



Technische Universität München

Klinikum rechts der Isar

Klinik und Poliklinik für Chirurgie

Direktor: Prof. Dr. Helmut Friess

Der Einfluss des Mustererkennungsrezeptors TLR3 auf die Regeneration der Leber im Mausmodell

Christian Stöß

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Weber

Prüfende der Dissertation: 1. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

2. Prof. Dr. Angela Krackhardt

Die Dissertation wurde am 08.06.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 07.10.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die Leber – Funktion und Regeneration	5
1.2	Regenerationsmodelle	5
1.2.1	Die partielle Hepatektomie	6
1.2.2	Tetrachlormethan	7
1.2.3	Dimethyl- oder Diethylnitrosamin	7
1.2.4	Thioacetamid.....	7
1.3	Die Regeneration der Leber nach akuter Schädigung	7
1.3.1	Die Initiationsphase	8
1.3.2	Die Progressionsphase	10
1.3.3	Die Terminationsphase	11
1.4	Immunität und Regeneration	12
1.4.1	Leberregeneration und Toll-like Rezeptoren	12
1.4.2	Der Toll-like Rezeptor 3	14
1.5	Translationale Aspekte der Leberregeneration	16
1.6	Zielsetzung	17
2	Material	18
2.1	Geräte und technisches Zubehör	18
2.2	Software	19
2.3	Chemikalien und Medien	19
2.4	Antikörper	21
2.5	Stammlösungen und Puffer	22
2.6	Enzyme	23
2.7	Reagenzienkits	23
2.8	Verbrauchsmaterialien	23
2.9	Oligonukleotide	24
2.10	Versuchstiere	26
3	Methoden	28
3.1	Bestimmung des Leber-Körpergewichtsverhältnisses	28
3.2	Tierexperimentelle Methoden	28
3.2.1	Partielle Hepatektomie	28
3.2.1.1	Anästhesie der Versuchstiere	28
3.2.1.2	Durchführung der partiellen Hepatektomie.....	29
3.2.2	Organentnahme der Versuchstiere	29

3.2.2.1	Kontrollproben	29
3.2.2.2	Experimentalproben	30
3.2.3	Intraperitoneale Bromdesoxyuridin-Injektion	30
3.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	31
3.4	Immunhistochemische Methoden	31
3.4.1	Gewebefixierung	31
3.4.2	Einbettung in Paraffin	31
3.4.3	Herstellung von Gewebeschnitten	32
3.4.4	Immunhistochemie von Paraffinschnitten	32
3.4.5	Hämatoxylin-Färbung	32
3.4.6	Auswertung der immunhistochemischen Daten	33
3.5	Molekularbiologische Methoden	33
3.5.1	RNA-Isolierung aus Gewebe	33
3.5.2	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (cDNA-Synthese)	34
3.5.3	Quantitative real-time PCR	34
3.5.4	Proteinextraktion aus Lebergewebe	36
3.5.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
3.5.6	SDS-PAGE	36
3.5.7	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	38
3.5.8	Western Blot	38
3.5.9	Re-Blot-Lösung zur weiteren Verwendung der Nitrozellulose-Membran	39
3.6	Statistische Analysen	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Analyse des Leber-Körpergewichtsverhältnisses	40
4.2	Analyse der frühen Phase der Leberregeneration	41
4.2.1	Zytokinmuster	41
4.2.2	Aktivierung proliferationshemmender Signale	43
4.3	Analyse des Zellzyklus während der Leberregeneration	44
4.3.1	Untersuchung der G ₁ -S-Transition	44
4.3.2	Analyse der S-Phase	46
4.3.3	G ₂ -M-Transition	47
4.4	Analyse inhibitorischer Signale während der Leberregeneration	49
4.4.1	Zellzyklusinhibitoren	49
4.4.2	<i>Transforming Growth Factor-β</i> als Inhibitor der Leberregeneration	50
4.4.3	Apoptose	51
4.5	Analyse proliferationsfördernder Signale während der Leberregeneration ..	53

4.5.1	Freisetzung von <i>Hepatocyte Growth Factor</i> aus der extrazellulären Matrix	53
4.5.2	PI3K/Akt/mTOR-Signalweg	57
5	Diskussion	59
5.1	Der zellspezifische Einfluss von TLR3 auf die Leberregeneration	59
5.2	Die frühe Phase der Leberregeneration	59
5.3	Der Einfluss von TLR3 auf die Zellzyklusprogression	62
5.3.1	G ₁ -Phase/G ₁ -S-Transition	62
5.3.2	S-Phase	63
5.3.3	G ₂ -Phase und M-Phase	64
5.4	Der Einfluss von TLR3 auf die Zellzyklusinhibition	64
5.4.1	Zellzyklusinhibitoren	64
5.4.2	Termination	65
5.4.3	Apoptose	65
5.5	Der Einfluss von TLR3 auf die Produktion und Aktivität von HGF	67
5.5.1	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> – Aktivierung durch das Urokinase-System	67
5.5.2	Proliferationsfördernde Signalwege – TLR3, HGF und PI3K/Akt/mTOR	68
6	Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Literatur	70
7	Ausblick	73
8	Zusammenfassung	74
9	Literaturverzeichnis	76
10	Abbildungsverzeichnis	88
11	Tabellenverzeichnis	89
12	Abkürzungsverzeichnis	90
13	Danksagung	94

1 Einleitung

1.1 Die Leber – Funktion und Regeneration

Die Leber ist das größte Drüsenorgan des Menschen und erfüllt vielfältige Aufgaben des Stoffwechsels, insbesondere die des Glucose-, Protein- und Fettstoffwechsels. Die Leber hält damit die Körperfunktionen im Gleichgewicht. Ein akutes oder chronisches Leberversagen kann deshalb potenziell lebensbedrohlich sein. Um in solchen Fällen einen letalen Ausgang möglichst zu verhindern, besitzt die Leber neben der Steuerung des Metabolismus auch eine hohe regenerative Kapazität. In diesem Sinne ist der Begriff „Regeneration“ als kompensatorisches Wachstum unbeschädigten Lebergewebes zu verstehen. Während der gesamten Regeneration findet ein koordiniertes Zusammenspiel aus wachstumsstimulierenden sowie -inhibierenden Signalen statt, wobei letztere zum Ende der Regeneration überwiegen, wenn die ursprüngliche Lebermasse und funktionelle Kapazität zur Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase wiederhergestellt ist. Die Balance aus kompensatorischem Wachstum und Erreichen der für die metabolische Homöostase benötigten Lebergröße wird auch als „Hepostat“ definiert [1, 2]. Für die Untersuchung der Regeneration existieren verschiedene Regenerationsmodelle.

1.2 Regenerationsmodelle

Je nach Experimentalmodell und Art der Schädigung lassen sich verschiedene Regenerationsarten in der Leber untersuchen. Akute Schädigungen der Leber im klinischen Alltag können beispielsweise durch eine akute fulminante Hepatitis oder durch eine Leberteileresektion bedingt sein. Unter chronischen Leberschädigungen lassen sich Krankheitsentitäten wie chronischer Alkoholabusus, Virushepatitiden, aber auch hereditäre oder autoimmune Erkrankungen (z. B. Morbus Wilson) subsumieren. Die Regenerationsmodelle unterscheiden sich anhand der Art und Dauer der Schädigung. Im Falle einer akuten Schädigung geht die Regeneration überwiegend von adulten Hepatozyten aus. Im Gegensatz dazu kompensieren im Falle der chronischen Regeneration sogenannte *oval cells* oder Progenitorzellen, also stammzellähnliche Zellen, die im Bereich der Heringkanäle residieren und sich sowohl in Hepatozyten als auch Cholangiozyten transdifferenzieren können, den Untergang von vitalem Lebergewebe [3-6]. Nachfolgend werden verschiedene Regenerationsmodelle vorgestellt und der Ablauf der Regeneration nach akuter Schädigung beschrieben.

1.2.1 Die partielle Hepatektomie

Um die Regeneration nach akuter Schädigung zu untersuchen, stellt die chirurgische Resektion von Lebermasse ein praktikables und unter standardisierten Bedingungen präzises Modell dar (**Abb. 1**). Das Ausmaß der Resektion ist dabei entscheidend. Es hat sich gezeigt, dass eine Entfernung von ca. 67 % bzw. 2/3 der Lebermasse den optimalen proliferativen Stimulus darstellt. Sowohl ein geringeres als auch höheres Ausmaß resezierten Lebergewebes führt zu eingeschränkten Regenerationsmechanismen bzw. zu einem höheren Risiko für ein akutes Leberversagen [7, 8]. Erstmals wurde das Modell der partiellen Hepatektomie (PHx) 1931 durch Higgins und Anderson beschrieben, welches im Laufe der Zeit versuchstierspezifisch modifiziert und standardisiert wurde [9-14]. Das anschließende kompensatorische Wachstum setzt sich aus einer kompensatorischen Hypertrophie im präreplikativen Stadium und einer nachfolgenden Hyperplasie der Zellen in den verbleibenden Leberlappen zusammen [15, 16]. In der vorliegenden Arbeit wird die PHx als Regenerationsmodell genutzt.

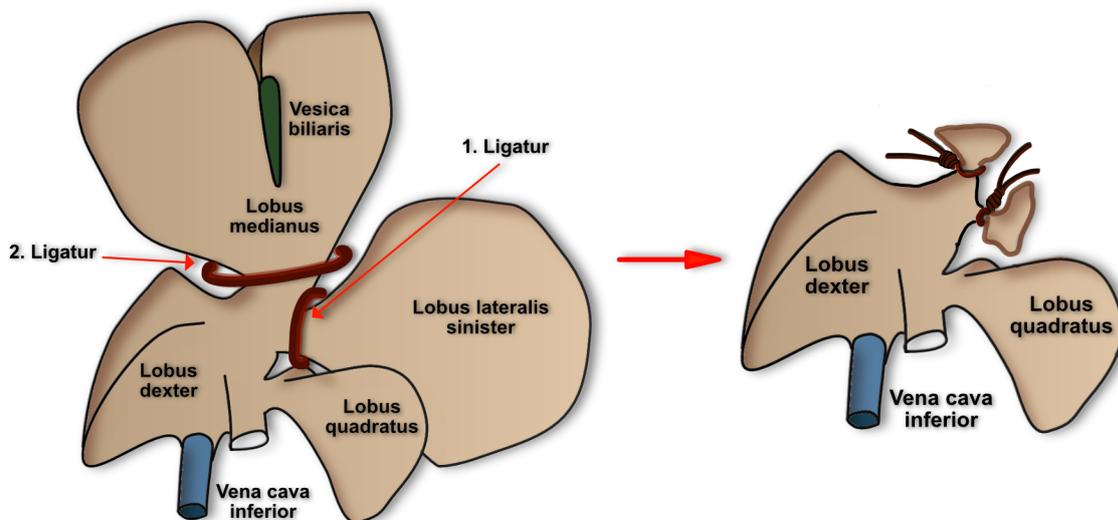


Abb. 1 Schematische Darstellung des OP-Situs der 2/3-PHx in der Maus

Der Lobus medianus ist in dieser Darstellung nach oben mobilisiert (links). Darunter liegend findet sich der Lobus lateralis sinister, der zuerst pedikelnah ligiert wird. Anschließend erfolgt die zweite Ligatur am Lobus medianus. Hierbei muss auf ausreichenden Abstand zur V. cava inferior geachtet werden. Der Lobus medianus wird im Gesamten mit der Gallenblase reseziert. Die Entfernung beider Lappen entspricht einer Reduktion der Lebermasse um ca. 67 %. In der Folge kommt es zum kompensatorischen Wachstum der verbleibenden Lappen (rechts). Modifiziert nach Mitchell et al. [12].

1.2.2 Tetrachlormethan

Neben dem chirurgischen Modell der 2/3-PHx ist es möglich, eine akute Schädigung durch die systemische Applikation von Tetrachlormethan (CCl_4) zu induzieren. Das Trichloromethan-Radikal $\text{CCl}_3\cdot$ ist der hepatotoxisch wirkende Metabolit und führt durch Peroxidation von Lipiden zur Zerstörung von Zellmembranen und somit zu zentrolobulären Nekrosen in der Leber [17, 18]. CCl_4 kann intraperitoneal appliziert werden und die kontinuierliche Anwendung über einen längeren Zeitraum erlaubt zudem die Untersuchung der chronischen Leberregeneration bei chronischer Entzündung.

1.2.3 Dimethyl- oder Diethylnitrosamin

Dimethyl- bzw. Diethylnitrosamin (DMN/DEN) wird durch das hepatische Enzym Cytochrom P-450 2E1 hydroxyliert, was zur Bildung von Diazoniumionen führt. Als biologisch aktive Metabolite alkylieren Diazoniumionen Nukleinsäuren [19]. Die somit induzierten DNA-Mutationen führen zur Schädigung von Hepatozyten und Entwicklung von Tumorzellen [20]. Leberschäden und Nekrosen entstehen zentrolobulär und periportal mit der zusätzlichen Bildung fibrotischer Septen. Das DMN/DEN-Modell ist besonders geeignet, um den Progress fibrotischen Gewebes zum hepatozellulären Karzinom (HCC) zu untersuchen.

1.2.4 Thioacetamid

Thioacetamid (TAA) ist das Amid der Thioessigsäure und wirkt sowohl hepatotoxisch als auch karzinogen. Der bioaktive Metabolit TAA-S-oxid, der zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zählt, bindet kovalent an Makromoleküle in den Hepatozyten, was zelluläre Schädigung und Nekrosen hervorruft. Eine längere Applikation induziert die Bildung von Bindegewebssepten und führt schließlich zur Leberzirrhose [21]. Neben der Injektion von TAA ist auch die Beimischung in das Trinkwasser der Versuchstiere möglich.

1.3 Die Regeneration der Leber nach akuter Schädigung

Der Verlust von Lebermasse durch 2/3-PHx oder CCl_4 führt zum Eintritt vitaler, adulter Hepatozyten aus ihrem Ruhezustand (G_0) in die G_1 -Phase des Zellzyklus. Anschließend teilen sie sich durchschnittlich zwei- bis dreimal, wobei Transplantationsexperimente zeigen, dass das maximale Replikationspotenzial mit bis zu 69 Zellteilungen weitaus höher liegt [22]. In der gesunden, ausgewachsenen Leber finden sich unter Ruhebedingungen kaum proliferierende Hepatozyten [23], nach PHx proliferieren hingegen synchron bis zu 95 % der Hepatozyten.

Einleitung

Die Leberregeneration wird übersichtshalber in drei Phasen eingeteilt: die Initiations-, Progressions- und Terminationsphase (**Abb. 2**).

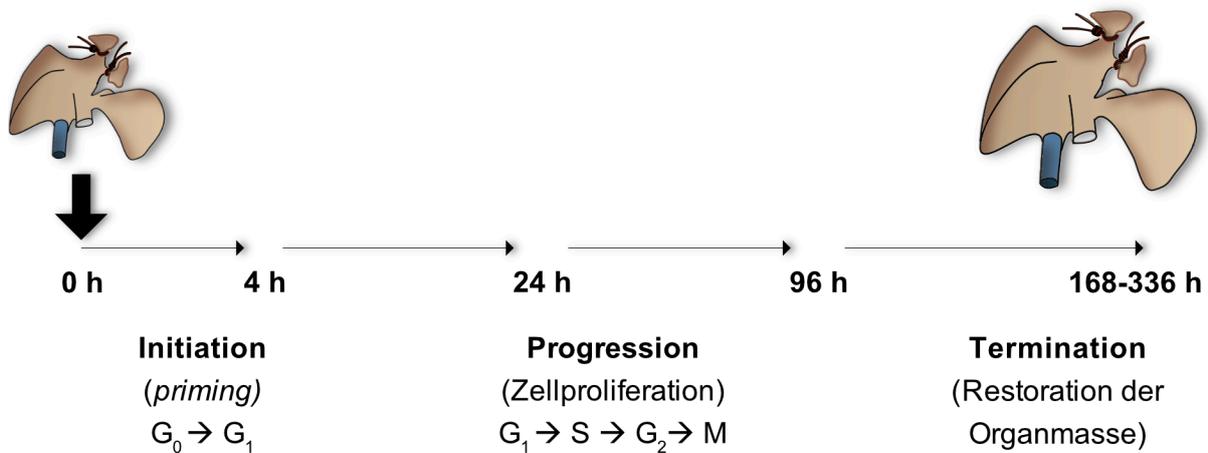


Abb. 2 Schematische Darstellung der Leberregeneration

Durch die PHx werden adulte Hepatozyten aus dem Ruhezustand in die G_1 -Phase des Zellzyklus versetzt. Wachstumsfaktoren wie HGF, TGF- α oder HB-EGF fördern die Expression von Zellzyklusproteinen und somit die Progression durch den Zellzyklus. Die adulten Hepatozyten teilen sich zwei- bis dreimal und stellen die benötigte Lebermasse wieder her. Terminiert wird der Prozess durch Faktoren wie TGF- β oder Activin A. Die Leberregeneration ist in Mäusen nach ca. 7-10 Tagen beendet.

1.3.1 Die Initiationsphase

Adulte Hepatozyten werden nach dem schädigenden Stimulus (z. B. PHx, PVL, CCl₄ etc.) durch ein Netzwerk aus molekularen Mediatoren (z. B. Zytokine) sowohl für extra- als auch intrahepatische Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- α und HGF sensitiviert, was auch als *priming* bezeichnet wird. Sogenannte *immediate early genes*, wie c-Fos oder β -Catenin, die den Eintritt der Leberzellen von der G_0 - in die G_1 -Phase sowie die frühe Progression durch die G_1 -Phase stimulieren, werden exprimiert und tragen so zu einer späteren DNA-Synthese und Zellreplikation bei [15, 24-35]. Dabei kommt es auch zum Umbau der extrazellulären Matrix und Freisetzung wichtiger Wachstumsfaktoren. Es existieren verschiedene Erklärungsansätze für die sofortige Expression dieser Gene und Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren. Zum einen erhöht sich nach 2/3-PHx die portalvenöse Flussrate pro Lebervolumen um das Dreifache und stimuliert über Mechanorezeptoren den Regenerationsprozess [36]. Zum anderen enthält das Portalvenenblut nun die dreifache Konzentration an wachstumsstimulierenden Signalmolekülen, wie Insulin aus dem Pankreas und EGF aus den Brunnerschen Drüsen des Duodenums, die zusammen einen synergistischen Effekt auf die Leberregeneration zeigen [37]. Vollumfänglich sind die ausschlaggebenden Startsignale jedoch nicht endgültig identifiziert.

Einleitung

Zu den Zytokinen, die auf die Leberregeneration Einfluss nehmen, zählen insbesondere IL-6 und TNF- α [38, 39]. So weisen TNF- α -Rezeptor 1 (TNFR1)-defiziente Mäuse schwere Defizite in der Proliferation der Hepatozyten in den ersten vier Tagen nach 2/3-PHx auf. TNF- α - und TNFR2-defiziente Mäuse regenerieren hingegen ohne Einschränkung. In Mäusen, die sowohl defizient für Lymphotoxin- α , einem weiteren Mitglied der TNF-Superfamilie, als auch für TNF- α sind, ist die Regeneration in der Leber wiederum inhibiert [40-43]. Die Aktivierung des TNF-Signalwegs ist also notwendig für die Regeneration, jedoch vermutlich nicht durch TNF- α als einzigen Liganden.

Die Datenlage zu IL-6 ist zwar heterogen, eine zentrale Rolle für den Ablauf der Leberregeneration gilt jedoch als gesichert. IL-6 wird nach PHx aus Kupffer-Zellen freigesetzt und bindet an den IL-6-Rezeptor auf Hepatozyten [44]. Die Bindung führt zur Aktivierung von JAK und STAT3, letzteres transloziert als Dimer in den Nukleus. Cressman *et al.* zeigen, dass die Unterdrückung der IL-6-Expression während der Leberregeneration zum Leberversagen führen kann [45]. In einer anderen Studie von Sakomoto *et al.* verzögert sich zwar die Regeneration, am Ende besteht aber kein Unterschied zwischen Kontrollen und IL-6-KO-Mäusen bzw. keine Nekrosen oder Leberversagen sind detektierbar. Die Autoren schreiben IL-6 eine regulierende Funktion auf Mitose und Apoptose zu [46]. Wuestefeld *et al.* postulieren, dass IL-6 weniger in die Triggerung des Zellzyklus als vielmehr in die Aktivierung protektiver Signalwege zum Schutz der Hepatozyten vor Stresssignalen, wie bakterieller Infektionen nach 2/3-PHx, involviert ist [47]. Interessant sind hierzu die Ergebnisse zu SOCS3, dem negativen Regulator des IL-6-Signalwegs. Riehle *et al.* stellen die Hypothese auf, dass in hepatozytenspezifischen SOCS3-KO-Mäusen eine verlängerte Akute-Phase-Reaktion mit einer überschießenden Zytokinkonzentration zu erhöhter Toxizität und verringerter Regeneration führt. In den Experimenten zeigt sich jedoch, dass das Fehlen von SOCS3 in Hepatozyten zwar zu einer verlängerten Akute-Phase-Reaktion führt, allerdings auch zu einer beschleunigten Regeneration sowie einer Erhöhung von p-ERK1/2 (MAPK) [48]. Gestützt wird dieser Befund durch Ergebnisse von Primärkulturen mit Hühnerhepatozyten, wo eine zeit- und dosisabhängige IL-6-Applikation zur Proliferation via PKC-, p44/42 MAPKs- und PPAR δ -Signalwege führt [49]. Die Daten zeigen insgesamt, dass die Einteilung in Phasen artifiziell und hilfreich für die Analysen ist, diese jedoch in der Realität eng zusammenhängen und Entzündungsmediatoren unmittelbar die Proliferation beeinflussen. Weiterhin wird deutlich, dass je nach Experimentalansatz und Methodik die Ergebnisse deutlich variieren können, worauf im späteren Diskussionsteil noch näher eingegangen wird.

1.3.2 Die Progressionsphase

In der Progressionsphase durchlaufen die Hepatozyten die G₁-Phase bis zum Restriktionspunkt und treten anschließend in die S-Phase ein. Die Progression des Zellzyklus wird primär durch Wachstumsfaktoren beeinflusst. Dabei spielen insbesondere HGF und die EGF-Superfamilie, bestehend aus den Liganden EGF, TGF- α , HB-EGF und Amphiregulin, eine essentielle Rolle. Zarnegar *et al.* zeigen, dass in Ratten nach PHx sowohl HGF im Serum als auch die mRNA-Expression zu frühen Zeitpunkten in der Leber ansteigt [50]. Fallen die Rezeptoren für HGF (c-Met) und die Liganden der EGF-Superfamilie (EGFR) aus, führt dies zu einem kompletten Verlust der Regenerationsfähigkeit und somit zum akuten Leberversagen. Fällt dagegen nur einer der beiden Rezeptoren aus, sorgt die Redundanz des Netzwerks aus Wachstumsfaktoren für einen (wenn auch eingeschränkten) Erhalt der Regenerationskapazität [51]. Dies verdeutlicht, wie c-Met und EGFR synergistisch die Leberhomöostase auch unter physiologischen Umständen aufrechterhalten. Die Aktivierung des HGF/c-Met-Signalwegs führt in Hepatozyten zur G₁-S-Progression, indem MAPK-, PI3K/Akt-, Rac/Pak- sowie Crk/Rap1-Signalwege aktiviert werden (**Abb. 3**) [52, 53]. Besonders die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs führt zur positiven Regulation des Zellwachstums sowie -zyklus und der Proteinbiosynthese via S6-Kinase, 4EBP1 sowie ULK1 [54, 55]. Die Expression von Cyclin D1 wird ebenso über den mTOR-Signalweg beeinflusst [56].

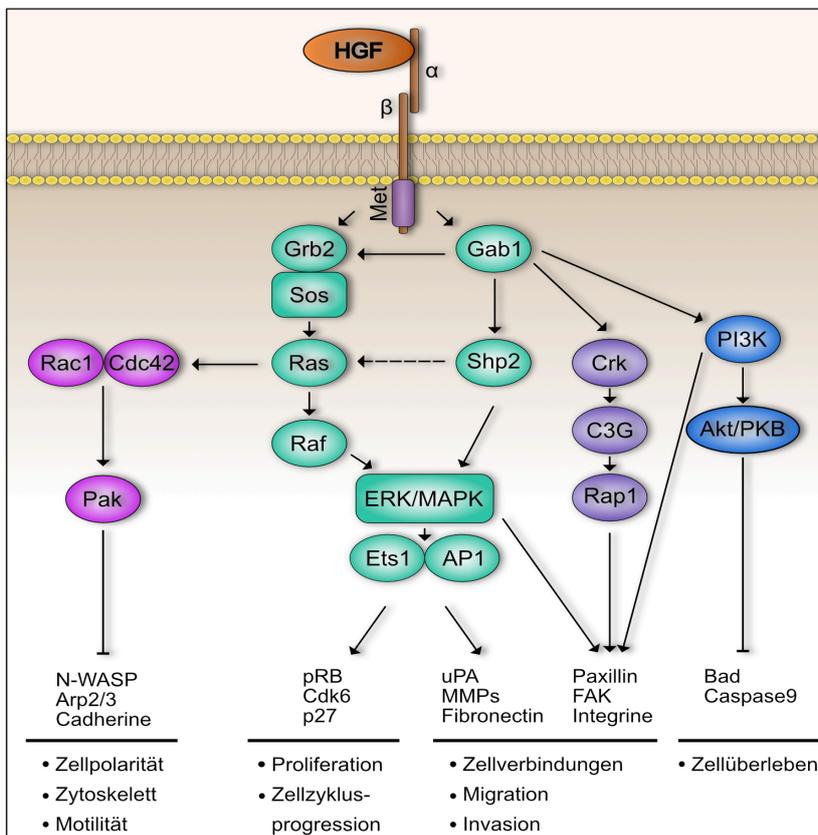


Abb. 3 Darstellung der durch HGF/c-Met aktivierten Signalwege

Der Wachstumsfaktor HGF bindet an den Rezeptor c-Met. Daraufhin werden der MAPK-, PI3K/Akt-, Rac/Pak- sowie Crk/Rap1-Signalweg aktiviert. Insgesamt fördern alle Signalwege Zellüberleben und Zellteilung. Insbesondere auf den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wird später in dieser Arbeit noch eingegangen. Modifiziert nach Birchmeier *et al.* [53].

Die Mitogene fördern auf zellulärer Ebene die Expression von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die den Ablauf des Zellzyklus regulieren. Am Restriktionspunkt phosphoryliert der Cyclin D/CDK4/6-Komplex das Retinoblastom-Protein (Rb), was zur Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren führt. Daraufhin steigt die Expression von Cyclin E und CDK2, die den Cyclin E/CDK2-Komplex bilden. Wie der Cyclin D/CDK4/6-Komplex phosphoryliert auch Cyclin E/CDK2-Komplex Rb, sodass Rb nun hyperphosphoryliert vorliegt. Die G₁-S-Transition wird eingeleitet [57, 58]. Ab diesem Punkt läuft der Zellzyklus ohne extrazelluläre Wachstumsfaktoren weiter ab [59]. Rb verbleibt im phosphorylierten Zustand, bis die Zelle sich in der Mitose teilt und anschließend entweder in die G₀- oder erneut in die G₁-Phase eintritt. In der S-Phase wird die DNA repliziert. Der Höhepunkt der DNA-Replikation findet in Mäusen 36-40 h nach der Operation statt [60]. Kommt es zum Verlust eines Wachstumsfaktors, wird dies durch andere Proliferationsfaktoren kompensiert und führt nicht unmittelbar zu einem kompletten Ausfall der Regenerationsfähigkeit.

1.3.3 Die Terminationsphase

Nach ca. 7-10 Tagen ist der Regenerationsprozess der Leber in Ratten und Mäusen beendet und das ursprüngliche Lebergewicht wiederhergestellt [37]. Verschiedene Mechanismen und Signalwege werden als Terminationssignale diskutiert. So zeigt beispielsweise TGF- β als multifunktionales Zytokin, welches in der Leber von nicht-parenchymatösen Zellen (NPCs), wie Kupffer- oder Ito-Zellen, aber auch von Hepatozyten sekretiert wird, einen negativen Effekt auf die Proliferation der selbigen [61, 62]. Zunächst als Proprotein exprimiert wird es im Golgi-Apparat in das sogenannte *latency-associated peptide* (LAP) sowie das reife TGF- β gespalten. Nach der Sekretion bleibt TGF- β inaktiv, indem LAP über Disulfidbrücken nicht-kovalent bindet. Nach der extrazellulären Spaltung von LAP-TGF- β durch z. B. Matrixmetalloproteinasen entsteht die biologisch aktive Form, die an den Rezeptor bindet und über die Phosphorylierung der R-Smad-Proteine signalisiert [63]. Ein Effekt auf die Termination der Leberregeneration wird vermutet, da die Expression von TGF- β nach 4 h ansteigt und den Höhepunkt nach 72 h erreicht, nachdem Proliferation und DNA-Synthese abgeschlossen sind. Der wichtigste Subtyp ist dabei TGF- β 1 [64]. Über verschiedene Mechanismen hemmt TGF- β 1 die Proliferation: Zum einen wird die EGF-induzierte DNA-Synthese in Hepatozyten supprimiert [65], zum anderen induziert TGF- β 1 einen Zellzyklusarrest am G₁-S-Checkpoint durch Blockade der Rb-Phosphorylierung [66]. Weiterhin fördert TGF- β 1 die Expression des Zellzyklusinhibitors p15^{INK4}, der CDK 4/6 sowie Cyclin D1 und E inhibiert [67]. *In vitro*-Experimente zeigen zudem, dass die Synthese und Sekretion von HGF durch TGF- β beeinträchtigt wird [68].

Activin A ist ein weiteres Mitglied der TGF- β -Superfamilie, das einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von Hepatozyten zeigt und auch via R-Smad-Proteine signalisiert. Activin A wirkt autokrin und zeigt eine nahezu komplette Inhibition der EGF- sowie HGF-vermittelten DNA-Synthese [69, 70]. Die Inhibition der Proliferation wird letztlich durch die Expression von Zellzyklusinhibitoren vermittelt. Bekannte Zellzyklusinhibitoren sind p21^{CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} [71, 72]. Eine erhöhte Expression während der Leberregeneration kann auf ein Stoppsignal im Zellzyklus und auf eine verlangsamte Proliferation hinweisen.

1.4 Immunität und Regeneration

Das Immunsystem spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen entzündlichen Erkrankungen der Leber. Zunehmend existiert Evidenz dafür, dass Toll-like Rezeptoren (TLRs) des angeborenen Immunsystems an der Entstehung und Progression leberspezifischer Erkrankungen wie der alkoholischen und nicht-alkoholischen Steatohepatitis, viraler und autoimmuner Hepatitiden, der Leberzirrhose sowie des hepatozellulären Karzinoms beteiligt sind [73-76]. Anzumerken ist hier, dass die genannten Erkrankungen überwiegend mit chronischen Entzündungsprozessen verbunden sind. Nichtsdestotrotz lässt die Expression und erhöhte Konzentration von inflammatorischen Zytokinen und Entzündungsmediatoren zu Beginn der Leberregeneration den Schluss zu, dass Komponenten des Immunsystems wie die TLRs ebenso hierbei involviert sind.

1.4.1 Leberregeneration und Toll-like Rezeptoren

Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) detektieren sowohl körperfremde Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) als auch körpereigene Gefahrensignale, sogenannte Gefahr-assoziierte molekulare Muster (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) [77, 78]. Neben der Expression der PRRs auf Zellen des angeborenen Immunsystems finden sie sich auch auf Hepatozyten. Zu den PRRs werden die TLRs gezählt. Hepatozyten exprimieren mRNA aller TLR-Typen und reagieren auf multiple PAMPs [79-83]. Bislang sind 12 TLRs im Menschen bekannt, in der Maus finden sich 13 unterschiedliche TLRs. TLR1-9 finden sich in beiden Spezies (**Tab. 1**). TLRs sind Typ I-Transmembranproteine und zeichnen sich strukturell durch eine extrazelluläre LRR-Domäne zur Bindung der Liganden sowie eine intrazelluläre, zytoplasmatische TIR-Domäne, worüber die Signaltransduktion initiiert wird, aus. Nach Bindung eines pathogenen Liganden assoziiert das Adapterprotein MyD88 mit allen TLRs außer TLR3. TLR3 signalisiert ausschließlich über TRIF. Die MyD88-abhängigen sowie -unabhängigen Signalwege führen zur Aktivierung diverser pro-inflammatorischer

Signalkaskaden und Transkription von NF κ B, JNK/AP-1, ERK, IRF, p38 oder Interferonen [84, 85]; also jenen Mediatoren, denen auch ein Einfluss bei regenerativen Prozessen zugeschrieben wird. In verschiedenen Organen wird so neben der Abwehr von Erregern durch die Regulation der Entzündung die Erneuerung von Gewebe beeinflusst. So zeigen TLR4/MyD88-defiziente Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen stärkere Entzündungszeichen und eine geringere Epithelregeneration des Darms nach DSS-induzierter Kolitis [86]. Die Stimulation von TLR4 durch LPS, der sowohl mit MyD88 als auch TRIF als Adapterproteine interagiert, erhöht zudem die Expression des EGFR-Liganden und Wachstumsfaktors Epiregulin. TLR4^{-/-}-Mäuse sind also anfälliger für die experimentell-induzierte Kolitis, entwickeln jedoch seltener Tumoren [87, 88]. Auch bei Verletzungen der Haut zeigt sich ein Einfluss von TLRs auf die Regeneration. In MyD88-defizienten Mäusen verzögert sich die Wundheilung der Haut, da die Produktion angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF durch Makrophagen reduziert ist [89].

Die Datenlage zur Leberregeneration zeigt, dass TLRs eine Rolle spielen. Einen Einfluss auf regenerative Abläufe in der Leber konnten Seki *et al.* bestätigen, indem MyD88^{-/-}-Mäuse eine eingeschränkte Leberregeneration und Zytokinproduktion aufwiesen. Im Gegensatz dazu konnten Campbell *et al.* keine Einschränkung in der DNA-Synthese und Regeneration nachweisen [90, 91]. Diskrepanzen der Ergebnisse könnten durch variierende Zuchtbedingungen in unterschiedlichen Einrichtungen erklärt werden [92]. Dies kann zu Änderungen in der intestinalen Mikroflora führen [92]. Kommt es zur Elimination gastrointestinaler Pathogene in keimfreien Mäusen, führt dies zu einer verzögerten Leberregeneration [93]. Ein weiterer Befund der Studien ist, dass die Regeneration bei Verlust einzelner MyD88-abhängigen TLRs wie TLR2, TLR4 sowie TLR9 uneingeschränkt stattfindet [90, 91]. Vielmehr fördert TLR4 MyD88-abhängig die Fibrosierung der Leber über das Herabregulieren des TGF- β -Pseudorezeptors Bambi in inaktiven Ito-Zellen, um die TGF- β -vermittelte Aktivierung und Kollagenproduktion durch Ito-Zellen zu steigern [94]. Auch Mäuse, die kein TLR9 exprimieren, sind weniger anfällig für Leberfibrose [95]. Mit der Steuerung pro-inflammatorischer Signalwege nehmen TLRs Einfluss auf regenerative und entzündliche Prozesse und somit auch auf die Struktur der hepatischen extrazellulären Matrix und proliferative Kapazität der umliegenden Zellen.

Einleitung

Toll-like Rezeptor	Lokalisation	Ligand
TLR1/2	Plasmamembran	Grampositive Bakterien: Lipoproteine, Triacylpeptide, Lipoteichonsäure
TLR2/6	Plasmamembran	Diacyl-Lipopeptide
TLR3	Endosom	dsRNA
TLR4	Plasmamembran	Gramnegative Bakterien: LPS
TLR5	Plasmamembran	Flagellin
TLR7	Endosom	ssRNA (HIV-1, <i>vesicular stomatitis virus</i> , Influenza A-Virus)
TLR8	Endosom	ssRNA, Imidazoquinoline
TLR9	Endosom	CpG-unmethylierte DNA
TLR10	Plasmamembran	Triacyllipopeptide

Tab. 1 Übersicht über Lokalisation und Liganden der TLRs

1.4.2 Der Toll-like Rezeptor 3

Der einzig bekannte TLR, der unabhängig von MyD88 signalisiert, ist TLR3. Im Jahr 2001 wurde TLR3 als Sensor viraler dsRNA bzw. poly(I:C), einer synthetischen Ribonukleinsäure, erstmalig beschrieben [96]. TLR3 gehört mit TLR7, TLR8 und TLR9 zu der Gruppe von TLRs, die sich in der Membran von Endosomen intrazellulär befinden (**Abb. 4**). Dort erfolgt die Detektion sowohl körpereigener als auch körperfremder (z. B. viraler) dsRNA. Durch die Bindung von dsRNA an die hufeisenförmige Ektodomäne des TLR3 erhöht sich die Stabilität des Rezeptors und es folgt die Bildung eines Homodimers. Das TLR3-Homodimer führt zur Rekrutierung des Adapterproteins TRIF. Wird TRIF rekrutiert, werden im Wesentlichen zwei Signalwege aktiviert: der TRIF-IRF3-IFN- sowie der TRIF-NF κ B-Signalweg. Die Steuerung der antiviralen Antwort erfolgt durch die Aktivierung der TRIF-IRF3-Achse. Das nicht-kanonische I κ B Kinase (IKK)-Homolog IKK- ϵ und TBK1 stellen die Schnittstelle zwischen TRIF und IRF3 dar, indem sie IRF3 phosphorylieren und die Transkription IRF3-abhängiger Gene wie Typ I Interferone (IFN- α und IFN- β) und pro-inflammatorischer Zytokine fördern [97, 98]. Die Aktivierung der TRIF-NF κ B-Achse erfolgt über die Assoziation von TRIF mit Rip1 am C-Terminus sowie mit TRAF6 am N-Terminus [99]. Die Rekrutierung von Rip3 führt dagegen zu einer negativen Regulation dieses Signalweges [100]. IRF und NF κ B induzieren die Aktivierung von Typ I-Interferonen (IFN- α , IFN- β) und pro-inflammatorischer

Zytokine/Chemokine einschließlich *neutrophil chemoattractant*, Interleukin-8, RANTES, IL-6 und IL-1 β und TNF- α [85]. In der Leber wird TLR3 von Hepatozyten, Kupffer-Zellen, Epithel-Zellen und nicht-ortsständigen Immunzellen exprimiert [82]. Der aktuelle Stand der Forschung weist neben der Steuerung der antiviralen Immunantwort sowie Zytokinproduktion und Aktivierung des erworbenen Immunsystems auf weitere Funktionen des TLR3 hin. So bewirkt beispielsweise im Rahmen der *wound-induced hair neogenesis* die Aktivierung von TLR3 durch dsRNA aus geschädigten Zellen eine effektivere Regeneration der Haarfollikel [101, 102]. In einem HCC-Mausmodell führt die Injektion von poly(I:C), einem TLR3-Liganden, zu einem verzögerten Tumorwachstum und zur Hemmung der Angiogenese [103]. Liu *et al.* zeigen dagegen, dass TLR3 zur pulmonalen Metastasierung von Tumoren beiträgt [104]. In der SW620-Zelllinie (metastasiertes Kolon-Karzinom) ist TLR3 hochreguliert und trägt über die Produktion von Chemokinen (CXCL10, CXCL8 etc.) zur Migration und Invasivität der Tumorzellen bei. Weiteren Einfluss auf Zellmigration und Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) nimmt TLR3 vermutlich über Serinproteasen wie die Urokinase (u-PA, *urokinase-type plasminogen activator*) [105]. Die Bindung von u-PA an den Rezeptor (u-PAR) führt zur Produktion von aktivem Plasmin und zur Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Darüber hinaus folgt der Stimulation von TLR3 mit poly(I:C) eine erhöhte Expression von MMPs wie MMP-9 oder MMP-13 [106]. Hierbei ist zu erwähnen, dass der Umbau der ECM auch bei der Regeneration der Leber für die Freisetzung aktiver Wachstumsfaktoren wichtig ist.

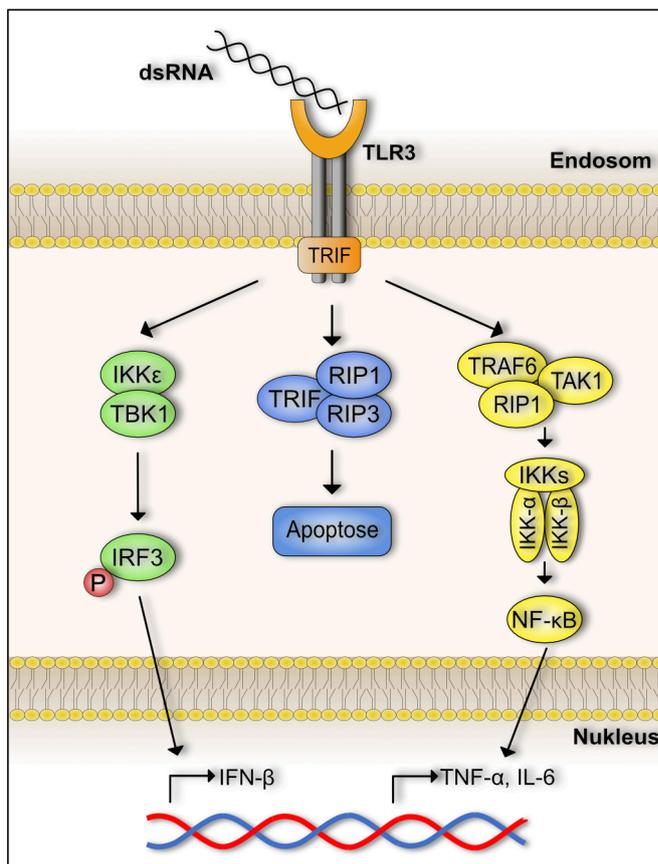


Abb. 4 Schematische Darstellung des TLR3-Signalwegs

Virale oder körpereigene dsRNA (Helix in schwarz) bindet im Endosom an den TLR3. Der Rezeptor wird aktiviert und über das Adapterprotein TRIF werden verschiedene Signalwege induziert. Dies führt zur Expression von proliferationshemmenden Interferonen und entzündungs-induzierenden Mediatoren wie TNF- α oder IL-6. Welche Signalwege überwiegend aktiv sind und damit entweder zu einer proliferationsfördernden oder -hemmenden TLR3-abhängigen Immunantwort führen, hängt von Faktoren wie dem Zelltyp, der Art der Schädigung und des Ligandentyps ab. Modifiziert nach Ramnath *et al.* [107].

1.5 Translationale Aspekte der Leberregeneration

In der Klinik werden Kenntnisse zu Regenerationsprozessen der Leber bei der Durchführung onkologischer Leberteileresektionen, bei Lebertransplantationen (*split liver*-Transplantationen) oder bei der Behandlung akut toxischer Schädigungen der Leber durch Medikamente oder Toxine benötigt. Die Regeneration beginnt bereits innerhalb eines Tages und kann abhängig von der Pathologie nach ungefähr drei Monaten abgeschlossen sein [108]. Ist die Regenerationskapazität der Leber hingegen unzureichend bzw. das funktionelle Restvolumen der Leber zu klein, kann dies zu Komplikationen wie beispielsweise zum postoperativen Leberversagen (*post hepatectomy liver failure*, PHLF) führen. Die Angaben zur Häufigkeit des PHLF variieren in der Literatur abhängig vom Operationsverfahren von 1-35 % [109-115]. Das postoperative Leberversagen ist nach wie vor eine der Hauptkomplikationen nach hepatischen Majorresektionen. Ein tieferes Verständnis der Leberregeneration kann dazu beitragen, zukünftig zum einen Patienten besser vorselektionieren zu können und zum anderen kurative, chirurgische Therapien zu ermöglichen, wenn ein fortgeschritteneres Tumorstadium vorliegt. Auch die Weiterentwicklung chirurgischer Techniken basiert auf einem besseren Verständnis der Regeneration der Leber. Dies schlägt sich nieder in der Kombination aus Portalvenenembolisation (PVE), Portalvenenligation (PVL) und chirurgischer Resektion. Neben konventionellen Ansätzen wie der alleinigen PVE oder der PVE mit zweizeitiger Hepatektomie beschreiben Schnitzbauer *et al.* 2012 erstmalig die Durchführung der *associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy* (ALPPS) in einer Serie von 25 Patienten, die zu einer Vergrößerung der Lebersegmente II und III von bis zu 74 % innerhalb von 9 Tagen führte, was sich gegenüber den bisherigen Methoden als überlegen erwies [116]. *Ultima ratio* bei PHLF oder einem Leberversagen anderer Genese ist die Lebertransplantation (LTx). Generell ist es bei Lebendspendern oder postmortalen *split liver*-Transplantationen unabdingbar, dass die verbleibenden Leberlappen (*future liver remnant*, FLR) ausreichende Regenerationskapazität besitzen. Die Regeneration scheint hier vor allem positiv mit dem Peak der Portalvenen-Flussgeschwindigkeit (*portal vein velocity*, PVV) sowie der Flussgeschwindigkeit der A. und V. hepatica zu korrelieren – also mit einer Hyperperfusion – sowie negativ mit der *graft-to-recipient weight ratio* (GRWR) [117]. Für die hier vorgestellten chirurgischen Therapien und Techniken liefern die molekularbiologischen Untersuchungen der hepatischen Regenerationskapazität Möglichkeiten zur Weiterentwicklung, um letztlich die medizinische Versorgung von vielen Patienten verbessern zu können.

1.6 Zielsetzung

Die Leberregeneration wird durch ein komplexes System aus Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren induziert, das in seiner Gesamtheit unabdingbar ist für eine effiziente Regeneration. Das angeborene Immunsystem ist Teil dieses Systems. Wie in den Abschnitten zuvor dargestellt, ist die aktuelle Datenlage jedoch teils kontrovers und komplexe Zusammenhänge sind noch nicht gänzlich verstanden. Dies trifft besonders auf die Rolle der TLRs zu. Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht dabei TLR3. Die Rolle von TLR3 in der Immunantwort ist gut untersucht. Verschiedene Studien zeigen für TLR3 jedoch weitere biologische Einflüsse im Rahmen der Kanzerogenese, Zellmigration und -proliferation, Invasivität und Geweberegeneration. Die Aktivierung des TLR3 führt dabei zur Expression und Sekretion sowohl anti- als auch pro-proliferativer Proteine und Zytokine. Deshalb sind stimulierende und hemmende Auswirkungen von TLR3 auch auf die Leberregeneration denkbar (**Abb. 4**).

Durch den Einsatz transgener TLR3-Stp-Versuchstiere, die TLR3 nicht exprimieren, sowie TLR3-Mye-Mäusen, die TLR3 ausschließlich in Monozyten und Makrophagen exprimieren, soll der biologische Einfluss des Rezeptors auf die Leberregeneration charakterisiert und die Rolle von TLR3 als Regulator proliferativer Prozesse untersucht werden. Als Regenerationsmodell dient dabei die 2/3-PHx. Im Anschluss erfolgt die biomolekulare, proteinbiochemische und histologische Analyse der Leber und des Serums von TLR3-Stp- sowie TLR3-Mye-Mäusen und WT-Kontrolltieren. Zunächst wird die Initiationsphase untersucht (IL-6 und TNF- α , *immediate early genes* etc.). Danach folgt die Untersuchung der Progressionsphase anhand der einzelnen Zellzyklusabschnitte und relevanter Zellzyklusproteine. So soll gezeigt werden, an welchen Stellen im Zellzyklus sich Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und den Wildtypen finden. Ausgehend von diesen Ergebnissen werden weitere für die Leberregeneration relevante Mediatoren und Signalwege analysiert, um Erklärungsansätze vorzustellen, die den Zusammenhang von TLR3 und der Zellproliferation in der Leber beschreiben.

2 Material

In den Abschnitten 2.1 bis 2.10 werden die eingesetzten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Versuchstiere mit deren Bezugsquellen aufgeführt.

2.1 Geräte und technisches Zubehör

Geräte	Bezugsquelle
BIORUPTOR® Ultrasound	Diagenode, Seraing (Ougrée), Belgium
HydroFlex™ <i>microplate washer</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Entwässerungsmaschine ASP200S	Leica Microsystems, Wetzlar
Einbettmaschine EG 1160	Leica Microsystems, Wetzlar
Gelkammer	Bio-Rad Laboratories, München
LightCycler 480 II	Roche, Mannheim
Mikroskop Zeiss Observer Z1 (Objektiv: Achroplan 20 x/0,45 ∞/0,17) + Kamera (AxioCam MRc 5)	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop StemiDV4 Spot (8-32 x/0,63)	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrotom RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar
Mithras LB940	Berthold, Bad Wildbad
Mixing Rotor	Renner, Darmstadt
Nadelhalter, gerade	Plazotta GmbH, München
Nadelhalter, gebogen	Plazotta GmbH, München
NanoDrop® 1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Narkosegerät/Vaporizer	Völker GmbH, Kaltenkirchen
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Berlin
OPTIMAX X-Ray Film Processor	Typon Medical Systems, Burgdorf
pH-Meter Inolab	WTW/Xylem Analytics, Weilheim
Pinzette, gebogen	Plazotta GmbH, München
Pinzette, gerade	Plazotta GmbH, München
Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Reinstwasseranlage Purelab-Ultra	ELGA LabWater, Celle
Retraktor	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

Material

Schere, gebogen (ToughCut® La Grange)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Schere, gerade	Plazotta GmbH, München
Sterilbank	Heraeus, Hanau
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tissue Lyser Qiagen® LT	Quiagen GmbH, Hilden
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Waage 0,1 g	Kern & Sohn GmbH, Balinge-Frommern
Waage Sartorius Analytic 0,1 mg	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

2.2 Software

Affinity Designer 1.7.2	Serif (Europe) Ltd., Nottingham, UK
AxoVision Rel. 4.5	Carl Zeiss, Oberkochen
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA
LightCycler® 480 Software 1.5.1	Roche, Mannheim
Adobe Photoshop 9.0	Adobe Inc., San José, USA
ImageJ	<i>Open Source</i>
PubMed NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, USA
EndNote X8	Clarivate Analytics, Jersey, USA

2.3 Chemikalien und Medien

Acrylamid	Bio-Rad Laboratories, München
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
APS	Sigma-Aldrich, München
<i>Blotting-Grade Blocker</i> (Milchpulver)	Bio-Rad Laboratories, München
BrdU	Becton Dickinson, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
<i>Cell Lysis Buffer</i> (10x)	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Citronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DEPC-H ₂ O	Sigma-Aldrich, München
<i>2x DyNAmo ColorFlash Probe</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Material

Ethanol absolut, vergällt	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol 96-100 % (rein)	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
EDTA	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
H ₂ O ₂ 30 % (Perhydrol®)	Merck, Darmstadt
Isofluran CP® 1 ml/ml	Cp Pharma, Burgdorf
<i>GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycerol-Gelatine	Sigma-Aldrich, München
Glycin PUFFERAN®	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Histosec® Pastillen (Paraffin ohne DMSO)	Merck, Darmstadt
Leupeptin Hemisulfat	Sigma-Aldrich, München
Methanol absolut für Analyse	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen
SDS	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaOH)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Bio-Rad Laboratories, München
Oligo(dT) ₁₈ Primer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
PFA 8 %	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München
PBS Dulbecco´s	Biochrom, Berlin
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, München
PMSF	Sigma-Aldrich, München
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
<i>Random Hexamer primer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>5x Reaction Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Re-Blot Plus Mild Solution (10x)</i>	Merck, Darmstadt
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BSA	Sigma-Aldrich, München
Roticlear® für die Histologie	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel (30 (37,5:1)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>RNase-free Water</i>	Quiagen GmbH, Hilden
Salzsäure rauchend 37 %, ROTIPURAN®	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serum (Maus, Ziege)	Sigma-Aldrich, München

Material

Tris-base M 121,14 g/mol
 Trypanblau
 TWEEN® 20 Detergenz

Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
 Merck, Darmstadt
 Calbiochem/Merck, Darmstadt

2.4 Antikörper

Tab. 2 gibt einen Überblick über die verwendeten Erstantikörper. Die eingesetzten Zweitantikörper sind in **Tab. 3** zusammengefasst.

Name	Spezies/ Isotyp	Anwendung	Gewicht [kDa]	Referenz
Anti-Maus BrdU	Maus	IHC	-	Calbiochem/Merck, Darmstadt
CDK1	Kaninchen	WB	34	abcam
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Kaninchen	WB	17, 19	Cell Signaling
Cyclin D1	Kaninchen	WB	35	Santa Cruz
Cyclin E1	Kaninchen	WB	48	Cell Signaling
p-Akt (Ser473)	Kaninchen	WB	60	Cell Signaling
p-Akt (Thr308)	Kaninchen	WB	60	Cell Signaling
p-CDK2 (Tyr160)	Kaninchen	WB	33	Cell Signaling
p-p70 S6 Kinase (Thr389)	Kaninchen	WB	70, 85	Cell Signaling
p-Rb (Ser807/811)	Kaninchen	WB	110	Cell Signaling
p-Smad2 (Ser465/467)	Kaninchen	WB	60	Cell Signaling
p-STAT3 (Tyr705)	Kaninchen	WB	79, 86	Cell Signaling

Tab. 2 Erstantikörper

Name	Konjugat	Spezies	Anwendung	Referenz
Anti-Maus Dako EnVision+	HRP	Ziege	IHC	Agilent Technologies, Waldbronn
Anti-Kaninchen IgG	HRP	Ziege	WB	Jackson

Tab. 3 Zweitantikörper

2.5 Stammlösungen und Puffer

In **Tab. 4** sind alle verwendeten Stammlösungen sowie Puffer aufgeführt.

Stammlösung / Puffer	Zusammensetzung
5 % BSA-Lösung	1 g BSA 20 ml TBS + 0,05 % Tween-20
20 x Citratpuffer, pH 6	42 g Citronensäure-Monohydrat 5 M NaOH 1 L H ₂ O _{dd}
10 x PBS-Puffer + Tween-20 (PBS-T): Waschpuffer für Western Blot	90,5 g PBS + 0,05 % Tween-20 1 L H ₂ O _{dd}
PFA 8 %, pH 7,4	80,0 g Paraformaldehyd 9,55 g PBS 5 M NaOH 1 L H ₂ O _{dd}
1 x PBS-Waschpuffer	9,55 g PBS + 1 L H ₂ O _{dd}
Ponceau S-Lösung	1 g Ponceau 25 ml 100 % Essigsäure 475 ml H ₂ O _{dd}
5 x SDS-Laufpuffer: Laufpuffer für SDS-Polyacrylamidgele	248 mM Tris-base 2 M Glycin 0,5 % (w/v) 17 mM SDS
1 x SDS-Probenpuffer, pH 6,8	15 % (w/v) Glycerol 10 % SDS 0,5 M Tris 0,5 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol
10 x TBS-Puffer, pH 7,6: Waschpuffer für immunhistochemische Analysen	24,2 g Tris-base 80 g NaCl 5 M HCl 1 L H ₂ O _{dd}
1 x Transferpuffer	48 mM Tris-base 39 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

Tab. 4 Überblick über die verwendeten Stammlösungen und Puffer

2.6 Enzyme

RevertAid™ H-Minus M-MuLV	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.7 Reagenzienkits

Dako Liquid DAB+ <i>Substrate Chromogen System</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
Pierce® ECL <i>Western Blotting Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce® BCA <i>Protein Assay Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Quantikine® ELISA mL-6 Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rnase free Dnase Set	Quiagen GmbH, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Quiagen GmbH, Hilden
SuperSignal® West Pico <i>Stable Peroxide Solution</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
WESTAR ηC Ultra 2.0 Cod.	Cyanagen, Bologna

2.8 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platte, weiß	Star Lab, Lübeck
<i>Adhesive Optical Film</i>	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Freiburg
Amersham™ Protran™ 0,45 µm	GE Healthcare, Freiburg
<i>Beads</i> (5 mm)	Quiagen GmbH, Hilden
<i>Blotting Papier</i>	Bio-Rad Laboratories, München
BD Micro-Fine™ + Demi 0,3 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
U-100 Insulin-Spritzen (0,3 mm 30 G x 8 mm)	
Cutasept Hautdesinfektionslösung	Bode, Hamburg
Dako Pen (Fettstift)	Agilent Technologies, Waldbronn
Deckgläser für die Mikroskopie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmalhandschuhe (unsteril)	Ansell Healthcare Europe, Brüssel
Ethilon 5-0 (nicht resorbierbar, monofil)	Ethicon, Cincinnati, USA
Filterpipettenspitzen	Kisker Biotech GmbH Co. KG, Steinfurt
Fixierklebeband	3M, St. Paul, USA
Kryoröhrchen 1,2 ml	Brand, Wertheim
Menzel-Gläser SUPEFROST® PLUS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Seide-Faden 4-0, geflochten	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Petrischale	Greiner-bio-one, Frickenhausen

Material

Pipettenspitzen	Star Lab, Lübeck
Reagenzgefäß (10 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reagenzröhrchen (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reagenzröhrchen SafeLock	Eppendorf, Hamburg
Reagenzröhrchen SafeLock	Sarstedt, Nümbrecht
Rotilabo®-Einbettkassetten	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SST Microtainer	Becton Dickinson, Heidelberg
Stieltupfer	Lohmann & Rauscher, Neuwied
U-bottom-96-Well-Platte	Becton Dickinson, Heidelberg

2.9 Oligonukleotide

In **Tab. 5** sind die Primer für die q-RT-PCR aufgeführt.

Name		Sequenz (F 5' → 3'; R 3' → 5')	Sonde
Activin A	F	ATC ATC ACC TTT GCC GAG TC	72
	R	TCA CTG CCT TCC TTG GAA AT	
β-Actin	F	AAG GCC AAC CGT GAA AAG AT	56
	R	GTG GTA CGA CCA GAG GCA TAC	
BIRC5	F	TGA TTT GGC CCA GTG TTT TT	97
	R	CAG GGG AGT GCT TTC TAT GC	
BTG2	F	GCG AGC AGG ACT CAA GGT T	1
	R	CCA GTG GTG TTT GTA ATG ATC G	
Cyclin A2	F	CTT GGC TGC ACC AAC AGT AA	4
	R	CAA ACT CAG TTC TCC CAA AAA CA	
Cyclin B1	F	GCT TAG CGC TGA AAA TTC TTG	38
	R	TCT TAG CCA GGT GCT GCA TA	
Cyclin D1	F	TTT CTT TCC AGA GTC ATC AAG TGT	72
	R	TGA CTC CAG AAG GGC TTC AA	
Cyclin E1	F	TTT CTG CAG CGT CAT CCT C	108
	R	TGG AGC TTA TAG ACT TCG CAC A	
MYC	F	CCT AGT GCT GCA TGA GGA GA	77

Material

	R	TCC ACA GAC ACC ACA TCA ATT T	
HGF	F	CAC CCC TTG GGA GTA TTG TG	100
	R	GGG ACA TCA GTC TCA TTC ACA G	
IL-6	F	GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A	6
	R	CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA	
IL-6ST (gp130)	F	AGG ACC AAA GAT GCC TCA AC	85
	R	TGA AGG AAG TTC GAG GAG ACA	
IL-6R α	F	ATC CTC TGG AAC CCC ACA C	53
	R	GAA CTT TCG TAC TGA TCC TCG TG	
MMP-9	F	ACG ACA TAG ACG GCA TCC A	19
	R	GCT GTG GTT CAG TTG TGG TG	
MMP-13	F	CTT TTC CTC CTG GAC CAA ACT	105
	R	TCA TGG GCA GCA ACA ATA AA	
p15 ^{INK4b}	F	AATAACTTCCTACGCATTTTCTGC	93
	R	CCCTTGGCTTCAAGGTGAG	
p21 ^{Cip1}	F	AAC ATC TCA GGG CCG AAA	16
	R	TGC GCT TGG AGT GAT AGA AA	
PLAT	F	TCA GTG CCT GTC CGA AGT T	40
	R	GCA CTG GCA GAC AAA GTC AG	
PLAU	F	GCC TTG GTG GTG AAA AAC TC	5
	R	CAC GCA TAC ACC TCC GTT C	
PLAUR	F	GGT TTC CAT AGC AAC CAG ACC	49
	R	GTT GGG AGT GCC ACA GAT G	
PLK3	F	GGC TGG CAG CTC GAT TAG	6
	R	GTT GGG AGT GCC ACA GAT G	
SOCS3	F	ATTCGCTTCGGGACTAGC	83
	R	AACTTGCTGTGGGTGACCAT	
TGFB1	F	CCT TCC TGC TCC TCA TGG	107
	R	CGC ACA CAG CAG TTC TTC TC	
TGFB2	F	AGG AGG TTT ATA AAA TCG ACA TGC	10
	R	TTG TAA CAA CTG GGC AGA CAG T	

Material

TNF- α	F	TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC	49
	R	GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT	
VGLL4	F	TGT GAA AAC GAC CAC GTC TC	41
	R	GCA GTC TCC GTT GAC AGT CTT	

Tab. 5 Überblick über verwendete q-RT-PCR-Primer

2.10 Versuchstiere

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die Experimente Versuchstiere der Art *Mus musculus* eingesetzt. Es wurden ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet, um einen Einfluss des Geschlechts auf die Leberregeneration auszuschließen [118, 119]. Zum Zeitpunkt der PHx lag das Alter der Versuchstiere bei 10-12 Wochen [12, 14]. **Tab. 6** gibt einen Überblick über die verwendeten Mauslinien. Die Hygienestandards der Einrichtungen orientieren sich an den Vorgaben der FELASA-Richtlinien und sind konform mit der EU-Richtlinie 86/609. Die Tiere wurden in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h gehalten und erhielten Wasser sowie Futter *ad libitum*.

Die tierexperimentellen Versuche wurden tierschutzrechtlich geprüft und anhand der Regierung Oberbayern geprüfter Protokolle durchgeführt. Eine Genehmigung der nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigungspflichtiger Tierversuche erfolgte durch die Regierung Oberbayern (Tierversuchsantrag: 55.2-2532.Vet_02-15-147). Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte mittels PCR aus Schwanzbiopsien.

Mauslinie	Referenz	Eigenschaft
C57BL/6N (Wildtyp)	Charles River, Wilmington	Kontrolltiere
TLR3 ^{Stp/Stp} (TLR3-Stp)		Versuchstiere (TLR3 ^{OFF})
TLR3 ^{Stp/Stp} x Lysm ^{Cre} (TLR3-Mye)		Versuchstiere (TLR ^{ON} in Makrophagen)

Tab. 6 Übersicht der eingesetzten Versuchstiere

Die Generierung des $TLR3^{Stp/Stp}$ -Mausstamms erfolgte im Labor der AG Holzmann. Durch das Einfügen eines mit *loxP sites*-markierten Terminationselements (Stp) zwischen Exon 3 und 4 kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription des *Tlr3*-Gens (**Abb. 5**). Die genetische Inaktivierung von TLR3 wurde durch den Verlust der IL-6-Produktion mittels poly(I:C)-Stimulation in $TLR3^{OFF}$ -Knochenmarksmakrophagen bestätigt. Die *loxP sites* werden von der Cre-Rekombinase detektiert, sodass gewebespezifische *switch-on*-Mutanten generiert werden können. Befindet sich das Cre-Rekombinase-Gen hinter dem LysozymeM-Promotor, wird TLR3 in Monozyten, reifen Makrophagen und Granulozyten reexprimiert (= $TLR3^{Stp/Stp}LysozymeM^{Cre/Cre}$). Die $TLR3$ -Stp-Mäuse wurden mindestens für 10 Generationen mit C57BL/6N rückgekreuzt und in einer SPF-Einrichtung gehalten (Charles River, Calco, Italien).

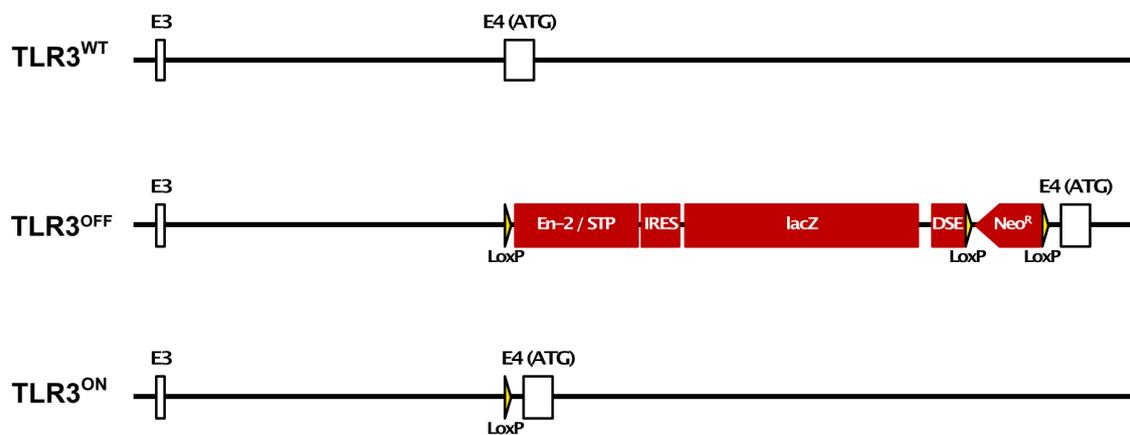


Abb. 5 Darstellung des $TLR3^{Stp/Stp}$ (TLR3-Stp)-Modells

Das Terminationselement *En-2/STP* ist zwischen Exon 3 und 4 eingefügt, um einen Abbruch der Transkription des *Tlr3*-Gens zu erreichen.

3 Methoden

Nachfolgend werden die in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden zur Datenerhebung beschrieben.

3.1 Bestimmung des Leber-Körpergewichtsverhältnisses

Um den makroskopischen Effekt der Leberregeneration zu quantifizieren, wurde das Gewicht der Leber nach Explantation in das Verhältnis zum Körpergewicht unmittelbar vor dem Explantationszeitpunkt gesetzt ($\text{Ratio}_{L/K} = \text{Gewicht}_{\text{Leber}} [\text{g}] / \text{Gewicht}_{\text{Körper}} [\text{g}]$). Das Lebergewicht wurde mit einer Feinwaage gemessen.

3.2 Tierexperimentelle Methoden

In den folgenden Abschnitten wird die Durchführung der tierexperimentellen Versuche beschrieben.

3.2.1 Partielle Hepatektomie

Die PHx führt zur kompensatorischen Hyperplasie der verbleibenden Leberlappen. Die chirurgische und anästhesiologische Durchführung der PHx sowie das perioperative Management orientiert sich an dem Protokoll von Mitchell *et al.* [12]. Sämtliche Tierversuche, die nachfolgend beschrieben werden, wurden durch den Leiter des Tierversuchsvorhabens Prof. Dr. med. Norbert Hüser und nach den Angaben des TVA durchgeführt.

3.2.1.1 Anästhesie der Versuchstiere

Für alle operativen Eingriffe an den Versuchstieren wurde eine Narkose mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran durchgeführt. Neben der guten Steuerbarkeit sowie geringen Kreislaufdepression eignet sich Isofluran speziell für chirurgische Eingriffe an der Leber, da die hepatische Metabolierungsrate mit 0,2 % niedrig ist. Zudem ist es speziell im Rahmen der PHx weniger hepatotoxisch als beispielsweise Ketamin/Xylazin [12]. Während der Einleitung der Narkose wurde die Tiefe der Narkose anhand der Stellreflexe getestet. Anschließend wurde das Versuchstier an die Beatmungsmaske gelegt und vor Beginn der Operation die Narkosetiefe nochmals mittels Flexorreflex getestet. Perioperativ wurde folgendes Narkose-/Schmerzprotokoll durchgeführt: Vor der Narkoseeinleitung erfolgte eine präemptive Analgesie mit der peroralen Gabe von Metamizol (200 mg/kg KG). Die Inhalationsnarkose erfolgte mit

Isofluran (zur Einleitung der Narkose 5 %, zum Erhalt 2-3 %) und intraoperativ vor dem Hautschnitt wurde Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) intraperitoneal appliziert. Postoperativ schloss sich die subkutane Gabe von Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) alle 8-10 Stunden für die Gruppen ½, 1, 2 und 3 Tage für die gesamte Überlebenszeit bzw. für die 7 Tage-Gruppe bis zum dritten Tag an.

3.2.1.2 Durchführung der partiellen Hepatektomie

Das Versuchstier wurde unterhalb des Operationsmikroskops auf einer sauberen Arbeitsfläche in supiner Position fixiert. Die Bauchdecke wurde desinfiziert und es erfolgte eine 2,5-3 cm lange mediane Laparatomie (entlang der Linea alba suprapubisch bis zum Processus xyphoideus). Der eröffnete Situs wurde durch einen Retraktor fixiert, um im Abdomen genügend Übersicht zu erhalten. Der Lobus lateralis sinister wurde mittels feuchter Wattestäbchen dargestellt. Die Ligatur des lateralen linken Leberlappenpedikels erfolgte mit 4-0 Seide. Der Lappen wurde reseziert und in kaltes PBS gegeben. Nun erfolgte die Durchtrennung des Ligamentum falciforme sowie die Darstellung und Resektion des Lobus medianus (Seide 4-0). Das Resektat wurde in kaltes PBS gegeben. Nach Kontrolle der Bluttrockenheit wurde die Bauchhöhle abschließend durch eine zweireihige Naht in Einzelknopftechnik mit Prolene 5-0 verschlossen. Die Operationen dauerten zwischen 15-20 Minuten. Die Maus erwachte etwa 10 Minuten postoperativ aus der Narkose und wurde zunächst unter einer Wärmelampe in einen Einzelkäfig mit Einstreu gegeben, Trinkwasser stand zur freien Verfügung. Tiere, bei denen die Regeneration des Gewebes über mehrere Tage beobachtet wurde, erhielten postoperativ wieder ihr normales Trockenfutter *ad libitum*. Alle Operationen wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, um Infektionen der Bauchhöhle oder der Leber zu vermeiden. Eine prophylaktische Gabe eines Antibiotikums war daher nicht notwendig. Alle Versuchstiere wurden in einem Zeitraum von 08.00-10.00 Uhr operiert, da zirkadiane Proteine (z. B. Wee1) die G₂/M-Transition der regenerierenden Hepatozyten beeinflussen [60, 120].

3.2.2 Organentnahme der Versuchstiere

3.2.2.1 Kontrollproben

Das entnommene Lebergewebe (Lobus medianus und lateralis sinister) wurde als Kontrollprobe für die sich anschließenden Untersuchungen eingesetzt. Die resezierten Leberlappen wurden in kaltes PBS gegeben und durch leichte Schwenkbewegungen ausgewaschen. Für geplante Sektionszeitpunkte ab 24 h wurde ein Teil des Lobus lateralis sinister als Referenzgewebe in PFA 4 % für 48 h bei Raumtemperatur fixiert. Das restliche

Gewebe wurde von PBS gereinigt und in flüssigen Stickstoff gegeben. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

3.2.2.2 Experimentalproben

Zu definierten Zeitpunkten nach PHx war die Entnahme von Organen sowie Blut zur *in vitro* Analyse vorgesehen. Zuerst wurde das Körpergewicht der Maus bestimmt. Anschließend wurde in Isoflurannarkose die Bauchhöhle eröffnet und das Tier durch Thorakotomie sowie das Punktieren der Aorta bei der Entnahme der Leber getötet. Es wurde folgendes Narkose-/Schmerzprotokoll durchgeführt: Vor der Narkoseeinleitung erfolgte eine präemptive Analgesie mit der peroralen Gabe von Metamizol (200 mg/kg KG). Die Inhalationsnarkose erfolgte mit Isofluran (zur Einleitung der Narkose 5 %, zum Erhalt 2-3 %) und intraoperativ vor dem Hautschnitt wurde Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) intraperitoneal appliziert.

Die entnommenen Proben stellten die Experimentalproben für die sich anschließenden Untersuchungen dar. Das Blut wurde in BD Microtainer® LH Tubes gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gewebe wurde in kaltem PBS ausgewaschen und das nekrotische Gewebe entfernt. Als nächstes wurde das Gewicht des Lebergewebes festgestellt. Das PBS wurde durch vorsichtiges Abtupfen zuvor entfernt. Ab Experimentalzeitpunkten von 24 h wurde der Lobus posterius sinister in PFA 4 % für 48 h bei Raumtemperatur fixiert. Der restliche rechte Leberlappen sowie Lobus caudatus und quadratus wurden für biomolekulare Analysen in flüssigen Stickstoff gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Das Blut in den BD Microtainer® LH Tubes wurde nach 30 Minuten für 7 Minuten bei 4 °C mit 7000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum bei -80 °C eingefroren.

3.2.3 Intraperitoneale Bromdesoxyuridin-Injektion

Bromdesoxyuridin (BrdU) kann als Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin während der S-Phase anstatt dem Nucleotid Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut werden. Somit eignet sich BrdU als Marker für proliferierende Zellen. BrdU wurde in PBS gelöst und jeweils 2 h vor der schmerzfreien Tötung der Maus in einer Konzentration von 80 µg/g Körpergewicht einmalig intraperitoneal appliziert (Einmalnadel 26 G). Eine spezielle Vorbereitung der Tiere auf die Injektion war nicht notwendig. Die Tiere wurden *post interventionem* für 30 Minuten in einem Extrakäfig kontinuierlich beobachtet, bei unauffälligem Verlauf wurden sie zu den Geschwistern in den Käfig zurückgesetzt.

3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Es wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Kit der Firma R&D nach dem Prinzip des quantitativen enzymgekoppelten Sandwich-Immunoassays eingesetzt. In die mit polyklonalen Antikörpern beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte wurden jeweils 50 µl verdünntes Serum mit 50 µl Assay Diluent RD1-14 als Doppelansatz pipettiert. Zur quantitativen Bestimmung diente als Referenz ein BSA-Standard. Die anschließende Inkubationszeit betrug 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schwenk-Rotor. Im anschließenden Waschschrift wurden der Überstand und somit ungebundene Antigene entfernt. Anschließend wurden 100 µl des enzymgekoppelten Antikörpers hinzugegeben. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurden 100 µl der Substrat-Lösung, das von der Meerrettichperoxidase in ein gefärbtes Produkt umgesetzt wird, hinzugegeben. Um die Reaktion nach 30 Minuten zu stoppen, wurden 100 µl einer schwefelsäurehaltigen Stopp-Lösung hinzugegeben, was zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führt. Die Optische Dichte (OD), die proportional zur Menge des zu detektierenden Antigens ist, wurde anschließend photometrisch analysiert

3.4 Immunhistochemische Methoden

In den Abschnitten **3.4.1** bis **3.4.6** werden alle Schritte beschrieben, die zur Herstellung und Analyse der Gewebeschnitte erfolgten.

3.4.1 Gewebefixierung

Der Lobus posterior dexter wurde nach Explantation in PFA 4 % für 48 h bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde das Gewebe einmal in PBS gewaschen und in der Dehydratationsmaschine in aufsteigender Alkoholreihe entwässert.

3.4.2 Einbettung in Paraffin

Für die Einbettung in Paraffin wurde das entwässerte und fixierte Gewebe aus der Gewebekassette entnommen. Der Leberlappen wurde in eine Metallform gelegt und mit dem unteren Teil der Gewebekassette bedeckt. Anschließend wurde durch die Gewebekassette flüssiges Paraffin in die Metallform und somit über das Gewebe gegeben. Das Aushärten des Paraffins erfolgte durch die Auflage des Gewebeblocks auf die Kaltplatte (-20 °C). Nach Aushärten des Paraffins wurde die Metallform abgelöst.

3.4.3 Herstellung von Gewebeschnitten

Der Paraffin-Block mit dem Lebergewebe wurde für 15 Minuten auf einer Kaltplatte bei 15 °C gekühlt und anschließend im Mikrotom eingespannt. Die Schnitte wurden mit einer Schnittdicke von 3 µm hergestellt. Der Schnitt wurde auf ein 40 °C warmes H₂O_{dd}-Wasserbad gegeben und faltenfrei auf einen Objektträger gezogen. Die Trocknung des Schnitts erfolgte bei 37 °C über Nacht.

3.4.4 Immunhistochemie von Paraffinschnitten

Um die Antigenmarkierung und Färbung des Paraffinschnitts durchführen zu können, wurde zunächst in Xylol (3 x 10 min) entparaffinisiert und anschließend in absteigender Alkoholreihe rehydriert (100 % 3 x 2 min, 96 % 1 x 2 min, 70 % 1 x 2 min, 50 % 1 x 2 min). Es folgte eine fünfminütige Inkubation in H₂O_{dd}. Zur Demaskierung wurden die Gewebeschnitte in 1x Citrat-Puffer (10 mM, pH 6) und auf 90-95 °C für 15 Minuten erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte im Citrat-Puffer für ca. 20 Minuten auf Eis gekühlt. Es folgte ein Waschschriff für 5 Minuten in 1x TBS + 0,1 % BSA auf dem Schüttelinkubator. Für den Peroxidase-Block wurde der Schnitt anschließend für 5 Minuten in 3 % H₂O₂ und Methanol (1:10) gegeben. Anschließend wurde mit 1x TBS + 0,1 % BSA für 5 Minuten gewaschen. Der Objektträger wurde abgetrocknet und das Gewebe mit einem Fettstift eingekreist, um eine gleichmäßige Benetzung des Gewebes zu ermöglichen. Die nächsten zwei Waschgänge erfolgten durch Auftropfen von je 100 µl 1x TBS + 0,1 % BSA. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1x TBS + 0,1 % BSA + 10 % Ziegen Serum geblockt. Dieses wurde auf die fixierten Gewebe gegeben und für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert. Es folgten drei Waschgänge für je 10 Minuten mit 1x TBS + 0,1 % BSA. Danach wurde der Erstantikörper auf den Schnitt gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgten zunächst drei Waschgänge für je 10 Minuten. Nun wurde der Sekundärantikörper auf das Gewebe gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte wieder ein dreimaliger Waschgang für je 10 Minuten. Das DAB wurde nach Herstellerangaben auf das Gewebe gegeben und die Reaktion nach ca. 3 Minuten mit H₂O_{dd} gestoppt. Bei jedem Durchgang wurden sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen verwendet.

3.4.5 Hämatoxylin-Färbung

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden im Anschluss an die immunhistochemische Markierung der Antigene in Hämalaun-Lösung für 8-10 Minuten bei Raumtemperatur gegeben. Überschüssiges Hämalaun wurde anschließend für 5-10 Minuten mit Leitungswasser abgewaschen. Zum Abschluss wurde der Gewebeschnitt mit Glycerin-Gelatine bedeckt.

3.4.6 Auswertung der immunhistochemischen Daten

Die Auswertung der Schnittbilder erfolgte mit dem Mikroskop Axiolab der Firma Zeiss. Mit der AxioCam MRc5 wurden Bilder der IHC-Schnitte aufgenommen. Die Auszählung der BrdU-positiven Hepatozyten sowie aller Hepatozyten erfolgte in fünf repräsentativen Schnittbildern bei einer 40-fachen Vergrößerung. Es wurde die Software AxoVision Rel. 4.8 verwendet.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die RNA-Isolierung aus Lebergewebe wurde mit dem *RNeasy® Mini Kit* nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Isolation der RNA aus den Hepatozyten wurden im ersten Schritt 2 ml-Reaktionsgefäße aus dem *RNeasy® Mini Kit* mit 650 µl *RLT*-Puffer sowie 1 % β-Mercaptoethanol vorbereitet. Die Reaktionsgefäße wurden auf Eis gekühlt. Die eingesetzten Gewebestücke entsprachen annähernd einem Volumen von ca. 27 mm³ bzw. einem Gewicht von 30 mg und wurden direkt aus dem -80 °C-Schrank in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben. Die Homogenisierung der Proben erfolgte durch den Gewebelysator für 3 min bei einer Frequenz von 30 Hz. Das Lysat wurde für 3 min bei 13.000 U/min und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand oberhalb des Gewebelysator-Kügelchen wurde in 650 µl Ethanol 70 % gegeben und vorsichtig vermischt. Das Gewebehomogenisat + *RLT*-Puffer/Ethanol wurde auf die *RNeasy*-Silicamembran des *spin column* gegeben. Die Waschschriffe erfolgten bei 10.000 U/min für 15 Sekunden. Der Durchlauf wurde nach jedem Waschschriff verworfen. Es folgte ein Waschschriff mit 700 µl *RW1*-Puffer. Für den anschließenden DNase-Verdau wurde 10 µl *DNase I* zu 70 µl *RDD*-Puffer gegeben, auf die Säule pipettiert und für 15 min inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschriff mit 700 µl *RW1*-Puffer. Daraufhin wurde zweimal mit 500 µl *RPE*-Puffer gewaschen. Abschließend wurde für 2 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Zur Trocknung des *spin column* wurde ein neues *collection tube* verwendet und bei 13.800 U/min für 1 min zentrifugiert. Das *spin column* wurde nun in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß eingesetzt und 30-50 µl RNase-freies Wasser auf die Silikamembran pipettiert. Der Ansatz inkubierte für 2 min. Anschließend wurde für 1 min bei 13.800 U/min zentrifugiert. Die Reinheit (OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotient 1,9-2,2) und Konzentration der RNA wurde photometrisch ermittelt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.5.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (cDNA-Synthese)

Mittels der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase (isoliert aus M-MuLV) wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend durch PCR amplifiziert. Es wurden sowohl unspezifische Random Hexamer- und oligo-dT-Primer als auch genspezifische Primer verwendet. Pro Ansatz wurde 1 µg mRNA in cDNA umgeschrieben. Im ersten Schritt wurde Ansatz A (**Tab. 7**) angesetzt. Es folgte die Inkubation im Thermocycler für 10 min bei 70 °C und die Kühlung auf 4 °C, um Sekundärstrukturen der mRNA aufzubrechen. Nun wurde Ansatz B (**Tab. 8**) hinzugegeben. Es folgte das Primer-Annealing bei 20 °C für 10 min im Thermocycler. Die Polymerisation der cDNA fand bei 42 °C für 60 min statt. Im letzten Schritt wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße zentrifugiert und mit 180 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

Ansatz A (pro Probe)	Volumina [µl]
1 µg mRNA in RNA-freiem H ₂ O	10
Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl) 1:150	1
Oligo(dT) ₁₈ Primer (0,5 µg/µl) 1:20	1
H ₂ O (RNase-frei)	1,5
Gesamt	13,5

Tab. 7 Ansatz A cDNA

Ansatz B (pro Probe)	Volumina [µl]
5x Reaction Buffer	4
10x dNTPs	1
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5
Gesamt	6,5

Tab. 8 Ansatz B cDNA

3.5.3 Quantitative real-time PCR

Das Prinzip der q-RT-PCR ermöglicht simultan die Amplifikation und Quantifizierung der cDNA-Doppelstränge mittels Fluoreszenz-Messung. Die Anwendung des Hydrolysis-Probe-

Methoden

Assay erhöht dabei die Spezifität. Die Sonden sind am 5'-Ende mit einem Donor-Fluorophor sowie am 3'-Ende mit einem Akzeptor-Fluorophor markiert, welches die FRET-Energie, die vom Donor bei Anregung durch eine Lichtquelle übertragen wird, unterdrückt (*quencht*), solange räumliche Nähe besteht. Während des PCR-Zyklus hybridisieren die Sonden spezifisch mit den komplementären DNA-Sequenzen. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase werden die Sonden während der Elongationsphase abgebaut und die Donor-Fluoreszenz nimmt proportional zur Template-Menge zu. Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals kann während der exponentiellen Phase mit Hilfe des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem C_T -Wert, durchgeführt werden. Der C_T -Wert ist definiert als jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Für die relative Quantifizierung wurde das Referenzgen β -Actin verwendet [121]. Für die Durchführung der q-RT-PCR wurde der *LightCycler® 480 II* verwendet. In **Tab. 9** ist der Ansatz für die q-RT-PCR dargestellt. Das qRT-PCR-Protokoll „Mono Color Hydrolysis Probe/UPL“ wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Reaktionszyklen siehe **Tab. 10**). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *LightCycler® 480 SW 1.5* von Roche mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die Primerpaare wurden für jedes Gen spezifisch entworfen (Verfügbar unter: <http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome.html>).

Komponenten	Volumina [μ l]
H ₂ O _{dd}	4,4
UPL Sonde [100 nM]	0,2
3'-Primer [200 nM]	0,2
5'-Primer [200 nM]	0,2
2x ThermoScientific DyNamo ColorFlash Probe Master Mix	10,0
cDNA [50 ng]	5,0

Tab. 9 Ansatz qRT-PCR

Phase	Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Prä-Inkubation	1	95	600
Amplifizierung	45	95	10
		60	30
		72	1
Kühlung	1	40	30

Tab. 10 Phasen der qRT-PCR

3.5.4 Proteinextraktion aus Lebergewebe

Für die Isolation von Protein aus Lebergewebe wurde 10 x *Cell Lysis Buffer* mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ 1:5 verdünnt und Protease-Inhibitoren (PMSF 1:100, Aprotinin 1:1000, Pepstatin A 1:1000) wurden hinzugefügt. Das Gewebe wurde zügig zu dem Ansatz gegeben. Die Homogenisierung erfolgte im Gewebelysator (3 min, Frequenz 30 Hz). Um noch intakte Zellmembranen vollständig zu lösen, wurde im nächsten Schritt die Zellsuspension in einem Wasserbad ultrageschallt (4 x 15 Sekunden). Auf einem Rotor (4 °C, 10 min) wurde das Lysat gemischt, um es anschließend bei 4 °C für 15 min mit 13.000 U/min zu zentrifugieren. Es wurden 200 µl Überstand abgenommen und aliquotiert. Davon wurden 150 µl Lysat mit 150 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Die restlichen 50 µl Lysat wurden für den BCA-Assay nach Pierce verwendet. Nachdem die Konzentrationsbestimmung des Proteins erfolgt war, wurde mit 1x SDS-Probenpuffer eine einheitliche Konzentration von 2 mg/dl Protein hergestellt. β -Mercaptoethanol wurde im Verhältnis 1:20 hinzugefügt. Die SDS-Proteinlysate wurden entweder direkt mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert oder bei -20 °C gelagert.

3.5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das *BCA Protein Assay Reagent Kit* der Firma Pierce verwendet. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen. BCA besitzt die Eigenschaft, mit Cu^{1+} -Ionen einen violetten Farbkomplex zu bilden. Dieser Farbkomplex absorbiert Licht bei der Wellenlänge von 562 nm. Als Referenz diente ein BSA-Standard mit folgenden Konzentrationen: 10,0 mg/ml; 5,0 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,625 mg/ml; 0,312 mg/ml; 0,156 mg/ml. Negativkontrolle war 1x PBS (0 mg/ml). Die Proteinproben wurden 1:10 mit 1x PBS verdünnt. Die Messung erfolgte als Doppelansatz. Nun wurden 200 µl BCA-Reagenz (196 µl *Pierce Lösung A* und 4 µl *Pierce Lösung B*) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion führt zu einem Farbumschlag von grün nach violett. Die photometrische Messung der Extinktion bzw. OD, die proportional zur Proteinkonzentration ist, erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem DynatechMRX. Die Proteinkonzentration wurde dann abschließend mithilfe des BSA-Standards, einer Eichgeraden und linearer Regression berechnet.

3.5.6 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient der Analyse der Proteine aus dem Lebergewebe. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße findet in einem diskontinuierlichen, porigen Gel auf Polyacrylamidbasis, bestehend aus Sammel- und Trenngel, statt. Als anionisches Tensid (Detergens) bindet SDS an Aminosäuren. Dies bewirkt die Auffaltung der sekundären sowie

Methoden

tertiären Proteinstrukturen und konstante Negativladung der Proteine. So erfolgt die Auftrennung nach Kettenlänge proportional zur Molekülmasse. Für die Auftrennung wurden je nach Größe des Zielproteins 10 %- oder 12,5 %-Trenngele verwendet. Die Zusammensetzung der Trenngele ist aus **Tab. 11** zu entnehmen. Nach Polymerisation wurde der Ansatz für das 4 %-ige Sammelgel (**Tab. 12**) in die Elektrophoresekammer pipettiert. Für die Geltaschen wurde ein Kamm eingesetzt. Bevor die Proben aufgetragen wurden, erfolgte die Denaturierung in SDS-Probenpuffer bei 95 °C für 5 Minuten. Als Referenz wurde 5 µl des Molekulargewichtsstandards aufgetragen. Die restlichen Geltaschen wurden mit je 20 µl Proteinprobe befüllt. Zu Beginn der Elektrophorese (U = 80 V) konzentrieren sich die Proteinproben im Sammelgel. Die Auftrennung fand unter Anlage einer Spannung von 120 V statt. Das Zielprotein lässt sich anschließend anhand des Molekulargewichtsstandards sowie des Molekulargewichts identifizieren.

Reagentien	10 %	12,5 %
Acrylamid 30/0,8	11,8 ml	14,0 ml
1,5M Tris pH 8,8	8,7 ml	8,7 ml
H ₂ O _{dd}	14,0 ml	11,8 ml
10 % SDS	0,4 ml	0,4 ml
TEMED	0,02 ml	0,02 ml
10 % APS	0,2 ml	0,2 ml

Tab. 11 Trenngel (20 ml)

Reagentien	4 %
Acrylamid 30/0,8	1,0 ml
1M Tris pH 6,8	2,4 ml
H ₂ O _{dd}	6,4 ml
10 % SDS	0,1 ml
TEMED	0,005 ml
10 % APS	0,2 ml

Tab. 12 Sammelgel (5 ml)

3.5.7 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine unter Verwendung einer *Semidry*-Transblotapparatur aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen [122]. Das Gel wurde zunächst aus der Gelkammer herausgelöst und in Transblot-Puffer equilibriert. Die flächige Anode wurde mit Transblot-Puffer getränktem Blotting-Papier ausgelegt. Die Nitrozellulose-Membran wurde aufgelegt, auf der Membran wurde das Gel platziert. Es folgte eine weitere Schicht Blotting-Papier. Die Schichtung wurde abschließend mit Transblot-Puffer übergossen und das Gerät mit der Kathode verschlossen. Es wurde ein elektrisches Feld für ca. 1 h angelegt. Die Proteine binden durch hydrophobe Wechselwirkungen auf dem Filter. Nach dem Transfer wurde die Membran in Ponceau-Lösung gewaschen.

3.5.8 Western Blot

Der Nitrozellulose-Filter wurde nach der Inkubation mit Ponceau-Lösung drei Mal in PBS-T für je 5 Minuten gewaschen und anschließend für 1 h in 5 % (w/v) Magermilchpulver/PBS-T auf einem Schwenkrotor inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Es folgten drei Waschschrte. Anschließend wurde die Membran mit der Erstantikörperlösung bei 4 °C über Nacht auf einem Schwenkrotor inkubiert. Je nach Herstellerangaben wurde die Primärantikörperlösung entweder in 5 % (w/v) BSA oder Magermilchpulver und PBS-T verdünnt. Am nächsten Tag wurden drei Waschschrte durchgeführt und es folgte die Inkubation mit dem enzymgekoppelten Zweitantikörper, der den F_c-Teil des Erstantikörper detektiert, in 5 % (w/v) Magermilchpulver/PBS-T für 1 h. Nicht gebundene Antikörper wurden durch drei Waschschrte entfernt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit der Zugabe des Substrates. Bei der Reaktion setzt die Peroxidase des Zweitantikörpers das Substrat zu Wasserstoffperoxid um, wobei Sauerstoff entsteht. Dies bewirkt die Katalyse der Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu. Durch die Oxidation werden die Elektronen des Luminols auf ein höheres Energieniveau gehoben und bei Rückfall auf das Ausgangsniveau wird die Differenz der Energie als Chemilumineszenz freigesetzt. Die Blot-Membran wurde in einer 1:1 Mischung von Reagenz 1 und 2 der Substrat-Lösung für eine Minute unter Schwenkbewegungen inkubiert. Im Dunkellabor wurde die Membran (ca. 15 Sekunden bis 30 Minuten) auf einem Röntgenfilm exponiert und anschließend mit dem Typon Optimax Film Processor entwickelt. Anhand des Standards konnte die Proteingröße semiquantitativ abgelesen werden.

3.5.9 Re-Blot-Lösung zur weiteren Verwendung der Nitrozellulose-Membran

Zur erneuten Verwendung der Nitrocellulose-Membran wurden Antikörper mit der *Re-Blot Plus Mild Solution* entfernt („gestrippt“). Die Membran wurde 15 min mit PBS-T gewaschen und für 15 min in Reblot-Lösung auf einem Schwenkrotor inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für je 5 Minuten mit PBS-T. Darauf folgte die Inkubation mit 5 % Magermilchpulver/PBS-T für 2 x 5 Minuten, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Es folgten drei Waschschrte mit PBS-T für je 5 Minuten. Nach dem Strippen konnte die Membran für weitere Antikörperinkubationen verwendet werden.

3.6 Statistische Analysen

Für die statistischen Auswertungen wurde GraphPad Prism 8 verwendet. Bei kontinuierlichen, normalverteilten Messwerten wurde zur Berechnung der Signifikanz der Student's t-Test verwendet. Bei kontinuierlichen, nicht-normalverteilten Messwerten wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. Das Signifikanz-Niveau wurde bei $p < 0,05$ angesetzt. Hoch bzw. sehr hoch signifikante Ergebnisse wurden ab $p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$ definiert. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des Leber-Körpergewichtsverhältnisses

Wie unter 3.1 beschrieben, wurde das L/K-Verhältnis für die Zeitpunkte 0, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 40, 48, 72, 168 sowie 336 h nach PHx berechnet. Zum Zeitpunkt 0 h lag für die C57BL/6N-Kontrolltiere ein Lebergewicht von durchschnittlich $5,5 \pm 0,3$ % des Gesamtkörpergewichts vor, welches mit einem Leberausgangsgewicht von durchschnittlich $5,5 \pm 0,2$ % der transgenen TLR3^{Stp/Stp}-Mäuse (TLR3-Stp) vergleichbar war (**Abb. 6A**). Für die TLR3^{Stp/Stp} x Lysm^{Cre}-Mäuse (TLR3-Mye) lag im Durchschnitt ein ebenso vergleichbares L/K-Verhältnis von $5,2 \pm 0,1$ % vor (**Abb. 6B**). Signifikante Unterschiede der Regenerationskapazität zwischen WT- und TLR3-Stp-Tieren waren 72 h nach PHx zu identifizieren. Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass die Unterschiede nach 168 h und 336 h bestehen blieben. Zwischen 7 und 14 Tagen fand basierend auf dem L/K-Quotienten keine Regeneration mehr statt. Die TLR3^{Stp/Stp} x Lysm^{Cre}-Mäuse lagen konstant und signifikant ab 48 h unter dem Regenerationspotenzial der Kontrollen bis zum Ende der Datenaufzeichnung nach 336 h. Zum Ende des Regenerationsprozesses erreichten auch die TLR3^{Stp/Stp} x Lysm^{Cre}-Mäuse nicht die Werte des L/K-Quotienten der Kontrollen. Dass sowohl TLR3-Stp- als auch TLR3-Mye-Versuchstiere zum Ende der Regeneration vergleichbare L/K-Quotienten aufweisen, zeigt, dass eine zellspezifische Re-Expression von TLR3 in Makrophagen nicht zu einer Rekonstitution der hepatischen Regenerationskapazität führt. Somit werden in den folgenden Abschnitten primär die Ergebnisse der WT- und TLR3-Stp-Mäuse vorgestellt und verglichen.

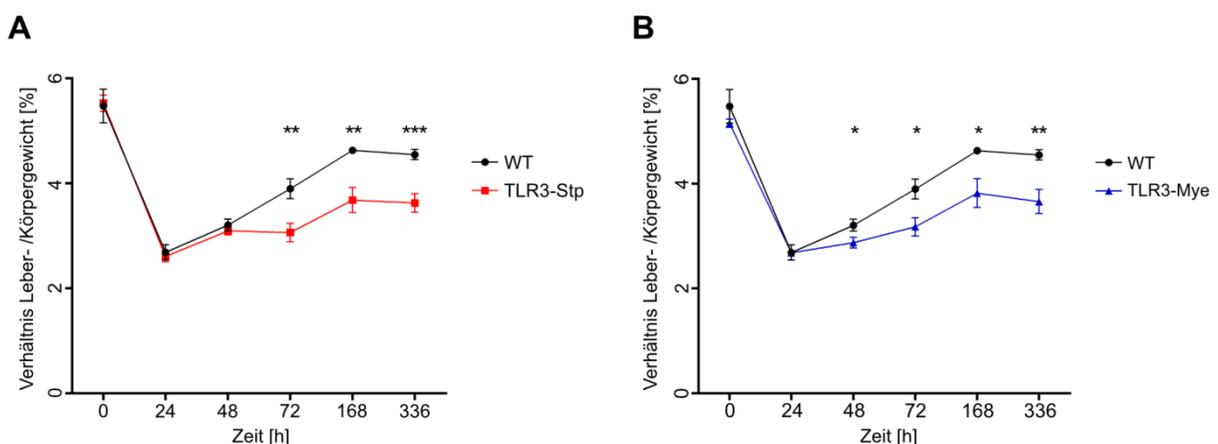


Abb. 6 Entwicklung des Leber-/Körpergewichtsverhältnisses

A) Vergleich von WT- zu TLR3-Stp-Mäusen **B)** Vergleich von WT- zu TLR3-Mye-Mäusen ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2 Analyse der frühen Phase der Leberregeneration

Die Initiationsphase wird anhand der Inflammation und diverser Gene, die die Zellproliferation beeinflussen, untersucht.

4.2.1 Zytokinmuster

Die Daten zu IL-6 im Rahmen der Leberregeneration sind, wie unter 1.3.1 beschrieben, kontrovers. **Abb. 7** zeigt den IL-6-Signalweg. Zusammenfassen lässt sich, dass IL-6 einen Einfluss auf die Regeneration hat und für das Gleichgewicht des Prozesses entscheidend ist. Hinsichtlich der IL-6-mRNA-Expression in der Leber ließ sich, wie in **Abb. 8A** dargestellt, zwar eine Induktion für die frühe Phase zwischen 2-4 h erkennen, jedoch war die Expression für beide Mausstämme vergleichbar. Weiterer Aufschluss sollten die mRNA-Analysen für die Expression des IL-6-Rezeptors sowie der signalisierenden Untereinheit IL-6ST (gp130) geben. So konnten eine signifikant höhere Expression im TLR3-Stp-Mausstamm sowohl für den Rezeptor als auch die Signalisierungsuntereinheit gp130 bei 8 h detektiert werden (**Abb. 8A**). Die mRNA-Level des negativen IL6-Signalwegregulators SOCS3 waren bedeutend höher in TLR3-Stp-Mäusen bei 4 h ausgeprägt. Weiterhin wurde im Serum die IL-6-Konzentration mittels ELISA gemessen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp- und TLR3-Stp-Stamm (**Abb. 8B**). Um den Effekt von IL-6 auf die Zellen in der Leber direkt zu analysieren, wurde p-STAT3 (Tyr705) im Western Blot dargestellt (**Abb. 8C**). Es war kein Unterschied zwischen WT- und TLR3-Stp-Mäusen zu erkennen. Ein weiteres Zytokin, das die Sekretion von IL-6 beeinflusst und eine Rolle in der Leberregeneration spielt, ist TNF- α . Die mRNA-Level (**Abb. 8D**) fielen in der TLR3-Stp-Maus bei 2 h gegenüber den WT-Mäusen signifikant ab.

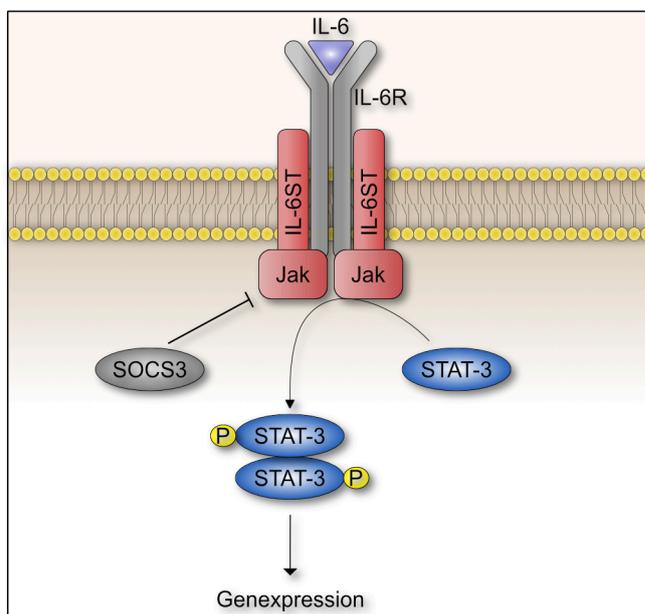


Abb. 7 Schematische Darstellung des IL-6-Signalwegs

IL-6 bindet an den IL-6-Rezeptor. Intrazellulär erfolgt über die Janus-Kinasen (Jak) die Phosphorylierung von STAT-3. Als aktiver Homodimer transloziert STAT-3 in den Zellkern und bewirkt die Transkription IL-6-abhängiger Gene. SOCS3 wirkt als Inhibitor des Signalwegs.

Ergebnisse

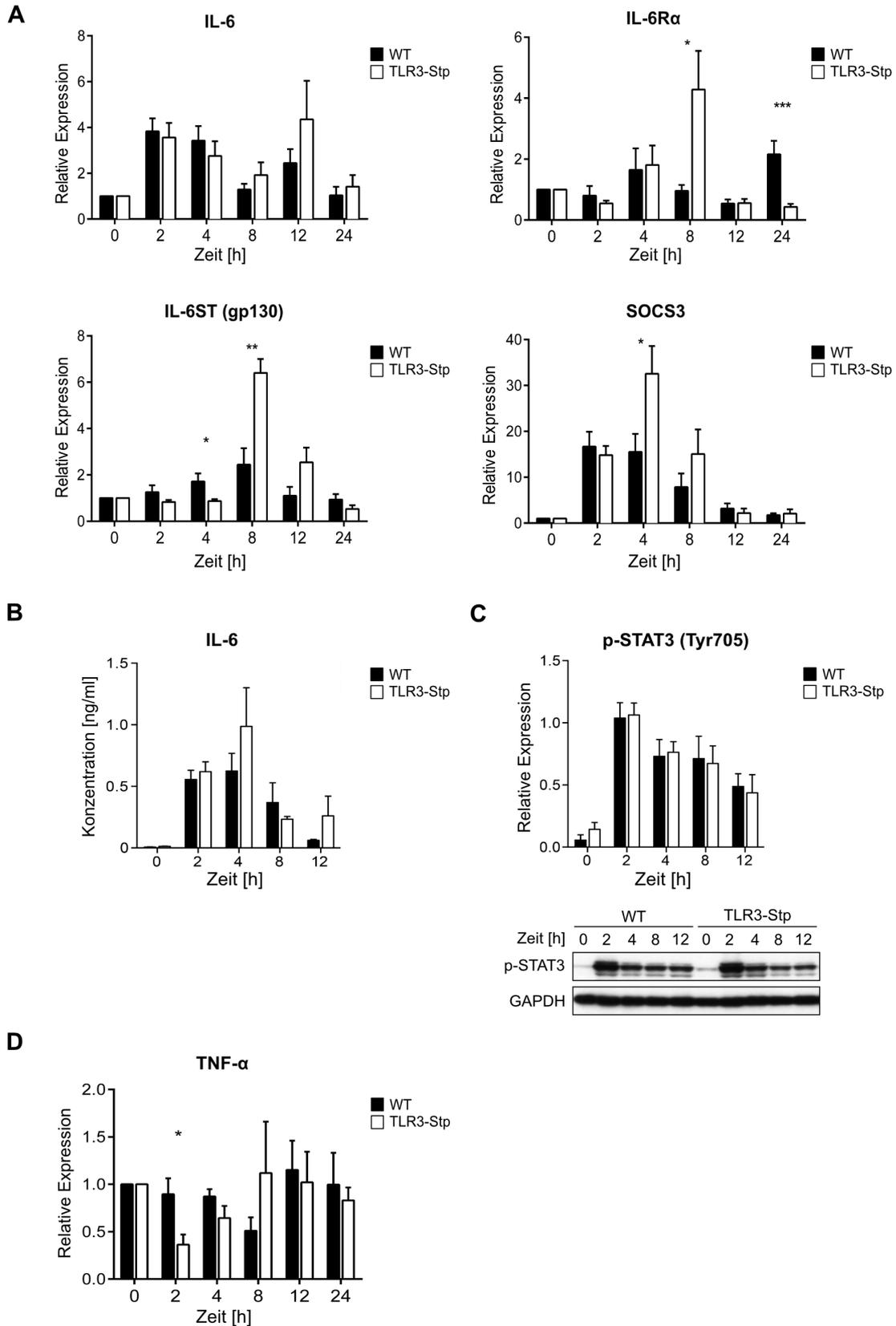


Abb. 8 Untersuchung der Zytokin-Expression zu Beginn der Leberregeneration

A) Aktivierung des IL-6-Signalwegs **B)** IL-6-Konzentration im Serum nach PHx **C)** Western Blot-Daten zur p-STAT3 **D)** Darstellung der mRNA-Expression von TNF- α ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.2 Aktivierung proliferationshemmender Signale

Neben der zytokinabhängigen Induktion der Regeneration steigt zu Beginn die Expression sogenannter *immediate early genes*, die sowohl proliferationsfördernd als auch -hemmend wirken. Exemplarisch wurde die mRNA-Expression des Zellzyklusinhibitors $p21^{Cip1}$, des p53-induzierbaren, anti-proliferativen Gens *BTG Anti-Proliferation Factor 2* (BTG2) und des Gens *Polo Like Kinase 3* (PLK3) untersucht. Für $p21^{Cip1}$ zeigte sich ein signifikanter Anstieg nach 2 h, 4 h und 8 h in TLR3-Stp-Mäusen im Vergleich mit den WT-Mäusen (**Abb. 9A**). Die BTG2-mRNA war nach 4 h und 8 h in TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen signifikant erhöht (**Abb. 9B**). In **Abb. 9C** zeigte sich eine signifikante Erhöhung von PLK3 nach 4 h und 8 h in TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen im Vergleich zu den TLR3-exprimierenden Kontrollen.

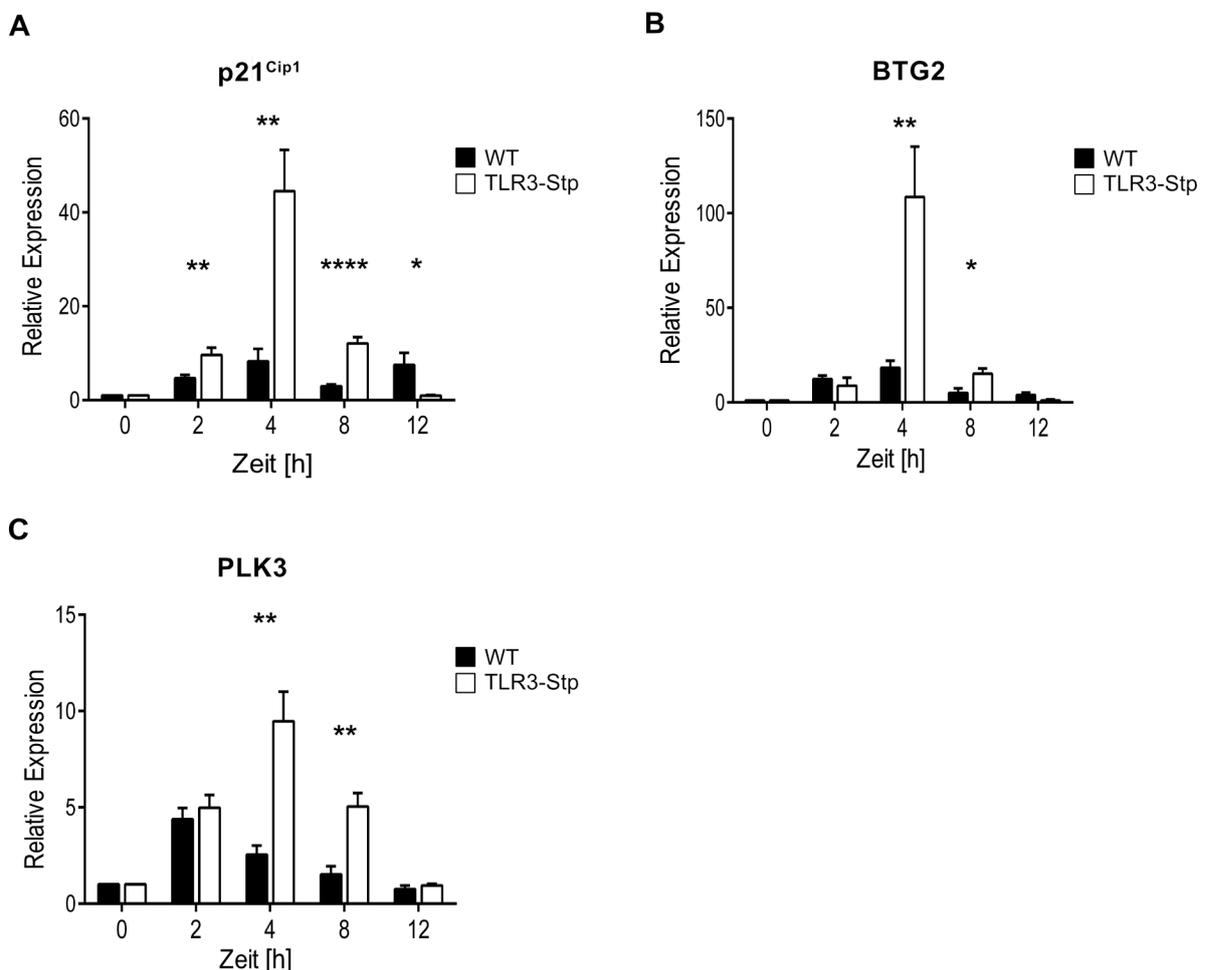


Abb. 9 Analyse der frühen Expression pro- und antiproliferativer Gene

(**A-C**) *q*-RT-PCR-Analyse der Expression von $p21^{Cip1}$, BTG2 und PLK3 ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Der Zellzyklusinhibitor $p21^{Cip1}$ hemmt alle Cyclin-abhängigen Kinasen (insbesondere CDK2). BTG2 ist Mitglied der BTG/Tob-Familie. Proteine dieser Familie weisen antiproliferative Eigenschaften auf und sind an der Regulation der G₁-S-Transition beteiligt. Die Familie der PLKs besteht aus vier Serin-/Threonin-Proteinkinasen, die den Zellzyklus, die Mitose sowie die Zytokinese regulieren.

4.3 Analyse des Zellzyklus während der Leberregeneration

Nachdem der Einfluss von TLR3 auf die frühe Phase der Regeneration in den vorherigen Abschnitten untersucht wurde, schließt sich nun die Untersuchung der Wirkung von TLR3 auf den Zellzyklus der Leberzellen während der Leberregeneration an. Indem die verschiedenen Phasen (G₁-S-Transition, S-Phase, G₂-M-Transition) des Zellzyklus einzeln untersucht werden, wird spezifiziert, an welcher Stelle TLR3 für die Proliferation und Zellteilung der Hepatozyten entscheidend ist.

4.3.1 Untersuchung der G₁-S-Transition

Wie unter 1.3.2 beschrieben, stellt der Restriktionspunkt ein kritisches Moment im Zellzyklus dar. Um den Restriktionspunkt zu überschreiten und somit in die S-Phase eintreten zu können, muss Rb-Protein hyperphosphoryliert werden. Die Hyperphosphorylierung erfolgt durch den CyclinD-CDK4/6-Komplex sowie CyclinE-CDK2-Komplex. Inhibiert werden kann der Cyclin D-CDK4/6-Komplex durch spezifische INK4-Proteine (z. B. p15^{INK4b}), die einen G₁-Arrest bewirken [123].

Die Analyse des Restriktionspunktes erfolgte mittels q-RT-PCR und Western Blotting. Die Expressionslevel von Cyclin D1, Cyclin E1, p-CDK2 sowie p-Rb wurden untersucht. Die Cyclin D1-mRNA-Level in **Abb. 10A** zeigten nach 2 h und 4 h einen signifikanten Anstieg mit einem Peak nach 32 h in den Kontrolltieren im Vergleich zu den TLR3-Stp-Tieren. Nach 32 h zeigte sich auch im Western Blot eine signifikant höhere Expression des Proteins im Wildtyp (**Abb. 10B**). In dieser Phase treten die meisten adulten Hepatozyten von der G₁- in die S-Phase ein. Für die Cyclin E1-mRNA konnte eine signifikant erhöhte Expression zu den wichtigen Zeitpunkten 24 h, 32 h und 40 h festgestellt werden. Im Vergleich dazu steigt die Expression der TLR3-Stp-Tiere kaum (**Abb. 10A**). Auf Proteinebene ließen sich dagegen keine Differenzen zwischen TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen und C57BL/6N ausmachen (**Abb. 10B**). Die Aktivität der Kinase CDK2 ist durch die Darstellung von p-CDK2 (Tyr160) überprüfbar. In der Analyse zeigte sich p-CDK2 in den Kontrolltieren nach 32 h und 40 h signifikant erhöht, was annähernd dem Zeitpunkt der G₁-S-Transition entspricht (**Abb. 10C**). Sowohl die höhere p-CDK2- als auch die höhere Cyclin D1-Expression in den Kontrolltieren im Vergleich zu den TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen ließ vermuten, dass auch die Aktivität von Rb in den WT-Mäusen höher sein könnte. Die Überprüfung erfolgte anhand der Rb-Phosphorylierungsstellen Serin 807 und 811. Die Phosphorylierung führt zur Freigabe von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und die S-Phase wird initiiert. Es bestätigte sich (**Abb. 10C**), dass p-Rb (Ser807/811) signifikant erhöht war in WT-Mäusen nach 32 h, 40 h und 48 h. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf eine verminderte G₁-S-Transition in TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen hin.

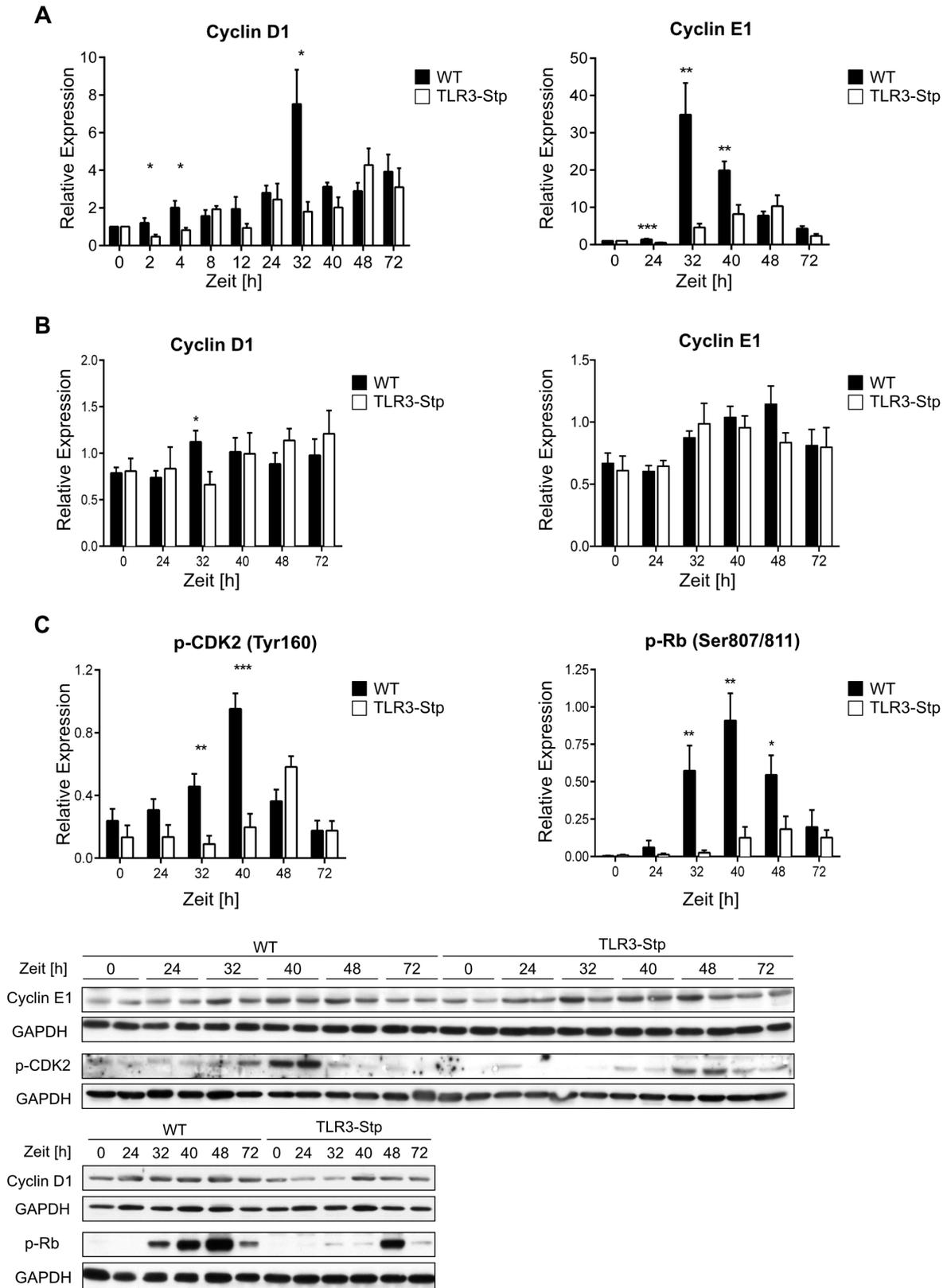


Abb. 10 Analyse des Restriktionspunktes

A) *q*-RT-PCR-Analyse der Expression von Cyclin D1 und Cyclin E1 **B)** Western Blot-Analyse der Cyclin D1- und E1-Proteine **C)** Western Blot-Analyse von p-CDK2 und p-Rb ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.3.2 Analyse der S-Phase

Die Proliferation der Hepatozyten wurde mittels zuvor erfolgter Injektion von BrdU immunhistochemisch ermittelt. BrdU kann als Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin während der S-Phase anstelle des Nucleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut werden. Somit eignet sich BrdU als Marker für proliferierende Zellen. Die quantitative Auswertung der BrdU-Inkorporation zeigt **Abb. 11A**. Repräsentative Bilder sind in **Abb. 11B** zusammengefasst. In den Untersuchungen zeigte sich nach 32 h und 40 h ein signifikant höherer Anteil BrdU-positiver Hepatozyten in WT-Mäusen. Der Höhepunkt der Hepatozyten in der S-Phase war in der Kontrollgruppe bei 40 h erreicht mit 42,2 % BrdU-positiver Hepatozyten. Der Höhepunkt in der TLR3^{Stp/Stp}-Gruppe wurde hingegen nicht nur verzögert bei 48 h erreicht, sondern blieb darüber hinaus mit einem Anteil von maximal $17,1 \pm 3,4$ % BrdU-positiver Hepatozyten unter dem Niveau des Kontrollstamms. Der Anteil BrdU-positiver Hepatozyten fiel sodann auch schneller ab. Nach 72 h wiesen die Kontrolltiere wieder signifikant mehr Hepatozyten in der S-Phase auf als die TLR3-defizienten Tiere. Die Kinetik ist vergleichbar mit Ergebnissen der Literatur [12]. Es lässt sich Folgendes festhalten: (1) Die TLR3-defizienten Tiere weisen weniger BrdU-positive Hepatozyten im zeitlichen Verlauf der Untersuchung auf. (2) Der Peak der sich in der S-Phase befindenden adulten TLR3-defizienten Hepatozyten ist um ca. 8 Stunden verzögert. (3) Die Proliferation der Hepatozyten ist in TLR3-defizienten Mäusen früher beendet.

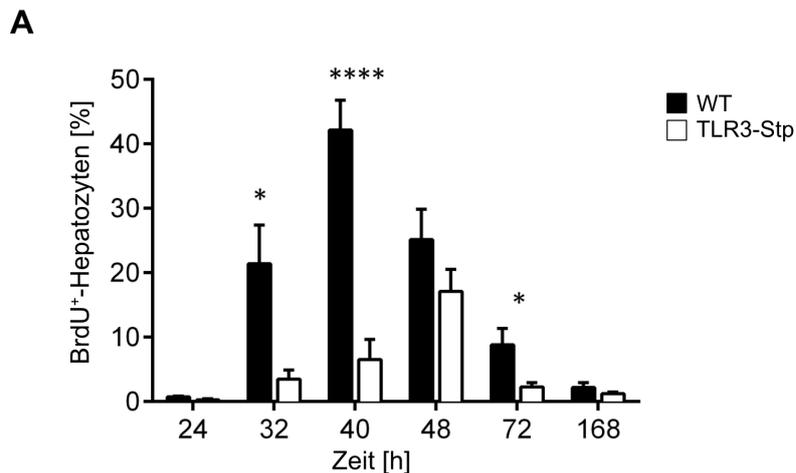


Abb. 11 Darstellung der S-Phase mittels IHC-Analyse der BrdU-Inkorporation

A) Quantitative Auswertung der BrdU-Daten ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Gezeigt ist die relative Anzahl BrdU-positiver Hepatozyten im zeitlichen Verlauf. Der Wildstamm zeigte einen früheren Beginn der Proliferation. Der Höhepunkt der Zellteilungen im Wildtyp projizierte sich auf 40 h, im TLR3-Stp-Stamm auf 48 h. Anschließend fiel der Anteil BrdU-positiver Hepatozyten ab, dies geschah in TLR3-Stp-Mäusen schneller als in Wildtypmäusen.

B

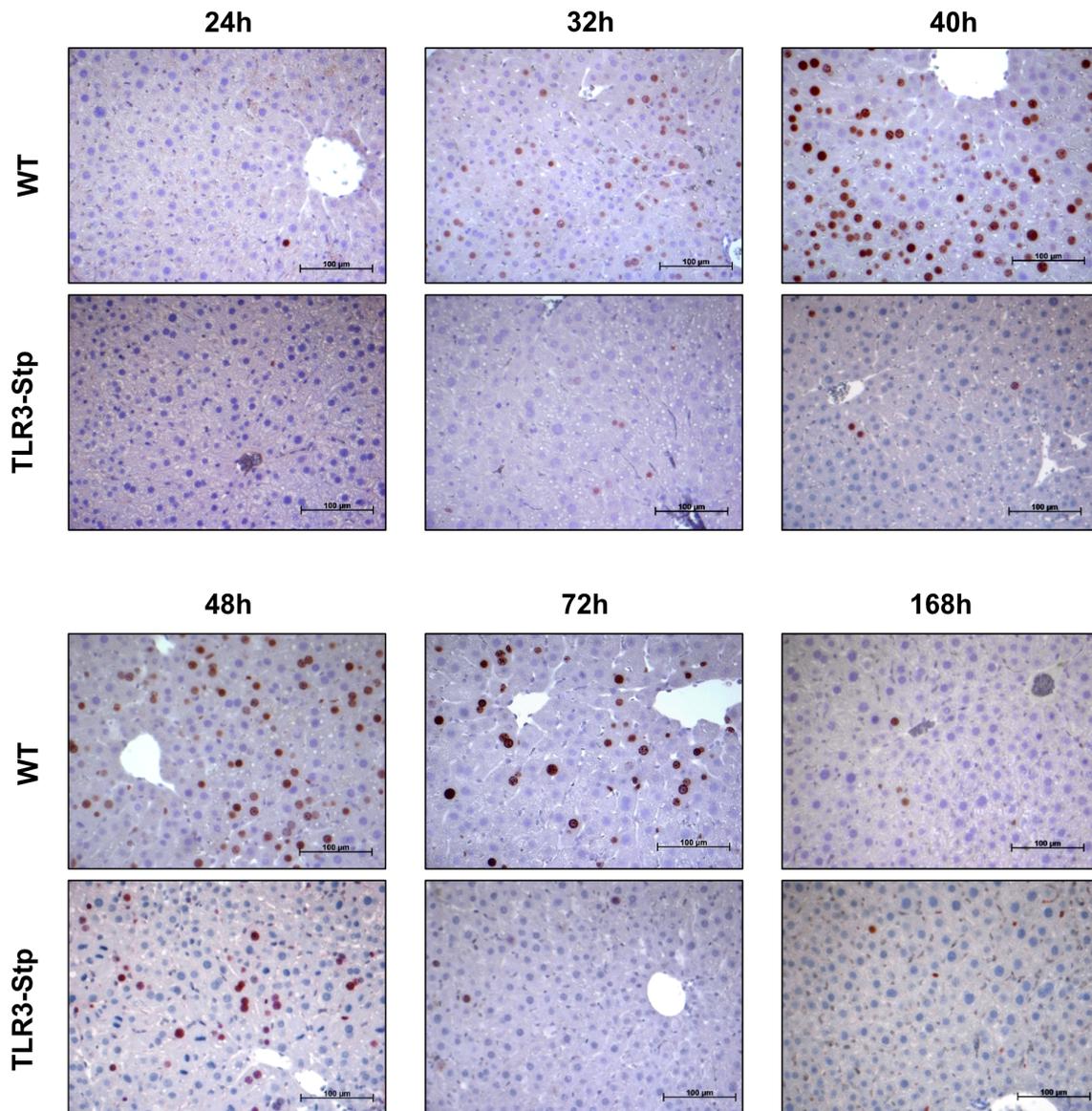


Abb. 11 Darstellung der S-Phase mittels IHC-Analyse der BrdU-Inkorporation

B) Repräsentative Bilder der Leberhistologie und Anti-BrdU-Färbung (24-168 h nach PHx). Deutlich wird, dass bei 24 h kaum Proliferation in beiden Mausstämmen bestand (gleiches gilt für TLR3-Mye-Mäuse, Daten nicht gezeigt). Die Regeneration begann nach 32 h im Wildtyp und verzögert in den TLR3-Stp-Mäusen ab 40 h. Wie in der quantitativen Auswertung zu sehen, war die Regeneration um ca. 8 h versetzt und schwächer ausgeprägt.

4.3.3 G₂-M-Transition

Für die Zellteilung nach der G₂-Phase ist die Expression von Cyclin A, Cyclin B und CDK1 nötig. Während der Cyclin A-CDK2- Komplex in der S-Phase aktiv ist, wird der Cyclin B-CDK1-Komplex für den Eintritt in die Mitose gebildet [124]. Während der späten S-Phase bindet

Ergebnisse

Cyclin A an CDK1 und der Komplex bleibt bis zur späten G₂-Phase bestehen. Cyclin A wird anschließend durch Cyclin B ersetzt. Cyclin B-CDK1 leitet dann als *mitosis-promoting factor* (MPF) die M-Phase ein. Die Expression von Cyclin A2 und Cyclin B1 wurde mittels q-RT-PCR quantifiziert. Die Expression von Cyclin A2 war in C57BL/6N-Mäusen ab 32 h deutlich induziert. Bei diesem Zeitpunkt sowie bei 40 h und 72 h zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen (**Abb. 12A**). Auch Cyclin B1 schien eine stärkere Induktion in den Kontrolltieren aufzuweisen. Analog zur Literatur wird es zeitlich später als Cyclin A2 exprimiert. So zeigte sich eine deutlichere Expression erst ab 40 h, die signifikant in C57BL/6N-Mäusen gegenüber TLR3^{Stp/Stp} erhöht war (**Abb. 12B**). Die Expression der Serin/Threonin-Kinase CDK1 wurde auf Proteinebene im Western Blot analysiert (**Abb. 12C**). In den Kontrolltieren war CDK1 ab 32 h signifikant höher exprimiert und erreichte den Hochpunkt bei 40 h. Danach war die Expression bei 48 und 72 h vergleichbar.

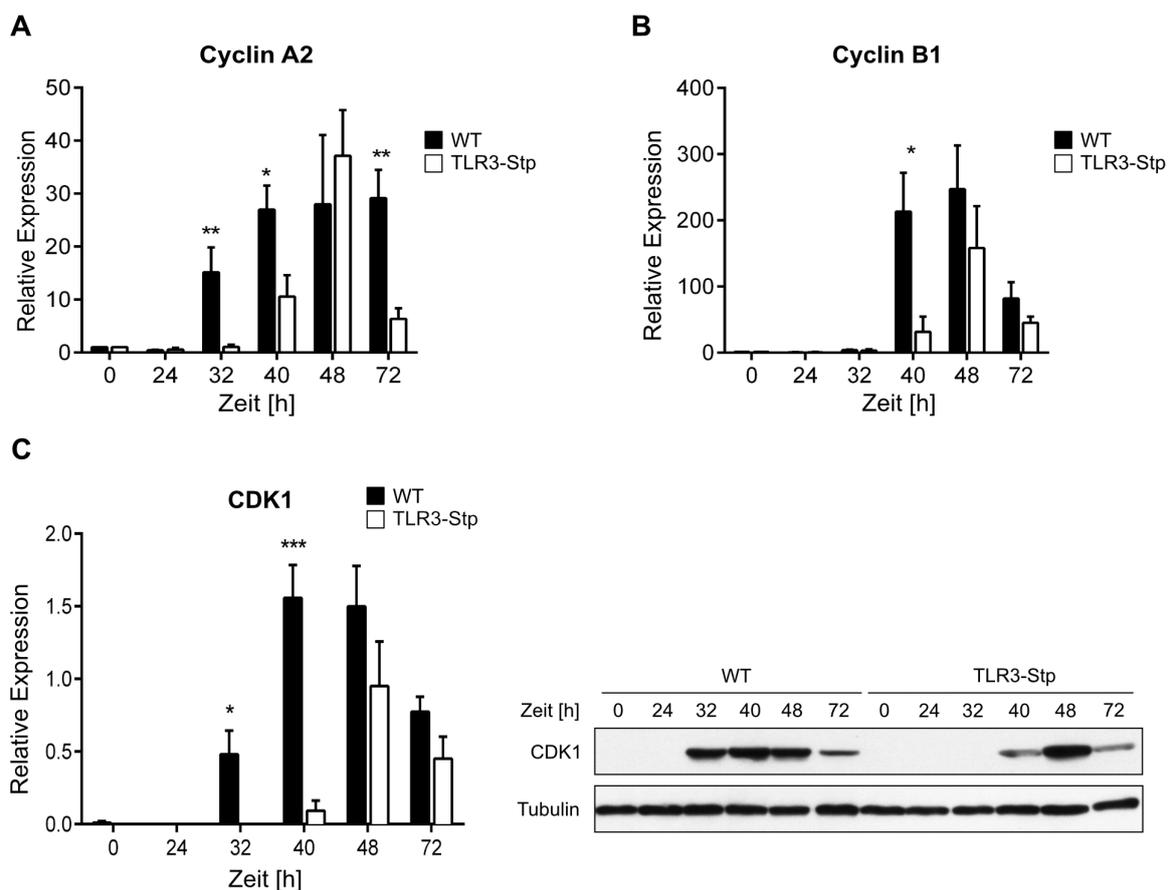


Abb. 12 Analyse der G₂-M-Transition

A) Darstellung der mRNA-Expression von Cyclin B1. **B)** Darstellung der mRNA-Expression von Cyclin A2. **C)** Proteinexpression von CDK1 nach PHx als Surrogatparameter für die G₂-M-Transition ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4 Analyse inhibitorischer Signale während der Leberregeneration

Nachdem der Einfluss von TLR3 auf den Zellzyklus im Rahmen der Leberregeneration untersucht wurde, sollen nun im Folgenden verschiedene Inhibitoren der Regeneration analysiert werden, um weiter Aufschluss über die Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den TLR3-Stp-Tieren zu bekommen. Dazu zählen Zellzyklusinhibitoren, der TGF- β -Signalweg sowie pro-apoptotische Gene.

4.4.1 Zellzyklusinhibitoren

Zu den bekannten Zellzyklusinhibitoren zählen $p15^{INK4b}$, $p21^{Cip1}$, GADD45A, GADD45B, IER1 sowie CDC42 [125-127]. Eine erhöhte Expression in der Leber kann eine Verzögerung in der Leberregeneration erklären. Der Zellzyklusinhibitor $p21^{Cip1}$ wurde bereits in der frühen Phase der Leberregeneration analysiert (siehe 4.2.2). Nach 32 h, wo sich die Hepatozyten im Übergang von der G₁- zur S-Phase befinden, wurde $p21^{Cip1}$ signifikant höher in TLR3^{Stp/Stp}- als in WT-Mäusen exprimiert (**Abb. 13A**). Eine Erhöhung der Expression von $p21^{Cip1}$ könnte dazu führen, dass weniger Hepatozyten in die S-Phase eintreten. Der Zellzyklusinhibitor $p15^{INK4b}$, der spezifisch CDK4/6 hemmt, wies eine höhere Expression in TLR3-Stp-Mäusen bei 24 h und 40 h auf (**Abb. 13B**). Zusammen zeigten die Zellzyklusinhibitoren $p21^{Cip1}$ und $p15^{INK4b}$ zu verschiedenen Zeitpunkten im Prozess der Regeneration eine höhere Expression in TLR3-Stp-Mäusen: $p21^{Cip1}$ in der frühen Phase während des G₁-Eintritts sowie zum späteren Zeitpunkt der G₁-S-Transition bei 32 h und $p15^{INK4b}$ bei 24 und 40 h während der Proliferationsphase. Lediglich nach 48 h war $p15^{INK4b}$ höher in WT-Mäusen exprimiert.

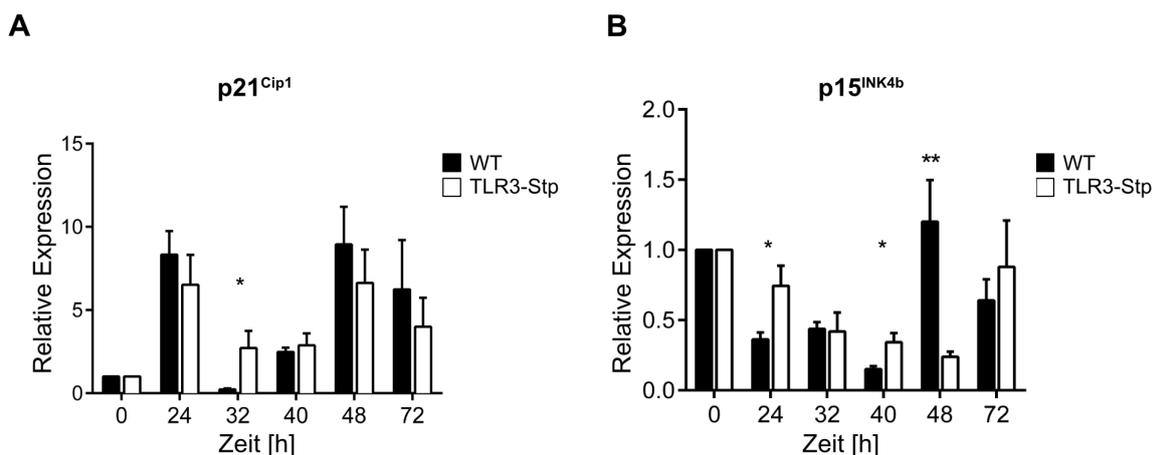


Abb. 13 Darstellung der Zellzyklusinhibitoren während der Progressionsphase

A) q-RT-PCR-Analyse der mRNA-Expression von $p21^{Cip1}$. **B)** mRNA-Expression des CDK4/6-Inhibitors $p15^{INK4b}$ ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4.2 Transforming Growth Factor- β als Inhibitor der Leberregeneration

Der TGF- β -Signalweg beeinflusst sowohl Gewebewachstum als auch -entwicklung. Die Stimulation des Signalwegs kann zu einem G₁-S-Arrest sowie zur Induktion der Apoptose führen [128, 129]. Die humane TGF- β -Superfamilie schließt mehr als 30 Faktoren ein, wie z. B. TGF- β , Activin A und die *Bone morphogenetic proteins* (BMPs). Die TGF- β -Isoformen TGF- β 1, 2 und 3 signalisieren spezifisch über die Bindung an den TGF- β -Rezeptorkomplex, bestehend aus T β RI und T β RII. Die intrazelluläre T β RII-Serin/Threonin-Rezeptorkinase phosphoryliert die T β RI Serin/Threonin-Rezeptorkinase, woraufhin R-Smads (im Fall von TGF- β Smad2 und Smad3) durch Phosphorylierung der Serin-Reste 465/467 (Smad2) bzw. Serin-Reste 423/425 (Smad3) am Carboxy-Terminus induziert werden [66]. Smad2/3 bindet dann an Smad4 und bildet den Smad4-R-Smad-Komplex. Es folgt die Translokation in den Zellkern und die Assoziation mit unterschiedlichen Kofaktoren, um die Affinität der Smad-Proteine zu *Smad binding element* (SBE) der DNA zu erhöhen und spezifisch Zielgene, deren Proteine Zellwachstum und -teilung inhibieren, je nach Kombination zu exprimieren oder zu unterdrücken [130]. Mittels q-RT-PCR wurde die Expression der TGF- β -Isoformen TGF- β 1 und TGF- β 2 untersucht (**Abb. 14A**). Interessanterweise zeigte sich bei 32 h für beide Isoformen eine höhere Expression im Wildtyp. Eine eindeutige Dynamik im Verlauf ließ sich jedoch nicht erkennen. Zudem erschien die Expression generell recht gering.

Die Auswirkung der TGF- β 1- und TGF- β 2-Expression auf die Signalwegaktivität wurde anhand von p-Smad2 (Ser 465/467) im Western Blot überprüft (**Abb. 14B**). Bei 24 h zeigte sich eine signifikante Erhöhung in TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen. Die Expression von p-Smad2 erreichte somit in TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen schneller ein höheres Niveau als im Wildtyp. Durch den Verlauf der TGF- β 1- und TGF- β 2-Expression lässt sich dieser Befund nicht erklären.

Aus der TGF- β -Superfamilie signalisiert jedoch nicht nur TGF- β über die Smad2/3-Proteine, sondern auch Activin A, das über ActR-II (Typ2-Rezeptor) und ALK4 bzw. ALK7 die R-Smads phosphoryliert. Yasuda *et al.* zeigten, dass Activin A auch die DNA-Synthese in Rattenhepatozyten hemmt [69]. In der q-RT-PCR konnte bestätigt werden, dass die Activin-mRNA sowohl bei 24 h als auch bei 40 h signifikant in den TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen erhöht war (**Abb. 14C**).

Der proliferationsinhibierende Smad-Signalweg in TLR3^{Stp/Stp} Mäusen scheint stärker aktiv zu sein. Dies ist vermutlich nicht durch TGF- β , aber durch die Expression von Activin A bedingt.

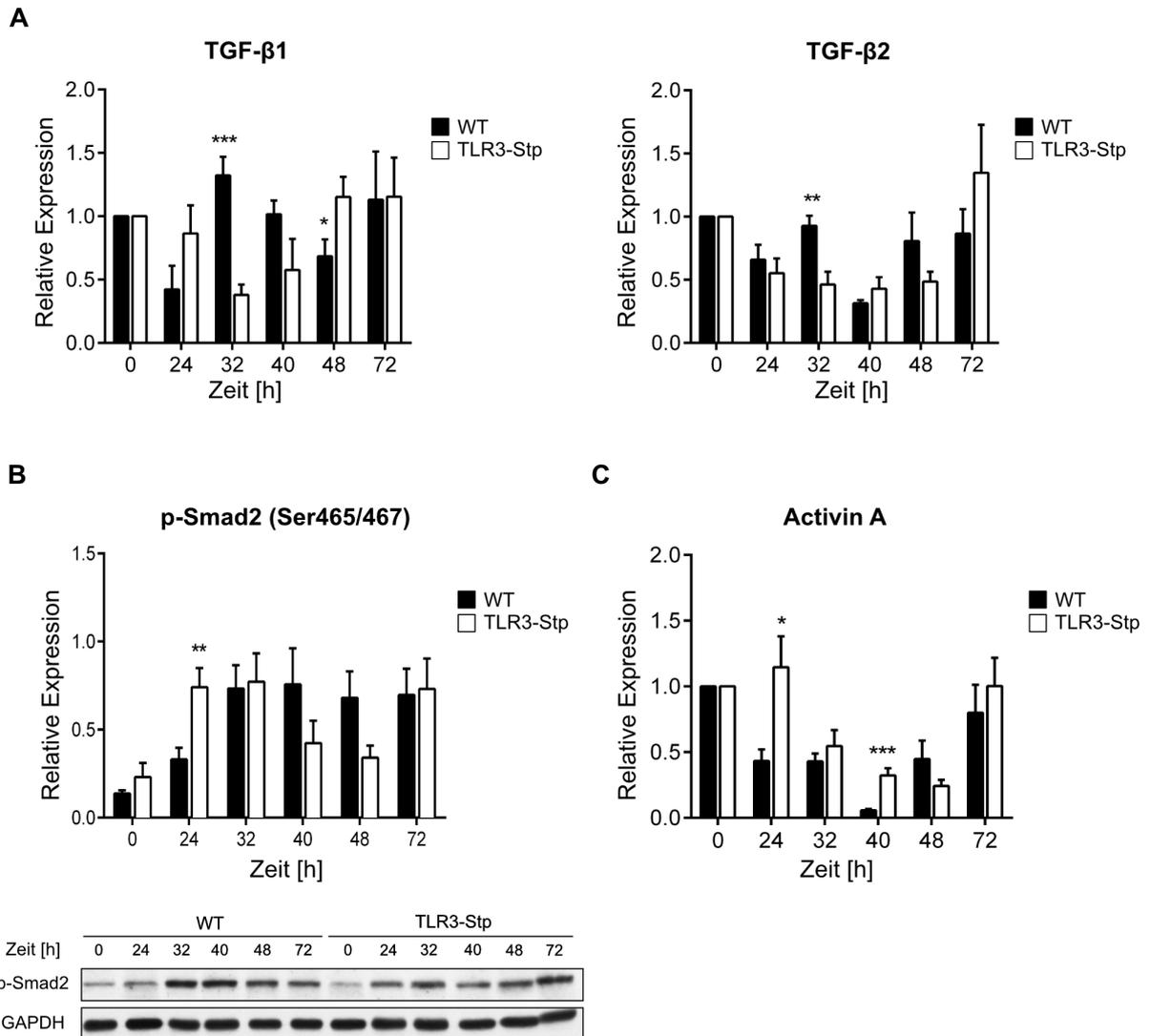


Abb. 14 Analyse des Smad-Signalwegs

A) Die mRNA-Expression der Isotypen TGF- β 1 und 2 wurde mittels q-RT-PCR analysiert. **B)** Western Blot-Daten zur dualen Phosphorylierung von Smad2. **C)** q-RT-PCR-Analyse des Gens Activin A ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4.3 Apoptose

Eine erhöhte Apoptoserate während der Leberregeneration kann zu einer eingeschränkten Regenerationskapazität führen. Untersucht wurde mittels q-RT-PCR die Expression von Survivin/BIRC5, das an der Regulierung der Apoptose in der Leber beteiligt ist (**Abb. 15A**). Survivin hemmt die Apoptose und unterstützt die Zellzyklusprogression [131, 132]. Baba *et al.* zeigten, dass sowohl Survivin-mRNA als auch -Protein in Ratten zwischen 24-72 h nach PHx signifikant hochreguliert werden und deren Expression mit der Proliferation korreliert. In

humanen Leberbiopsien im Rahmen von Leber-Lebendspenden zeigte sich eine Expression nach 5-7 Tagen und korrelierte hier mit der Proliferation [133]. Survivin wird vor allem in der G₂-M-Phase exprimiert, wo es während der Mitose an der korrekten Aufteilung der Schwesterchromatid-Chromosomen beteiligt ist [134]. Weiterhin konnte in Regenerationsexperimenten gezeigt werden, dass ein Verlust von Survivin zu Makronukleation, Polyploidität und einer reduzierten Anzahl an Hepatozyten aufgrund von gestörter Zellteilung führt [135]. Nach 40 h, 48 h sowie 72 h zeigte sich eine starke Induktion in den Kontrolltieren, wohingegen die Expression des Survivin-Transkripts in TLR3^{Stp/Stp}-Mäusen signifikant geringer ausfiel.

Vestigial Like Family Member 4 (VGLL4) ist Mitglied der Vestigial-like Proteinfamilie bestehend aus vier Genen (VGLL1-4). Das Protein ist ein transkriptioneller Koregulator, der die Aktivität der *transcriptional enhancer factors* (TEFs), auch als *TEA domain-containing factors* (TEADs) bezeichnet, moduliert. Vermutlich kann VGLL4 den Zelltod verhindern, indem die Expression von Apoptose- und Zytoskelett-assoziierten Genen moduliert wird. Weiterhin kann VGLL4 die Caspase-Aktivität reduzieren und so Zellüberleben erhöhen. In den mRNA-Analysen fiel eine signifikant höhere Expression in WT-Mäusen bei 32 h im Vergleich zu TLR3-Stp-Mäusen auf (**Abb. 15B**).

Auf Proteinebene wurde die aktivierte Effektor-Caspase *cleaved Caspase 3* untersucht, die neben anderen Endoproteasen am Ende des in- sowie extrinsischen Apoptosesignalwegs den Abbau verschiedener Strukturproteine und die Fragmentierung der DNA einleitet (**Abb. 15C**). Vor allem bei 24 h zeigte sich eine hochsignifikante Erhöhung der Proteinexpression in TLR3-Stp-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen. Nach 32 h kam es zu einem Abfall auf das Niveau der WT-Mäuse und der weitere Verlauf entwickelte sich nahezu synchron.

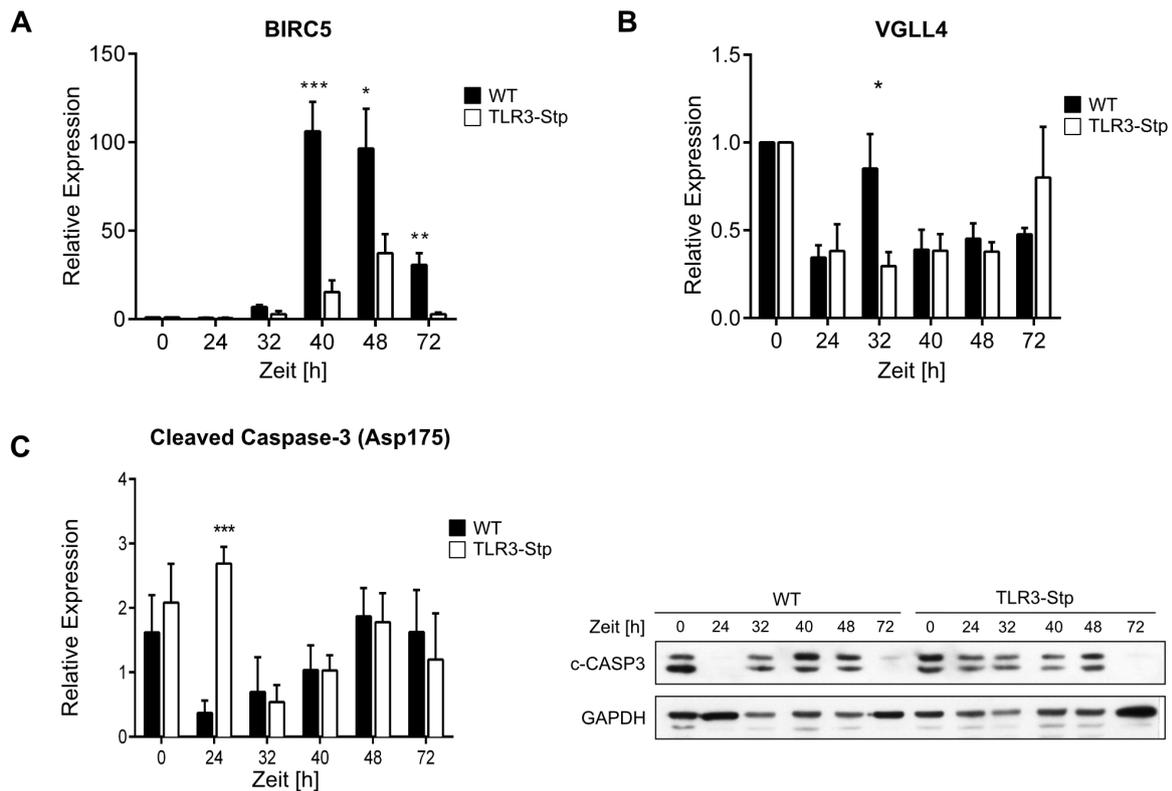


Abb. 15 Untersuchung der Apoptose im Rahmen der Leberregeneration

A) mRNA-Expression von Survivin/BIRC5. **B)** q-RT-PCR für VGLL4. **C)** Western Blot-Daten zur Expression von cleaved Caspase 3 ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5 Analyse proliferationsfördernder Signale während der Leberregeneration

Im vorhergehenden Abschnitt wurden inhibitorische Mechanismen der Leberregeneration untersucht. Nun sollen im Folgenden proliferationsfördernde Mediatoren und Signalwege untersucht werden, um eine Verbindung zwischen TLR3 und der Proliferation im Rahmen der Regeneration herzustellen. Exemplarisch dargestellt wird die Aktivierung von HGF durch das Urokinase-System, das bereits früh nach der PHx induziert wird. Anschließend wird die Aktivität des pro-proliferativen HGF-Signalwegs untersucht.

4.5.1 Freisetzung von *Hepatocyte Growth Factor* aus der extrazellulären Matrix

Während der Regeneration der Leber wird die ECM umgebaut und neu strukturiert. Ein System aus MMPs kontrolliert das *Remodeling* und die Freisetzung von aktiven Wachstumsfaktoren aus der ECM. Dieser Kontrolle unterliegt auch HGF, ein multifunktionales Zytokin und potentes Mitogen, das von zentraler Relevanz für die Progression der Leberregeneration ist (**Abb. 16**).

Aktives HGF bindet an c-Met und führt zur Aktivierung der Signalwege Ras/Erk/MAPK, PI3K/Akt, Rac/Pak und Crk/Rap1. Met-defiziente Mäuse zeigen nach 2/3-PHx eine geringere Erk1/2-Aktivierung und eine eingeschränkte Proliferation [52]. HGF liegt in inaktiver Form in der hepatischen ECM vor. Durch MMPs und Aktivatoren wie Urokinase bzw. Urokinase-Plasminogenaktivator (u-PA) und Gewebeplasminogenaktivator (t-PA) kann es rasch in die aktive Form gespalten werden. Die Ausschaltung von TIMP1 führt zu einer erhöhten HGF-Aktivität und einer gesteigerten Zellproliferation. Analog verhält sich die Zunahme der TIMP1-Funktion, was zu einer verzögerten Zellteilung führt [136]. Eine erhöhte Expression des Gens PLAUR, das für den Urokinase-Rezeptor codiert, und der Komponenten des Plasminogen-Aktivierungssystems korreliert auch mit Malignität und Metastasierung in verschiedenen Tumorentitäten [137, 138]. Die Bindung von Urokinase an den Rezeptor führt zu einer erhöhten Produktion von aktivem Plasmin, was die Aktivierung der MMPs fördert. Wie unter 1.4.2 beschrieben, ist ein Zusammenhang zwischen den Urokinase-System und TLR3 im Rahmen einer Tumorzelllinie *in vitro* nachgewiesen [105].

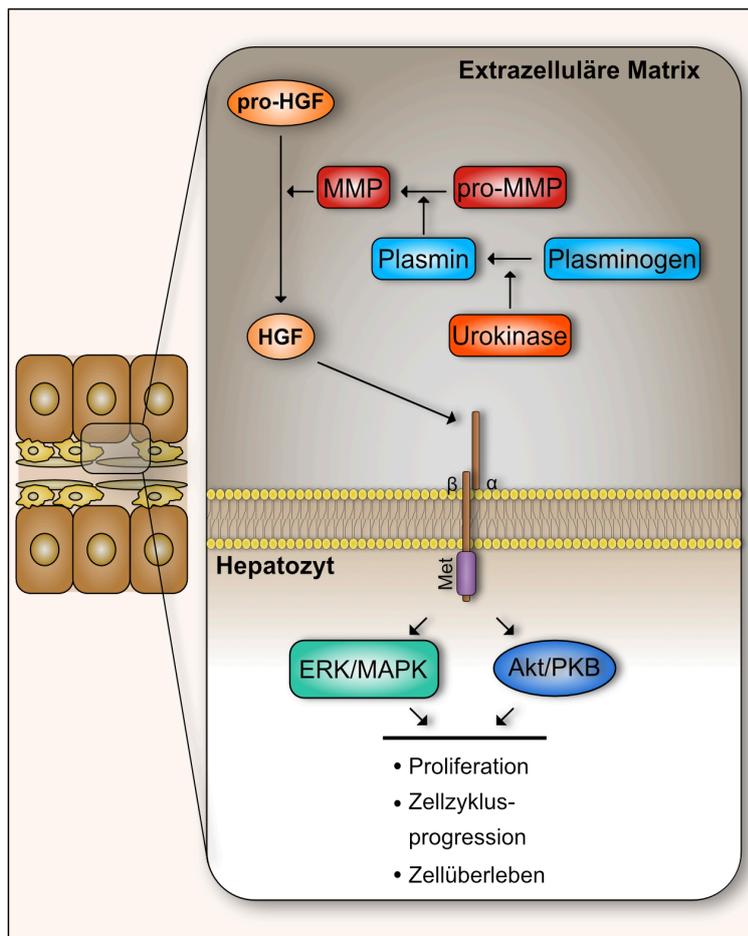


Abb. 16 Aktivierung von HGF aus der ECM durch das Urokinase-System

Der Wachstumsfaktor HGF liegt in der extrazellulären Matrix als inaktives pro-HGF vor. Erst durch die Spaltung in aktives HGF durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bindet HGF an den Rezeptor c-Met und aktiviert verschiedene proliferationsfördernde Signalwege in Hepatozyten. Die Aktivierung der MMPs unterliegt wiederum der Kontrolle durch das Urokinase-System.

Um Hinweise zu erhalten, ob TLR3 auch das Urokinase- und MMP-System in der Leberregeneration beeinflusst, wurde die Expression der Gene PLAU (Urokinase), PLAT (Gewebeplasminogenaktivator), PLAUR (Urokinase-Rezeptor), MMP-9 sowie MMP-13 in der

Ergebnisse

der q-RT-PCR untersucht (**Abb. 17A-E**). Es bestätigte sich eine erhöhte Expression von MMP-13 in TLR3-exprimierenden WT-Mäusen für die Zeitpunkte 12 h und 32 h. Für MMP-9 konnte zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied detektiert werden. Für PLAT zeigte sich zu späten Zeitpunkten wie 48 h und 72 h zwar eine erhöhte Expression, allerdings war diese nicht signifikant. Dagegen ließ sich für PLAU eine signifikante Hochregulierung nach 24 h, 32 h und 40 h in WT-Mäusen darstellen. Auch PLAUR war signifikant hochreguliert bei 32 h.

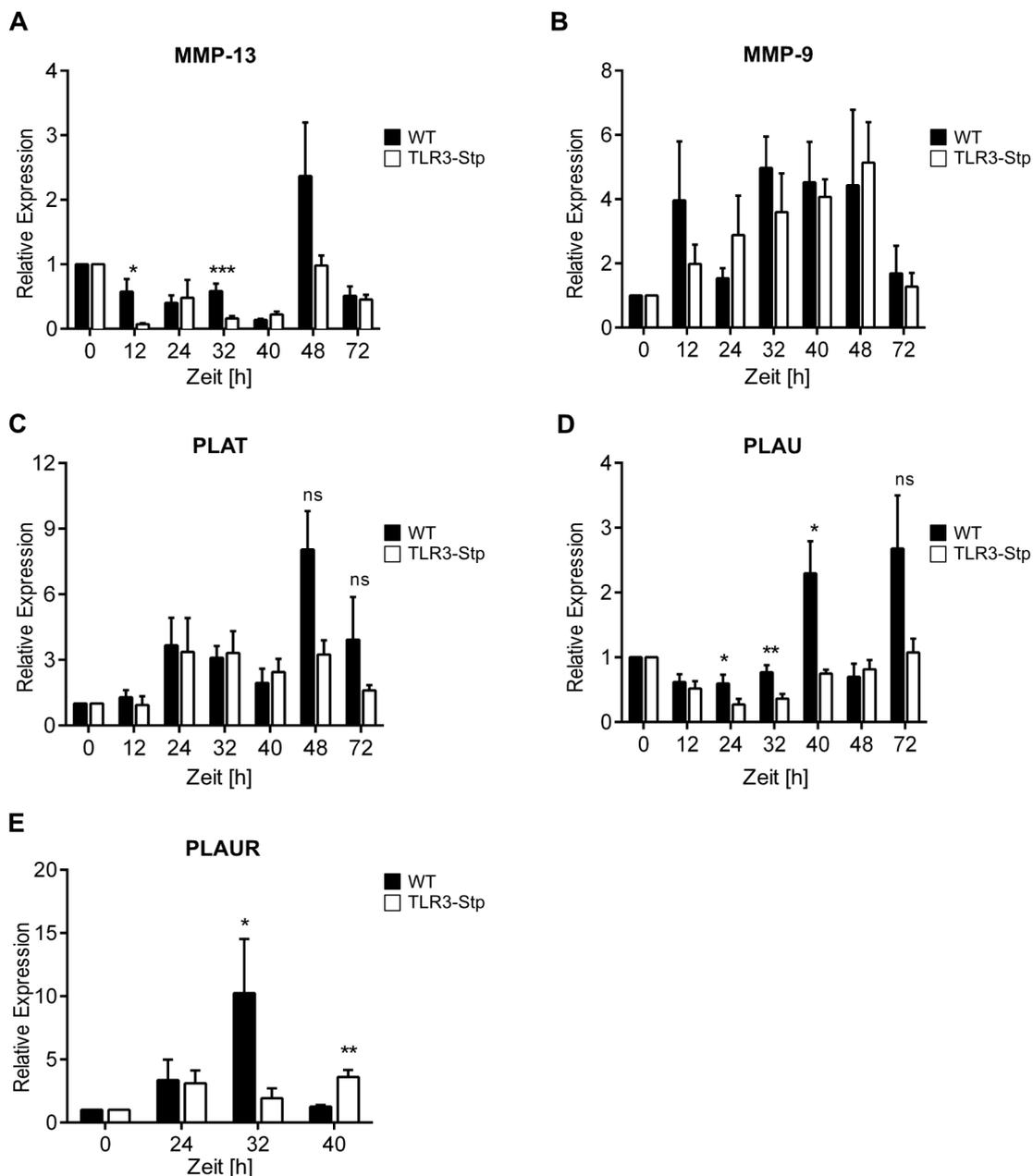


Abb. 17 Analyse der MMP-Expression sowie des PLAU/PLAUR-Systems

(A-E) q-RT-PCR-Analyse der Expression von Matrix-Metalloproteinasen und deren Aktivatoren ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Es zeigte sich eine erhöhte Expression von MMP-13 im Wildtyp nach 32 h, simultan waren auch die Gene für u-PA (PLAU) und den u-PA-Rezeptor (PLAUR) erhöht exprimiert.

Ergebnisse

Nachdem gezeigt wurde, dass die Gene PLAU und PLAUR des Urokinase-Systems in TLR3-exprimierenden WT-Mäusen stärker exprimiert werden, sollte auch der Einfluss auf die Aktivierung von HGF untersucht werden. Neben der Freisetzung aus der ECM steigt die Konzentration von HGF in der Leber zusätzlich durch die *de novo*-Synthese in Kupffer-Zellen, Ito-Zellen und LSECs nach PHx. Deshalb wurde die mRNA-Expression von HGF mittels q-RT-PCR untersucht (**Abb. 18A**). Es zeigte sich ein biphasischer Verlauf mit einer höheren Expression von HGF-mRNA nach 8 h und einem zweiten Höhepunkt nach 48 h in WT-Mäusen verglichen zu TLR3-Stp-Mäusen. Im letzten Schritt sollte analysiert werden, ob sich die stärkere Aktivierung des PLAU- und MMP-Systems auch auf die HGF-Konzentration im Serum auswirkt (**Abb. 18B**). HGF wirkt auch endokrin proliferationsfördernd und muss somit nicht unmittelbar in der Leber freigesetzt werden, um dort auf Hepatozyten zu wirken [139, 140]. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Serum-Konzentration bereits nach 4 h und 8 h in beiden Mausstämmen. Die Konzentration fiel dann in TLR3-Stp-Mäusen bei 24 h ab und erreichte ein Minimum bei 32 h und 40 h. Insgesamt zeigte sich in den TLR3-Stp-Mäusen ein biphasischer Verlauf mit einem Anstieg der Konzentration nach 48 h. Im Vergleich zum Abfall der HGF-Konzentration in den TLR3-Stp-Mäusen zeigte sich in den WT-Mäusen eine stabil hohe Konzentration mit einem Peak bei 40 h. Sowohl nach 24 h und 32 h als auch nach 40 h waren die Konzentrationsniveaus signifikant höher in WT- verglichen mit TLR3-Stp-Mäusen.

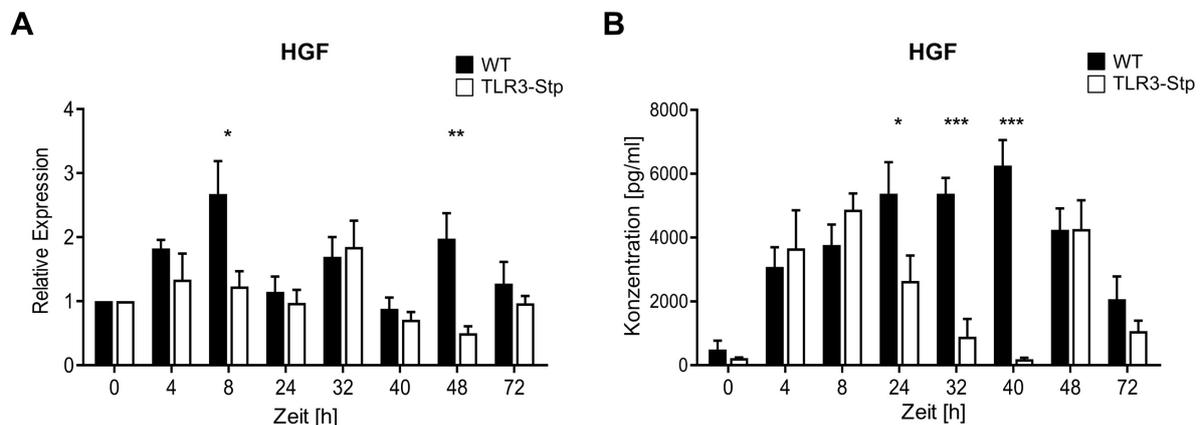


Abb. 18 Analyse der Expression und Konzentration von HGF

A) mRNA-Expression von HGF im Wildstamm vs. TLR3-Stp-Stamm **B)** ELISA-Daten der HGF-Konzentration im Serum ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Während der Progressionsphase fördern Mitogene wie HGF die Proliferation der Leberzellen. So zeigte sich für HGF im Wildtyp eine signifikant höhere Konzentration während dieser Phase (24-40 h).

4.5.2 PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Inwieweit sich die geringere HGF-Expression in der Leber sowie die geringere Serumkonzentration auf c-Met-abhängige Signalwege in der Leber auswirken, wurde anhand des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs (**Abb. 19**) exemplarisch untersucht. Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren wie HGF aktiviert und reguliert die Zellproliferation abhängig des zellulären Energielevels [141, 142]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass TLR3 über den TRIF/TBK1-Signalweg Akt direkt aktivieren kann und somit Einfluss auf die Zellproliferation nimmt [143].

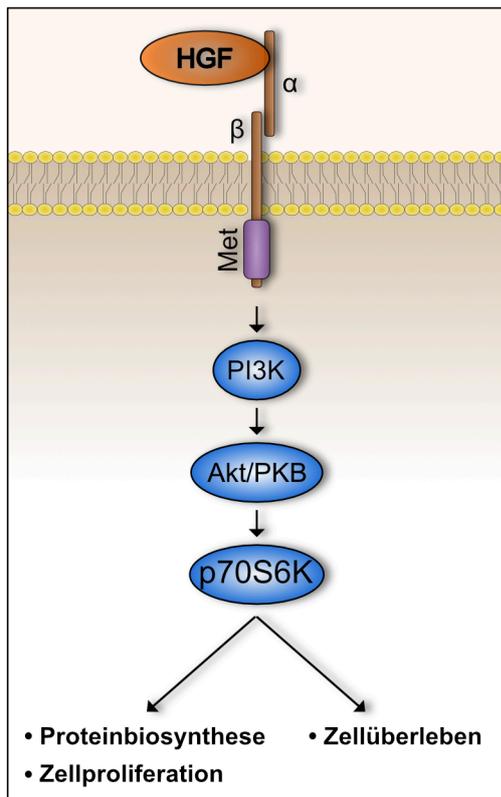


Abb. 19 Aktivierung der S6-Kinase durch HGF

Sobald HGF an c-Met bindet, wird über PI3K Akt/PKB aktiviert. Dies führt schließlich zur Aktivierung von mTORC1, das die S6-Kinase phosphoryliert und aktiviert. Die S6-Kinase aktiviert die Proteinbiosynthese und fördert damit die Zellproliferation.

Auf Proteinebene zeigte sich im Western Blot, dass die Phosphorylierung von Akt (Ser473/Thr308) sowohl in WT-Mäusen als auch in TLR3-Stp-Mäusen nach PHx zunimmt (**Abb. 20A**). Die p-Akt (Ser473)-Expression stieg stetig bis 72 h an, die p-Akt (Thr308)-Expression erreichte den Höhepunkt bei 48 h. Bis auf 72 h für p-Akt (Thr308) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen. Trotzdem wies die Effektor kinase p-p70S6-Kinase (Thr389) einen höheren Phosphorylierungsgrad in WT-Mäusen nach 32 h und 72 h auf (**Abb. 20B**). Dies könnte auf eine stärkere Aktivierung des mTOR-Signalwegs in Mäusen hinweisen, die TLR3 exprimieren.

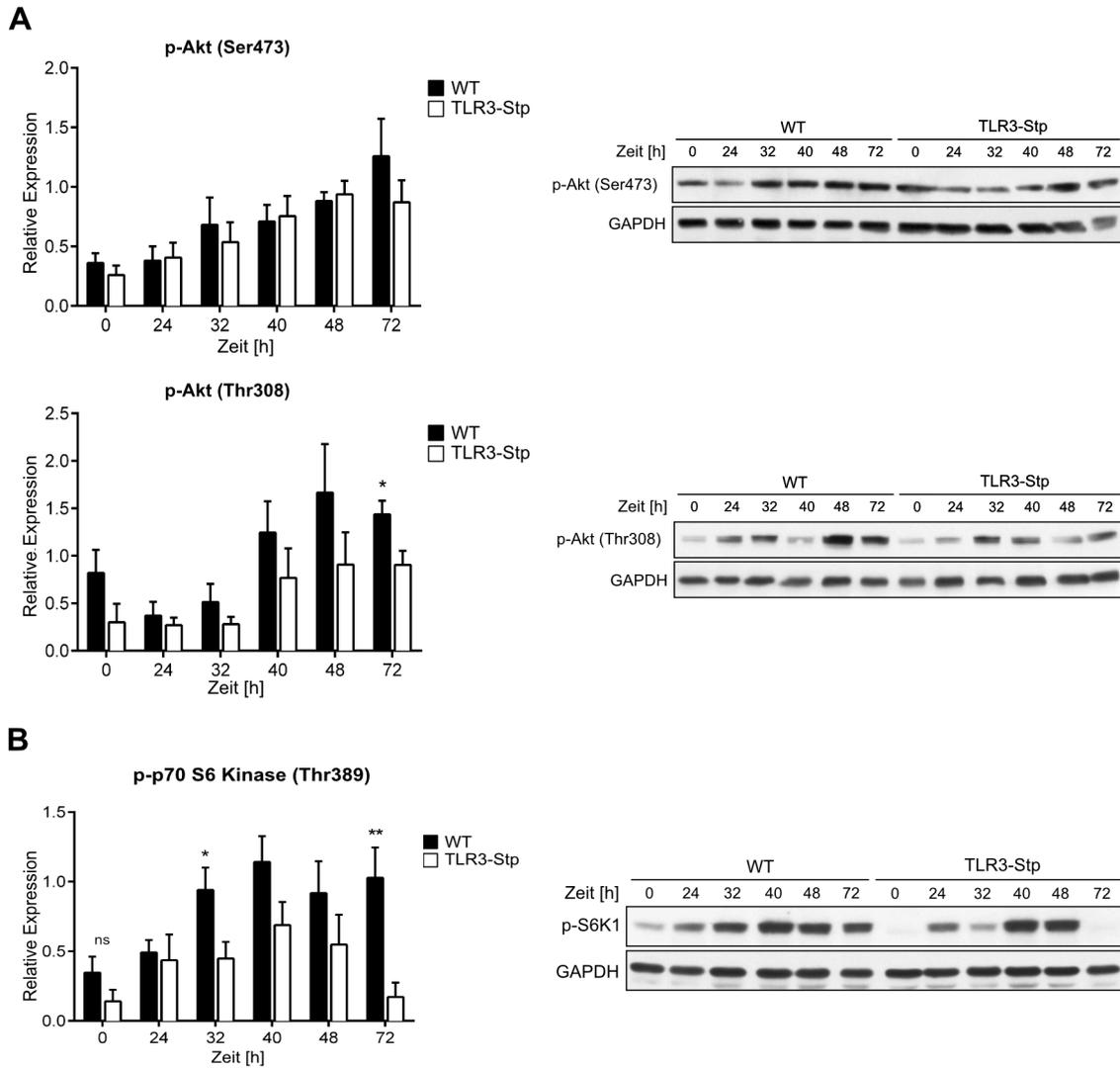


Abb. 20 Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs

A) Darstellung der p-Akt-Aktivität als Parameter für die Zellproliferation. **B)** Darstellung der aktivierten Effektor kinase p-p70S6-Kinase ($n \geq 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die Aktivierung von Akt mittels der Phosphorylierung an Ser473 sowie Thr308 führt im weiteren Verlauf zur Aktivierung der S6-Kinase. Zellteilung und Proliferation werden so positiv reguliert. Eine höhere Aktivität von S6-Kinase zu wichtigen Zeitpunkten während der Regeneration (z. B. 32 h) war im Wildtyp zu erkennen.

5 Diskussion

5.1 Der zellspezifische Einfluss von TLR3 auf die Leberregeneration

Der Verlauf des L/K-Verhältnisses in 4.1 zeigt, dass TLR3-Stp-Mäuse (TLR3^{OFF}) verzögert und eingeschränkt regenerieren. Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass TLR3 als positiver Mediator im Rahmen der Leberregeneration agiert und für eine effektive Kompensation des hepatischen Gewebeverlustes benötigt wird. Die alleinige Expression von TLR3 in Monozyten, reifen Makrophagen und Granulozyten (TLR3-Mye-Mäuse) führt jedoch nicht, wie vermutet, zu einer Wiederherstellung der Regenerationsfähigkeit. Beide transgene Mausstämme weisen zum Ende der Regenerationsphase sowohl nach 168 h als auch 336 h einen signifikant niedrigeren L/K-Quotienten auf als die Kontrolltiere. Die TLR3-Stp- bzw. TLR3-Mye-Mäuse erreichen das Plateau der Regenerationsfähigkeit zudem früher als die Kontrollen. Da sowohl TLR3-Stp- als auch TLR3-Mye-Mäuse eine vergleichbar reduzierte Regeneration der Leber aufweisen, werden in den folgenden Abschnitten primär die Unterschiede zwischen WT- und TLR3-Stp-Mäusen diskutiert, um so insgesamt die Rolle von TLR3 in der Leberregeneration zu beschreiben.

Hinsichtlich der Charakterisierung einer zellspezifischen Funktion des TLR3 im Rahmen der Leberregeneration liegt nun Evidenz vor, dass die alleinige, zellspezifische Expression von TLR3 in Monozyten, reifen Makrophagen und Granulozyten (aber nicht in den restlichen Zellen des Organismus) nicht ausreicht, um die volle Regenerationskapazität wiederherzustellen. Zukünftige Experimente mit weiteren zellspezifischen TLR3^{ON}-Mutanten können dahingehend weitere Erkenntnisse liefern. Zelltypen von Interesse sind insbesondere Hepatozyten, Ito-Zellen sowie ortsständige Endothelzellen (LSECs).

5.2 Die frühe Phase der Leberregeneration

Verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren orchestrieren die Anfangsphase der Regeneration und das *priming* der Hepatozyten, also die G₀-G₁-Transition sowie rasche Expression der *immediate early genes* (c-Fos, c-Jun, β-Catenin etc.) in Hepatozyten, die für die spätere Proliferation der Hepatozyten eine Rolle spielen [144-146]. Es ist bekannt, dass TLRs die Zytokinexpression stimulieren. Gut untersucht sind dabei die Zytokine IL-6 und TNF-α. So kann TNF-α beispielsweise Kupffer-Zellen, LSECs oder Ito-Zellen aktivieren, die dann über die Sekretion von IL-6 in Hepatozyten zur Phosphorylierung von STAT3 und zum oben beschriebenen *priming* beitragen [147]. Denkbar ist hier ein Einfluss des TLR3 (**Abb. 21**). Die

Ergebnisse zeigen, dass sowohl die mRNA-Expression als auch die Serum-Konzentration von IL-6 zu Beginn der Leberregeneration zwar steigen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und TLR3-Stp-Mäusen. Die Aktivierung des Signalwegs korreliert mit der Phosphorylierung von STAT3 (Tyr705), welche mittels Western Blot überprüft wurde. Eine frühe Aktivierung zeigt sich bereits bei 2 h, die dann im weiteren Verlauf abnimmt. Auch hier ist kein Unterschied zwischen TLR3-Stp- und WT-Mäusen detektierbar. Die Hypothese, dass TLR3 in der frühen Phase die IL-6-Produktion moduliert und so positiven Einfluss auf die Regeneration nimmt, ist somit nicht haltbar (auch für die Re-Expression von TLR3 in Lysozym M-exprimierenden Zellen ergibt sich keine signifikante Änderung für den IL-6-Signalweg, Ergebnisse nicht gezeigt). Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten lassen somit die Schlussfolgerung zu, dass der Entzündungsmediator IL-6 unabhängig von TLR3 die Regeneration der Leber moduliert. An dieser Stelle soll auf die Forschungsgruppe um Zorde-Khvaleyevsky *et al.* hingewiesen werden, die in ihrer Studie auch TLR3 im Rahmen der Leberregeneration untersuchten. In ihren Resultaten zeigten sich signifikante Unterschiede der IL-6-Konzentration nach 4 h und 10 h zwischen WT und TLR3^{-/-}-Tieren (anzumerken ist, dass die IL-6-Konzentrationen für die WT-Mäuse vergleichbar mit denen in der vorliegenden Arbeit sind) [148]. Interessanterweise beschreiben Zorde-Khvaleyevsky *et al.* – ohne dabei die Daten zu zeigen – nach 4 h und 24 h jedoch, dass keine Unterschiede von p-STAT3 im Western Blot zwischen WT und TLR3^{-/-}-Tieren zu sehen sind. Da Zorde-Khvaleyevsky *et al.* am Ende zu dem Schluss kommen, dass TLR3 als negativer Mediator der Leberregeneration fungiert, soll im weiteren Verlauf der Diskussion die Unterschiede der Ergebnisse und der Methodik erörtert werden, um die Rolle des TLR3 differenziert bewerten zu können.

Kurz nach PHx steigen TNF- α -Konzentration im Serum sowie dessen Expression in der Leber an. Dies korreliert mit der Aktivierung von NF- κ B und ein Ausfall des TNFR1 führt gar zu einer Beeinträchtigung der Regeneration [15, 16, 42]. Campbell *et al.* zeigten in ihrer Arbeit eine erhöhte, wenn auch insgesamt geringe TNF- α -mRNA-Expression nach 0,5 h in WT-Mäusen im Vergleich zu MyD88 KO-Mäusen, die dann im weiteren Verlauf abnimmt [91]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine vergleichbar schwache Expression der TNF- α -mRNA. Bei 2 h wird die Expression von TNF- α in TLR3-Stp-Mäusen signifikant herabreguliert. Danach ist die Expression mit den WT-Mäusen vergleichbar. Eine Interpretation der Daten bezüglich TNF- α ist allerdings schwierig, da zum einen nur eine geringe Induktion stattfindet und zum anderen das Zeitfenster der Untersuchung spät gewählt ist. Auch Campbell *et al.* konnten TNF- α auf Proteinebene weder im Serum noch in Leberlysaten detektieren. Während der Initialphase wurden auch proliferationshemmende Gene wie PLK3, BTG2 oder p21^{Cip1} untersucht, um einen Hinweis auf eine frühe Störung in der G₀-G₁-Transition zu erhalten. Alle Gene sind bei 4 h höher exprimiert in TLR3-Stp-Mäusen

als im Wildtyp. Für die Expression von $p21^{Cip1}$ -mRNA zeigt sich in einer anderen Studie in einem BALB/c-Wildstamm nach 3 h eine 10-Fache Erhöhung, was in etwa dem vorliegenden Wert bei 4 h in den C57BL/6N-Mäusen entspricht [149]. Die mRNA von $p21^{Cip1}$ ist im Vergleich dazu in den TLR3-Stp-Mäusen um ca. das 44-Fache erhöht ($44,5 \pm 8,82$). Bezüglich BTG2 zeigen Guardavaccaro *et al.* in ihren Versuchen, dass in 3T3-Zellen (Maus-Fibroblasten) die Expression von BTG2 zu hypophosphoryliertem Rb und zu einem G_1 -Arrest sowie einer verminderten Expression von Cyclin D1 führt [150]. In der Leber ist eine proliferationshemmende Funktion im Rahmen der Hepatokarzinogenese beschrieben, indem BTG2 mit FoxM1, einem Transkriptionsfaktor, interagiert und dessen aktivierende Phosphorylierung durch die Hemmung des Cyclin B1-CDK1-Komplexes verhindert [151]. Außerdem wurde die Serin/Threonin-Kinase PLK3 untersucht, die ubiquitär exprimiert wird und einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt [152]. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von PLK3 nach 4 h und 8 h in TLR3-Stp-Mäusen. Die Entzündungsreaktion zu Beginn der Leberregeneration scheint durch TLR3 nicht beeinflusst. Dagegen weisen die Expressionsanalysen einer Auswahl proliferationsinhibierender Gene auf eine beeinträchtigte G_0 - G_1 -Transition hin (**Abb. 21**).

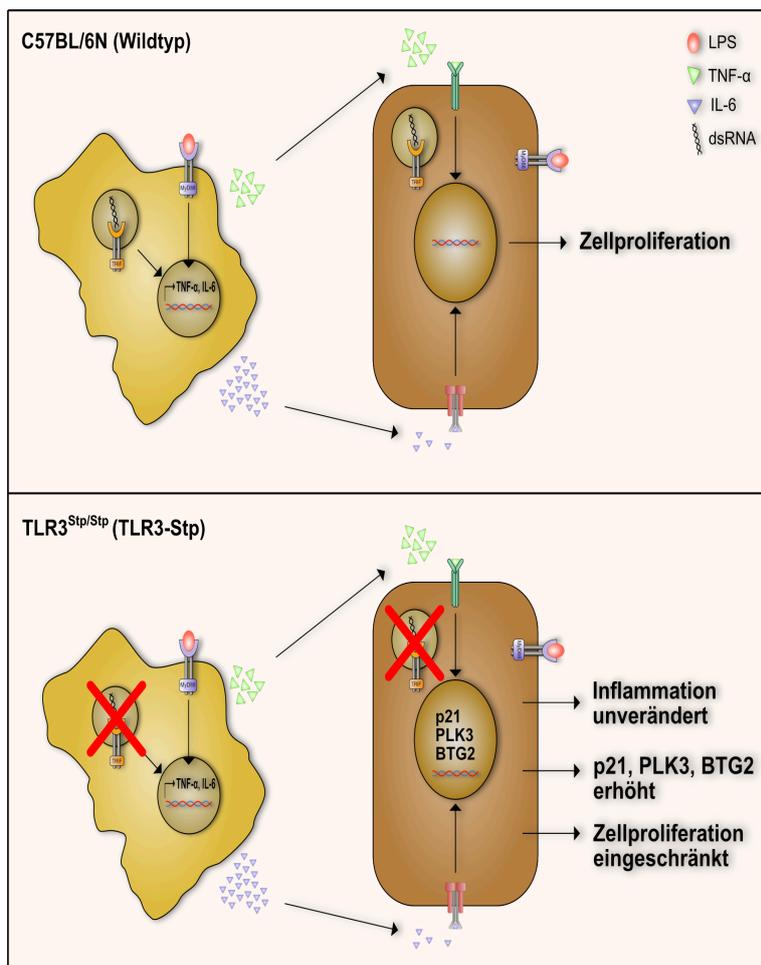


Abb. 21 Darstellung der Aktivierung von TLRs in Kupfer-Zellen und Hepatozyten

TLRs werden durch ihre Liganden (TLR3 \rightarrow dsRNA, TLR4 \rightarrow LPS etc.) aktiviert. In Kupfer-Zellen (gelb) führt dies zu einer erhöhten Sekretion von TNF- α und IL-6. Beide Mediatoren binden an Rezeptoren auf Hepatozyten (braun) und erhöhen die Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren (c-Fos, c-Jun etc.). Fehlt TLR3, ist die Inflammation mittels IL-6 und TNF- α unverändert. Dennoch sind zellzyklushemmende Gene ($p21^{Cip1}$, PLK3, BTG2) früh aktiver als im Wildtyp, was sich später auf eine reduzierte Regeneration auswirkt.

5.3 Der Einfluss von TLR3 auf die Zellzyklusprogression

Mit der G₀-G₁-Transition treten Hepatozyten und andere ortsständige Leberzellen in den Zellzyklus ein. Der Einfluss von TLR3 auf den Zellzyklus im Rahmen der Leberregeneration ist bislang nicht beschrieben und soll im Folgenden diskutiert werden.

5.3.1 G₁-Phase/G₁-S-Transition

Während des G₁-Intervalls werden wachstumsstimulierende und -hemmende Signale aus der ECM freigesetzt und wirken auf die zellzykluskontrollierenden Cycline und deren Partnerkinasen sowie CDK-Inhibitoren [153, 154]. Insbesondere die Synthese der D-Typ- und E-Typ-Cycline sowie die Bildung der CDKs zu Holoenzymkomplexen (Cyclin D1-CDK4/6, Cyclin E1/CDK2 etc.) wird durch Mitogene wie EGF oder Insulin stimuliert und reguliert die Progression durch die G₁-Phase in Hepatozyten [155]. Die Regulation der G₁-S-Transition erfolgt durch den Phosphorylierungsgrad von Rb am Ende der G₁-Phase (Restriktionspunkt). So liegt Rb während der G₀- und G₁-Phase unphosphoryliert vor und bindet Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, die für den Eintritt in die S-Phase benötigt werden. Am Ende der G₁-Phase führt die Phosphorylierung von Rb (Ser780) durch den Cyclin D1-CDK4/6-Komplex, der auch die Sequestration der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27 bewirkt, zur Freigabe der Transkriptionsfaktoren und zur Bildung des CyclinE-CDK2-Komplexes [156]. Dieser phosphoryliert Rb zusätzlich an Ser807/811 [157, 158]. Während der nachfolgenden S- und G₂-Phase liegt Rb dann hyperphosphoryliert vor [159]. In unstimulierten Lebern ist eine Phosphorylierung von Rb nur minimal nachweisbar, 24-36 h nach PHx ist sie dagegen signifikant erhöht [157]. Untersucht wurde somit zunächst die Expression von Cyclin D1, Cyclin E1 sowie p-CDK2, um die Regulation des Restriktionspunktes darzustellen. Für Cyclin D1 zeigen *in vitro*-Untersuchungen an isolierten Rattenhepatozyten, dass deren mRNA-Konzentration von extrazellulären Mitogenen abhängt und während des Restriktionspunktes akkumuliert [160]. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich bei 32 h eine 7,5-fache Erhöhung von Cyclin D1-mRNA in WT-Mäusen im Vergleich zu einer nur 1,8-fachen Erhöhung in TLR3-Stp-Mäusen. Im Western Blot zeigte sich bei 32 h ebenso eine signifikante Erhöhung in WT-Mäusen. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die adulten Hepatozyten von der G₁- in die S-Phase einzutreten. Die Daten legen nahe, dass in diesem Zeitraum der Restriktionspunkt durchschritten wird und dass eine erhöhte Cyclin D1-Expression mit einer erhöhten G₁-S-Transition einhergeht.

Zur weiteren Charakterisierung des Restriktionspunktes wurde die Cyclin E1-Expression auf mRNA- und Proteinebene sowie die aktivierende Phosphorylierung von CDK2 (Tyr160) untersucht, um Hinweise auf die Rolle des Cyclin E-CDK2-Komplexes zu erhalten.

Interessanterweise zeigt sich für die Cyclin E1-mRNA zunächst eine relativ niedrige Induktion, woraufhin eine nahezu 35-fache bzw. 20-fache Induktion nach 32 und 40 h folgt. Währenddessen steigt die Expression in TLR3-Stp-Mäusen nur um das 4,8- bzw. 8,2-Fache. Bereits Loyer *et al.* zeigen an isolierten Rattenhepatozyten, dass deren Cyclin E-mRNA nach mitogener Stimulation während der G₁-Phase in niedriger Konzentration vorliegt und während der G₁-S-Transition akkumuliert [160]. Die Proteinexpression von Cyclin E unterschied sich jedoch von den mRNA-Befunden, insofern kein Unterschied der Proteinlevel zwischen beiden Mausstämmen zu detektieren war. Auch bei Loyer *et al.* differiert die Cyclin E-mRNA-Expression vom Proteingehalt und abhängig von der mitogenen Stimulation wird kaum Induktion detektiert [160]. Die Aktivität von p-CDK2 (Tyr160) wurde im Western Blot untersucht. Hier zeigt sich eine deutliche Induktion nach 32 h und 40 h in TLR3-exprimierenden WT-Mäusen, die signifikant gegenüber TLR3-Stp-Mäusen erhöht war. Der Peak der Induktion für TLR3-Stp-Mäuse zeigte sich dagegen verzögert erst bei 48 h.

Letztlich lassen eine erhöhte Cyclin D1-Expression sowie erhöhte Phosphorylierung von CDK2 bei 32 h bzw. 40 h eine stärkere Phosphorylierung von Rb vermuten. Dies wäre ein weiterer Hinweis für eine erniedrigte und verzögerte G₁-S-Transition in TLR3-Stp-Mäusen. Untersucht wurde das Phosphorylierungsniveau von Rb (Ser807/811). Die Phosphorylierung erfolgt durch den Cyclin E-CDK2-Komplex. Es zeigte sich in der Tat ein signifikant erhöhtes Phosphorylierungsniveau für Rb in TLR3-exprimierenden WT-Mäusen nach 32 h, 40 h und 48 h im Vergleich zu den TLR3-Stp-Mäusen.

Zusammengenommen weisen die Ergebnisse auf eine effizientere G₁-S-Transition in WT-Mäusen als TLR3-Stp-Mäusen hin, die zudem früher stattfindet.

5.3.2 S-Phase

Da der Verlust von TLR3 zu einer geringeren G₁-S-Transition der Leberzellen nach PHx führt, wurde untersucht, ob sich dadurch auch weniger Hepatozyten in der S-Phase befinden. Die Kinetik der BrdU-Inkorporation der C57/BL6-Kontrolltiere entspricht der Kinetik von Mitchell *et al.* [12]. Außerdem belegen Untersuchungen in BALB/c-Mäusen, dass die DNA-Synthese nach PHx bei 36 h am höchsten ist [161, 162]. Dies passt ebenso zu den BrdU-Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit mit dem höchsten Anteil BrdU-positiver Hepatozyten in der S-Phase bei 40 h. In TLR3-Stp-Mäusen lagen zu diesem Zeitpunkt signifikant weniger BrdU-positive Hepatozyten vor, was für eine geringere Anzahl an Zellen in der S-Phase spricht. Die höchste Rate zeigte sich dann erst nach 48 h, die Höchststrate von $42,2 \pm 4,6$ % BrdU-positiven Hepatozyten in WT-Mäusen wurde aber zu keinem Zeitpunkt erreicht. Auch Zorde-Khvaleyevsky *et al.* untersuchten in ihrer Studie die Proliferation der Hepatozyten mittels

BrdU-Injektion. Der Höhepunkt der BrdU-positiven Hepatozyten in den Wildtypmäusen wird hier bei 72 h beschrieben. Nach 24 h, 36 h und 48 h zeigten sich jeweils signifikante Erhöhungen in den TLR3-defizienten Tieren. Jedoch wiesen 96 h und 120 h nach PHx die TLR3-exprimierenden Mäuse eine höhere Anzahl an BrdU-positiven Hepatozyten auf. Wie die Autoren selbst schließen, lässt sich dadurch allenfalls eine verstärkte Regeneration bis 72 h in TLR3-defizienten Mäusen festhalten. Unabhängig davon unterscheidet sich die von Zorde-Khvaleyevsky *et al.* gezeigte Kinetik sowohl von der Literatur als auch von den hier vorgestellten Ergebnissen. Auf mögliche Gründe hierfür wird später in der Diskussion eingegangen.

5.3.3 G₂-Phase und M-Phase

In der G₂-Phase des Zellzyklus wird die Zellteilung vorbereitet. Dabei ist die Expression von Cyclin A2 und B1 nötig, um die Hyperphosphorylierung von Rb-Protein während der S-, G₂- sowie M-Phase aufrechtzuerhalten [158]. Es zeigte sich im Vergleich zu TLR3-Stp-Mäusen, dass die mRNA-Expression beider Cycline in WT-Mäusen signifikant erhöht war. Zudem stellte sich die Proteinexpression von CDK1 signifikant höher bei 32 h und 40 h nach PHx im WT- vs. TLR3-Stp-Mausstamm dar.

Die Zellzyklusanalysen in WT- sowie TLR3-defizienten Mäusen während der Leberregeneration zeigen, dass TLR3 positiv auf den Zellzyklus und somit auf die Zellproliferation wirkt. Eine solche Funktion wurde für TLR3 bislang nicht beschrieben und liefert die Basis für eine mögliche Neubewertung von TLR3 im Rahmen proliferativer Prozesse.

5.4 Der Einfluss von TLR3 auf die Zellzyklusinhibition

Im Folgenden sollen anhand von Expressionsanalysen diverser Gene und Proteine proliferationsfördernder- und hemmender Signalwege die regenerativen Prozesse in Verbindung mit TLR3 besser nachvollzogen und kritisch diskutiert werden.

5.4.1 Zellzyklusinhibitoren

Zellzyklusinhibitoren der INK4-Familie (p15, p16, p18 und p19) hemmen spezifisch CDK4 und CDK6, während Mitglieder der Cip/Kip-Familie (p21, p27 und p57) unspezifisch CDKs inhibieren. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Expression von p15^{INK4b} als auch p21^{Cip1} via q-RT-PCR untersucht. Im TLR3-Stp-Mausstamm war p15^{INK4b} nach 24 h und 40 h im Vergleich zum Wildtyp höher exprimiert, die Expression fiel nach 48 h ab. Bei 72 h kam es wieder zu einem Anstieg. Das Expressionsmuster von p15^{INK4b} spricht für eine stärkere

Hemmung der G₁-Phase in den TLR3-Stp-Mäusen als im Wildtyp. Für die späteren Zeitpunkte zeigte die Verlaufsbeobachtung der Expression von p21^{Cip1} in WT-Mäusen einen Abfall mit niedrigster Expression nach 32 h und 40 h, was mit dem Beginn und Hochpunkt der S-Phase zusammenfällt, wie es auch von Albrecht *et al.* beschrieben wird [149]. In TLR3-Stp-Mäusen zeigte sich nach 32 h hingegen eine signifikant erhöhte Expression gegenüber dem Wildtyp, was zur Hemmung der G₁-S-Transition in Hepatozyten beitragen könnte (**Abb. 22**).

5.4.2 Termination

Ein früheres Ende der Regenerationsprozesse kann als Erklärungsansatz für das verminderte L/K-Verhältnis in den TLR3-Stp-Mäusen dienen. TGF- β inhibiert die DNA-Synthese in Hepatozyten *in vitro* und *in vivo* und wird mit der Termination der Leberregeneration in Verbindung gebracht [64, 70, 163-165]. Oe *et al.* zeigen, dass in R2LivKO-Mäusen, einem leberspezifischen Knock-out des T β RII, die DNA-Synthese früher stattfindet und deutlicher ausgeprägt ist als in den Kontrollen [166]. Die vorliegenden Expressionsanalysen der TGF- β -Isoformen 1 und 2 ließen jedoch keine eindeutige Induktion erkennen. Zwar zeigte sich für die TGF- β -Isoformen 1 und 2 eine erhöhte mRNA-Expression bei 32 h nach PHx, jedoch ist diese ähnlich gering ausgeprägt wie bei TNF- α . Somit ist eine zuverlässige Interpretation kritisch zu bewerten. Weiterhin zeigen die R2LivKO-Mäuse bei 120 h eine mit den Kontrollen vergleichbare Proliferation, sodass TGF- β als alleiniger Terminator der Leberregeneration eher unwahrscheinlich erscheint [166]. Dagegen findet sich eine erhöhte Aktivität von Activin A, womit sich die Autoren die Termination der Regeneration erklären. Nach Supprimierung von Activin A durch den Inhibitor Follistatin zeigt sich eine erhöhte Proliferation auch bei 120 h nach PHx. In der vorliegenden Arbeit war der Smad-Signalweg, über den die Liganden der TGF- β -Superfamilie wie TGF- β und auch Activin A signalisieren, in den TLR3-Stp-Mäusen bei 24 h bereits stärker induziert als in WT-Mäusen, also zum Ende der G₁-Phase. Dies lässt sich anhand der Western Blot-Daten zur aktivierenden Phosphorylierung von Smad2 belegen. Bei 24 h zeigte sich zudem die Activin A-mRNA in TLR3-Stp-Mäusen deutlich höher exprimiert und könnte die Smad-Aktivierung erklären und somit zu einer Blockade zum Ende der G₁-Phase beitragen. Eine frühere Termination bzw. negative Beeinflussung der Regenerationsprozesse durch eine erhöhte Activin A- oder TGF- β -Aktivität könnte zur eingeschränkten Regenerationskapazität beitragen (**Abb. 22**).

5.4.3 Apoptose

Neben einer gehemmten Proliferation durch Zellzyklusinhibitoren oder proliferationshemmende Zytokine kann auch eine erhöhte Rate an apoptotischen Zellen das

L/K-Verhältnis in TLR3-Stp-Mäusen negativ beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurde *cleaved Caspase 3*, also die aktivierte Effektor-Caspase, die für die zelluläre Apoptose essentiell ist, im Western Blot untersucht. Eine erhöhte Expression bei 24 h in den TLR3-Stp-Mäusen war auffällig. Sollten hier vermehrt parenchymatöse und nicht-parenchymatöse Zellen apoptotisch sein, so können auch weniger Zellen in die S-Phase bzw. M-Phase eintreten. Zusätzlich wird dieses Ergebnis durch die verminderte Expression von Survivin/BIRC5 in TLR3-Stp-Versuchstieren zu späteren Zeitpunkten gestützt. Erste Experimente weisen somit auf einen Zusammenhang zwischen TLR3 und Apoptose im Rahmen der Leberregeneration hin. Es bedarf hier jedoch noch einer weiteren Evaluation der Befunde.

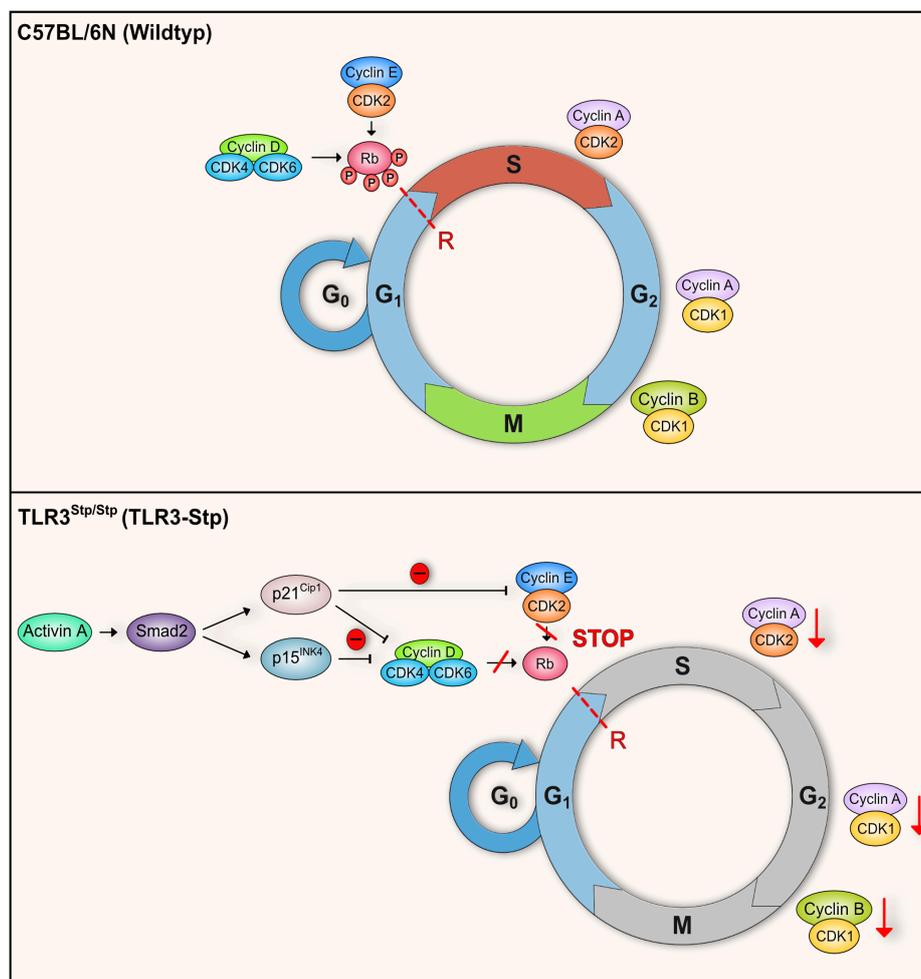


Abb. 22 Schematische Darstellung des Zellzyklus im Wildtyp vs. TLR3-Stp-Mausstamm

Der reguläre Ablauf des Zellzyklus im Wildtyp (obere Abbildung) ist dargestellt. Rb wird hyperphosphoryliert und der Zellzyklus läuft regelrecht ab. Wird TLR3 nicht exprimiert (untere Abbildung), so zeigte sich eine höhere Expression von Activin A sowie eine höhere Expression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p15^{INK4b}. In der Folge fällt die Hyperphosphorylierung von Rb schwächer aus, es kommt zu einer geringeren G₁-S-Transition. Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen werden geringer exprimiert. In TLR3-Stp-Mäusen kann somit darauf geschlossen werden, dass weniger Leberzellen den Zellzyklus effizient durchlaufen und eine geringere Proliferation stattfindet.

5.5 Der Einfluss von TLR3 auf die Produktion und Aktivität von HGF

5.5.1 *Hepatocyte Growth Factor* – Aktivierung durch das Urokinase-System

Der Wachstumsfaktor HGF und die Liganden der EGF-Superfamilie, zu denen EGF, Amphiregulin, TGF- α , HB-EGF zählen, spielen eine zentrale Rolle im Ablauf der regenerativen Prozesse. HGF wird sowohl in der Leber als auch extrahepatisch exprimiert und wirkt unmittelbar nach PHx endokrin proliferationsfördernd auf die Leber. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die HGF-Konzentration im Serum sowie die Expression der mRNA in der Leber bestimmt. Die Expressionsanalysen wiesen einen nahezu biphasischen Verlauf mit einer erhöhten Expression in WT-Mäusen im Vergleich zu TLR3-Stp-Mäusen nach 8 h (also in der frühen Phase der Regeneration) und nach 48 h (der späteren Phase der Regeneration) auf. Noch deutlicher wird der Unterschied mit Blick auf die ELISA-Daten, die die Konzentration von HGF im Blut zeigen. Die Konzentration nimmt bei 24 h in TLR3-Stp-Mäusen ab und ist bei den Zeitpunkten 32-40 h kaum detektierbar. Dies entspricht den Zeitpunkten der G₁-S-Transition sowie der S-Phase der meisten Hepatozyten und anderen Leberzellen (z. B. Ito-Zellen). Zorde-Khvaleyevsky *et al.* untersuchten die HGF-Konzentration für die frühen Zeitpunkte bis 24 h als Erklärungsansatz für die vergleichbaren p-STAT3-Level in TLR3^{-/-}-Mäusen und Wildtypen. Der Verlauf der Kurve ist vergleichbar mit den hier vorliegenden Ergebnissen, wobei zum 24 h-Zeitpunkt eine höhere Konzentration für den Wildtyp in dieser Arbeit vorliegt. Nachfolgend zeigen sich für spätere Zeitpunkte hohe Level in den WT-Mäusen. Hierzu zeigen Zhorde-Khvaleyevsky *et al.* keine Daten.

Der Anstieg von aktivem HGF im Plasma ist vermutlich durch das *Remodeling* der extra- und perizellulären Matrix bedingt, die zu einer Freisetzung von präformierten Wachstumsfaktoren wie z. B. HGF führt. In der Leber selbst sinkt in der Folge vermutlich dadurch die Konzentration an aktivem HGF [167, 168]. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der höheren Konzentration von HGF im Blut und TLR3 in Wildtypmäusen kann im *Remodeling* der Leber während der Leberregeneration liegen. Wie unter 1.4.2 erläutert, existieren Daten, die TLR3 als möglichen Aktivator des Urokinase-Systems beschreiben [105]. Die Bindung von Urokinase an den Urokinase-Rezeptor führt zur Produktion von aktivem Plasmin und zur Aktivierung von MMPs. Zusätzlich führt die Aktivierung von TLR3 selbst bereits zu einer erhöhten Expression von MMPs wie MMP-9 oder MMP-13 [106]. Das Urokinase-System und die MMPs bewirken den Umbau der extrazellulären Matrix und ermöglichen damit die Freisetzung von Wachstumsfaktoren [169]. Es bestätigte sich eine erhöhte Expression von MMP-13 in WT-Mäusen im Vergleich zu TLR3-Stp-Mäusen. Für MMP-9 konnte kein Unterschied detektiert werden. Für PLAU, das für die Urokinase codiert, zeigten sich

signifikant erhöhte Werte nach 24 h, 32 h und 40 h in WT-Mäusen vs. TLR3-Stp-Mäusen. Auch das Gen PLAUR (Urokinase-Rezeptor) war in WT-Mäusen nach 32 h signifikant hochreguliert. Es liegen damit erste Hinweise vor, dass es durch den Verlust von TLR3 zu einer verminderten Aktivierung des PLAU/PLAUR-Systems und MMP-13 kommt (**Abb. 23**). In der Folge ist der Umbau der hepatischen ECM kompromittiert und es wird weniger HGF freigesetzt. Dieser Mechanismus kann möglicherweise zur reduzierten Regenerationsfähigkeit der TLR3-Stp-Mäusen beitragen.

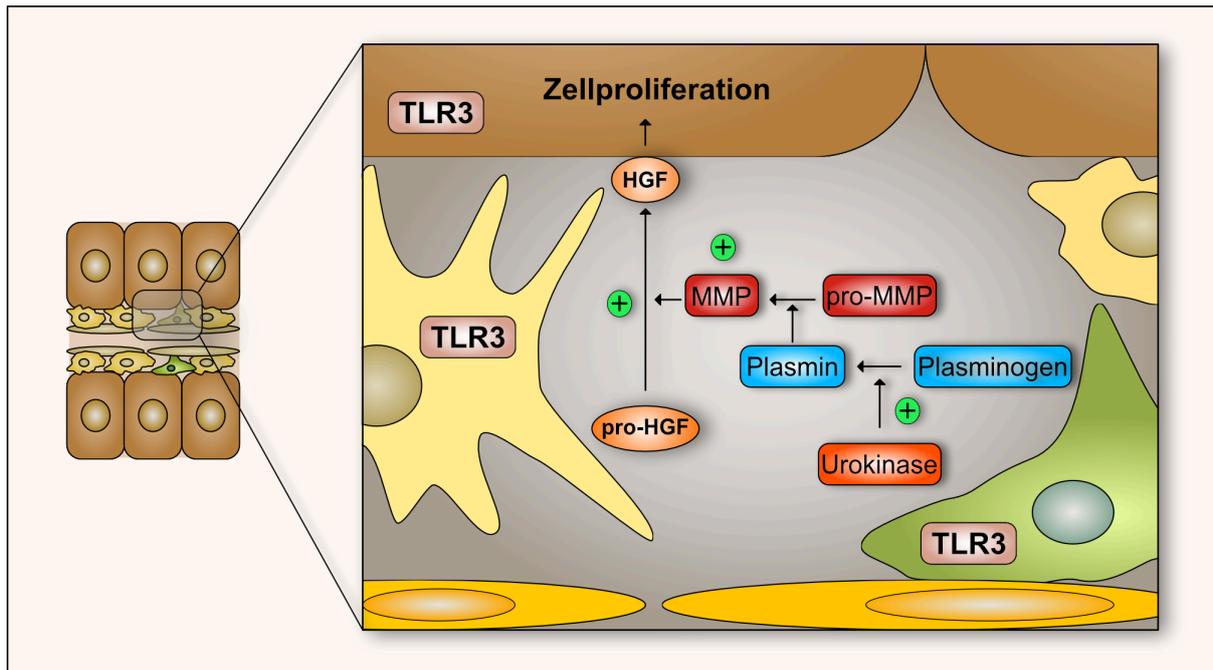


Abb. 23 Darstellung der extrazellulären Matrix und des Urokinase-Systems

TLR3 wird in Hepatozyten (braun), Kupfer-Zellen (hellgelb) sowie Ito-Zellen (grün) exprimiert. Alle aufgezählten Zelltypen kommen somit für eine TLR3-vermittelte Aktivierung des Urokinase-Systems und in der Folge für die Aktivierung von HGF in der Leber in Frage.

5.5.2 Proliferationsfördernde Signalwege – TLR3, HGF und PI3K/Akt/mTOR

Im letzten Schritt der Experimente wurde die Auswirkung der höheren HGF-Serumspiegel im Wildstamm auf die Leber analysiert. Der Wachstumsfaktor HGF bindet an den Rezeptor c-Met, woraufhin die Aktivierung proliferativer Signalwege folgt [52, 170]. Unter anderem wird durch HGF der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg aktiviert [171]. In einem Hepatozyten-spezifischen *Knock out* für c-Met wird Akt nach PHx nur verzögert und ERK1/2 überhaupt nicht aktiviert [52]. Interessanterweise zeigen Joung *et al.* zudem, dass TLR3 über TRIF/TBK1 Akt direkt aktivieren kann [143]. Die aktivierenden Phosphorylierungsstellen von Akt (Ser473/Thr308) wiesen im Western Blot lediglich bei 72 h für Serin 473 einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und TLR3-Stp-Mäusen auf. Die aktive Effektor kinase p-p70S6K1 zeigte eine

signifikant höhere Expression sowohl bei 32 h als auch bei 72 h. Eine höhere Aktivität von p-p70S6K1 zum Zeitpunkt von 32 h bedeutet, dass der Signalweg während der Proliferationsphase aktiver ist. Ob die Aktivierung durch c-Met-Akt erfolgt oder aber mTOR-p70S6K1 durch andere Stimuli reguliert wird, bedarf weiterer Untersuchungen. Im Zusammenhang mit den oben diskutierten Ergebnissen zu HGF und der Umstrukturierung der ECM erscheint eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs durch HGF dennoch möglich. Somit zeigt sich unmittelbar der positive Einfluss von TLR3 auf die Leberregeneration.

6 Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Literatur

Anhand der vorliegenden Resultate lässt sich für den TLR3 ein positiver Einfluss auf die Leberregeneration formulieren. Wie bereits zuvor beschrieben, kommen die Autoren um Zorde-Khvaleyevsky *et al.* dagegen zu dem Schluss, dass TLR3 als negativer Mediator der Leberregeneration agiert. Unter 5.3.2 wurden die Untersuchungen zur S-Phase der hier vorliegenden Studie mit den Ergebnissen von Zorde-Khvaleyevsky *et al.* verglichen. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich der Höhepunkt der DNA-Synthese bei ca. 36-40 h befindet, was sich auch in den hier präsentierten Daten widerspiegelt [12, 15, 42, 172]. Zorde-Khvaleyevsky *et al.* zeigen jedoch den Höhepunkt der DNA-Synthese mittels CDC47- und BrdU-IHC bei 72 h mit einer bis dahin erhöhten Proliferation in TLR3^{-/-}-Mäusen. Für die Zeitpunkte 96 h und 120 h zeigt sich dann ein signifikanter Proliferationsvorteil für die TLR3-exprimierenden Wildtypmäuse. Welche Auswirkungen die IHC-Daten letztlich auf den L/K-Quotienten haben, präsentieren die Autoren nicht. Zorde-Khvaleyevsky *et al.* stützen sich in ihrer Argumentation des Weiteren auf die Arbeit von Sun *et al.*, die nach intraperitonealer Injektion des TLR3-Liganden poly(I:C) durch Stimulation von IFN- γ -produzierenden NK-Zellen eine Beeinträchtigung der Leberregeneration sehen [148, 173]. IFN- γ hemmt die Zellproliferation und fördert die Apoptose. Die Injektion von poly(I:C) verzögert den Höhepunkt der DNA-Synthese auf 70 h nach PHx, anschließend folgt für spätere Zeitpunkte kompensatorisch eine signifikant höhere DNA-Synthese. Neben der Injektion von poly(I:C) werden die Mäuse mit murinem Cytomegalovirus (MCMV) nach PHx infiziert, was ebenso zu einer Verzögerung und Reduktion der DNA-Synthese führt. Weder die NK-Zell-depletierten Mäuse noch die IFN γ ^{-/-}-Mäuse weisen eine erhöhte Regenerationskapazität auf. Anzumerken ist, dass die Autoren einen dosisabhängigen anti-proliferativen Effekt von poly(I:C) – unabhängig vom genetischen Hintergrund der Mäuse, d. h. auch im Wildtyp – beschreiben. Die Injektion von poly(I:C) zur zusätzlichen Stimulation von TLR3 als Experimentalansatz stellt einen wesentlichen Unterschied dar, wenn man die Studie von Sun *et al.* mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit sowie der Studie von Zorde-Khvaleyevsky *et al.* vergleicht. Die Aktivierung von TLR3 ist im Gegensatz zur zusätzlichen poly(I:C)-Stimulation allein durch die partielle Hepatektomie bedingt. Dies ist jedoch für die Aktivierung unterschiedlicher Funktionen der Zellen während der Regeneration entscheidend, wie die Arbeit von Graubardt *et al.* verdeutlicht [174].

Graubardt *et al.* zeigen, dass Rag2^{-/-} γ c^{-/-}-Mäuse, die defizient für T-, B- und NK-Zellen sind, im Vergleich zu Rag1^{-/-}-Mäusen (defizient für T- und B-Zellen) und WT-Mäusen eine verminderte Regenerationskapazität aufweisen. NK-Zellen werden für die Gewebereparatur und -regeneration benötigt, jedoch entscheidet die Art des Stimulus über die vielfältigen zellulären

Funktionen. Werden NK-Zellen mittels poly(I:C) stimuliert, so erhöht sich die IFN γ -Produktion. Diese Zellantwort entspricht am ehesten der Reaktion auf eine Virusinfektion (und -detektion). IFN γ fördert dann die Apoptose und hemmt die Zellteilung, um die Ausbreitung des viralen Erregers zu verhindern. Die IFN γ -abhängige Inhibition der Zellproliferation führt im Rahmen der Leberegeneration folglich zu einem verminderten Regenerationspotenzial.

Werden die NK-Zellen dagegen rein PHx-abhängig aktiviert, kommt es zu einer Erhöhung der Zelltoxizität sowie der *Natural-killer receptor group 2, member D* (NKG2D)-abhängigen Lyse von Kupfer-Zellen. Diese Regulation fördert letztlich die Leberregeneration. Die Autoren kommen somit zu dem Schluss, dass durch die partielle Hepatektomie aktivierte NK-Zellen die Regeneration fördern, da im Gegensatz zur Stimulation mit poly(I:C) pro-proliferative Zellfunktionen aktiviert werden. Der Ligand poly(I:C) simuliert vielmehr einen infektiösen Stimulus (z. B. Virus) und führt zur Induktion anti-proliferativer Zellantworten. Somit besteht die Wahrscheinlichkeit, dass durch die Applikation von poly(I:C) TLR3 so stimuliert wird, dass die Aktivierung anti-proliferativer Signalwege überwiegt.

Des Weiteren soll diskutiert werden, inwiefern die unterschiedlichen Studienergebnisse durch Unterschiede in den Experimentalansätzen bedingt sein können. Im Forschungsfeld der Leberregeneration ist es kein Einzelfall, dass zu zentralen Signalwegen und einzelnen Proteinen beziehungsweise Mediatoren eine heterogene Datenlage existiert. Wie unter **1.3.1** beschrieben, variieren beispielsweise die Ergebnisse zu IL-6. Gleiches gilt für NF κ B. So zeigen Iiumuro *et al.* eine eingeschränkte Regenerationskapazität und erhöhte Apoptoserate in Ratten, wenn NF κ B inhibiert wird [175]. Yang *et al.* dagegen kommen zu dem Ergebnis, dass in Mäusen die Apoptoserate nicht erhöht ist [176]. Ringelhan *et al.* schließen für den kanonischen NF κ B-Signalweg einen Einfluss auf die Leberregeneration in Mäusen aus [177]. Hinsichtlich der Ergebnisheterogenität werden Unterschiede in der Anwendung der Operationsprotokolle, unterschiedliche genetische Hintergründe der Versuchstiere sowie variierende Zuchtbedingungen diskutiert. Insbesondere der Einfluss der Operationsmethode zeigt sich unmittelbar in der Arbeit von Ringelhan *et al.* Die Autoren führen die Ligation für den linken sowie rechten medianen Lappen separat durch und die Gallenblase wird *in situ* belassen. Erfolgt zusätzlich eine simultane Cholezystektomie, lässt sich eine eingeschränkte Regeneration der Leber im konditionalen *RelA^{Fl/Fl}MxCre-Knock out* (*Knock out* der NF κ B-Untereinheit RelA/p65 in NPCs) nachweisen. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit wird hier Folgendes deutlich: Das Protokoll von Mitchell *et al.*, wie es in dieser Arbeit angewendet wurde, sieht sowohl eine gemeinsame Ligation des linken und rechten Lobus medianus sowie die Resektion der Gallenblase standardmäßig vor.

Ein weiteres Beispiel ergibt sich aus den Untersuchungen zu HGF/c-Met. Die Anwendung der Higgins & Anderson-Operationsmethode führt zu einer erhöhten Letalität in MetLivKo-Mäusen, wohingegen bei intakter Gallenblase keine Unterschiede in der postoperativen Mortalität zwischen WT- und konditionalen MetLivKO-Mäusen bestehen [142, 178]. Ein erneuter Blick auf die Studie von Zorde-Khvaleyevsky *et al.* zeigt, dass die Leber nach dem Protokoll nach Higgins & Anderson reseziert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde nach dem Protokoll von Mitchell *et al.* operiert. Dass die Unterschiede in der DNA-Synthese durch die unterschiedlichen Operationsmethoden bedingt sind, kann nicht ausgeschlossen werden.

Neben methodischer Unterschiede hinsichtlich des Regenerationsmodells ist auch die Auswahl des Anästhetikums relevant. Damit die Entzündungsreaktion in der Leber möglichst natürlich abläuft, sollte bei der Auswahl der Anästhetika die Hepatotoxizität berücksichtigt werden. Avertin oder Tribromethanol sind in der Veterinärmedizin für intraperitoneale Injektionsnarkosen bei Nagetieren bekannt [179]. Früher wurde es während der PHx zur Narkose eingesetzt. Avertin ist jedoch hoch hepatotoxisch, wie Mitchell *et al.* in ihrem PHx-Protokoll anhand von ALT-Daten zeigen [12]. Auch zeigt sich eine erhöhte postoperative Morbidität und Mortalität [180]. Als injizierbares Anästhetikum steht die Kombination aus Ketamin und Xylazin zur Verfügung, die Zorde-Khvaleyevsky *et al.* für ihre Studie nutzten. Ketamin/Xylazin erscheint hinsichtlich Morbidität und Mortalität weniger problematisch als Avertin, zeigt im ALT-Essay von Mitchell *et al.* jedoch eine vergleichbare Hepatotoxizität und geht mit längeren Aufwachzeiten einher. Sun *et al.* verwenden in ihrer Studie Natriumpentobarbital, ein Derivat der Barbitursäure, als Narkotikum, das ebenso eine bekannte hepatotoxische Wirkung hat [181]. Die Auswahl der Anästhetika in beiden Studien lassen bereits vor Beginn der Regeneration einen höheren Entzündungsgrad mit Einfluss auf den TLR3 vermuten. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen Isofluran verwendet. Isofluran ist ein inhalatives Anästhetikum, das als relativ sicher in der Anwendung gilt und mit einer kurzen Aufwachzeit einhergeht. In der Veterinärmedizin wird es bevorzugt eingesetzt. Aufgrund der geringen Hepatotoxizität ist es speziell für die Anwendung im Rahmen der PHx gut geeignet.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die neue Evidenz für eine positive Beeinflussung der Leberregeneration durch TLR3 liefern, muss dies unter Berücksichtigung der methodischen Unterschiede zu bisherigen TLR3-Studien (z. B. in der Durchführung der PHx, Auswahl der Anästhetika etc.) geschehen.

7 Ausblick

Basierend auf den Ergebnissen von Sun *et al.* und Zorde-Khvailevsky *et al.* ging man bislang von einem negativen Einfluss des TLR3 auf die Regeneration der Leber aus. Die nun präsentierten Ergebnisse machen eine Neubewertung der Rolle des TLR3 möglich. Es konnte nachgewiesen werden, dass TLR3 einen positiven Einfluss auf die proliferativen Prozesse während der Regeneration hat. Zuvor dargelegte methodische Unterschiede der Studien können zur Diskrepanz der Ergebnisse beigetragen haben. Unabhängig von den methodischen Differenzen steht jedoch die detaillierte Beschreibung des Einflusses von TLR3 auf die unterschiedlichen Phasen der Leberregeneration sowie auf den Zellzyklus für sich und ist in dieser Form aktuell so noch nicht beschrieben. Zudem wurden diverse Erklärungsansätze vorgestellt, wie TLR3 die Proliferation im Allgemeinen moduliert (z. B. durch die Aktivierung des Urokinase-Systems). Eine weitere Erkenntnis aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist, dass die Re-Expression von TLR3 in Kupffer-Zellen (TLR3-Mye-Mäuse) nicht zu einer Wiederherstellung der Wildtyp-Regenerationskapazität führt. Hierzu ist eine weitere, dezidierte Aufarbeitung der zellspezifischen TLR3-Funktionen in der Leberregeneration nötig. Das in dieser Studie verwendete *in vivo*-Modell könnte zukünftig genutzt werden, um TLR3 in weiteren Zelltypen wie Hepatozyten, Endothelzellen oder Ito-Zellen, die alle eine wichtige Rolle für die regenerativen Prozesse spielen, spezifisch zu untersuchen. Daneben bieten *in vitro*-Versuche die Möglichkeit, mit isolierten Zellen aus der Leber die zelltypabhängigen Mechanismen der TLR3-Aktivierung zu entschlüsseln. Unklar bleibt, welcher Herkunft die dsRNA im Rahmen der Leberregeneration ist, die TLR3 aktiviert. Mögliche Quellen könnten TLR3-enhaltende Exosomen sein. Nicht abschließend geklärt ist außerdem, unter welchen Bedingungen TLR3-abhängige proliferationsfördernde und -hemmende Signale in ihrer Aktivität überwiegen (mögliche Einflüsse: virale vs. körpereigene Aktivierung, Aktivierung abhängig von der extrazellulären Umgebung etc.). Zur Absicherung der neuen Ergebnisse und einer möglichen Etablierung dieser Erkenntnisse in klinischen Therapien sind Experimente mit alternativen Regenerationsmodellen sowie mechanistische *in vitro*-Untersuchungen notwendig. Grundsätzlich können weitere Untersuchungen regenerativer und proliferativer Prozesse der Leber auch zu einem besseren Verständnis der Hepatokarzinogenese führen. Sollten sich die Resultate hinsichtlich TLR3 auch in zukünftigen Modellen bestätigen, können therapeutische Maßnahmen im Bereich der Leberteileresektionen bei Raumforderungen oder bei bestimmten Formen der Lebertransplantationen (z. B. *split-liver*-Transplantationen) angewendet werden.

8 Zusammenfassung

Die Leberregeneration ist Ausdruck einer komplexen Abfolge von Prozessen, die nach akutem Gewebeerlust zur Wiederherstellung der ursprünglichen Lebermasse sowie metabolischen Funktionen führt. Im Sinne des *Hepostat* wird die kompensatorische Hyperplasie und Hypertrophie der verbleibenden Leberlappen nach 2/3-PHx durch proliferationsfördernde und -hemmende Faktoren moduliert und die Hepatozyten durchlaufen mehrere Replikationsrunden, sodass nach Erreichen einer ausreichenden Lebermasse der Regenerationsprozess beendet wird. Die Initiation der regenerativen Mechanismen ist bedingt durch ein Zusammenspiel aus veränderter Hämodynamik und Inflammation in der Leber. Welche Rezeptoren und Signalwege dabei aktiviert werden, ist Gegenstand aktueller Forschung.

TLR3 als Mustererkennungsrezeptor ist Teil des innate Immunsystems und detektiert sowohl exogene virale dsRNA als auch endogene, körpereigene dsRNA. Bekannt ist die Rolle des TLR3 in der Abwehr viraler Pathogene. Neben der Produktion anti-viraler, proliferationshemmender Interferone vom Typ I kann die Aktivierung von TLR3 aber auch zur Bildung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 oder zur Apoptose der Zelle führen. Ebenso können proliferationsfördernde Signalwege aktiviert werden. All dies deutet auf ein weitaus breiteres, zelltypabhängiges Funktionsspektrum des TLR3 hin als die bloße Abwehr viraler Infektionen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TLR3 die regenerativen Prozesse in der Leber nach PHx positiv beeinflusst. TLR3-Stp-Mäuse, die TLR3 nicht exprimieren, wiesen zum Abschluss der Regeneration nach 336 h im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ein signifikant geringeres Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht auf. Die Re-Expression von TLR3 in LysozymM-exprimierenden Zellen (Monozyten, reifen Makrophagen und Granulozyten) führte nicht zu einer Wiederherstellung der hepatischen Regenerationskapazität, sondern war vielmehr mit der Regeneration der TLR3-Stp-Mäuse vergleichbar.

Anschließend wurde der allgemeine Einfluss von TLR3 auf die unterschiedlichen Phasen der Leberregeneration mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden erfasst. Während der Initiationsphase zeigte sich für die Aktivierung des IL-6-Signalwegs und die TNF- α -Expression keine Unterschiede. Anti-proliferative Gene wie p21^{Cip1}, BTG2 oder PLK3 waren simultan zu Beginn der Regeneration in TLR3-Stp-Mäusen höher reguliert als in den Kontrollen. Während der Progressionsphase wiesen TLR3-Stp-Mäuse geringere Level an p-CDK2 und p-Rb auf, was für eine verzögerte G₁-S-Transition spricht. Dies spiegelte sich in der

Zusammenfassung

immunhistochemischen Auswertung der BrdU-Daten wider: Es zeigten sich signifikant weniger BrdU-positive Hepatozyten in TLR3-Stp-Mäusen. CDK1, ein wichtiger Regulator der G₂-M-Transition, war geringer in TLR3-Stp-Mäusen exprimiert.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Zellzyklusinhibitoren p15^{INK4} und p21^{Cip1} während der Progressionsphase in TLR3-Stp-Mäusen erhöht exprimiert wurden. Weiterhin war der antiproliferative Signalweg TGF- β /Activin A/Smad-2 in TLR3-Stp-Mäusen stärker aktiviert. Eine höhere Aktivität dieses proliferationshemmenden Signalwegs könnte zu einer früheren Termination der Regeneration beitragen.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass in WT-Mäusen die Gene für MMP-13, PLAU und PLAUR höher als in TLR3-Stp-Mäusen reguliert waren. Die Daten weisen darauf hin, dass über TLR3 die Aktivierung des Urokinase-Systems (PLAU/PLAUR) und das *Remodeling* der ECM erfolgt und somit die Freisetzung und Aktivierung des Mitogens HGF positiv beeinflusst wird. Weitergehende Untersuchungen konnten bestätigen, dass HGF in höherer Konzentration in WT-Mäusen als in TLR3-Stp-Mäusen vorlag und die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in WT-Mäusen dementsprechend deutlicher ausgeprägt war. Insgesamt legen die Daten nahe, dass die TLR3-vermittelte Aktivierung von HGF entscheidend zur effektiven Regeneration beiträgt.

9 Literaturverzeichnis

1. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 286-300.
2. Michalopoulos, G.K., *HepatoStat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance*. Hepatology, 2016. **65**(4): p.1384-1392.
3. Farber, E., *Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene*. Cancer Res, 1956. **16**(2): p. 142-148.
4. Lazaro, C.A., et al., *Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture*. Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5514-5522.
5. Roskams, T.A., et al., *Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1739-1745.
6. Dunsford, H.A., et al., *Different lineages of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats defined by monoclonal antibodies*. Cancer Res, 1989. **49**(17): p. 4894-4900.
7. Mitchell, C., et al., *Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor Links Hepatocyte Priming with Cell Cycle Progression during Liver Regeneration*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2562-2568.
8. Moser, M.J., et al., *Immediate-early protooncogene expression and liver function following various extents of partial hepatectomy in the rat*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(4): p. 907-914.
9. Higgins, G.M., Anderson, R.M., *Experimental pathology of the liver - Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal*. Arch. Pathol. 1931. **12**: p. 186-202.
10. Greene, A.K. and M. Puder, *Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management*. J Invest Surg, 2003. **16**(2): p. 99-102.
11. Boyce, S. and D. Harrison, *A detailed methodology of partial hepatectomy in the mouse*. Lab Anim (NY), 2008. **37**(11): p. 529-532.
12. Mitchell, C. and H. Willenbring, *A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice*. Nat Protoc, 2008. **3**(7): p. 1167-1170.
13. Hori, T., et al., *Simple and reproducible hepatectomy in the mouse using the clip technique*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(22): p. 2767-2774.
14. Nevzorova, Y.A., et al., *Partial hepatectomy in mice*. Lab Anim, 2015. **49**(1 Suppl): p. 81-88.
15. Fausto, N., J.S. Campbell, and K.J. Riehle, *Liver regeneration*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S45-53.

16. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 836-847.
17. Wu, J. and P.A. Norton, *Animal models of liver fibrosis*. Scand J Gastroenterol, 1996. **31**(12): p. 1137-1143.
18. Starkel, P. and I.A. Leclercq, *Animal models for the study of hepatic fibrosis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 319-333.
19. Kroeger-Koepke, M.B., et al., *alpha-Hydroxylation pathway in the in vitro metabolism of carcinogenic nitrosamines: N-nitrosodimethylamine and N-nitroso-N-methylaniline*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(10): p. 6489-6493.
20. Poirier, L.A., *Hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine in rats fed high dietary levels of lipotropes*. J Natl Cancer Inst, 1975. **54**(1): p. 137-140.
21. Muller, A., et al., *Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats--usefulness and reliability of this animal model*. Exp Pathol, 1988. **34**(4): p. 229-236.
22. Overturf, K., et al., *Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes*. Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1273-1280.
23. Mangnall, D., N.C. Bird, and A.W. Majeed, *The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy*. Liver Int, 2003. **23**(2): p. 124-138.
24. Fausto, N., A.D. Laird, and E.M. Webber, *Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration*. FASEB J, 1995. **9**(15): p. 1527-1536.
25. Cruise, J.L., et al., *Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration*. Hepatology, 1987. **7**(6): p. 1189-1194.
26. Kohler, C., et al., *Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration*. Hepatology, 2004. **39**(4): p. 1056-1065.
27. LeCouter, J., et al., *Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1*. Science, 2003. **299**(5608): p. 890-893.
28. Huang, W., et al., *Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration*. Science, 2006. **312**(5771): p. 233-236.
29. Lesurtel, M., et al., *Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration*. Science, 2006. **312**(5770): p. 104-107.
30. DeAngelis, R.A., M.M. Markiewski, and J.D. Lambris, *Liver regeneration: a link to inflammation through complement*. Adv Exp Med Biol, 2006. **586**: p. 17-34.
31. Yamauchi, H., et al., *Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice*. Exp Toxicol Pathol, 2003. **54**(4): p. 281-286.
32. Starzl, T.E., K.A. Porter, and C.W. Putnam, *Insulin, glucagon, and the control of hepatic structure, function, and capacity for regeneration*. Metabolism, 1976. **25**(11 Suppl 1): p. 1429-1434.

33. Kan, M., et al., *Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7432-7436.
34. Mohn, K.L., et al., *The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(1): p. 381-390.
35. Monga, S.P., et al., *Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration*. Hepatology, 2001. **33**(5): p. 1098-1109.
36. Marubashi, S., et al., *Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model*. Surgery, 2004. **136**(5): p. 1028-1037.
37. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 2-13.
38. Trautwein, C., et al., *Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration*. Gastroenterology, 1996. **110**(6): p. 1854-1862.
39. Iwai, M., et al., *Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy*. Cytokine, 2001. **13**(1): p. 60-64.
40. Hayashi, H., et al., *Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice*. Liver Int, 2005. **25**(1): p. 162-170.
41. Yamada, Y., et al., *Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor*. Hepatology, 1998. **28**(4): p. 959-970.
42. Yamada, Y., et al., *Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1441-1446.
43. Knight, B. and G.C. Yeoh, *TNF/LTalpha double knockout mice display abnormal inflammatory and regenerative responses to acute and chronic liver injury*. Cell Tissue Res, 2005. **319**(1): p. 61-70.
44. Aldeguer, X., et al., *Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration*. Hepatology, 2002. **35**(1): p. 40-48.
45. Cressman, D.E., et al., *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1379-1383.
46. Sakamoto, T., et al., *Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 403-411.
47. Wuestefeld, T., et al., *Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11281-11288.

48. Riehle, K.J., et al., *Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3*. J Exp Med, 2008. **205**(1): p. 91-103.
49. Suh, H.N., et al., *Role of interleukin-6 in the control of DNA synthesis of hepatocytes: involvement of PKC, p44/42 MAPKs, and PPARdelta*. Cell Physiol Biochem, 2008. **22**(5-6): p. 673-684.
50. Zarnegar, R., et al., *Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **177**(1): p. 559-565.
51. Paranjpe, S., et al., *Combined systemic elimination of MET and epidermal growth factor receptor signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation*. Hepatology, 2016. **64**(5): p. 1711-1724.
52. Borowiak, M., et al., *Met provides essential signals for liver regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10608-10613.
53. Birchmeier, C., et al., *Met, metastasis, motility and more*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(12): p. 915-925.
54. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-293.
55. Yu, J.S. and W. Cui, *Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination*. Development, 2016. **143**(17): p. 3050-3060.
56. Nelsen, C.J., et al., *Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 3656-3663.
57. Morgan, D.O., *Principles of CDK regulation*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 131-134.
58. Pines, J., *Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view*. Biochem J, 1995. **308**(Pt 3): p. 697-711.
59. Pardee, A.B., *G1 events and regulation of cell proliferation*. Science, 1989. **246**(4930): p. 603-608.
60. Matsuo, T., et al., *Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo*. Science, 2003. **302**(5643): p. 255-259.
61. Braun, L., et al., *Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(5): p. 1539-1543.
62. Bissell, D.M., et al., *Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 447-455.

63. Bottinger, E.P., et al., *The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5877-5882.
64. Jakowlew, S.B., et al., *Transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in rat liver regeneration: messenger RNA expression and activation of latent TGF-beta*. Cell Regul, 1991. **2**(7): p. 535-548.
65. Strain, A.J., et al., *Transforming growth factor beta inhibits DNA synthesis in hepatocytes isolated from normal and regenerating rat liver*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **145**(1): p. 436-442.
66. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
67. Alexandrow, M.G. and H.L. Moses, *Transforming growth factor beta and cell cycle regulation*. Cancer Res, 1995. **55**(7): p. 1452-1457.
68. Gohda, E., et al., *TGF-beta is a potent inhibitor of hepatocyte growth factor secretion by human fibroblasts*. Cell Biol Int Rep, 1992. **16**(9): p. 917-926.
69. Yasuda, H., et al., *Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1491-1496.
70. Ichikawa, T., et al., *Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver*. Hepatology, 2001. **34**(5): p. 918-925.
71. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**(4): p. 817-825.
72. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell, 1993. **75**(4): p. 805-816.
73. Seki, E. and D.A. Brenner, *Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 322-335.
74. Szabo, G., A. Dolganiuc, and P. Mandrekar, *Pattern recognition receptors: a contemporary view on liver diseases*. Hepatology, 2006. **44**(2): p. 287-298.
75. Petrasek, J., P. Mandrekar, and G. Szabo, *Toll-like receptors in the pathogenesis of alcoholic liver disease*. Gastroenterol Res Pract, 2010. **2010**: 710381.
76. Byun, J.S., et al., *Activation of toll-like receptor 3 attenuates alcoholic liver injury by stimulating Kupffer cells and stellate cells to produce interleukin-10 in mice*. J Hepatol, 2013. **58**(2): p. 342-349.
77. Chen, C.J., et al., *Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 851-856.
78. Zhang, Q., et al., *Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 104-107.

79. Matsumura, T., et al., *Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(10): p. 915-921.
80. Matsumura, T., et al., *TRAF6-NF-kappaB pathway is essential for interleukin-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes*. Immunology, 2003. **109**(1): p. 127-136.
81. Li, K., et al., *Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 16739-16747.
82. Kesar, V. and J.A. Odin, *Toll-like receptors and liver disease*. Liver Int, 2014. **34**(2): p. 184-196.
83. Chen, Y. and R. Sun, *Toll-like receptors in acute liver injury and regeneration*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(10): p. 1433-1441.
84. Beutler, B., et al., *Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 353-389.
85. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-384.
86. Fukata, M., et al., *Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine*. Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 862-877.
87. Fukata, M., et al., *Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1869-1881.
88. Fukata, M., et al., *Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(5): p. G1055-1065.
89. Macedo, L., et al., *Wound healing is impaired in MyD88-deficient mice: a role for MyD88 in the regulation of wound healing by adenosine A2A receptors*. Am J Pathol, 2007. **171**(6): p. 1774-1788.
90. Seki, E., et al., *Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration*. Hepatology, 2005. **41**(3): p. 443-450.
91. Campbell, J.S., et al., *Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2522-2528.
92. Iimuro, Y. and J. Fujimoto, *TLRs, NF-kappaB, JNK, and Liver Regeneration*. Gastroenterol Res Pract, 2010. **2010**: 598109.
93. Cornell, R.P., B.L. Liljequist, and K.F. Bartizal, *Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice*. Hepatology, 1990. **11**(6): p. 916-922.

94. Seki, E., et al., *TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1324-1332.
95. Watanabe, A., et al., *Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9*. Hepatology, 2007. **46**(5): p. 1509-1518.
96. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-738.
97. Fitzgerald, K.A., et al., *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 491-496.
98. McWhirter, S.M., et al., *IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 233-238.
99. Sato, S., et al., *Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 4304-4310.
100. Meylan, E., et al., *RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation*. Nat Immunol, 2004. **5**(5): p. 503-507.
101. Nelson, A.M., et al., *dsRNA Released by Tissue Damage Activates TLR3 to Drive Skin Regeneration*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(2): p. 139-151.
102. Lin, Q., et al., *Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid promotes wound healing in human and murine skin*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(8): p. 2085-2092.
103. Berge, M., et al., *Small interfering RNAs induce target-independent inhibition of tumor growth and vasculature remodeling in a mouse model of hepatocellular carcinoma*. Am J Pathol, 2010. **177**(6): p. 3192-3201.
104. Liu, Y., et al., *Tumor Exosomal RNAs Promote Lung Pre-metastatic Niche Formation by Activating Alveolar Epithelial TLR3 to Recruit Neutrophils*. Cancer Cell, 2016. **30**(2): p. 243-256.
105. Matijevic, T. and J. Pavelic, *The dual role of TLR3 in metastatic cell line*. Clin Exp Metastasis, 2011. **28**(7): p. 701-712.
106. Ritter, M., et al., *Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response*. J Inflamm (Lond), 2005. **2**: p. 16.
107. Ramnath, D., et al., *The toll-like receptor 3 pathway in homeostasis, responses to injury and wound repair*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **61**: p. 22-30.
108. Clavien, P.A., et al., *Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation*. N Engl J Med, 2007. **356**(15): p. 1545-1559.

109. Belghiti, J., et al., *Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection*. J Am Coll Surg, 2000. **191**(1): p. 38-46.
110. Cucchetti, A., et al., *Impact of model for end-stage liver disease (MELD) score on prognosis after hepatectomy for hepatocellular carcinoma on cirrhosis*. Liver Transpl, 2006. **12**(6): p. 966-971.
111. Dinant, S., et al., *Risk assessment of posthepatectomy liver failure using hepatobiliary scintigraphy and CT volumetry*. J Nucl Med, 2007. **48**(5): p. 685-692.
112. Farges, O., et al., *Risk of major liver resection in patients with underlying chronic liver disease: a reappraisal*. Ann Surg, 1999. **229**(2): p. 210-215.
113. Karoui, M., et al., *Influence of preoperative chemotherapy on the risk of major hepatectomy for colorectal liver metastases*. Ann Surg, 2006. **243**(1): p. 1-7.
114. Kawano, Y., et al., *Short- and long-term outcomes after hepatic resection for hepatocellular carcinoma with concomitant esophageal varices in patients with cirrhosis*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(6): p. 1670-1676.
115. McCormack, L., et al., *Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study*. Ann Surg, 2007. **245**(6): p. 923-930.
116. Schnitzbauer, A.A., et al., *Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings*. Ann Surg, 2012. **255**(3): p. 405-414.
117. Byun, S.H., H.S. Yang, and J.H. Kim, *Liver graft hyperperfusion in the early postoperative period promotes hepatic regeneration 2 weeks after living donor liver transplantation: A prospective observational cohort study*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(46): p. e5404.
118. Desbois-Mouthon, C., et al., *Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout*. FASEB J, 2006. **20**(6): p. 773-775.
119. Naugler, W.E., et al., *Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production*. Science, 2007. **317**(5834): p. 121-124.
120. Bucher, N.L., *Regeneration of Mammalian Liver*. Int Rev Cytol, 1963. **15**: p. 245-300.
121. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-295.
122. Gershoni, J.M. and G.E. Palade, *Protein blotting: principles and applications*. Anal Biochem, 1983. **131**(1): p. 1-15.
123. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-707.

124. Jeffrey, P.D., et al., *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex*. Nature, 1995. **376**(6538): p. 313-320.
125. Seoane, J., et al., *Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation*. Cell, 2004. **117**(2): p. 211-223.
126. Gomis, R.R., et al., *C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytosstatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells*. Cancer Cell, 2006. **10**(3): p. 203-214.
127. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-230.
128. Chen, C.R., et al., *E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression*. Cell, 2002. **110**(1): p. 19-32.
129. Wakefield, L.M. and A.B. Roberts, *TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 22-29.
130. Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Smad transcription factors*. Genes Dev, 2005. **19**(23): p. 2783-2810.
131. Li, F., et al., *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin*. Nature, 1998. **396**(6711): p. 580-584.
132. Altieri, D.C., *New wirings in the survivin networks*. Oncogene, 2008. **27**(48): p. 6276-6284.
133. Baba, H.A., et al., *Survivin is upregulated during liver regeneration in rats and humans and is associated with hepatocyte proliferation*. Liver Int, 2009. **29**(4): p. 585-592.
134. Deguchi, M., et al., *Expression of survivin during liver regeneration*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(1): p. 59-64.
135. Hagemann, S., et al., *Loss of Survivin influences liver regeneration and is associated with impaired Aurora B function*. Cell Death Differ, 2013. **20**(6): p. 834-844.
136. Mohammed, F.F., et al., *Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration*. Hepatology, 2005. **41**(4): p. 857-867.
137. Li, D., et al., *The critical role of dysregulated FOXM1-PLAUR signaling in human colon cancer progression and metastasis*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(1): p. 62-72.
138. Rabbani, S.A., et al., *An anti-urokinase plasminogen activator receptor antibody (ATN-658) blocks prostate cancer invasion, migration, growth, and experimental skeletal metastasis in vitro and in vivo*. Neoplasia, 2010. **12**(10): p. 778-788.
139. Kinoshita, T., et al., *Possible endocrine control by hepatocyte growth factor of liver regeneration after partial hepatectomy*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **177**(1): p. 330-335.
140. Lindroos, P.M., R. Zarnegar, and G.K. Michalopoulos, *Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver*

- regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration.* Hepatology, 1991. **13**(4): p. 743-750.
141. Nelsen, C.J., et al., *Amino acids regulate hepatocyte proliferation through modulation of cyclin D1 expression.* J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25853-25858.
142. Factor, V.M., et al. *Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice.* PLoS One. 2010. **5**(9): e12739.
143. Joung, S.M., et al., *Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1.* J Immunol, 2011. **186**(1): p. 499-507.
144. Fausto, N. and E.M. Webber, *Control of liver growth.* Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1993. **3**(2): p. 117-135.
145. Morello, D., A. Lavenu, and C. Babinet, *Differential regulation and expression of jun, c-fos and c-myc proto-oncogenes during mouse liver regeneration and after inhibition of protein synthesis.* Oncogene, 1990. **5**(10): p. 1511-1519.
146. Thompson, N.L., et al., *Sequential protooncogene expression during rat liver regeneration.* Cancer Res, 1986. **46**(6): p. 3111-3117.
147. Streetz, K.L., et al., *Interleukin 6 and liver regeneration.* Gut, 2000. **47**(2): p. 309-312.
148. Zorde-Khvaleyevsky, E., et al., *Toll-like receptor 3 signaling attenuates liver regeneration.* Hepatology, 2009. **50**(1): p. 198-206.
149. Albrecht, J.H., A.H. Meyer, and M.Y. Hu, *Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1/Sdi1) gene expression in hepatic regeneration.* Hepatology, 1997. **25**(3): p. 557-563.
150. Guardavaccaro, D., et al., *Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(5): p. 1797-1815.
151. Park, T.J., et al., *TIS21 negatively regulates hepatocarcinogenesis by disruption of cyclin B1-Forkhead box M1 regulation loop.* Hepatology, 2008. **47**(5): p. 1533-1543.
152. Helmke, C., S. Becker, and K. Strebhardt, *The role of Plk3 in oncogenesis.* Oncogene, 2016. **35**(2): p. 135-147.
153. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases.* Genes Dev, 1995. **9**(10): p. 1149-1163.
154. Matsushime, H., et al., *D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2066-2076.
155. Fausto, N., *Liver regeneration.* J Hepatol, 2000. **32**(1 Suppl): p. 19-31.
156. Albrecht, J.H., et al., *Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the liver: role of nuclear localization and p27 sequestration.* Am J Physiol, 1999. **277**(6): p. G1207-1216.

157. Rickheim, D.G., et al., *Differential regulation of cyclins D1 and D3 in hepatocyte proliferation*. Hepatology, 2002. **36**(1): p. 30-38.
158. Mittnacht, S., et al., *Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation*. EMBO J, 1994. **13**(1): p. 118-127.
159. Buchkovich, K., L.A. Duffy, and E. Harlow, *The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle*. Cell, 1989. **58**(6): p. 1097-1105.
160. Loyer, P., et al., *Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes in vitro. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1*. J Biol Chem, 1996. **271**(19): p. 11484-11492.
161. Hoffman, A.L., et al., *Hepatic regeneration: current concepts and clinical implications*. Semin Liver Dis, 1994. **14**(2): p. 190-210.
162. Albrecht, J.H., et al., *Changes in cell cycle-associated gene expression in a model of impaired liver regeneration*. FEBS Lett, 1994. **347**(2-3): p. 157-162.
163. Nakamura, T., et al., *Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **133**(3): p. 1042-1050.
164. Zhong, Z., et al., *Inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling improves regeneration of small-for-size rat liver grafts*. Liver Transpl, 2010. **16**(2): p. 181-190.
165. Romero-Gallo, J., et al., *Inactivation of TGF-beta signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy*. Oncogene, 2005. **24**(18): p. 3028-3041.
166. Oe, S., et al., *Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice*. Hepatology, 2004. **40**(5): p. 1098-1105.
167. Mars, W.M., et al., *Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration*. Hepatology, 1995. **21**(6): p. 1695-1701.
168. Padiaditakis, P., et al., *The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat*. Hepatology, 2001. **34**(4 Pt 1): p. 688-693.
169. Zhou, B., et al., *Matrix metalloproteinases-9 deficiency impairs liver regeneration through epidermal growth factor receptor signaling in partial hepatectomy mice*. J Surg Res, 2015. **197**(1): p. 201-209.
170. Paumelle, R., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway*. Oncogene, 2002. **21**(15): p. 2309-2319.

171. Okano, J., et al., *Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **309**(2): p. 298-304.
172. Vaquero, J., et al., *Liver Regeneration after Partial Hepatectomy Is Not Impaired in Mice with Double Deficiency of MyD88 and IFNAR Genes*. *Gastroenterol Res Pract*, 2011. **2011**: 727403.
173. Sun R. and Gao B., *Negative Regulations of Liver Regeneration by Innate Immunity (Natural Killer Cells/Interferon- γ)*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(5):1525-1539.
174. Graubardt, N., et al., *Promotion of liver regeneration by natural killer cells in a murine model is dependent on extracellular adenosine triphosphate phosphohydrolysis*. *Hepatology*, 2013. **57**(5): p. 1969-1979.
175. Jimuro, Y., et al., *NF-kappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(4): p. 802-811.
176. Yang, L., et al., *NF-kappaB activation in Kupffer cells after partial hepatectomy*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **289**(3): p. G530-538.
177. Ringelhan, M., R.M. Schmid, and F. Geisler, *The NF-kappaB subunit RelA/p65 is dispensable for successful liver regeneration after partial hepatectomy in mice*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46469.
178. Huh, C.G., et al., *Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(13): p. 4477-4482.
179. Meyer, R.E. and R.E. Fish, *A review of tribromoethanol anesthesia for production of genetically engineered mice and rats*. *Lab Anim (NY)*, 2005. **34**(10): p. 47-52.
180. Kieling, C.O., et al., *The effects of anesthetic regimen in 90% hepatectomy in rats*. *Acta Cir Bras*, 2012. **27**(10): p. 702-706.
181. Yu, J., X. Sun, and G. Sang, *Effects of repeated high dosage of chloral hydrate and pentobarbital sodium anesthesia on hepatocellular system in rats*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(7): p. 10568-10576.

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des OP-Situs der 2/3-PHx in der Maus	6
Abb. 2	Schematische Darstellung der Leberregeneration	8
Abb. 3	Darstellung der durch HGF/c-Met aktivierten Signalwege	10
Abb. 4	Schematische Darstellung des TLR3-Signalwegs	15
Abb. 5	Darstellung des TLR3 ^{Stp/Stp} (TLR3-Stp)-Modells	27
Abb. 6	Entwicklung des Leber-/Körpergewichtsverhältnisses	40
Abb. 7	Schematische Darstellung des IL-6-Signalwegs	41
Abb. 8	Untersuchung der Zytokin-Expression zu Beginn der Leberregeneration	42
Abb. 9	Analyse der frühen Expression pro- und antiproliferativer Gene	43
Abb. 10	Analyse des Restriktionspunktes	45
Abb. 11	Darstellung der S-Phase mittels IHC-Analyse der BrdU-Inkorporation	46
Abb. 12	Analyse der G ₂ -M-Transition	48
Abb. 13	Darstellung der Zellzyklusinhibitoren während der Progressionsphase	49
Abb. 14	Analyse des Smad-Signalwegs	51
Abb. 15	Untersuchung der Apoptose im Rahmen der Leberregeneration	53
Abb. 16	Aktivierung von HGF aus der ECM durch das Urokinase-System	54
Abb. 17	Analyse der MMP-Expression sowie des PLAU/PLAUR-Systems	55
Abb. 18	Analyse der Expression und Konzentration von HGF	56
Abb. 19	Aktivierung der S6-Kinase durch HGF	57
Abb. 20	Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs	58
Abb. 21	Darstellung der Aktivierung von TLRs in Kupffer-Zellen und Hepatozyten	61
Abb. 22	Schematische Darstellung des Zellzyklus im Wildtyp vs. TLR3-Stp-Mausstamm ...	66
Abb. 23	Darstellung der extrazellulären Matrix und des Urokinase-Systems	68

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über Lokalisation und Liganden der TLRs	14
Tab. 2	Erstantikörper	21
Tab. 3	Zweitantikörper	21
Tab. 4	Überblick über die verwendeten Stammlösungen und Puffer	22
Tab. 5	Überblick über verwendete q-RT-PCR-Primer	26
Tab. 6	Übersicht der eingesetzten Versuchstiere	26
Tab. 7	Ansatz A cDNA	34
Tab. 8	Ansatz B cDNA	34
Tab. 9	Ansatz q-RT-PCR	35
Tab. 10	Phasen der q-RT-PCR	35
Tab. 11	Trenngel (20 ml)	37
Tab. 12	Sammelgel (5 ml)	37

12 Abkürzungsverzeichnis

4EBP	4E Binding Protein 1
Akt	Proteinkinase B
ALK	Activin-like kinase
ALPPS	Associating liver partition and portal vein ligation
AP-1	Activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
Bambi	BMP and the activin membrane-bound inhibitor
BCA	Bicinchoninsäure
Birc5	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	Circa
CAK	CDK-activating kinase
CCl ₄	Tetrachlormethan
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-Met	Mesenchymal epithelial transition (MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase)
CpG	Cytosin-Guanin-Oligodesoxynukleotide
Crk	CRK Proto-Oncogene, Adaptor Protein
C _T	Cycle Threshold
DAMPs	Danger-associated molecular patterns
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DEN (DMN)	Dimethyl-/Diethylnitrosamin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DSS	Dextransulfat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EU	Europäische Union
EGF	Epithelial growth factor
EGFR	Epithelial growth factor receptor
ERK	Extracellular regulated kinase
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations

Abkürzungsverzeichnis

FLR	Future liver remnant
FoxM1	Forkhead Box M1
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GH	Growth hormone
GRWR	Graft weight to recipient body weight ratio
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	Hepatocyte growth factor
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HRP	Horse radish peroxidase
IEG	Immediate early genes
IFN	Interferon
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
INK4	Inhibitors of CDK4 and CDK6
IRF	Interferon-regulatory factor
Jak	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KG	Körpergewicht
LAP-TGF β	Latency-associated peptide-TGF β
LPCs	Liver progenitor cells
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine rich repeat
LSECs	Leberspezifische sinusoidale Endothelzellen
LTx	Lebertransplantation
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCMV	Murines Cytomegalovirus
MMP	Matrixmetalloproteinase
M-MuLV	Moloney murine leukemia virus
MPF	Mitosis promoting factor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF κ B	Nuclear factor Kappa B

Abkürzungsverzeichnis

NK	Natürliche Killer-Zellen
NKG2D	Natural-killer receptor group 2, member D
NPCs	Nicht-parenchymatöse Zellen
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pak	p21 (RAC1) activated kinase 1
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHLF	Post-hepatectomy liver failure
PHx	Partielle Hepatektomie (=2/3), Leberteilresektion (=2/3)
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLAT	Tissue plasminogen activator
PLAU	Urokinase-type plasminogen activator
PLAUR	Urokinase-type plasminogen activator receptor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PVE	Portalvenenembolisation
PVL	Portalvenenligation
PVV	Portalvenenflussgeschwindigkeit
PRR	Pathogen recognition receptor
q-RT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
Rac	Rac family small GTPase 1
RANTES	Regulated and normal T cell expressed and secreted (= CCL5)
Rb	Retinoblastomprotein
Rip	Receptor-interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure
R-Smad	Receptor-regulated Smad
RT	Reverse Transkriptase
SBE	Smad binding element
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SEM	Standardfehler
Ser	Serin
Smad	Small mothers against decapentaplegic homolog
SOCS	Suppressor of cytokine signalling

Abkürzungsverzeichnis

SPF	Specific-pathogen-free
ssRNA	Single-stranded RNA
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAA	Thioacetamid
TANK	TRAF-associated NF- κ B activator
TEAD	TEA domain-containing factors
TEF	Transcriptional enhancer factor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TBK	TANK-binding kinase
TGF α	Transforming growth factor α
TGF β	Transforming growth factor β
Thr	Threonin
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumor necrosis factor α
TNFR	Tumor necrosis factor α receptor
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRIF	Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing Interferon beta
TVA	Tierversuchsantrag
Tyr	Tyrosin
U	Spannung
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase 1
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VGLL4	Vestigial like family member 4
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung

13 Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Bernhard Holzmann für die Möglichkeit, unter seiner Aufsicht und als Mitglied seines Laborteams diese Arbeit anfertigen zu dürfen, danken. Die täglichen Besprechungen der Daten und das Wissen, jederzeit auch bei praktischen Fragen Rücksprache halten zu können, haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit und auch zu meiner persönlichen Entwicklung beigetragen.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Norbert Hüser bedanken, der als weiterer Betreuer nicht nur diese Arbeit ermöglicht hat, sondern auch während der Anfangsphase in der Klinik immer zur Seite stand und steht.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Mentor PD Dr. Guido von Figura bedanken. Vor allem seine Ratschläge für die Entwicklung der wissenschaftlichen und klinischen Karriere waren und sind immer sehr bereichernd für mich gewesen.

Weiterer Dank geht sowohl an PD Dr. Melanie Laschinger als auch Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen. Beide waren jederzeit zur Stelle, falls es Fragen oder Unklarheiten gab. Besonders Melanie möchte ich für ihr hilfreiches Feedback nach jedem Journal Club danken.

Für die gute Aufnahme ins Team und die sorgsame Einführung sowie Einarbeitung in den Laboralltag möchte ich mich besonders bei Gabriela Holzmann und Felicitas Altmayer bedanken. Dankend habe ich eure Hinweise und Ratschläge angenommen und wusste eure Geduld mit mir sehr zu schätzen. Ihr habt mir das Laborhandwerk sozusagen beigebracht. Und auch während meiner Zeit in der Klinik schaue ich immer wieder gerne bei euch vorbei.

Mit der AG Janssen konnte man im Labor viele unterhaltsame Stunden verbringen, und deshalb danke ich Widya, Fabian, Markus, Andreas, Sarah, Ulrich, Anja, Andrea und allen anderen, die für kurz oder lang im Labor tätig waren, für diese schöne Zeit.

Zu guter Letzt gilt mein unschätzbare Dank meiner Familie. Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich mich für die moralische Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge bedanken, die mir immer wieder den rechten Weg aufgezeigt und zur Fertigstellung dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.