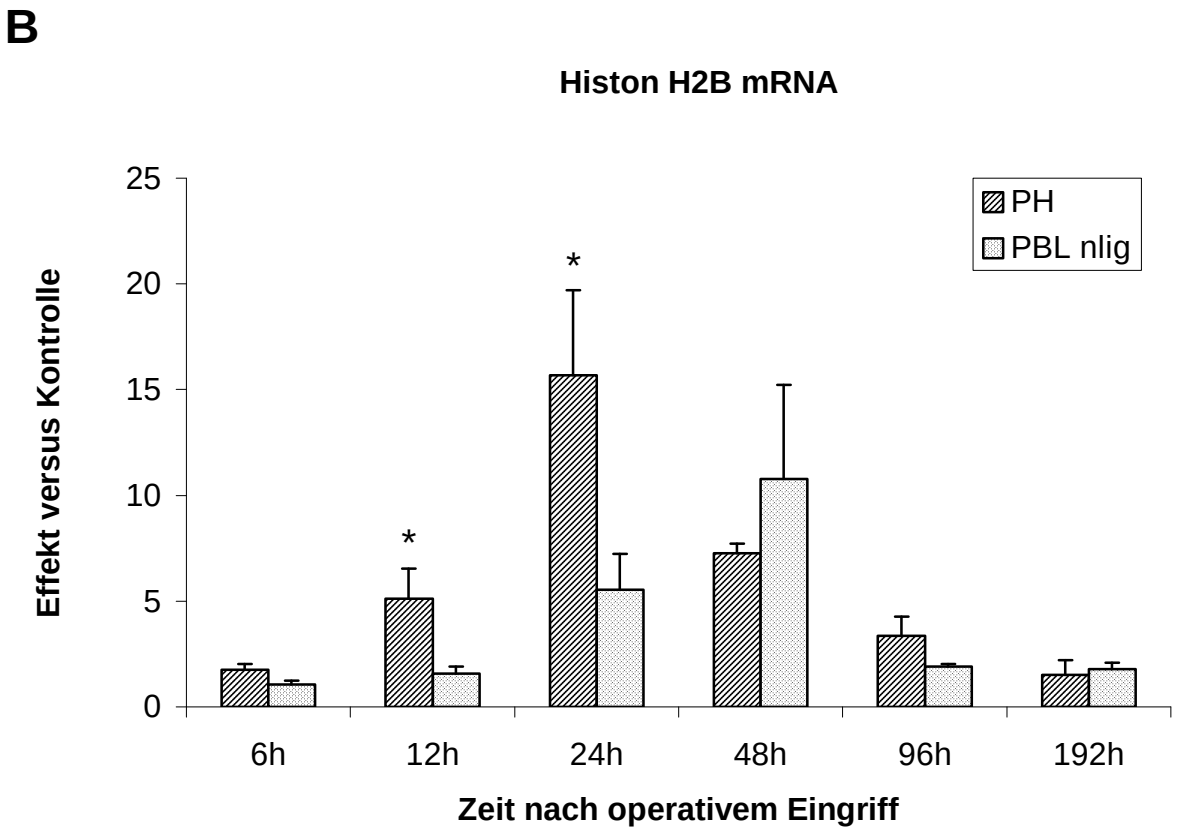



*Abb. 2 (B) Densitometrische Analysen der Blots von Partieller Hepatektomie (PH) und PBL in den nicht-ligierten Lappen (PBL nlig). Die Werte von H2B wurden nach Re-Hybridisierung mit dem jeweiligen Albumin Signal normalisiert. Das mRNA-Niveau der unbehandelten Kontrolltiere (K) wurde als 1 betrachtet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

### 4.4 Expression von Egr-1

Um die individuelle Rolle der portalen Mehrbelastung als einen frühen Trigger-Mechanismus in der Induktion der IEG Expression *in vivo* zu untersuchen, haben wir die Egr-1-spezifischen Transkripte nach PH und PBL verglichen. Die letztgenannte Prozedur führt zu vergleichbaren hämodynamischen Bedingungen wie nach PH, jedoch ohne akuten Gewebsverlust. Die Werte wurden jeweils mit dem Gehalt der Albumin mRNA, der nur kleinste Unterschiede in den in diesem Versuch angewandten Verfahren aufwies, als Referenzwert verrechnet (Abb.2-6).

In dem Lebergewebe der Kontroll-Tiere konnte Egr-1 mRNA nachgewiesen werden. Die Egr-1 spezifischen Transkripte ließen eine deutliche Induktion 1 Stunde nach PH und PBL in den nicht-ligierten Lappen erkennen. Densitometrische Analysen zeigten einen spezifischen Anstieg gegenüber der Kontrolle von 16,6 + / – 7,2-fach ($P < 0,001$) nach PH und von 7,9 + / – 2,7-fach ($P < 0,05$) nach PBL in den nicht-ligierten Lappen (Abb. 3). Die

Unterschiede zwischen beiden Verfahren waren statistisch signifikant (P < 0,05). Zu diesem Zeitpunkt war kein Anstieg von Egr-1 mRNA nach Scheinoperation oder in den ligierten Lappen nach PBL sichtbar, wobei die Expressionsmuster in allen untersuchten Verfahren erheblich variierten. Nach 2 Stunden blieb die Signalintensität der Egr-1 spezifischen Transkripte nach PH und PBL in den ligierten Lappen verstärkt (Abb. 3). Sowohl nach PH als auch nach PBL in den nicht-ligierten Lappen blieben die Egr-1 mRNA Niveaus bis 3 Stunden postoperativ erhöht, und fielen nach 6 Stunden auf die Ausgangswerte zurück (Abb. 3, 6(A)). Interessanterweise konnte eine vorübergehende Induktion von Egr-1 mRNA nach PBL in den atrophierenden Lappen festgestellt werden, die in der 3. bis 6. postoperativen Stunde anstieg und bis 24 Stunden nach operativem Eingriff anhielt (nicht gezeigt). Auch die Scheinoperation beeinflusste die Basalwerte der Egr-1 mRNA Expression, führte aber nicht zu signifikanten Effekten. Nach 3 Stunden wurden keine signifikanten Unterschiede in der Egr-1 mRNA Expression gefunden.

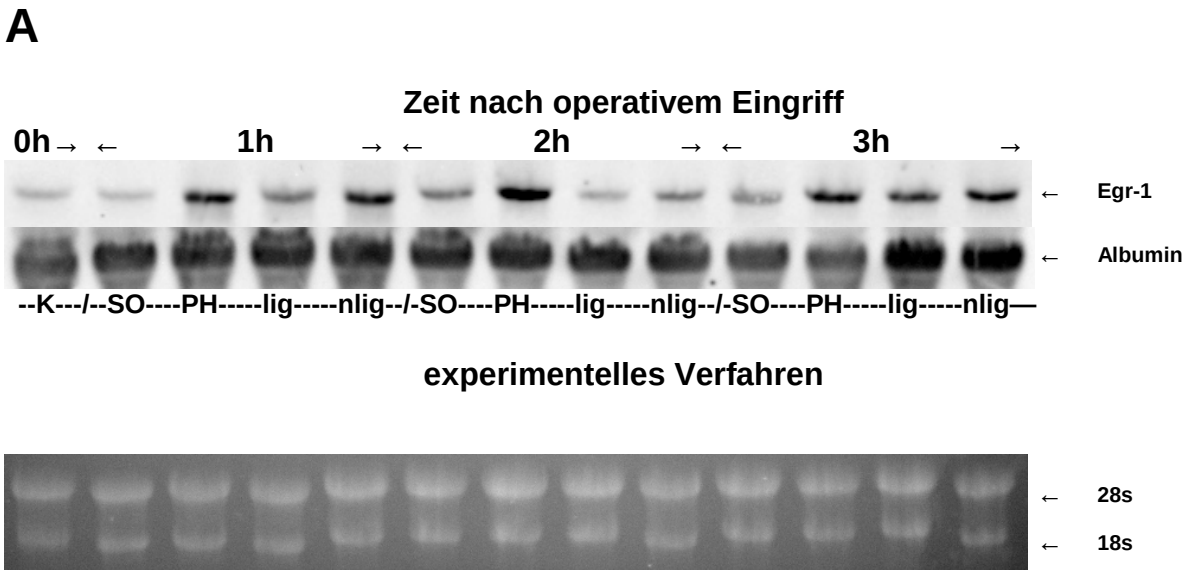



*Abb. 3 (A) Repräsentativer Northern Blot von Egr-1 mRNA in unbehandelten Kontrollen (K) und 1, 2 und 3 h nach Scheinoperation (SO), partieller Hepatektomie (PH) und Pfortaderastligatur in den ligierten (lig) und nicht-ligierten (nlig) Lappen. Die jeweiligen Ergebnisse der Re-Hybridisierung mit Albumin und die Darstellung der 18S- und 28S-rRNA als Lade-und Qualitätskontrolle sind unten gezeigt.*

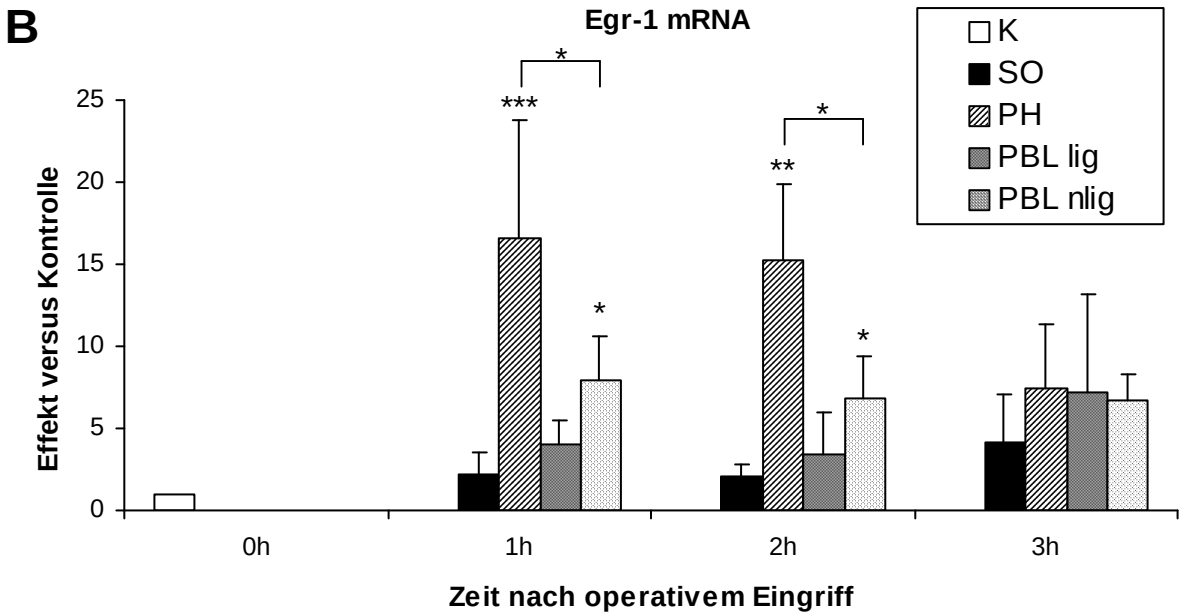



*Abb. 3 (B) Ergebnisse der densitometrischen Auswertungen der Egr-1 Blots. Jeder Wert wurde mit dem entsprechenden Albumin-Signal normalisiert. Die Ordinate zeigt das Niveau der Egr-1 mRNA Expression gegenüber Kontrolltieren, für die der Wert 1 festgelegt wurde. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/– SEM. *P<0,05; **P <0,01; ***P<0,001 versus SO.*

### 4.5 Expression von PAI-1

PAI-1 ist der wichtigste physiologische Inhibitor von Plasminogen-Aktivatoren (Seki et al. 1996). Die proteolytische Kaskade, die Plasminigen-Aktivatoren und Plasmin einschließt, und PAI-1 als ein Regulator dieses Systems, scheinen eine wichtige Funktion in Gewebe-regenerativen Prozessen zu haben (Thornton et al. 1994).

Die Expressionsmuster von PAI-1 waren vergleichbar mit denen von Egr-1, da sie auch eine frühe spezifische Induktion eine Stunde postoperativ sowohl in der Restleber nach PH als auch in den hyperperfundierten Lappen nach PBL zeigten. In dem letztgenannten Verfahren wies die PAI-1 Expression jedoch eine hohe Variabilität auf. Im Gegensatz zu Egr-1 waren nach einer Stunde keine signifikanten Unterschiede zwischen PH und PBL nachzuweisen. Doch nach 6 Stunden und nach 12 Sunden konnten wir eine signifikant höhere PAI-1 Expression nach PH verglichen mit PBL in den nicht-ligierten Lappen feststellen.

Nach PH und nach PBL in den nicht-ligierten Lappen blieben die PAI-1 Transkriptionsniveaus zunächst bis zur 3. Stunde erhöht, fielen ab der 6. Stunde kontinuierlich ab und erreichten nach 192 Stunden wieder normale Werte, wobei nach PH jeweils stärkere Signale zu beobachten waren (Abb. 6(B)). Wie bereits oben für Egr-1 beschrieben, fanden wir auch eine in der 3. postoperativen Stunde einsetzende spezifische Hoch-Regulation von PAI-1-

mRNA in den ligierten Lappen, die nach 24 Stunden auf basale Werte zurückfiel. Die Scheinoperation hatte zu keinem Zeitpunkt einen Effekt auf die PAI-1-mRNA Niveaus. Die Kontrollen ließen nur eine schwache Bande erkennen, die kaum vom Hintergrund zu unterscheiden war.

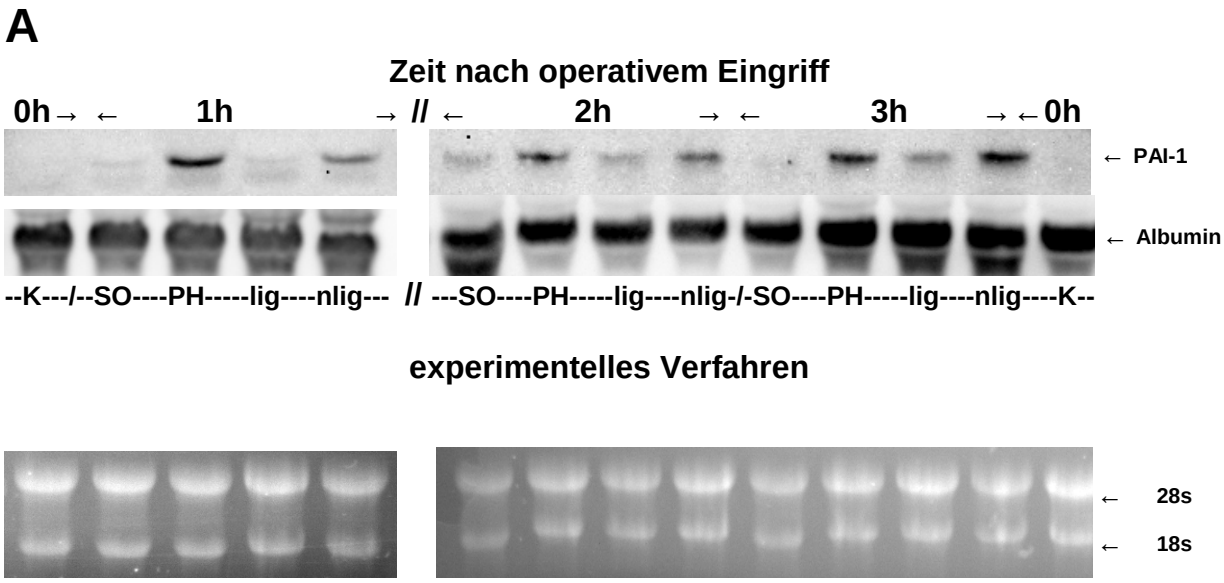



*Abb. 4 (A) Northern Blots von PAI-1 mRNA 1, 2 und 3 h nach Scheinoperation (SO), partieller Hepatektomie (PH) und Pfortaderastligatur (lig, ligierte Lappen; nlig, nicht-ligierte Lappen). Unbehandelte Kontrollen sind links und rechts am Rand platziert. Das Ergebnis der Re-Hybridisierung mit Albumin und die 18S- und 28S-rRNA Untereinheiten als Ladekontrolle sind unten gezeigt.*

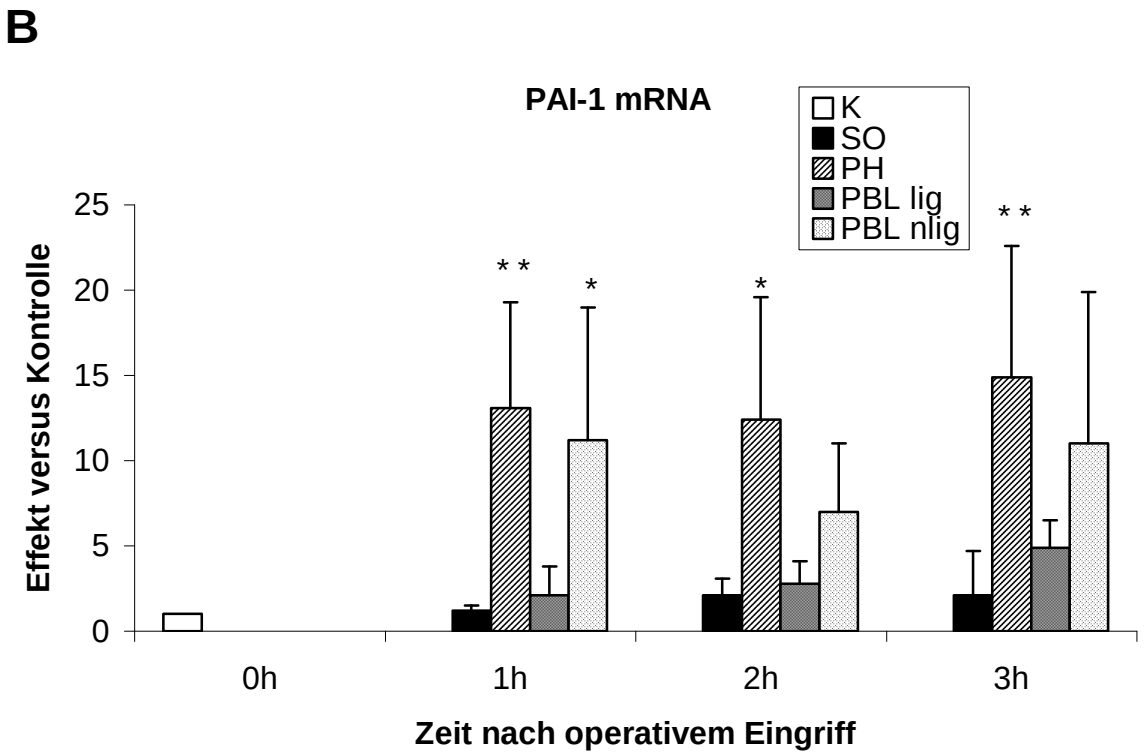



*Abb. 4 (B) Quantifizierung der PAI-1 mRNA durch densitometrische Analysen. Jede PAI-1 spezifische Bande wurde mit dem jeweiligen Albuminsignal normalisiert und als Effekt gegenüber der Kontrolle berechnet (Ordinate). Für die Kontrolltiere wurde der Wert 1 festgelegt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/− SEM. *P<0,05; **P<0,01*

### 4.6 Expression von PRL-1

Es wird angenommen, dass Egr-1 eine wichtige Rolle in der Aktivierung von PRL-1 spielt, indem es in frühen Stadien der Regeneration an den P1 Promotor bindet (Peng et al. 1999). PRL-1 ist allgemein charakterisiert als eine nukleäre Protein-Tyrosin Phosphatase, der eine Bedeutung im Zellwachstum zukommt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal versucht, die physiologischen Bedingungen zu untersuchen, die möglicherweise die mRNA Expression von PRL-1 während der Leberregeneration beeinflussen. PRL-1 spezifische Transkripte wiesen in Kontroll-Lebergewebe eine schwache Signalintensität auf. Eine Stunde und 2 Stunden postoperativ konnten wir einen unspezifischen Anstieg von PRL-1 mRNA nach Scheinoperation, PH und PBL in den ligierten und in den nicht-ligierten Lappen im Vergleich zu Kontroll Lebergewebe nachweisen. (Abb. 5). Nach 3 Stunden wurde eine spezifische Hochregulation von PRL-1 Transkripten nach PH und PBL in den nicht ligierten Lappen sichtbar. Nach PH war PRL-1 13,3 + / – 4,4-fach induziert gegenüber der Kontrolle. Nach Scheinoperation zeigte sich eine 6 + / – 1,4-fache Induktion ($P < 0,05$). Nach PBL in den nicht-ligierten Lappen war ein 10,7 + / – 4,9-facher

Anstieg gegenüber der Kontrolle feststellbar (P < 0,05 versus Scheinoperation) (Abb. 5). Abbildung 6(C) zeigt das Niveau der PRL-1 mRNA nach PH und PBL in den nicht-ligierten Lappen im zeitlichen Verlauf. In beiden Modellen blieben die PRL-1 Transkripte zu allen untersuchten Zeitpunkten in einem biphasischen Verlauf, mit Maximalwerten um die 3. und 24. Stunde, bis zu 192 Stunden postoperativ erhöht. Nach Scheinoperation und PBL in den ligierten Lappen verblieb das Niveau der PRL-1 mRNA von der 3. postoperativen Stunde an auf basalen Werten.

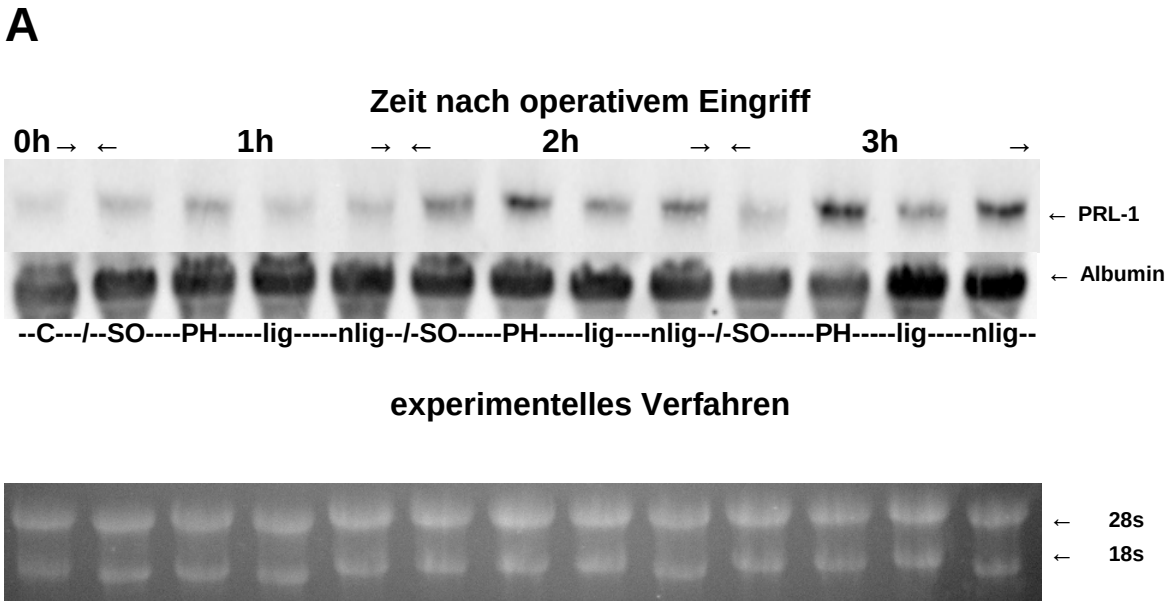



*Abb. 5(A) PRL-1 mRNA Expression in Kontrollen (K) und 1, 2 und 3 h nach Scheinoperation (SO), partieller Hepatektomie (PH) und Pfortaderastligatur (lig, ligierte Lappen; nlig, nicht-ligierte Lappen). Erste Re-Hybridisierung des Northern Blots aus Abb. 3. Die Resultate der Re-Hybridisierung mit Albumin und die 18S- und 28S r-RNA, um die Integrität der geladenen RNA zu prüfen, sind unten gezeigt.*

**B**

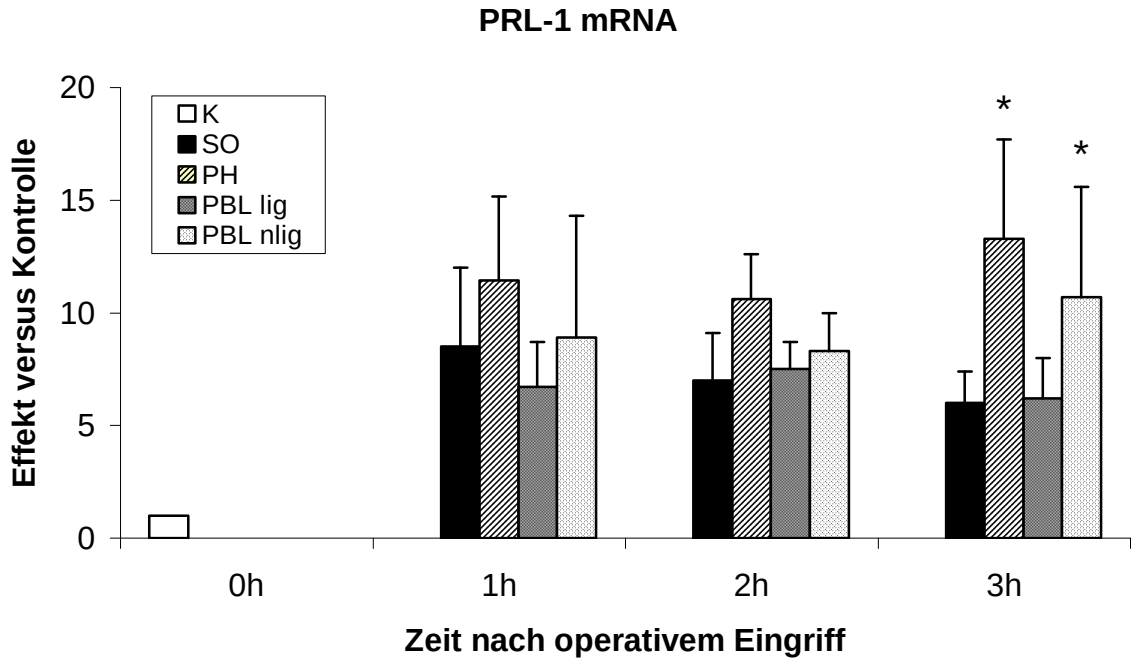



*Abb. 5 (B) PRL-1 mRNA Expressionsniveaus gegenüber unbehandelten Kontrolltieren. Für die Kontrolltiere wurde der Wert 1 festgelegt. Die Ergebnisse der Dichtemessungen wurden mit dem jeweiligen Albumin Signal korrigiert. Jeder Balken repräsentiert Mittelwert +/− SEM. *P<0,05 gegenüber SO.*

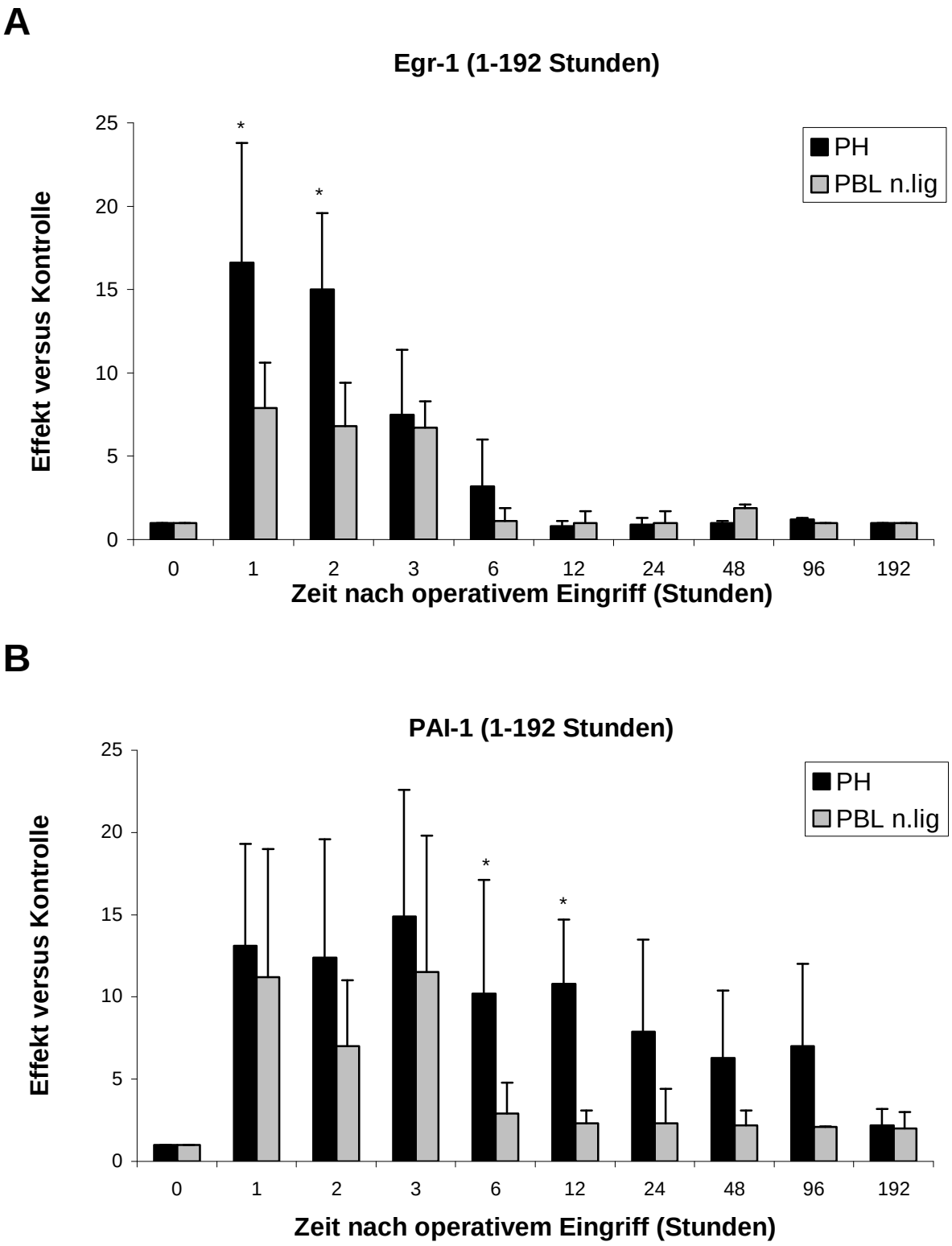



*Abb. 6 Quantifizierung der Egr-1 (A) und PAI-1 (B) Langzeit mRNA Niveaus durch Northern Blot Analysen von 1 h bis 192 h (=8Tage) nach partieller Hepatektomie (PH) in direktem Vergleich zu den nicht-ligierten Lappen (PBL n.lig) nach Pfortaderastligatur. Jeder Balken repräsentiert Mittelwert +/− SEM des jeweiligen mRNA-Gehaltes gegenüber denen der Kontrollen, welche als 1 betrachtet wurden. Die Densitometrie-Werte wurden mit ihrem dazugehörigen Albumin-Signal normalisiert. *P<0,05 (PH gegen PBL n.lig)*

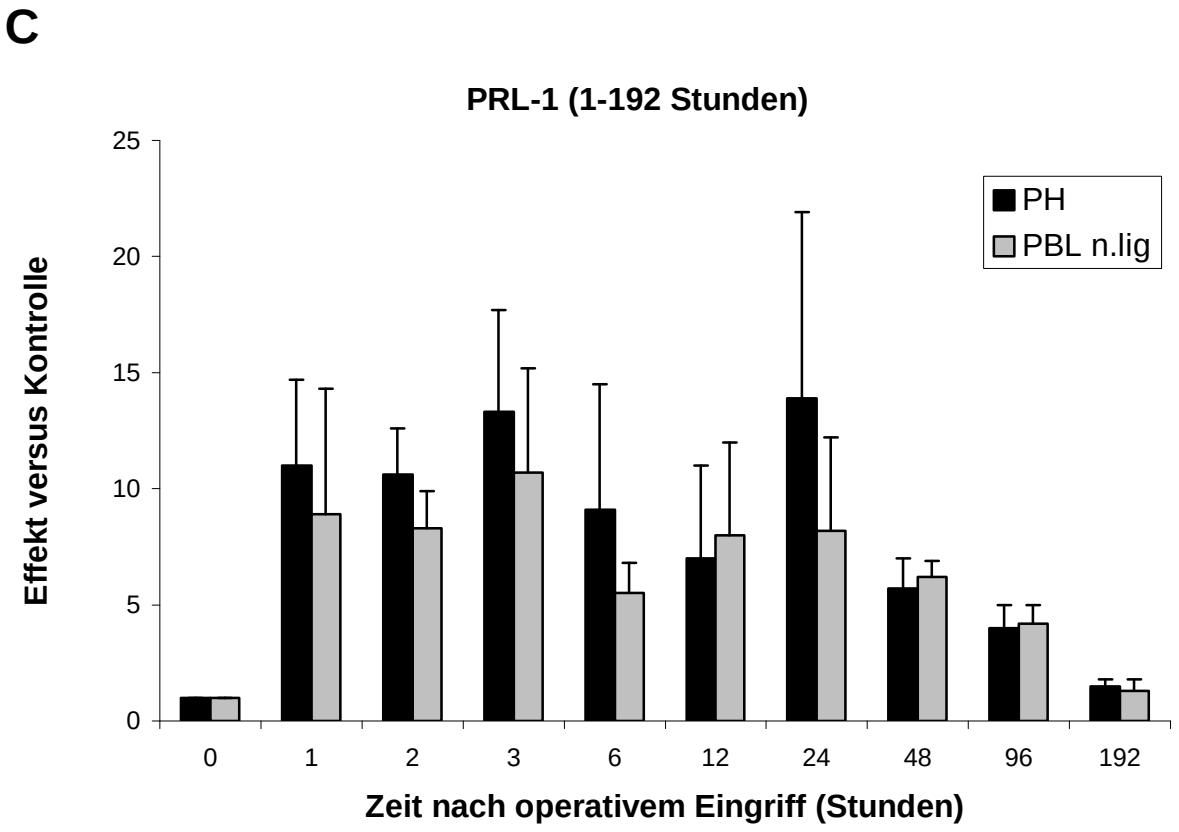



*Abb. 6 (C) Quantifizierung der PRL-1 Langzeit mRNA Niveaus durch Northern Blot Analysen von 1 h bis 192 h (=8Tage) nach partieller Hepatektomie (PH) in direktem Vergleich zu den nicht-ligierten Lappen (PBL n.lig) nach Pfortaderastligatur. Jeder Balken repräsentiert Mittelwert +/− SEM des jeweiligen mRNA-Gehaltes gegenüber denen der Kontrollen, welche als 1 betrachtet wurden. Die Densitometrie-Werte wurden mit ihrem dazugehörigen Albumin-Signal normalisiert. *P<0,05 (PH gegen PBL n.lig)*

### 4.7 Expression von Albumin und GAPDH

Das Niveau der Albumin-spezifischen Transkripte wies keine Unterschiede zwischen PH, PBL und Scheinoperation auf. Selbst in Stadien von progressiver Leberatrophie nach PBL in den ligierten Lappen, war kein Abfall der Albumin-mRNA aufzuzeigen. Wir fanden einen leichten Rückgang gegenüber der Kontrollgruppe 24 Stunden nach allen operativen Eingriffen (Abb 7).

GAPDH-mRNA war spezifisch induziert 24 und 48 Stunden nach PH (1,6- und 1,8-fach; P<0,05 gegenüber Scheinoperation). Zu diesen Zeitpunkten sah man auch nach PBL in den nicht-ligierten Lappen einen kleineren, jedoch nicht signifikanten Anstieg. In den portaldeprivierten Lappen nach PBL waren keine signifikanten Veränderungen der GAPDH-mRNA Expression im Vergleich zur Scheinoperation festzustellen.

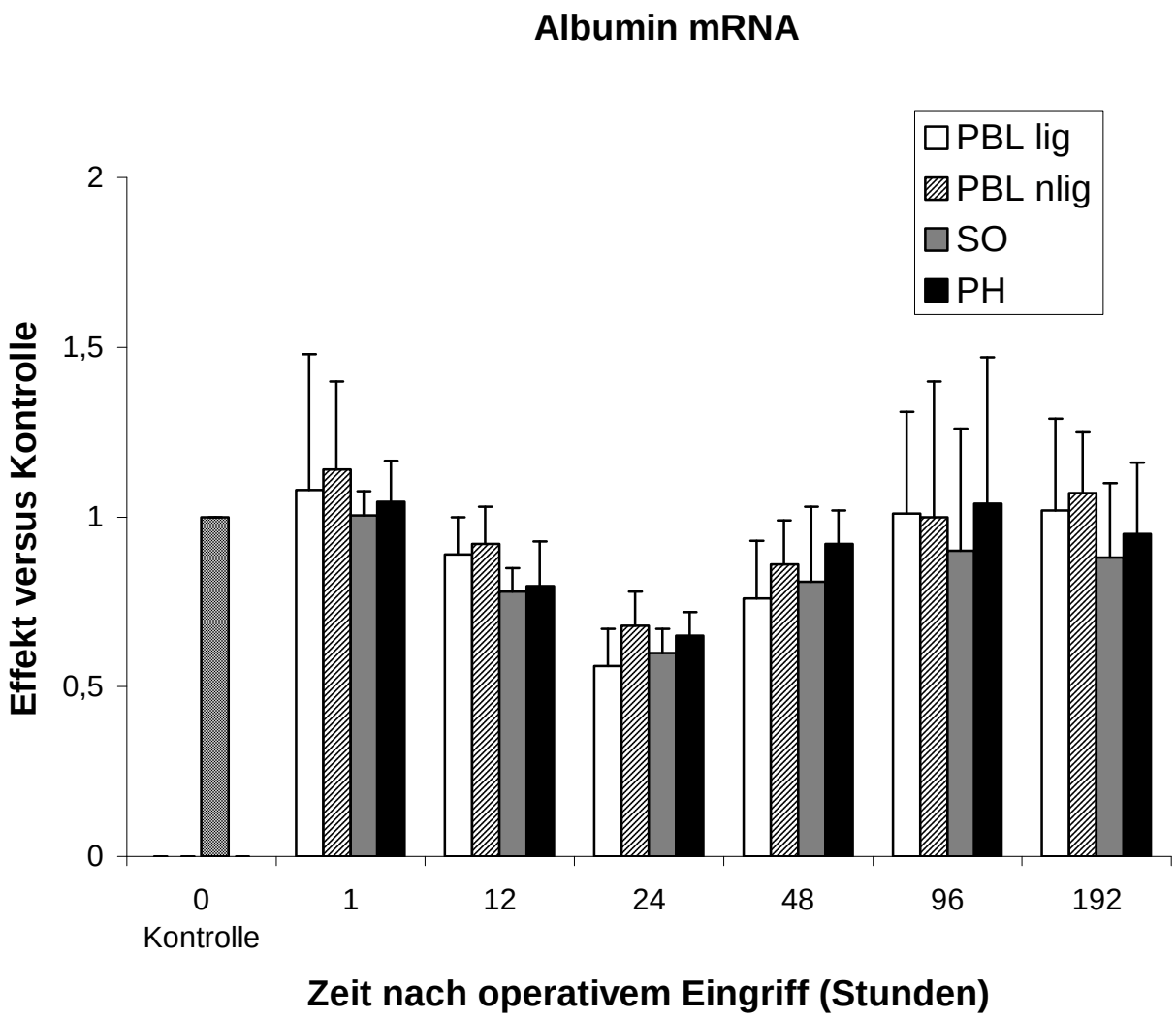



*Abb. 7 Densitometrische Analysen der Northern Blots für Albumin zu verschiedenen Zeitpunkten nach Pfortaderastligatur in den ligierten (PBL lig) und nicht-ligierten Lappen (PBL nlig), partieller Hepatektomie (PH) und Scheinoperation (SO). Die Dichtemessungen der Albumin mRNA wurden mit den entsprechenden 18S-rRNA Signalen normalisiert. Für die Kontrolltiere wurde der Wert 1 festgelegt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- SEM, (n=5).*

## 4.8 Glukosehomöostase

Der Mittelwert des Glukose Gehaltes im Serum der Kontroll-Tiere wurde mit 222,5 +/–17 mg/dl gemessen. Nach Scheinoperation kam es zu keinem untersuchten Zeitpunkt zu signifikanten Veränderungen der Serum-Glukose. PH führte zu einem signifikanten Absinken des Serum-Glukose Spiegels auf 127 +/–3 mg/dl nach einer Stunde (P<0,05 gegenüber Scheinoperation) und 99 +/–15 mg/dl nach 6 Stunden (P<0,01 gegenüber PBL und P<0,001 gegenüber Scheinoperation). Nach PBL zeigte sich ein geringerer Abfall auf 147 +/–18 mg/dl nach 12 Stunden und auf 176 +/–26 mg/dl nach 48 Stunden (Abb.8).

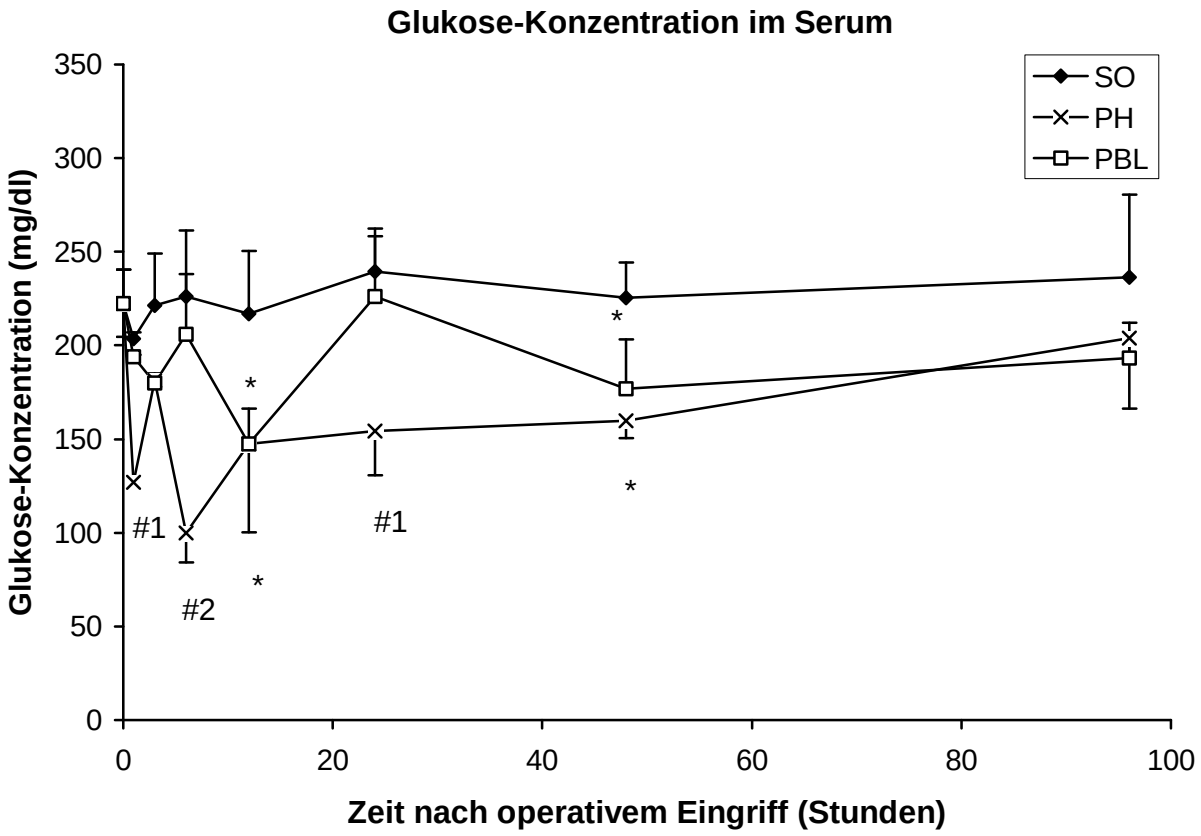



*Abb. 8 Glukose-Konzentration im Serum zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 1 und 96 h nach Pfortaderastligatur (PBL), partieller Hepatektomie (PH) und Scheinoperation (SO). Die Werte wurden als Mittelwerte +/− SD ausgedrückt. *P<0,05 versus SO; #1, P<0.05 versus SO, PBL; #2,P<0.01 versus PBL, P<0,001 versus SO; n = 5.*

# 5. Diskussion

## 5.1 Diskussion der Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden die Northern-Blot-Hybridisierungen im Gegensatz zur standardmäßig verwendeten radioaktiven $^{32}$Phosphor-Markierung mit Digoxigenin-Methoden in Anlehnung an die Arbeiten von Höltke und Sato durchgeführt (Holtke et al. 1990, Sato et al. 1993). Die Methode weist eine Reihe wichtiger Vorteile gegenüber der $^{32}$Phosphor-Markierung auf wie eine fehlende Strahlenbelastung, die einfache Entsorgung der Abfälle, geringere Kosten, die Langzeitstabilität und die Möglichkeit, die markierten Sonden wiederzuverwenden. Die zunächst aufgetretenen starken unspezifischen Hintergrundphänomene konnten durch Modifizierungen der Protokolle eliminiert werden, so dass die Methode hinsichtlich ihrer Sensitivität als mindestens gleichwertig gegenüber radioaktiven Methoden angesehen wird (Engler-Blum et al. 1993, Holtke et al. 1992, Sato et al. 1993).

Bei Northern-Hybridisierungen sollen einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle detektiert werden. Bei den üblicherweise gebrauchten Doppelstrang-DNA-Sonden besteht eine Konkurrenzreaktion: Einerseits kann die DNA-Sonde mit der auf der Membran befindlichen Zielsequenz hybridisieren und andererseits mit sich selbst (DNA/DNA-Hybride). In den meisten Hybridisierungen wird die Sonde im Überschuss eingesetzt. Dadurch wird diese Problematik noch verschärft. Zur Vermeidung einer Konkurrenz von Sonden-Reassoziation und Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz wurden in der vorliegenden Arbeit Einzelstrang-Sonden benutzt. In der PCR-Reaktion wurde nur derjenige Primer eingesetzt, der den zur RNA-Zielsequenz komplementären Strang („Antisense-Strang“) herstellt. Durch diese asymmetrische PCR-Methode in Anlehnung an Yamaguchi (Yamaguchi et al. 1994) konnte eine konzentrierte Einzelstrang-cDNA hergestellt werden, die komplementär zu den m-RNA-Transkripten auf der Membran, und deswegen hoch spezifisch war.

Die meisten zur Untersuchung der molekularen Regulation von Leberregeneration durchgeführten Experimente sind bislang an kultivierten Zellen durchgeführt worden. Die *in-vitro*-Modelle weisen oft wenig Gemeinsamkeiten mit den *in-vivo*-Prozessen auf, hauptsächlich wegen der fehlenden Interaktion zwischen Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen, der inzwischen eine entscheidende Rolle in der Regeneration zugeschrieben wird. Die Leberzellpopulationen werden im Kulturmodell getrennt erforscht und

die gewonnenen Ergebnisse spiegeln nicht exakt die natürlichen Bedingungen mit der intakten Mikroarchitektur wider (LaBrecque 1994).

Als *in-vivo*-Modell für die Erforschung von Leberregeneration wurde bisher insbesondere das 70%-PH-Modell angewandt, wie auch in der vorliegenden Arbeit. Im Vergleich zu anderen Methoden wie z.B. dem Einsatz von Lebertoxinen ist das PH-Modell nicht mit Gewebsschaden oder Entzündungsreaktionen assoziiert, es ist reproduzierbar und der Regenerationsstimulus, nämlich die Entfernung von Leberlappen, ist genau definiert.

Die Physiologie der Ratte unterscheidet sich deutlich von der des Menschen, beispielsweise durch eine abweichende Leberperfusion oder die viel schnellere Regenerationsgeschwindigkeit. Studien an Großtiermodellen würden die Situation am Menschen wahrscheinlich besser reflektieren, diese sind jedoch kosten- und zeitintensiver. Das Rattenmodell hat sich insbesondere für molekularbiologische Grundlagenforschung bewährt, da das Genom von Nagetieren eine sehr hohe Parallelität zu dem des Menschen aufweist.

Zur Beurteilung der Rolle des chirurgischen Traumas wurde zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine Scheinoperationsgruppe mitgeführt. Um den Effekt der mRNA-Transkripte zum Ausdruck zu bringen, setzten wir die Ergebnisse der einzelnen Gruppen (PH, PBL in den nicht-ligierten und den ligierten Lappen und Scheinoperation) jeweils in Bezug zur Kontrollgruppe.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit haben wir zwei Standard-Tiermodelle zur Erforschung der Leberregeneration verglichen, das partielle Hepatektomie-Modell und das Pfortaderastligatur-Modell. Auf diesem Wege haben wir versucht, die Auswirkungen einer akuten Erhöhung des Pfortaderflusses auf die Expression der *Immediate-Early*-Gene Egr-1, PAI-1 und PRL-1, und deren Beziehung zur Wachstumskinetik zu analysieren. Alle drei Proteine sind an Entwicklungs-, Proliferations- und Wiederherstellungsprozessen in zahlreichen Geweben beteiligt und spielen vermutlich eine wichtige Rolle während des Wiedereintritts der ruhenden Hepatozyten in den Zellzyklus in frühen Stadien der Leberregeneration. Wir haben herausgefunden, dass eine Stunde nach PH oder PBL die *Immediate-Early*-Gene Egr-1 und PAI-1 in der Restleber sowie in den portal-hyperperfundierten Lappen spezifisch induziert waren (Abb. 3, 4). Diese spezifischen Induktionen gingen denen von PRL-1 voran, die nach 3 Stunden in den gleichen Lappen, im Vergleich zu den portal-deprivierten Lappen oder dem Lebergewebe von scheinoperierten Tieren, folgten. Nach einer Stunde war die PRL-1 Expression in allen untersuchten Bedingungen unspezifisch angeschaltet, sehr

wahrscheinlich als Reaktion auf das chirurgische Trauma (Abb. 5). Der verzögerte spezifische Anstieg von PRL-1 in den portal-hyperperfundierten Lappen nach PH und PBL könnte die Trans-Aktivierung durch das vorher induzierte Egr-1 widerspiegeln. Somit ist PRL-1 als *Delayed-Early*-Gen zu charakterisieren. Der Zusammenhang einer Transaktivierung durch Egr-1 war in unserem Modell nicht feststellbar, konnte aber in *in-vitro*-Studien gezeigt werden (Peng et al. 1999). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die schnelle Änderung der portalen Hämodynamik möglicherweise als ein Trigger-Mechanismus für die Induktion der IEG wirkt. Unsere Studie wurde unter der Annahme durchgeführt, dass beide, die Restleber nach PH und die nicht-ligierten Lappen nach PBL, einem vergleichbaren hämodynamischen Stress unterliegen, der durch die portale Mehrdurchblutung hervorgerufen wird. Diese Theorie wird durch jüngste Untersuchungsergebnisse gestützt (Morsiani et al. 1998, Rocheleau et al. 1999, Schoen et al. 2001, Um et al. 1994). Morphologische Studien sprechen für erhebliche Auswirkungen einer portalen Mehrdurchblutung nach PH auf die Lebergewebsarchitektur mit einer Dilatation der sinusoidalen Strombahn und des Disse´schen Raums und ödematös geschwollene Hepatozyten mit Auflockerung der Parenchymzellverbände (Um et al. 1994).

Unterschiede zwischen dem PH- und dem PBL-Modell fanden sich hinsichtlich des Egr-1 Transkriptionsniveaus nach einer Stunde und nach 2 Stunden mit signifikant höheren Werten nach PH, bezüglich des Langzeitanstieges von PAI-1 mRNA nach PH (Abb. 6b) sowie des Expressionsmusters von H2B-mRNA. Die H2B-Transkripte, als Replikationsmarker, präsentierten sich nach PBL weniger ausgeprägt. Das letztgenannte Beispiel wird bestätigt durch frühere Untersuchungen, die eine höhere 3H-Thymidin Aufnahme und Thymidin-Kinase Aktivität nach PH im Gegensatz zu PBL feststellten (Lambotte et al. 2000). Die unterschiedlichen Regenerationsgeschwindigkeiten zwischen beiden Modellen könnten durch ein wesentlich geringeres metabolisches Bedürfnis für Regeneration nach PBL erklärt werden (Bilodeau et al. 1999, Fausto 2000, Lambotte et al. 1997). Möglicherweise übt die erhaltene Funktion der okkludierten Leberteile einen hemmenden Einfluss auf das kontralaterale Wachstum aus, im Vergleich zu der Entwicklung der Residualleber nach PH. Die verspätete Antwort in den nicht-ligierten Lappen nach PBL zeigt, dass beide Modelle zusätzlichen unterschiedlichen physiologischen Einflüssen unterliegen, die sich durch die verschiedenen Egr-1 Expressionsniveaus ausdrücken. Entsprechend ist die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Proliferation in beiden Modellen divergent, diese Feststellungen weisen zusammengenommen darauf hin, dass die Unterschiede in den Egr-1-mRNA

Niveaus mit der Progression im Zellzyklus und mit dem Beginn der replikativen Expression von H2B-mRNA übereinstimmen (Mueller et al. 2002).

Es ist schwierig, diesen Erklärungsansatz des metabolischen Bedarfes auf die Unterschiede in der Egr-1 Expression während der ersten zwei Stunden zu übertragen, da wir transkriptionelle Reaktionen auf ein bisher unbekanntes Signal beurteilen, welches bereits innerhalb von Minuten nach Resektion oder Ligatur gesendet werden muss. Weiter bleibt unklar, ob die höheren PAI-1 Transkriptionsniveaus nach PH mit den Unterschieden in der regenerativen Antwort zusammenhängen. Es ist denkbar, dass diese Unterschiede durch die Gelegenheit einer arteriellen Gegenregulation nach PBL zustande kommen. Die Blutversorgung einer normalen Leber erfolgt zu 2/3 über die Pfortader und zu 1/3 über die Leberarterie. Unter physiologischen Bedingungen können Veränderungen im Pfortaderfluss durch Fluss-Variationen der Leberarterie gegenreguliert werden, mit dem Ziel eines konstanten Gesamtleber-Flusses (Lautt 1983, Lautt et al. 1990). Studien zeigen, dass das Abklemmen eines Pfortaderastes durch einen bisher unbekannten vasoreaktiven Mechanismus zu einem vielfachen Anstieg des arteriellen Flusses in dem betreffenden Leberareal führt. Dieses Phänomen wird im Englischen als *Hepatic Artery Buffer Response* bezeichnet und ist in diversen physiologischen Studien bestimmt und charakterisiert worden (Kawasaki et al. 1990, Lautt 1996, Rocheleau et al. 1999). Dieser regulatorische Mechanismus dient offenbar nicht nur der Erfüllung des Sauerstoff- und Metabolitbedarfs der Leber, sondern scheint auch für die Gesamtleberfunktion wichtig zu sein. Die arterielle Gegenregulation nach PBL, bei welcher die Menge des Gesamtblutflusses innerhalb der nicht-ligierten Leberlappen durch Reduktion des arteriellen Zustroms vermindert werden kann, hat möglicherweise zur Folge, dass auf das Parenchym weniger mechanischer Stress einwirkt. Das Fehlen dieser Gegensteuerungsoption nach PH könnte in einem verstärkten mechanischen Stress für die Residualleber resultieren und, wie in dieser Arbeit gezeigt, in einer erhöhten Expression von Egr-1 und PAI-1. Vielleicht wirken diese Unterschiede auch auf die Progression in frühen präreplikativen Veränderungen und können möglicherweise dadurch die leicht verzögerte S-Phasen abhängige H2B-Expression nach PBL erklären. Es muss jedoch gesagt werden, dass wir in unseren Experimenten bewusst keine hämodynamische Messungen durchgeführt haben, weil wir zusätzliche störende Manipulationen zu der Pfortader vermeiden wollten.

Die Hypothese, dass die Wachstumskinetik nach PBL präzise durch das Ausmaß der Atrophie reguliert ist, wird durch unsere Ergebnisse gestützt, da die kontralateralen Replikatio-

nen im Vergleich zu PH verzögert auftreten (Bilodeau et al. 1999, Lambotte et al. 2000, Takeuchi et al. 1996, Uemura et al. 2000). Dennoch müssen in Anbetracht der Zeit, die zur Progression im Zellzyklus erforderlich ist, Modifizierungs-Ereignisse stattfinden, bevor ein effektiver Verlust von Lebergewebe eintritt. Diese Hypothese wurde jüngst durch experimentelle Arbeiten an molekularen Ereignissen während der $G_1$/S-Phasen Progression nach PBL bestätigt (Starkel et al. 2001).

Die transkriptionelle Aktivierung von IEG geschieht unabhängig von einer Proteinsynthese. Dies erfordert die Beteiligung präexistierender Transkriptionsfaktoren in der gesunden Leber, die wahrscheinlich durch früheste Veränderungen nach Regenerationsstimulus aktiviert werden. Neben anderen konnten NF-κB und Stat3 als inaktive Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die offenbar als Teil der initialen Antwort nach PH in ihre aktive Form überführt werden können. Verschiedene Zytokine wie TNFα, Il-1, Il-6, LSP und Mitogene wie HGF scheinen über rezeptorvermittelte Signaltransduktion die Aktivierung von latentem NF-κB und Stat3 zu bewirken, die dann vermutlich in den Zellkern wandern, ihre Zielgene binden und deren Expression beeinflussen (Taub 1996). Diese frühen Vorgänge nach PH werden für eine Modifizierung der Hepatozyten verantwortlich gemacht, durch welche die Zellen empfänglicher für verschiedene Wachstumsfaktoren werden sollen. Dieser als „Priming“ bezeichnete Prozess könnte die weitere Progression der Hepatozyten im Zelllzyklus in Richtung Mitose erlauben (Fausto et al. 1995). Man könnte postulieren, dass die Regeneration während dieser initialen Veränderungen nicht nur initiiert, sondern bereits der vollständige Regenerationsablauf festgelegt wird. Untersuchungen am Modell einer reversiblen PH konnten zeigen, dass die frühen Reize nicht ausreichen, die gesamte regenerative Antwort aufrecht zu erhalten, wenn der Parenchymverlust innerhalb der ersten 3 Stunden wieder rückgängig gemacht wird. Offenbar legt das Ausmaß des Parenchymverlustes erst um die 10. Stunde die Anzahl der Zellen fest, die tatsächlich den Replikationszyklus durchlaufen (Lambotte et al. 1997). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Bestimmung der Zellen, im Zellzyklus fortzufahren, oder die Progression abzubrechen, zu einem späteren Zeitpunkt durch zusätzliche Steuerungsmechanismen entschieden wird.

Das PH-Modell legt nahe, dass der akute Parenchymverlust im Sinne eines metabolischen Defizits die Regeneration auslöst. Eine bedeutende Studie lässt jedoch Zweifel aufkommen hinsichtlich der Spezifität verschiedener IEG bei Leberregeneration. Denn im 70%-Pfortaderastligatur-Modell erschien die Aktivierung und Expression von IEG und Zytoki-

nen wie c-myc, c-jun, Stat3 und Il-6 unspezifisch hinsichtlich der zukünftigen Auswirkungen auf die deprivierten und nicht-deprivierten Lappen nach PBL (Atrophie gegen Regeneration), wobei das Niveau von c-fos mRNA in den nicht-ligierten Lappen signifikant höher war als in den ligierten (Starkel et al. 1999). Die Scheinoperation war ebenfalls gefolgt von einer Stat3 und Il-6 Induktion, was einen wichtigen Einfluss des chirurgischen Traumas auf diese molekularen Veränderungen andeutet (Heim et al. 1997, Starkel et al. 1999, Trautwein et al. 1996). Bis heute finden sich nur begrenzte Hinweise für einen Zusammenhang zwischen hämodynamischen Veränderungen und einer spezifischen Genexpression bei Leberregeneration. Eine andere PBL-/ PH-Modell Vergleichsstudie legt eine frühe c-fos mRNA Expression als Reaktion auf durch Scherkräfte vermittelte Stickoxid Freisetzung nahe (Schoen et al. 2001).

Egr-1 ist eines der wenigen Transkriptionsfaktoren, dessen Aktivierung mit mechanischer Beanspruchung und Scherkräften in Verbindung gebracht wird. Diese Annahme stützt sich auf Untersuchungen, in denen kultivierte Endothelzellen, Herzmuskelzellen, Mesangiumzellen und glatte Muskelzellen verschiedenen Arten von mechanischem Stress ausgesetzt wurden (Chiu et al. 1999, Morawietz et al. 1999, Wung et al. 1999). Im Übrigen ist gezeigt worden, dass durch Zug-Stress in kultivierten Endothelzellen eine PAI-1 Freisetzung induziert werden kann (Cheng et al. 1996). Doch der physiologische Einfluss von Egr-1 und PAI-1 Induktion in leberregenerativen Prozessen ist nicht nachgewiesen, solange in-vivo Experimente mit funktioneller Ausschaltung von Egr-1 oder PAI-1 fehlen. Egr-1 scheint ein besonders reizvolles Molekül zu sein, da es durch Aktivierung und Unterdrückung transkriptioneller Ereignisse möglicherweise zahlreiche zelluläre Prozesse wie Wachstum, Entwicklung, Differenzierung und Inflammation kontrolliert (Gashler et al. 1993, Kilbourne et al. 1995, Sukhatme et al. 1988). Die Kenntnis seiner genaue Funktion in der Leberregeneration als ein potentieller Kontrollpunkt in der Expression von anderen wachstumsabhängigen Genen wäre von entscheidendem Bedeutung.
Obwohl die eindeutige Signalkaskade, die zur Aktivierung von Egr-1 und PAI-1 führt, zur Zeit nicht bekannt ist, scheinen die *immediate-early* Expressionsmuster von Egr-1 und PAI-1 einen klaren Bezug zu dem Umstand der portalen Mehrperfusion zu haben. Egr-1 und PAI-1 wurden eine Stunde nach PH in der Restleber und nach PBL in den nicht-ligierten Lappen spezifisch induziert. Bezüglich der PAI-1 Expression nach PH decken sich unsere Ergebnisse teilweise mit der Fachliteratur. Im 70%-PH-Modell wurde ebenfalls eine spezifische Induktion von PAI-1 mRNA nach einer Stunde gezeigt, mit einem Maxi-

mum nach 2 Stunden (Thornton et al. 1994). Eine andere Studie beschreibt einen nach einer Stunde einsetzenden Anstieg der PAI-1 Transkripte, der nach 8 Stunden maximale Werte erreicht, jedoch wurde in dieser Arbeit lediglich eine 25%-PH an der Maus durchgeführt, dieser Umstand liefert eine mögliche Erklärung für die gefundenen Differenzen (Schneiderman et al. 1993). Hinsichtlich der spezifischen Egr-1 Induktion gibt es in der Literatur Angaben mit einem Expressionsgipfel 2 Stunden nach PH (Taub 1996). Am PBL-Modell wurde das PRL-1, PAI-1 und Egr-1 Expressionsmuster bislang noch nicht untersucht. Kürzlich ist beobachtet worden, dass Il-6-defiziente Mäuse eine beeinträchtigte Leberregeneration zeigen, verbunden mit einer reduzierten Expression verschiedener IEG, darunter Egr-1 und PAI-1. Dies legt eine ko-stimulatorische Rolle für Il-6 nahe (Li et al. 2001). Die Tatsache, dass die Egr-1 und PAI-1 Induktion in Il-6-defizienten Mäusen nicht vollständig aufgehoben war, und dass die PRL-1 Expression unbeeinflusst blieb, unterstreicht die Bedeutsamkeit anderer Signalmechanismen. Studien auf der Grundlage kultivierter Endothelzellen und glatter Muskelzellen, die Zug- und Druckkräften ausgesetzt wurden, zeigten, dass Vertreter der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP) Familie als Signaltransmitter für mechanischen Stress wirkten (Chiu et al. 1999, Wung et al. 1999). Zusätzlich scheinen diese Bahnen an durch mechanischen Stress induzierter nukleärer Translokation und Expression von Egr-1 in ROS/17/2.8 Osteoblasten beteiligt zu sein (Granet et al. 2001). Ihre potentielle Rolle in der Signaltransduktion in Abhängigkeit von veränderten hämodynamischen Umständen in chirurgischen Modellen für Leberregeneration bleibt nachzuweisen.

PRL-1 mRNA wurde schnell induziert, 1 Stunde nach Scheinoperation, PH und PBL in den portal-deprivierten und nicht-deprivierten Lappen. Dieses unspezifische Expressionsprofil könnte eventuell auf das chirurgische Trauma zurückzuführen sein, wie bereits für verschiedene andere IEG gezeigt wurde (Starkel et al. 1999). Zu späteren Zeitpunkten konnten wir nach PH und PBL in den regenerierenden Lappen erhöhte PRL-1 Transkripte nachweisen, diese Beobachtung stimmt mit der Fachliteratur überein (Diamond et al. 1994, Haber et al. 1995a). Vor kurzem wurde anhand von Electrophorese Mobility Shift Assay (EMSA) Untersuchungen dargelegt, dass der PRL-1 Promotor durch Egr-1 trans-aktiviert wurde (Peng et al. 1999). Unsere Beobachtung einer unspezifischen Induktion, gefolgt von einer spezifischen Hoch-Regulation in regenerierendem Lebergewebe, deutet auf eine Verbindung mit einem vorher induzierten Trans-Aktivator, vielleicht Egr-1, hin. Möglicherweise spielen andere Transkriptionsfaktoren wie Sp1, welches mit Egr-1 um eine Bindungsstelle konkurriert, eine Rolle in der unspezifischen frühen Antwort. sp1 scheint be-

deutsam für die basale Expression von PRL-1 zu sein. Vielleicht wird sp1 durch einen Überschuss an Egr-1 verdrängt, und dadurch eine stärkere Transkriptions-Aktivation ausgelöst (Kutoh et al. 1993). Es ist gut vorstellbar, dass die PRL-1 Expression wichtig für hepatisch regenerative Ereignisse ist, da gezeigt wurde, dass PRL-1 mit Wachstums- und Differenzierungsvorgängen in einer Vielzahl von Zellen und Geweben assoziiert ist (Diamond et al. 1994, Gregory et al. 2000, Peng et al. 1998, Rundle et al. 1999, Zeng et al. 2000). Seine Funktion in der Leberregeneration muss jedoch weiter erforscht werden.
Schließlich beobachteten wir, dass die Transkription einzelner IEG, nämlich Egr-1, PAI-1 und PRL-1, eher mit ansteigendem Pfortaderfluss als mit Verlust von Lebergewebe oder chirurgischem Trauma zusammenhängt. Die *Immediate Early Gene* zeigen somit eine heterogene Gruppe von zellulären Antworten auf verschiedene physiologische Bedingungen *in vivo*, mit wahrscheinich multiplen, für die Regeneration wichtigen funktionellen Eigenschaften.

In Serum-Glukose Messungen konnten wir unterschiedliche Werte zwischen dem PH- und dem PBL-Modell feststellen. Nach PH kam es zu einem stärkeren Abfall des Blutglukose-Spiegels als nach PBL. Die regenerierende Leber nach PH versucht den akuten Verlust von 2/3 des Gewebes zu kompensieren und viele ihrer Funktionen einschließlich der Synthese von Gerinnungsfaktoren, Albumin und Gallenflüssigkeit und die Glukosehomöostase aufrechtzuerhalten (Michalopoulos 1990). Nach PH wird ein schneller Insulin-Abfall und Glukagon-Anstieg innerhalb weniger Minuten beobachtet, diese Hormonspiegel normalisieren sich innerhalb von Stunden (Bucher et al. 1975). Als Teil dieser kompensatorischen Mechanismen werden unmittelbar nach PH in der Restleber Gene induziert, die wichtig für die hepatische Glukose Produktion sind, wie Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) und Glukose-6-Phosphatase (G6P) (Haber et al. 1995b, Mohn et al. 1990, Rosa et al. 1992). Eine andere Studie aus unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass nach PH und PBL die Fähigkeit der Leber, die Glukosehomöostase aufrecht zu erhalten, herabgesetzt ist. Beobachtungen der Glykogenspeicher deuten darauf hin, dass der atrophierende Leberteil die Funktion des regenerierenden Leberteils unterstützt, so dass die Gesamtleberfunktion nach PBL abgeschwächt sein könnte jedoch wahrscheinlich nicht in einem für den Patienten kritischem Maße (Mueller et al. 2003). Die Funktionsbeeinträchtigung nach PH scheint ausgeprägter zu sein, vielleicht weil eben diese Möglichkeit nach einer Entfernung des Gewebes nicht mehr besteht und die Residualleber Schwierigkeiten hat, glukoseproduzierende Enzyme herzustellen und den Blutzuckerspiegel konstant zu halten.

Die Expressionsprofile der Haushaltsgene wie Albumin und GAPDH waren in regenerierendem Gewebe nach PH und PBL vergleichbar, und diese Ergebnisse decken sich mit denen aus früheren Publikationen (Milland et al. 1990). In den atrophierenden Lappen fanden wir keinen wesentlichen Abfall der Leber spezifischen Haushaltsproteine. Die Daten über Glukose-Homöostase und Haushaltsproteine belegen somit am präklinischen Modell, dass die Pfortaderembolisation in der Klinik sinnvoll und ohne signifikante frühe Leberfunktionseinschränkung für den Patienten während des Ablaufs der balancierten Regeneration und Atrophie ist.

### 5.3 Ausblick / Klinische Interpretation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen eine wichtige Rolle der portalen Hämodynamik für die Steuerung der Leberregeneration nahe. Gleichsam ist die unterschiedliche Expression der IEG Egr-1, PAI-1 und PRL-1 möglicherweise die summierte zelluläre Antwort auf hämodynamischen Stress. In der Klinik ist ein Zusammenhang zwischen hämodynamischem Stress und der späteren regenerativen Antwort nicht belegt. Es gibt jedoch Hinweise, dass ein „portales Hyperperfusionssyndrom“, welches mitverantwortlich ist für das Leberversagen nach erweiterten Resektionen oder Small-for-Size-Transplantationen, tatsächlich pathophysiologisch bedeutsam ist (Lo et al. 2003, Troisi et al. 2003). Die Analyse der Genexpression eröffnet dabei die Möglichkeit einer molekularen Früh-Diagnostik, gerade im Hinblick auf die derzeitige Verfügbarkeit der kostengünstigen Hochdurchsatz-Technologien wie Arrays und Genchips.

Die Ergebnisse der Glukosemessungen nach PBL und PH, beziehungsweise die erhaltene Albumin-Expression zeigen, dass die Pfortaderastembolisation als Standardmethode gut geeignet ist, ohne passagere Funktionsminderung eine präoperative Hyperplasie der Restleber zu erreichen.

## 6. Zusammenfassung

Die frühen physiologischen Mechanismen, welche die kompensatorische Leberregeneration nach partieller Hepatektomie auslösen sind bislang unklar. Diskutiert werden metabolische und hämodynamische Faktoren.

Bereits innerhalb einer Stunde nach partieller Hepatektomie kommt es zu einer verstärkten Transkription zahlreicher Gene, deren Expression in normalem Lebergewebe nicht oder nur in geringem Maße nachweisbar ist. Diese *Immediate-Early* Gene wie zum Beispiel c-fos, c-myc, c-jun, Egr-1, PAI-1, PRL-1 werden als bedeutsam im Rahmen des Wiedereintritts der ruhenden Hepatozyten in den Zellteilungszyklus angesehen.

Im Modell der Pfortaderastligatur kommt es, bei konstantem Gesamtlebervolumen, in dem nicht-ligierten Leberteil zu einer analogen regenerativen Antwort. Der Vergleich beider Modelle eröffnet die Möglichkeit, portale Hämodynamik und akuten Parenchymverlust als potentielle Steuerungsmechanismen getrennt zu betrachten.

Mit der vorliegenden Studie wurde der mögliche Einfluss der portalen Mehrperfusion auf die frühe Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Early-Growth-Response-Gen-1 (Egr-1), der Tyrosin-Kinase Phosphatase of Regenerating Liver-1 (PRL-1) und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) nach partieller Hepatektomie, Pfortaderastligatur und Scheinoperation am Rattenmodell untersucht. Die mRNA-Expression von Egr-1, PAI-1 und PRL-1 wurde anhand von RT-PCR und Northern Blot-Hybridisierungen bestimmt.

Die Wachstumskinetik wurde durch Lebergewichtsbestimmungen ermittelt und zeigte eine in beiden Modellen ähnliche Regenerationskinetik, allerdings trat nach partieller Hepatektomie eine schnellere Volumenzunahme sowie eine frühere Expression der S-Phase-spezifischen Histon H2B mRNA auf.

Northern Blot-Analysen ergaben eine spezifische Induktion von Egr-1- und PAI-1 mRNA während der ersten 3 Stunden in den mehr-perfundierten Lappen nach Pfortaderastligatur und in größerem Ausmaß nach partieller Hepatektomie. PRL-1 wurde früh unspezifisch hoch reguliert und fand sich nach 3 Stunden ausschließlich verstärkt in regenerierendem Lebergewebe.

Die Veränderungen des Pfortaderflusses nach partieller Hepatektomie und Pfortaderastligatur sind mit der Expression von Egr-1, PAI-1 und PRL-1 verbunden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass hämodynamische Prozesse einen wichtigen Triggermechanismus für Leberregeneration darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis


1. **Akerman, P., P. Cote, S. Q. Yang, C. McClain, S. Nelson, G. J. Bagby, and A. M. Diehl**. 1992. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. Am. J. Physiol **263**:G579-G585.

2. **Alison, M. R., C. J. Ryan, C. A. Lee, and K. McDermott**. 1986. Compensatory hyperplasia in the rat liver as a result of cytoplasmic atrophy. Br. J. Exp. Pathol. **67**:901-908.

3. **Aljada, A., H. Ghanim, P. Mohanty, N. Kapur, and P. Dandona**. 2002. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. J. Clin. Endocrinol. Metab **87**:1419-1422.

4. **Bilodeau, M., M. C. Aubry, R. Houle, P. N. Burnes, and C. Ethier**. 1999. Evaluation of hepatocyte injury following partial ligation of the left portal vein. J. Hepatol. **30**:29-37.

5. **Bismuth, H., M. Morino, D. Castaing, M. C. Gillon, D. A. Descorps, F. Saliba, and D. Samuel**. 1989. Emergency orthotopic liver transplantation in two patients using one donor liver. Br. J. Surg. **76**:722-724.

6. **Bucher, N. L. and M. N. Swaffield**. 1975. Synergistic action of glucagon and insulin in regulation of hepatic regeneration. Adv. Enzyme Regul. **13**:281-293.

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

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

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

10. **Chiu, J. J., B. S. Wung, H. J. Hsieh, L. W. Lo, and D. L. Wang**. 1999. Nitric oxide regulates shear stress-induced early growth response-1. Expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells. Circ. Res. **85**:238-246.

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

12. **Dano, K., P. A. Andreasen, J. Grondahl-Hansen, P. Kristensen, L. S. Nielsen, and L. Skriver**. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. Adv. Cancer Res. **44**:139-266.

13. **Diamond, R. H., D. E. Cressman, T. M. Laz, C. S. Abrams, and R. Taub**. 1994. PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. Mol. Cell Biol. **14**:3752-3762.

14. **Diehl, A. M. and R. M. Rai**. 1996. Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration. FASEB J. **10**:215-227.

15. **Emond, J. C., P. Rosenthal, J. P. Roberts, P. Stock, S. Kelley, G. Gregory, R. C. Lim, Jr., and N. L. Ascher**. 1996. Living related donor liver transplantation: the UCSF experience. Transplant. Proc. **28**:2375-2377.

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

17. **Fausto, N.** 2000. Liver regeneration. J. Hepatol. **32**:19-31.

18. **Fausto, N., A. D. Laird, and E. M. Webber**. 1995. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. FASEB J. **9**:1527-1536.

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

20. **Francavilla, A., Q. Zeng, L. Polimeno, B. I. Carr, D. Sun, K. A. Porter, D. H. Van Thiel, and T. E. Starzl**. 1994. Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model of hepatic regeneration. Hepatology **19**:210-216.

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

22. **Granet, C., N. Boutahar, L. Vico, C. Alexandre, and M. H. Lafage-Proust**. 2001. MAPK and SRC-kinases control EGR-1 and NF-kappa B inductions by changes in mechanical environment in osteoblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. **284**:622-631.

23. **Gregory, R. C., K. A. Lord, L. B. Panek, P. Gaines, S. B. Dillon, and D. M. Wojchowski**. 2000. Subtraction cloning and initial characterization of novel epo-immediate response genes. Cytokine **12**:845-857.

24. **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.

25. **Haber, B., L. Naji, D. Cressman, and R. Taub**. 1995a. Coexpression of liver-specific and growth-induced genes in perinatal and regenerating liver: attainment and maintenance of the differentiated state during rapid proliferation. Hepatology **22**:906-914.

26. **Haber, B. A., S. Chin, E. Chuang, W. Buikhuisen, A. Naji, and R. Taub**. 1995b. High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes. J. Clin. Invest **95**:832-841.

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

28. **Hasan, R. N., S. Phukan, and S. Harada**. 2003. Differential regulation of early growth response gene-1 expression by insulin and glucose in vascular endothelial cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **23**:988-993.

29. **Healy, A. M. and T. D. Gelehrter**. 1994. Induction of plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. J. Biol. Chem. **269**:19095-19100.

30. **Heaton, J. H., S. Kathju, and T. D. Gelehrter**. 1992. Transcriptional and post-transcriptional regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue-type plasminogen activator gene expression in HTC rat hepatoma cells by glucocorticoids and cyclic nucleotides. Mol. Endocrinol. **6**:53-60.

31. **Heim, M. H., G. Gamboni, C. Beglinger, and K. Gyr**. 1997. Specific activation of AP-1 but not Stat3 in regenerating liver in mice. Eur. J. Clin. Invest **27**:948-955.

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

33. **Holtke, H. J. and C. Kessler**. 1990. Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection. Nucleic Acids Res. **18**:5843-5851.

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

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

36. **Kaido, T., A. Yoshikawa, S. Seto, S. Yamaoka, M. Sato, T. Ishii, and M. Imamura**. 1998. Portal branch ligation with a continuous hepatocyte growth factor supply makes extensive hepatectomy possible in cirrhotic rats. Hepatology **28**:756-760.

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

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

39. **Kawasaki, T., F. J. Carmichael, V. Saldivia, L. Roldan, and H. Orrego**. 1990. Relationship between portal venous and hepatic arterial blood flows: spectrum of response. Am. J. Physiol **259**:G1010-G1018.

40. **Khachigian, L. M., V. Lindner, A. J. Williams, and T. Collins**. 1996. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. Science **271**:1427-1431.

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

42. **Kinoshita, H., K. Sakai, K. Hirohashi, S. Igawa, O. Yamasaki, and S. Kubo**. 1986. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. World J. Surg. **10**:803-808.

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

44. **Kutoh, E. and J. Schwander**. 1993. Sp1 interacts with the consensus sequence for Egr-1 gene product with a cellular factor(s) and activates the transcription through this element. Biochem. Biophys. Res. Commun. **194**:1475-1482.

45. **LaBrecque, D.** 1994. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. Am. J. Gastroenterol. **89**:S86-S96.

46. **Lambotte, L., B. Li, I. Leclercq, C. Sempoux, A. Saliez, and Y. Horsmans**. 2000. The compensatory hyperplasia (liver regeneration) following ligation of a portal branch is initiated before the atrophy of the deprived lobes. J. Hepatol. **32**:940-945.

47. **Lambotte, L., A. Saliez, S. Triest, E. M. Tagliaferri, A. P. Barker, and A. G. Baranski**. 1997. Control of rate and extent of the proliferative response after partial hepatectomy. Am. J. Physiol **273**:G905-G912.

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

49. **Lautt, W. W.** 1996. The 1995 Ciba-Geigy Award Lecture. Intrinsic regulation of hepatic blood flow. Can. J. Physiol Pharmacol. **74**:223-233.

50. **Lautt, W. W., D. J. Legare, and W. R. Ezzat**. 1990. Quantitation of the hepatic arterial buffer response to graded changes in portal blood flow. Gastroenterology **98**:1024-1028.

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

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

53. **Lo, C. M., C. L. Liu, and S. T. Fan**. 2003. Portal hyperperfusion injury as the cause of primary nonfunction in a small-for-size liver graft-successful treatment with splenic artery ligation. Liver Transpl. **9**:626-628.

54. **Lu, A., Y. Tang, R. Ran, J. F. Clark, B. J. Aronow, and F. R. Sharp**. 2003. Genomics of the periinfarction cortex after focal cerebral ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab **23**:786-810.

55. **Makuuchi, M., B. L. Thai, K. Takayasu, T. Takayama, T. Kosuge, P. Gunven, S. Yamazaki, H. Hasegawa, and H. Ozaki**. 1990. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. Surgery **107**:521-527.

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

57. **Mayer, M.** 1990. Biochemical and biological aspects of the plasminogen activation system. Clin. Biochem. **23**:197-211.

58. **Michalopoulos, G. K.** 1990. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. FASEB J. **4**:176-187.

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

60. **Milland, J., A. Tsykin, T. Thomas, A. R. Aldred, T. Cole, and G. Schreiber**. 1990. Gene expression in regenerating and acute-phase rat liver. Am. J. Physiol **259**:G340-G347.

61. **Mohn, K. L., T. M. Laz, A. E. Melby, and R. Taub**. 1990. Immediate-early gene expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated Balb/c 3T3 cells. Liver-specific induction patterns of gene 33, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the jun, fos, and egr families. J. Biol. Chem. **265**:21914-21921.

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

63. **Morsiani, E., A. Aleotti, and D. Ricci**. 1998. Haemodynamic and ultrastructural observations on the rat liver after two-thirds partial hepatectomy. J. Anat. **192 ( Pt 4)**:507-515.

64. **Mueller, L., D. C. Broering, J. Meyer, Y. Vashist, J. Goettsche, C. Wilms, and X. Rogiers**. 2002. The induction of the immediate-early-genes Egr-1, PAI-1

and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. J. Hepatol. **37**:606-612.

65. **Mueller, L., R. Grotelueschen, J. Meyer, Y. K. Vashist, A. Abdulgawad, C. Wilms, C. Hillert, X. Rogiers, and D. C. Broering**. 2003. Sustained function in atrophying liver tissue after portal branch ligation in the rat. J. Surg. Res. **114**:146-155.

66. **Nagasue, N., H. Yukaya, Y. Ogawa, H. Kohno, and T. Nakamura**. 1987. Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. Ann. Surg. **206**:30-39.

67. **Naldini, L., K. M. Weidner, E. Vigna, G. Gaudino, A. Bardelli, C. Ponzetto, R. P. Narsimhan, G. Hartmann, R. Zarnegar, G. K. Michalopoulos, and .** 1991. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. EMBO J. **10**:2867-2878.

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

69. **Okada, M., T. Fujita, T. Sakaguchi, K. E. Olson, T. Collins, D. M. Stern, S. F. Yan, and D. J. Pinsky**. 2001. Extinguishing Egr-1-dependent inflammatory and thrombotic cascades after lung transplantation. FASEB J. **15**:2757-2759.

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

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

72. **Peng, Y., A. Genin, N. B. Spinner, R. H. Diamond, and R. Taub**. 1998. The gene encoding human nuclear protein tyrosine phosphatase, PRL-1. Cloning, chromosomal localization, and identification of an intron enhancer. J. Biol. Chem. **273**:17286-17295.

73. **Pichlmayr, R., B. Ringe, G. Gubernatis, J. Hauss, and H. Bunzendahl**. 1988. [Transplantation of a donor liver to 2 recipients (splitting transplantation)--a new method in the further development of segmental liver transplantation]. Langenbecks Arch. Chir **373**:127-130.

74. **Pistoi, S. and D. Morello**. 1996. Liver regeneration 7. Prometheus' myth revisited: transgenic mice as a powerful tool to study liver regeneration. FASEB J. **10**:819-828.

75. **Raia, S., J. R. Nery, and S. Mies**. 1989. Liver transplantation from live donors. Lancet **2**:497.

76. **Rocheleau, B., C. Ethier, R. Houle, P. M. Huet, and M. Bilodeau**. 1999. Hepatic artery buffer response following left portal vein ligation: its role in liver tissue homeostasis. Am. J. Physiol **277**:G1000-G1007.

77. **Rosa, J. L., R. Bartrons, and A. Tauler**. 1992. Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. Biochem. J. **287 ( Pt 1)**:113-116.

78. **Rous, P. and L. D. Larimore**. 1920. Relation of the portal blood to liver maintenance: A demonstration of liver atrophy conditional on compensation. J Exp Med **31**:609-632.

79. **Rozga, J., B. Jeppsson, and S. Bengmark**. 1986. Portal branch ligation in the rat. Reevaluation of a model. Am. J. Pathol. **125**:300-308.

80. **Rundle, C. H. and C. Kappen**. 1999. Developmental expression of the murine Prl-1 protein tyrosine phosphatase gene. J. Exp. Zool. **283**:612-617.

81. **Saksela, O. and D. B. Rifkin**. 1988. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. Annu. Rev. Cell Biol. **4**:93-126.

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

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

84. **Schneiderman, J., M. Sawdey, H. Craig, T. Thinnes, G. Bordin, and D. J. Loskutoff**. 1993. Type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression following partial hepatectomy. Am. J. Pathol. **143**:753-762.

85. **Schoen, J. M., H. H. Wang, G. Y. Minuk, and W. W. Lautt**. 2001. Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. Nitric. Oxide. **5**:453-464.

86. **Seki, T., H. Imai, S. Uno, T. Ariga, and T. D. Gelehrter**. 1996. Production of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in mildly cirrhotic rat liver. Thromb. Haemost. **75**:801-807.

87. **Shin, S. Y., J. Ko, J. S. Chang, d. S. Min, C. Choi, S. S. Bae, M. J. Kim, D. S. Hyun, J. H. Kim, M. Y. Han, Y. H. Kim, Y. S. Kim, D. S. Na, P. G. Suh, and Y. H. Lee**. 2002. Negative regulatory role of overexpression of PLC gamma 1 in the expression of early growth response 1 gene in rat 3Y1 fibroblasts. FASEB J. **16**:1504-1514.

88. **Starkel, P., Y. Horsmans, C. Sempoux, S. C. De, J. Wary, P. Lause, D. Maiter, and L. Lambotte**. 1999. After portal branch ligation in rat, nuclear factor kappaB, interleukin-6, signal transducers and activators of transcription 3, c-fos, c-myc, and c-jun are similarly induced in the ligated and nonligated lobes. Hepatology **29**:1463-1470.

89. **Starkel, P., L. Lambotte, C. Sempoux, S. C. De, A. Saliez, D. Maiter, and Y. Horsmans**. 2001. After portal branch ligation in the rat, cellular proliferation is associated with selective induction of c-Ha-ras, p53, cyclin E, and Cdk2. Gut **49**:119-130.

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

91. **Takeuchi, E., Y. Nimura, S. Mizuno, M. Nagino, M. Shoji-Kawaguchi, S. Izuta, and S. Yoshida**. 1996. Ligation of portal vein branch induces DNA polymerases alpha, delta, and epsilon in nonligated lobes. J. Surg. Res. **65**:15-24.

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

93. **Taub, R.** 1996. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. FASEB J. **10**:413-427.

94. **Thornton, A. J., C. J. Bruzdzinski, S. E. Raper, and T. D. Gelehrter**. 1994. Plasminogen activator inhibitor-1 is an immediate early response gene in regenerating rat liver. Cancer Res. **54**:1337-1343.

95. **Trautwein, C., T. Rakemann, M. Niehof, S. Rose-John, and M. P. Manns**. 1996. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. Gastroenterology **110**:1854-1862.

96. **Troisi, R. and H. B. de**. 2003. Clinical relevance of adapting portal vein flow in living donor liver transplantation in adult patients. Liver Transpl. **9**:S36-S41.

97. **Uemura, T., M. Miyazaki, R. Hirai, H. Matsumoto, T. Ota, R. Ohashi, N. Shimizu, T. Tsuji, Y. Inoue, and M. Namba**. 2000. Different expression of positive and negative regulators of hepatocyte growth in growing and shrinking hepatic lobes after portal vein branch ligation in rats. Int. J. Mol. Med. **5**:173-179.

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

99. **Um, S. H., O. Nishida, M. Tokubayashi, F. Kimura, Y. Takimoto, H. Yoshioka, R. Inque, and T. Kita**. 1994. Hemodynamic changes after ligation of a major branch of the portal vein in rats: comparison with rats with portal vein constriction. Hepatology **19**:202-209.

100. **Uno, S., M. Nakamura, T. Seki, and T. Ariga**. 1997. Induction of tissue-type plasminogen activator (tPA) and type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) as early growth responses in rat hepatocytes in primary culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. **239**:123-128.

101. **Urayama, M., S. Ishiyama, T. Kuzumaki, K. Ishikawa, A. Fuse, H. Kuzu, Y. Igarashi, K. Suto, and M. Tsukamoto**. 1999. Change of liver function in hypertrophying lobe of rabbit liver after portal branch ligation. J. Surg. Res. **86**:55-61.

102. **Uwagawa, T., Y. Unemura, and Y. Yamazaki**. 2001. Hyperbaric oxygenation after portal vein emobilization for regeneration of the predicted remnant liver. J. Surg. Res. **100**:63-68.

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

104. **Wung, B. S., J. J. Cheng, Y. J. Chao, H. J. Hsieh, and D. L. Wang**. 1999. Modulation of Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway by reactive oxygen species is involved in cyclic strain-induced early growth response-1 gene expression in endothelial cells. Circ. Res. **84**:804-812.

105. **Yamaguchi, K., D. Zhang, and R. A. Byrn**. 1994. A modified nonradioactive method for northern blot analysis. Anal. Biochem. **218**:343-346.

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

107. **Yamanaka, N., E. Okamoto, E. Kawamura, T. Kato, T. Oriyama, J. Fujimoto, K. Furukawa, T. Tanaka, F. Tomoda, and W. Tanaka**. 1993. Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. Hepatology **18**:79-85.

108. **Yan, S. F., J. Lu, Y. S. Zou, J. Soh-Won, D. M. Cohen, P. M. Buttrick, D. R. Cooper, S. F. Steinberg, N. Mackman, D. J. Pinsky, and D. M. Stern**. 1999. Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. J. Biol. Chem. **274**:15030-15040.

109. **Zeng, Q., X. Si, H. Horstmann, Y. Xu, W. Hong, and C. J. Pallen**. 2000. Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. J. Biol. Chem. **275**:21444-21452.

**********

## 8. Bezugsquellenverzeichnis

### 8.1 Chemikalien und Reagenzien

**Amersham Biosciences** UK Limited (Little Chalfont,GB): Nylon Hybond®-N+ Nukleinsäure- Transfermembran.

**Applied Biosystems** (USA): ABI Prism® Big Dye™ Terminator Kit.

**Baxter GmbH** (Unterschleißheim, Deutschland): Aqua ad injectabilia.

**BMA** (Rockland, USA): NuSieve® 3:1 Agarose.

**DAKO Corporation (**USA): DAKO® Biotin Blocking System, Levamisol

**Gibco BRL** (Life Technologies, Paisley, Schottland): Sodium salt citrat (SSC), Tris- Borat- EDTA (TBE)- Puffer.

**Merck** (Darmstadt, Deutschland): Ethanol 70%, Ethidiumbromid, Natriumchlorid, Trinatriumcitrat, Natronlauge, Salzsäure.

**Qiagen** (Hilden, Deutschland): QIAquick Spin PCR Purification Kit, RNeasy Midi Kit.

**Roche diagnostics GmbH** (Mannheim, Deutschland): 1st strand cDNA Synthesis Kit for RT- PCR (AMV), PCR DIG Probe Synthesis Kit, PCR Nukleotide Mix, Taq DNA- Polymerase und dazugehörige Reaktionspuffer, Hybridisierungspuffer DIG Easy Hyb, DIG Wasch- und Blockierungspuffer- Set, Anti digoxigenin AP conjugate, Fab- Fragmente, CDP- Star™ ready to use.

**Sigma** (Taufkirchen, Deutschland): β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Ethylendiaminotetraacetat (EDTA), Tris- EDTA, Ficoll, Formaldehyd, Formamid, 3-N-[Morpholino]propanesulfonic acid (MOPS), Natriumacetat, Phosphate buffered saline (PBS), Sodiumdodecylsulfate (SDS), Wasser.

**Vector Laboratories** (USA): Vectastain®ABC-AP Kit (Alkaline Phosphatase Mouse IgG, AK-5002, Alkalische Phosphatase Substratase Kit I

## 8.2 Primer

Die folgenden Primerpaare wurden zur PCR Amplifikation von spezifischen cDNAs verwendet. Die Position der Primer bezieht sich auf die Originalsequenz, die unter der Literaturstelle angegeben ist. Die amplifizierten cDNA Fragmente wurden kloniert und sequenziert und nach Bestätigung der korrekten Identität für die Hybridisierung verwendet.

| | |
|---|---|
| Zielgen: | **PAI-1**, Ratte |
| Sequenz Forward Primer: | 5′ TGA GAT CAG TAC TGC GGA CG 3′ |
| Sequenz Riverse Primer: | 5′ GAG GGG CAC ATC TTT TTC AA 3′ |

| | |
|---|---|
| Zielgen: | **PRL-1**, Ratte |
| Sequenz Forward Primer: | 5′ TGC GAA GCA ACT TAC GAC AC 3′ |
| Sequenz Reverse Primer: | 5′ GCT TGC TGT TAA AAG CTC CG 3′ |

| | |
|---|---|
| Zielgen: | **Albumin**, Ratte |
| Sequenz Forward Primer: | 5′ CCT CAA AGC CTG GGC AGT AG 3′ |
| Sequenz Reverse Primer: | 5′ AGT AAT CGG GGT GCC TTC TT 3′ |

| | |
|---|---|
| Zielgen: | **GAPDH**, Ratte |
| Sequenz Forward Primer | 5´ ATG GGA AGC TGG TCA TCA AC 3´ |
| Sequenz Reverse Primer | 5´CCA CAG TCT TCT GAG TGG CA 3´ |

| | |
|---|---|
| Zielgen: | **h2b**, Ratte |
| Sequenz Forward Primer: | 5′ GAT GCC GCG AAG AGA GTT AC 3′ |
| Sequenz Reverse Primer: | 5′ GTG TAC TTG GTG ACC GCC TT 3′ |

| | |
|---|---|
| Zielgen: | **egr-1**, Ratte |
| Sequenz Forward Primer: | 5′ AAC ACT TTG TGG CCT GAA CC 3′ |
| Sequenz Reverse Primer: | 5′ AGG TCT CCC TGT TGT TGT GG 3′ |

## 8.3 Lösungen und Puffer

| | |
|---|---|
| 1% Agarosegel | 2 g Agarose +<br>176 ml H2O +<br>20 ml Formaldehyd +<br>24 ml 10fach RB +<br>5 µl Ethidiumbromid |
| 2% Agarosegel | 5 g Agarose +<br>250 ml 1fach TBE- Puffer +<br>10 µl Ethidiumbromid |
| 10fach RNA Running Buffer (RB) | 200 mM MOPS +<br>50 mM Natriumacetat +<br>10 mM EDTA<br>ad H2O |
| RNA- Probenpuffer | 500 µl deionisiertes Formamid +<br>169 µl Formaldehyd +<br>100 µl 10fach RB |
| 5fach RNA- Ladungspuffer | 5 ml 10fach RB +<br>3 ml H2O +<br>1,5 g Ficoll 400 +<br>10 mg Bromphenolblau |
| 20fach SSC | 3 M NaCl + |

| | |
|---|---|
| | 0,3 M Trinatriumcitrat<br>ad H2O |
| 2fach Waschpuffer | 0,25 g SDS +<br>25 ml 20fach SSC<br>ad H2O |
| 0,5fach Waschpuffer | 0,25 g SDS +<br>6,25 ml 20fach SSC<br>ad H2O |

## Abkürzungen

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| bp | Basenpaare |
| cDNA | komplementäre DNA |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DIG | Digoxigenin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiaminotetraacetat |
| Egr-1 | Early growth response gene-1 |
| et al. | et alii |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| h | Stunden |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HGF | Hepatocyte Growth Factor |
| H2B | Histon H2B |
| IEG | Immediate early genes |
| K | Kontrolle |
| kb | Kilo-Basenpaare |
| kD | Kilo-Dalton |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| mRNA | Messenger RNA |
| nm | Nanometer |
| PA | Plasminogenaktivator |
| PAI-1 | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-1 |
| PBL | Portal branch ligation (Pfortaderastligatur) |
| PBL lig. | Portal branch ligation (Pfortaderastligatur) ligierter Lappen |
| PBL nlig. | Portal branch ligation (Pfortaderastligatur) nicht-ligierter Lappen |

| | |
|---|---|
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion) |
| PE | Pfortaderastembolisation |
| PH | Partielle Hepatektomie |
| PRL-1 | Phosphatase of regenerating liver-1 |
| RB | Running Buffer |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Reverse Transkriptase |
| SDS | Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| SO | Scheinoperation |
| SSC | Sodium salt citrate |
| Tab. | Tabelle |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |

**Danksagungen:**

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. X. Rogiers möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Arbeitsbedingungen, die wissenschaftliche Förderung und das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit bedanken.

Yogesh Vashist bin ich Dank für die Hilfe bei den Operationen der Versuchstiere schuldig.

Juliane Göttsche danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, sowie die umfassende Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Auch bedanke ich mich bei Mark Heine für die zur Verfügung Stellung der notwendigen EDV und damit verbundenen Hilfestellungen.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die geduldige emotionale und finanzielle Unterstützung bedanken.

Mein ganz herzlicher und besonderer Dank gilt jedoch meinem Betreuer Herrn Dr. med. Lars Müller, der jederzeit für mich ansprechbar war und mich in allen Belangen persönlich und fachlich unterstützt hat.

**Lebenslauf**

| | |
|---|---|
| Name: | Jannine Meyer |
| Geburtsdaten: | geb. am 19.06.1974 in Hamburg |
| Eltern: | Lotti Meyer geb. Heinbockel (Verwaltungsbeamtin)<br>Dr. rer. nat. Hans-Wilhelm Meyer (Diplomchemiker) |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch |
| Anschrift: | Kegelhofstr. 30, 20251 Hamburg |
| Schule: | 1981-1985 Grundschule Vizelinstraße, Hamburg<br>1985-1994 Gymnasium Gelehrtenschule des Johanneums Hamburg |
| Studium: | ab WS 1996/97 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg |
| Examina: | 03 / 1999 Ärztliche Vorprüfung<br>03 / 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung<br>09 / 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung<br>12 / 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| Ärztin im Praktikum: | 04 / 2004 – 09 / 2004 im Kath. Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Abteilung Pädiatrie, Hamburg |
| Assistenzärztin: | seit 10 / 2004 im Kath. Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Abteilung Pädiatrie, Hamburg |

**Eidesstattliche Versicherung**

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

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