



**Einfluss Leberregenerations-relevanter Faktoren auf die
Translation und Chemokinsynthese in murinen
Hepatozyten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Judith Knievel

aus Paderborn

Düsseldorf, Juli 2014

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Dieter Häussinger

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Johannes G. Bode
Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2014

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht:in Originalarbeiten

Knievel J., Häussinger D., Bode J.G. *HGF enables TNF α to induce chemokine release from hepatocytes but not from macrophages that is sufficient to mediate recruitment of neutrophils*

(Manuscript in preparation)

als Posterbeiträge

Knievel J.*, Wolf S.*, Häussinger D., Bode J.G. *Interactive influence of macrophages and hepatocytes in co-culture*; 43rd Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI), September 2013, Mainz (* gleichberechtigte Erstautoren)

Knievel J., Häussinger D., Bode J.G. *HGF induces expression and modulates TNF α -induced expression of the CXCR2 ligands CXCL1-3 in primary murine hepatocytes*; 49th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), April 2014, London

Knievel J., Häussinger D., Bode J.G. *HGF induces expression and modulates TNF α -induced expression of the CXCR2 ligands CXCL1-3 in primary murine hepatocytes*; 5th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells (SBMC), Mai 2014, Berlin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	13
1.1 Die Leber	13
1.1.1 Zelltypen der Leber	13
1.2 Leberregeneration	16
1.2.1 Regulatoren des Leberwachstums	18
1.2.1.1 Hepatocyte Growth Factor (HGF)	21
1.2.1.2 Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)	21
1.2.1.3 Epidermal Growth Factor (EGF)	22
1.2.1.4 Transforming Growth Factor beta (TGF β)	22
1.2.1.5 Interleukin 1 beta (IL-1 β)	22
1.3 Proteinbiosynthese	24
1.4 Chemokine	25
1.4.1 Struktur und Nomenklatur	25
1.4.2 Funktion	29
1.4.3 Chemokine im Rahmen der Leberregeneration	32
1.5 Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion im Rahmen der Leberregeneration	33
1.6 Ziel der Arbeit	35
2 Material und Methoden	36
2.1 Material	36
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	36
2.1.2 Medien, Reagenzien und Inhibitoren für die Zellkultur	37
2.1.3 Antikörper	38
2.1.4 Molekularbiologische Kits	38
2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen	39
2.1.6 Spezielle Materialien und Geräte	40
2.1.7 Oligonukleotide (Primer)	42
2.1.8 Versuchstiere, Tierhaltung	42
2.2 Methoden	43
2.2.1 Zellbiologische Methoden	43
2.2.1.1 Präparation muriner Hepatozyten	43
2.2.1.2 Präparation neutrophiler Granulozyten der Maus	44
2.2.1.3 Präparation muriner Makrophagen aus dem Knochenmark	45
2.2.1.4 Präparation muriner Endothelzellen der Leber (LSEC)	45
2.2.1.5 Ko-Kultur Hepatozyten – Makrophagen	46

2.2.1.6	Migrations-Assay	46
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	47
2.2.2.1	RNA-Präparation	47
2.2.2.2	Reverse Transkription.....	47
2.2.2.3	Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion.....	48
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	48
2.2.3.1	Präparation von Proteinlysaten	48
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	49
2.2.3.3	Western Blot	49
2.2.3.4	ELISA	50
2.2.3.5	Proteinsynthese-Messung	50
2.2.4	Statistische Auswertung	51
3	Ergebnisse	52
3.1	<i>Chemokinexpression unter Einfluss verschiedener regenerations-relevanter Faktoren.....</i>	52
3.2	<i>Einfluss von HGF und TNFα auf die Chemokinsynthese in Hepatozyten und Makrophagen</i>	55
3.3	<i>Einfluss der CXC-Chemokine auf das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten und Leber-Endothelzellen (LSEC)</i>	59
3.4	<i>Regulation der Chemokinexpression.....</i>	62
3.4.1	Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für die Chemokinsynthese	62
3.4.2	Einfluss weiterer Signalwege für die Chemokinsynthese	67
3.5	<i>Gegenseitige Beeinflussung von Hepatozyten und Makrophagen.....</i>	73
3.6	<i>Einfluss von HGF auf die Proteinbiosynthese in Hepatozyten</i>	78
3.6.1	Kontrolle translations-regulatorischer Faktoren durch HGF.....	78
3.6.2	Analyse der <i>de novo</i> Proteinsynthese	80
4	Diskussion.....	81
4.1	<i>Chemokinexpression unter Einfluss verschiedener regenerations-relevanter Faktoren.....</i>	81
4.2	<i>Einfluss der CXC-Chemokine auf das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten und Leber-Endothelzellen</i>	85
4.3	<i>Gegenseitige Beeinflussung von Hepatozyten und Makrophagen.....</i>	87
4.4	<i>Einfluss von HGF auf die Proteinbiosynthese in Hepatozyten</i>	89
5	Zusammenfassung	91
6	Summary	92
7	Literaturverzeichnis	93
8	Danksagung.....	103
9	Lebenslauf	105
	Eidesstattliche Erklärung	106

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Leber und ihrer Zelltypen	15
Abbildung 1.2: Zeitlicher Ablauf der Genaktivierung in der regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie	17
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Start- und Stopp-Signale während der Leberregeneration	20
Abbildung 1.4: Dreidimensionale Struktur der Chemokine	26
Abbildung 1.5: Struktur der Chemokin-Familien.....	26
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Aktivierung des Chemokinrezeptors	31
Abbildung 1.7: Komprimierte Darstellung der verschiedenen Signalwege	34

3. Ergebnisse

Abbildung 3.1: Expressionsmuster der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3	54
Abbildung 3.2: Chemokinexpression in murinen Hepatozyten und Makrophagen	56
Abbildung 3.3: Chemokinexpression nach gleichzeitiger Stimulation mit HGF und TNF α	58
Abbildung 3.4: Migration neutrophiler Granulozyten.....	59
Abbildung 3.5: Migration Sinusoidaler Endothelzellen der Leber.....	60
Abbildung 3.6: CXCR2-abhängige Migration neutrophiler Granulozyten	61
Abbildung 3.7: Bedeutung der PI3-Kinase für die durch HGF und EGF induzierte Chemokinexpression.....	63
Abbildung 3.8: Einfluss des Akt-Inhibitors Triziribin auf die Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 induziert durch HGF.....	65
Abbildung 3.9: Einfluss des Akt-Inhibitors Triziribin auf die Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 induziert durch EGF	66
Abbildung 3.10: Chemokinexpression in Abhängigkeit verschiedener Inhibitoren	68
Abbildung 3.11: Vergleich der Chemokinexpression zwischen Wildtyp- und MK2- Knockout-Mäusen.....	69
Abbildung 3.12: mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3, induziert durch HGF und TNF α , unter Verwendung verschiedener Inhibitoren.....	71

Abbildung 3.13: Protein-Expression von CXCL1 und CXCL2, induziert durch HGF und TNF α , unter Verwendung verschiedener Inhibitoren.....	72
Abbildung 3.14: Chemokinexpression nach gleichzeitiger Stimulation mit HGF und TNF α in Hepatozytenkulturen mit und ohne Makrophagen	74
Abbildung 3.15: Protein-Expression von CXCL1 und CXCL2 nach gleichzeitiger Stimulation mit HGF und TNF α in Hepatozytenkulturen mit und ohne Makrophagen	75
Abbildung 3.16: Chemokinexpression der Hepatozyten im Vergleich zwischen Mono- und Ko-Kultur.....	77
Abbildung 3.17: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von EF2 und Akt	Fehler!
Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 3.18: Messung der Proteinsynthese in murinen Hepatozyten	80

4. Diskussion

Abbildung 4.1: Zusammenfassendes Model der Chemokin-Regulation.....	84
Abbildung 4.2: Gegenseitige Beeinflussung von Kupffer-Zellen und Hepatozyten.....	88

Tabellenverzeichnis

1. Einleitung

Tabelle 1.1: Zusammenstellung humaner und muriner Chemokine [nach Zlotnik and Yoshie, 2012].....	28
--	----

2. Material und Methoden

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper	38
Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide für die Real Time PCR.....	42

Abkürzungsverzeichnis

Acc	<i>acceleration</i>
ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Da	Dalton
Dec	<i>deceleration</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EF	<i>elongation factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ErbB	<i>avian erythroblastosis oncogene B</i>
Erk	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFR	<i>growth factor receptor</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cell</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MK2	Mitogen aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NK	<i>natural killer</i>
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PHx	Partielle Hepatektomie
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
R	Rezeptor
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rF	Relative Luftfeuchtigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
S.E.M.	<i>standard error of mean</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	<i>tris-buffered saline with Tween</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLP	Triton-Lysepuffer

TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Trishydroxy-Aminomethan
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WST	<i>water soluble tetrazolium</i>

Die Standardeinheiten des SI-Systems wurden nicht aufgenommen. Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt.

1 Einleitung

1.1 Die Leber

Die Leber eines gesunden Erwachsenen stellt mit einem Gewicht von ca. 1,5 kg das größte Stoffwechselorgan des Menschen dar¹. Einige ihrer Aufgaben sind der Eiweißstoffwechsel, der Kohlenhydratstoffwechsel und die Produktion der Gallensäuren. Die Leber ist auch von großer Bedeutung für die angeborene und adaptive Immunität [Crispe, 2009] und die sogenannte Akute-Phase-Antwort [Bode *et al.*, 2012; Häussinger *et al.*, 2004]. Durch den Darm werden über das Pfortaderblut Pathogene transportiert, die in der Leber eliminiert werden.

Anatomisch können beim Menschen zwei große Leberlappen unterschieden werden (*Lobus dexter* und *Lobus sinister*) sowie zwei deutlich kleinere Leberlappen, der *Lobus quadratus* und der *Lobus caudatus*. Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Leber der Maus fünf Lappen: der seitlich rechte (*Lobus lateralis dexter*) und linke (*Lobus lateralis sinister*), der mittlere rechte und linke (*Lobus medialis dexter/sinister*) und der hintere (*Lobus caudatus*) [Salomon *et al.*, 2008]. Die Leberlappen werden weiter in Leberläppchen untergliedert, welche wiederum aus Leberzellbalken aufgebaut sind.

Die Blutversorgung der Leber geschieht auf zwei Wegen: zum einen wird über die Leberarterie (*Arteria hepatica propria*) sauerstoffreiches Blut vom Herz der Leber zugeführt, zum anderen wird über die Pfortader (*Vena portae*) nährstoffreiches Blut aus dem Magen-Darm-Trakt und der Milz in die Leber transportiert. Innerhalb der Leber wird das Blut in den Leberläppchen über Sinusoide zu den Zentralvenen (*Venae cantralis*) geleitet, welche in die Lebervenen (*Venae hepaticae*) münden.

1.1.1 Zelltypen der Leber

Die Leber besteht aus unterschiedlichen Zelltypen, welche in Parenchym- und Nichtparenchymzellen unterteilt werden. Mit etwa 60 % der Zellen und 80 % des Lebervolumens stellen die Hepatozyten als Parenchymzellen die dominierende Zellpopulation dar. Der Hepatozyt ist eine 20 – 40 µm große, polare, epitheliale Zelle, die

¹ Sofern nicht anders kenntlich gemacht, wurden die Grundlagen zur Anatomie und Biochemie der Leber den Büchern „Lehrbuch der Anatomie“ [Lippert, 2011] und „Klinische Hepatologie“ [Dancygier, 2003] entnommen.

entsprechend ihrer Stoffwechselaktivität reich an Zellorganellen aller Art ist. Circa 25 % der Hepatozyten weisen zwei Kerne auf. Die Hepatozyten lagern sich zu einschichtigen Balken und Platten zusammen, die vom Netz der Sinusoide umspinnen werden.

Zu den Nichtparenchymzellen gehören die Sinusendothelzellen (10 – 20 % der Leberzellen), die Kupffer-Zellen (15 – 25 % der Leberzellen) sowie die Ito- und Pit-Zellen (< 5 % der Leberzellen). Die Sinusoide werden von den Sinusendothelzellen ausgekleidet, die im Gegensatz zu Endothelien anderer Blutgefäße keine Basalmembran besitzen und ein lockeres Zellgeflecht bilden. Charakteristisch für die Sinusendothelzellen sind 100 – 150 nm große Poren (*Fenestrae*), welche die direkte Kommunikation zwischen Sinusoidallumen und Disse-Raum vermitteln. Der Disse-Raum ist der 0,2 – 0,5 µm breite subendotheliale Raum zwischen Sinusendothel und der sinusoidalen Oberfläche der Hepatozyten. Das Sinusendothel stellt durch die größenvariablen Endothelfenster eine selektive Barriere für belebte und unbelebte Partikel auf ihrem Weg aus dem Blut zum Hepatozyten, aber auch auf dem umgekehrten Weg dar.

Neben den Endothelzellen finden sich in den Sinusoiden leberspezifische Makrophagen, die Kupffer-Zellen. Mit Hilfe von Pseudopodien haften sie an den Endothelzellen. Die wichtigsten Aufgaben sind die Aufnahme, Verarbeitung und Präsentation von antigenem Material. Sie sind in der Lage, Fremdmaterial zu phagozytieren, Zytokine zu synthetisieren und die Funktion von Hepatozyten, Sinusendothelzellen und Ito-Zellen zu beeinflussen.

Im Disse-Raum gelegen, der äußeren Oberfläche der Endothelzellen aufgelagert, sind die Vitamin-A-speichernden Ito-Zellen, auch Sternzellen genannt. Neben ihrer Funktion im Vitamin-A- und Lipidstoffwechsel sind sie unter anderem an der Regulation des sinusoidalen Blutflusses beteiligt und beeinflussen Wachstum und Proliferation der Hepatozyten. Neuere Arbeiten legen zudem nahe, dass es sich bei den Sternzellen um leberspezifische Stammzellen handelt. Dementsprechend können sie Stimulus-abhängig in verschiedene Zellpopulationen der Leber differenzieren [Kordes *et al.*, 2013]. Hiermit übereinstimmend weist der Disse-Raum Charakteristika einer Stammzellnische auf [Kordes and Häussinger, 2013].

Im sinusoidalen Lumen findet man nach immunologischen Stimuli die sog. Pit-Zellen, leberassoziierte Lymphozyten. Sie üben wahrscheinlich antivirale und antitumorale Funktionen aus. Die Anordnung der verschiedenen Zelltypen im Leberlappen ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

Im Zusammenhang mit der Leberregeneration ist noch ein weiterer Zelltyp von Bedeutung, die Ovalzellen. Diese Zellen verfügen über die Fähigkeit, in Hepatozyten und Gallengang-

epithelien zu differenzieren und stellen somit neben den Ito-Zellen ein weiteres Stammzellkompartiment dar.

Zwischen den oben beschriebenen Zellen befindet sich die extrazelluläre Matrix (EZM). Die EZM steht mit den Leberzellen in bidirektionalem Kontakt und kann die Expression von Genen beeinflussen, die wiederum auf die Matrix einwirken. Hauptproduzent der EZM der menschlichen Leber sind die Ito-Zellen. Zu den Komponenten der Matrix zählen Kollagene, Elastin, Glykosaminoglykane und Proteoglykane sowie adhäsive Glykoproteine (Fibronectin, Laminin). Die EZM nimmt neben der mechanischen Stützfunktion an physiologischen Stoffwechsellleistungen teil und wirkt aktiv bei jeder Leberregeneration mit.

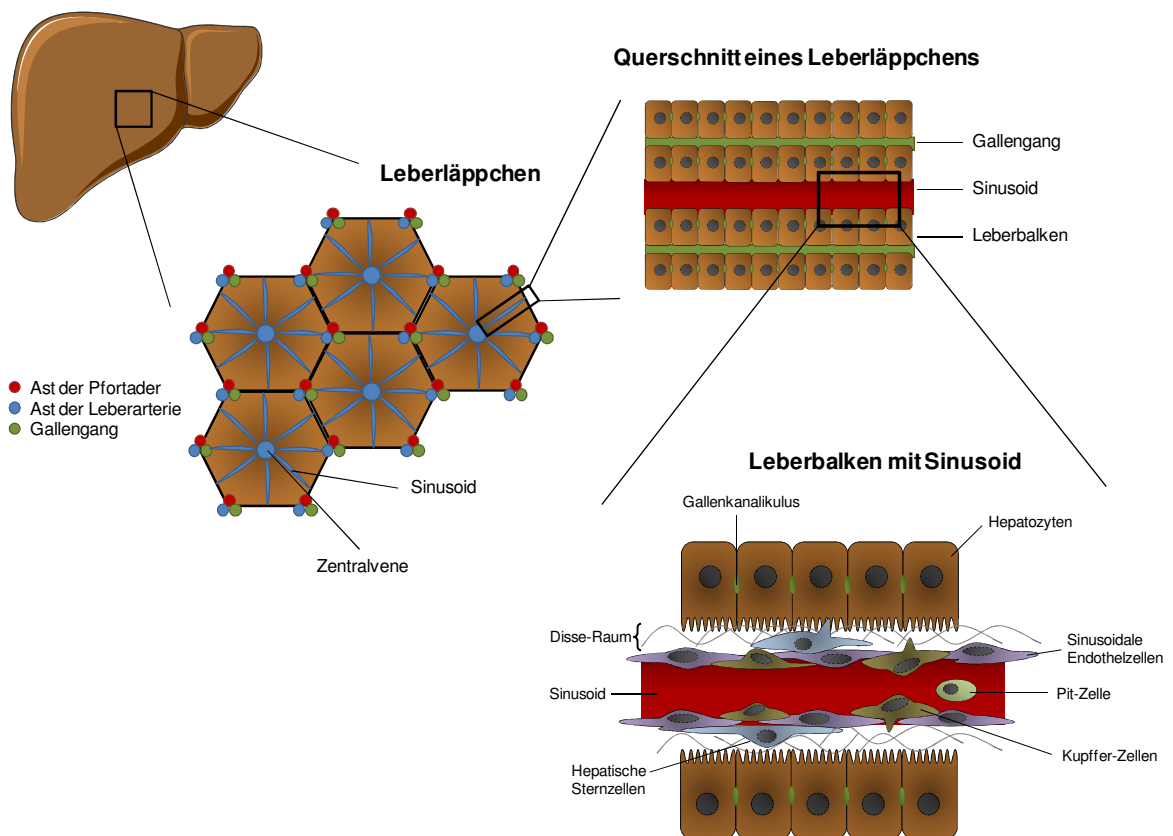


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Leber und ihrer Zelltypen

Die Leber setzt sich aus Leberläppchen zusammen, welche wiederum aus Leberzellbalken aufgebaut sind. Die verschiedenen Zelltypen der Leber sind in den Sinusoiden bzw. im Disse-Raum zu finden. Nähere Erläuterungen im Text.

1.2 Leberregeneration

Die Leber verfügt über die bemerkenswerte Eigenschaft, sich nach einer Schädigung regenerieren zu können. Diese Regenerationsfähigkeit ist bereits seit der Antike bekannt, wie im Mythos um Prometheus überliefert wird [Michalopoulos and DeFrances, 1997]. Nach dem Diebstahl des Geheimnisses des Feuers von den Göttern des Olympos war Prometheus verurteilt, täglich ein Stück seiner Leber der Gier eines Adlers zu überlassen. Seine Leber regenerierte über Nacht, wodurch dem Adler auf ewig Nahrung gesichert und Prometheus zu unendlichen Qualen verdammt war. Das am häufigsten verwendete Modell zur Erforschung der Leberregeneration im Tiermodell der Maus bzw. Ratte ist die Operationsmethode von Higgins und Anderson [Higgins and Anderson, 1931]. Bei dieser Operation werden zwei Drittel der Leber lappenweise entfernt (partielle Hepatektomie, PHx) ohne die verbleibenden Lappen zu beschädigen. In den folgenden Tagen vergrößern sich diese Lappen, um die resezierten funktionell zu ersetzen. Dieser Vorgang dauert bei Nagetieren 5 – 7 Tage, beim Menschen 8 – 15 Tage [Michalopoulos, 2007]. Im Vergleich zu anderen Methoden, in denen Lebergifte wie z. B. Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) verwendet werden, induziert die Hepatektomie nur eine eingeschränkte Entzündungsreaktion und schädigt auch nicht das verbleibende Lebergewebe [Michalopoulos and DeFrances, 1997]. Für die Wachstumsregulation scheint nicht die Lebermasse, sondern das Verhältnis von Lebermasse zu Körpermasse entscheidend zu sein. Ein für den Empfänger zu kleines Transplantat wächst auf die entsprechende Größe an, während ein für die Körpermasse des Empfängers zu großes Transplantat nach der Transplantation kleiner wird [Francavilla *et al.*, 1994].

Morphologische Zeichen der Leberregeneration sind eine Zunahme der Zellproliferation und der Mitosezahl. Die normalerweise nicht proliferierenden Hepatozyten sind in der Lage, nach Erhalt eines Stimulus zu proliferieren, aber auch hepatische Stammzellen proliferieren und differenzieren zu unterschiedlichen Zelltypen [Strain and Crosby, 2000]. Als Stammzellen gelten die ovalen Zellen, die in den Hering-Kanälen, d. h. in der Übergangszone zwischen periportalen Hepatozyten und Gallengangepithelien lokalisiert sind, aber auch die hepatischen Sternzellen zeigen einen Stammzellcharakter [Kordes *et al.*, 2013]. Oval-Zellen proliferieren und differenzieren nach einer Leberschädigung vor allem dann, wenn die Hepatozyten an der Proliferation gehindert werden [Alison, 1998].

Die Leberregeneration beginnt periportal [Rabes, 1977] und setzt sich nach zentral fort. Als letztes teilen sich die Hepatozyten um die Zentralvene [Gebhardt *et al.*, 2007]. Die

Hepatozyten sind die ersten Leberzellen, die nach einer PHx beginnen, zu proliferieren. Erst Stunden später beginnen auch die anderen Zellen mit der Zellteilung. Dieser Ablauf der Zellregeneration legt nahe, dass Wachstumsfaktoren produzierende Leberzellen die anderen Zellen der Leber zur Teilung stimulieren [Michalopoulos and DeFrances, 1997]. Nach einem adäquaten Stimulus verlassen 95 % der Hepatozyten das G_0 -Stadium und durchlaufen innerhalb von 48 h den Mitosezyklus. Die Leberteileresektion bewirkt eine schnelle Induktion von mehr als 100 Genen, welche in der gesunden Leber nicht exprimiert werden [Taub, 1996]. Diese Gene steuern direkt oder indirekt den Eintritt der Hepatozyten in die G_1 -Phase und ermöglichen es der Leber trotz verminderten Volumens die metabolische Homöostase aufrechtzuerhalten [Michalopoulos, 2007]. Bevor Hepatozyten replizieren und auf Wachstumsfaktoren antworten können, müssen sie zunächst in einen Zustand „replikativer Kompetenz“ (*priming*) versetzt werden. In dieser Phase nach PHx exprimieren die Leberzellen zunächst wachstumsassoziierte Protoonkogene wie *c-fos*, *c-jun* und *c-myc*, welche aufgrund der frühen Expression als *immediate early genes* bezeichnet werden [Fausto, 2000]. Sie benötigen für ihre Aktivierung keine Proteinsynthese und ihre Expression ist reversibel. Die von den *immediate early genes* kodierten Proteine fungieren als Transaktivatoren anderer Gene, die für die weitere Progression der Hepatozyten im Zellzyklus verantwortlich sind. Die zweite Phase der Genexpression nach PHx ist durch die Expression von *delayed early genes* (z. B. Bcl-x) und Zellzyklus-Genen charakterisiert. Zu den Zellzyklus-Genen gehören p53, mdm2, p21, Cyclin und Cyclin-abhängige Kinasen (Abbildung 1.2). Cyclin D1 ist der wichtigste Marker der Progression im Zellzyklus. Seine Induktion zeigt den Eintritt in die S-Phase an. Auch Zellzyklus-Repressoren wie p53, p21 und TGF β werden nach Teilhepatektomie aktiviert.

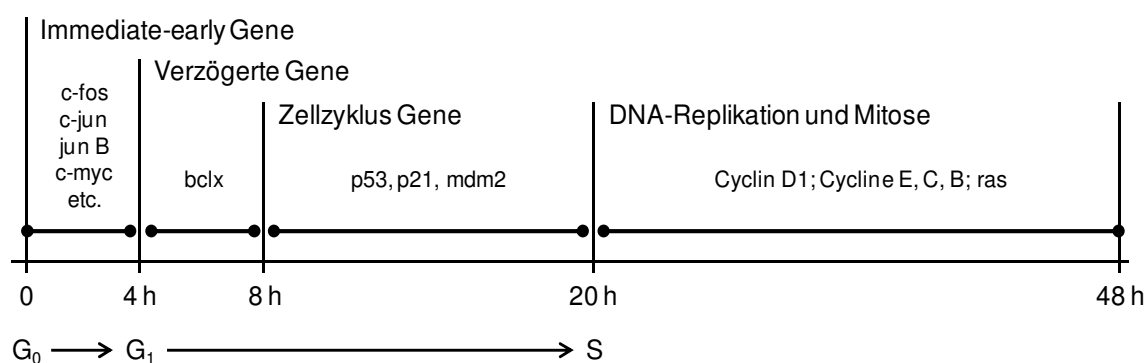


Abbildung 1.2: Zeitlicher Ablauf der Genaktivierung in der regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie

Nach PHx werden zunächst die Immediate-early Gene aktiviert, gefolgt von den verzögerten Genen und den Zellzyklus Genen. Am Ende der Regenerationsphase werden die Gene aktiviert, die für die Mitose benötigt werden. Nach [Fausto, 2000].

Die Expression der frühen und verzögerten Gene führt noch nicht zu einer DNA-Replikation, diese tritt erst ein, wenn die Zellen in den Zellzyklus eintreten bzw. den Restriktionspunkt überschritten haben. Der Fortschritt durch den Zellzyklus wird durch Wachstumsfaktoren wie *hepatocyte growth factor* (HGF) und *transforming growth factor α* (TGF α) bewirkt, welche auch die DNA-Synthese der Hepatozyten stimulieren. Der Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6) gehören zu den wichtigsten Komponenten der frühen Signaltransduktion, welche die Leberregeneration initiieren [Fausto, 2000]. TNF α fördert das *Priming*, ist aber kein komplettes Mitogen und ist somit nicht in der Lage, die Zellen zur Proliferation anzuregen.

Voraussetzung für eine ungestörte Leberregeneration ist die Rekrutierung von Leukozyten, welche abhängig von dem intrazellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) ist [Selzner *et al.*, 2003]. ICAM-1 wird von Endothelzellen, Makrophagen und Leukozyten exprimiert und kann durch TNF α und IL-1 β induziert werden [Menger *et al.*, 1999]. Außerdem vermittelt es die Rekrutierung von Neutrophilen zum Ort der Entzündung. Nach PHx reguliert ICAM-1 die Hepatozytenproliferation, indem es die Produktion von TNF α und IL-6 in den Kupffer-Zellen reguliert. Fehlt ICAM-1, ist die Leberregeneration gestört [Selzner *et al.*, 2003]. Zudem belegen mehrere Arbeiten, dass Makrophagen vor allem in der frühen Phase der Leberregeneration eine wichtige Rolle spielen. Eine Depletion der Makrophagen führt zu einer Inhibierung der Hepatozytenproliferation [Abshagen *et al.*, 2007; Meijer *et al.*, 2000]. Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsort spielt neben der Eliminierung von Pathogenen zudem eine wichtige Rolle in der Beseitigung apoptotischer Zellen, auch wenn hierdurch der Gewebsschaden zunächst größer wird [Vega *et al.*, 1999].

1.2.1 Regulatoren des Leberwachstums

Die Regulatoren des Leberwachstums können in drei Gruppen eingeteilt werden: die kompletten Leberzellmitogene, die komitogenen Wachstumsfaktoren und die Wachstumsinhibitoren. Komplette Mitogene können die DNA-Synthese und Mitose in kultivierten Hepatozyten stimulieren, wie der *epidermal growth factor* (EGF), TGF α , HGF und der *fibroblast growth factor* (FGF). Komitogene haben keinen direkten proliferativen Effekt auf kultivierte Hepatozyten. Sie verstärken den Effekt der kompletten Mitogene und vermindern die inhibitorische Wirkung von Wachstumshemmern. Zu den Komitogenen gehören unter anderem Insulin, Glukagon, Prostaglandine und Zytokine wie TNF α und IL-

6. Zu den Inhibitoren der Leberregeneration zählen TGF β und IL-1 β [Michalopoulos, 1990].

Eine der frühesten biochemischen Veränderungen ist die erhöhte Aktivität des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (uPA) fünf Minuten nach PHx, welcher für eine Aktivierung der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix verantwortlich ist [Michalopoulos, 2007]. Ebenfalls an der Umstrukturierung beteiligt ist die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9), deren Aktivierung 30 Minuten nach PHx beobachtet werden kann [Kim *et al.*, 2000]. In der Matrix der Leber sind viele Wachstumsfaktoren wie HGF gebunden, welche durch die MMP9 aus der Matrix gelöst und durch uPA aktiviert werden [Mars *et al.*, 1995; Mars *et al.*, 1993]. Durch die erhöhte Verfügbarkeit von aktiviertem HGF kommt es zur Ligandenvermittelten Aktivierung des entsprechenden Rezeptors cMet innerhalb von 30 – 60 Minuten nach PHx [Stolz *et al.*, 1999]. Zusätzlich steigen innerhalb der ersten Stunde die Konzentration von TGF β und der Hyaluronsäure im Serum an, welche ebenfalls aus der Leber stammen [Michalopoulos and DeFrances, 1997]. TGF β 1 ist ein bekannter Inhibitor der Mitose [Houck *et al.*, 1988], welcher in der gesunden Leber vermutlich die Aufgabe hat, die an die Matrix gebundenen Wachstumsfaktoren in ihrer Wirkung zu neutralisieren und die Zellen in der G₀-Phase zu halten [Michalopoulos, 2007]. Die Umstrukturierung der Matrix nach PHx verschiebt dieses Gleichgewicht zwischen Mitogenen und Inhibitoren durch die Freisetzung und Aktivierung von HGF und die gleichzeitige Verlagerung von TGF β 1 in den Blutstrom, wo es von α -2-Makroglobulin inaktiviert wird [LaMarre *et al.*, 1991]. Mit der Aktivierung des HGF-Rezeptors wird auch der Rezeptor des *epidermal growth factors* (EGFR) aktiviert [Stolz *et al.*, 1999]. Die Aktivität dieser beiden Rezeptoren wird durch die ebenfalls ansteigende Norepinephrinkonzentration noch verstärkt [Cruise *et al.*, 1985]. Zusätzlich steigen die Konzentrationen von TNF α [Yamada and Fausto, 1998], Gallensäuren [Huang *et al.*, 2006], IL-6 [Cressman *et al.*, 1996] und Serotonin [Lesurtel *et al.*, 2006].

Neben den beschriebenen extrazellulären Vorgängen gibt es auch Veränderungen innerhalb der Zellen. 15 – 30 Minuten nach PHx erscheinen β -Catenin [Monga *et al.*, 2001] und die Notch-1 intrazelluläre Domäne (NICD) [Kohler *et al.*, 2004] im Zellkern der Hepatozyten. Ebenfalls innerhalb der ersten Stunde werden die Transkriptionsfaktoren *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) und *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B) aktiviert [Cressman *et al.*, 1995; FitzGerald *et al.*, 1995]. STAT3 und NF- κ B werden dann in den Zellkern transportiert, wo sie die Expression der *immediate early genes* aktivieren [Michalopoulos and DeFrances, 1997].

In Abbildung 1.3 ist die zeitliche Abfolge von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zusammengefasst, die als „Start- und Stopp-Signale“ die Leberregeneration steuern [Mohammed and Khokha, 2005].

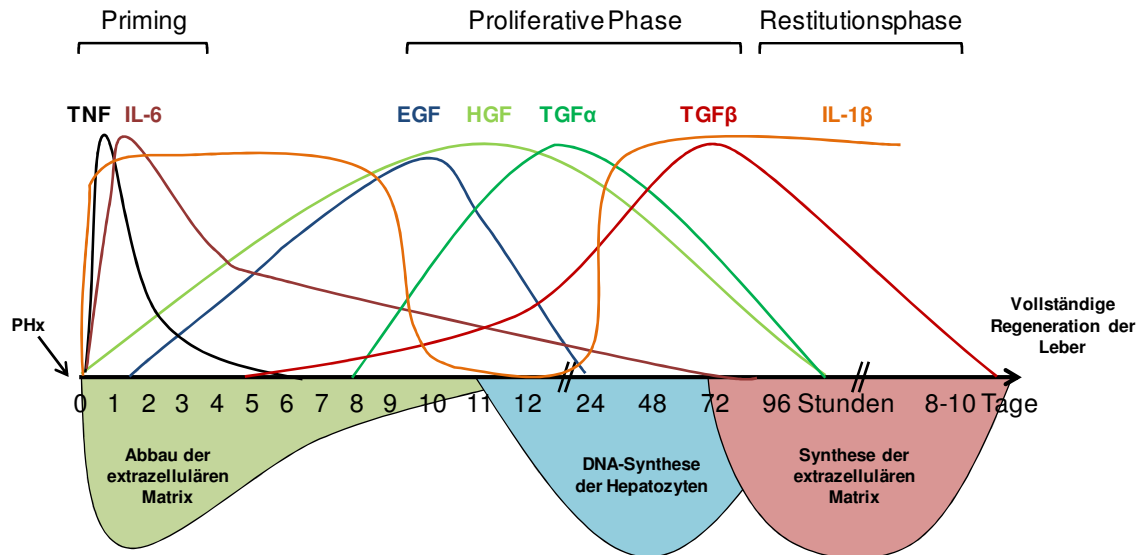


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Start- und Stopp-Signale während der Leberregeneration

Die Proliferation der Hepatozyten im Rahmen der Leberregeneration beinhaltet den Zytokin-induzierten Übergang von der G_0 - in die G_1 -Phase, gefolgt von einem Wachstumsfaktor-gesteuerten Durchlauf des Zellzyklus. Das Hepatozyten-Wachstum wird durch TGF β und IL-1 β wieder gestoppt. Modifiziert nach [Mohammed and Khokha, 2005].

Auch die Beendigung der Leberregeneration, also die Rückführung der beteiligten Zellen in die G_0 -Phase, ist ein komplex regulierter Ablauf. Hier spielen die Mitglieder der TGF β -Familie eine wichtige Rolle. Zusammen mit IL-1 β beenden sie die Leberregeneration [Mohammed and Khokha, 2005]. TGF β wird vier Stunden nach PHx induziert und erreicht das Konzentrationsmaximum etwa 48–72 Stunden nach PHx. Die sich teilenden Hepatozyten sind aufgrund einer verminderten Expression der entsprechenden Rezeptoren unempfindlich gegenüber TGF β [Chari *et al.*, 1995]. IL-1 β wird in zwei Phasen nach PHx exprimiert. Das erste Mal in der Präproliferativen Phase direkt nach PHx und ein zweites Mal am Ende der DNA-Synthese. IL-1 β reduziert die DNA-Synthese in den Hepatozyten [Boulton *et al.*, 1997]. Der Abschluss der Leberregeneration ist durch einen Rückgang der Hepatozytenproliferation gekennzeichnet, zusammen mit einer Vermehrung der Kupffer- und Ito-Zellen sowie der Sinusendothelzellen.

Einige der wichtigsten und in dieser Arbeit verwendeten Parameter der Leberregeneration werden im Folgenden näher dargestellt.

1.2.1.1 *Hepatocyte Growth Factor (HGF)*

HGF ist ein multifunktionelles Zytokin, welches ein breites Wirkungsspektrum sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen besitzt [Higashio *et al.*, 1990]. Ursprünglich wurde HGF aus Rattenserum nach partieller Hepatektomie isoliert, wo es eine wichtige regulatorische Funktion bei der Leberzellregeneration ausübt [Nakamura *et al.*, 1984]. HGF ist in der Matrix der Leber lokalisiert und wird sowohl von den Sternzellen [Schirmacher *et al.*, 1993] als auch den Sinusoidalen Endothelzellen produziert [LeCouter *et al.*, 2003]. Die Vermittlung der HGF-Signale an die Zielzellen erfolgt über seinen Rezeptor MET, das c-met Protoonkogen-Produkt [Weidner *et al.*, 1993]. Dieser Rezeptor wird von den meisten Epithelzellen, Endothelzellen und Neuronen exprimiert [Naldini *et al.*, 1991]. HGF ist ein direktes Mitogen und scheint von allen an der Leberregeneration beteiligten Faktoren eines der wichtigsten zu sein [Michalopoulos, 2007]. Ein Fehlen von HGF oder cMet führt in Mäusen zu einer unterentwickelten Leber und somit zum Tod der Embryonen [Borowiak *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 1995]. Nach einer PHx wird HGF durch die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) aus der Matrix gelöst und aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Plasminogen durch uPA aktiviert. In den ersten Stunden nach der PHx stammt das gesamte HGF aus der extrazellulären Matrix. Erst nach drei Stunden beginnt die Synthese von neuem HGF [Pediaditakis *et al.*, 2001], welche u.a. durch IL-6 und Norepinephrin stimuliert wird [Brotten *et al.*, 1999].

1.2.1.2 *Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)*

TNF α ist eines der frühesten Zytokine, die nach PHx induziert werden. Es ist kein direktes Mitogen, sondern verstärkt den Effekt der direkten Mitogene [Webber *et al.*, 1998]. TNF α wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet, in der Leber also von den Kupffer-Zellen [Michalopoulos, 2007]. Es stimuliert die Produktion anderer Zytokine, wie z. B. IL-6 und IL-10, welches die TNF α -Expression wieder herunter reguliert. Über die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 werden die Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF- κ B aktiviert [Mohammed and Khokha, 2005]. Lässt sich NF- κ B nicht aktivieren, erfolgt als Antwort auf TNF α die Apoptose der Hepatozyten [Imose *et al.*, 2003]. Die wichtige

Bedeutung von TNF α für die Leberregeneration wurde in mehreren Arbeiten bestätigt. So führt die Injektion von TNF α antagonisierenden Antikörpern vor PHx zu einer verminderten Proliferation der Hepatozyten [Akerman *et al.*, 1992] und der Verlust des TNF-R1 zu einer verspäteten Leberregeneration sowie einer erhöhten Mortalität [Yamada *et al.*, 1997].

1.2.1.3 *Epidermal Growth Factor (EGF)*

Der *epidermal growth factor* ist ein potentes Mitogen für epitheliale und mesenchymale Zellen. Er stimuliert die DNA-Synthese durch direkte Interaktion mit nukleären Strukturen [Marti *et al.*, 1989]. EGF wird kontinuierlich von den Brunner'schen Drüsen des Duodenums und von den Speicheldrüsen produziert und der Leber über die Pfortader zugeführt [Jones *et al.*, 1995; Skov Olsen *et al.*, 1988]. Die partielle Hepatektomie führt zu einem Anstieg der EGF-Konzentration im verbleibenden Lebergewebe. Zusätzlich werden die Brunner'schen Drüsen durch Norepinephrin, welches ebenfalls nach PHx induziert wird, zur vermehrten Produktion von EGF stimuliert [Skov Olsen *et al.*, 1988]. Die Signalweiterleitung von EGF erfolgt zunächst über vier Rezeptoren der EGF-Rezeptor-Familie, der ErbB-Familie (*avian erythroblastosis oncogene B*) [Oda *et al.*, 2005], hierbei insbesondere über EGFR und ErbB2, welche als Heterodimere vorliegen.

1.2.1.4 *Transforming Growth Factor beta (TGF β)*

TGF β ist ein potentes wachstumshemmendes Zytokin, das nach PHx vorübergehend die Hepatozytenproliferation vermindert. Es wird in der Leber überwiegend von den hepatischen Sternzellen produziert [Ikeda *et al.*, 1998], aber auch von den Sinusoidalen Endothelzellen [Mohammed and Khokha, 2005]. Neben seiner Aufgabe in der Beendigung der Leberregeneration stimuliert TGF β die Synthese verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix [Roberts *et al.*, 1992].

1.2.1.5 *Interleukin 1 beta (IL-1 β)*

IL-1 β ist ein hochwirksames Zytokin, welches hauptsächlich von Monozyten sezerniert wird, in der Leber durch die Kupffer-Zellen [Ramadori and Armbrust, 2001]. Es wird als inaktives Vorläuferprotein synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert [Black

et al., 1988]. Die Synthese der Vorläuferproteine wird durch Toll-*like* Rezeptor (TLR) Agonisten initiiert. Die meisten dieser Vorläuferproteine befinden sich dann im Zytosol, ein Teil wandert jedoch in spezielle sekretorische Lysosomen, wo das IL-1 β -Vorläuferprotein mit der Procaspase-1 zusammen kommt. Von dieser wird mit Hilfe des IL-1 β -Inflammasoms die aktive Caspase-1 abgespalten, welche dann das aktive IL-1 β vom Vorläuferprotein abtrennt [Snodgrass *et al.*, 2013].

IL-1 β wirkt über den Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 (IL1R1), dessen Expression kaum reguliert wird. Seine Aktivierung wird jedoch durch den Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL1Ra) aufgehoben. Der Rezeptor wird also durch das Gleichgewicht zwischen IL-1 und IL1Ra reguliert [Dinarello, 2009]. Die Freisetzung von IL-6 wird durch IL-1 β reguliert [Dinarello, 2007], wodurch IL-1 β ein wichtiger Regulator der Leberregeneration ist.

1.3 Proteinbiosynthese

Bis zu 25 % der gesamten Proteinsynthese eines Organismus findet in der Leber statt [Elsner *et al.*, 1994]. In der regenerierenden Leber kann 12 – 36 Stunden nach partieller Hepatektomie ein Anstieg der Proteinsynthese beobachtet werden [Mezey, 1982]. Einerseits werden Proteine für die Wiederherstellung der Leber benötigt, andererseits müssen die StoffwechsellLeistungen von den verbleibenden Leberzellen aufrechterhalten werden.

Die Proteinsynthese beginnt zunächst mit der Transkription, gefolgt von der Translation. Bei der Transkription wird die für die Translation benötigte RNA synthetisiert: die messenger RNA (mRNA), die transfer RNA (tRNA) und die ribosomale RNA (rRNA). Die Translation kann in drei Schritte eingeteilt werden, die Initiation, die Elongation und die Termination. Die Initiationsphase beginnt mit der Bindung des Translations-Initiationsfaktors 4E (eIF4E) an die 5'-Cap-Struktur der mRNA, wodurch die mRNA an die 40S Untereinheit des Ribosoms bindet. Die 40S Untereinheit wandert an der mRNA entlang, bis sie das Start-Codon erreicht. Dort wird zusammen mit der 60S Untereinheit des Ribosoms und der Methionin-tRNA der Initiationskomplex gebildet. Die Elongation beginnt damit, dass eine Aminoacyl-tRNA in die leere A-Stelle des Ribosoms eingefügt wird. Dieser Vorgang geschieht mit Hilfe des Elongationsfaktors eEF1 und benötigt Guanosintriphosphat (GTP). Im nächsten Schritt verbindet die Peptidyltransferase die Aminosäuren der tRNA-Moleküle in der P- und der A-Stelle des Ribosoms und das Ribosom wandert schließlich an der mRNA drei Nukleotide weiter. Dieser Schritt wird durch den Elongationsfaktor eEF2 und GTP katalysiert. Die A-Stelle ist nun wieder frei und eine neue Aminoacyl-tRNA kann eingefügt werden. Beim Erreichen eines Stoppcodons wird die Translation durch Bindung eines Freisetzungsfaktors abgebrochen (Termination) und nach kurzer Zeit wird der ganze Komplex aufgelöst [Berg *et al.*, 2007]. Der Elongationsfaktor EF2 reguliert die Verlängerung der wachsenden Proteine und ist alleine verantwortlich für die Translokation der Ribosomen zum nächsten Codon. Wird EF2 durch Phosphorylierung durch die EF2-Kinase inhibiert, kann keine Proteinsynthese stattfinden [Sivan *et al.*, 2007]. EF2 ist somit essentiell für die Proteinsynthese.

1.4 Chemokine

Chemokine sind eine Familie chemotaktischer Zytokine, die die Migration verschiedener Zellen sowie deren Differenzierung und Lokalisation im Gewebe regulieren [Nomiya *et al.*, 2010]. Die Zellen wandern dabei entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. Es lassen sich inflammatorische und homöostatische Chemokine unterscheiden [Fernandez and Lolis, 2002]. Inflammatorische Chemokine sind induzierbar und werden nur nach einer Verletzung, Infektion oder Entzündung produziert. Ihre Freisetzung lockt Immunzellen an, welche die Immunantwort und die Wundheilung aktivieren. Zu den wichtigsten inflammatorischen Chemokinen gehören CXCL1, CXCL2 und CXCL8. Die homöostatischen Chemokine hingegen werden kontinuierlich produziert und sind an der Organisation von lymphoiden Organen beteiligt. Zu ihnen gehören u.a. CCL19, CCL21 und CXCL12. Die ungefähr 50 verschiedenen Chemokine werden von Immunzellen und vielen Gewebezellen produziert.

1.4.1 Struktur und Nomenklatur

Die Chemokine sind kleine Proteine mit einer molaren Masse von 8 – 12 kDa, deren Aminosäuresequenz eine Homologie von weniger als 20 % oder auch mehr als 90 % aufweisen kann. Die Tertiärstruktur ist hingegen sehr ähnlich [Allen *et al.*, 2007]. Die drei β -Faltblätter sind antiparallel zueinander angeordnet und durch flexible Schleifen (30s und 40s) miteinander verbunden. Das dritte β -Faltblatt ist über eine 50s Schleife an die C-terminale α -Helix gebunden (Abbildung 1.4). Die Chemokinstruktur wird durch zwei Disulfidbrücken und hydrophobe Interaktionen der α -Helix mit dem β -Faltblatt stabilisiert [Fernandez and Lolis, 2002].

Die Position der Cysteinreste am amino-terminalen Ende teilt die Chemokine in vier Gruppen ein, welche auch die Nomenklatur der Chemokine bestimmt: C, CC, CXC und CX₃C (C: Cystein, X: jede beliebige Aminosäure) [Zlotnik and Yoshie, 2000]. Bei den CC-Chemokinen folgen zwei Cysteine direkt aufeinander, bei den CXC- und CX₃C-Chemokinen sind sie durch eine bzw. drei beliebige Aminosäuren voneinander getrennt. Die Chemokine der C-Familie besitzen dagegen nur ein Cystein am amino-terminalen Ende (Abbildung 1.5). Die CX₃C-Chemokine sind die einzigen, die über ihre Muzin-ähnliche Domäne an die Zellmembran binden können [Bazan *et al.*, 1997].

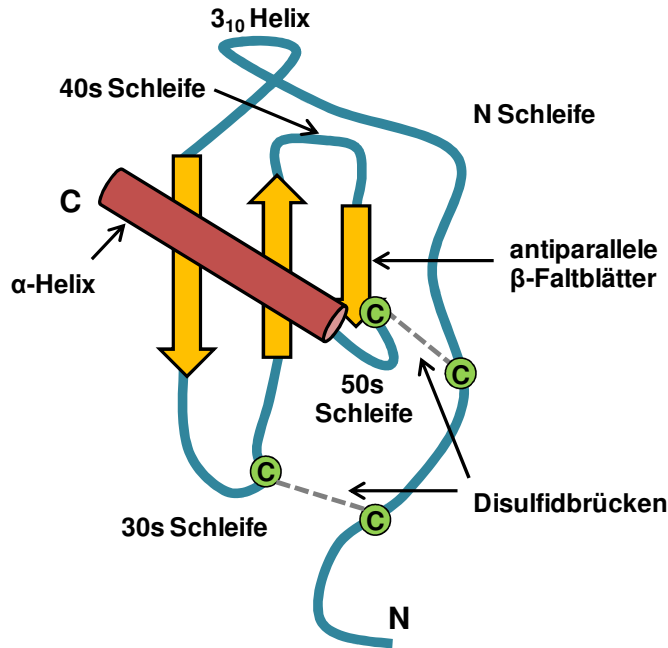


Abbildung 1.4: Dreidimensionale Struktur der Chemokine

Die drei β -Faltblätter sind antiparallel zueinander angeordnet und durch 30s bzw. 40s Schleifen miteinander verbunden. Das dritte β -Faltblatt ist über eine 50s Schleife an die C-terminale α -Helix gebunden. (C: carboxy-terminales Ende; N: amino-terminales Ende, C im Kreis: Cystein). Modifiziert nach [Fernandez and Lolis, 2002].

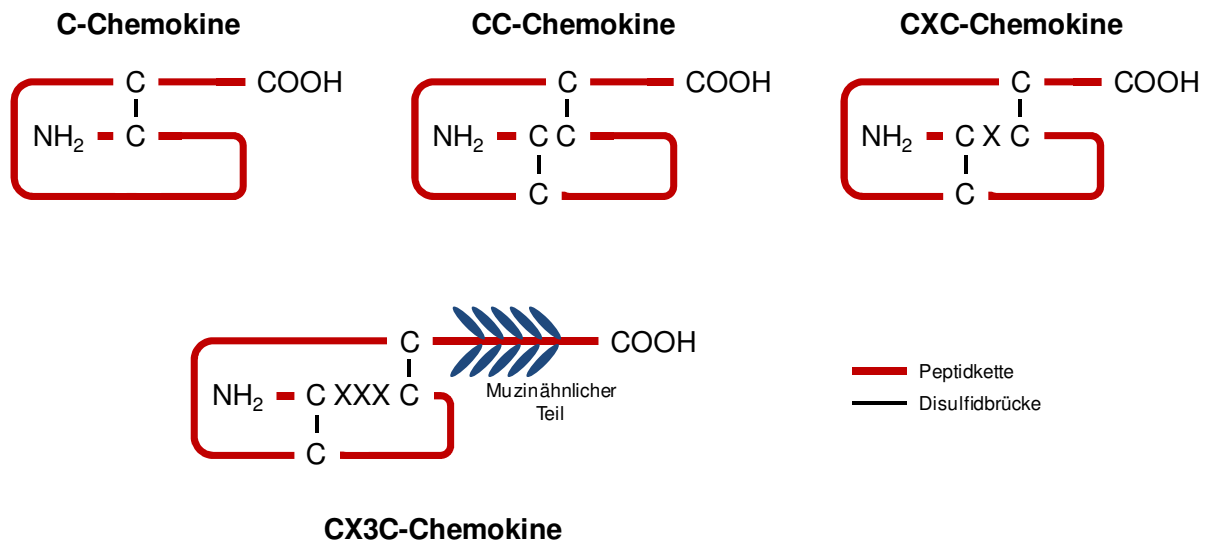


Abbildung 1.5: Struktur der Chemokin-Familien

Die Chemokine unterteilen sich anhand von Cysteinstrukturen am amino-terminalen Ende in vier Familien (C, CC, CXC, CX3C). Modifiziert nach [Townson and Liptak, 2003].

C-Familie: Die Familie der humanen C-Chemokine besteht aus zwei Chemokinen, XCL1 und XCL2. Beide binden an den Rezeptor XCR1 [Zlotnik and Yoshie, 2000]. In der Maus ist nur XCL1 (Lymphotaktin) bekannt. C-Chemokine werden von aktivierten CD8⁺-T-Lymphozyten sowie Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert und beeinflussen das Verhalten von T- und B-Lymphozyten, Neutrophilen und NK-Zellen [Townson and Liptak, 2003].

CC-Familie: Die CC-Familie ist die größte Chemokinfamilie. Beim Menschen hat sie 28 Mitglieder, bei der Maus 23 [Zlotnik and Yoshie, 2012]. Über zehn Rezeptoren werden die Chemokinsignale weitergeleitet. Sie werden von Monozyten, Neutrophilen, Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten produziert und wirken auf die selbigen.

CXC-Familie: Die 17 CXC-Chemokine des Menschen (15 in der Maus) werden anhand der An- oder Abwesenheit einer bestimmten Aminosäuresequenz weiter unterteilt. Dieses sogenannte ELR-Motiv besteht aus der Aminosäureabfolge Glutaminsäure, Leucin und Arginin [Clark-Lewis *et al.*, 1993]. ELR⁺ Chemokine fördern die Angiogenese und Zellproliferation, während ELR⁻ Chemokine hemmend wirken [Strieter *et al.*, 1995]. Zu den ELR⁺ Chemokinen gehören u.a. CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL8. Sie binden an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2. ELR⁻ Chemokine sind z. B. CXCL4, CXCL9, CXCL10 und CXCL11, welche über die Rezeptoren CXCR3-7 wirken [Van Sweringen *et al.*, 2011]. Die CXC-Chemokine werden von Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen produziert und bewirken vor allem die Migration neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten [Townson and Liptak, 2003].

CX3C-Familie: Das einzige Mitglied dieser Familie, Fraktalkin (human) bzw. Neurotaktin in Mäusen, existiert in zwei Formen: Membran-gebunden oder als lösliches 95 kDa Glykoprotein [Bazan *et al.*, 1997]. Es wird von Makrophagen, Dendritischen Zellen und Epithelzellen produziert, die membranständige Variante wird auf aktivierten Endothelzellen exprimiert. Fraktalkine wirken über den Rezeptor CX3CR1 auf T-Lymphozyten, Monozyten und Leukozyten.

Auch wenn die Maus oft als Modellorganismus für den Menschen verwendet wird, gibt es bei den Chemokinen große Unterschiede zwischen Maus und Mensch [Zlotnik *et al.*, 2006]. So gibt es Chemokine im Menschen, die in der Maus nicht vorkommen, wie CXCL8, CCL13 und CCL14, während CXCL15 in der Maus vorhanden ist, aber nicht im Menschen (siehe Tabelle 1.1). Von einigen Chemokinen gibt es in der einen Spezies mehr Variationen als in der anderen (z. B. CCL3, CCL4, CCL27). Manche Chemokine sind in

den verschiedenen Spezies ähnlich, werden aber aufgrund der strukturellen oder funktionellen Unterschiede anders benannt [Zlotnik *et al.*, 2006].

Tabelle 1.1: Zusammenstellung humaner und muriner Chemokine [nach Zlotnik and Yoshie, 2012]

Systematischer Name	Gen-Symbol		Alternativer Name		Rezeptor
	human	murin	human	murin	
CXC-Familie					
CXCL1	<i>CXCL1</i>	<i>Cxcl3</i>	GRO α	Gm1960	CXCR2
CXCL2	<i>CXCL2</i>	<i>Cxcl2</i>	GRO β	MIP-2	CXCR2
CXCL3	<i>CXCL3</i>	<i>Cxcl1</i>	GRO γ	KC	CXCR2
CXCL4	<i>PF4</i>	-	PF4		CXCR3-B
CXCL4L1	<i>PF4V1</i>	<i>Pf4</i>	PF4V1		CXCR3-B
CXCL5	<i>CXCL5</i>	-	ENA78		CXCR2
CXCL6	<i>CXCL6</i>	<i>Cxcl5</i>	GCP2	LIX	CXCR1/2
CXCL7	<i>PPBP</i>	<i>Ppbp</i>	NAP-2		CXCR1/2
CXCL8	<i>IL-8</i>	-	IL-8		CXCR1/2
CXCL9	<i>CXCL9</i>	<i>Cxcl9</i>	MIG		CXCR3
CXCL10	<i>CXCL10</i>	<i>Cxcl10</i>	IP-10		CXCR3
CXCL11	<i>CXCL11</i>	<i>Cxcl11</i>	I-TAC		CXCR3/7
CXCL12	<i>CXCL12</i>	<i>Cxcl12</i>	SDF-1		CXCR4/7
CXCL13	<i>CXCL13</i>	<i>Cxcl13</i>	BLC, BCA-1		CXCR3/5
CXCL14	<i>CXCL14</i>	<i>Cxcl14</i>	BRAK		unbekannt
-	-	<i>Cxcl15</i>		Lungkine, Weche	unbekannt
CXCL16	<i>CXCL16</i>	<i>Cxcl16</i>	SR-PSOX		CXCR6
CXCL17	<i>CXCL17</i>	<i>Cxcl17</i>	DMC		unbekannt
CC-Familie					
CCL1	<i>CCL1</i>	<i>Ccl1</i>	I-309	TCA-3	CCR8
CCL2	<i>CCL2</i>	<i>Ccl2</i>	MCP-1	JE	CCR2
CCL3	<i>CCL3</i>	<i>Ccl3</i>	MIP-1 α , LD78 α		CCR1/5
CCL3L1	<i>CCL3L1</i>	-	LD78 β		CCR1/3/5
CCL3L3	<i>CCL3L3</i>	-	LD78 β		
CCL4	<i>CCL4</i>	<i>Ccl4</i>	MIP-1 β		CCR5
CCL4L1	<i>CCL4L1</i>	-	AT744.2		
CCL4L2	<i>CCL4L2</i>	-			
CCL5	<i>CCL5</i>		RANTES	<i>Ccl5</i>	CCR1/3/5
CCL7	<i>CCL7</i>	<i>Ccl7</i>	MCP-3	MARC	CCR1/2/3
CCL8	<i>CCL8</i>	-	MCP-2		CCR1/2/5
-	-	<i>Ccl8</i>			CCR8
CCL11	<i>CCL11</i>	<i>Ccl11</i>	Eotaxin		CCR3/5
-	-	<i>Ccl12</i>	-	MCP-5	
CCL13	<i>CCL13</i>	-	MCP-4		CCR2/3
CCL14	<i>CCL14</i>	-	HCC-1		CCR1/3/5
CCL15	<i>CCL15</i>	<i>Ccl9</i>	HCC-2	CCF18, MIP-1 γ	CCR1/3
CCL16	<i>CCL16</i>	-	LEC, HCC-4		CCR1/2/5/8
CCL17	<i>CCL17</i>	<i>Ccl17</i>	TARC	ABCD-2	CCR4
CCL18	<i>CCL18</i>	-	PARC, DC-CK1		PITPNM3
CCL19	<i>CCL19</i>	<i>Ccl19</i>	MIP-3 β , ELC		CCR7
CCL20	<i>CCL20</i>	<i>Ccl20</i>	MIP-3 α , LARC		CCR6
CCL21	<i>CCL21</i>	<i>Ccl21a</i>	SLC, 6CKine		CCR7
-	-	<i>Ccl21b</i>	-		CCR7
-	-	<i>Ccl21c</i>	-		CCR7
CCL22	<i>CCL22</i>	<i>Ccl22</i>	MDC	ABCD-1	CCR4

Systematischer Name	Gen-Symbol		Alternativer Name		Rezeptor
	human	murin	human	murin	
CCL23	<i>CCL23</i>	<i>Ccl6</i>	MPIF-1	C10	CCR1, FPRL-1
CCL24	<i>CCL24</i>	<i>Ccl24</i>	Eotaxin-2, MPIF-2		CCR3
CCL25	<i>CCL25</i>	<i>Ccl25</i>	TECK		CCR9
CCL26	<i>CCL26</i>	<i>(Ccl26)</i>	Eotaxin-3		CCR3, CX3CR1
CCL27	<i>CCL27</i>	<i>Ccl27a</i>	CTACK, ILC		CCR10
-	-	<i>Cck27b</i>	-		
CCL28	<i>CCL28</i>	<i>Ccl28</i>	MEC		CCR10/3
C-Familie					
XCL1	<i>XCL1</i>	<i>Xcl1</i>	Lymphotaktin, ATAC, SCM-1 α	Lymphotaktin	XCR1
XCL2	<i>XCL2</i>	-			XCR1
CX3C-Familie					
CX3CL1	<i>CX3CL1</i>	<i>Cx3cl1</i>	Fraktalkin	Fraktalkin, Neurotaktin	CX3CR1

1.4.2 Funktion

Die wichtigste Aufgabe der Chemokine ist die Migration von Zellen zu steuern. Dabei wandern die Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten zur Stelle der höchsten Konzentration. Einige Chemokine wirken auf Zellen des Immunsystems und regulieren die Leukozytenwanderung. Vor allem ELR⁺ CXC-Chemokine, insbesondere CXCL1, CXCL2, CXCL5 und CXCL8, spielen eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [Kolaczkowska and Kubes, 2013]. Chemokine sind auch an der Embryogenese beteiligt, indem sie die Hämatopoese, Angiogenese und Kardiogenese regulieren. Ebenso sind sie an der Entstehung von Tumoren beteiligt, da sie auch hier die Angiogenese sowie die Metastasierung und Zellproliferation kontrollieren [Savarin-Vuailat and Ransohoff, 2007].

Das Chemokinsignal wird nach Bindung der Chemokine an den Rezeptor über verschiedene Signalwege innerhalb der Zelle weitergeleitet. Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sieben Transmembranbereiche sowie je drei intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen aufweisen [Murphy *et al.*, 2000]. Die Bindung des Chemokins an den Rezeptor und die damit verbundene Aktivierung des Rezeptors erfolgt vermutlich in zwei Schritten [Fernandez and Lolis, 2002]. Zuerst bindet das Chemokin an den extrazellulären Teil des Rezeptors, gefolgt von einer Konformationsänderung des flexiblen amino-terminalen Endes des Chemokins. Danach bindet der Amino-Terminus an Bindungsstellen innerhalb der Transmembrandomänen, wodurch der

Rezeptor aktiviert wird. Die Aktivierung des Rezeptors sorgt für den Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins, wodurch es in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert [Savarin-Vuailat and Ransohoff, 2007]. Die Signalweiterleitung erfolgt nun über verschiedene Signalwege, wie der MAPK- oder PI3K/Akt-Signalweg. Um eine Überstimulation der Zellen zu vermeiden, wird der Rezeptor mit Hilfe von G-Proteingekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) und β -Arrestin wieder inaktiviert. Der Carboxy-Terminus des Rezeptors wird durch die GRK phosphoryliert, was die Affinität für β -Arrestin erhöht. Durch Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor wird eine Anbindung der G-Proteine verhindert. Die Bindung des Rezeptor-Arrestin-Komplexes an Clathrin führt mit Hilfe der GTPase Dynamin zur Internalisierung des Rezeptors in Vesikel und dem damit verbundenen Abbau des Rezeptors (Abbildung 1.6).

Chemokine können nicht nur an Rezeptoren binden, sondern auch an Glykosaminoglykane (GAG), die an der Oberfläche von Endothelzellen oder bei Proteinen der extrazellulären Matrix vorhanden sind [Kuschert *et al.*, 1999]. Durch die Bindung an GAGs werden die Chemokine in bestimmten Geweben konzentriert, da die Diffusion ins Blut verhindert wird, und es entsteht ein haptotaktischer Gradient [Mortier *et al.*, 2012]. GAGs wurden auch auf Leukozyten gefunden, wo sie die Bindung der Chemokine an den G-Proteingekoppelten Rezeptor auf derselben Zelle unterstützen. Ein Verlust der Glykosaminoglykane führt zu einer verminderten Bindungsfähigkeit vieler Chemokine [Kuschert *et al.*, 1999].

Die Interaktion der Chemokine mit den Rezeptoren ist sehr variabel. So bindet ein Rezeptor mehrere Chemokine und ein Chemokin kann mit verschiedenen Rezeptoren interagieren [Mantovani, 1999].

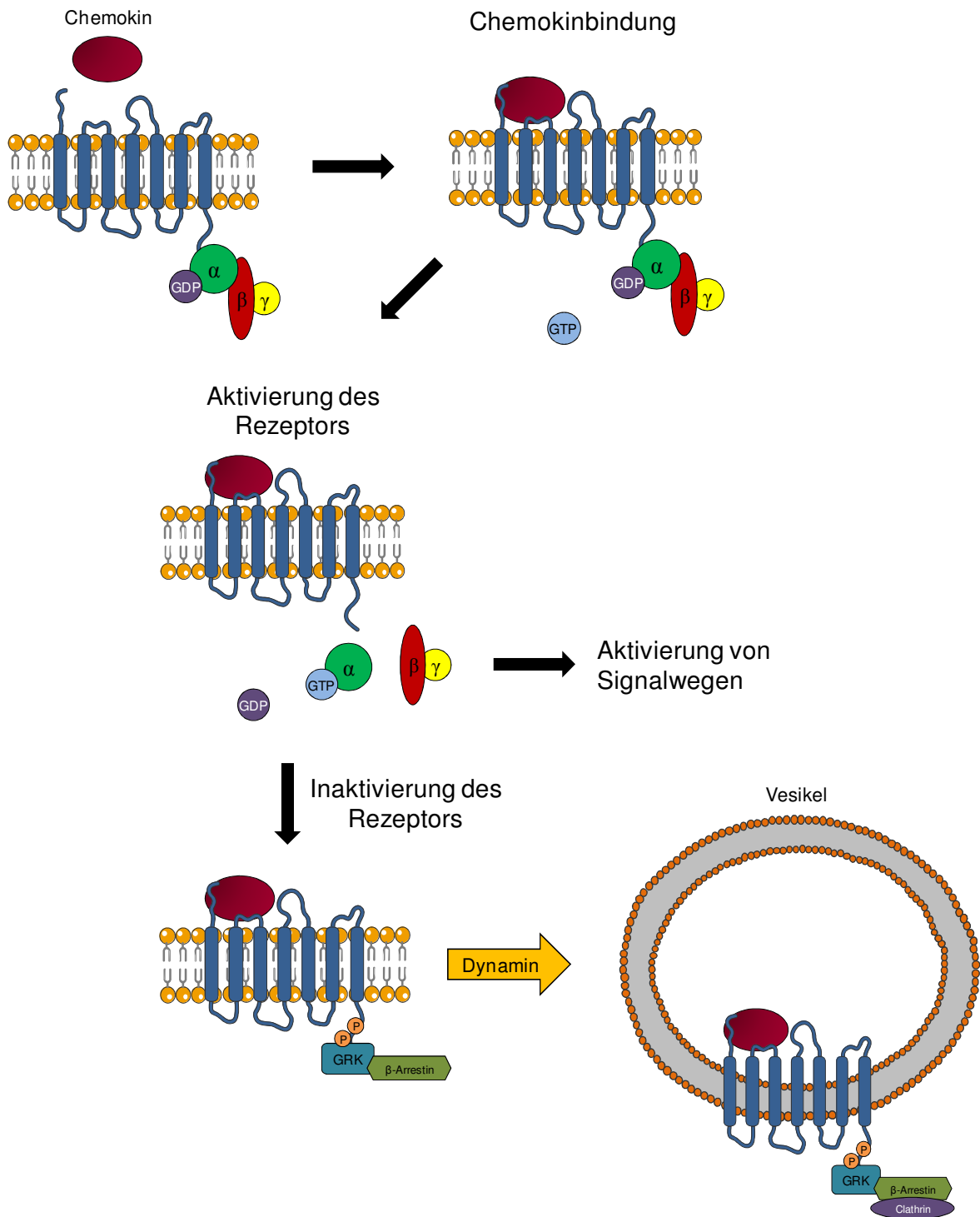


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Aktivierung des Chemokinrezeptors

Nach Bindung des Chemokins an den Rezeptor ändert dieser seine Konformation und kann als GTP-Austauschfaktor für das G-Protein fungieren. Nach Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins dissoziiert dieses in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Das Chemokinsignal wird nun ins Zellinnere weitergeleitet. Die Inaktivierung des Rezeptors startet mit der Phosphorylierung des C-terminalen Endes durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK). Nach Bindung an β -Arrestin wird mit Hilfe von Clathrin und der GTPase Dynamin der Rezeptor internalisiert und in Vesikel verpackt. Hier erfolgt der Abbau des Rezeptors. Nach [Savarin-Vuailat and Ransohoff, 2007].

Die Aktivität der Chemokine kann durch verschiedene Inhibitoren unterbunden werden. Neben monoklonalen Antikörpern können Mutationen in den Chemokinen die Aktivität inhibieren oder auch niedermolekulare Verbindungen, sogenannte *small molecules* [Fernandez and Lolis, 2002]. Eines der ersten *small molecules* wurde 1998 entdeckt und wirkt als Antagonist von CXCR2: N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N'-(2-bromophenyl)urea (SB225002) [White *et al.*, 1998]. SB225002 inhibiert die Bindung von CXCL1 und CXCL8 an CXCR2 und die dadurch induzierte Chemotaxis von Neutrophilen. Obwohl die Struktur von CXCR1 und CXCR2 sehr ähnlich ist, ist die Selektivität von SB225002 für CXCR2 über 150-fach stärker als für CXCR1.

1.4.3 Chemokine im Rahmen der Leberregeneration

Chemokine spielen auch in der regenerierenden Leber eine wichtige Rolle, jedoch hängt ihre Funktion von der Höhe der Konzentration ab [Kuboki *et al.*, 2008]. Geringe Konzentrationen von CXC-Chemokinen fördern die Leberregeneration, wohingegen große Mengen toxisch wirken und die Hepatozytenproliferation unterdrücken. Mehrere Arbeiten konnten die Relevanz ELR⁺ CXC-Chemokine für die Leberregeneration zeigen. So wurde nach partieller Hepatektomie eine erhöhte Konzentration dieser Chemokine gefunden und eine Inhibition der Chemokine oder des Rezeptors CXCR2 führte zu einer verminderten Leberregeneration [Colletti *et al.*, 1998]. Hepatozyten, die mit ELR⁺ CXC-Chemokinen stimuliert wurden, zeigten denselben Effekt, der auch durch HGF induziert wird. CXCR2 wird von den Hepatozyten konstitutiv exprimiert und durch verschiedene Zytokine hochreguliert [Hogaboam *et al.*, 1999]. CXCR1 hingegen wird in Hepatozyten Stimulus-abhängig exprimiert, zum Beispiel nach Ischämie/Reperfusion [Clarke *et al.*, 2011]. Die Signaltransduktion der Chemokine wird in den Hepatozyten vermutlich hauptsächlich über CXCR2 vermittelt, da in CXCR2-defizienten Mäusen keine Reaktion auf die Chemokine erkennbar ist [Clarke *et al.*, 2009].

1.5 Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion im Rahmen der Leberregeneration

Durch extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine oder Hormone werden verschiedene Signalwege aktiviert. Mit Hilfe von Rezeptoren werden die extrazellulären Signale von der Zelle aufgenommen und verarbeitet. Dazu bindet das Signalmolekül an den Rezeptor und durch eine Konformationsänderung wird das Signal in die Zelle weitergeleitet. Man unterscheidet G-Protein-gekoppelte und Enzym-gekoppelte Rezeptoren, wie z. B. Rezeptor-Tyrosinkinasen. Von den Rezeptoren können verschiedene Signalwege ausgehen, über die durch Protein-Interaktionen intrazelluläre Signalproteine aktiviert werden. Die Aktivität der Signalproteine kann durch Phosphorylierung mittels Kinasen bzw. Dephosphorylierung durch Phosphatasen reguliert werden. Auch die Bindung von GDP und GTP oder cyclischer Nukleotide wie cAMP reguliert die Aktivität [Lodish *et al.*, 2000].

Die wichtigsten und in dieser Arbeit untersuchten Signalwege sind der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg, der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt) Signalweg sowie der NF- κ B Signalweg. Die für diese Arbeit relevanten Faktoren der Signalwege werden im Folgenden kurz dargestellt und sind in Abbildung 1.7 zusammengefasst.

Der **MAPK Signalweg** umfasst mindestens drei aufeinander folgende Kinasen: eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K), eine MAP-Kinase-Kinase (MAP2K) und eine MAP-Kinase (MAPK), welche in dieser Reihenfolge durch Phosphorylierung aktiviert werden [Pimienta and Pascual, 2007]. Die aktivierten MAPK translozieren in den Zellkern, wo sie eine Reihe von Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so unter anderem Zellwachstum, Zellproliferation, Apoptose und Entzündungsreaktionen regulieren. Zu diesen MAPK gehören ERK1/2, welche durch die MAPKK MEK1/2 aktiviert werden, und p38, welches die MAPK-aktivierte Proteinkinase MK2 reguliert [Gaestel, 2006].

Durch die Ligandenbindung an andere Rezeptoren wird der **PI3K/Akt Signalweg** aktiviert, wodurch viele biologische Prozesse wie die Zellproliferation und Inhibierung der Apoptose reguliert werden. Nach Aktivierung der Rezeptoren wird PI3K zur Zellmembran rekrutiert und katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) [Cantley, 2002]. PIP₃ bindet Akt an die Membran, wo es durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) phosphoryliert und somit aktiviert wird [Lawlor and Alessi, 2001]. Aktiviertes Akt phosphoryliert viele weitere Proteine wie *mammalian target of rapamycin* (mTOR), I-KappaB Kinase (IKK) oder Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK-3). Die Phosphatase

PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) inhibiert den PI3K/Akt Signalweg durch Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 [Maehama and Dixon, 1998].

Eine Vielzahl inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren aktivieren den **NF-κB Signalweg**. NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor, der aktiviert wird, indem er von seinen Inhibitoren, den IκB Proteinen, gelöst wird und dann in den Zellkern translozieren kann. Eine Aktivierung des IκBα-Kinase-Komplexes (IKK), bestehend aus IKKα, IKKβ (IKK2) und IKKγ, führt zur Phosphorylierung der IκB Proteine, welche daraufhin ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut werden. Nach Translokation von NF-κB in den Zellkern werden verschiedene Zielgene aktiviert, die u.a. an Entzündungsprozessen und der Immunantwort beteiligt sind [Baldwin, 1996].

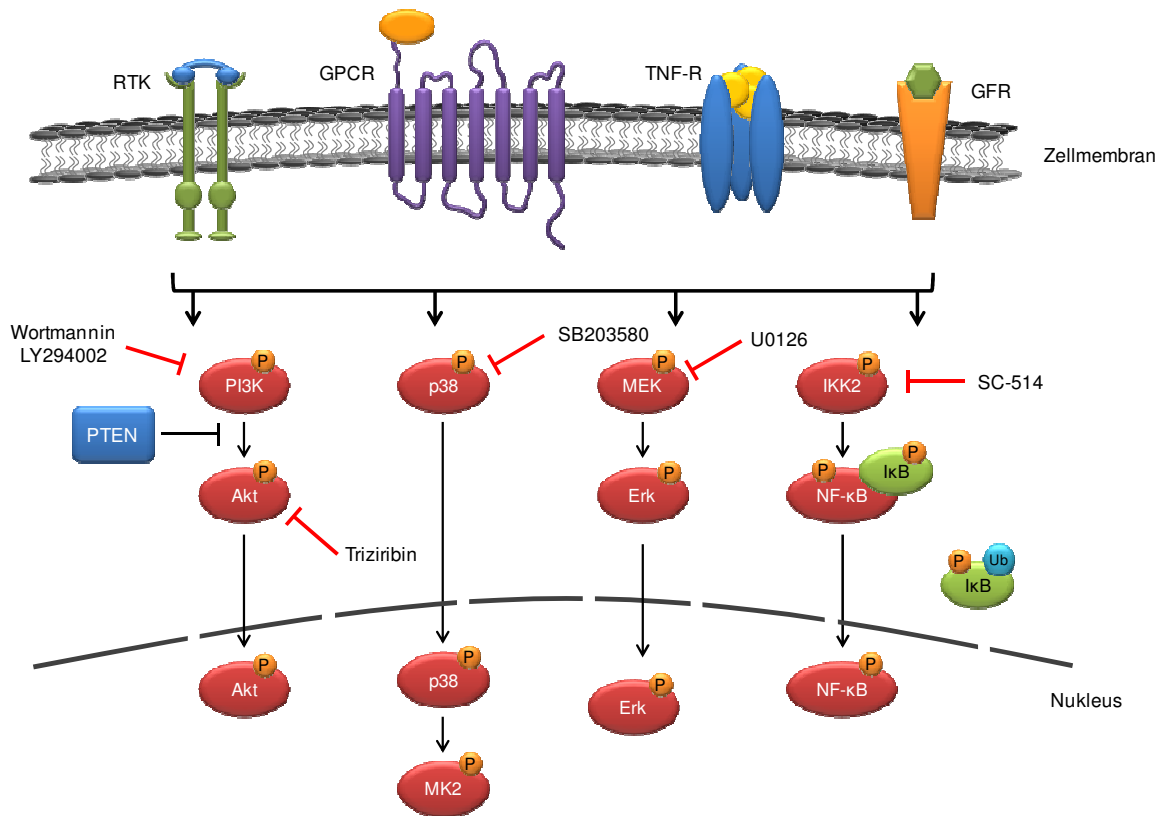


Abbildung 1.7: Komprimierte Darstellung der verschiedenen Signalwege

Nach Bindung der unterschiedlichen Liganden an den entsprechenden Rezeptor wird das Signal ins Zellinnere auf verschiedene Faktoren übertragen und in den Zellkern geleitet. Durch spezielle Inhibitoren kann die Signalweiterleitung unterbunden werden.

Abkürzungen: RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, TNF-R: TNF-Rezeptor, GFR: Wachstumsfaktor-Rezeptor

1.6 Ziel der Arbeit

Wie einleitend beschrieben, wird die Leberregeneration durch komplexe regulatorische Netzwerke gesteuert. Diese kontrollieren einerseits das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen vor Ort und regulieren andererseits die Rekrutierung bzw. Aktivierung weiterer für den Regenerationsprozess relevanten Zellen. Im Hinblick auf letzteres spielt die Freisetzung chemotaktischer Mediatoren, vor allem von Chemokinen, eine wichtige Rolle.

Führende Fragestellung dieser Arbeit war, in wie weit Hepatozyten an der Chemokin-synthese beteiligt sind, und ob regenerations-relevante Faktoren wie HGF und TNF α in der Lage sind die Produktion von Chemokinen in Hepatozyten zu induzieren. Da die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten für die Leberregeneration eine wichtige Rolle spielt, wurden vorrangig Chemokine untersucht, die für die Neutrophilenrekrutierung von Bedeutung sind. Im Vordergrund stand hierbei die Gruppe der CXCR2-Liganden. Die Regulation dieser Chemokine ist bislang wenig untersucht, so dass in der vorliegenden Arbeit zusätzlich versucht wurde, ein Modell der Regulation im Zusammenhang der Leberregeneration zu erstellen. Weiterhin wurde die Rolle der Makrophagen für die Chemokinsynthese und Neutrophilenrekrutierung untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Proteinsynthese während der Leberregeneration. Da in der regenerierenden Leber ein Anstieg der Proteinsynthese beobachtet werden kann [Mezey, 1982], sollte der Einfluss von HGF hierauf näher untersucht werden. Hierfür wurde einerseits die Aktivität des Translationsfaktors EF2 analysiert, welcher direkt an der Proteinsynthese beteiligt ist, andererseits wurde die *de novo* Proteinsynthese nach Stimulation mit HGF gemessen.

Da humane Hepatozyten nur in begrenzter Menge und Qualität zur Verfügung standen, wurden für diese Arbeit murine Zellen verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

• Aprotinin	Sigma Aldrich Chemie	München
• APS	Serva	Heidelberg
• Benzamidin	Sigma Aldrich Chemie	München
• Bradford-Protein Assay	Biorad	München
• BSA	PAA-Laboratories	Linz, Österreich
• Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich Chemie	München
• DMSO	Sigma Aldrich Chemie	München
• ECL Western Lightning	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
• Ketavet	Pfizer	New York, USA
• L-[4,5- ³ H]-Leucin	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
• Leupeptin	Sigma Aldrich Chemie	München
• NaCl (steril)	B. Braun	Melsungen
• PBS	Biochrom	Berlin
• Pefablock	Fluka	St. Gallen, Schweiz
• Polyacrylamid	Applichem	Darmstadt
• Protein Standard	Biorad	München
• Rompun	Bayer Healthcare	Leverkusen
• SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	Darmstadt
• Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
• TEMED	Sigma Aldrich Chemie	München
• Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie	München

Alle weiteren Chemikalien wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie (München) bezogen und wiesen den Reinheitsgrad *pro analysi* auf.

2.1.2 Medien, Reagenzien und Inhibitoren für die Zellkultur

- Collagen Typ I BD Biosciences San Diego, USA
- Collagenase Typ I-A Sigma Aldrich Chemie München
- Dexamethason Sigma Aldrich Chemie München
- DMEM Biochrom Berlin
- EGF R&D Systems Wiesbaden
- FCS Biochrom, Gibco Life Berlin, Karlsruhe
Technology
- Glutamin Gibco Life Technology Karlsruhe
- HGF R&D Systems Wiesbaden
- IL-1 β Jena Bioscience Jena
- LY294001 Calbiochem Darmstadt
- M-CSF Peprotech Hamburg
- PBS Biochrom Berlin
- PD98059 Calbiochem Darmstadt
- Penicillin/
Streptomycin Gibco Life Technology Karlsruhe
- SB203580 Calbiochem Darmstadt
- SB225002 Tocris Bioscience Bristol, England
- SC-514 Calbiochem Darmstadt
- TGF β Sigma Aldrich Chemie München
- TNF α Roche Mannheim
- Triziribin Calbiochem Darmstadt
- Trypsin CytoGen Sinn
- U0126 Promega Mannheim
- Williams' Medium E Biochrom Berlin
- Williams' Medium E
ohne Leucin Biochrom Berlin
- Wortmannin Calbiochem Darmstadt

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Wirt	Hersteller	
anti phospho eEF2 (Thr56)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Denver (MA,USA)	
anti eEF2	Maus	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)	
anti phospho Akt (Ser473)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Denver (MA,USA)	
anti Akt	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Denver (MA,USA)	
anti GAPDH	Maus	Meridian Life Science Memphis (USA)	
anti CXCL1	Ratte	R&D Systems, Wiesbaden	
anti CXCL2	Ratte	R&D Systems, Wiesbaden	

Sekundärantikörper	Wirt	Konjugat	Hersteller
anti Maus	Kaninchen	HRP	Dako, Hamburg (Deutschland)
anti Kaninchen	Ziege	HRP	Dako, Hamburg (Deutschland)

2.1.4 Molekularbiologische Kits

- Anti-CD11b MicroBead Kit Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach
- Anti-CD146-(LSEC) MicroBead Kit Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach
- Anti-Ly-6G MicroBead Kit Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach
- Maus CXCL1 ELISA Kit R&D Systems Wiesbaden
- Maus CXCL2 ELISA Kit R&D Systems Wiesbaden
- QCM™ 3 µm Chemotaxis Assay 24-well-Colorimetric Millipore Eschborn
- QuantiTect Reverse Transcription Kit Qiagen Hilden
- RNeasy® Mini Kit Qiagen Hilden

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

<u>10x Blotting-Puffer (5 l)</u>	15 g	SDS
	145 g	Glycin
	290 g	Tris
<u>10x TBS (5 l)</u>	120 g	Tris
	435 g	NaCl
		pH 7,6
<u>1x Blotting-Puffer (5 l)</u>	0,5 l	10x Puffer
	1 l	Methanol
	3,5 l	H ₂ O
<u>2x SDS-Ladepuffer</u>	0,2 %	Bromphenolblau
	20 %	Glycerin
	4 %	SDS
	100 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	200 mM	DTT (vor Gebrauch zugeben)
<u>5x Elektrophorese-Puffer (5 l)</u>	25 g	SDS
	75,5 g	Tris
	470 g	Glycin
<u>ACK</u>	8,02 g/l	NH ₄ Cl
	0,1 g/l	KHCO ₃
	0,037 g/l	EDTA
		pH 7,3
<u>Attachment Medium</u>	500 ml	Williams' Medium E
	50 ml	FCS
	1 %	Pen/Strep
	2 mM	L-Glutamin
	100 nM	Dexamethason
<u>HANKS</u>	137 mM	NaCl
	5 mM	KCl
	15 mM	Hepes
	0,33 mM	Na ₂ HPO ₄
	0,44 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,4
<u>MACS-Puffer</u>	0,5 %	BSA
	2 mM	EDTA
		in PBS, pH 7,2

<u>Pre-Starvation Medium</u>	500 ml	Williams' Medium E
	1 %	Pen/Strep
	2 mM	L-Glutamin
	100 nM	Dexamethason
<u>Starvation Medium</u>	500 ml	Williams' Medium E
	1 %	Pen/Strep
	2 mM	L-Glutamin
<u>Triton-Lysepuffer (TLP)</u>	136 mM	NaCl
	20 mM	Tris-HCl
	10 %	Glycerin
	2 mM	EDTA
	50 mM	β -Glycerophosphat
	20 mM	Na-Pyrophosphat
	0,2 mM	Pefablock
	5 μ g/ml	Aprotinin
	5 μ g/ml	Leupeptin
	4 mM	Benzamidin
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 %	Triton X 100
		in H ₂ O lösen, pH 7,4; vor Gebrauch 0,2 % SDS zugeben
<u>Waschpuffer (TBST)</u>		0,1 % Tween 20 in 1xTBS

2.1.6 Spezielle Materialien und Geräte

- Abboath Venisystems, Hospira München
- Blottingkammer Biorad München
- Brutschrank Thermo Scientific Schwerte
- Companion-Platten für Zellkultureinsätze BD Falcon™ Heidelberg
- Curix 60 (Filmentwickler) AGFA Köln
- Einsätze für Ko-Kultur (0,4 μ m) BD Falcon™ Heidelberg
- Elektrophoresekammer Biometra, Biorad Göttingen, München
- Hyperfilm ECL™ Amersham, GE Healthcare München
- Image Station Kodak Rochester, USA
- Large Cell Separationssäulen Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach

• MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies	Darmstadt
• Mikroskop	Zeiss	Jena
• MS Separationssäulen	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
• Multiskan plate reader	Thermo Scientific	Schwerte
• Nanodrop	NanoDrop Technologies	Wilmington, USA
• Nitrozellulosemembran	Millipore	Eschborn
• OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
• pH-Meter	WTW	Weilheim
• Power Supply	Biometra, Biorad	Göttingen, München
• QIAshredder Säulen	Qiagen	Hilden
• Schlauchpumpe	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH	Wertheim- Mondfeld
• Schüttler	Stuart	Staffordshire, England
• Sterican-Kanülen 23G	B. Braun	Melsungen
• Sterilfilter	Millipore	Eschborn
• Szintillationscounter	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
• Szintillationsröhrchen	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
• T3 Thermocycler	Biometra	Göttingen
• Thermoblock	Eppendorf	Hamburg
• ViiA7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems	Darmstadt
• Whatman Filterpapier	Whatman	Maidstone, England
• Zellschaber	BD Falcon™	Heidelberg
• Zellsieb 70/100 µm	Greiner	Frickenhausen
• Zentrifugen	Eppendorf	Hamburg

Die Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur stammten von den Firmen Greiner (Frickenhausen) und Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg)

2.1.7 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide für Expressionsanalysen mittels quantitativer Real Time PCR wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide für die Real Time PCR

Bezeichnung	Nukleotidsequenz in 5'→3'	
murines SDHA	sense antisense	TGG GGA GTG CCG TGG TGT CA GTG CCG TCC CCT GTG CTG GT
murines CXCL1	sense antisense	ACC CAA ACC GAA GTC ATA GC TGG GGA CAC CTT TTA GCA TC
murines CXCL2	sense antisense	GCC AAG GGT TGA CTT CAA GA GCC CTT GAG AGT GGC TAT GA
murines CXCL3	sense antisense	AAC ACC CTA CCA AGG GTT GA GGG TTG AGG CAA ACT TCT TG

2.1.8 Versuchstiere, Tierhaltung

Männliche C57/BL6J Wildtyp-Mäuse wurden von der Firma Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) erworben. MK2-defiziente Mäuse wurden von Prof. Gaestel (Medizinische Hochschule Hannover) zu Verfügung gestellt, CXCR2-defiziente Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) bezogen. Die Knockout-Mäuse hatten denselben genetischen Hintergrund wie die C57/BL6J Wildtyp-Mäuse. Von den CXCR2-defizienten Tieren wurden aufgrund der schlechten Überlebensrate der Männchen zusätzlich Weibchen verwendet. Für die jeweiligen Versuche wurden zuvor geschlechtsspezifische Unterschiede der Wildtyp-Mäuse ausgeschlossen.

Die Haltung und Zucht der Versuchstiere erfolgte unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf. Die Tiere wurden unter einem strikten Tag-Nacht-Zyklus (12 h/12 h) bei 22 °C und 50 % rF und freiem Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter gehalten. Für die Versuche wurden Tiere im Alter von acht bis zwölf Wochen verwendet. Die Versuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) genehmigt und entsprechend des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation muriner Hepatozyten

Die Präparation der Hepatozyten erfolgte über eine 2-Schritt *in situ* Perfusion der Leber. Hierfür wurden die Tiere zunächst durch eine *intraperitoneale* Injektion von Ketavet und Rompun (Ketavet 10 mg/100 g KG; Rompun 0,5 mg/100 g KG in 0,9 % NaCl-Lösung) betäubt. Nach Eintritt der Narkose wurde die Bauchhöhle geöffnet und die Leber sowie die Portalvene (*Vena portae*) freigelegt. Die Portalvene wurde kanüliert und die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) zur Entlastung durchtrennt. Die Perfusion der Leber erfolgte unter Verwendung einer Schlauchpumpe bei einem Volumenstrom von 8 ml/min zunächst für 2 – 3 min mit HANKS-Puffer, der 2,5 mM EGTA (pH 8) und 0,1 % Glukose enthielt. Die nun blutleere Leber wurde für weitere 2 – 3 min mit Collagenase-haltigem HANKS-Puffer perfundiert (0,1 % Glukose, 5 mM CaCl₂, 0,015 % Collagenase), bis die Hepatozyten aus ihrem Zellverbund gelöst waren. Die Leber wurde entnommen und in Attachment Medium überführt. Unter sterilen Bedingungen wurde mit einer Pinzette die Leberkapsel geöffnet und die Zellen im Medium ausgeschüttelt. Die Zellen wurden über ein 70 µm Zellsieb gefiltert und durch dreimaliges Zentrifugieren (3 min, 50 rcf, RT, Acc 2, Dec 2) wurden die Hepatozyten von den Nicht-Parenchymzellen (Überstand) getrennt. Die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau-Ausschluss bestimmt und die Zellen auf zuvor mit Collagen-I-beschichtete Platten ausgesät. Nach drei Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen um die toten Zellen zu entfernen, und dann in Pre-Starvation Medium über Nacht kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Drei Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und bis zum Versuchsende in Starvation Medium kultiviert.

Für eine Makrophagen-freie Hepatozytenkultur wurden die Leber-spezifischen Makrophagen (Kupffer-Zellen) mit Hilfe von anti-CD11b MicroBeads (Miltenyi Biotech) entfernt. Hierfür wurden die Hepatozyten wie oben beschrieben präpariert, der letzte Waschschrift erfolgte jedoch in MACS-Puffer. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in ca. 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden nun mit 100 µl anti-CD11b MicroBeads für 15 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Separationssäulen (Large Cell Columns, Miltenyi) in den Magneten (OctoMACS, Miltenyi) gehängt und mit 1 ml MACS-Puffer equilibriert. Die Zellen

wurden mit weiteren 10 ml MACS-Puffer resuspendiert und die Suspension auf die Säule gegeben. Hierbei wurde immer nur ein maximales Volumen von 1 ml verwendet. Die durchgeflossenen Hepatozyten wurden aufgefangen, zentrifugiert und nach Bestimmung der Zellzahl für die weiteren Versuche entsprechend ausgesät.

2.2.1.2 Präparation neutrophiler Granulozyten der Maus

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Knochenmark von 8 – 12 Wochen alten Wildtyp-Mäusen und CXCR2-defizienten Mäusen isoliert. Hierfür wurden die Hinterbeine vom Hüftgelenk abgetrennt und Ober- und Unterschenkel von der Muskulatur befreit. Die Knochen wurden mit Isopropanol und DMEM (4,5 g/l Glucose, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) gewaschen, mit einer Schere die Enden geöffnet und das Knochenmark wurde mit einer Spritze (Nadelgröße 0,60 x 0,25 mm, 23G) und DMEM aus den Markhöhlen gespült. Das so gewonnene Knochenmark wurde resuspendiert, die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb filtriert und das Filtrat zentrifugiert (600 rcf, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml ACK-Puffer resuspendiert, um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren und die neutrophilen Granulozyten anzureichern. Nach ca. 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 ml DMEM gestoppt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in einem definierten Volumen resuspendiert und mittels Trypanblau-Ausschluss die Zellzahl bestimmt.

Die weitere Isolation der neutrophilen Granulozyten erfolgte mit Hilfe des Anti-Ly-6G MicroBead Kits über eine positive MACS-Selektion. Die Zellen wurden mit anti-Ly-6G-Biotin (50 µl/1x10⁸ Zellen) für 10 min und anschließend mit anti-Biotin MicroBeads (100 µl/ 1x10⁸ Zellen) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach den Inkubationen wurden die Zellen in MACS-Puffer gewaschen (300 rcf, 10 min, 4 °C) und in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden auf die MS-Separationssäule (Miltenyi) gegeben und nach Durchlauf der Zellen wurde die Säule dreimal mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Die Separationssäulen wurden aus dem Magnetfeld entfernt und die verbliebenen Zellen in den Säulen mit 1 ml MACS-Puffer und sterilem Säulenstempel eluiert. Die isolierten neutrophilen Granulozyten wurden in DMEM aufgenommen und für weitere Experimente verwendet.

2.2.1.3 Präparation muriner Makrophagen aus dem Knochenmark

Die Makrophagen wurden mit Hilfe des Monozytenkolonien-stimulierenden Faktors (M-CSF) aus dem Knochenmark differenziert. Hierfür wurden die Hinterbeine von 8 – 12 Wochen alten, männlichen Mäusen vom Hüftgelenk abgetrennt und Ober- und Unterschenkel von der Muskulatur befreit. Die Knochen wurden zunächst in 70 %igem Ethanol für 2 – 5 Minuten gewaschen, dann in PBS transferiert und schließlich in Wasch-Medium (DMEM 1000 mg/l Glukose) überführt. Mit einer Schere wurden die Enden der Knochen geöffnet und mit Hilfe einer Spritze (Nadelgröße 0,60 x 0,25 mm, 23G) und DMEM das Knochenmark aus den Markhöhlen gespült. Das so gewonnene Knochenmark wurde resuspendiert und für 10 min zentrifugiert (4 °C, 300 rcf, Acc/Dec gering). Das Zellpellet wurde mit DMEM (10 % FCS, 1 % Pen/Strep) resuspendiert und die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in der Zellkulturflasche mehrmals mit dem Medium abgespült und anschließend zentrifugiert (10 min, 4 °C, 300 rcf, Acc/Dec gering). Die Zellen wurden auf 3 – 4 Zellkulturschalen (15 cm Durchmesser) in einem Volumen von 20 ml pro Schale verteilt. Dem Medium wurden 10 ng/ml M-CSF beigesetzt. Nach zwei Tagen wurde jeder Schale 20 ml frisches Medium mit 10 ng/ml M-CSF zugesetzt, nach weiteren drei Tagen jeweils 10 ml. Um die Makrophagen für Versuche zu verwenden, wurden die Zellen am Tag sieben mit PBS gewaschen und für 20 – 30 min mit Trypsin/EDTA inkubiert. Das Trypsin wurde mit Kulturmedium inaktiviert und die noch adhärennten Zellen mit einem Zellschaber gründlich abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium (mit 10 ng/ml M-CSF) resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen für die Versuche, welche am nächsten Tag durchgeführt wurden, entsprechend ausgesät.

2.2.1.4 Präparation muriner Endothelzellen der Leber (LSEC)

Sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC) wurden mit Hilfe der anti-LSEC MicroBeads von Miltenyi aus der perfundierten Mausleber isoliert. Hierfür wurde die Leber mit Collagenase-haltigem HANKS-Puffer für 1 – 2 min perfundiert (0,1 % Glukose, 5 mM CaCl₂, 0,06 % Collagenase). Die perfundierte Leber wurde vorsichtig entnommen, in kleine Stückchen geschnitten und in Collagenase-haltigem HANKS-Puffer für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann über ein Sieb

(Maschengröße 100 µm) in eine Petrischale abgekippt und die nicht verdauten Stückchen mit einem Einmalspritzenstempel durch leichte Bewegungen homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 300 rcf, 22 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem MACS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl anti-LSEC MicroBeads für 20 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 10 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und in 1 ml Schritten auf eine Large-Cell Separationssäule (Miltenyi) gegeben. Die Separationssäulen wurden aus dem Magnetfeld entfernt und die in den Säulen verbliebenen Zellen mit 1 ml MACS-Puffer und sterilem Säulenstempel eluiert. Die isolierten LSEC wurden in DMEM (4,5 g/l Glucose, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) aufgenommen und für weitere Experimente verwendet.

2.2.1.5 Ko-Kultur Hepatozyten – Makrophagen

Um den gegenseitigen Einfluss von Hepatozyten und Makrophagen zu untersuchen, wurden beide Zelltypen ko-kultiviert. Zunächst wurden die Makrophagen wie in 2.2.1.3 beschrieben isoliert und sieben Tage mit M-CSF differenziert. Am siebten Tag wurden die Makrophagen auf Zellkultureinsätze ausgesät, die eine Porengröße von 0,4 µm besitzen, so dass die Zellen nicht durchwandern können. Ebenfalls am siebten Tag wurden die Hepatozyten präpariert und die Leber-spezifischen Makrophagen aus der Zellsuspension entfernt (siehe 2.2.1.1). Die Hepatozyten wurden auf spezielle Companion-Platten ausgesät (Collagen-I-beschichtet), in die am nächsten Tag die Zellkultureinsätze mit den Makrophagen eingesetzt wurden. Beide Zelltypen wurden vor dem Zusammensetzen gewaschen und nach der Vereinigung in Starvation-Medium kultiviert. Den weiteren Versuchen entsprechend wurden die Zellen für bestimmte Zeitspannen mit Wachstumsfaktoren oder Zytokinen inkubiert.

2.2.1.6 Migrations-Assay

Das Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten (siehe 2.2.1.2) und sinusoidalen Endothelzellen (siehe 2.2.1.4) wurde mit Hilfe des Chemotaxis-Assays für 24-Well-Platten von Millipore gemessen. Hierfür wurden die Neutrophilen bzw. Endothelzellen nach der Präparation in Serum-freiem DMEM in einer Konzentration von $0,2 - 2 \times 10^6$ Zellen/ml

aufgenommen. 250 µl von dieser Zellsuspension wurden auf spezielle Einsätze ausgesät, deren Boden aus einer Membran mit 3 µm großen Poren besteht. In die Kammer unter den Einsätzen wurden 300 µl der Überstände von Hepatozyten gegeben, die zuvor mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen inkubiert wurden. Die Zellen wurden nun für 20 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen durch die Membran in Richtung des Chemokingradienten wandern. Um die Anzahl der migrierten Zellen zu messen, wurden die Einsätze aus den Kammern entfernt und 30 µl WST-1-Reagenz zu den Zellen gegeben, welches von Zellen mit einer intakten Atmungskette enzymatisch zu Formazan umgesetzt wird. Dieser Farbumschlag wurde nach 3 Stunden photometrisch gemessen (Absorption 450 – 630 nm). Als Kontrolle diente Medium ohne Zellen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Präparation

Die RNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits. Die Lyse der Zellen erfolgte in RLT-Puffer mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte den Herstellerangaben entsprechend mittels des QIAshredder Kits (Qiagen) und die weitere Isolierung und Aufreinigung der RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen). Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm/280 nm bestimmt.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Die cDNA wurde aus 1 µg RNA mit Hilfe des Quantitect Reverse Transcription Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers synthetisiert, in 100 µl sterilem H₂O aufgenommen und anschließend in der Real-Time-PCR eingesetzt. Durch entsprechend durchgeführte Kontrollen ohne DNA und ohne Reverse Transkriptase wurde die Reinheit der Synthesereaktion überprüft.

2.2.2.3 Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die gleichzeitig die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt unter Nutzung von Fluoreszenz-Farbstoffen, die an die DNA binden und bei jedem Zyklus gemessen werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten interkalierenden Farbstoff handelt es sich um SYBR Green, welches eine Anregungswellenlänge von 494 nm und eine Emissionswellenlänge von 521 nm besitzt. Die Messungen erfolgten am ViiA7 Real Time System in Mikrotiterplatten unter Verwendung der entsprechenden Primer (Tabelle 2.2). Als Ausgangsmaterial der Real-Time-PCR wurde 1,2 µl der 1:6 verdünnten cDNA eingesetzt und 12,5 µl SYBR Green PCR Mastermix nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems) in einem Gesamtvolumen von 25 µl zugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte nach standardisierten Parametern (*Annealing*: 59 °C, 40 Zyklen), an die sich eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Reaktionen anschloss. Für die Quantifizierung wurde die Δ CT-Methode verwendet [Lang and Heeg, 1998], dabei ergibt sich der CT-Wert aus der Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt. Als Referenz wurde murines SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A) verwendet.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Präparation von Proteinlysaten

Die kultivierten Zellen wurden am Ende der jeweiligen Versuche zweimal mit kaltem PBS (supplementiert mit 0,1 mM Na_3VO_4) gewaschen und unter Zugabe von Triton-Lysepuffer mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Die geernteten Zellen wurden gut mit dem Lysepuffer vermischt, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei 15.000 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe des Bradford Protein-Assays von Biorad nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei dieser Methode wird der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau verwendet, der mit basischen Aminosäuren reagiert und dessen Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm verschiebt. Die Extinktion bei 595 nm wird photometrisch gemessen und anhand einer BSA-Standardreihe die Konzentration bestimmt.

2.2.3.3 Western Blot

Zur Auftrennung löslicher und membrangebundener Proteine nach ihrer Masse wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in vertikalen Gelkammern durchgeführt. Von den Proben wurden 10 – 50 µg mit 2x-SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die abgekühlten Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 140 – 160 V aufgetrennt. Die Sammelgele der Polyacrylamidgele wiesen immer die gleiche PAA-Konzentration auf (5 %), wohingegen die PAA-Konzentration der Trenngele abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine zwischen 10 und 12 % lag.

Polyacrylamid-Sammelgel (5 %, 5 ml)	3,4 ml	H ₂ O
	0,83 ml	30 % Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1
	0,63 ml	1 M Tris/HCl (pH 6,8)
	0,05 ml	10 % SDS
	0,05 ml	10 % APS
	0,005 ml	TEMED

Polyacrylamid-Trenngel (10 %, 15 ml)	5,9 ml	H ₂ O
	5,0 ml	30 % Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1
	3,8 ml	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
	0,15 ml	10 % SDS
	0,15 ml	10 % APS
	0,006 ml	TEMED

Polyacrylamid-Trenngel (12 %, 15 ml)	4,9 ml	H ₂ O
	6,0 ml	30 % Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1
	3,8 ml	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
	0,15 ml	10 % SDS
	0,15 ml	10 % APS
	0,006 ml	TEMED

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer nach der „Semi-dry“-Blotting-Methode bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² für 90 min auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Transfer eine Stunde in 5 % BSA/TBST schüttelnd inkubiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Vor und nach der einstündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran 3 x 10 min in Waschpuffer gewaschen.

Die Immundetektion mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper erfolgte mittels Western Lightning ECL Reagent und ECL-Filmen in einer Entwicklermaschine.

2.2.3.4 ELISA

Die Konzentration der von den Hepatozyten produzierten Chemokine CXCL1 und CXCL2 wurde in Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.3.5 Proteinsynthese-Messung

Die Proteinsynthese wurde anhand des Einbaus von radioaktivem Leucin und der darauf folgenden Messung der Proteine im Flüssig-Szintillationszähler bestimmt. Die Hepatozyten wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben isoliert und kultiviert. Das Starvation Medium wurde entfernt und die Zellen gründlich mit PBS und Leucin-freiem Starvation Medium gewaschen. Nach Zugabe von 0,5 µCi/ml L-[4,5-³H]-Leucin wurden die Zellen 30 min inkubiert und dann für definierte Zeitpunkte mit 50 ng/ml HGF stimuliert. Am Ende der Stimulation wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und die Proteine mit Triton-Lysepuffer geerntet (2.2.3.1). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proteinlysate in Szintillationsröhrchen mit Szintillationsflüssigkeit gut gemischt und die Radioaktivität der Proben im Flüssig-Szintillationszähler gemessen.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die densitometrische Auswertung der aus den Western Blots erhaltenen Proteinbanden wurde mit Hilfe der Molecular Imaging Software (Version 4.0.3) der Firma Kodak durchgeführt. Die Werte wurden relativ zur Kontrolle berechnet.

Tabellarisch oder in Diagrammen dargestellte Daten wurden als Mittelwert \pm S.D. (Standardabweichung) ausgedrückt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 5.01 (La Jolla, USA) unter Verwendung der ein- und zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Die Ergebnisse wurden als signifikant eingestuft bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % ($p < 0,05$).

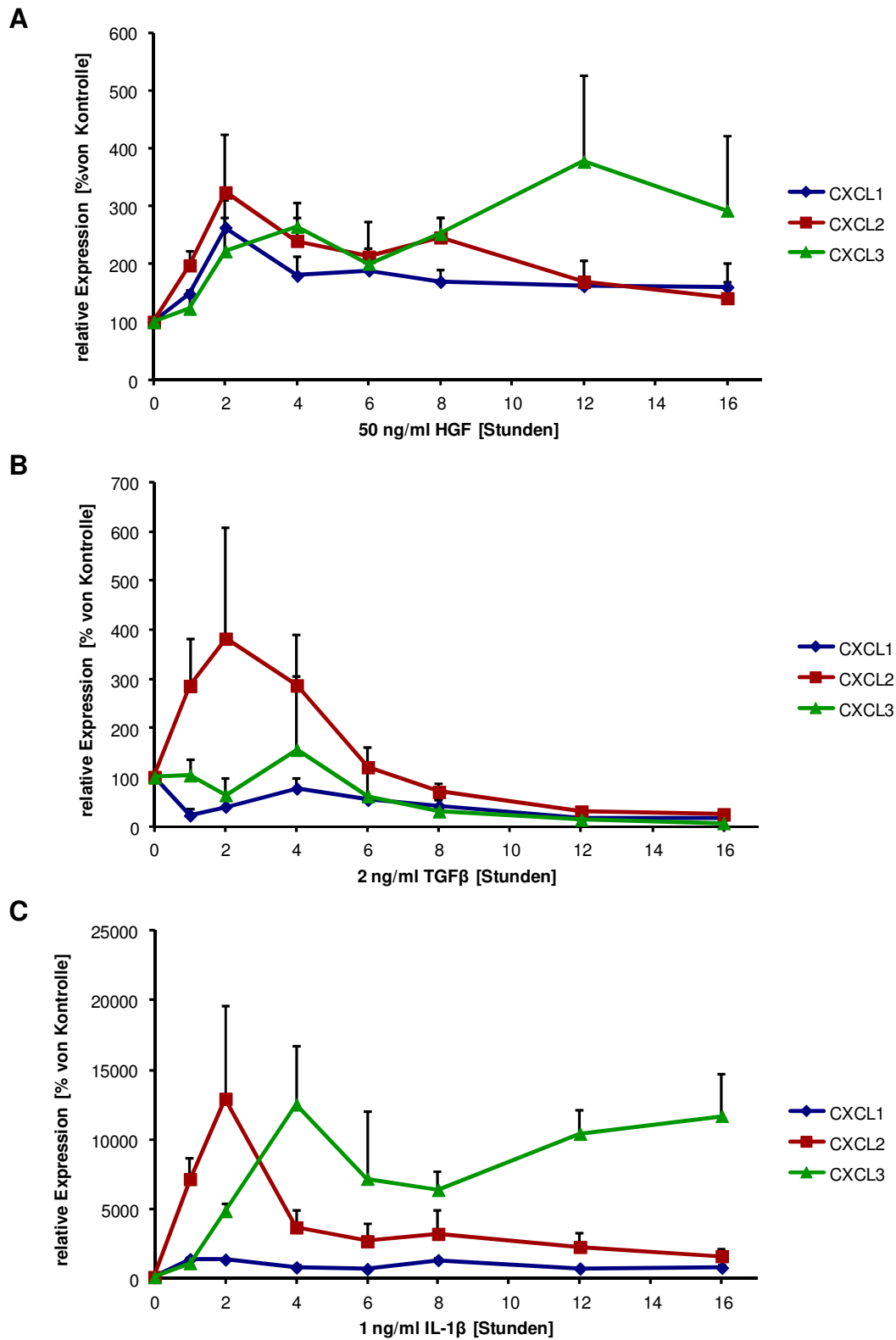
3 Ergebnisse

3.1 Chemokinexpression unter Einfluss verschiedener regenerationsrelevanter Faktoren

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ist ein wichtiges Detail der Leberregeneration und erfordert die Anwesenheit von Chemokinen. Da über Chemokine im Zusammenhang mit der Leberregeneration wenig bekannt ist, war zunächst die Frage, in wie weit regenerations-relevante Faktoren wie HGF und TNF α die Synthese von hierfür relevanten Chemokinen steuern und in wie weit Hepatozyten an der Chemokinsynthese beteiligt sind. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher zunächst der Einfluss verschiedener regenerations-relevanter Faktoren auf die mRNA-Expression der CXC Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3 untersucht. Zu den hierbei berücksichtigten Faktoren gehören die Wachstumsfaktoren HGF, EGF und TGF β sowie die Zytokine IL-1 β und TNF α .

HGF führte in einer Konzentration von 50 ng/ml zu einer verstärkten Expression der mRNA der drei genannten Chemokine, wobei CXCL1 und CXCL2 den Höhepunkt der Expression nach zwei Stunden erreicht hatten, während CXCL3 eher schwankend den Höhepunkt nach zwölf Stunden erreichte (Abbildung 3.1, A). Im Vergleich zu HGF kam es durch Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 β zu einer sehr viel stärkeren Expression, auch wenn CXCL1 viel geringer exprimiert wurde als CXCL2 und CXCL3 (Abbildung 3.1, B). Während HGF und IL-1 β stimulierend auf die mRNA-Expression von CXCL1-3 in Hepatozyten wirkte, kam es unter Stimulation mit TGF β nur im Fall von CXCL2 zunächst zu einer Verstärkung der Expression, die langfristig aber unter das basale Expressionsniveau supprimiert wurde. Die Expression von CXCL1 und CXCL3 wurde direkt inhibiert. (Abbildung 3.1, C). EGF (50 ng/ml) führte wie HGF zu einer verstärkten Exprimierung von CXCL1, 2 und 3, wobei die Expression von CXCL2 am stärksten induziert wurde (Abbildung 3.1, D). Eine Stimulation der Hepatozyten mit 10 ng/ml TNF α führte zu einem sofortigen Anstieg der Expression von CXCL2 mit einer direkten Abnahme zurück auf eine 5-fach erhöhte Expression nach 16 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. CXCL1 wurde zunächst verstärkt exprimiert, langfristig gesehen war der Effekt von TNF α eher gering. Auch CXCL3 wurde vermehrt exprimiert, zeigte aber kein bestimmtes Muster, sondern schwankte in der Expressionsstärke (Abbildung 3.1, E). Von den fünf Substanzen konnte IL-1 β die größte Reaktion hervorrufen. HGF und EGF

induzieren zwar die Chemokin-Expression, im Vergleich zu IL-1 β und TNF α ist die Expression jedoch sehr gering.



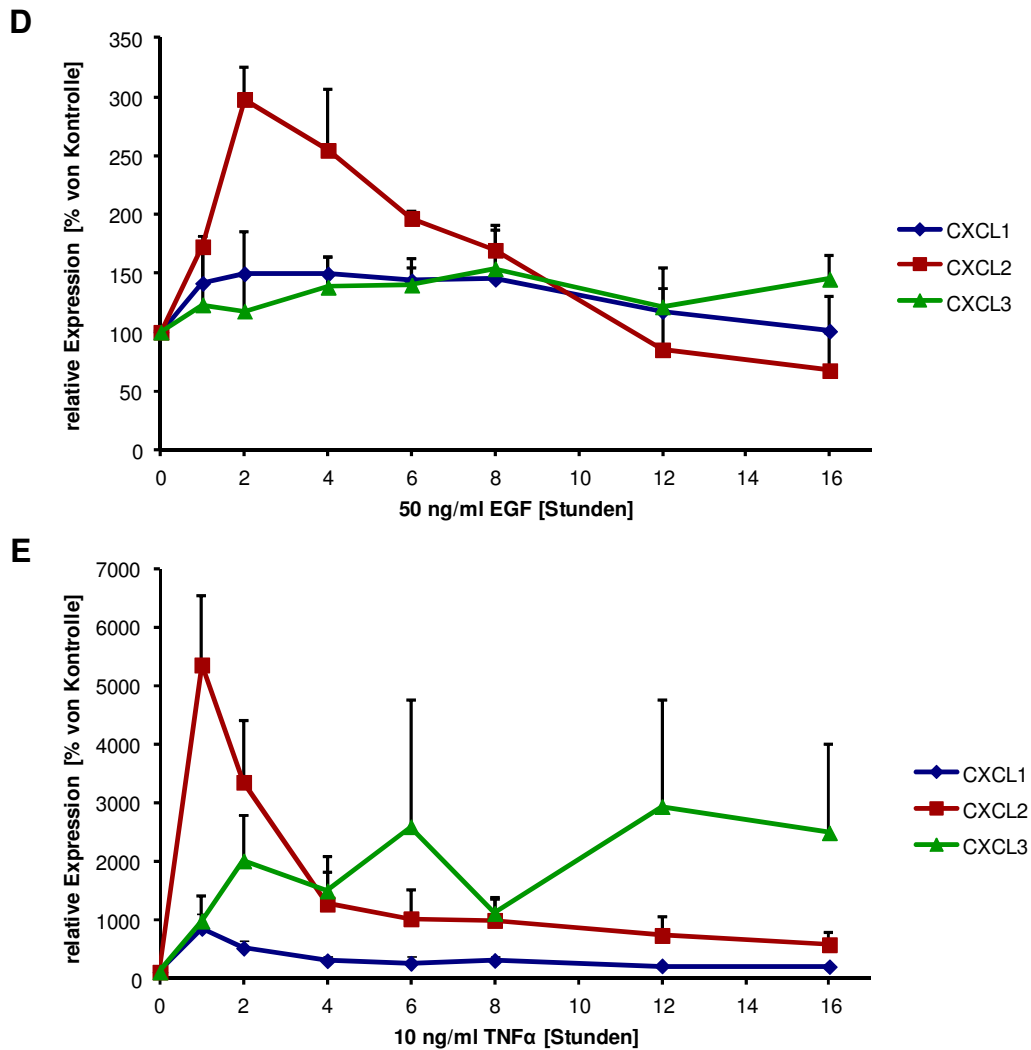


Abbildung 3.1: Expressionsmuster der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3

Murine Hepatozyten wurden über einen Zeitraum von 16 Stunden mit A: 50 ng/ml HGF, B: 1 ng/ml IL-1 β , C: 2 ng/ml TGF β , D: 50 ng/ml EGF und E: 10 ng/ml TNF α stimuliert. Die mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Standardabweichung wurde auf der Grundlage von vier unabhängigen Experimenten erstellt.

Die in Abbildung 3.1 dargestellten Ergebnisse belegen, dass Hepatozyten nach Stimulation mit regenerations-relevanten Faktoren zur mRNA-Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3 in der Lage sind. Die Expressionsstärke ist abhängig vom Stimulus und jedes Chemokin wird unterschiedlich von den Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert. Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Fokus auf HGF und TNF α gelegt, da diese Faktoren zu den wichtigsten Promotoren für die Leberregeneration gehören, während IL-1 β und TGF β eher für die Terminierung bzw. Hemmung der Regeneration relevant sind.

3.2 Einfluss von HGF und TNF α auf die Chemokinsynthese in Hepatozyten und Makrophagen

Im Rahmen der Leberregeneration spielen nicht nur die Hepatozyten eine bedeutende Rolle, sondern auch die gewebsständigen Makrophagen in der Leber (Kupffer-Zellen). Da über die Chemokinexpression in Makrophagen während der Leberregeneration ebenfalls wenig bekannt ist, wurde die Chemokinexpression zusätzlich in Makrophagen gemessen, die zuvor mit 50 ng/ml HGF oder 10 ng/ml TNF α stimuliert wurden. Die Makrophagen wurden aus dem Knochenmark differenziert, da die Makrophagen aus der Leber nicht in ausreichender Menge vorhanden waren.

Wie in Abbildung 3.2, A zu sehen, wurde CXCL1 nach Stimulation mit HGF hauptsächlich von den Hepatozyten produziert und nur in sehr geringen Mengen von den Makrophagen. Die mRNA-Expression in den Hepatozyten war 100 – 250-mal stärker als in den Makrophagen. Nach Stimulation mit 10 ng/ml TNF α wurde CXCL1 von den Makrophagen vermehrt exprimiert, jedoch war die Menge im Vergleich zu den Hepatozyten wie zuvor bei HGF sehr gering. Auch die HGF-induzierte Expression von CXCL2 und CXCL3 war in den Makrophagen deutlich geringer als in den Hepatozyten, wohingegen die TNF α -induzierte Expression in beiden Zelltypen annähernd gleich war (Abbildung 3.2, B und C). HGF bewirkte in den Makrophagen nur einen geringen Anstieg der Chemokinexpression, während TNF α dasselbe Muster wie in den Hepatozyten zeigte, jedoch zeitlich verzögert und im Fall von CXCL2 und 3 war die Expressionsstärke mit der in Hepatozyten vergleichbar.

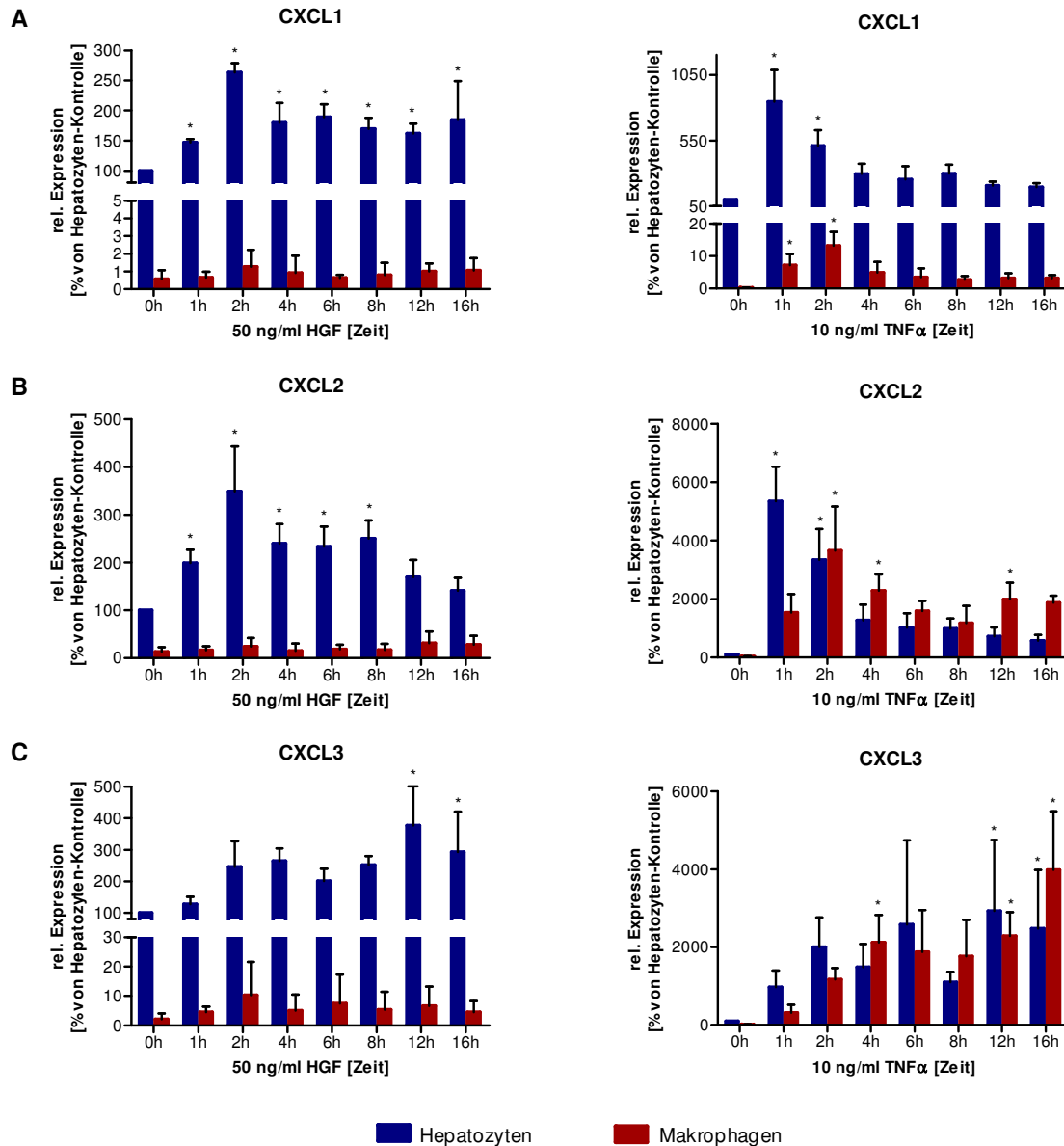


Abbildung 3.2: Chemokinexpression in murinen Hepatozyten und Makrophagen

Murine Hepatozyten und aus dem Knochenmark differenzierte Makrophagen wurden über einen Zeitraum von 16 Stunden mit 50 ng/ml HGF oder 10 ng/ml TNF α stimuliert. Die mRNA-Expression von CXCL1 (A), CXCL2 (B) und CXCL3 (C) wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle der Hepatozyten normalisiert. Die Signifikanz (*) wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) berechnet ($p < 0,05$).

Da sowohl HGF als auch TNF α einen Effekt auf die Chemokinexpression in Hepatozyten und Makrophagen hatte, und beide Substanzen eine wichtige Rolle während der Leberregeneration spielen, wurde eine kombinatorische Gabe der beiden Stimulanzen untersucht. Die Zellen wurden für vier und acht Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml TNF α stimuliert und die Chemokinexpression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR und auf Protein-Ebene im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Die Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 wurde sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene durch HGF und TNF α in den Hepatozyten induziert. HGF alleine ist hierbei ein vergleichsweise schwacher Induktor der Chemokinsynthese, verstärkt jedoch insbesondere auf Proteinebene die TNF α -induzierte Synthese von CXCL1 und CXCL2 in Hepatozyten, nicht aber in Makrophagen (Abbildung 3.3). In Makrophagen wurde die Chemokinexpression nur durch TNF α gesteigert, HGF hatte hier sowohl alleine, als auch in Kombination mit TNF α keinen Einfluss. Im Fall von CXCL1 konnte die Expression auf Protein-Ebene in den Makrophagen durch keine der beiden Substanzen signifikant verändert werden (Abbildung 3.3, A).

Auffällig war, dass Makrophagen deutlich weniger CXCL1 produzierten als Hepatozyten. Im ELISA konnte eine Konzentration von ~ 50 pg/ml gemessen werden, während die Hepatozyten Stimulus-abhängig bis zu 500 pg/ml CXCL1 produzierten. Die Expression von CXCL2 und CXCL3 war in beiden Zelltypen annähernd gleich.

CXCL2 wurde auf mRNA-Ebene bis zu 10-fach stärker exprimiert als CXCL1, die Proteinkonzentration von CXCL2 war jedoch mit max. 250 pg/ml geringer als die von CXCL1. Die mRNA-Expression von CXCL3 war von allen drei Chemokinen am größten und in den Makrophagen stärker als in den Hepatozyten (Abbildung 3.3, C). Auch hier war der modulierende Effekt von HGF nur in den Hepatozyten zu sehen.

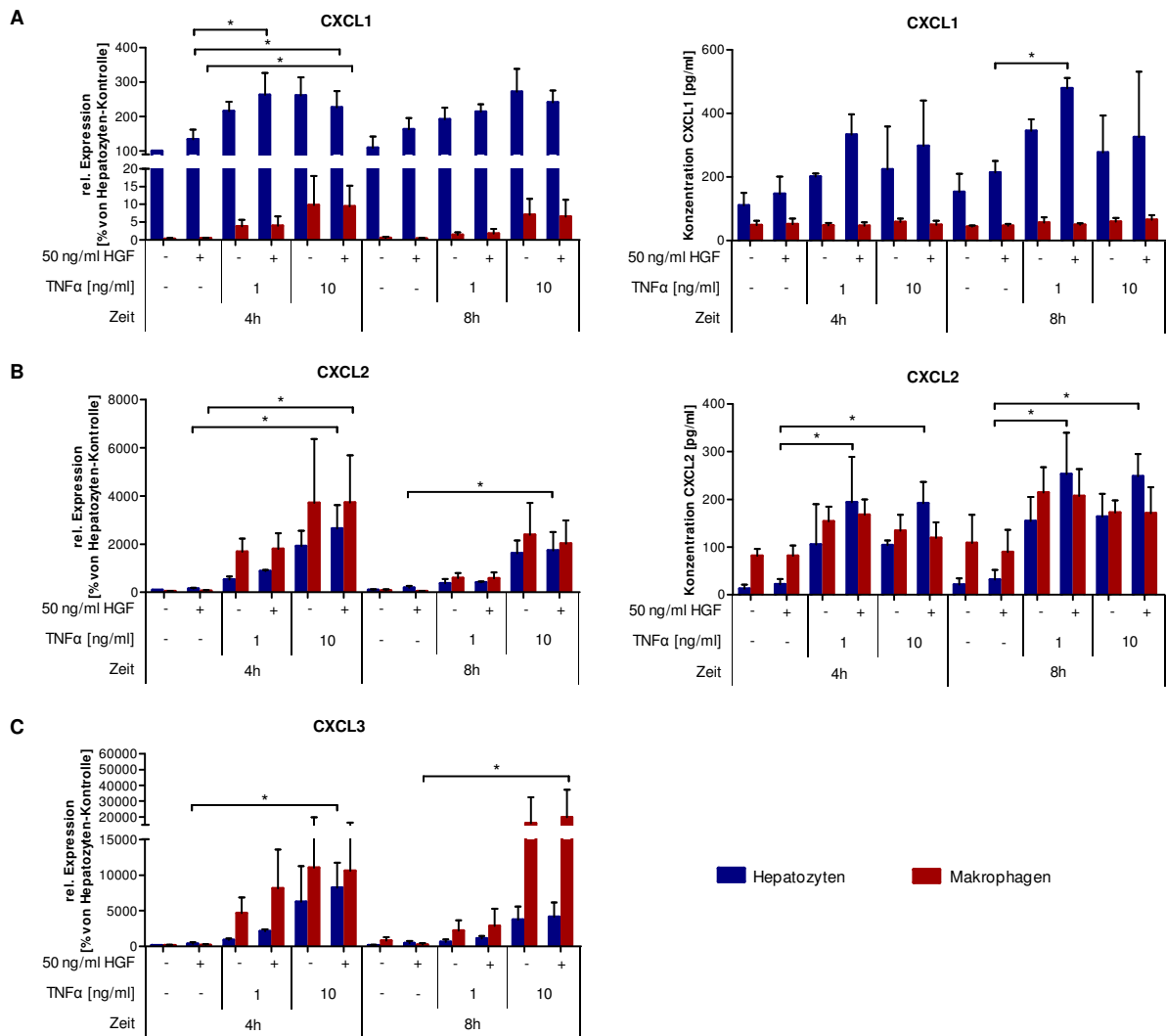


Abbildung 3.3: Chemokinexpression nach gleichzeitiger Stimulation mit HGF und TNF α

Murine Hepatozyten und aus dem Knochenmark differenzierte Makrophagen wurden für vier und acht Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml oder 10 ng/ml TNF α stimuliert. Die mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle der Hepatozyten normalisiert. Die Proteinkonzentration von CXCL1 und CXCL2 wurde mittels ELISA in Zellkultur-Überständen bestimmt. Die Signifikanz (*) wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) berechnet ($p < 0,05$).

Sowohl Hepatozyten als auch Makrophagen exprimieren nach Stimulation mit Substanzen, welche für die Leberregeneration eine wichtige Rolle spielen, verstärkt die Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3, so dass sich nun die Frage stellt, in wie weit diese Chemokine an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Sinusoidaler Endothelzellen der Leber beteiligt sind.

3.3 Einfluss der CXC-Chemokine auf das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten und Leber-Endothelzellen (LSEC)

Chemokine haben eine wichtige Funktion in der Induktion von Chemotaxis. Die hier untersuchten Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3 sind wichtige Faktoren für die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und LSEC. Aus diesem Grund wurde das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten und Sinusoidaler Endothelzellen der Leber im Hinblick auf den Einfluss der zuvor analysierten Chemokine untersucht. Die Zellen wurden hierfür in speziellen Zellkultur-Einsätzen mit einer Porengröße von 3 μm kultiviert, so dass die Zellen durch die Poren in das untere Gefäß migrieren konnten, in dem sich konditionierte Zellkultur-Überstände befanden. Die Überstände stammten von Hepatozyten und Makrophagen, die zuvor 24 Stunden mit 50 ng/ml HGF und 10 ng/ml TNF α bzw. einer Kombination beider Faktoren inkubiert wurden.

Die neutrophilen Granulozyten migrierten bis zu 120 % stärker, wenn Überstände von Hepatozyten verwendet wurden, welche zuvor mit HGF und TNF α in Kombination stimuliert wurden. Eine alleinige Gabe der jeweiligen Faktoren konnte kein signifikant verstärktes Migrationsverhalten auslösen. Interessanterweise konnte auch der Überstand kultivierter Makrophagen kein verstärktes Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten induzieren (Abbildung 3.4).

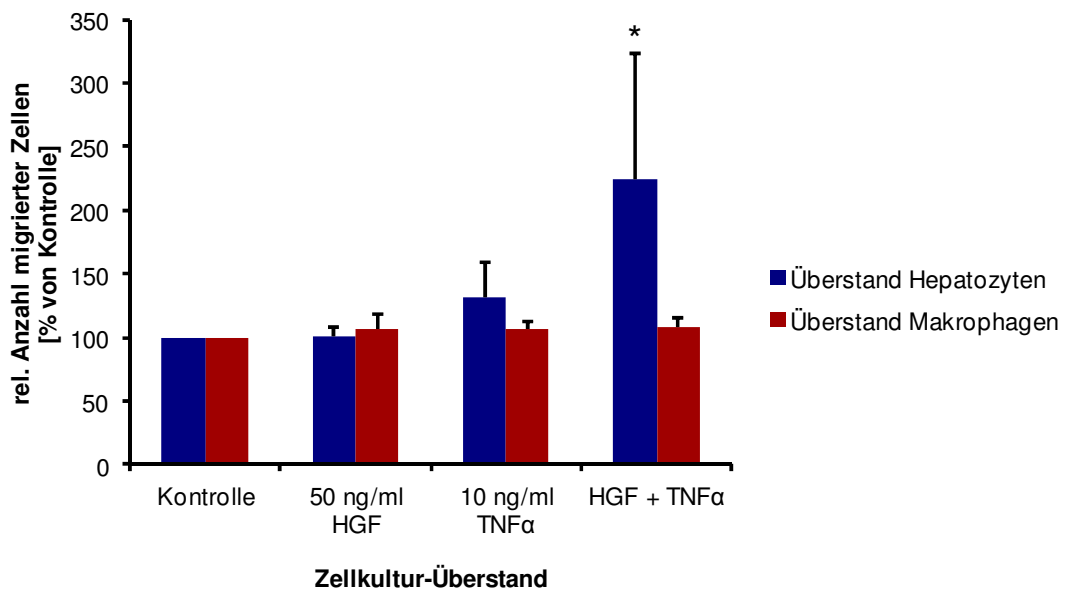


Abbildung 3.4: Migration neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen isoliert und in Zellkultur-Einsätzen mit einer Porengröße von 3 μm ausgesät. Überstände von Hepatozyten und Makrophagen, stimuliert mit 50 ng/ml HGF und 10 ng/ml TNF α , wurden in die unteren Gefäße gegeben, um in den neutrophilen Granulozyten die Migration zu initiieren. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus elf (Überstand Hepatozyten) bzw. vier (Überstand Makrophagen) unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA berechnet (* $p < 0,05$).

Die Sinusoidalen Endothelzellen der Leber migrierten im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten nicht, wenn Überstände kultivierter Hepatozyten verwendet wurden (Abbildung 3.5).

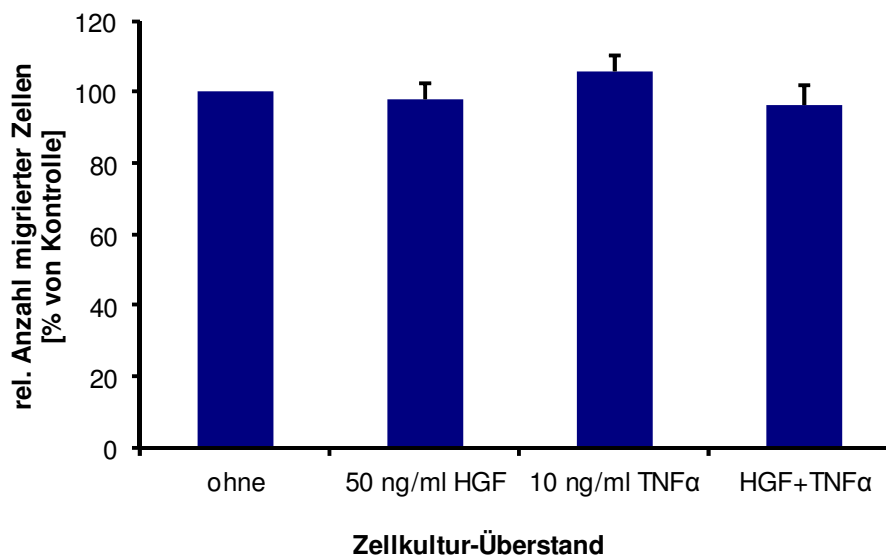


Abbildung 3.5: Migration Sinusoidaler Endothelzellen der Leber

Sinusoidale Endothelzellen wurden aus der Leber von Wildtyp-Mäusen präpariert und in Zellkultureinsätzen mit einer Porengröße von 3 μm ausgesät. Überstände von Hepatozyten, stimuliert mit 50 ng/ml HGF und 10 ng/ml TNF α , wurden in die unteren Gefäße gegeben, um in den Endothelzellen die Migration zu initiieren. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus fünf unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert.

Um zu überprüfen, ob die Migration durch Chemokine induziert wurde und nicht durch andere Substanzen, die von den Hepatozyten nach Stimulation mit HGF und TNF α produziert wurden, wurde den neutrophilen Granulozyten 50 nM des CXCR2-Inhibitors SB225002 zugesetzt. Weiterhin wurden neutrophile Granulozyten von CXCR2-defizienten Mäusen verwendet. CXCR2 ist einer der wichtigsten Rezeptoren für Chemokine und an der Migration von Leukozyten beteiligt.

Nach Inhibierung des Chemokinrezeptors durch den Inhibitor SB225002 war keine Migration messbar. Die neutrophilen Granulozyten der CXCR2-defizienten Mäuse konnten hingegen im Vergleich zur Kontrolle verstärkt migrieren, wenn Überstände von Hepatozyten verwendet wurden, welche zuvor mit HGF und TNF α in Kombination stimuliert wurden. Die Migration war jedoch signifikant geringer als die der Wildtyp-Zellen. (Abbildung 3.6).

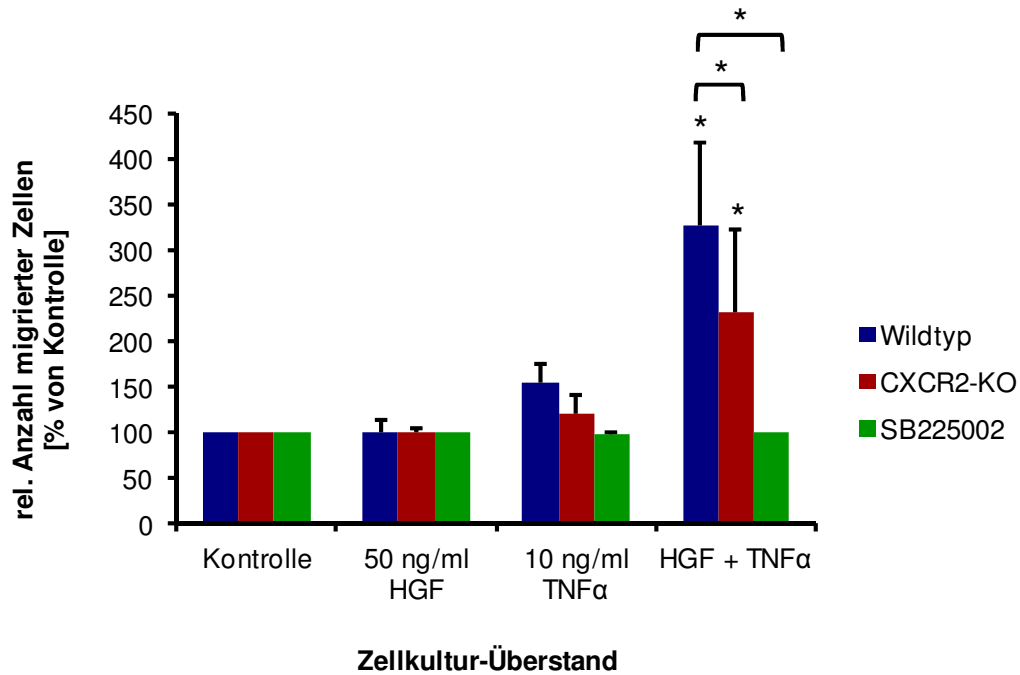


Abbildung 3.6: CXCR2-abhängige Migration neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp- und CXCR2-defizienten Mäusen isoliert und in Zellkultureinsätzen mit einer Porengröße von 3 μm ausgesät. Überstände von Hepatozyten, stimuliert mit 50 ng/ml HGF und 10 ng/ml TNF α , wurden in die unteren Gefäße gegeben, um in den neutrophilen Granulozyten die Migration zu initiieren. Die Zellen der Wildtyp-Mäuse wurden mit 50 nM des CXCR2-Inhibitors SB225002 kultiviert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus sieben unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA berechnet (* $p < 0,05$).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten durch Chemokine induziert wird, die von Hepatozyten, nicht aber von Makrophagen sezerniert werden. Mit Hilfe des CXCR2-Inhibitors SB225002 konnte diese Rekrutierung inhibiert werden. Im Vergleich hierzu verlief die Rekrutierung Neutrophiler von CXCR2-defizienten Mäusen nahezu ungestört, jedoch war das Migrationsverhalten geringer als das der Neutrophilen von Wildtyp-Mäusen.

3.4 Regulation der Chemokinexpression

Da über die Regulierung der Chemokinexpression in Hepatozyten vom Signal zum Molekül wenig bekannt ist, wurde mit Hilfe verschiedener Inhibitoren versucht, ein vorläufiges Modell dieser „Signalwege“ zu erstellen. Zunächst wurde die Bedeutung der Signalwege PI3K/Akt und MAPK für die durch HGF bzw. EGF induzierte Chemokinsynthese untersucht.

3.4.1 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für die Chemokinsynthese

Der PI3K/Akt-Signalweg spielt bei vielen Vorgängen in der Zelle wie z. B. der Zellproliferation eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurde zunächst durch Inhibierung der PI3-Kinase untersucht, ob die Chemokinexpression in Hepatozyten über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert wird. Hierfür wurden die beiden PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 eingesetzt. Da nach Stimulation mit HGF und EGF die stärkste mRNA-Expression der Chemokine nach zwei Stunden gemessen werden konnte (Abbildung 3.1), wurde dieser Zeitpunkt für die Versuche zur Klärung der Regulation ausgewählt. Die Hepatozyten wurden eine Stunde mit 100 nM Wortmannin oder 10 μ M LY294002 vorinkubiert und anschließend für zwei Stunden mit 50 ng/ml HGF bzw. EGF stimuliert. DMSO wurde als Lösungsmittel des Inhibitors verwendet und diente in den Versuchen als Kontrolle, um auszuschließen, dass der inhibitorische Effekt von DMSO verursacht wurde und nicht vom jeweiligen Inhibitor.

Sowohl die durch HGF induzierte Expression der Transkription von CXCL1, CXCL2 und CXCL3, als auch die EGF-induzierte sind abhängig von der PI3-Kinase (Abbildung 3.7). Wortmannin und LY294002 führten zu einer Inhibierung der HGF-induzierten Chemokinexpression auf mRNA-Ebene, wohingegen die EGF-induzierte Expression nur für CXCL1 durch Wortmannin inhibiert wurde. Die mRNA-Expression von CXCL2 und CXCL3 wurde durch Wortmannin nur leicht verringert. LY294002 inhibierte jedoch alle drei Chemokine, so dass auch die EGF-induzierte mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 abhängig von der PI3-Kinase ist. Desweiteren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den HGF- bzw. EGF-stimulierten Proben mit und ohne DMSO festgestellt werden.

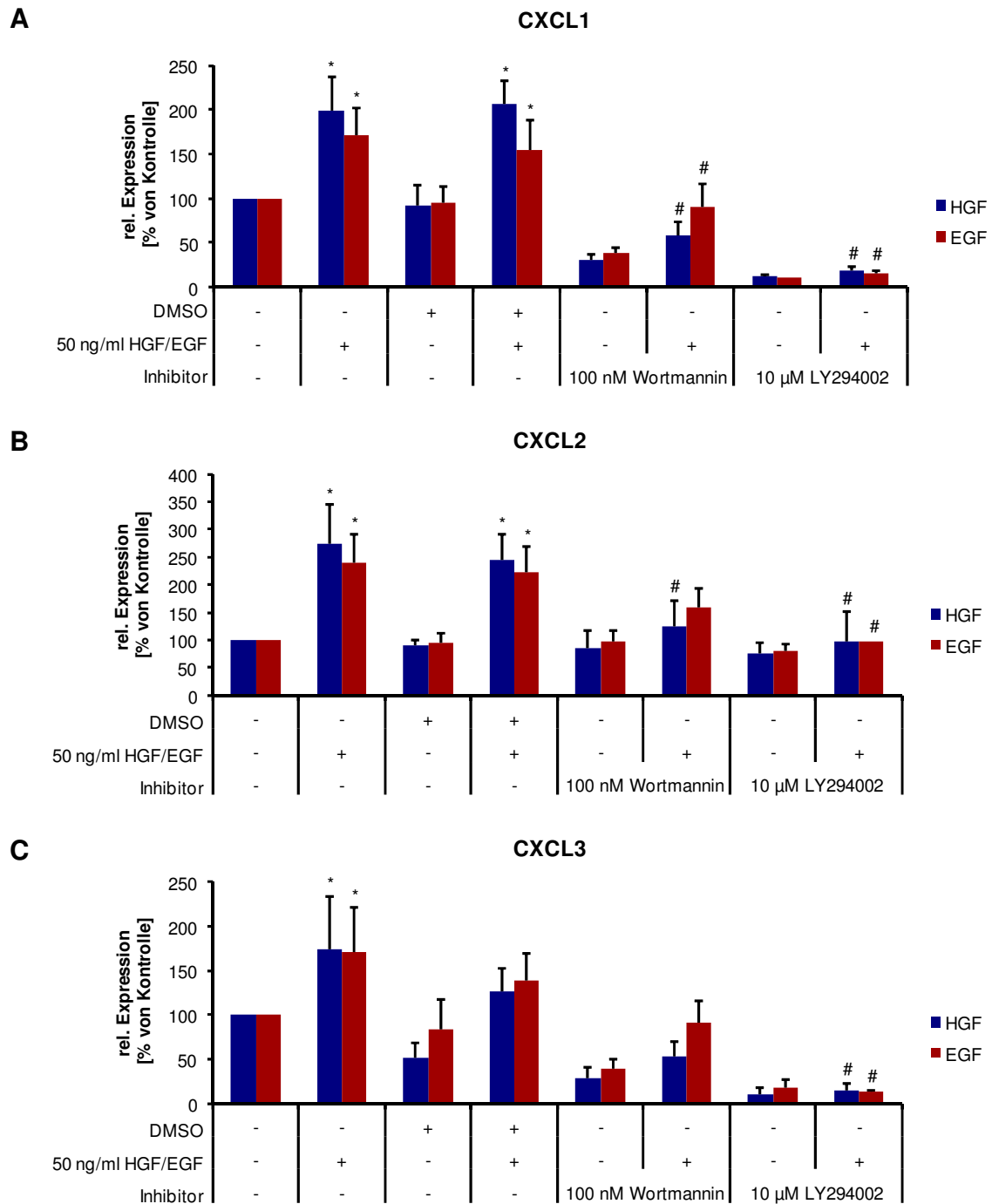


Abbildung 3.7: Bedeutung der PI3-Kinase für die durch HGF und EGF induzierte Chemokinexpression

Murine Hepatozyten wurden eine Stunde mit 100 nM Wortmannin bzw. 10 µM LY294002 vorinkubiert und für zwei Stunden mit 50 ng/ml HGF oder EGF stimuliert. Die mRNA-Expression von CXCL1 (A), CXCL2 (B) und CXCL3 (C) wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) berechnet ($p < 0,05$) und bezieht sich auf die Kontrolle (*) bzw. die mit HGF/EGF-stimulierten Proben, die mit DMSO vorinkubiert wurden (#).

Mit Hilfe des Akt-Inhibitors Triziribin, welcher die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von Akt inhibiert, wurde analysiert, ob die Chemokinexpression über die Kinase Akt reguliert wird, welche der PI3-Kinase nachgeschaltet ist. Die Hepatozyten wurden zunächst für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen Triziribin (50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M) behandelt und anschließend für zwei Stunden mit 50 ng/ml HGF. Die Chemokinexpression wurde mittels qRT-PCR gemessen. Triziribin inhibierte die Expression von CXCL1, induziert durch HGF, in Konzentrationen von 1 μ M und 500 nM, geringere Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Expression (Abbildung 3.8, A). CXCL2 und CXCL3 wurden nur schwach von Akt reguliert, bzw. teilweise sogar verstärkt exprimiert (Abbildung 3.8, B und C).

Da 1 μ M Triziribin die größte Wirkung zeigte, wurde für die Expressions-Analysen mit EGF diese Konzentration verwendet. Auch nach Stimulation mit 50 ng/ml EGF inhibierte Triziribin die mRNA-Expression von CXCL1, während CXCL2 und CXCL3 teilweise sogar noch stärker exprimiert wurden (Abbildung 3.9).

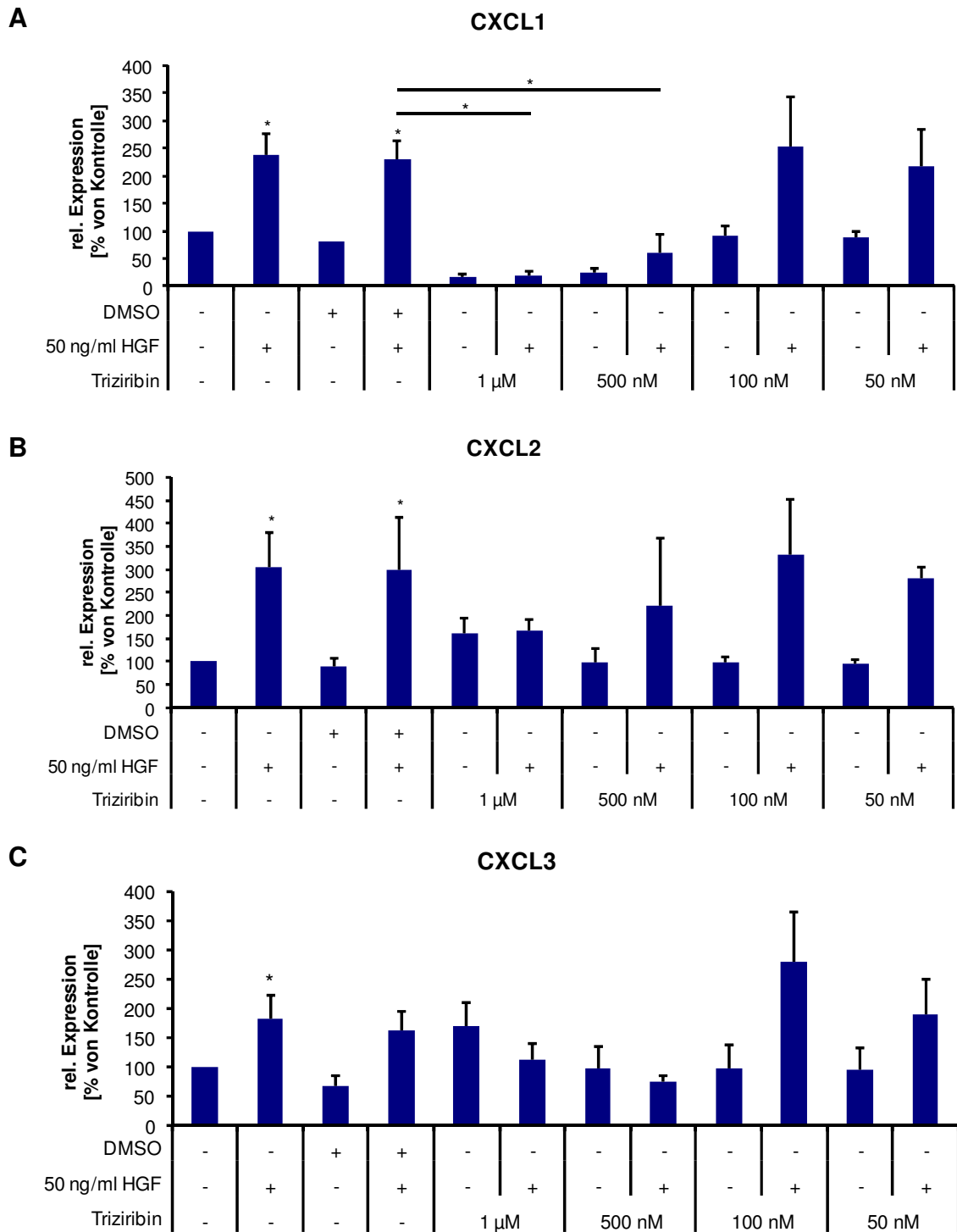


Abbildung 3.8: Einfluss des Akt-Inhibitors Triziribin auf die Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 induziert durch HGF

Murine Hepatozyten wurden eine Stunde mit 1 µM, 500 nM, 100 nM oder 50 nM Triziribin vorinkubiert und für zwei Stunden mit 50 ng/ml HGF stimuliert. Die mRNA-Expression von CXCL1 (A), CXCL2 (B) und CXCL3 (C) wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz (*) wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) berechnet ($p < 0,05$).

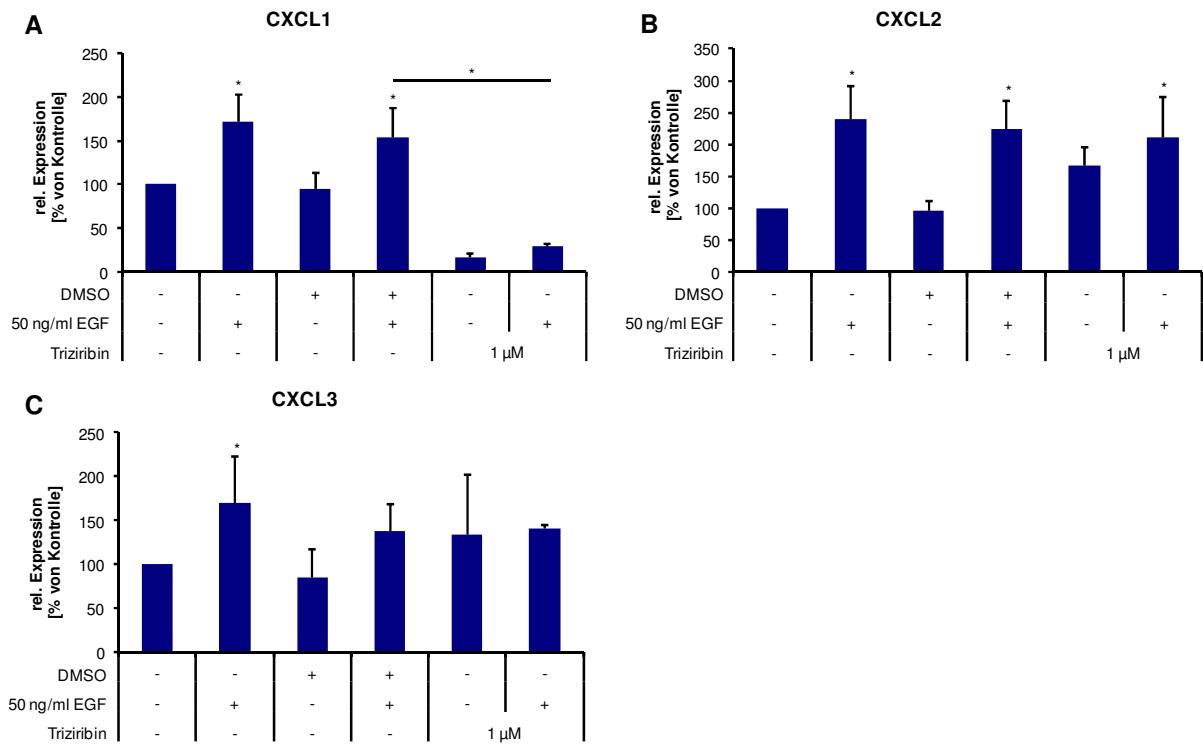


Abbildung 3.9: Einfluss des Akt-Inhibitors Triziribin auf die Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 induziert durch EGF

Murine Hepatozyten wurden eine Stunde mit 1 μ M Triziribin vorinkubiert und für zwei Stunden mit 50 ng/ml EGF stimuliert. Die mRNA-Expression von CXCL1 (A), CXCL2 (B) und CXCL3 (C) wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz (*) wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) berechnet ($p < 0,05$).

Die mRNA-Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3 wird abhängig von der PI3-Kinase reguliert. Der weitere Verlauf der Regulation über den PI3K/Akt-Signalweg ist für jedes Chemokin spezifisch. Nur die Expression von CXCL1 ist abhängig von Akt, so dass sich nun die Frage stellt, wie die Regulation unabhängig von Akt abläuft. Hierfür wurden im Folgenden andere Signalwege analysiert.

3.4.2 Einfluss weiterer Signalwege für die Chemokinsynthese

Wie bereits beschrieben, verläuft die Regulation der Chemokine nicht einheitlich über den PI3K/Akt-Signalweg. Um weiterhin zu klären, wie die Expression der Chemokine reguliert wird, wurden im Folgenden Inhibitoren gegen p38 (SB203580), MEK (U0126) und IKK2 (SC-514) verwendet sowie MK2-Knockout-Mäuse, um die Beteiligung dieser Kinasen an der Regulierung der Chemokinsynthese zu untersuchen. Für diese Versuche wurden die Hepatozyten nur noch mit HGF stimuliert, da EGF ungefähr denselben Effekt hervorruft wie HGF. Auch hier wurden die Hepatozyten zunächst für eine Stunde mit den Inhibitoren vorinkubiert und dann mit 50 ng/ml HGF für zwei Stunden stimuliert. Die Zellen der Knockout-Mäuse wurden für 0 – 16 Stunden mit 50 ng/ml HGF stimuliert. Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 gemessen.

Die mRNA-Expression von CXCL1 wurde reduziert durch die Inhibitoren SC-514 (9 μ M) und SB203580 (5 μ M), welche IKK2 bzw. p38 inhibieren (Abbildung 3.10, A). CXCL2 wurde nur durch den IKK2-Inhibitor SC-514 inhibiert, die anderen drei Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die Expression (Abbildung 3.10, B). Die Expression von CXCL3 wurde durch die Inhibitoren U0126 (0,5 μ M), SC-514 (9 μ M) und SB203580 (5 μ M) verringert (Abbildung 3.10, C).

Zusätzlich zu dem p38-Inhibitor wurden Knockout-Mäuse verwendet, denen die Kinase MK2 fehlt, welche von der Kinase p38 reguliert wird. Die Hepatozyten der MK2-Knockout-Mäuse wurden im Vergleich mit Hepatozyten von Wildtyp-Mäusen mit 50 ng/ml HGF stimuliert. Nach 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 16 Stunden wurde die RNA isoliert und mittels qRT-PCR die Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 gemessen. Die Expression von CXCL1 war nach zwei, vier und sechs Stunden in den MK2-Knockout-Zellen deutlich geringer als in den Wildtyp-Zellen. CXCL2 wurde von den MK2-Knockout-Zellen etwas weniger exprimiert, als in den Wildtyp-Zellen, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Die Expression von CXCL3 zeigte nach vier Stunden eine starke Differenz in den MK2-Knockout-Zellen. Auch zu den übrigen Zeitpunkten waren gering schwächere Expressionen von CXCL3 zu messen.

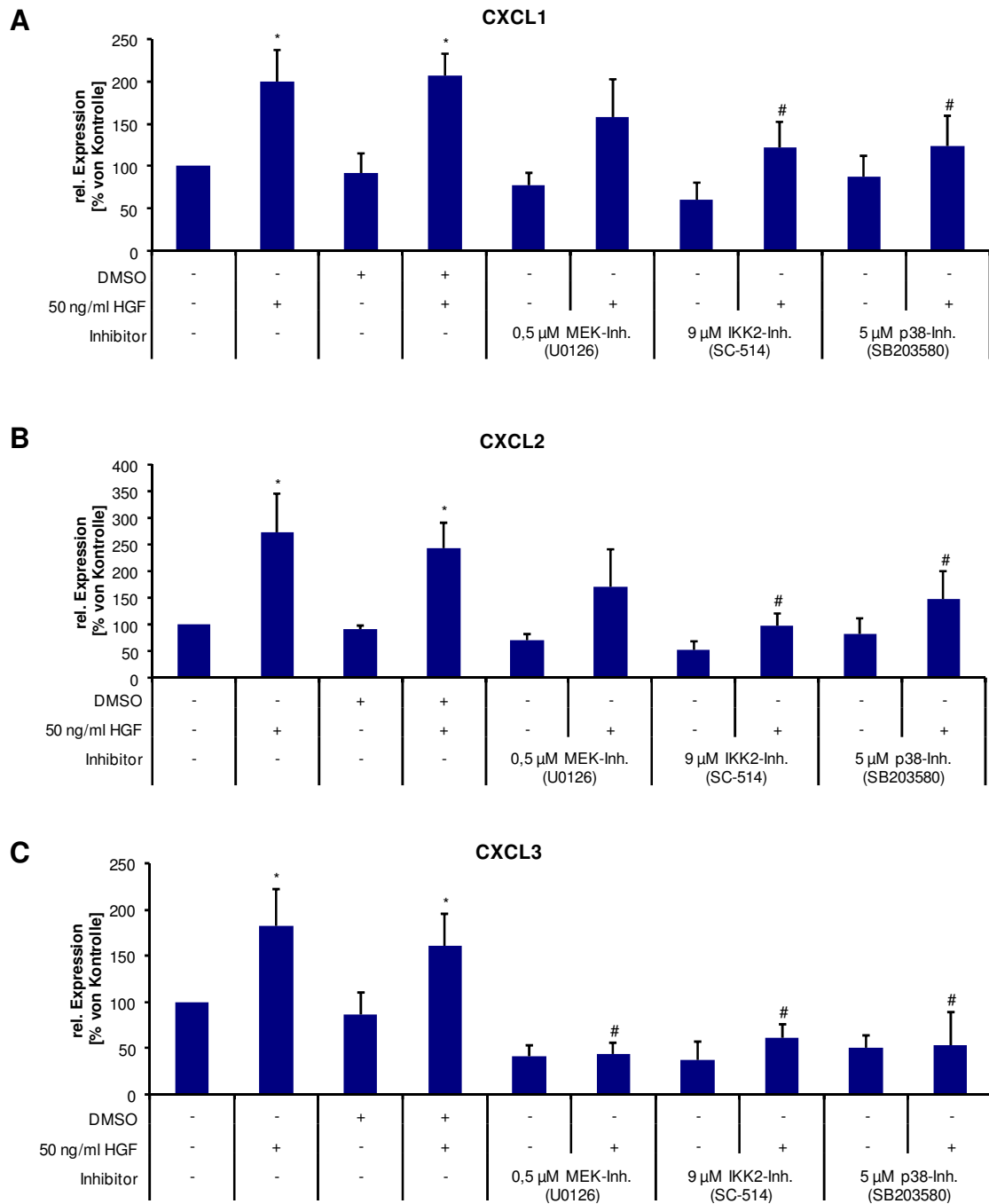


Abbildung 3.10: Chemokinexpression in Abhängigkeit verschiedener Inhibitoren

Murine Hepatozyten wurden eine Stunde mit 0,5 μ M U0126, 9 μ M SC-514 oder 5 μ M SB203580 vorinkubiert und für zwei Stunden mit 50 ng/ml HGF stimuliert. Die mRNA-Expression von CXCL1 (A), CXCL2 (B) und CXCL3 (C) wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) berechnet ($p < 0,05$) und bezieht sich auf die Kontrolle (*) bzw. die mit HGF-stimulierten Proben, die mit DMSO vorinkubiert wurden (#).

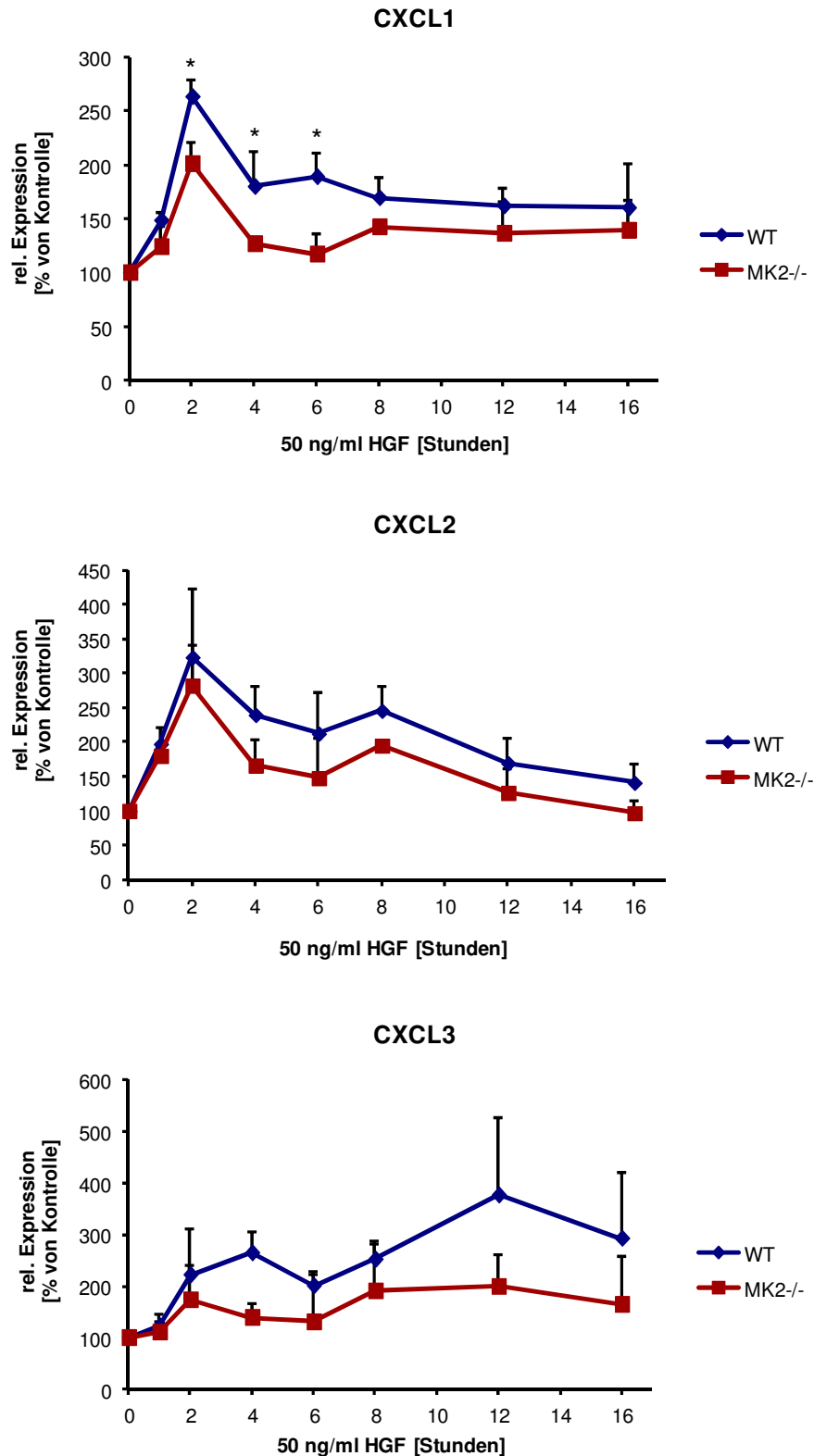


Abbildung 3.11: Vergleich der Chemokinexpression zwischen Wildtyp- und MK2-Knockout-Mäusen

Murine Hepatozyten von Wildtyp- und MK2-Knockout-Mäusen wurden über einen Zeitraum von 16 Stunden mit 50 ng/ml HGF stimuliert. Die mRNA-Expression von CXCL1 (A), CXCL2 (B) und CXCL3 (C) wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA berechnet (* $p < 0,05$). WT: Wildtyp-Maus

Im Folgenden wurde untersucht, über welche Signalwege die Kombination aus HGF und TNF α die Chemokinexpression reguliert. Hierfür wurden murine Hepatozyten zunächst für eine Stunde mit dem entsprechenden Inhibitor bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert und dann für zwei Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml TNF α stimuliert. Für diese Versuche wurde TNF α nur in der geringeren Konzentration verwendet, da bereits 1 ng/ml TNF α in den vorherigen Versuchen einen deutlichen Effekt hervorgerufen hat, der durch eine höhere Konzentration nur teilweise verstärkt wurde (Abbildung 3.3).

Wortmannin (100 nM) inhibierte wie zuvor gezeigt die HGF-induzierte mRNA-Expression von CXCL1 (Abbildung 3.7), während die TNF α -induzierte Expression nur gering inhibiert wurde. Auch die mRNA-Expression, die durch Kombination aus HGF und TNF α induziert wurde, wurde nur leicht durch Wortmannin inhibiert. Der Inhibitor SC-514 (9 μ M) zeigte einen ähnlichen Effekt wie Wortmannin, die TNF α -induzierte Expression von CXCL1 und die Ko-Stimulation wurden nur wenig beeinflusst. Der MEK-Inhibitor U0126 (0,5 μ M) hatte weder auf die HGF-, noch auf die TNF α -induzierte Expression von CXCL1 einen Einfluss, während SB203580 (5 μ M) wie zuvor gezeigt die HGF-induzierte Expression inhibiert. Die Expression von CXCL1 nach Stimulation mit TNF α oder HGF mit TNF α wurde durch SB203580 schwach inhibiert (Abbildung 3.12, A).

Die mRNA-Expression von CXCL2 war sowohl in den Mono-Stimulationen, als auch in der Ko-Stimulation abhängig von der PI3-Kinase und IKK2. Der Inhibitor SB203580 hatte nur einen inhibierenden Einfluss auf die HGF-induzierte Expression, U0126 inhibierte die Expression von CXCL2 nicht (Abbildung 3.12, B).

Die HGF-induzierte mRNA-Expression von CXCL3 wurde von allen vier Inhibitoren reduziert, die TNF α -induzierte Expression nur von SC-514. Die durch die Ko-Stimulation mit HGF und TNF α induzierte mRNA-Expression konnte durch den p38-Inhibitor SB203580 um etwa 50 % gesenkt werden (Abbildung 3.12, C).

Auf Protein-Ebene konnte die Produktion von CXCL1 und CXCL2 durch keinen der Inhibitoren beeinflusst werden. Lediglich SC-514 konnte die Synthese von CXCL2 leicht verringern (Abbildung 3.13).

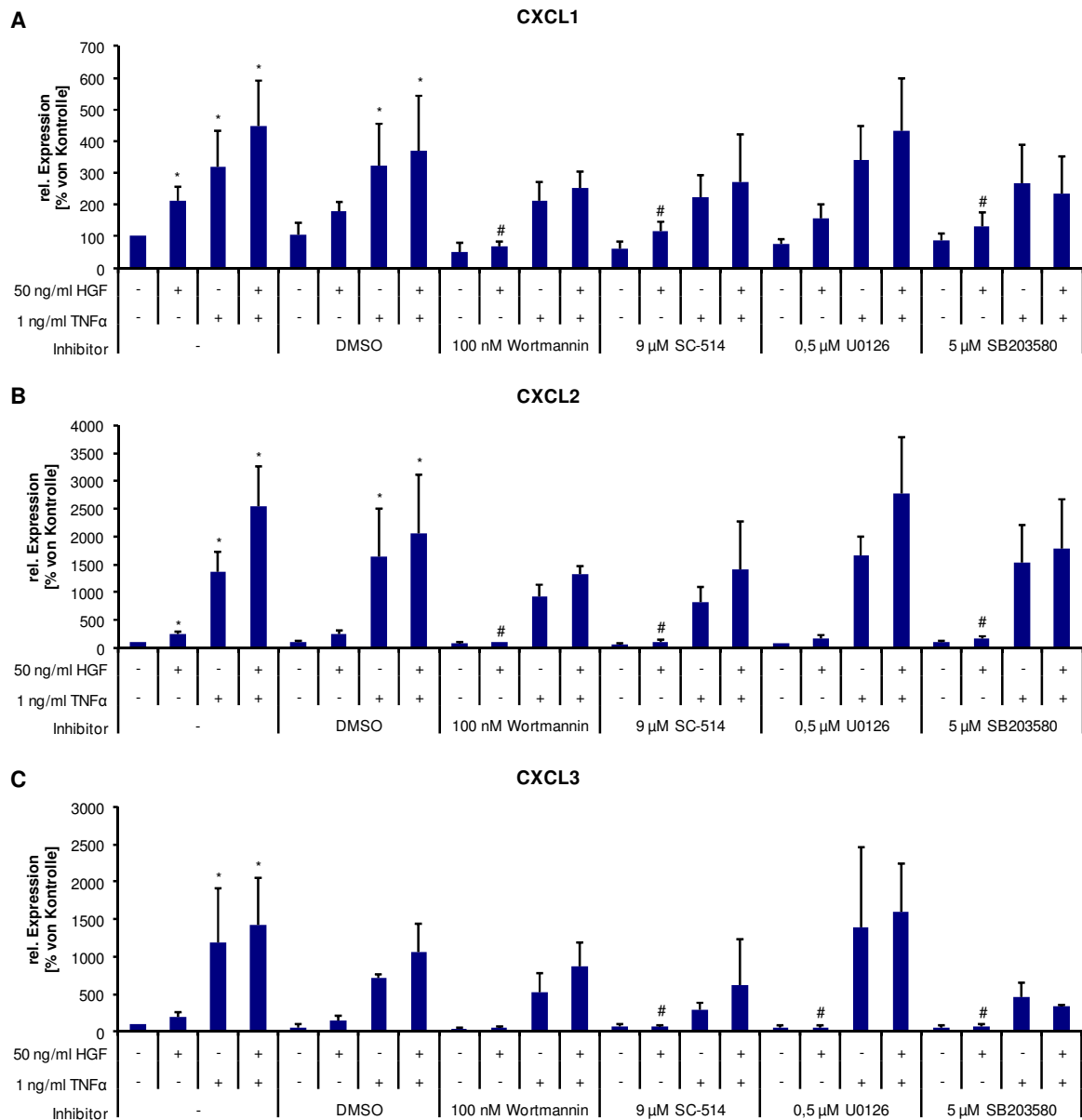


Abbildung 3.12: mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3, induziert durch HGF und TNF α , unter Verwendung verschiedener Inhibitoren

Murine Hepatozyten wurden eine Stunde mit 100 nM Wortmannin, 9 μ M SC-514, 0,5 μ M U0126 oder 5 μ M SB203580 vorinkubiert und für zwei Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml TNF α stimuliert. Die mRNA-Expression von CXCL1 (A), CXCL2 (B) und CXCL3 (C) wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) berechnet ($p < 0,05$) und bezieht sich auf die Kontrolle (*) bzw. die Proben, welche mit DMSO vorinkubiert wurden (#).

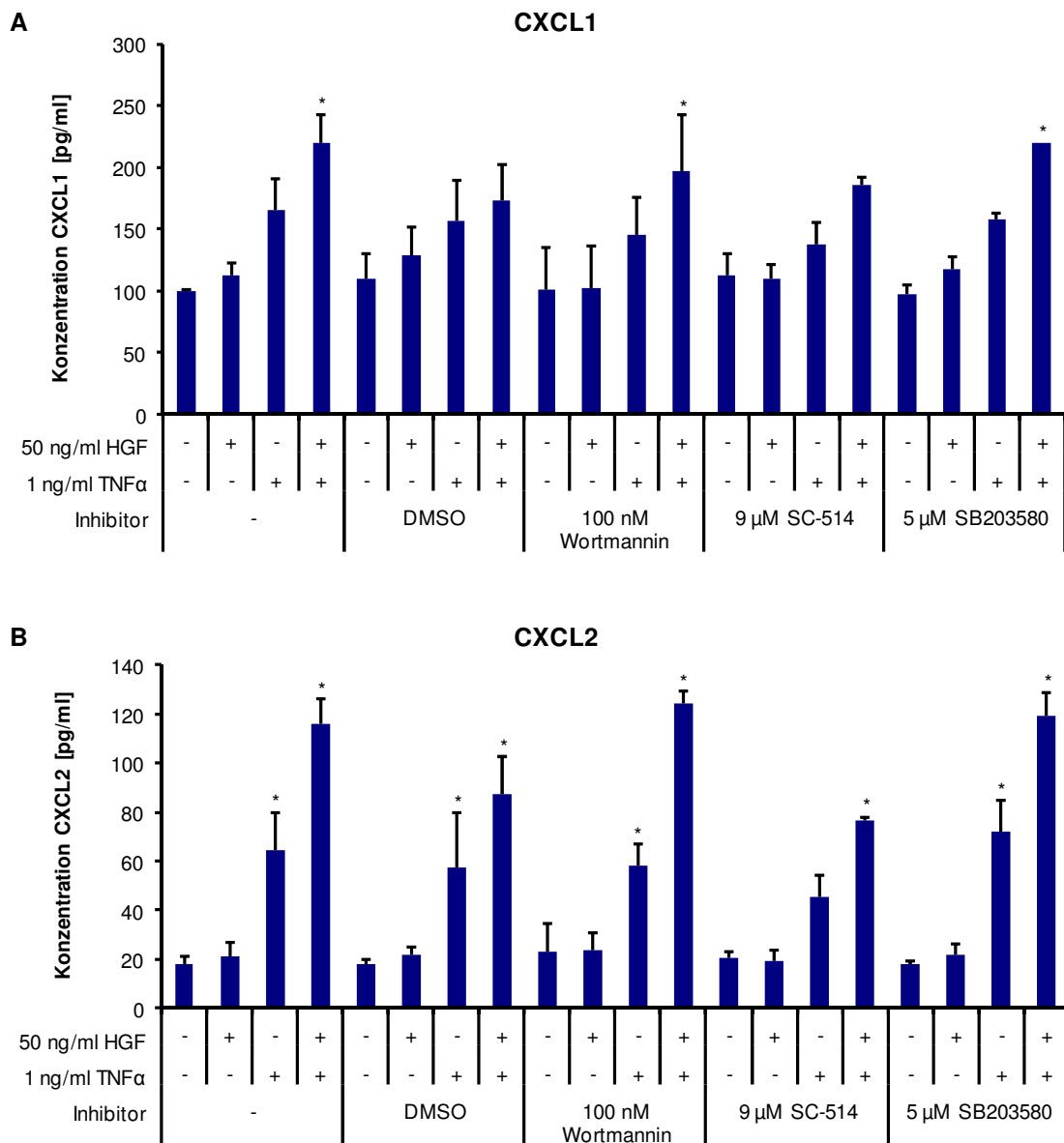


Abbildung 3.13: Protein-Expression von CXCL1 und CXCL2, induziert durch HGF und TNF α , unter Verwendung verschiedener Inhibitoren

Murine Hepatozyten wurden eine Stunde mit 100 nM Wortmannin, 9 μ M SC-514 oder 5 μ M SB203580 vorinkubiert und für zwei Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml TNF α stimuliert. Die Protein-Konzentration von CXCL1 (A) und CXCL2 (B) im Zellkultur-Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) berechnet ($p < 0,05$) und bezieht sich auf die Kontrolle (*).

Zusammenfassend belegen die Daten, dass die Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3 sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene unterschiedlich reguliert werden. Die TNF α -induzierte mRNA-Expression wird nahezu nicht beeinflusst, während die HGF-induzierte Expression abhängig von IKK2 und p38 ist. Die mRNA-Expression von CXCL3 ist zusätzlich von MEK abhängig. Auf Protein-Ebene sind die inhibitorischen Effekte nicht zu erkennen.

3.5 Gegenseitige Beeinflussung von Hepatozyten und Makrophagen

In den vorherigen Versuchen wurden nicht weiter aufgereinigte Hepatozytenkulturen verwendet, die neben den Hepatozyten noch geringe Mengen kontaminierender Leberzellen, wie z. B. Makrophagen, beinhalten. Um einen eventuellen Einfluss der kontaminierenden Makrophagen auf die Hepatozyten zu untersuchen, wurden die Makrophagen mit Hilfe der MACS-Technik und anti-CD11b MicroBeads aus der Hepatozytenkultur nahezu vollständig entfernt. Die Hepatozyten wurden für vier, acht und sechzehn Stunden mit 50 ng/ml HGF, 1 ng/ml TNF α oder einer Kombination der beiden Faktoren stimuliert und die mRNA-Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3 mittels quantitativer Real Time PCR gemessen. Auf mRNA-Ebene konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der nicht aufgereinigten und der Makrophagen-depletierten Hepatozytenkultur gemessen werden (Abbildung 3.14). Die mRNA-Expression von CXCL2 ist in beiden Zellkulturen nahezu identisch (Abbildung 3.14, B), wohingegen CXCL1 und CXCL3 in der Makrophagen-freien Hepatozytenkultur teilweise geringer exprimiert wurden. CXCL1 wurde nach acht Stunden in der unbehandelten Probe und der HGF-stimulierten Probe in der Makrophagen-freien Hepatozytenkultur weniger exprimiert (Abbildung 3.14, A). Auch die Unterschiede in der Expression von CXCL3 waren gering.

Die Produktion von CXCL1 und CXCL2 wurde zusätzlich auf Protein-Ebene mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurden die Hepatozyten wie zuvor für vier, acht und sechzehn Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml TNF α stimuliert und die Proteinkonzentration im Überstand gemessen. Sowohl die Konzentration von CXCL1 als auch die von CXCL2 war interessanterweise in der Makrophagen-freien Hepatozytenkultur deutlich höher als in der Hepatozytenkultur mit Makrophagen (Abbildung 3.15). Die Konzentration beider Chemokine wurde in beiden Hepatozytenkulturen im Laufe der Zeit immer größer, mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Zellkulturen bei nahezu allen Proben. Am deutlichsten sind die Unterschiede in den Proben zu erkennen, die sowohl mit HGF als auch mit TNF α stimuliert wurden.

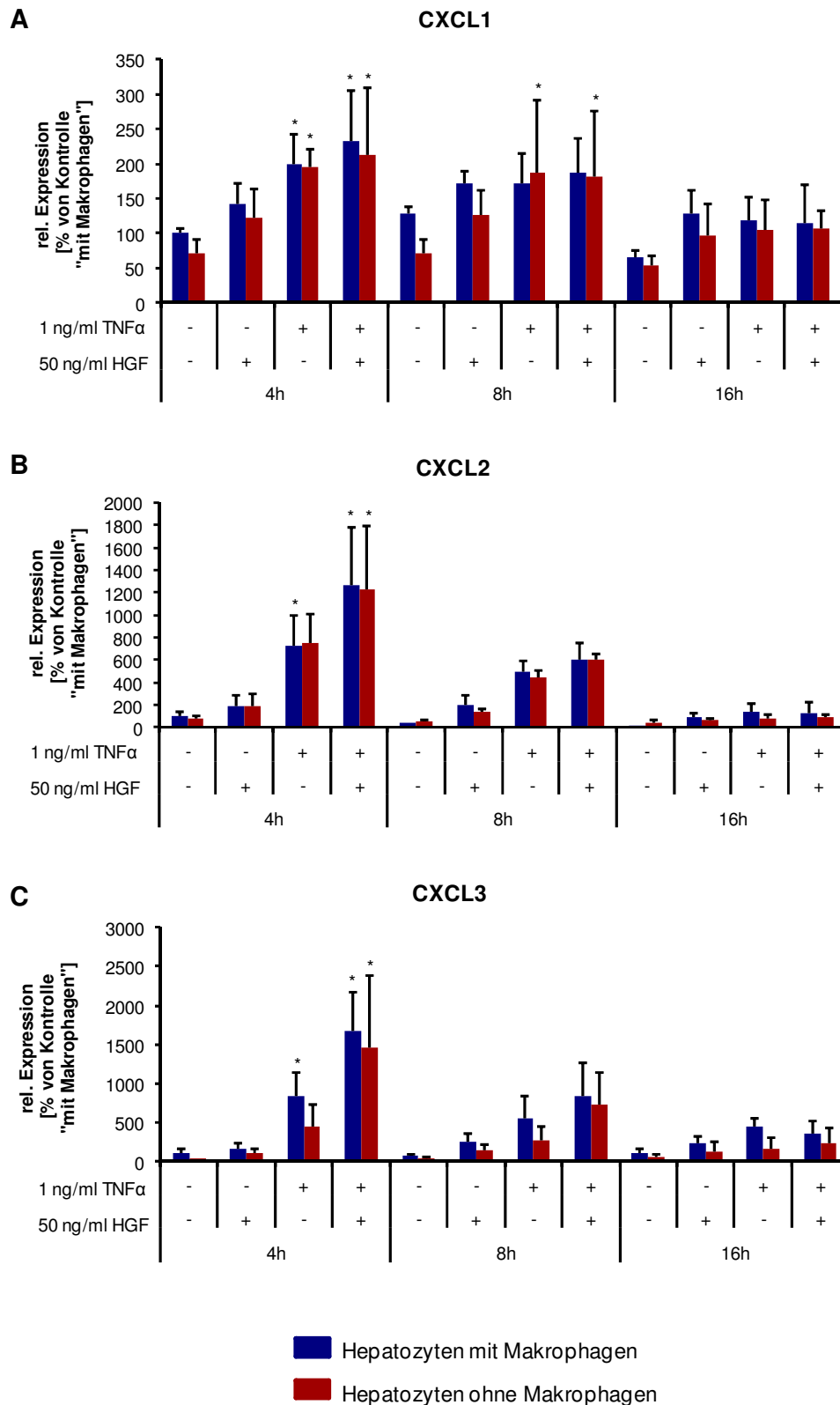


Abbildung 3.14: Chemokinexpression nach gleichzeitiger Stimulation mit HGF und TNF α in Hepatozytenkulturen mit und ohne Makrophagen

Murine Hepatozyten wurden für vier, acht und sechzehn Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml TNF α stimuliert. Die Makrophagen in der Hepatozytenkultur wurden unter Verwendung der MACS-Technik und Verwendung der anti-CD11b MicroBeads entfernt. Die mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle der Hepatozyten mit Makrophagen normalisiert. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorier Varianzanalyse (ANOVA) berechnet (* $p < 0,05$).

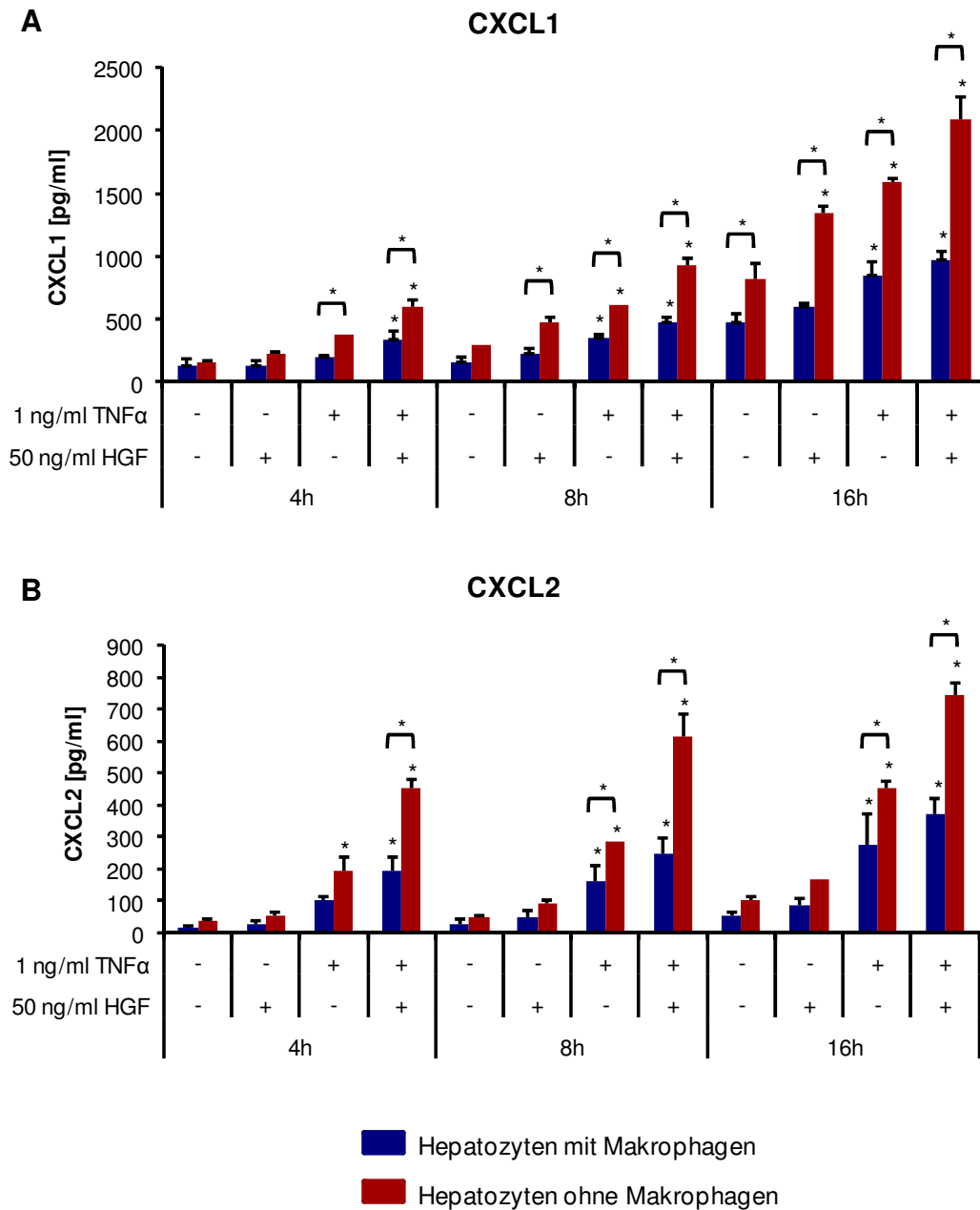


Abbildung 3.15: Protein-Expression von CXCL1 und CXCL2 nach gleichzeitiger Stimulation mit HGF und TNF α in Hepatozytenkulturen mit und ohne Makrophagen

Murine Hepatozyten wurden für vier, acht und sechzehn Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml TNF α stimuliert. Die Makrophagen in der Hepatozytenkultur wurden unter Verwendung der MACS-Technik und anti-CD11b MicroBeads entfernt. Die Proteinkonzentration von CXCL1 und CXCL2 im Zellkultur-Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA berechnet (* $p < 0,05$).

Um den gegenseitigen Einfluss von Hepatozyten und Makrophagen aufeinander besser analysieren zu können, wurde das System der Ko-Kultur angewandt. Hierfür wurden die Makrophagen durch eine Membran von den Hepatozyten getrennt, so dass Substanzen durch die Membran hindurch gelangen können, die Zellen aber voneinander getrennt bleiben. Dies ermöglicht es, beide Zelltypen nach einer Stimulation weiter zu analysieren. Die Zellen wurden für zwei, vier und 24 Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml TNF α stimuliert und die Chemokinexpression der Hepatozyten mittels qRT-PCR gemessen. CXCL1 wurde von Hepatozyten, die mit Makrophagen ko-kultiviert wurden, weniger exprimiert im Vergleich zur Mono-Kultur. CXCL2 und CXCL3 zeigten keine Unterschiede in der Expression in mono- und ko-kultivierten Hepatozyten (Abbildung 3.16).

Die Ergebnisse legen nahe, dass eine Beeinflussung der Hepatozyten durch die Makrophagen vorliegt, was vor allem auf Protein-Ebene sichtbar wird. Im Ko-Kultur-System ist ein Einfluss der Makrophagen in der mRNA-Expression von CXCL1 zu erkennen.

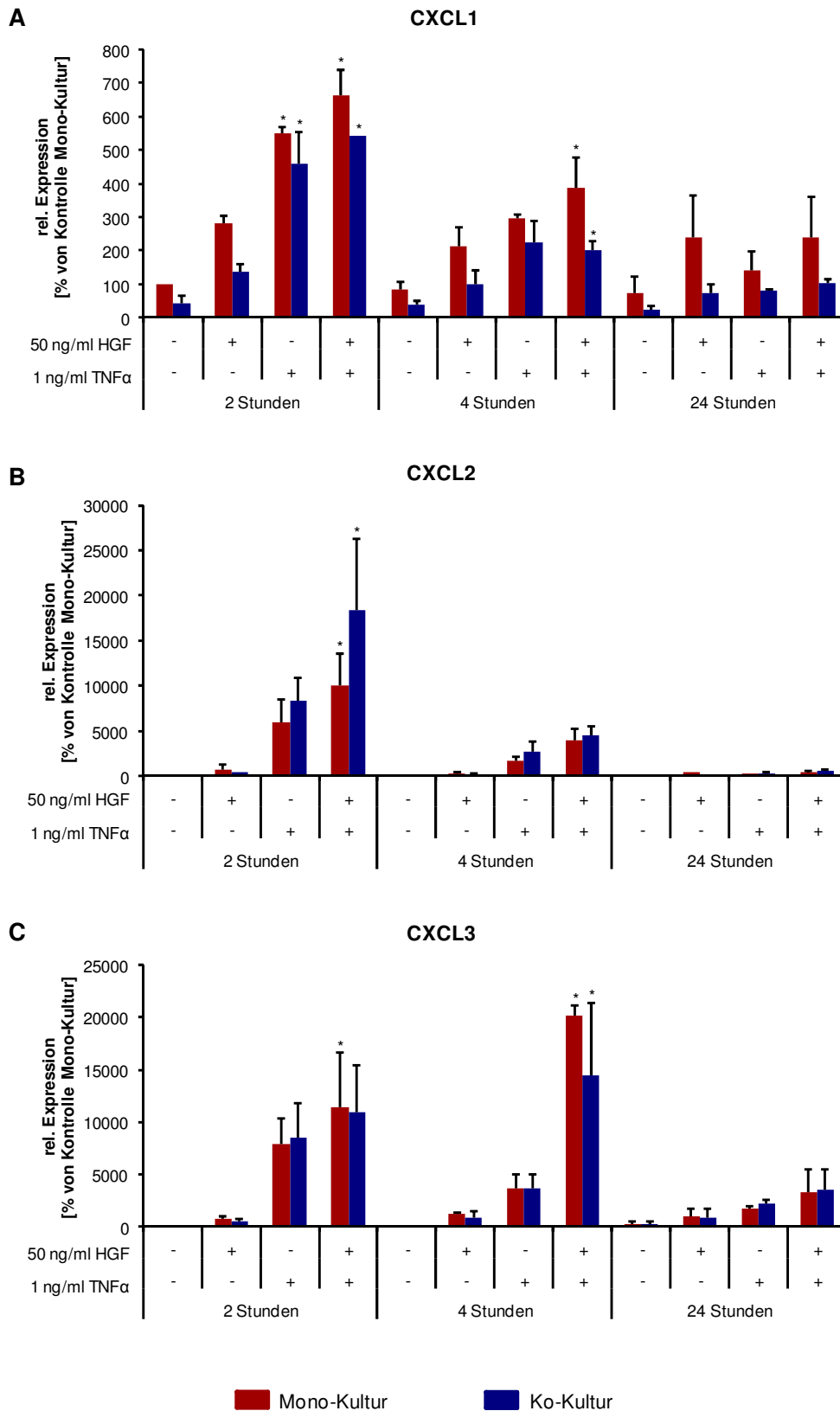


Abbildung 3.16: Chemokinexpression der Hepatozyten im Vergleich zwischen Mono- und Ko-Kultur
 Murine Hepatozyten wurden für zwei, vier und 24 Stunden mit 50 ng/ml HGF und 1 ng/ml TNFα stimuliert. Die Zellen wurden alleine kultiviert (Mono-Kultur) oder in Ko-Kultur mit Makrophagen. Die mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 wurde mittels qRT-PCR gemessen. Zur Auswertung wurde die Δ CT-Methode mit SDHA als Referenzgen verwendet. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle der Hepatozyten in Mono-Kultur normalisiert. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) berechnet (* $p < 0,05$).

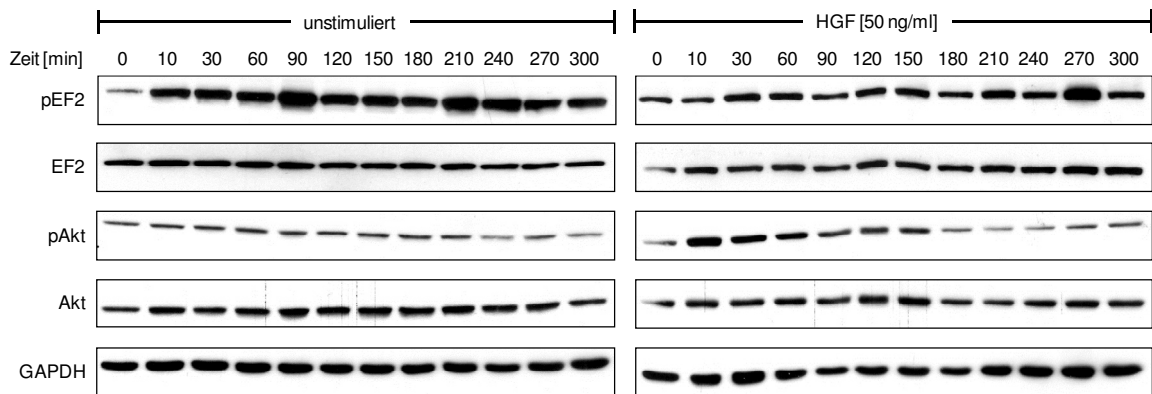
3.6 Einfluss von HGF auf die Proteinbiosynthese in Hepatozyten

Der Wachstumsfaktor HGF spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation der Hepatozyten. In einem weiteren kleinen Projektteil wurde untersucht, ob HGF die Genexpression nur auf Ebene der Transkription reguliert oder auch auf Translationsebene. Hierfür wurden Faktoren analysiert, die über verschiedene Signalwege die Translationsmaschinerie regulieren, wie Akt und EF2. Von besonderer Bedeutung ist hier der Translations-Elongationsfaktor 2 (EF2), da dieser direkt an der Translation beteiligt ist. Weiterhin wurde untersucht, ob HGF die Gesamtproteinsynthese beeinflusst.

3.6.1 Kontrolle translations-regulatorischer Faktoren durch HGF

Der Translations-Elongationsfaktor 2 wird unter anderem über den PI3K/Akt Signalweg reguliert und sorgt im aktiven Zustand durch Konformationsänderungen dafür, dass das Ribosom an der mRNA entlangwandert und die Aminosäurekette verlängert werden kann. EF2 ist im phosphorylierten Zustand inaktiv und wird erst durch Dephosphorylierung aktiviert. Um den Einfluss von HGF auf die Aktivität von EF2 zu untersuchen, wurde sowohl die Phosphorylierung von EF2 als auch die der Kinase Akt im Western Blot gemessen (Abbildung 3.17). HGF steigerte die Phosphorylierung von Akt innerhalb von 10 Minuten, jedoch nahm die Phosphorylierung über einen Zeitraum von 5 Stunden kontinuierlich wieder ab. Hinsichtlich der Phosphorylierung von EF2 ließ sich kein signifikanter Einfluss von HGF auf die basalen Schwankungen der Phosphorylierung feststellen. Auch konnte kein Einfluss der Zelldichte auf das Phosphorylierungsverhalten von EF2 unter basalen Bedingungen sowie unter Stimulation mit HGF nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

A



B

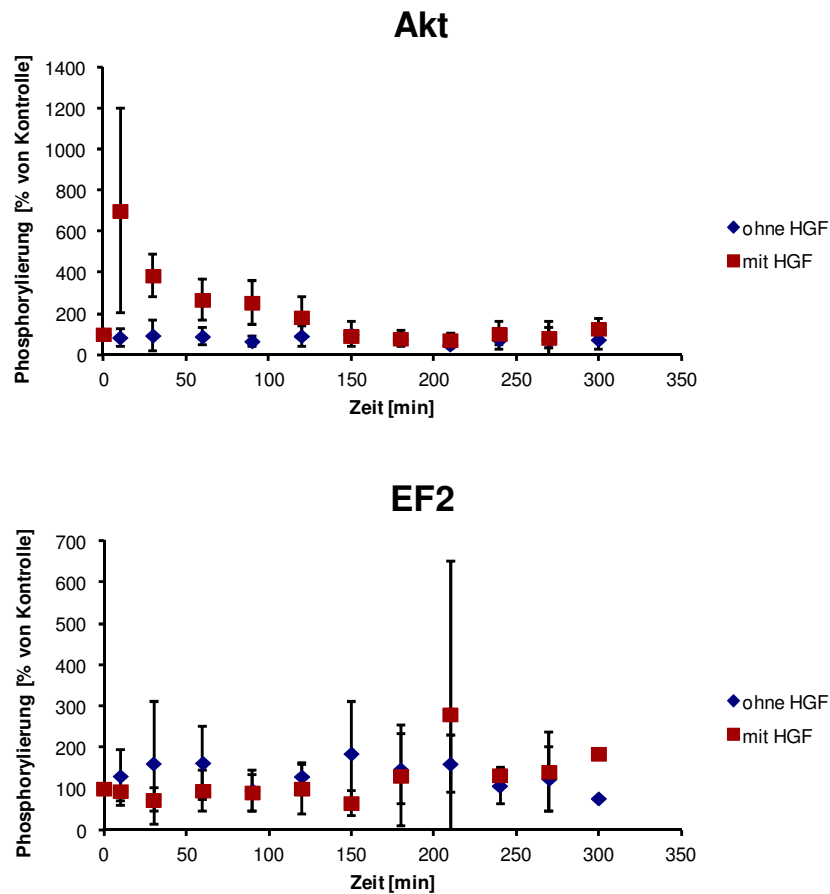


Abbildung 3.17: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von EF2 und Akt

A: Murine Hepatozyten wurden über einen Zeitraum von 5 Stunden mit 50 ng/ml HGF stimuliert. Zu jedem Zeitpunkt wurde eine unstimulierte Kontrolle geerntet. 10 µg Gesamtprotein wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Phosphorylierung von EF2 und Akt wurde mit spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes Akt (Ser⁴⁷³) und phosphoryliertes EF2 (Thr⁵⁶) visualisiert. Gesamt-EF2, Gesamt-Akt und GAPDH dienten als Beladungskontrolle.

B: Die Auswertung der Western Blots erfolgte mittels einer densitometrischen Messung der Banden. Die Mittelwerte wurden aus vier unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Standardabweichung wurde auf der Grundlage von vier unabhängigen Experimenten erstellt.

Analyse der *de novo* Proteinsynthese

Da HGF zu keiner signifikanten Phosphorylierung von EF2 führte, was die translationale Aktivität von EF2 widerspiegelt, wurde weiterhin der Einfluss von HGF auf die Gesamtproteinsynthese untersucht. Hierzu wurde dem Zellkultur-Medium Tritium-markiertes Leucin beigelegt, welches bei der Proteinsynthese in die Proteine eingebaut wird. Durch Messung der Radioaktivität der Proteinlysate konnte die Menge der Proteinsynthese bestimmt werden.

Über einen Zeitraum von 16 Stunden konnte ein deutlicher Anstieg der Radioaktivität gemessen werden, was eine erhöhte Proteinsynthese widerspiegelt (Abbildung 3.18). Auch hatte HGF hierauf keinen Einfluss. Die unbehandelten Kontrollen zeigten ebenfalls einen Anstieg der Radioaktivität, welche durch HGF nicht verstärkt werden konnte. Die Zelldichte der Hepatozyten hatte wie zuvor bei der Phosphorylierung von EF2 keinen Einfluss.

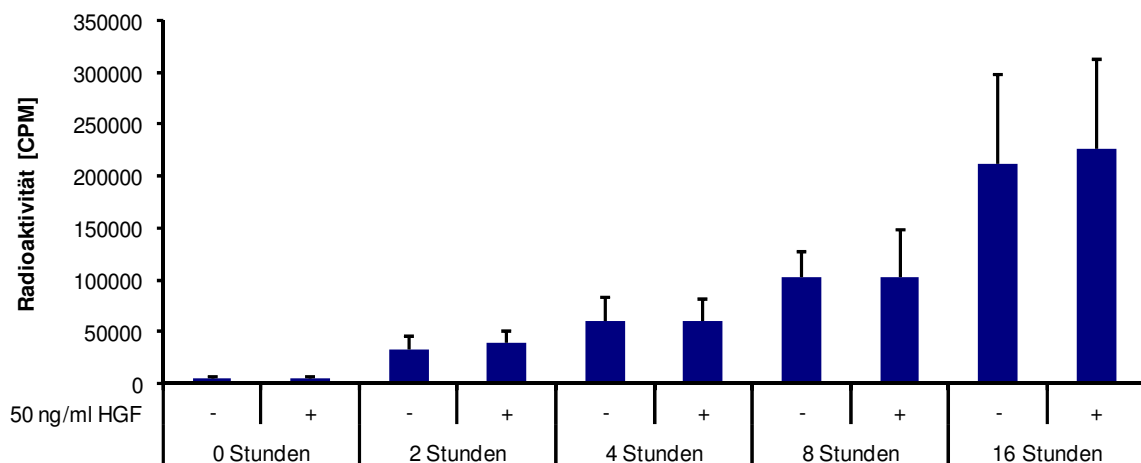


Abbildung 3.18: Messung der Proteinsynthese in murinen Hepatozyten

Murine Hepatozyten wurden in Kulturmedium mit $0,5 \mu\text{Ci/ml}$ L-[4,5- ^3H]-Leucin bis zu 16 Stunden mit bzw. ohne 50 ng/ml HGF inkubiert. Nach 2, 4, 8 und 16 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Radioaktivität der Proteinlysate im Flüssig-Szintillationszähler bestimmt. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und auf die Kontrolle normalisiert.

Anhand der gezeigten Ergebnisse lässt sich kein Einfluss von HGF auf die Proteinsynthese feststellen.

4 Diskussion

4.1 Chemokinexpression unter Einfluss verschiedener regenerations-relevanter Faktoren

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ist ein wichtiges Detail der Leberregeneration. Da dieser Prozess hauptsächlich von Chemokinen gesteuert wird, war die zentrale Fragestellung dieser Arbeit, in wie weit Hepatozyten an der Chemokinsynthese beteiligt sind, und ob regenerations-relevante Faktoren wie HGF und TNF α in der Lage sind die Produktion von Chemokinen in Hepatozyten zu induzieren. Im Vordergrund standen hierbei die CXCR2-Liganden CXCL1, CXCL2 und CXCL3, welche für die Neutrophilenrekrutierung und Angiogenese von Bedeutung sind.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit konnte belegt werden, dass Hepatozyten in der Lage sind, nach Stimulation mit regenerations-relevanten Faktoren Chemokine verstärkt zu exprimieren. HGF und EGF konnten die Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 nur schwach induzieren, wohingegen IL-1 β und TNF α sehr potente Induktoren darstellten. TGF β führte langfristig gesehen zu einer Inhibierung der Chemokinsynthese.

Über die Regulation der Chemokinexpression in Hepatozyten im Rahmen der Leberregeneration ist bislang wenig bekannt. Viele Arbeiten beschäftigen sich mit den Signalwegen, die durch Bindung von Chemokinen an die entsprechenden Rezeptoren aktiviert werden [Nibbs and Graham, 2013; Patel *et al.*, 2013], aber über welche Signalwege die Expression der Chemokine selbst reguliert wird, ist kaum erforscht. Zunächst wurde der Einfluss der Regenerations-relevanten Faktoren HGF, EGF, IL-1 β , TNF α und TGF β auf die Expression der CXC-Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3 untersucht. Bereits hier gibt es erste Anzeichen, dass die drei Chemokine unterschiedlich reguliert werden. HGF und EGF konnten in etwa die gleiche Reaktion hervorrufen, wohingegen IL-1 β , TNF α und TGF β die drei Chemokine unterschiedlich induzierten bzw. inhibierten (Abbildung 3.1). TGF β hat die Expression von CXCL1 bereits in der ersten Stunde inhibiert, während CXCL2 zunächst verstärkt exprimiert wurden und erst nach einigen Stunden inhibiert wurden. Langfristig gesehen wurden aber alle drei Chemokine durch TGF β inhibiert. Oh *et al.* konnten in Astrozyten einen ähnlichen Effekt beobachten. So hatte TGF β auf verschiedene Chemokine einen verstärkenden oder inhibierenden Effekt in Kombination mit TNF α oder IL-1 β [Oh *et al.*, 1999]. Auch in Tumorzellen unterdrückt TGF β die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine wie CXCL1 und CXCL5 [Pickup *et al.*, 2013].

Es gibt zahlreiche Arbeiten über die Expression von verschiedenen Chemokinen nach Stimulation mit HGF, EGF, IL-1 β , TNF α oder TGF β in unterschiedlichen Zelltypen [Bhardwaj *et al.*, 2013; Calkins *et al.*, 2002; Roach *et al.*, 2002; Scarpino *et al.*, 2000; Sheng *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2013], aber die in dieser Arbeit untersuchten Chemokine wurden im Zusammenhang mit der Leberregeneration bzw. regenerations-relevanten Faktoren nur wenig oder nicht untersucht.

Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurden HGF und TNF α in den Vordergrund gestellt und die Chemokinexpression in den für die Leberregeneration wichtigsten Zelltypen, den Hepatozyten und den Makrophagen, analysiert. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Chemokine nicht in beiden Zelltypen gleichstark exprimiert werden. Die Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 wird durch HGF in den Hepatozyten stärker exprimiert als in den Makrophagen. In diesen Zellen bewirkt HGF nur kaum eine Verstärkung der mRNA-Expression, auf Protein-Ebene hat HGF keinen Einfluss. TNF α führt in beiden Zelltypen zu einem deutlichen Anstieg der Chemokin-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene. CXCL1 wird auch nach Stimulation mit TNF α nur gering von den Makrophagen produziert, was zu der Annahme führt, dass im Rahmen der Leberregeneration die Hepatozyten relevante Produzenten von CXCL1 sind.

Die Ko-Stimulation von HGF und TNF α zeigt in Hepatozyten einen verstärkenden Effekt von HGF auf TNF α , welcher in den Makrophagen nicht erkennbar ist.

Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren wurde versucht, ein Modell der Chemokin-Regulation zu erstellen, da hierzu bislang wenig bekannt ist (Abbildung 4.1).

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass die HGF-induzierte mRNA-Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 über die PI3-Kinase reguliert wird, der weitere Signalweg ist allerdings für jedes Chemokin spezifisch. Auch Gong *et al.* konnten in Nierenzellen zeigen, dass die HGF-induzierte Chemokin-Expression vom PI3K/Akt-Signalweg abhängig ist [Gong *et al.*, 2005]. Die der PI3-Kinase nachgeschaltete Kinase Akt ist lediglich für die Expression von CXCL1 von Bedeutung. Die Befunde aus den Inhibitor-Studien legen nahe, dass die anderen beiden Chemokine auch nach Inhibierung von Akt weiterhin exprimiert werden. Ebenso führen die Versuche mit Inhibitoren gegen IKK2 und p38/MK2 zu der Annahme, dass diese Kinasen für alle drei Chemokine wichtig sind, MEK hingegen spielt nur für die Expression von CXCL3 eine Rolle. Wie die Signalwege untereinander verbunden sind und in wie weit die PI3-Kinase IKK2, Akt, p38/MK2 und MEK beeinflusst, ist in diesem Kontext nicht bekannt.

Wenn man jedoch die Protein-Expression der drei Chemokine nach Stimulation mit HGF betrachtet, zeigt keiner der Inhibitoren einen deutlichen Effekt. Da auch nach Inhibition noch eine geringe Menge mRNA vorhanden ist, stellt sich die Frage, ob diese Menge ausreicht, um dieselbe Menge an Proteinen zu synthetisieren, wie in den Kontrollen. Dies könnte durch eine Stabilisierung der mRNA ermöglicht werden. Liegt eine sehr stabile mRNA vor, kann die Proteinsynthese auch noch einige Zeit nach Inaktivierung der Gene bzw. der Transkription stattfinden. Die Arbeitsgruppe um Thomas Hamilton hat mehrfach beschrieben, dass die mRNA von Chemokinen durch bestimmte Zytokine, u.a. IL-17 und TNF α , stabilisiert wird [Biswas *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2011]. Evtl. führt auch die Stimulation mit HGF und TNF α zu einer Stabilisierung der mRNA, so dass weiterhin Proteine synthetisiert werden können, und die Inhibitoren somit keinen Effekt hervorrufen. Dies muss in weiteren Studien überprüft werden.

TNF α führt ebenfalls zu einer vermehrten Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene. Die Expression war im Vergleich zur HGF-induzierten wesentlich stärker. Wie die TNF α -induzierte Expression reguliert wird, ist nicht eindeutig erkennbar, da durch Verwendung der Inhibitoren die Chemokinexpression nur leicht verringert wird. Alle drei Chemokine werden auf mRNA-Ebene durch Wortmannin und SC-514 beeinflusst, CXCL3 zusätzlich durch den p38-Inhibitor SB203580. Auf Protein-Ebene ist lediglich für CXCL2 eine schwache Regulation durch IKK2 zu erkennen. In anderen Zelltypen ist bekannt, dass TNF α die Expression einiger Chemokine über die Kinase p38 reguliert [Sheng *et al.*, 2005]. Gegenstand künftiger Arbeiten wird die Verwendung weiterer Inhibitoren gegen andere Mitglieder der vielen verschiedenen Signalwege sein, über welche die TNF α -induzierte Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 reguliert werden könnte.

Generell ist sehr wenig über die Regulation der Chemokine unter Einfluss von HGF und TNF α bekannt, so dass hier noch einige Arbeiten durchgeführt werden müssen.

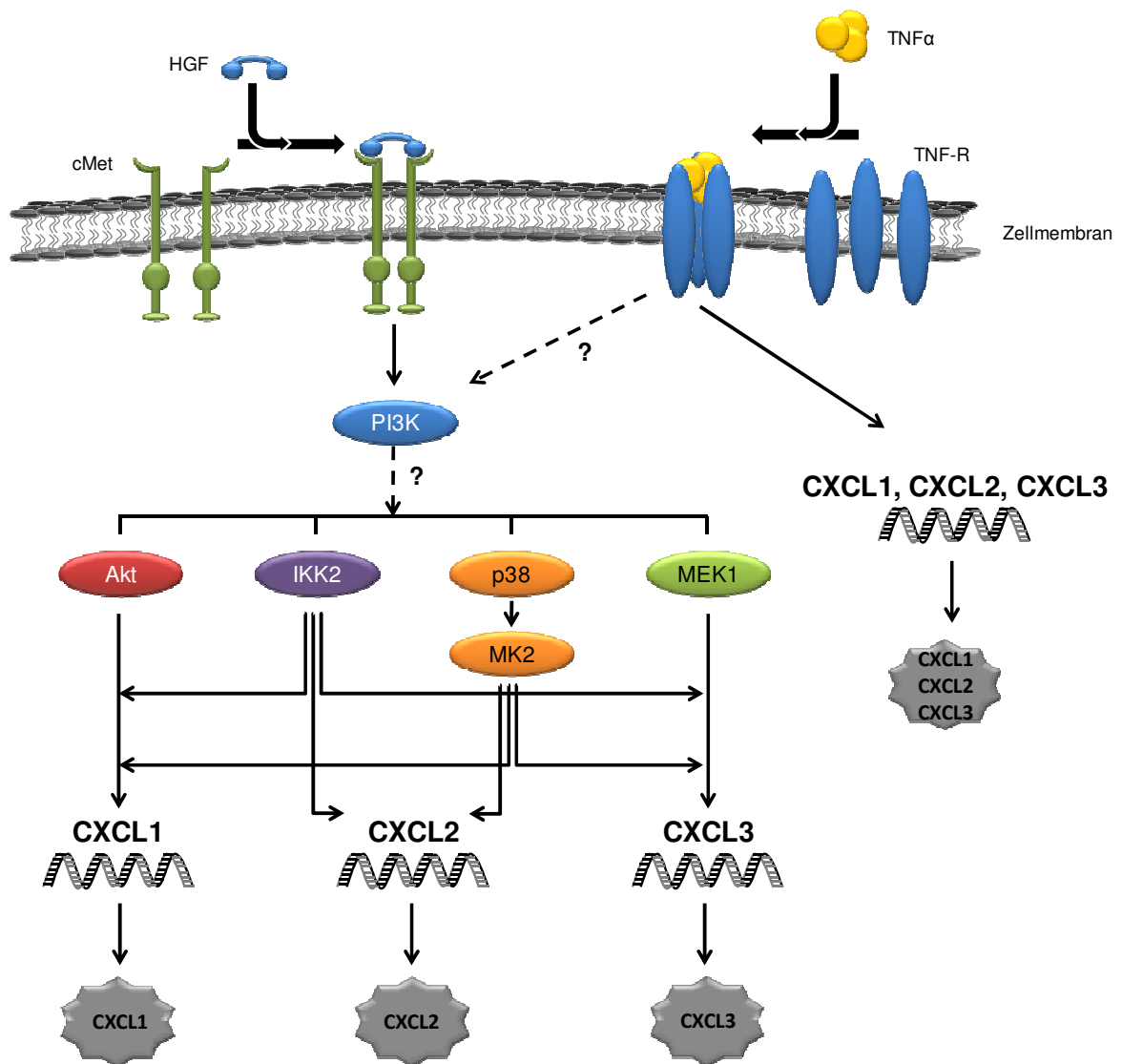


Abbildung 4.1: Zusammenfassendes Model der Chemokin-Regulation

Zusammenfassende Darstellung der Regulation der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL3, induziert durch HGF und TNF α . Nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor werden über die PI3-Kinase und verschiedene andere Kinasen die Chemokine unterschiedlich reguliert. Nähere Erläuterungen im Text.

4.2 Einfluss der CXC-Chemokine auf das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten und Leber-Endothelzellen

Chemokine spielen eine wichtige Rolle in der Induktion der Migration von Leukozyten [Nomiya *et al.*, 2010], was im Rahmen der Leberregeneration ein wichtiger Schritt ist. Das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten im Rahmen der Leberregeneration sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden. Nachdem festgestellt werden konnte, dass sowohl Hepatozyten als auch Makrophagen nach Stimulation mit HGF und TNF α verstärkt Chemokine produzieren, wurden die Zellkultur-Überstände der stimulierten Zellen für die Migrationsversuche verwendet. Es ist deutlich zu erkennen, dass nur Überstände von kultivierten Hepatozyten die Migration neutrophiler Granulozyten auslösen, wenn die Hepatozyten zuvor mit HGF und TNF α in Kombination stimuliert wurden. Da HGF die TNF α -induzierte Chemokin-Expression scheinbar noch verstärkt, muss wohl eine bestimmte Konzentration an Chemokinen vorhanden sein, um eine Migration auslösen zu können. Diese Konzentration kann alleine durch HGF oder TNF α nicht erreicht werden.

Die Verwendung von Makrophagen-Überständen führte nicht zu einer Migration der neutrophilen Granulozyten, obwohl auch diese Zellen nach Stimulation mit HGF und TNF α verstärkt Chemokine sezernieren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Hepatozyten und Makrophagen unterschiedliche Chemokine nach Stimulation mit HGF und TNF α produzieren, von denen nicht alle eine Migration auslösen können. Wie in 3.2 beschrieben, wird CXCL1 nach Stimulation mit HGF und TNF α hauptsächlich von Hepatozyten produziert und in viel geringeren Mengen von Makrophagen, während CXCL2 von beiden Zelltypen annähernd gleich stark exprimiert wird. Dies lässt vermuten, dass CXCL1 eine wichtige Rolle in der Induktion der Migration spielt und CXCL2 weniger Einfluss hat. Die Arbeitsgruppe um De Filippo konnte zeigen, dass *in vivo* die Migration neutrophiler Granulozyten abhängig von CXCL1 und CXCL2 ist [De Filippo *et al.*, 2008]. Auch Matzer *et al.* konnten eine CXCR2-abhängige, durch CXCL2 induzierte Migration messen [Matzer *et al.*, 2004].

Hier muss in weiteren Studien überprüft werden, welche Chemokine in den Hepatozyten, aber nicht in Makrophagen durch HGF und TNF α produziert werden und so die Migration auslösen können.

Die Sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) spielen vor allem für die Angiogenese eine wichtige Rolle, so dass auch diese Zellen die Fähigkeit zur Migration besitzen [Lamalice *et al.*, 2007]. In den Versuchen mit Zellkultur-Überständen von Hepatozyten

war jedoch keine Migration der LSEC messbar. Evtl. werden die hierfür benötigten Chemokine von den Hepatozyten nicht durch Stimulation mit HGF und TNF α sezerniert. Weiterhin ist bekannt, dass die Proliferation und Migration von Endothelzellen hauptsächlich durch VEGF reguliert wird [Olsson *et al.*, 2006]. Auch hier müsste in weiteren Forschungsarbeiten geklärt werden, in wie fern Hepatozyten einen Einfluss auf die Migration von LSEC haben und ob Chemokine dabei eine Rolle spielen.

Es ist bereits bekannt, dass der Chemokin-Rezeptor CXCR2 eine wichtige Funktion bei der Angiogenese und der Chemokin-vermittelten Migration besitzt [Addison *et al.*, 2000]. Auch Arbeiten mit dem CXCR2-Inhibitor SB225002 zeigen, dass die Migration neutrophiler Granulozyten über CXCR2 gesteuert wird [White *et al.*, 1998]. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Inhibitors SB225002 ebenfalls gezeigt werden, dass die Migration neutrophiler Granulozyten, induziert durch Hepatozyten, abhängig von CXCR2 ist. Die Verwendung neutrophiler Granulozyten aus CXCR2-defizienten Mäusen führte jedoch überraschenderweise zu einem anderen Ergebnis. Die Zellen zeigten im Vergleich zu Zellen von Wildtyp-Mäusen zwar eine geringere Migrationsrate, jedoch waren sie immer noch in der Lage, zu migrieren. Die Tiere können den Verlust von CXCR2 anscheinend kompensieren. Die Arbeitsgruppe um Callisia Clarke hat herausgefunden, dass in Hepatozyten CXCR2-defizienter Tiere TNF α die Expression von CXCR1 verstärkt, in Wildtyp-Tieren jedoch nicht [Clarke *et al.*, 2011]. Sie stellen die Vermutung, dass CXCR2 die Expression von CXCR1 reguliert. Möglicherweise übernimmt CXCR1 die Funktion des fehlenden Rezeptors CXCR2, sodass auch in den CXCR2-defizienten Tiere eine Migration stattfinden kann. TNF α könnte zusätzlich die Expression von CXCR1 verstärken. Bislang wurde in den CXCR2-defizienten Tieren die Konzentration von TNF α nicht bestimmt, da die Tiere aber sehr anfällig gegenüber Pathogenen sind und nur in einer spezifisch pathogen-freien Umgebung (SPF) überleben, wäre es möglich, dass leichte Infektionen vorliegen. Hierauf deutet auch die stark vergrößerte Milz hin, die in vielen Tieren zu sehen war.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Inhibitor- und Knockout-Studien führen zu der Annahme, dass die Migration neutrophiler Granulozyten abhängig von CXCR2 ist, der vollständige Verlust des Rezeptors *in vivo* jedoch durch andere Rezeptoren kompensiert werden kann. Diese Rezeptoren werden erst durch die Abwesenheit von CXCR2 verstärkt exprimiert, so dass eine temporäre Inhibition von CXCR2 die Expression dieser Rezeptoren nicht beeinflusst.

Auffällig war ebenfalls, dass die Tiere unterschiedlich auf den Verlust von CXCR2 reagierten. Einige Tiere, vor allem die Männchen, waren deutlich kleiner als Wildtyp-Mäuse und überlebten nicht lange, während andere Tiere optisch nicht von den Wildtyp-Tieren zu unterscheiden waren. Auch gab es einzelne Tiere, in denen die neutrophilen Granulozyten wie zu erwarten nicht migrieren konnten, jedoch waren diese Tiere in der Minderheit. Die Klärung dieses Phänomens wird Grundlage zukünftiger Projekte sein.

4.3 Gegenseitige Beeinflussung von Hepatozyten und Makrophagen

Die nach gängigem Standardprotokoll isolierten und verwendeten Hepatozytenkulturen sind nicht zu 100 % rein, da durch die Präparation noch etwa 5 – 10 % andere Leberzellen, vor allem Kupffer-Zellen, in der Kultur vorhanden sind. Um einen Einfluss dieser Zellen auf die Hepatozyten auszuschließen, wurden die Kupffer-Zellen mit Hilfe der MACS-Technik aus den Hepatozytenkulturen entfernt.

Durch die Entfernung der Kupffer-Zellen aus der Hepatozytenkultur konnte ein Anstieg der Chemokinexpression beobachtet werden, welcher vor allem auf Proteinebene deutlich vorhanden war. Eine Beobachtung, die sich interessanterweise in einem Ko-Kultur-Modell für die Chemokine CXCL2 und CXCL3 nicht bestätigen ließ. Im Ko-Kultur-System werden zwei Zelltypen getrennt voneinander kultiviert. Die Trennung erfolgt durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,4 µm, so dass kein direkter Zell-Zell-Kontakt entsteht, aber trotzdem ein Austausch von z.B. Zytokinen, Chemokinen oder Wachstumsfaktoren stattfinden kann.

Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Chemokinexpression in den Hepatozyten durch die Makrophagen inhibiert wird. Auch hier scheint es wieder Unterschiede in der Regulation der Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 zu geben, da die Anwesenheit der Makrophagen nicht alle drei Chemokine gleich beeinflusst. Die inhibierende Wirkung der Makrophagen scheint zudem durch den direkten Kontakt mit Hepatozyten zustande zu kommen, da der Effekt in der Ko-Kultur geringer war. Auch andere Arbeiten belegen, dass die beiden Zelltypen für eine gegenseitige Beeinflussung den direkten Zell-Zell-Kontakt benötigen [Hoebe *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005].

Eine mögliche Ursache der Inhibition durch die Makrophagen könnte eine vermehrte Produktion von TGFβ sein. Melino *et al.* konnten einen Anstieg der TGFβ mRNA-

Expression in Hepatozyten sehen, wenn diese mit konditionierten Makrophagen-Überständen kultiviert wurden [Melino *et al.*, 2012]. Wie in 3.1 gezeigt, führte eine Stimulation der Hepatozyten mit TGF β zu einer Verringerung der Chemokinexpression. In weiteren Experimenten müsste geklärt werden, ob Hepatozyten oder Makrophagen in der Ko-Kultur vermehrt TGF β produzieren, wodurch die Chemokinexpression gehemmt werden könnte.

Mehrere Arbeiten haben einen Einfluss von Makrophagen auf Hepatozyten oder andere Zelltypen beschrieben, welcher neben TGF β auch durch Zytokine und Prostaglandine vermittelt wird [Billiar and Curran, 1990]. Prostaglandine können die Chemokinexpression negativ regulieren, so dass auch hier ein möglicher Ansatz für weitere Untersuchungen zu finden ist [Takayama *et al.*, 2002].

Da der inhibierende Effekt der Makrophagen auf die Hepatozyten vor allem auf Protein-Ebene sehr stark ist, stellt sich zudem die Frage, ob Proteasen, die durch den Zell-Zell-Kontakt aktiviert werden, hier eine Rolle spielen.

Abbildung 4.2 zeigt eine mögliche Interaktion von Kupfer-Zellen und Hepatozyten und die damit einhergehende Beeinflussung der Chemokinexpression. In welcher Weise die Hepatozyten die Kupfer-Zellen regulieren, ist wenig bekannt.

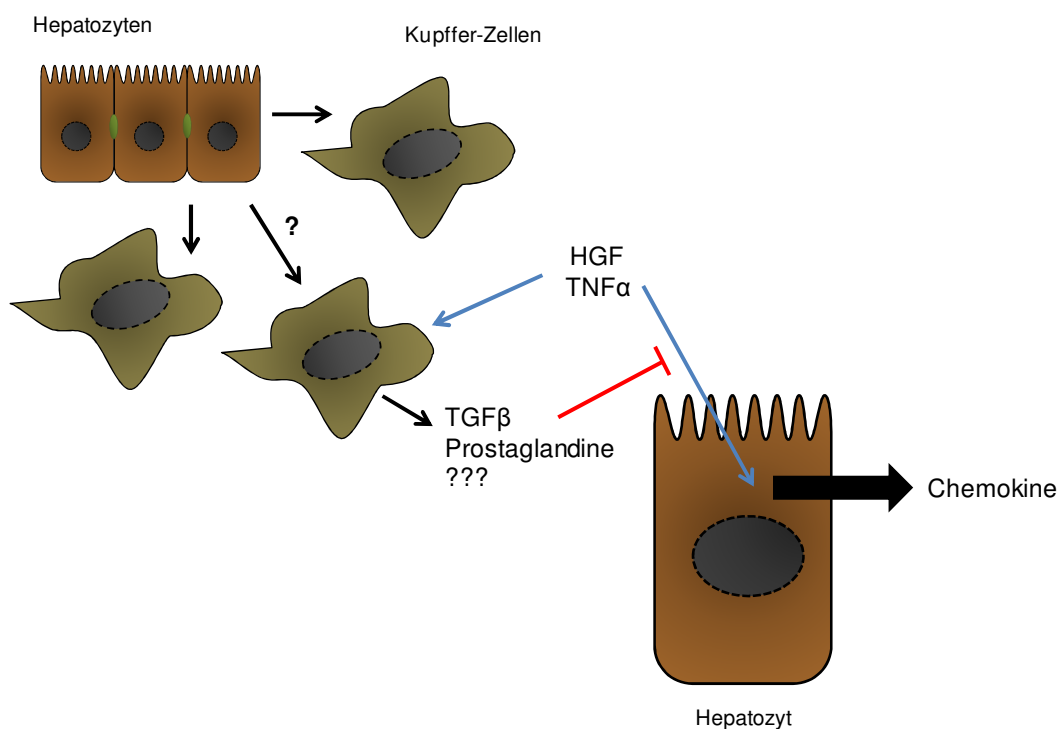


Abbildung 4.2: Gegenseitige Beeinflussung von Kupfer-Zellen und Hepatozyten

Ko-Kultivierung von Hepatozyten und Kupfer-Zellen führt zur Freisetzung von TGF β , Prostaglandinen und weiteren Faktoren, welche die durch HGF und TNF α induzierte Chemokinexpression in Hepatozyten inhibieren.

4.4 Einfluss von HGF auf die Proteinbiosynthese in Hepatozyten

Die Leber spielt für die Proteinsynthese eine wichtige Rolle, da in der Leber ein Großteil des Stoffwechsels stattfindet, für den viele verschiedene Proteine benötigt werden. Viele dieser Proteine werden in der Leber synthetisiert und sezerniert. Hierzu zählen auch die Proteine der Akut-Phase-Reaktion.

Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit war zu klären, ob regenerations-relevante Faktoren wie HGF Einfluss auf die Aktivität des Translationsfaktors EF2 haben und wie weit dies mit der Aktivierung von Akt korreliert. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob HGF die Gesamtproteinsynthese kultivierter Hepatozyten beeinflusst.

Die hier vorgelegten Untersuchungen belegen, dass HGF in kultivierten Hepatozyten zwar zu einer transienten Aktivierung von Akt führt, jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität von EF2 hat und auch die Gesamtproteinsynthese nicht beeinflusst.

Die Aktivität von EF2 wird durch die EF2-Kinase reguliert, dessen Aktivität Calcium-abhängig ist und somit durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann [Kaul *et al.*, 2011]. Hierzu gehört unter anderem auch Stress, wodurch die Aktivitäts-Schwankungen von EF2 zustande kommen könnten. Da die EF2-Kinase sehr leicht aktiviert bzw. inaktiviert werden kann, ist eine Analyse der EF2-Aktivität sehr schwierig.

Zusätzlich wurde in kultivierten Hepatozyten die *de novo* Proteinsynthese mittels Tritium-markiertem Leucin gemessen. Da diese Methode seit den 80er Jahren nicht mehr angewandt wurde, musste zunächst ein Protokoll etabliert werden, welches für murine Hepatozyten verwendbar war.

Wie in 3.6 beschrieben konnte in den Hepatozyten eine *de novo* Proteinsynthese gemessen werden, eine Stimulation der Hepatozyten mit HGF führte aber nicht zu einer Verstärkung der Proteinsynthese.

Die Ergebnisse legen nahe, dass HGF die *de novo* Proteinsynthese nicht beeinflusst, sondern evtl. eine Umorientierung der Proteine bewirkt. Die für die Regeneration wichtigen Proteine werden verstärkt produziert, während weniger bedeutende Proteine abgebaut werden, so dass die Summe der Proteine unverändert bleibt. Dies ist unter anderem bei den Proteinen der Akut-Phase-Reaktion zu sehen, welche auch im Verlauf der Regeneration aktiviert werden. Hierbei werden Proteine, die für Transportsysteme, das Gerinnungssystem und die Gewebereparatur wichtig sind, vermehrt produziert (Fibrinogen, Haptoglobin), während z.B. Albumin und Proteine des P450 Systems

gehemmt werden [Trautwein *et al.*, 1994]. Auch Pierzchalski *et al.* konnten in kultivierten Hepatozyten der Ratte zeigen, dass HGF die Synthese von Akut-Phase-Proteinen zwar beeinflusst, die Gesamtproteinmenge jedoch unverändert bleibt [Pierzchalski *et al.*, 1992].

5 Zusammenfassung

Die Leber, das größte Stoffwechselorgan des Menschen, verfügt über die bemerkenswerte Eigenschaft, sich nach einer Schädigung regenerieren zu können. Dieser Prozess wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine gesteuert. Hierzu gehören u.a. HGF, EGF, TGF β , IL-1 β und TNF α . Weiterhin ist die Rekrutierung inflammatorischer Zellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen von großer Bedeutung für die Entzündungsantwort. Die Anlockung verschiedener Zelltypen und die Wiederherstellung der Zellfunktionen werden hauptsächlich durch Chemokine reguliert.

Führende Fragestellung dieser Arbeit war, in wie weit Hepatozyten an der Chemokinsynthese beteiligt sind, und ob regenerations-relevante Faktoren wie HGF und TNF α in der Lage sind die Produktion von Chemokinen in Hepatozyten zu induzieren. Die erhobenen Daten legen nahe, dass HGF die Expression der CXCR2-Liganden CXCL1, CXCL2 und CXCL3 in Hepatozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene, jedoch nicht in Makrophagen induziert. Weiterhin konnte HGF die TNF α -induzierte Expression in Hepatozyten noch verstärken. Die Induktion der drei Chemokine benötigt die Aktivierung der PI3-Kinase, während die darauf folgende Signalweiterleitung für jedes Chemokin spezifisch ist.

Weiterhin führen die Ergebnisse zu der Annahme, dass nur eine kombinatorische Gabe von HGF und TNF α in den Hepatozyten die Induktion der Migration neutrophiler Granulozyten ermöglicht. Makrophagen konnten keine Migration induzieren. Ebenso konnten Sinusoidale Endothelzellen der Leber nicht migrieren. Die Migration der neutrophilen Granulozyten scheint abhängig vom CXC-Rezeptor 2 zu sein, obwohl in Zellen CXCR2-defizienter Tiere eine Migration messbar war.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die Regulation der Proteinsynthese im Rahmen der Leberregeneration in primären Hepatozyten der Maus untersucht.

Die hier vorgelegten Untersuchungen belegen, dass HGF in kultivierten Hepatozyten zwar zu einer transienten Aktivierung von Akt führt, jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität des Translationsfaktors EF2 hat und auch die Gesamtproteinsynthese nicht beeinflusst. Dies lässt darauf schließen, dass HGF evtl. zu einer Umorientierung der Proteine führt, aber nicht zu einer vermehrten Proteinsynthese.

6 Summary

The functions of the liver are safeguarded by its extraordinary capacity to regenerate. Orchestration of this complex process requires the recruitment of inflammatory cells such as neutrophils and macrophages and the induction of a controlled inflammatory response together with the release of growth factors and cytokines such as HGF, EGF, TGF β , IL-1 β and TNF α . Recruitment of the different cell populations and the reestablishment of the functional cellular organization is largely governed by factors such as chemokines, which are key mediators of chemotactic cell movement.

Main question of this study was to investigate in how far hepatocytes are involved in the chemokine synthesis, and whether regeneration relevant factors such as HGF and TNF α are able to induce the production of chemokines in hepatocytes. The data collected suggest that HGF induces the expression of the CXCR2 ligands CXCL1, CXCL2 and CXCL3 in hepatocytes but not in macrophages. Furthermore, HGF could enhance the TNF α -induced expression in hepatocytes yet. The induction of the three chemokines requires activation of PI3-kinase, while the subsequent signal transduction is specific for each chemokine.

Furthermore, the results lead to the assumption that only a combinatorial administration of HGF and TNF α allows hepatocytes to induce migration of neutrophils. Macrophages could not induce migration. In addition also sinusoidal endothelial cells of the liver could not migrate. The migration of neutrophils appears to be dependent on CXC receptor 2, although cells of CXCR2-knockout mice were able to migrate.

In a second part of this thesis the regulation of protein synthesis during liver regeneration was studied in primary murine hepatocytes. The findings implicate that HGF leads to a transient activity of Akt in cultivated hepatocytes but does not influence the activity of EF2 or the whole protein synthesis. These observations suggest a switch of the proteins instead of increased protein synthesis.

7 Literaturverzeichnis

- Abshagen, K., Eipel, C., Kalff, J.C., Menger, M.D., and Vollmar, B.** (2007). Loss of NF-kappaB activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**: G1570-1577.
- Addison, C.L., Daniel, T.O., Burdick, M.D., Liu, H., Ehlert, J.E., Xue, Y.Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., and Strieter, R.M.** (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* **165**: 5269-5277.
- Akerman, P., Cote, P., Yang, S.Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G.J., and Diehl, A.M.** (1992). Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol* **263**: G579-585.
- Alison, M.** (1998). Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 710-715.
- Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M.** (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* **25**: 787-820.
- Baldwin, A.S., Jr.** (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**: 649-683.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J.** (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**: 640-644.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L.** (2007). Biochemie, Vol 6 (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg).
- Bhardwaj, D., Nager, M., Camats, J., David, M., Benguria, A., Dopazo, A., Canti, C., and Herreros, J.** (2013). Chemokines induce axon outgrowth downstream of Hepatocyte Growth Factor and TCF/beta-catenin signaling. *Front Cell Neurosci* **7**: 52.
- Billiar, T.R., and Curran, R.D.** (1990). Kupffer cell and hepatocyte interactions: a brief overview. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **14**: 175S-180S.
- Biswas, R., Datta, S., Gupta, J.D., Novotny, M., Tebo, J., and Hamilton, T.A.** (2003). Regulation of chemokine mRNA stability by lipopolysaccharide and IL-10. *J Immunol* **170**: 6202-6208.
- Black, R.A., Kronheim, S.R., Cantrell, M., Deeley, M.C., March, C.J., Prickett, K.S., Wignall, J., Conlon, P.J., Cosman, D., Hopp, T.P., et al.** (1988). Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J Biol Chem* **263**: 9437-9442.

- Bode, J.G., Albrecht, U., Häussinger, D., Heinrich, P.C., and Schaper, F.** (2012). Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling. *Eur J Cell Biol* **91**: 496-505.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wustefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C.** (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10608-10613.
- Boulton, R., Woodman, A., Calnan, D., Selden, C., Tam, F., and Hodgson, H.** (1997). Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1alpha and -1beta: a mechanism of negative regulation of hepatocyte proliferation. *Hepatology* **26**: 49-58.
- Broten, J., Michalopoulos, G., Petersen, B., and Cruise, J.** (1999). Adrenergic stimulation of hepatocyte growth factor expression. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 76-79.
- Calkins, C.M., Bensard, D.D., Shames, B.D., Pulido, E.J., Abraham, E., Fernandez, N., Meng, X., Dinarello, C.A., and McIntyre, R.C., Jr.** (2002). IL-1 regulates in vivo C-X-C chemokine induction and neutrophil sequestration following endotoxemia. *J Endotoxin Res* **8**: 59-67.
- Cantley, L.C.** (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**: 1655-1657.
- Chari, R.S., Price, D.T., Sue, S.R., Meyers, W.C., and Jirtle, R.L.** (1995). Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am J Surg* **169**: 126-131; discussion 131-122.
- Clark-Lewis, I., Dewald, B., Geiser, T., Moser, B., and Baggiolini, M.** (1993). Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3574-3577.
- Clarke, C., Kuboki, S., Sakai, N., Kasten, K.R., Tevar, A.D., Schuster, R., Blanchard, J., Caldwell, C.C., Edwards, M.J., and Lentsch, A.B.** (2011). CXC chemokine receptor-1 is expressed by hepatocytes and regulates liver recovery after hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* **53**: 261-271.
- Clarke, C.N., Kuboki, S., Tevar, A., Lentsch, A.B., and Edwards, M.** (2009). CXC chemokines play a critical role in liver injury, recovery, and regeneration. *Am J Surg* **198**: 415-419.
- Colletti, L.M., Green, M., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., and Strieter, R.M.** (1998). Proliferative effects of CXC chemokines in rat hepatocytes in vitro and in vivo. *Shock* **10**: 248-257.
- Cressman, D.E., Diamond, R.H., and Taub, R.** (1995). Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* **21**: 1443-1449.

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

Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* **27**: 147-163.

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

Dancygier, H. (2003). *Klinische Hepatologie, Vol 1* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).

De Filippo, K., Henderson, R.B., Laschinger, M., and Hogg, N. (2008). Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J Immunol* **180**: 4308-4315.

Dinarello, C.A. (2007). Mutations in cryopyrin: bypassing roadblocks in the caspase 1 inflammasome for interleukin-1beta secretion and disease activity. *Arthritis Rheum* **56**: 2817-2822.

Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**: 519-550.

Elsner, P., Dich, J., and Grunnet, N. (1994). Quantification of protein turnover in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* **1199**: 157-165.

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

Fernandez, E.J., and Lolis, E. (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 469-499.

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

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

Gaestel, M. (2006). MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 120-130.

Gebhardt, R., Baldysiak-Figiel, A., Krugel, V., Ueberham, E., and Gaunitz, F. (2007). Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Prog Histochem Cytochem* **41**: 201-266.

- Gong, R., Rifai, A., and Dworkin, L.D.** (2005). Activation of PI3K-Akt-GSK3beta pathway mediates hepatocyte growth factor inhibition of RANTES expression in renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **330**: 27-33.
- Häussinger, D., Kubitz, R., Reinehr, R., Bode, J.G., and Schliess, F.** (2004). Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol Aspects Med* **25**: 221-360.
- Higashio, K., Shima, N., Goto, M., Itagaki, Y., Nagao, M., Yasuda, H., and Morinaga, T.** (1990). Identity of a tumor cytotoxic factor from human fibroblasts and hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 397-404.
- Higgins, G.M., and Anderson, R.M.** (1931). Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **12**: 186-202.
- Hoebe, K.H., Witkamp, R.F., Fink-Gremmels, J., Van Miert, A.S., and Monshouwer, M.** (2001). Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**: G720-728.
- Hogaboam, C.M., Bone-Larson, C.L., Steinhauser, M.L., Lukacs, N.W., Colletti, L.M., Simpson, K.J., Strieter, R.M., and Kunkel, S.L.** (1999). Novel CXCR2-dependent liver regenerative qualities of ELR-containing CXC chemokines. *FASEB J* **13**: 1565-1574.
- Houck, K.A., Cruise, J.L., and Michalopoulos, G.** (1988). Norepinephrine modulates the growth-inhibitory effect of transforming growth factor-beta in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol* **135**: 551-555.
- Huang, W., Ma, K., Zhang, J., Qatanani, M., Cuvillier, J., Liu, J., Dong, B., Huang, X., and Moore, D.D.** (2006). Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* **312**: 233-236.
- Ikeda, H., Nagoshi, S., Ohno, A., Yanase, M., Maekawa, H., and Fujiwara, K.** (1998). Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **250**: 769-775.
- Imose, M., Nagaki, M., Naiki, T., Osawa, Y., Brenner, D.A., Asano, T., Hayashi, H., Kato, T., and Moriwaki, H.** (2003). Inhibition of nuclear factor kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt is essential for massive hepatocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha in mice. *Liver Int* **23**: 386-396.
- Jones, D.E., Jr., Tran-Patterson, R., Cui, D.M., Davin, D., Estell, K.P., and Miller, D.M.** (1995). Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration. *Am J Physiol* **268**: G872-878.
- Kaul, G., Pattan, G., and Rafeequi, T.** (2011). Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem Funct* **29**: 227-234.

- Kim, T.H., Mars, W.M., Stolz, D.B., and Michalopoulos, G.K.** (2000). Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* **31**: 75-82.
- Kohler, C., Bell, A.W., Bowen, W.C., Monga, S.P., Fleig, W., and Michalopoulos, G.K.** (2004). Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* **39**: 1056-1065.
- Kolaczowska, E., and Kubes, P.** (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**: 159-175.
- Kordes, C., and Häussinger, D.** (2013). Hepatic stem cell niches. *J Clin Invest* **123**: 1874-1880.
- Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S., and Häussinger, D.** (2013). Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem* **31**: 290-304.
- Kuboki, S., Shin, T., Huber, N., Eismann, T., Galloway, E., Schuster, R., Blanchard, J., Edwards, M.J., and Lentsch, A.B.** (2008). Hepatocyte signaling through CXC chemokine receptor-2 is detrimental to liver recovery after ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology* **48**: 1213-1223.
- Kuschert, G.S., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., and Wells, T.N.** (1999). Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* **38**: 12959-12968.
- Lamalice, L., Le Boeuf, F., and Huot, J.** (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* **100**: 782-794.
- LaMarre, J., Hayes, M.A., Wollenberg, G.K., Hussaini, I., Hall, S.W., and Gonias, S.L.** (1991). An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice. *J Clin Invest* **87**: 39-44.
- Lang, R., and Heeg, K.** (1998). Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR. *Inflammopharmacology* **6**: 297-309.
- Lawlor, M.A., and Alessi, D.R.** (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* **114**: 2903-2910.
- LeCouter, J., Moritz, D.R., Li, B., Phillips, G.L., Liang, X.H., Gerber, H.P., Hillan, K.J., and Ferrara, N.** (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* **299**: 890-893.
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., and Clavien, P.A.** (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* **312**: 104-107.

- Lippert, H.** (2011). Lehrbuch Anatomie, Vol 8 (Elsevier GmbH München).
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J.** (2000). Molecular Cell Biology, Vol 4 (New York, W. H. Freeman and Company).
- Maehama, T., and Dixon, J.E.** (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**: 13375-13378.
- Mantovani, A.** (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* **20**: 254-257.
- Mars, W.M., Liu, M.L., Kitson, R.P., Goldfarb, R.H., Gabauer, M.K., and Michalopoulos, G.K.** (1995). Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology* **21**: 1695-1701.
- Mars, W.M., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G.K.** (1993). Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* **143**: 949-958.
- Marti, U., Burwen, S.J., and Jones, A.L.** (1989). Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: an update. *Hepatology* **9**: 126-138.
- Matzer, S.P., Zombou, J., Sarau, H.M., Rollinghoff, M., and Beuscher, H.U.** (2004). A synthetic, non-peptide CXCR2 antagonist blocks MIP-2-induced neutrophil migration in mice. *Immunobiology* **209**: 225-233.
- Meijer, C., Wiezer, M.J., Diehl, A.M., Schouten, H.J., Meijer, S., van Rooijen, N., van Lambalgen, A.A., Dijkstra, C.D., and van Leeuwen, P.A.** (2000). Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* **20**: 66-77.
- Melino, M., Gadd, V.L., Walker, G.V., Skoien, R., Barrie, H.D., Jothimani, D., Horsfall, L., Jones, A., Sweet, M.J., Thomas, G.P., et al.** (2012). Macrophage secretory products induce an inflammatory phenotype in hepatocytes. *World J Gastroenterol* **18**: 1732-1744.
- Menger, M.D., Richter, S., Yamauchi, J., and Vollmar, B.** (1999). Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* **46 Suppl 2**: 1452-1457.
- Mezey, E.** (1982). Liver disease and protein needs. *Annu Rev Nutr* **2**: 21-50.
- Michalopoulos, G.K.** (1990). Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J* **4**: 176-187.

- Michalopoulos, G.K.** (2007). Liver regeneration. *J Cell Physiol* **213**: 286-300.
- Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C.** (1997). Liver regeneration. *Science* **276**: 60-66.
- Mohammed, F.F., and Khokha, R.** (2005). Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol* **15**: 555-563.
- Monga, S.P., Padiaditakis, P., Mule, K., Stolz, D.B., and Michalopoulos, G.K.** (2001). Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology* **33**: 1098-1109.
- Mortier, A., Van Damme, J., and Proost, P.** (2012). Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett* **145**: 2-9.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A.** (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**: 145-176.
- Nakamura, T., Nawa, K., and Ichihara, A.** (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* **122**: 1450-1459.
- Naldini, L., Vigna, E., Narsimhan, R.P., Gaudino, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K., and Comoglio, P.M.** (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* **6**: 501-504.
- Nibbs, R.J., and Graham, G.J.** (2013). Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nat Rev Immunol* **13**: 815-829.
- Nomiyama, H., Osada, N., and Yoshie, O.** (2010). The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**: 253-262.
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., and Kitano, H.** (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* **1**: 2005 0010.
- Oh, J.W., Schwiebert, L.M., and Benveniste, E.N.** (1999). Cytokine regulation of CC and CXC chemokine expression by human astrocytes. *J Neurovirol* **5**: 82-94.
- Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L.** (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 359-371.
- Patel, J., Channon, K.M., and McNeill, E.** (2013). The downstream regulation of chemokine receptor signalling: implications for atherosclerosis. *Mediators Inflamm* **2013**: 459520.

- Pediaditakis, P., Lopez-Talavera, J.C., Petersen, B., Monga, S.P., and Michalopoulos, G.K.** (2001). The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* **34**: 688-693.
- Pickup, M., Novitskiy, S., and Moses, H.L.** (2013). The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* **13**: 788-799.
- Pierzchalski, P., Nakamura, T., Takehara, T., and Koj, A.** (1992). Modulation of acute phase protein synthesis in cultured rat hepatocytes by human recombinant hepatocyte growth factor. *Growth Factors* **7**: 161-165.
- Pimienta, G., and Pascual, J.** (2007). Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* **6**: 2628-2632.
- Rabes, H.M.** (1977). Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. *Ciba Found Symp*: 31-53.
- Ramadori, G., and Armbrust, T.** (2001). Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**: 777-784.
- Roach, D.R., Bean, A.G., Demangel, C., France, M.P., Briscoe, H., and Britton, W.J.** (2002). TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* **168**: 4620-4627.
- Roberts, A.B., McCune, B.K., and Sporn, M.B.** (1992). TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* **41**: 557-559.
- Salomon, F.-V., Geyer, H., and Gille, U.** (2008). Anatomie für die Tiermedizin, Vol 2 (Enke Verlag, Stuttgart).
- Savarin-Vuillat, C., and Ransohoff, R.M.** (2007). Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics* **4**: 590-601.
- Scarpino, S., Stoppacciaro, A., Ballerini, F., Marchesi, M., Prat, M., Stella, M.C., Sozzani, S., Allavena, P., Mantovani, A., and Ruco, L.P.** (2000). Papillary carcinoma of the thyroid: hepatocyte growth factor (HGF) stimulates tumor cells to release chemokines active in recruiting dendritic cells. *Am J Pathol* **156**: 831-837.
- Schirmacher, P., Geerts, A., Jung, W., Pietrangelo, A., Rogler, C.E., and Dienes, H.P.** (1993). The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *EXS* **65**: 285-299.
- Schmidt, C., Blatt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C.** (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**: 699-702.

- Scott, M.J., Liu, S., Su, G.L., Vodovotz, Y., and Billiar, T.R.** (2005). Hepatocytes enhance effects of lipopolysaccharide on liver nonparenchymal cells through close cell interactions. *Shock* **23**: 453-458.
- Selzner, N., Selzner, M., Odermatt, B., Tian, Y., Van Rooijen, N., and Clavien, P.A.** (2003). ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology* **124**: 692-700.
- Sheng, W.S., Hu, S., Ni, H.T., Rowen, T.N., Lokensgard, J.R., and Peterson, P.K.** (2005). TNF-alpha-induced chemokine production and apoptosis in human neural precursor cells. *J Leukoc Biol* **78**: 1233-1241.
- Sivan, G., Kedersha, N., and Elroy-Stein, O.** (2007). Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Mol Cell Biol* **27**: 6639-6646.
- Skov Olsen, P., Boesby, S., Kirkegaard, P., Therkelsen, K., Almdal, T., Poulsen, S.S., and Nexø, E.** (1988). Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* **8**: 992-996.
- Snodgrass, R.G., Huang, S., Choi, I.W., Rutledge, J.C., and Hwang, D.H.** (2013). Inflammasome-mediated secretion of IL-1beta in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *J Immunol* **191**: 4337-4347.
- Son, D.S., Kabir, S.M., Dong, Y., Lee, E., and Adunyah, S.E.** (2013). Characteristics of chemokine signatures elicited by EGF and TNF in ovarian cancer cells. *J Inflamm (Lond)* **10**: 25.
- Stolz, D.B., Mars, W.M., Petersen, B.E., Kim, T.H., and Michalopoulos, G.K.** (1999). Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* **59**: 3954-3960.
- Strain, A.J., and Crosby, H.A.** (2000). Hepatic stem cells. *Gut* **46**: 743-745.
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., et al.** (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* **270**: 27348-27357.
- Sun, D., Novotny, M., Bulek, K., Liu, C., Li, X., and Hamilton, T.** (2011). Treatment with IL-17 prolongs the half-life of chemokine CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF). *Nat Immunol* **12**: 853-860.
- Takayama, K., Garcia-Cardena, G., Sukhova, G.K., Comander, J., Gimbrone, M.A., Jr., and Libby, P.** (2002). Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem* **277**: 44147-44154.
- Taub, R.** (1996). Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J* **10**: 413-427.

Townson, D.H., and Liptak, A.R. (2003). Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 94.

Trautwein, C., Boker, K., and Manns, M.P. (1994). Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms. *Gut* **35**: 1163-1166.

Van Sweringen, H.L., Sakai, N., Tevar, A.D., Burns, J.M., Edwards, M.J., and Lentsch, A.B. (2011). CXC chemokine signaling in the liver: impact on repair and regeneration. *Hepatology* **54**: 1445-1453.

Vega, V.L., Maldonado, M., Mardones, L., Schulz, B., Manriquez, V., Vivaldi, E., Roa, J., and Ward, P.H. (1999). Role of Kupffer cells and PMN leukocytes in hepatic and systemic oxidative stress in rats subjected to tourniquet shock. *Shock* **11**: 403-410.

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

Weidner, K.M., Sachs, M., and Birchmeier, W. (1993). The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol* **121**: 145-154.

White, J.R., Lee, J.M., Young, P.R., Hertzberg, R.P., Jurewicz, A.J., Chaikin, M.A., Widdowson, K., Foley, J.J., Martin, L.D., Griswold, D.E., et al. (1998). Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem* **273**: 10095-10098.

Yamada, Y., and Fausto, N. (1998). Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol* **152**: 1577-1589.

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

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**: 121-127.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity* **36**: 705-716.

Zlotnik, A., Yoshie, O., and Nomiya, H. (2006). The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* **7**: 243.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Johannes Bode, unter dessen Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde. Ich danke ihm für seine Unterstützung, seine Bereitschaft zur Diskussion, seine wertvollen Anregungen und sein Vertrauen.

Bei Herrn Professor Dr. Dieter Willbold bedanke ich mich außerordentlich für die Bereitschaft, meine Promotion als Gutachter in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen.

Mein Dank gilt zudem Professor Dr. Dieter Häussinger für die Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe sowie für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in seiner Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können.

Ein großes Dankeschön geht an Carina Franek! Ich danke dir für die großartige Einarbeitung am Anfang meiner Doktorarbeit. Du hast dich wie ein Post-Doc um mich gekümmert und warst immer zur Stelle, wenn ich nicht weiter wusste. Auch als ich deine Hilfe nicht mehr täglich brauchte, hattest du immer ein offenes Ohr für meine Probleme.

Ein besonderer Dank geht zudem an Leah Missing, Maximilian Hahnel und Stephanie Wolf. Ohne euch wären die vielen VLN-Reisen ziemlich langweilig geworden, vor allem unsere jährlichen Reisen nach Hünfeld. Danke für die unvergessliche Zeit in Raum 62, die vielen Diskussionen über den Sinn unserer Arbeit, den Sinn des Lebens und die Bedeutung unserer täglichen Hor(r)o(r)skope.

Ich danke den Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie für die gute Zusammenarbeit. Vor allem Ayse, Carina, Carola, Chrissi, Leah, Maike, Max, Sanaz, Steffi, Tini und Uschi danke ich für die vielen unvergesslichen, lustigen Stunden während der Arbeit und vor allem in unserer Freizeit. Mit euch will ich immer Kekse essen!

Katha, ich danke dir für die stundenlangen Telefongespräche, in denen du wahrscheinlich nicht immer verstanden hast, wovon ich rede, mich aber trotzdem immer wieder aufgebaut

und unterstützt hast. Danke, dass du immer an mich und meine Arbeit geglaubt hast und dass du immer für mich da bist!

Mein größter Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Zu guter Letzt möchte ich es nicht versäumen, allen meinen Freunden zu danken, die mir trotz der Erstellung dieser Arbeit in den vergangenen Jahren treu geblieben sind.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 03.07.2014

Judith Knievel