



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Moleküle der TNF/TNFR Superfamilie: Rolle bei der Immunabwehr und Leberregeneration

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Kristina Behnke

Düsseldorf, Mai 2014

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2014

Es ist nicht von Bedeutung wie langsam du gehst, solange du nicht stehen bleibst.

Konfuzius (551-479 v.Chr.)

Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Abkürzungsverzeichnis	
V	Zusammenfassung	
VI	Summary	
1.	Einleitung	1
1.1	Die Mitglieder der TNF/TNFR Superfamilie	1
1.1.1	Die Kernmitglieder der TNF/TNFR Superfamilie.....	2
1.1.2	Signalwege über LT β /LT β R und TNF/TNFRp55.....	5
1.1.3	Der Einsatz von gendefizienten Mauslinien	6
1.1.4	Die Rolle von LT β /LT β R und TNF/TNFR in der Organogenese der primären und sekundären lymphatischen Organe	7
1.1.5	Die Rolle von LT β /LT β R und TNF/TNFR in der Leberregeneration	8
1.2	Leberregeneration	10
1.2.1	Anatomie der Leber	10
1.2.2	Funktionen der Leber	12
1.2.3	Akute vs. Chronische Leberschädigung	12
1.2.4	Modellsysteme zur Aufklärung der Leberregeneration	13
1.2.5	Die partielle Hepatektomie in der Maus	14
1.2.6	Phasen der Leberregeneration.....	15
1.2.7	Gallensalze und der enterohepatische Kreislauf.....	16
1.2.8	Bedeutung der Gallensalze in der Leberregeneration	19
1.2.9	Die Cholestase	20
1.3	<i>Toxoplasma gondii</i>	21
1.3.1	Die Rolle von LT β /LT β R und TNF/TNFRp55 in der Abwehr von bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen	21
1.3.2	Globale Verbreitung und Entwicklungszyklus	23
1.3.3	Immunpathologie	25
1.3.4	Immunologische Interaktion zwischen Wirt und Parasit.....	26
1.4	Zielsetzung	29

2. Material	30
2.1 Chemikalien und Enzyme	30
2.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.3 OP Instrumente	34
2.4 Kits	34
2.5 Geräte	35
2.6 Lösungen und Puffer	36
2.7 Synthetische Oligonukleotide.....	38
2.7.1 Primer für die Genotypisierung	38
2.7.2 Primer für die qRT-PCR	39
2.8 Tierversuche	41
2.8.1 Tierhaltung.....	41
2.8.2 Mauslinien	41
3. Methoden	43
3.1 Tierversuche.....	43
3.2 Partielle Hepatektomie.....	43
3.2.1 Anästhesie	43
3.2.2 Chirurgisches Vorgehen.....	43
3.2.3 Scheinoperation.....	44
3.2.4 Analgesie.....	44
3.2.5 Injektion mit Enbrel®	45
3.3 Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	45
3.4 Versuchsende.....	45
3.5 Entnahme von Untersuchungsmaterial	45
3.5.1 Blutanalysen	45
3.5.1.1 Entnahme von Vollblut.....	46
3.5.1.2 Serumgewinnung aus Vollblut	46
3.5.1.3 Bestimmung von Serumparametern.....	46
3.5.1.4 Proteome Profiler.....	47
3.5.1.5 Enzymgekoppelter Immunoabsorptionsassay (ELISA).....	47
3.5.1.6 NO-Assay	48
3.5.1.7 Lipase-Assay	48
3.5.1.8 Gallensalzanalyse (Serum)	48
3.5.2 Organentnahmen	48
3.5.2.1 Bestimmung des KG/LG Quotienten	49

3.5.2.2 Zystenpräparation aus infizierten Maushirnen.....	49
3.5.2.3 Gallensalzanalyse (Leber).....	49
3.5.2.4 Aufbereitung von Organen für die Zellzahlbestimmung.....	50
3.6 Histopathologie.....	50
3.6.1 Anfertigung und Verarbeitung von Paraffinschnitten.....	51
3.6.2 Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung.....	51
3.6.2.1 Das Scoring in der HE Auswertung.....	51
3.6.3 Elastika van Gieson (EvG) Färbung.....	51
3.6.4 Giemsa.....	52
3.6.5 Perjodsäure-Schiff'sche (PAS) Färbung.....	52
3.6.6 TUNEL.....	52
3.7 Zellbiologisches Arbeiten.....	52
3.7.1 Isolierung und Kultivierung von Cholangiozyten.....	52
3.8 Molekularbiologisches Arbeiten.....	53
3.8.1 Analysemethoden für DNA.....	53
3.8.1.1 Isolation von DNA aus Gewebe.....	53
3.8.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	53
3.8.1.3 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	55
3.8.2 Analysemethoden für RNA.....	56
3.8.2.1 Isolation von RNA aus Geweben und Zellen.....	56
3.8.2.2 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung.....	56
3.8.2.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription (RT).....	57
3.8.2.4 Quantitative Real-Time PCR.....	57
3.8.2.4.1 Durchführung.....	57
3.8.2.4.2 Auswertung.....	58
3.8.2.5 Microarray-Analyse (Transkriptomanalyse).....	59
3.8.3 Proteinanalyse.....	59
3.8.3.1 Isolation von Gesamtprotein aus Gewebe.....	59
4. Ergebnisse.....	60
4.1 Hintergrund partielle Hepatektomie.....	60
4.2 Genotypisierung.....	60
4.3 Leberregeneration LT β R- und TNFRp55-defizienter Tiere nach PHx.....	60
4.4 Blutanalysen.....	62
4.4.1 Serologische Charakterisierung diverser Blutmetabolite.....	62
4.4.2 Koagulation.....	70

4.4.3 Kleines Blutbild	73
4.5 Zytokinexpression der $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere nach PHx	78
4.5.1 Zytokinscreening mittels Mouse Cytokine Array.....	78
4.5.2 Analyse relevanter Zytokine und der Metalloprotease TIMP-1 bei der Leberregeneration mittels ELISA.....	81
4.6 Regulation der biliären Homöostase nach partieller Hepatektomie	84
4.6.1 Analyse der Gallensalze im Serum.....	85
4.6.2 Analyse der Gallensalze in der Leber.....	89
4.6.3 Analyse der Gallensalzregulation in der Leber auf Genexpressionsebene	93
4.7 Histopathologie der regenerierenden Leber nach PHx.....	96
4.8 Identifizierung von essentiellen $LT\beta R$ -regulierten Genen für die Leberregeneration	99
4.8.1 Microarray Analyse der Genexpression in der Leber nach PHx	99
4.8.2 Verifizierung und weitere Charaktisierung der Genexpression mittels qRT-PCR	105
4.9 Inhibierung des TNFR Signalweges durch Etanercept (Enbrel®) in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren.....	109
4.9.1 Einfluss einer Etanercept Behandlung auf das Überleben nach PHx	109
4.9.2 Serumanalyse diverser Blutmetabolite nach PHx unter Etanercept Behandlung.....	111
4.10 Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	113
4.11 Überleben nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	113
4.12 Serologische Charakterisierung nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	115
4.13 Zytokinexpression in Toxoplasma-infizierten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren.....	117
4.14 Histopathologie von Leber, Lunge und Gehirn nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	121
4.15 Lipombildung im Retroperitonealraum.....	125
4.16 Parasitenlast	127
4.17 Charakterisierung der Milz nach einer <i>T. gondii</i> -Infektion.....	129
4.18 Genexpression in der Lunge und Milz während einer <i>T. gondii</i> -Infektion	130
5. Diskussion	136
5.1 $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigen ein vermindertes Überleben nach PHx.....	136
5.2 $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigen eine beeinträchtigte Leberregeneration und Kompensation von Leberschäden nach PHx.....	138
5.3 $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigen eine unkontrollierte und verzögerte Zytokinantwort nach PHx.....	141
5.4 Identifizierung von $LT\beta R$ -relevanten, Leberregenerations-abhängigen Genen mittels <i>Microarrayanalyse</i>	143
5.5 Dereguliertes Expressionsprofil nach PHx: WT vs. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere.....	146
5.6 Die Akkumulation von toxischen GS nach PHx charakterisiert in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren eine Cholestase	149
5.7 Etanercept-behandelte $LT\beta R^{-/-}$ Tiere versterben innerhalb von 48 Stunden nach PHx.....	154

5.8 LTβR ^{-/-} Tiere sind suszeptibel gegenüber einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	155
5.9 Eine unzureichende Kontrolle der Parasitenlast induziert ausgeprägte Schäden in der Lunge und in der Leber von <i>T. gondii</i> -infizierten LTβR ^{-/-} Tieren.....	157
5.10 LTβR ^{-/-} Tiere zeigen Defekte in der Produktion von IFNγ und NO	159
5.11 <i>T. gondii</i> -infizierte LTβR ^{-/-} Tiere zeigen Defekte in der transkriptionellen Antwort.....	162
5.12 Differentielle Expression der IFNγ-abhängigen mGBPs in LTβR ^{-/-} Tieren	163
5.13 Ausblick	165
6. Literaturverzeichnis	168
7. Anhang	185
7.1 nicht gezeigte Daten.....	185
7.2 Publikationen.....	189
7.3 Danksagung	190
7.4 Eidesstattliche Erklärung	191

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Kernfamilie der TNF/TNFR-Superfamilie	4
Abbildung 1.2 Zellulärer Aufbau der Leber	12
Abbildung 1.3 Enterohepatischer Kreislauf	19
Abbildung 1.4 Lebenszyklus und Übertragungswege von <i>Toxoplasma gondii</i>	25
Abbildung 1.5 Humorale Immunantwort auf eine Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	28
Abbildung 3.1 Partielle Hepatektomie	44
Abbildung 3.2 Schematische Darstellung des Sandwich-ELISAs.....	47
Abbildung 4.1 Überlebenskurven und LG/KG-Ratio	61
Abbildung 4.2 Serumparameter WT vs. $LT\beta R^{-/-}$	64
Abbildung 4.3 Serumparameter WT vs. $TNFRp55^{-/-}$	69
Abbildung 4.4 Koagulationsparameter im Serum	72
Abbildung 4.5 Kleines Blutbild	76
Abbildung 4.6 Cytokine Array Panel A.....	80
Abbildung 4.7 ELISA von IL-1 β , TIMP-1, IL-6 und TNF	83
Abbildung 4.8 GS Konzentrationen im Serum	87
Abbildung 4.9 Konzentration ausgewählter GS im Serum	88
Abbildung 4.10 GS Konzentrationen in der Leber	91
Abbildung 4.11 Konzentration ausgewählter GS in der Leber	92
Abbildung 4.12 Genexpression von Gallensalz-Transportern, Enzymen und Rezeptoren	95
Abbildung 4.13 HE-Färbung und TUNEL-Staining nach PHx.....	98
Abbildung 4.14 Auswertung der Microarray Analyse nach PHx.....	102
Abbildung 4.15 Quantitative RT-PCR Analyse differentiell regulierter Gene	108
Abbildung 4.16 Überlebenskurven mit und ohne Etanercept Behandlung	111
Abbildung 4.17 Serumparameter nach einer 10 μ g/g KG Etanercept Behandlung	113
Abbildung 4.18 Überlebenskurven und Körpergewicht vs. Gender	115
Abbildung 4.19 Serumparameter nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	117
Abbildung 4.20 Cytokine Array Panel A und ELISA von IL-12p40, IL-4, TNF und NO.....	120
Abbildung 4.21 HE-Färbungen der Lunge nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	122
Abbildung 4.22 HE-Färbungen der Leber nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	123
Abbildung 4.23 HE-Färbungen des Gehirns nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	123
Abbildung 4.24 Makroskopische und histologische Darstellung von Lipomen.....	126
Abbildung 4.25 Bestimmung der Parasitenlast	128

Abbildung 4.26 Milzgewicht und Zellzahl nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	130
Abbildung 4.27 Genexpression der Lunge nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	132
Abbildung 4.28 Genexpression der Milz nach einer Infektion mit <i>T. gondii</i>	135
Abbildung 7.1 EvG-Färbung nach PHx.....	185
Abbildung 7.2 PAS-Färbung nach PHx.....	186
Abbildung 7.3 Giemsa-Färbung nach PHx.....	187
Abbildung 7.4 Verpaarungsschema zur Generierung LT β R/TNFRp55-defizienter Tiere	188

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Nomenklatur der Kernfamilie der TNF/TNFR-Superfamilie	4
Tabelle 1.2 Überblick über die Abkürzungen der GS-Transporter, Enzyme & Rezeptoren	17
Tabelle 2.1 Lösungen und Puffer	36
Tabelle 2.2 Primer Genotypisierung	38
Tabelle 2.3 Primer quantitative RT-PCR.....	39
Tabelle 2.4 Versuchstiere.....	41
Tabelle 3.1 PCR Programm Genotypisierungen	54
Tabelle 3.2 Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren.....	57
Tabelle 3.3 Protokoll cDNA-Synthese	57
Tabelle 3.4 Programm quantitative RT-PCR	58
Tabelle 3.5 Berechnung von Expressionsunterschieden	59
Tabelle 4.1 Normwerte klinische Serumparameter.....	64
Tabelle 4.2 Gesamtkonzentrationen der Gallensalze im Serum	87
Tabelle 4.3 Gesamtkonzentrationen der Gallensalze in der Leber.....	91
Tabelle 4.4 HE-Score pathologischer Veränderungen in der Leber nach PHx.....	99
Tabelle 4.5 HE-Score lymphozytärer Infiltrate nach einer <i>T. gondii</i> -Infektion	124
Tabelle 4.6 HE-Score zystenähnlicher Strukturen nach einer <i>T. gondii</i> -Infektion	125

IV Abkürzungsverzeichnis

A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
A, mA	Ampère
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALP	alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase (ALAT); GPT
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	antigenpräsentierende Zellen
APP	Akute-Phase-Proteine
APR	Akute-Phase-Reaktion
APS	Ammoniumpersulfat
ARD	<i>Ankyrin repeat domain</i>
AS	Aminosäure
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase (ASAT); GOT
ATG5	<i>Autophagy protein 5</i>
BAFF	<i>B cell activating factor of the TNF family</i> ; BLYS
BAR	<i>Bile Acid Receptor (FXR)</i>
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BDL	Gallengangsligatur (<i>bile duct ligation</i>)
Bp	Basenpaare
BSEP	<i>Bile Salt Export Pump</i> ; <i>ATP-binding cassette sub-family B member 11 (Abcb11)</i>
BTLA	B- and T-Lymphocyte attenuator
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine</i>
CA	Cholsäure
CCC	cholangiozelluläres Karzinom
CCL4	Chlorkohlenwasserstoff
CCR5	Chemokinrezeptor 5
CDCA	Chenodesoxycholsäure
CDE	<i>Cholin-deficient Ethionine-supplementary dietary</i>
CDKs	Cyclin-abhängiger-Kinasen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm, mm, µm, nm	Zenti-, Milli-, Mikro-, Nanometer
cMOAT1, 2	<i>canicular Multispecific Organic Anion Transporter 1/2</i>
CMV	<i>Zytomegalovirus</i>
CT	Schwellenwert-Zyklus (<i>Threshold Cycle</i>)

CXCL10	Chemokin (C-X-C motif) Ligand 10
CYP7A1	Cholesterol-7 α -Hydroxylase/Monooxygenase; Cytochrom P450 7A1
DC	Dendritische Zelle
DCA	Deoxycholsäure
DcR3	<i>Decoy receptor 3</i> ; TNFRSF6B
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGKQ	Diacylglycerol-Kinase theta
dH₂O	Milli-Q-Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
et al.	<i>et alii</i> ; und andere
Etanercept	Enbrel®
EtBr	Ethidiumbromid
FADD	<i>Fas-associated-Death-Domain</i>
Fas/FasL	CD95
FDC	follikuläre Dendritische Zelle
FgF15	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 15
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor; <i>nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4 (NR1H4)</i>
g	Beschleunigung (m/s ²)
GBP	Guanosine nucleotide-binding protein
G-CA	Glykocholsäure
G-CDCA	Glykochenodesoxycholsäure
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPI-Protein	<i>Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein</i>
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GS	Gallensalz(e)
GTPBP1	<i>GTP-Binding Protein 1</i>
h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCO₃⁻	Hydrogencarbonat, Bicarbonat
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HPC	hepatische Progenitorzelle

HRP	Meerrettich-Peroxidase
HVEM	<i>Herpes Virus Entry Mediator</i> ; CD270; TNFRSF14
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
IFNγ / IFNγR	Interferon gamma / Interferon gamma Rezeptor
IKK	(I κ B-Kinase)-Komplex
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
INR	Thromboplastinzeit
IRG	<i>Immunity Related Guanosine Triphosphatase</i>
IRGM3	<i>IRG family M protein 3</i>
JNK	c-Jun-N-terminale-Kinase
kDa	Kilodalton
LBAT	<i>Liver Bile Acid Transporter</i> (NTCP)
LCA	Lithocholsäure
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitisvirus
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LIGHT	<i>Lymphotoxin homolog which exhibits Inducible expression and completes with the herpes simplex virus Glycoprotein D for binding of HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes</i> ; HVEM-L; TNFSF14
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
LTα	Lymphotoxin α ; TNF β ; LT α_3 ; TNFSF1
LTβ	Lymphotoxin β ; LT $\alpha_1\beta_2$; LT $\alpha_2\beta_1$; TNFSF3
LTβR	Lymphotoxin β Rezeptor; CD18; TNFRSF3
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobakterium tuberculosis</i>
MCMV	<i>murines Zytomegalovirus</i>
MEKK1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
MIP-2	CXCL2; <i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
MRP2	<i>Multidrug Resistance-associated Protein 2</i> ; Abcc2; cMOAT1
MRP3	<i>Multidrug Resistance-associated Protein 3</i> ; Abcc3; cMOAT2
mTNF	membranständiges TNF
Mug1,2,3	Murinoglobulin 1, 2, 3
MW	Molekulargewicht
N	Anzahl

NF-κB1	p50/p105
NF-κB2	p52/p100
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
NK	natürliche Killerzelle
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NO	Stickstoffmonoxid
NS	Nukleinsäure
NTCP	<i>Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide</i> ; Slc10a1; LBAT
OD_{nm}	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
OPG	Oseteoprotegerin
P-AM	Pankreas-Amylase
<i>p.i.</i>	post infection
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>p.g.</i>	<i>post gestationem</i>
PHx	partielle (2/3; 70 %) Hepatektomie
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PP	<i>Peyer's Patches</i>
PT	Prothrombin
QRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
RA	<i>Retinoic acid</i>
RAGs	<i>Recombination-activating genes</i>
RANK/RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RelA	NF-κB/p65
RelB	NF-κB/p50
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SODD	<i>Silencer of death domains</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>

sTNF	lösliches TNF
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TACE	<i>TNF converting enzyme</i>
T-CA	Taurocholsäure
T-CDCA	Taurochenodesoxycholsäure
TE	Toxoplasmen-Enzephalitis
Tg	transgen
TGF-α	<i>Transforming Growth Factor-α</i>
TGR5	Gpbar-1; <i>G-protein-coupled bile acid receptor 1</i>)
TIMs	TNF-assoziierten Faktor (TRAF)-interagierenden Molekülen
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor; TNF α ; TNF $_3$; TNFSF2
TNFRp55	Tumor Nekrose Faktor p55; TNFR1; CD120a; TNFRSF1a
TNFRp75	Tumor Nekrose Faktor p75; TNFR2; CD120b; TNFRSF1b
TRADD	<i>TNF-receptor-associated-Death-Domain</i>
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
TRAIL-R3	<i>Decoy receptor 1</i> ; DcR1
TRIM30α	<i>Tripartite motif-containing protein 30 alpha</i>
u.a.	unter anderem
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VE-H2O	vollentsalztes (demineralisiertes) Wasser
vs.	<i>versus</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
λ	Lambda / Wellenlänge

V Zusammenfassung

Der Lymphotoxin- β Rezeptor (LT β R) und der Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor p55 (TNFRp55), die zu den Kernmitgliedern der TNF/TNFR Superfamilie gehören, spielen eine zentrale Rolle bei der Hepatozyten-vermittelten Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx) und sind für eine effiziente Leberregeneration notwendig. Die synchrone Teilung der normalerweise mitoseinaktiven Hepatozyten nach einem Verlust von >30 % Lebermasse ist ein streng regulierter Prozess. Während des Regenerationsprozesses muss die Leber weiterhin ihre Funktionen im Organismus erfüllen, u.a. die Synthese von Blutproteinen und von Galle. Im Rahmen dieses Projekts konnte bestätigt werden, dass sowohl LT β R^{-/-} als auch TNFRp55^{-/-} Tiere nach PHx eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zum WT aufweisen (LT β R^{-/-}: ca. 40 %; TNFRp55^{-/-}: ca. 50 %), wobei die überlebenden Tiere der gendefizienten Linien eine im Verlauf und in der Dauer dem WT entsprechende Leberregeneration zeigen, wie aus dem Vergleich der Lebergewicht/Körpergewicht-Ratio hervorging. Die akute Leberschädigung nach PHx war in beiden Genotypen (d.h. WT und LT β R^{-/-} Tieren) durch eine Erhöhung der Leber-Transaminasen geprägt und wurde durch deutliche Veränderungen in der Leberpathologie begleitet. Insbesondere LT β R^{-/-} Tiere zeigten 24 h und 48 h nach PHx ein erhöhtes Vorkommen von großflächigen Nekrosen, eine Fettakkumulation in den Hepatozyten und erweiterte Lymphgefäße, die mit ödematösen Veränderungen um die Portalfelder einhergingen. In einer Transkriptomanalyse von WT im Vergleich zu LT β R^{-/-} Tieren 12 h nach PHx wurden differentiell regulierte Gene in der Leber identifiziert. Bei dem am stärksten differentiell exprimierten Gen handelte es sich um Mug2 (Murinoglobulin 2), das in den LT β R^{-/-} Tieren einen Defekt in der Expression aufwies. Mug2 gehört zur Familie der α 2-Makroglobuline, die zu den Proteinen der Akuten-Phase gehören und neben ihrer Funktion als Protease-Inhibitoren die Fähigkeit besitzen, Zytokine (z.B. TNF, IL-6) zu binden. Bei einer nachfolgenden *Gene Ontology*-Analyse waren in LT β R^{-/-} Tieren folgende funktionale Gengruppen überrepräsentiert: Zellzyklusgene, Gene des Fett-/Cholesterinstoffwechsels und Gene des Koagulationssystem. Außerdem zeigten LT β R^{-/-} Tiere eine grundsätzliche Deregulation unterschiedlicher Zytokine bzw. Serumproteine, wobei es u.a. zu einer signifikant erhöhten Induktion der Alkalischen Phosphatase in LT β R^{-/-} Tieren (24, 48 und 240 h) nach PHx kam. Überdies zeigten WT und LT β R^{-/-} Tiere, dass es nach PHx sowohl im Serum, als auch in der Leber zu einer Störung der Gallensalz(GS)-Homöostase kommt, so dass der LT β R auch eine essentielle Rolle bei der Regulation des enterohepatischen Kreislaufs nach PHx spielt. Liegt ein Defekt im LT β R vor, zeigten LT β R^{-/-} Tiere im Vergleich zu WT Tieren bereits 6 h nach PHx deutlich erhöhte GS-Werte und es kam zu einer vermehrten Akkumulation toxischer GS (wie u.a. LCA), die zu einer Cholestase in den LT β R^{-/-} Tieren führten. Dies könnte die Ursache für das größere Ausmaß der in den LT β R^{-/-} Tieren beobachteten pathologischen Leberschäden sein und auch, zumindest zum Teil, das verminderte Überleben der LT β R^{-/-} Tiere nach PHx erklären. TNFRp55^{-/-} Tiere zeigten ähnliche Veränderungen in den Leberparametern und Serumproteinen wie die LT β R^{-/-} Tiere. Um die

Auswirkung einer gleichzeitigen Blockade beider Signalwege zu überprüfen, wurde den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren Etanercept (Enbrel®), ein TNFR2-F_c Fusionsprotein, injiziert, das die TNFR-Signaltransduktion blockiert. Das Ausschalten des TNFR-Signalweges führte in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nach PHx zu einer 100 %igen Letalität. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass ein Zusammenspiel beider Signalwege notwendig ist, um eine effiziente Leberregeneration nach PHx zu gewährleisten.

Mitglieder der TNFR-Superfamilie sind essentiell für die Abwehr von Pathogenen. Allerdings existieren bisher keine Daten zur Rolle des $LT\beta R$ bei der Abwehr von *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Akute Toxoplasmeninfektionen verlaufen in WT Tieren inapparent, da in der Regel eine effektive, schützende Immunantwort induziert wird, die zur Entstehung einer symptomlosen, chronisch-persistierenden Infektion führt. In $LT\beta R^{-/-}$ Tieren kann das Immunsystem die Replikation von *T. gondii* nicht zügig begrenzen, daher kommt es zu einer erhöhten Letalität (WT: 8 %; $LT\beta R^{-/-}$: 91 %) mit starken inflammatorischen Reaktionen in Lunge und Leber, einer erhöhten Parasitenlast in Lunge und Gehirn und einer abgeschwächten inflammatorischen Reaktion der Milz. Überdies weisen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu WT Tieren eine verzögerte und generell deregulierte Zytokinantwort auf und lassen im Verlauf einer *T. gondii* Infektion sowohl in der Lunge als auch in der Milz eine differentielle Genexpression erkennen: Die Expression von IFN γ sowie IFN γ -abhängiger Gene (z.B. mGBPs, iNOS) ist dabei in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren verzögert bzw. wird nicht induziert.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit, dass der $LT\beta R$ nicht nur während der Leberregeneration sowohl an der Regulation von Zytokinen und der Gallensalzhomöostase beteiligt ist, sondern auch für die Abwehr von *T. gondii* essentiell ist.

VI Summary

The lymphotoxin β receptor (LT β R) and the tumor necrosis factor receptor p55 (TNFRp55), both core members of the TNF/TNFR superfamily, play a pivotal role in hepatocyte-mediated liver regeneration after partial (70%) hepatectomy (PHx). It has been shown that the signaling via both receptors is important for efficient liver regeneration. Loss of >30% of liver mass leads to synchronized proliferation of mature hepatocytes and rapid restoration of liver mass via compensatory hyperplasia, a process orchestrated by distinct signaling cascades. While regenerating, the liver has to continue to fulfill its biological functions, e.g. synthesis of bile and blood proteins. In this thesis, decreased survival rates in LT β R^{-/-} and TNFRp55^{-/-} mice after PHx compared to WT mice could be confirmed (LT β R^{-/-}: 40%; TNFRp55^{-/-}: 50%, respectively). Interestingly, increase of liver mass in surviving LT β R^{-/-} and TNFRp55^{-/-} animals is not delayed and comparable to WT animals, as demonstrated by liver weight/body weight ratios. After PHx, levels of the liver transaminases GPT and GOT were elevated in both cohorts accompanied by substantial changes in liver morphology. Compared to WT animals, LT β R^{-/-} animals showed a higher number of necrotic areas and major fat accumulation in hepatocytes 24 and 48 h post PHx, accompanied by dilated lymphatics and enlarged hepatocytes in liver sections. Using microarray analysis, a panel of differentially expressed genes in WT and LT β R^{-/-} mice could be identified in the liver 12h after PHx. Most prominent among these was a markedly decreased expression in LT β R^{-/-} mice of murinoglobulin-2, a proteinase inhibitor of the α 2-macroglobulin family. α 2-macroglobulins are known to be able to bind cytokines (e.g. TNF, IL-6). Additional Gene Ontology analysis revealed overrepresentation of the GO terms cell cycle, fat-/cholesterol metabolism and coagulation in LT β R^{-/-} mice. In addition, the cytokine expression profile of LT β R^{-/-} animals was altered and several serum proteins appeared to be deregulated (e.g. a significant increase in alkaline phosphatase in LT β R^{-/-} animals 24 h, 48 h and 240 h post PHx). Total bile acid (BA) levels as well as the BA profile changed markedly after PHx and differed between WT and LT β R^{-/-} animals. This might indicate an important role for LT β R signaling in the regulation of the enterohepatic circulation/BA homeostasis after PHx, which seems to be disrupted in LT β R^{-/-} animals. In contrast to WT mice, LT β R^{-/-} mice showed increased elevation of BA levels already 6 h post PHx. Sustained elevation of BA levels in LT β R^{-/-} mice with an accumulation of toxic BA leads to cholestasis and severe liver damage, which might be at least in part responsible for the reduced survival of this genotype after PHx. The results from TNFRp55^{-/-} mice were comparable to the LT β R^{-/-} phenotype after PHx. To investigate a simultaneous inhibition of both signaling pathways, LT β R^{-/-} animals were injected with Etanercept (Enbrel®). Etanercept is a TNFR2-F_c fusion-protein that inhibits TNFR signal transduction. Elimination of TNFR signaling in LT β R^{-/-} mice leads to 100% lethality after PHx. These findings clearly demonstrate the importance of both signaling pathways for sufficient liver regeneration after PHx.

Several members of the TNFR superfamily are important players in the control of infections with intracellular pathogens. To date, the role of $LT\beta R^{-/-}$ animals in response to *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infection has not been analyzed. In WT animals, *T. gondii* infection usually proceeds inapparently and elicits a protective immune response that leads to a symptomless, chronic form of toxoplasmosis. $LT\beta R^{-/-}$ animals were less able to contain replication of the parasites, leading to markedly different organ pathology and higher cyst numbers in lung and liver, causing significantly decreased survival after *T. gondii* Infection. Contrary to WT animals, spleen weight of surviving $LT\beta R^{-/-}$ animals increased only marginally during acute infection, indicating a reduced inflammatory response. In addition, the cytokine response of $LT\beta R^{-/-}$ animals was delayed and the gene expression profile of lung and spleen appeared to be differentially regulated: Expression of $IFN\gamma$ and $IFN\gamma$ -dependent genes (i.e. mGBPs, iNOS) in infected $LT\beta R^{-/-}$ animals was delayed or not induced. Taken together, these data demonstrate that the $LT\beta R$ is not only important for regulation of cytokines and bile acid homeostasis during liver regeneration but also essential for an efficient immune response against *T. gondii*.

1. Einleitung

1.1 Die Mitglieder der TNF/TNFR Superfamilie

An einer Immunantwort sind eine Vielzahl von Zelltypen, löslichen Faktoren und Rezeptoren beteiligt, deren koordiniertes Zusammenwirken zur Aktivierung des Immunsystems führt. Eine Gruppe von Molekülen ist dabei von besonderer Bedeutung: die Tumornekrosefaktor (TNF)/TNF Rezeptor (R)-Superfamilie, die zu den am besten charakterisierten Genfamilien gehört und eine Gruppe von mehr als 40 Liganden und ihren Rezeptoren umfasst (*Ashkenazi and Dixit, 1998; Hehlhans and Pfeffer, 2005; Locksley et al., 2001*). Die Rezeptoren der TNFR-Superfamilie sind Transmembranproteine vom Typ I, deren C-Terminus intrazellulär liegt. Als typisches Merkmal besitzen die Rezeptoren 1 - 6 extrazellulär gelegene Cystein-reiche Domäne(n) (*Hehlhans and Pfeffer, 2005*). Die meisten TNF-Liganden und Rezeptoren werden von Immunzellen exprimiert und besitzen sowohl eine protektive Funktion als auch eine kritische Rolle in der Abwehr von Pathogenen, in der Autoimmunität, der Organogenese des lymphatischen Systems und der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen. Die Mitglieder der TNF-Superfamilie sind Transmembranproteine vom Typ II, das heißt Proteine deren N-Terminus intrazellulär liegt (*Remouchamps et al., 2011*). Mitglieder der TNFR-Superfamilie lassen sich aufgrund ihrer intrazellulären Domänen in drei Subgruppen unterteilen: Die TNFR-Subgruppe zu der u.a. TNFRp55 (TNFR1; CD120a), Fas (CD95) und TRAIL-Rezeptor (Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand-Rezeptor) gehören, enthält eine konservierte Struktureinheit, die sogenannte Todesdomäne (*death domain; DD*). Mitglieder dieser Gruppe werden daher auch als Todesrezeptoren (*death receptors; DR*) bezeichnet, da ihre Aktivierung über spezielle Adaptermoleküle, z.B. *TNF-receptor-associated-Death-Domain* (TRADD) oder *Fas-associated-Death-Domain* (FADD) zur anschließenden Rekrutierung der Caspase-8 und zur Apoptose führt. Die zweite Subgruppe, zu der u.a. CD40, TNFRp75 (TNFR2; CD120b) (*Bluethmann et al., 1994*), LT β R (Lymphotoxin β Rezeptor) (*Nakano et al., 1996*), RANK (*Receptor Activator of NF- κ B*) (*Anderson et al., 1997*) und HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*) (*Marsters et al., 1997; Zhai et al., 1998*) gehören, besitzen keine DD und induzieren über Signal-Transduktionsketten mit diversen TNF-Rezeptor assoziierten Faktor (TRAF)-interagierenden Molekülen (TIMs) (*Chaudhary et al., 2000; Force et al., 2000; Remouchamps et al., 2011*) die Aktivierung intrazellulärer Signalwege wie z.B. des nukleären Faktors κ B (NF- κ B), der c-Jun-N-terminalen-Kinase (JNK), was die Proliferation und das Überleben von Zellen fördert. Die dritte TNFR-Subgruppe umfasst DcR1 (*Decoy receptor 1*, TRAIL-R3), DcR3 (*Decoy receptor 3*, TNFRSF6B) und Osteoprotegerin (OPG), die keine Signal-Transduktionskette besitzen, jedoch mit den beiden anderen TNFR-Subgruppen um ihre korrespondierenden Liganden kompetieren (*Hehlhans and Pfeffer, 2005*). Zusammengefasst kann die Aktivierung der Rezeptoren der TNF-Familie durch ihre Liganden in der Zelle sowohl apoptotische

als auch proliferative Signale induzieren (**Abb. 1.1**). Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden entgegengesetzten Signalen wird durch eine Vielzahl von weiteren Faktoren reguliert.

1.1.1 Die Kernmitglieder der TNF/TNFR Superfamilie

Die Liganden TNF (Tumornekrosefaktor; TNF₃), LT α (Lymphotoxin α ; LT α_3), LT β (Lymphotoxin β ; LT $\alpha_1\beta_2$; LT $\alpha_2\beta_1$), LIGHT (*Lymphotoxin homolog which exhibits Inducible expression and completes with the herpes simplex virus Glycoprotein D for binding of HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes*; TNFSF14) und BTLA (*B- and T-Lymphocyte Attenuator*) und ihre Rezeptoren TNFRp55, TNFRp75, LT β R, HVEM und DcR3 werden auch als Kernmitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie bezeichnet, wobei BTLA und DcR3 nur eine untergeordnete Rolle spielen (Mauri et al., 1998) (**Abb. 1.1**). Der LT β R ist auf folliculären Dendritischen Zellen (FDCs), Stromazellen und Hepatozyten konstitutiv exprimiert (Browning et al., 1997; Wang et al., 2005), jedoch ist er nicht auf hämatopoetischen Zellen, mit Ausnahme von Makrophagen zu finden (Futterer et al., 1998). Im humanen Genom ist der LT β R (**Tab. 1.1**) auf dem Chromosom 12 lokalisiert (Ware, 2005). Das LT β Gen ist im humanen Genom auf dem Chromosom 6 innerhalb der MHC Class III Region lokalisiert (Collette et al., 2003). LT β , bezeichnet in der Regel das nicht kovalent gebundene Heterotrimer LT $\alpha_1\beta_2$. Außerdem existiert eine weitere Form, LT $\alpha_2\beta_1$ (Browning et al., 1993). LT $\alpha_2\beta_1$ bindet an beide TNF-Rezeptoren, wird jedoch nur in geringer Menge von T-Lymphozyten exprimiert (Browning et al., 1995) und spielt soweit bekannt, nur eine untergeordnete Rolle. Die biologisch wichtige Form ist das Heterotrimer LT $\alpha_1\beta_2$ (33 kDa), welches ausschließlich an den LT β R bindet (Crowe et al., 1994) und auf B-, T- und NK-Zellen vorkommt (Ansel et al., 2000). Wenn im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Begriff LT β verwendet wird, ist immer LT $\alpha_1\beta_2$ gemeint. Da eine lösliche Form für LT $\alpha_1\beta_2$ bis dato nicht beschrieben wurde, benötigt die Aktivierung des LT β R über LT $\alpha_1\beta_2$ einen Zell-Zell-Kontakt. Neben dem LT β Heterotrimer bindet auch das 29 kDa große Protein LIGHT an den LT β R (Crowe et al., 1994; Mauri et al., 1998). LIGHT ist ein Typ II Transmembranprotein, das als Homotrimer vorliegt und durch Matrix-Metalloproteinasen von der Zelloberfläche abgespalten werden kann (Morel et al., 2000). Es wird in erster Linie von aktivierten CD8⁺ T-Zellen und in geringerem Maße von CD4⁺ T-Zellen exprimiert (Mauri et al., 1998; Morel et al., 2000). Außerdem ist LIGHT ein Ligand des Rezeptors HVEM, der zunächst als Rezeptor für das Herpes Simplex Virus beschrieben wurde (Montgomery et al., 1996). Sein zelluläres Expressionsmuster ist weitgehend komplementär zu dem des LT β R und erstreckt sich auf unreife Dendritische Zellen (DCs) (Morel et al., 2000; Traber et al., 1999), T- und B-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und Endothelzellen (Harrop et al., 1998; Morel et al., 2000). Sowohl TNF als auch der lösliche Faktor LT α interagieren als Homotrimere mit den homologen TNF-Rezeptoren p55 und p75, die ihre Namen aufgrund ihres jeweiligen

Molekulargewichts von 55-60 kDa bzw. 75-80 kDa erhielten (Corti et al., 1995; Jacob et al., 1991; Loetscher et al., 1990). Das Gen für den TNFRp55 liegt auf dem humanen Chromosom 12p13 dicht am LT β R (*Mus Musculus*: Chromosom 6), während das Gen für den TNFRp75 auf dem humanen Chromosom 1p36 (*Mus Musculus*: Chromosom 4) lokalisiert ist (**Tab. 1.1**) (Budd et al., 1991; Fuchs et al., 1992). Beide Rezeptoren werden von allen kernhaltigen Zellen auf der Oberfläche exprimiert, können aber auch proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten werden (Crowe et al., 1995). Für die löslichen Varianten von TNFRp55 und TNFRp75, die keine Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion spielen, werden zwei mögliche biologische Funktionen diskutiert. Einerseits könnte so die systemische Bioverfügbarkeit reguliert werden, indem die sezernierten Rezeptoren die TNF und LT α gebunden halten und diese verzögert für die Interaktion mit membranständigen Rezeptoren zur Verfügung stellen. Andererseits könnte es sich um eine kompetitive Inhibition handeln, bei der die löslichen Rezeptorvarianten die Liganden endgültig aus dem System entfernen (Crowe et al., 1995). TNF kann nach Stimulation von einer Vielzahl von Zelltypen des Immunsystems (z. B. Mastzellen, Lymphozyten oder Makrophagen) exprimiert werden. Dabei existiert TNF neben der membranständigen Form (mTNF) auch als lösliches Trimer (sTNF, TNF₃), welches in einem streng regulierten Prozess durch *Shedding* mittels der Metalloprotease TACE (*TNF converting enzyme*) von der Zelloberfläche abgespalten werden kann (Black et al., 1997; Remouchamps et al., 2011). Während der TNFRp55 durch lösliches und membranständiges TNF aktiviert werden kann, wird der TNFRp75 vor allem durch membranständiges TNF aktiviert (Grell, 1995). Die Aktivierung über TNF erfolgt jedoch mit einer unterschiedlichen Affinität. So wurde gezeigt, dass lösliches TNF bei 37°C eine ca. 20x höhere Affinität zu TNFRp55 als zu TNFRp75 besitzt (Grell et al., 1998). LT α wird ähnlich wie LT β von peripheren Blutleukozyten (B-, T-Lymphozyten, NK-Zellen) produziert. Im humanen Genom liegt das LT α Gen zusammen mit dem TNF und dem LT β Gen (**Tab. 1.1**) auf dem Chromosom 6 (Collette et al., 2003). LT α bildet Homotrimere aus drei α Ketten (Browning et al., 1995; Browning et al., 1993; Crowe et al., 1995; Remouchamps et al., 2011) und liegt im Gegensatz zu seinem ausschließlich membranständig vorkommenden Homolog LT β ohne Transmembrandomäne vor (Remouchamps et al., 2011). Als Homotrimer bindet LT α an beide TNF-Rezeptoren und an HVEM (Mauri et al., 1998; Schoenfeld et al., 1991).

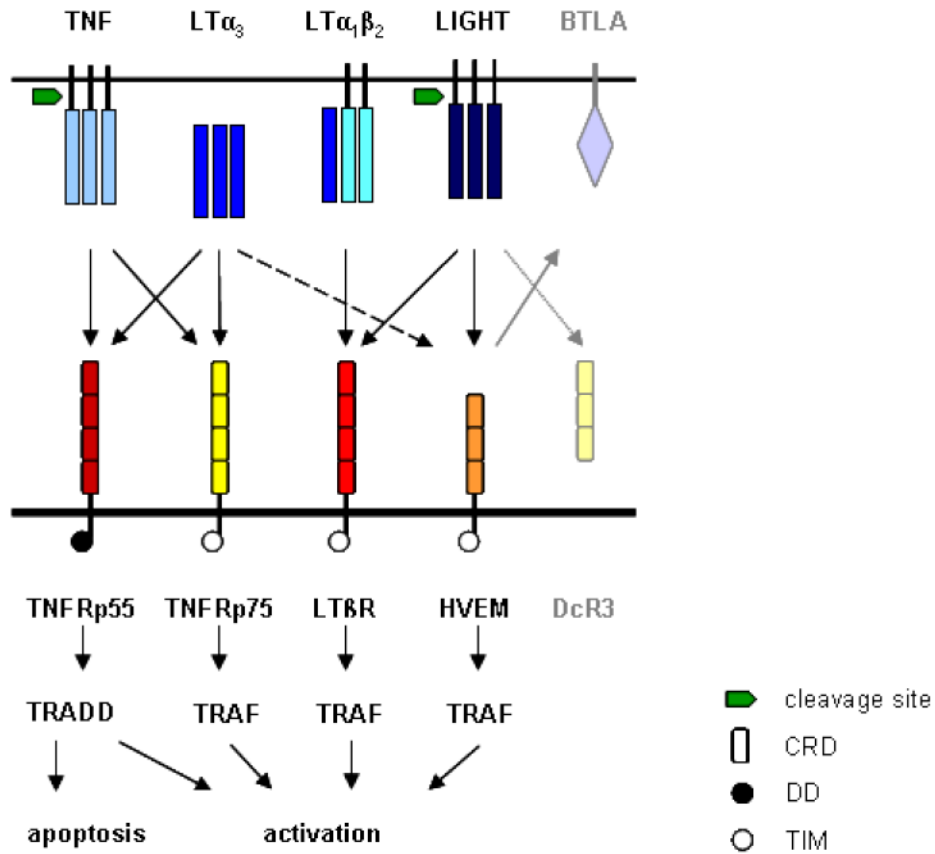


Abb. 1.1: Kernfamilie der TNF/TNFR-Superfamilie. Aus Sorg & Pfeffer, Häussinger D., *Liver Regeneration, De Gruyter Textbook, 1st Edition, 2011*. Pfeile signalisieren die Interaktionen zwischen drei Monomeren eines entsprechenden Liganden und deren verwandten Rezeptoren, die sich nicht-kovalent zu einem biologisch aktiven Trimer verbinden. CRD: Cystein-reiche Domäne; TRAF: TNF-Rezeptor assoziierter Faktor; TIM: TRAF-interagierendes Motiv; DD: Death Domain; TRADD: TNF-receptor-associated-Death-Domain.

Gen	Nomenklatur	Chromosom (<i>homo sapiens</i>)	Chromosom (<i>mus musculus</i>)
TNF	TNF α ; TNF $_3$; TNFSF2	6	17
LT α	TNF β ; LT α_3 ; TNFSF1	6	17
LT β	LT $\alpha_1\beta_2$; LT $\alpha_2\beta_1$; TNFSF3	6	17
LIGHT	HVEM-L; TNFSF14	19	17
TNFR1	CD120a; TNFRp55; TNFRSF1a	12	6
TNFR2	CD120b; TNFRp75; TNFRSF1b	1	4
LT β R	CD18; TNFRSF3	12	6
HVEM	CD270; TNFRSF14	1	4

Tab. 1.1: Nomenklatur der Kernfamilie der TNF/TNFR-Superfamilie. Gene ID modifiziert nach NCBI Datenbank. Referenzen siehe Text in Kap. 1.1.1.

1.1.2 Signalwege über LT β /LT β R und TNF/TNFRp55

Wie bereits beschrieben, spielen TRADD und TRAFs bei der Signaltransduktion von Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie eine essentielle Rolle (**Abb. 1.1**). Beim ersten Schritt im TNFRp55-vermittelten Signalweg bindet trimeres TNF an den Rezeptor. Die TNF-induzierte Aggregation der zytoplasmatischen Domänen des TNFRp55 führt zur Bildung eines membranständigen Signalkomplexes zusammen mit den Adapterproteinen FADD, TRADD, TRAF2 und RIP. Weitere Proteine, wie u.a. Caspase 8 können dann rekrutiert (*Lin et al., 1999; Shu et al., 1997*) und proteolytisch gespalten werden. Es kommt zur Aktivierung der apoptotischen Protease-Kaskade und damit zur Apoptose. Andererseits kann z.B. TRAF2 den I κ B-Kinase-Komplex (*I κ B inducing kinase complex*, IKK) an den TNFRp55 rekrutieren (*Devin et al., 2000*). Dieser Komplex besteht aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β und aus der regulatorischen Untereinheit IKK γ (auch bezeichnet als NEMO, für *NF- κ B essential modulator*) (*Mercurio et al., 1997*). Die Aktivierung des IKK-Komplexes führt zu einer Phosphorylierung und Ubiquitinierung des NF- κ B Inhibitors I κ B α . I κ B α ist ein spezifischer Inhibitor von NF- κ B, der über eine *ankyrin repeat domain* (ARD) an sogenannte Rel-Homologie-Domänen (RHD) bindet, wie sie auch in den NF- κ B Proteinen vorkommen (*Bonizzi et al., 2004*). Durch die Ubiquitinierung kommt es zur proteasomalen Degradation des I κ B α und Freisetzung von NF- κ B (*Chen et al., 1996*). NF- κ B ist ein eukaryotischer Transkriptionsfaktor, der in allen Zelltypen vorkommt. Die NF- κ B Familie besteht aus fünf Mitgliedern: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) und NF- κ B2 (p52/p100) (*Sen and Baltimore, 1986*). Der typische NF- κ B-Komplex besteht aus einem Rel-Protein und p105 oder p100 und liegt als Heterodimer vor (RelA:p105 bzw. RelB:p100). Allen NF- κ B-Proteinen ist gemein, dass sie eine RHD (Rel-Homologie-Domäne) besitzen, welche eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) beinhaltet und die an der Dimerisierung, der DNA-Bindung und der Interaktion mit den I κ B-Proteinen beteiligt ist (*Ghosh et al., 1998*). Durch die Bindung des Inhibitors I κ B α wird NF- κ B (RelA:p105) im Zytoplasma zurückgehalten (*Bonizzi et al., 2004*) und kann nicht in den Zellkern translozieren. Auch p100 und p105 besitzen eine C-terminale ARD und binden darüber an die RHD von RelA bzw. RelB. Nach der Inaktivierung von I κ B α kann die RHD Domäne von p100 bzw. p105 abgespalten werden, die dann als p52 bzw. p50 bezeichnet werden, und mit den entsprechenden Bindungspartnern (RelA bzw. RelB) in den Zellkern translozieren (*Waterfield et al., 2003*) und dort als Aktivatoren, aber auch als Inhibitoren der Transkription wirken (*Ruben et al., 1992; Ryseck et al., 1992*). Die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung ist hierbei IKK β -abhängig (*Delhase et al., 1999; Li et al., 1999*). Außerdem interagiert TRAF2 mit u. a. MEKK1 (*Shi and Kehrl, 1997*) und ASK1 (*Nishitoh et al., 1998*). Unter deren Beteiligung werden die Kinase-Kaskaden initiiert, die zur Aktivierung von JNK und des c-Jun Signalweges führen. Eine Stimulation des TNFRp55 kann daher zur Aktivierung von mindestens zwei Transkriptionsfaktoren führen: NF- κ B und c-Jun. Diese induzieren wiederum die Expression von Genen (z.B. AP-1), die bei vielen biologischen Prozessen wie z.B. Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zelltod, Onkogenese und

Entzündung eine wichtige Rolle spielen. Im Gegensatz zum TNFRp55 kann der LT β R NF- κ B über zwei Signalwege aktivieren (Haybaeck *et al.*, 2009; Muller and Siebenlist, 2003). Er trägt keine Todesdomäne und ist mit TRAF assoziiert. Bei der Bindung eines Liganden an den Rezeptor kommt es durch TRAF einerseits zur Aktivierung des IKK-Komplexes und dann, wie für den TNFRp55 beschrieben, auf dem klassischen oder kanonischen Weg zur Degradation von I κ B α und schließlich zur Translokation von RelA/p50 in den Zellkern. Andererseits aktiviert TRAF die NF- κ B-induzierende Kinase (NIK), die wiederum das IKK α Homodimer aktiviert. Das IKK α -Homodimer phosphoryliert daraufhin p100, das in der Regel an RelB gebunden vorliegt. Ist p100 aktiviert, kann es zu p52 prozessiert werden, das zusammen mit RelB als Heterodimer in den Zellkern wandert und die Transkription der entsprechenden Zielgene steuert (Dejardin *et al.*, 2002). Daher wird dieser alternative Signalweg als IKK α abhängig und IKK β - und IKK γ -unabhängig beschrieben (Dejardin *et al.*, 2002; Senftleben *et al.*, 2001). Bei der klassischen NF- κ B Aktivierung wird vor allem die Transkription pro-inflammatorischer Gene (wie u.a. Integrine, VCAM-1 oder MIP-2) gesteuert (Dejardin *et al.*, 2002; Hehlhans *et al.*, 2003), und so u.a. Leukozyten an den Ort einer Entzündung geführt. Die Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs führt hauptsächlich zur Induktion der Transkription von Genen, die bei der Organisation und Homöostase sekundärer lymphatischer Organe eine wichtige Rolle spielen (z. B. SLC, BAFF).

1.1.3 Der Einsatz von gendefizienten Mauslinien

Die umfangreichen biologischen Wirkungen der TNF Moleküle vermitteln im Organismus ein breites Spektrum von Effekten wie z.B. Entzündungsreaktionen, Apoptose, Nekrose und Differenzierung. Diese Vorgänge sind auch ursächlich an humanen Krankheitsbildern beteiligt. TNF Antagonisten werden gezielt in Therapien u. a. gegen rheumatoide Arthritis, Osteoporose, Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßung und Krebs eingesetzt. Ein wichtiges Instrument zur funktionellen Charakterisierung der einzelnen TNF Familienmitglieder ist durch die Analyse gendefizienter Tiere gegeben. Dies ermöglicht die Entwicklung neuer und erfolgreicher Therapieansätze *in vivo*. In dieser Arbeit wurden LT β R- und TNFRp55-defiziente Mausstämme verwendet, die durch gezieltes *gene targeting* generiert wurden (Futterer *et al.*, 1998; Pfeffer *et al.*, 1993). Die Rolle dieser Rezeptoren für die Leberregeneration und in einem Infektionsmodell wurde näher charakterisiert.

1.1.4 Die Rolle von LT β /LT β R und TNF/TNFRp55 in der Organogenese der primären und sekundären lymphatischen Organe

In primären lymphatischen Geweben, zu denen der Thymus und das Knochenmark zu zählen sind, entwickeln sich die lymphozytären Vorläuferzellen zu immunkompetenten naiven Lymphozyten. Zu den sekundären lymphatischen Geweben gehören neben der Milz, Lymphknoten und Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe in Lunge und Darm und auch die wenig organisierten Ansammlungen lymphatischer Zellen im Gastrointestinal-, Urogenital- und Respirationstrakt. Den Einfluss der Kernmitglieder der TNF/TNFR Superfamilie auf die Entwicklung und Funktion des sekundären lymphatischen Systems war und ist Bestandteil zahlreicher Untersuchungen, die sowohl redundante als auch nicht überlappende biologische Funktionen dieser Moleküle in der Ontogenese sekundärer lymphatischer Organe definiert haben (*Fu and Chaplin, 1999*). LT β R^{-/-} Mäuse besitzen keinerlei Lymphknoten (LK) und Peyer's Patches (PP) (*Futterer et al., 1998*). In LT α ^{-/-} und LT β ^{-/-} Mäusen ist ebenfalls eine Abwesenheit von PP zu verzeichnen, wohingegen speziell für den mesenterialen und cervikalen LK Besonderheiten zu gelten scheinen: In LT α ^{-/-} Tieren sind gelegentlich lymphatische Aggregate im Mesenterium zu beobachten (*Banks et al., 1995*). Dagegen sind in LT β -defizienten Mäusen immer mesenteriale und in einigen Fällen auch sakrale LK anzutreffen (*Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997*). Das Auftreten von mesenterialen LK in LT β ^{-/-} Mäusen, jedoch deren Abwesenheit in LT β R^{-/-} Mäusen weist auf eine mögliche Rolle von LIGHT, als weiteren Liganden des LT β R, in der Organogenese der mesenterialen LK hin. LIGHT^{-/-} Tiere zeigen zwar keinen Defekt in der Entwicklung von LK und PP, in Abwesenheit von LT β in einer doppelt defizienten Mauslinie kommt es aber zu einem reduzierten Auftreten mesenterialer LK (*Mauri et al., 1998; Scheu et al., 2002*). TNF-, TNFRp55- und TNFRp75-defiziente Mäuse zeigen normalerweise keinen Defekt in der Entwicklung der LK (*Pasparakis et al., 2000*), diese Moleküle werden aber benötigt, um PP und Keimzentren zu generieren (*Lemckert et al., 1997; Pasparakis et al., 1996; Toren et al., 1996*). Überdies sind in TNFRp55^{-/-} Tieren in mesenterialen LK T-/B-Zell Bereiche nicht abgegrenzt (*Fu and Chaplin, 1999*). Die Entwicklung von LK und PP läuft in einem festen embryonalen Zeitfenster ab und ist dann fixiert (*Rennert et al., 1998*). Eine Behandlung von schwangeren Mäusen mit einem LT β R-Fusionsprotein, das die Interaktion von LT β mit dem membranständigen LT β R verhindert, lieferte zudem weitere Informationen über den zeitlichen Ablauf der Lymphknotenontogenese: Wird das Fusionsprotein an Tag 12 *p.g.* verabreicht, entwickeln sich nur die mesenterialen, zervikalen, sakralen und lumbalen LK. Erfolgt die Applikation an Tag 16 *p.g.*, entwickeln sich auch axilläre und inguinale LK. Wenn eine Applikation an Tag 18 *p.g.* erfolgt, bilden sich alle LK, auch die poplitealen. PPs werden unter keiner dieser Bedingungen gebildet. Insgesamt erfolgt die Entwicklung von LK und PP also in einem begrenzten Zeitfenster und ist auf ein LT β R-vermitteltes Signal angewiesen. Die Ausbildung einer intakten Milzarchitektur ist, ähnlich wie die der LK, bei fehlendem LT β R-vermitteltem Signal extrem gestört. In LT α ^{-/-} und LT β R^{-/-} Mäusen ist keine T-/B-Zell Segregation in der Milz vorhanden und

die Zentralarteriole ist nicht mehr im T-Zell Bereich zu lokalisieren (Banks et al., 1995; Futterer et al., 1998). Zudem existieren weder B-Zell Follikel noch das Netzwerk der folliculären dendritischen Zellen (FDC) und eine Marginalzone, die normalerweise die rote von der weißen Pulpa trennt, fehlt (Banks et al., 1995; Futterer et al., 1998). In $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen kann jedoch durch Knochenmarktransfer von Wildtypen (Fu and Chaplin, 1999) oder durch Überexpression von LIGHT (Wang et al., 2001) die Ausbildung von FDC-Netzwerken und Keimzentren in der Milz induziert werden. Zwar fehlt auch in $LT\beta$ -defizienten Tieren die Marginalzone in der Milz (Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997), jedoch ist die Organisation der weißen Pulpa weniger gestört als in $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen. Bei TNFRp55- und TNF-defizienten Mäusen bleibt die T-/B-Zellkompartimentalisierung zwar intakt, es kommt aber nicht zur Ausbildung von Marginalsinus, FDC-Netzwerken oder Keimzentren (Alimzhanov et al., 1997; Koni et al., 1997; Pasparakis et al., 1996; Pasparakis et al., 2000; Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993; Toren et al., 1996). Insgesamt wird den Familienmitgliedern der TNF/TNFR-Superfamilie nach diversen Untersuchungen eine wichtige Rolle in der lymphoiden Organogenese und der Milzarchitektur, die wiederum wichtig für eine effektive Immunreaktion sind.

1.1.5 Die Rolle von $LT\beta$ / $LT\beta R$ und TNF/TNFR in der Leberregeneration

Die Hepatozyten-vermittelte Leberregeneration nach >30 % Masseverlust ist ein komplexer Prozess, an dem unterschiedliche Moleküllarten beteiligt sind: Transkriptionsfaktoren, Apoptoseinhibitoren, Zellzyklusproteine und Wachstumsfaktoren. Interessanterweise spielen die Kernmitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie, auch eine Rolle bei regulatorischen Prozessen des Leberwachstums bzw. der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx). Vorarbeiten zeigten, dass $LT\beta R$ -defiziente Mäuse ein vermindertes Leberregenerationsvermögen aufweisen, das auf eine Störung der LIGHT bzw. $LT\beta$ / $LT\beta R$ Signalkaskade zurückzuführen ist. Anders et al. zeigten zunächst, dass transgene LIGHT Tiere (Tg LIGHT) einen massiven Anstieg in der Lebermasse und eine veränderte Morphologie der Hepatozyten aufweisen. Werden Tg LIGHT Tiere aber mit $LT\beta R^{-/-}$ Tieren verpaart, zeigen die Nachkommen keine Auffälligkeiten hinsichtlich Lebermasse oder Leberpathologie mehr, da die Expression des $LT\beta R$ auf Hepatozyten den Effekt von LIGHT mediiert und ein Fehlen des $LT\beta R$ die Hyperplasie unterbindet (Anders et al., 2005). Eine Analyse von $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen zeigte dann eine verminderte Kapazität zur Leberregeneration nach einer 70 % PHx (ca. 40% der $LT\beta R$ -defizienten Tieren versterben). In diesen Tieren konnte eine verminderte DNA-Synthese in den Hepatozyten, vermehrte Nekrosen in der Leber und ein erhöhter Anteil apoptotischer Hepatozyten im Vergleich zu Wildtyp (WT) Tieren nachgewiesen werden (Anders et al., 2005). Tumanov et al. haben dann im Mausmodell gezeigt, dass es ca. 12 h nach einer 70 % PHx zu einer Infiltration von T-Lymphozyten in die Leber kommt und dass auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiertes $LT\beta$ essentiell für eine

effiziente Leberregeneration ist (Tumanov et al., 2009). Um nachzuweisen, dass die Veränderungen in der Leber abhängig von der T-Zell-spezifischen Expression von LIGHT sind wurden Knochenmarkchimären generiert: Letal bestrahlte WT Tiere denen Knochenmark von Tg LIGHT Tieren transplantiert wurde, zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie Tg LIGHT Tiere. Werden in Rag^{-/-} Tiere, die eine Defizienz sowohl in B- als auch T-Lymphozyten aufweisen, Thymozyten von Tg LIGHT Tieren transplantiert, führt das zu einer massiven Hepatomegalie und abnormaler Leberpathologie (Anders et al., 2005). Der TNFR spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Leberregeneration. Innerhalb von 30 Minuten nach einer PHx kommt es zu einem Anstieg in der Expression von TNFRp55 (FitzGerald et al., 1995). TNFRp55-defiziente Tiere sind nicht mehr in der Lage, den Transkriptionsfaktor NF-κB, der als *immediate early gene* früh nach einer PHx exprimiert wird, TNF-abhängig zu induzieren. Des Weiteren ist die STAT3 Aktivierung inhibiert und die Aktivierung von AP-1 (*activator protein 1*) vermindert. Diese Tiere zeigen eine Inhibition in der DNA Replikation und eine erhöhte Mortalität nach PHx (Yamada et al., 1997; Yamada et al., 1998). Auch TNF^{-/-}/LTα^{-/-} Mauslinien weisen eine abnormale Leberregeneration nach akuter und chronischer Leberschädigung auf (Knight and Yeoh, 2005). Dagegen zeigen Mäuse mit einer Defizienz des TNFRp75, obgleich die Expression der Transkriptionsfaktoren AP-1 und C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine) bis ca. 4 h nach der PHx verzögert ist, eine normale Proliferation der Hepatozyten und Leberregeneration nach PHx und bestätigen, dass der TNF/TNFRp55 Signalweg, nicht aber der TNF/TNFRp75 Signalweg essentiell für eine effiziente Leberregeneration ist (Yamada et al., 1998). Nach PHx spielt auch IL-6 eine wichtige Rolle in der Regulation der Leberregeneration, da es relativ schnell nach einer PHx freigesetzt wird (Blindenbacher et al., 2003; Cressman et al., 1996; Taub, 2004). TNFRp55^{-/-} Tiere zeigen nur einen geringen Anstieg von IL-6 nach einer PHx (Shimizu et al., 2009), eine Injektion von IL-6 konnte jedoch eine effiziente Leberregeneration wiederherstellen (Yamada et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass eine Blockierung der TNF-Signalkaskade durch spezifische anti-TNF Antikörper in der Lage ist, die Leberregeneration in WT Tieren zu inhibieren (Akerman et al., 1992; Yamada et al., 1997). Wurden WT Tiere mit einem LTβR-Ig Fusionsprotein (das durch kompetitive Hemmung die Aktivierung des membrangebundenen LTβR hemmt) oder anti-LTβ Antikörper behandelt, zeigten sich stark reduzierte IL-6 Level nach einer PHx (Tumanov et al., 2009). T- und B-Zell-defiziente Rag Tiere, in denen es nach PHx nicht zu einer T-Zell-Lymphozytose kommen kann, die mit einem agonistischen anti-LTβR Antikörper behandelt wurden, zeigten kurz nach PHx einen Anstieg der IL-6 Produktion und insgesamt ein signifikant höheres Überleben. Demnach führt die LTβ/LTβR Interaktion zu einer IL-6 Produktion und zu einer höheren Regenerationsfähigkeit und besserem Überleben nach PHx (Tumanov et al., 2009). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse in LTβR^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Tieren, dass diese Signalkaskaden eine wichtige Rolle in der Leberregeneration nach einer PHx spielen und für eine effiziente Leberregeneration gebraucht werden. Trotzdem überlebt ein gewisser Anteil sowohl der LTβR^{-/-} als auch der TNFRp55^{-/-} Tiere die PHx. Die Frage, ob diese beiden Signalwege synergistisch

wirken bzw. sich gegenseitig kompensieren können, soll als Bestandteil dieser Arbeit aufgeklärt werden.

1.2 Leberregeneration

1.2.1 Anatomie der Leber

Die Leber (griech. *Hepar*) ist eine Anhangsdrüse des Mitteldarms und stellt das größte Stoffwechselorgan des Wirbeltierorganismus dar. Bei den Säugetieren und auch beim Menschen liegt sie im rechten Oberbauch unter der Zwerchfellkuppe. Die Lage der Leber wird beeinflusst durch die Stellung des Körpers, durch den Muskeltonus der vorderen Bauchwand, durch Atemexkursionen und durch die Verdrängungseffekte der anderen Bauchorgane (*Schiebler TH, Schmidt W et al., 2002*). Aufgrund der anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten der Mausleber im Vergleich zur menschlichen Leber werden Mäuse in der Forschung als Versuchstiere eingesetzt und sie unterscheiden sich nur in wenigen Punkten: Beim Menschen wiegt die weibliche Leber 1.200-1.400 g, die männliche Leber 1400-1.500 g (*Wolf DC., Chapter 94, 1990*). Die weibliche Mäuseleber ist durchschnittlich 1,64 g und die männliche 2,18 g schwer (*Krinke et al., 2004*). Die physiologische Lebermasse korreliert in Säugern eng mit dem Körpergewicht, wobei die Leber in der Maus (und im Menschen) ca. 5 % des Körpergewichtes ausmacht. Während die menschliche Leber äußerlich in 2 Leberlappen gegliedert ist (*Kollmar O et al., 2000*), ist sie bei der Maus durch *Incisurae* in einzelne, leicht gegeneinander beweglichen Leberlappen, den *Lobus hepatis sinister lateralis* und *medialis* sowie den *Lobus hepatis dexter lateralis dorsalis* und *medialis*, deutlich unterteilt. Im Hilusbereich sind zusätzlich der *Lobus hepatis dexter lateralis ventralis* und der *Lobus caudatus* zu finden. Zwischen diesen Lappen befindet sich die Leberpforte (*Porta hepatis*), welche Ein- und Austrittsstelle für Nervenfasern, Blut-, Gallen- und Lymphgefäße ist. Die Leberarterie (*A. hepatica*) zweigt direkt von der Aorta ab und führt sauerstoffreiches Blut in die Leber, und auch die Pfortader (*V. portae*) tritt an der Leberpforte mit nährstoffreichem sowie mit Stoffwechsel-Abbauprodukten beladenem venösem Blut, das von den unpaarigen Bauchorganen kommt, in die Leber ein. Somit stellt das Pfortadersystem ein Ver- und Entsorgungssystem der Verdauungsorgane des Körpers dar. Die aus der Leber austretenden Gallengänge vereinigen sich an der Leberpforte zum *Ductus hepaticus communis*. Die Galle wird direkt in den Darm abgegeben (Lebergalle) oder in der Gallenblase gespeichert. Die Mikroarchitektur der humanen und murinen Leber besteht aus hexagonalen 1 x 2 mm großen Zentralvenen-Läppchen (*Lobuli hepatici*).

An den Eckpunkten, an denen drei Leberläppchen zusammentreffen, liegt das Periportalfeld, in dem die Endäste der *V. portae* (*V. interlobulares*) und *A. hepatica* (*A. interlobulares*) sowie die ableitenden

Gallengänge (*D. interlobulares*) verlaufen, die das sogenannte Glisson'sche-Dreieck (Glisson-Trias) bilden. Strahlenförmig um die Zentralvene sind die Hepatozyten angeordnet, die 80% aller Zellen in der Leber ausmachen. Sie sind der vielfältigste Zelltyp des gesamten Körpers, da sie alle Hauptfunktionen der Leber ausüben (*Selden et al., 1999*). Die basale Seite der Hepatozyten ist von den angrenzenden sinusoiden Endothelzellen durch den Disse-Raum getrennt, in dem der Austausch von Substanzen zwischen Blut und Hepatozyten stattfindet (*Parviz et al., 2003*). Zwischen den Hepatozytensträngen (**Abb. 1.2**) liegen auf der apikalen Seite die Gallengangs-Kanalikuli, in welche die gebildete Galle sezerniert und von dort in die Gallengänge abgeleitet wird (*McCuskey, 2008*). Neben den Endothelzellen finden sich noch weitere Nicht-Parenchymzellen in der Leber: Kupffer'sche Sternzellen sind die ungleichmäßig geformten Makrophagen der Leber und liegen luminal an der Wand der Sinusoide. Sie phagozytieren einerseits Stoffe und Pathogene aus dem Blut (z.B. Endotoxine, Bakterien und Viren) und erfüllen daher eine wichtige Funktion in der Immunabwehr, andererseits sezernieren sie Mediatoren die die Immunantwort regulieren und für die Gewebsintegrität wichtig sind (Zytokine, NO (Stickstoffmonoxid) und ROS (reaktive Sauerstoffspezies)) (*Bilzer et al., 2006; Wong et al., 2013*). Die parasinusoidalen Ito-Zellen (hepatische Stern-(Stellatum) Zellen, Lipozyten) sind fettspeichernde, interstitielle Zellen. Sie synthetisieren den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) und speichern Vitamin A. Außerdem sind sie an der Produktion der extrazellulären Matrix beteiligt (*Flisiak, 1997; Wong et al., 2013*). Die Leber-Progenitorzellen (Ovalzellen in Nagern) stellen die hepatischen Stammzellen dar (*Kap. 1.2.3*), die sich sowohl zu Hepatozyten als auch Cholangiozyten differenzieren können und in der adulten Leber in den Hering-Kanälen lokalisiert sind. Akute und chronische Leberschädigungen induzieren die Proliferation der Ovalzellen und fördern so die Leberregeneration (*Lowes et al., 2003*). Pit-Zellen befinden sich zwischen Sinusendothel und Hepatozyten im Disse'schen Spalt. Sie werden auch als leberspezifische Subpopulation der NK-Zellen oder als leberassoziierte Lymphozyten bezeichnet. Bis heute ist über ihre genaue Funktion wenig bekannt.

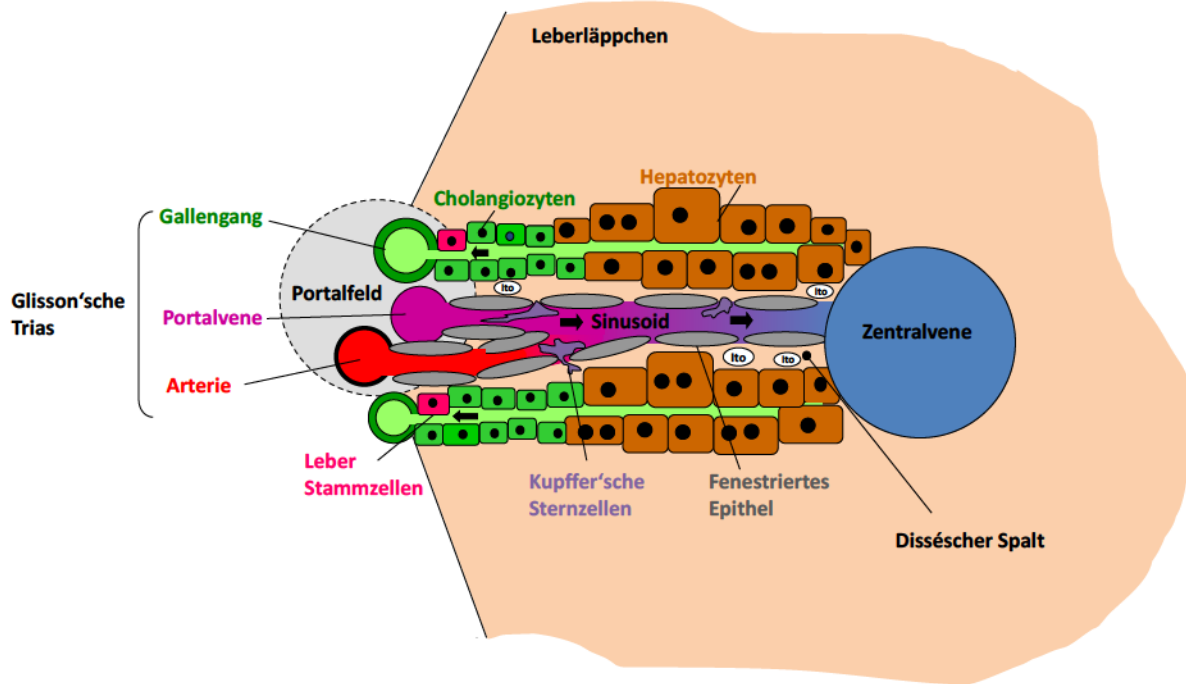


Abb. 1.2: Zellulärer Aufbau der Leber. Modifiziert nach *Dr. Ursula Sorg*. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Zelltypen der Leber. Strahlenförmig von der Zentralvene ausgehend sind die Hepatozyten, die von den sinusoidalen Endothelzellen umgeben sind. Die apikale Oberfläche zwischen den Hepatozytensträngen bilden die Gallengangs-Kanalikuli. Kupfer-Zellen liegen luminal der Wand der Sinusoiden an. Parasinusoidal sind die Ito-Zellen (Stellatum-Zellen) zu finden. Das Pfortadersystem stellt ein Ver- und Entsorgungssystem der Leber dar.

1.2.2 Funktionen der Leber

Als zentrales Stoffwechselorgan reguliert die Leber viele lebenswichtige Stoffwechselvorgänge. Im Kohlenhydrat-Metabolismus sorgt sie für die Glykogensynthese, die Glukoneogenese und reguliert den Blutzuckerspiegel. Beim Lipid-Stoffwechsel ist die Leber für die Synthese und den Abbau der Fettsäuren und die Synthese von Gallensäuren aus Cholesterol zuständig. Die Synthese und der Abbau von Blutplasmaproteinen (z.B. Akute-Phase-Proteine; APP oder Komponenten des Komplementsystems) und Gerinnungsfaktoren findet ebenfalls in der Leber statt. Darüber hinaus ist die Leber das wichtigste Entgiftungs- und Ausscheidungsorgan, da sie z.B. Giftstoffe, die mit der Nahrung aufgenommen wurden oder toxische Metabolite aus dem Blut, filtert (Detoxifizierung) und sie in ungiftige Substanzen umwandelt, die anschließend über den Urin oder mit der Galle ausgeschieden werden. Zudem ist die Leber nach einer Schädigung unter bestimmten Bedingungen zu einer vollständigen Regeneration von Volumen und Funktion fähig (*Michalopoulos and DeFrances, 1997*).

1.2.3 Akute vs. chronische Leberschädigung

Bei Menschen und Nagern besteht eine enge Korrelation zwischen Körpergröße und Lebermasse, die einhergeht mit einer ausgeprägten Fähigkeit der Leber zur Regeneration nach Schädigung (*FrancaVilla et al., 1988*). Es können prinzipiell zwei Mechanismen der Leberregeneration

unterschieden werden: Kommt es zu einer funktionellen Beeinträchtigung durch eine chronische Schädigung (z.B. chronische Vergiftungen, Alkoholabusus, Speicherkrankheiten oder chronische Hepatitiden), die zu einem eingeschränkten Replikationspotential der Hepatozyten führt (Alison et al., 2009; Riehle et al., 2011), wird ein fakultatives Zellkompartiment in der Leber aktiviert, das Eigenschaften von Stammzellen aufweist und im Normalzustand ruht (Lowes et al., 1999; Roskams et al., 2003). Aus diesem Zellkompartiment gehen schnell proliferierende Zellen hervor, die sowohl zu Hepatozyten als auch zu Cholangiozyten differenzieren können (Alison et al., 1996; Fausto and Campbell, 2003; Fougere-Deschatrette et al., 2006; Theise et al., 1999). Bei Nagern wird dieser bipotente Zelltyp als Ovalzelle, das humane Äquivalent als hepatische Progenitorzelle (HPC) bezeichnet (Roskams et al., 2003). Kommt es nach einer akuten Leberschädigung (z.B. Traumata, akuten Vergiftungen, Leber(teil-)resektionen oder Infektionen) zu einem Verlust von Lebermasse mit funktionaler Integrität der verbleibenden Restleber, wird die Regeneration überwiegend durch ausdifferenzierte hepatische Zellen (Hepatozyten und Cholangiozyten) gewährleistet, wenngleich mit einer anderen Dynamik (Fausto et al., 2006; Michalopoulos and DeFrances, 1997). Es handelt sich dabei im engeren Sinne um eine kompensatorische Hyperplasie (Fausto et al., 2006; Roskams et al., 2010).

1.2.4 Modellsysteme zur Aufklärung der Leberregeneration

Die Leberresektion ist bei Krebserkrankungen (hepatozelluläres Karzinom, HCC; cholangiozelluläres Karzinom, CCC) eine der maßgeblichen therapeutischen Ansätze (Haglund et al., 2008; Hasegawa et al., 2007). Eine Grenze der Resektabilität bildet jedoch das benötigte Restvolumen und die Regenerationsfähigkeit der Leber, eine zu kleine Restleber erhöht das Risiko eines sogenannten Post-Hepatektomie-Leberversagens (Garcea and Maddern, 2009). Ein weiteres Problem stellt in der Humanmedizin bei Lebertransplantationen eine zu geringe Transplantationsgröße (< 0,8 – 1 % der Körpermasse des Empfängers) dar, die zu lebensbedrohlichem Organversagen führen kann (*small for size syndrome*) bzw. sind der Resektion von Lebertumoren Grenzen gesetzt, wenn die verbleibende Restleber zu klein ist (Fausto, 2001; Helling, 2006). Ein besseres Verständnis der Prozesse die während der Leberregeneration ablaufen, könnte zur Entwicklung von Strategien/Therapien führen, die das Überleben von Patienten nach Leberresektion bzw. Lebertransplantation verbessern würden. Auch für Leberlebendspender, denen ein Teil der Leber entnommen wird, ist eine effiziente Leberregeneration notwendig und macht unterstützende Therapien relevant. Viele wichtige Erkenntnisse zur Leberregeneration stammen aus *in vitro*-Modellen. Aber während sich basale Mechanismen in diesen Modellen sehr gut simulieren lassen, können experimentelle Studien über Leberzellregeneration nur *in vivo* suffizient untersucht werden (Koniaris et al., 2003). Bei Tiermodellen zur Leberregeneration nach Masseverlust kann zwischen chirurgischen (PHx und Gallengangsligatur) oder chemischen bzw. hepatotoxischen (z.B. Chlorkohlenwasserstoff, D-

Galactosamin oder Acetaminophen) Modellen unterschieden werden. Bei einer partiellen Hepatektomie werden 70 % der physiologischen Lebermasse entfernt (Kap. 1.2.5). Die Gallengangsligatur führt durch unterbinden des *Ductus hepaticus communis* zu einem Gallenrückstau in der Leber, der in kurzer Zeit eine Fibrose erzeugt. Durch eine Applikation von u.a. Chlorkohlenwasserstoff (CCL₄) handelt es sich um eine chemisch induzierte hepatotoxische Leberschädigung (Hepatitis) die zur Apoptose des Parenchyms führt (Rahman and Hodgson, 2000). Vorteil dieser Applikation ist, dass sie im Gegensatz zur Hepatektomie leichter durchzuführen ist. Nachteile sind die geringe Reproduzierbarkeit und eine höhere Variation im Ausmaß des Leberschadens und der Regeneration (Bolesta and Haber, 2002). Im Mausmodell zeigt sich eine Grenze bei Resektionen von 70 % der Lebermasse, bei größeren Resektionen ist die Regenerationsfähigkeit vermindert und die Mortalität steigt (Cataldegirmen et al., 2005). Eine Ausnahme besteht jedoch bei Ratten, die durch eine spezielle OP-Technik weniger in Apoptose gehende Hepatozyten aufweisen und einen Masseverlust von bis zu 90 % ausgleichen können (Makino et al., 2005)(Kubota et al., 1997).

1.2.5 Die partielle Hepatektomie in der Maus

Die erstaunliche Regenerationsfähigkeit der Leber wurde durch das wegberaubende 2/3 Hepatektomie Modell an Nagern von Higgins und Anderson gezeigt (Higgins & Anderson et al., 1931). Nach der chirurgischen Entfernung von zwei Dritteln der Leber (70 %) vergrößert sich die verbliebene Restleber, bis die ursprüngliche Lebermasse wieder hergestellt ist. Normalerweise befinden sich reife Hepatozyten im Ruhestadium (G₀-Stadium) (Furchtgott et al., 2009). In Nagern kommt es ca. 44-48 Stunden nach einer partiellen Hepatektomie zu einer synchronen Teilung fast aller reifen Hepatozyten (95%). Erfolgt eine Leberresektion von $\leq 30\%$ ist das Wachstum der Restleber verlangsamt und die Teilung der Hepatozyten verläuft nicht synchron (Fausto, 2001). Die DNA-Synthese startet dabei in den Hepatozyten, die die Portalvene des Leberläppchens umgeben und schreitet in Zellen in Richtung auf die Zentralvene fort (Skullman et al., 1990). Weitere 24 Stunden später teilen sich nochmal ca. 1/3 der Hepatozyten. Die Teilung der Nicht-Parenchymzellen erfolgt ca. 12-24 Stunden nach der ersten Hepatozytenmitose. Im Schnitt durchläuft jeder Hepatozyt hierbei 1,4mal den Zellzyklus bevor er in den Ruhezustand zurückkehrt (Alison et al., 2009; Fausto, 2000; Stocker and Pfeifer, 1965). Das Lebergewebe nimmt solange zu, bis durch ein optimales Verhältnis zwischen Leber- und Körpermasse eine einwandfreie Stoffwechselfunktion gesichert ist (Kountouras et al., 2001). Zudem haben *in vivo* Versuche eine erstaunliche Teilungsfähigkeit der Hepatozyten dokumentiert: Durch serielle Transplantationen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass adulte Mäuselebern eine regenerative Fähigkeit besitzen die vergleichbar mit hämatopoetischen

Stammzellen ist und bis zu 80 Zellteilungen durchlaufen können (*Overturf et al., 1997*), obgleich Säugerzellen normalerweise bereits nach 20-30 Zellteilungen altern (*Fausto, 2001*). Auf diese Weise ist die gesunde Leber in der Lage, nach extremer Schädigung wie der 70%igen Hepatektomie unter gleichzeitiger Aufrechterhaltung ihrer organspezifischen Funktion zu regenerieren. Bei Nagern ist die Regeneration innerhalb von ca. 7 bis 14 Tagen abgeschlossen (*Bucher, 1963*).

1.2.6 Phasen der Leberregeneration

Innerhalb weniger Stunden nach einer PHx verlassen die Hepatozyten ihren Ruhezustand (G₀-Phase) und treten in den Zellzyklus ein. In der präreplikativen Phase (G₁-Phase) erfolgt die Verdopplung notwendiger Zellkomponenten und die Synthese neuer, proliferationspezifischer Moleküle. In der S-Phase (Synthesephase) erfolgt die DNA-Replikation. Die Moleküle, die die Zelle zur Teilung benötigt, werden in der postreplikativen Phase (G₂-Phase) synthetisiert. Nachfolgend kommt es zur Zellteilung bzw. Mitose (M-Phase). Nach ein oder zwei Runden der Replikation verlassen die Hepatozyten den Zellzyklus und treten wieder in den Ruhezustand ein (*Fausto et al., 2006; Sandgren et al., 1991; Taub, 2004*). Die Zellteilung der restlichen Nicht-Parenchymzellen des Lebergewebes folgt den Hepatozyten mit einigen Stunden Latenz (12-24 Stunden). Die Hepatozytenproliferation lässt sich in drei streng regulierte Phasen gliedern: Anfangs erfolgt eine Initiierungsphase (*Priming*), in der die Hepatozyten in ein Stadium replikativer Kompetenz eintreten. In der darauffolgenden Proliferationsphase wird die Zellpopulation vergrößert. Zuletzt wird in der Terminationsphase das Zellwachstum über das präzise Zusammenspiel von Stimulatoren und Inhibitoren gesteuert und zu einem bestimmten Zeitpunkt gestoppt (*Fausto et al., 2006; Michalopoulos, 2007*). Dabei gehören u.a. *Priming*-Faktoren, Wachstumsfaktoren und Inhibitoren sowie Stimulatoren zu den molekularbiologischen Mechanismen und Regelkreisen, die den Zellzyklus der Leberregeneration steuern. In den ersten 4-6 Stunden nach einer PHx erfolgt mit dem *Priming* der Hepatozyten der Eintritt in den Zellzyklus. Während der frühen Phase nach Leberresektion werden die verbleibenden Hepatozyten mit einem relativ zur Lebermasse vergrößertem Gallensalzpool belastet. Im Mausmodell konnte erstmals gezeigt werden, dass erhöhte Gallensalzkonzentrationen die Leberregeneration durch FXR(Farnesoid-X-Rezeptor)-vermittelte Signale beschleunigen (*Riemann u.a., Gastroenterologie 2010*). Vom Gastrointestinaltrakt stammende Faktoren wie Lipopolysaccharide (LPS) werden hochreguliert und erreichen die Leber über den portalen Blutzufluss. Sie aktivieren hepatische Nicht-Parenchymzellen und induzieren die Freisetzung von TNF und IL-6. Durch TNF, IL-6 und eine rasche Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF-κB, AP-1 oder STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), werden die Hepatozyten gegenüber den Einflüssen von Wachstumsfaktoren wie EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF-α (*Transforming Growth Factor-α*) und HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) sensibilisiert (Koniaris et

al., 2003). Zusätzlich kommt es zu sequentiellen Veränderungen der Genexpression mit mehr als 70 aktivierten Genen in der Leber, die sogenannten *immediate early* Gene wie *c-fos*, *c-jun*, *junB* und *c-myc*. Anschließend werden die *delayed early* Gene exprimiert, darunter das anti-apoptotisch wirkende Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) (Fausto, 2000, 2001; Kountouras et al., 2001; Taub, 1996) sowie einige Inhibitoren: p53, p21, p102. In diesem Zeitraum (4 - 12 h nach einer PHx) kommt es auch zu einer Lymphozytose in der Leber (Minagawa et al., 2000). Sobald die Hepatozyten das *Priming* durchlaufen haben, erfolgt über den Restriktionspunkt in der G1-Phase der Eintritt in die S-Phase. Bei Mäusen liegt dieser zwischen 30 bis 36 Stunden nach einer PHx. Der Übergang ist dabei abhängig von der Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren (z. B. HGF, EGF, TGF- α oder Amphiregulin) und der Aktivierung der Zellzyklusgene bzw. die Expression und Aktivierung einzelner Cycline (Cyclin D, E, A, C und B) sowie Cyclin-abhängiger-Kinasen (Cdks) (Fausto et al., 2006; Taub, 1996, 2004). Ca. 24 – 48 Stunden nach PHx sind die Hepatozyten in der Lage, den Zellzyklus autonom, d.h. wachstumsfaktorunabhängig, mit Eintritt in die Mitose zu beenden.

1.2.7 Gallensalze und der enterohepatische Kreislauf

Die Gallebildung ist ein osmotischer Prozess, der durch die aktive Sekretion von Gallensalzen (GS) und anderen Bestandteilen in die zwischen benachbarten Leberparenchymzellen liegenden Gallengangs-Kanalikuli angetrieben wird. GS stellen dabei den größten Anteil gelöster Substanzen in der Galle dar. Die Galle wird über die Gallenblase in den Dünndarm sezerniert und ist dort für die effiziente Lipidresorption aus der Nahrung verantwortlich. Außerdem reguliert sie die Cholesterin-Homöostase und die Metabolisierung bzw. Ausscheidung endogener (z.B. Bilirubin) und exogener (z.B. Schwermetalle, Medikamente) Substanzen. GS werden einerseits neu synthetisiert, andererseits werden sie sehr effizient aus dem Darm resorbiert, gelangen über die Pfortader wieder in die Leber und werden dort von den Hepatozyten aufgenommen. Dieser Vorgang erfolgt pro Tag etwa vier- bis zwölfmal zwischen Leber und Darm und wird auch als enterohepatischer Kreislauf der GS bezeichnet (**Abb. 1.3**). Nur ein kleiner Teil der wasserlöslichen GS wird via Fäzes und Urin ausgeschieden.

Abkürzung	Bezeichnung
CA	Cholsäure
T-CA	Taurocholsäure
DCA	Deoxycholsäure
T-DCA	Taurodeoxycholsäure
CDCA	Chenodeoxycholsäure
T-CDCA	Taurochenodeoxycholsäure
LCA	Lithocholsäure
T-LCA	Taurolithocholsäure
LCAS	Lithocholsäure-Sulfat
BSEP	Bile Salt Export Pump; ATP-binding cassette sub-family B member 11 (Abcb11)
CYP7A1	Cholesterol-7 α -Hydroxylase; Cytochrom P450 7A1; Cholesterol 7- α -Monooxygenase
NTCP	Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide; LBAT (Slc10a1)
MRP2	Multidrug Resistance-associated Protein 2; canalicular Multispecific Organic Anion Transporter 1 (cMOAT1); ATP-binding cassette sub-family C, member 2 (Abcc2)
MRP3	Multidrug Resistance-associated Protein 3; canalicular multispecific organic anion transporter 2 (cMOAT2); ATP-binding cassette sub-family C, member 3 (Abcc3)
FgF15	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 15
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor; Bile Acid Receptor (BAR); nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4 (NR1H4)

Tab. 1.2: Überblick über die Abkürzungen der GS-Transporter, Enzyme und Rezeptoren.

Die Gallensalzsynthese findet in den Hepatozyten statt. Dort wird aus Cholesterin über mehrere enzymatische Schritte 7 α -Hydroxycholesterin synthetisiert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird durch das Enzym Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1; Cytochrom P450 7A1; Tab. 1.2) durchgeführt, das daher ein wichtiger Ansatzpunkt für regulatorische Mechanismen ist: Der Fibroblasten Wachstumsfaktor FgF15 (Tab. 1.2) ist ein vom Ileum sezerniertes Enterokin (Uriarte et al., 2013), dessen Expression durch GS hochreguliert wird und der durch eine Inhibition der Cyp7A1 Expression die *de novo* Synthese der GS in der Leber herunterregulieren kann (Inagaki et al., 2005; Kir et al., 2011). Ähnliches gilt für den Gallensalzrezeptor FXR (Farnesoid-X-Rezeptor; Tab. 1.2), der in Geweben (wie u.a. Leber, Darm und Niere) exprimiert wird, die GS ausgesetzt sind. FXR reguliert die Expression von Proteinen, die in der GS Synthese involviert sind, u.a. wirkt die Aktivierung von FXR hemmend auf die Expression von CYP7A1, und unterstützt somit die Aufrechterhaltung der GS Homöostase (Keitel et al., 2008).

Hohe Konzentrationen von GS hemmen wiederum die FXR Biosynthese (*Makishima et al., 1999; Wang et al., 1999*). Aus 7 α -Hydroxycholesterin werden im nächsten Schritt die primären GS Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA) synthetisiert. Diese werden dann mit Taurin und Glycin zu den primären Gallensalzkonjugaten modifiziert. Die konjugierten primären Gallensalzkonjugate: Glykocholsäure (GCA), Taurocholsäure (TCA), Glykochenodesoxycholsäure (GCDCA) und Taurochenodesoxycholsäure (TCDCA) werden dann von den Hepatozyten apikal in die Kanikuli transportiert und gelangen über den Gallengang in die Galleblase bzw. in den Darm (**Tab. 1.2**). Die aktive, kanalikuläre Sekretion der konjugierten GS erfolgt dabei zum einem über BSEP (*Bile Salt Export Pump, Abcb11*) (*Kullak-Ublick et al., 2000; Meier and Stieger, 2002*) bzw. kann auch zu einem geringen Anteil passiv über subkanalikuläre Vesikel erfolgen (*Gerloff et al., 1998; Kipp and Arias, 2002*) und zum anderen über MRP2 (*Multidrug Resistance Protein 2, Abcc2*). Darüber hinaus gibt es den basolateralen Transporter MRP3 (*Multidrug Resistance Protein 3, Abcc3*), der den ATP-abhängigen Transport überwiegend konjugierter GS aus dem Hepatozyten in das sinusoidale Blut vermittelt (*Hirohashi et al., 1999*) und damit zu hohe intrahepatozytäre Anreicherung der teilweise sehr toxischen GS verhindern kann (**Tab. 1.2**). Im Darm wird ein Teil der GS durch Darmbakterien einerseits dekonjugiert und andererseits in die sekundären GS Deoxycholsäure (DCA) und die sehr toxische Lithocholsäure (LCA) umgewandelt. Über 95% der Gallensalzmetabolite werden dann durch passive Diffusion aus dem Darm erneut ins Pfortaderblut rückresorbiert. Die Aufnahme in die Hepatozyten erfolgt über den sinusoidalen Natrium-abhängigen Gallensalztransporter Ntcp (*Natrium-Taurocholat-Cotransporting-Polypeptid, Slc10a1; Tab. 1.2*)(*Meier, 1995; Nathanson and Boyer, 1991*). Er ist basolateral über den Leberlobulus verteilt. Transportiert werden hierüber bis zu 80% der konjugierten (z.B. TCA) und 50% der unkonjugierten GS (*Anwer and Hegner, 1978; Anwer and Stieger, 2014; Hagenbuch and Meier, 1996; Kullak-Ublick et al., 2000; Meier and Stieger, 2002*).

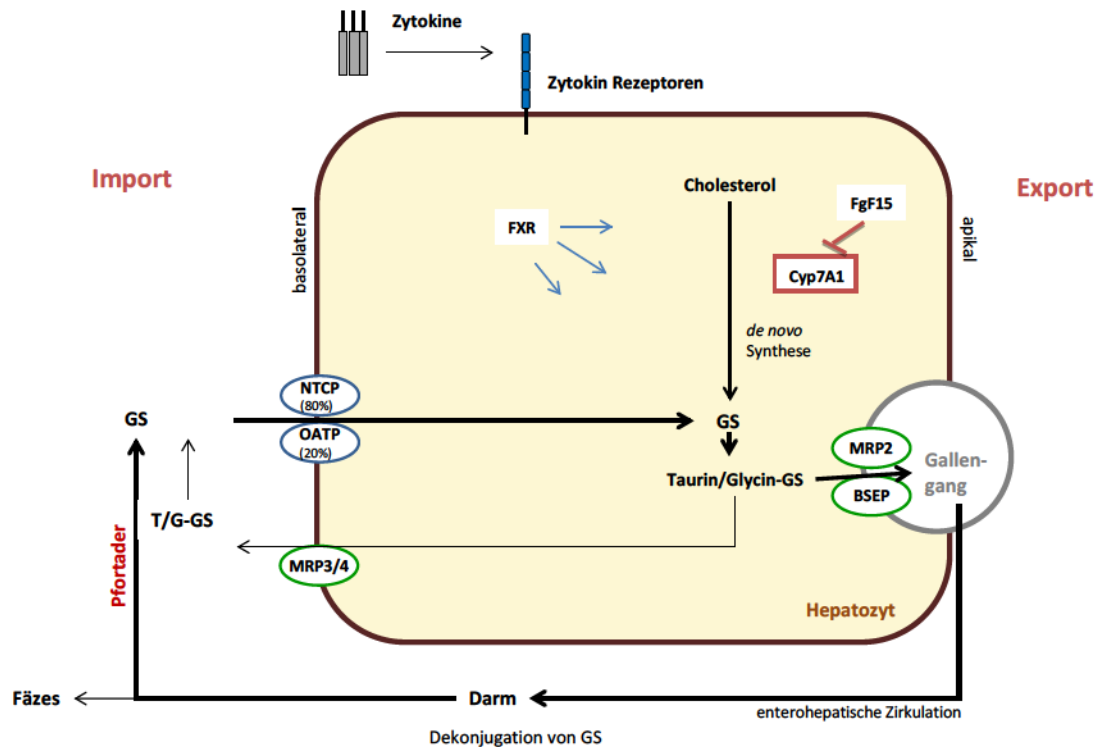


Abb. 1.3: Enterohepatischer Kreislauf. Modifiziert nach *Dr. V. Keitel*. Die Gallensalzsynthese findet im Hepatozyten statt. Dort werden aus Cholesterin über mehrere enzymatische Schritte GS synthetisiert. Reguliert wird diese Synthese durch das Enzym CYP7A1. Neu synthetisierte GS werden dann mit Taurin und Glycin zu den primären Gallensalzkonjugaten modifiziert und von den in der Leber sitzenden Transportern MRP2 bzw. BSEP über den Gallengang in den Darm abgegeben. Der basolaterale Transporter MRP3 vermittelt den ATP-abhängigen Transport konjugierter GS aus dem Hepatozyten in das sinusoidale Blut. Im Darm wird ein Teil der GS durch Darmbakterien modifiziert, wodurch sekundäre GS entstehen. 95% der GS werden erneut ins Pfortaderblut und damit in die Leber rückresorbiert. Nur ein kleiner Teil der wasserlöslichen GS wird via Fäzes und Urin ausgeschieden.

1.2.8 Bedeutung der Gallensalze in der Leberregeneration

Vor einigen Jahren beschrieben *Huang et al.*, dass Gallensalze vermutlich entscheidend an der Initiation der Leberregeneration beteiligt sind und dass eine Erhöhung der Serum-Gallensalzspiegel im enterohepatischen Kreislauf nach einer PHx ein wichtiges Signal für die Regeneration darstellt (*Huang et al., 2006*). Um die proliferative Wirkung der Gallensalze zu testen wurden WT Tiere mit 0.2 % Cholsäure (CA) für 5 Tage gefüttert. Diese Behandlung induzierte keine substanziellen toxischen Effekte wie u.a. eine Erhöhung der ALT (Alanin-Aminotransferase) oder histologische Anzeichen von Leberschäden, führte aber zu einer Vergrößerung der Leber um 30 % (*Huang et al., 2006*). Demnach können Gallensalze neben anderen Wachstumsfaktoren die Zellproliferation der Hepatozyten durch eine Aktivierung spezifischer Rezeptoren induzieren. Weitere Studien zeigten, dass GS nach PHx über eine Stimulation FXR-(Farnesoid-X-Rezeptor)-abhängiger Signalwege kommunizieren müssen, damit es zur Zellteilung, einem gleichzeitigen Schutz der Hepatozyten vor der toxischen Wirkung der GS kommt (*Huang et al., 2006*) und die Gallensalzsynthese an den GS-Anstieg angepasst wird (*Csanaky et al., 2009; Geier and Trautwein, 2007*). Eine Störung im enterohepatischen Kreislauf mit

insuffizienter Gallensalzsynthese nach einer PHx geht mit einer Störung des Fettstoffwechsels einher (Kubitz *et al.*, 1997; Kubitz *et al.*, 1999) und führt zur Inhibition der Regeneration (Meng *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 1994; Ueda *et al.*, 2002). Bestimmte GS (z.B. LCA) sind toxisch und eine Akkumulation der intrahepatischen Gallensalze, wie sie z.B. bei cholestatischen Lebererkrankungen gegeben sind, induzieren Apoptose und Nekrose (Kullak-Ublick *et al.*, 2000). Uriarte *et al.* zeigten zudem, dass der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 15 (FgF15) als essentielles Hormon an der Regulation der Gallensalze während der Leberregeneration nach einer PHx beteiligt ist. FgF15^{-/-} Tiere zeigten erhöhte intrahepatische Gallensalzlevel sowie eine erhöhte Mortalität nach PHx (Uriarte *et al.*, 2013). Gallensalze fördern nicht nur die Zellproliferation und Leberregeneration, sondern initiieren auch den programmierten Zelltod (Keitel *et al.*, 2008).

1.2.9 Die Cholestase

Bei einer Cholestase kommt es durch eine Einschränkung oder Unterbrechung des Gallenflusses zu einem Rückstau von gallenpflichtigen Substanzen ins Blut. Ursache für die Entstehung einer Cholestase kann z.B. eine Obstruktion der ableitenden Gallenwege (mechanisch induziert durch eine PHx), Arzneimittel oder eine systemische Entzündung sein. Unterschieden wird hierbei zwischen einer intrahepatischen und extrahepatischen Cholestase. Bei der hepatozellulären, intrahepatischen Cholestase ist die Ausscheidung der Galle aus den Hepatozyten gestört und es kommt zu einem Stau der Gallenflüssigkeit in der Leber. Die intrahepatische Cholestase kann ursächlich durch ein hepatozelluläres Karzinom, eine Leberzirrhose oder eine primäre biliäre Zirrhose hervorgerufen werden. Überdies wurde gezeigt, dass mit Endotoxin (LPS) behandelte Ratten eine durch Sepsis induzierte Cholestase entwickeln (Trauner *et al.*, 1998). Eine obstruktive, extrahepatische Cholestase (Verschlussikterus) hingegen wird durch mechanische Verlegung der Gallenwege durch z.B. Karzinome oder Gallensteine (Preuss; *Basislehrbuch Innere Medizin, 2. Auflage*) oder experimentell im Tiermodell durch eine Gallengangligatur hervorgerufen (Trauner *et al.*, 1998). Labordiagnostisch ist eine Cholestase beim Menschen durch den Anstieg von konjugiertem Bilirubin, alkalischer Phosphatase (ALP) und Gamma-Glutamyl-Transferase (γ -GT) im Serum charakterisiert (Preuss; *Basislehrbuch Innere Medizin, 2. Auflage*), außerdem kommt es zu Veränderungen in der Expression hepatobiliärer Transportproteine (Keitel *et al.*, 2005).

1.3 *Toxoplasma gondii*

1.3.1 Die Rolle von LT β /LT β R und TNF/TNFR in der Abwehr von bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen

Neben seiner Funktion bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung lymphatischer Organe spielt das LT/LT β R und TNF/TNFR Liganden/Rezeptor-System ebenfalls eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen, hervorgerufen durch Bakterien, Viren oder Parasiten. Nach einer Infektion des Organismus mit Pathogenen kommt es zunächst zur Aktivierung der angeborenen, unspezifischen Immunantwort, die anschließend die Aktivierung der spezifischen, adaptiven Immunantwort induziert. Für eine effektive und schützende Immunantwort wird sowohl eine korrekte Struktur der lymphatischen Organe benötigt, als auch die Aktivierung von Effektorfunktionen, vermittelt u.a. durch den TNFRp55 oder den LT β R. So gibt es beispielsweise Studien, die sich mit der Rolle des LT β R in der Abwehr von bakteriellen Infektionen beschäftigen: Bei einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* zeigen LT α ^{-/-}, LT β ^{-/-} und LT β R^{-/-} Mäuse eine erhöhte Bakterienlast in Lunge und Leber und auch die Überlebensrate ist im Vergleich zu WT Tieren geringer (Ehlers et al., 2003). LIGHT-defiziente Mäuse weisen keine Veränderungen auf und verhalten sich wie die Wildtypkontrollen. Konträr dazu zeigt eine andere Studie, dass LT β -defiziente Mäuse, im Gegensatz zu LT α -defizienten Mäusen, nicht anfälliger für eine Infektion mit *M. tuberculosis* sind (Roach et al., 2001). In LT α ^{-/-} Mäusen bilden sich bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* vergrößerte Granulome in der Lunge, in denen nur Makrophagen, aber keine T-Lymphozyten zu finden sind. Demnach ist LT α essentiell um chronische bakterielle Infektionen zu kontrollieren (Roach et al., 2001). Weiterhin zeigen TNF^{-/-}/LT α ^{-/-} Mäuse oder Mäuse die mit einem LT β R-Ig Fusionsprotein behandelt wurden (funktional LT β -defizient), einen letalen Verlauf nach Infektion mit *Mycobacterium bovis* (BCG). Die Bildung von Granulomen in der Milz ist beeinträchtigt und die Tiere besitzen eine höhere bakterielle Last als Tiere der Kontrollgruppe (Jacobs et al., 2000; Lucas et al., 1999). Erfolgt eine Infektion mit *Citrobacter rodentium*, kommt es in LT α ^{-/-}, LT β ^{-/-} und LT β R^{-/-} Mäusen (im Gegensatz zu WT Mäusen) zu einem Anstieg der Bakterienlast in Leber und Milz und die Tiere versterben (Spahn et al., 2004). Eine erhöhte Sterblichkeit LT β R-defizienter Tiere gegenüber den Kontrollmäusen zeigt sich überdies auch bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* (Ehlers et al., 2003). LT α -defiziente Mäuse, die mit dem lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV) infiziert wurden, zeigen eine starke Beeinträchtigung bei der Aktivierung und Expansion CD8⁺ T-Lymphozyten in der Milz (Suresh et al., 2002) und weisen, indirekt durch die oben beschriebene zerstörte Milzarchitektur verursacht, eine verringerte T-Zellantwort auf. Eine weitere Studie zeigt ebenfalls, dass die zerstörte Milzarchitektur in LT β ^{-/-} Tieren zu einer verzögerten antiviralen Immunantwort führt (Berger et al., 1999). Bei einer Infektion mit Herpesviren (HSV-1) entwickeln LT α ^{-/-} Mäuse eine beeinträchtigte zytotoxische und CD8⁺ T-Zell-Effektorantwort und die Tiere sind anfälliger für eine virale Enzephalitis (Kumaraguru et al., 2001). Erfolgt eine

Infektion von $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen und transgenen $LT\beta$ -IgG Mäusen (kein $LT\beta$ -vermitteltes $LT\beta$ R Signalling) mit dem humanen Zytomegalievirus (CMV), ist eine erhöhte Sterblichkeit der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten (*Benedict et al., 2001*). Die Infektion mit dem murinen Zytomegalovirus (MCMV) zeigt ebenfalls, dass der $LT\beta$ R Signalweg essentiell für das Überleben ist, da sowohl $LT\alpha^{-/-}$, $LT\beta^{-/-}$ als auch $LT\beta$ R-defiziente Mäuse eine stärkere Replikation des Pathogens aufweisen und der Infektion relativ schnell erliegen (*Banks et al., 2005; Benedict et al., 2001*). LIGHT-defiziente Tiere hingegen zeigen nur geringfügige Defekte nach Infektion (*Banks et al., 2005; Scheu et al., 2002*). Die Immunantwort bei $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen ist nach einer niedrig-dosierten Influenzainfektion hingegen nur wenig beeinträchtigt, da die spezifische T-Zellantwort mit einer nur geringen Zeitverzögerung auftritt. Allerdings zeigen hoch-dosierte Infektionen mit Influenzaviren einen tödlichen Verlauf (*Lund et al., 2002*). Zusätzlich zeigt eine Infektion mit Influenza Virus A von $TNF^{-/-}$, $TNF/LT\alpha^{-/-}$, $TNFRp55^{-/-}$ und $TNFRp75^{-/-}$ Tieren, dass $TNF^{-/-}$ und $LT\alpha$ -defiziente Tiere keine effiziente B-Zellantwort während der viralen Infektion zeigen (*Sedger et al., 2002*). Um die Rolle von $LT\alpha$ und $LT\beta$ bei der Abwehr von Parasiten zu untersuchen, wurden unter anderem Infektionen mit *Leishmania major* und *Trypanosoma brucei* in $LT\alpha^{-/-}$, $LT\beta^{-/-}$ und $TNF/LT\alpha^{-/-}$ Mäusen durchgeführt. Die im Leishmaniosemodell verwendeten $LT\beta^{-/-}$ Mäuse hatten ebenfalls eine stark verminderte Überlebensrate im Vergleich zum Wildtypen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit und richtige Organisation der Lymphknoten und nicht die Expression von $LT\beta$ für eine Abwehr von *Leishmania major* wichtig sind (*Wilhelm et al., 2002*). Eine Infektion von $LT\alpha^{-/-}$ und $LT\alpha/TNF\alpha^{-/-}$ Tieren mit *Trypanosoma brucei* hingegen führte zu einem geringen Überlebensvorteil der $LT\alpha^{-/-}$ Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch $LT\alpha/TNF\alpha^{-/-}$ Tiere überlebten die Infektion mit milden immunpathologischen Veränderungen (*Magez et al., 2002*). Die Immunantwort von $LT\beta$ R $^{-/-}$ Tieren nach einer Infektion mit *Plasmodium chaubaudi* zeigte, dass weibliche $LT\beta$ R $^{-/-}$ Tiere eine erhöhte Resistenz gegenüber Malaria aufweisen, wohingegen männliche $LT\beta$ R $^{-/-}$ Tiere dem Parasiten erliegen (*Krucken et al., 2005*). Bei einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) sind speziell $LT\alpha^{-/-}$ und $TNF\alpha^{-/-}$ Mäuse sehr anfällig und sterben an einer durch den Parasiten ausgelösten akuten Toxoplasmenezephalitis. Sie zeigen eine reduzierte IFN γ Sekretion, vermindertes IgM und IgG und reduzierte intrazerebrale Stickstoffmonoxid-(NO) Synthespiegel (*Schluter et al., 2003*). Eine weitere Studie zeigt, dass eine Infektion von $TNFRp55^{-/-}$ Tieren und von $TNFRp55/TNFRp75^{-/-}$ Tieren mit *T. gondii* ebenfalls zu einer letalen Toxoplasmenezephalitis führt und trotz einer im Vergleich zum Wildtypen geringeren Parasitenlast starke inflammatorische Reaktionen auftreten. Hingegen scheint der $TNFRp75$ bei der Immunantwort gegen Toxoplasmen keine Rolle zu spielen, da Tiere mit einer Defizienz im $TNFRp75$ über ausreichende Effektormechanismen verfügen (NO-Synthese) (*Deckert-Schluter et al., 1998; Silva et al., 2009; Yap et al., 1998*). Insgesamt wurde gezeigt, dass Rezeptor-Ligand-Interaktionen in der TNF/TNFR Superfamilie essentiell für Abwehrmechanismen und die Kontrolle von inflammatorischen Prozessen sind wobei die einzelnen Rezeptoren/Liganden in unterschiedlichen Infektionsmodellen

durchaus unterschiedliche Bedeutung haben. Eine Defizienz bzw. Dysregulation bestimmter Mitglieder dieser Familie führt zu einer gestörten Immunantwort die in pathophysiologischen Veränderungen oder einer chronischen Inflammation resultieren (*Hehlgans and Pfeffer, 2005*). LT β R-vermittelte anti-parasitäre Effektormechanismen gegen Toxoplasmen sind bisher noch nicht beschrieben. Deshalb beschäftigt sich ein Teilprojekt dieser Dissertation mit der Charakterisierung des Phänotyps von LT β R-defizienten Tieren im Rahmen einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* und mit der Rolle, die der LT β R bei der Abwehr einer Toxoplasmeninfektion spielt.

1.3.2 Globale Verbreitung und Entwicklungszyklus

Die Toxoplasmose ist eine parasitäre Zoonose, an der weltweit ein Drittel der menschlichen Bevölkerung leidet (*Tenter et al., 2000*), wobei die Prävalenz in den verschiedenen Regionen der Erde sehr unterschiedlich ist. Infektionen kommen am häufigsten in heißen und feuchtwarmen Klimazonen vor und in Gebieten mit geringen Höhenlagen, dabei sind in bestimmten Regionen bis zu 95 % der Bevölkerung infiziert (*Auszug: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>*). Der Erreger, das obligat intrazelluläre Protozoon *T. gondii*, wird taxonomisch dem Stamm der *Apicomplexa* und der Ordnung *Coccidien* zugeordnet. Bei den heteroxenen Coccidienarten, wie *T. gondii* wird ein fakultativer Wirtswechsel beschrieben (*Mehlhorn & Piekarski, Grundriß der Parasitenkunde, 2002*). Endwirte für *T. gondii* sind die Hauskatze und andere Mitglieder der Familie der *Felidae* (*Frenkel, 1970*), die sich durch eine orale Aufnahme von zystenhaltigem Fleisch infizieren und in dessen Darmepithel die geschlechtliche Entwicklung (Gametogonie) des Parasiten bis zur Bildung und Ausscheidung von Oozysten abläuft (**Abb. 1.4**). Nach einer Infektion, kommt es in der Katze zu einer Schizogonie bzw. Merogonie, (Zerfallsteilung), bei der sich ein mehrkerniges Stadium (Schizont bzw. Meront) in mehrere bis viele Zellen (Merozoiten) teilt. Nach mehreren Merontengenerationen entwickeln sich Gametozyten (Makro- und Mikrogamonten) im intestinalen Epithelium (*Dubey, 1992*). Diese reifen im Rahmen der geschlechtlichen Vermehrung zu weiblichen Makro- oder männlichen Mikrogameten heran. Nach Befruchtung der Makrogameten durch die Mikrogameten entstehen Zygoten, die sich zu Oozysten entwickeln und mit dem Fäzes ausgeschieden werden. Werden die Oozysten unsporuliert mit dem Fäzes der Katze ausgeschieden, erfolgt die Sporulation (Sporogonie) im Freien außerhalb des Wirtes. Dabei entstehen aus den in der Oozyste enthaltenen Sporonten zwei Sporoblasten, aus denen sich zunächst zwei Sporozysten entwickeln, die zu je vier Sporozoiten werden. Nach der Sporulation können die Oozysten durch zahlreiche Zwischenwirte oral, durch kontaminierte Nahrung, aufgenommen werden. Im Darm des Zwischenwirtes werden zunächst die Oozystenwand und die Sporozystenhülle durch proteolytische Verdauungssäfte aufgelöst und die Sporozoiten freigesetzt, gefolgt von einer Stadienkonversion zu Tachyzoiten. Die sich schnell replizierenden Tachyzoiten durchdringen daraufhin das Darmepithel

(Tenter et al., 2000) und werden hämatogen und lymphogen im gesamten Körper verteilt. In der akuten Phase der Infektion kommt es dann zur ungeschlechtlichen Vermehrung (Merogonie), überwiegend in Zellen des lymphatischen Systems. (Mehlhorn & Piekarski, *Grundriß der Parasitenkunde* S.89, 2002). Im weiteren Verlauf finden innerhalb einer parasitophoren Vakuole nach und nach wiederholte Teilungsvorgänge (Endodyogonie) statt und es entsteht eine sogenannte Pseudozyste (Mehlhorn & Piekarski, *Grundriß der Parasitenkunde* S. 89, 2002). Die Wand der parasitophoren Vakuole verdickt, wird durch wiederholte Endodyogonie-Schritte lysiert und Tachyzoiten werden freigesetzt. Von nun an verbreitet sich die Infektion schnell über die Lymphknoten in sämtliche Organe des Zwischenwirtes (Dubey, 2010) aus. Während die Infektion weiter voranschreitet differenzieren sich die Tachyzoiten zu Bradyzoiten, die durch einen metabolischen Stillstand charakterisiert sind (Black and Boothroyd, 2000; Yarovinsky, 2014). Bradyzoiten formen Gewebssysteme, die eine hohe Affinität zu neuralen und muskulären Geweben wie Gehirn, Auge, Skelett- und Herzmuskulatur haben, jedoch auch in viszeralen Organen wie Lunge, Leber und Niere beobachtet werden können (Dubey and Frenkel, 1998; Tenter et al., 2000). Diese Gewebssysteme charakterisieren die chronische Infektionsphase, in der der Parasit für die Immunabwehr des Wirtes nicht mehr zugänglich ist. Durch Aufnahme der Gewebssysteme durch den Endwirt, wird ein neuer Infektionszyklus initiiert. Dabei ist die Maus als natürliche Beute der Katze für die Verbreitung der Parasiten besonders wichtig (Mehlhorn & Piekarski, *Grundriß der Parasitenkunde* S.89, 2002). Weitere Zwischenwirte von *T. gondii* sind darüber hinaus alle warmblütigen Lebewesen einschließlich des Menschen (Dubey and Welcome, 1988; Jackson and Hutchison, 1993; Tenter et al., 2000).

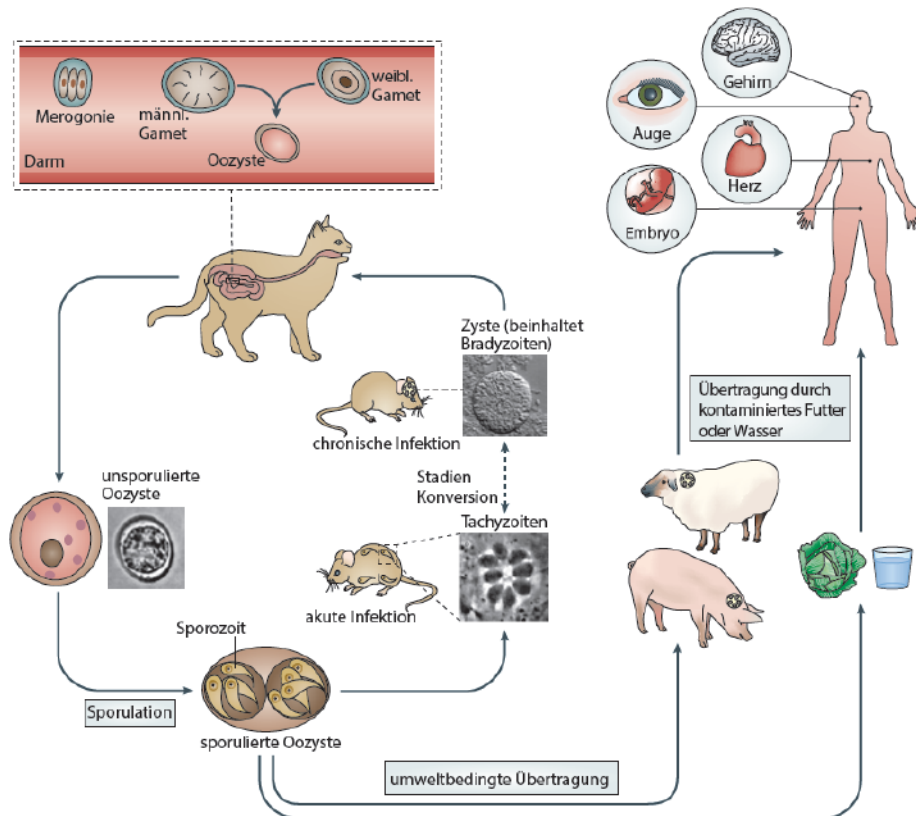


Abb. 1.4: Lebenszyklus und Übertragungswege von *Toxoplasma gondii*. Modifiziert nach (Hunter and Sibley, 2012). Endwirt für *T. gondii* ist die Katze, in der die sexuelle Entwicklung (Gametogonie) des Parasiten bis zur Bildung und Ausscheidung von unsporulierten Oozysten erfolgt. Im Freien kommt es zur Sporogonie und die Oozysten reifen zu infektiösen Oozysten heran. Durch die Aufnahme der Oozysten mit der Nahrung oder im Trinkwasser werden die Zwischenwirte (z. B. Maus) infiziert. Die aufgenommenen Oozysten entwickeln sich zu schnell replizierenden Tachyzoiten (akute Phase) und dann zu zystenbildenden Bradyzoiten (chronische Phase). Durch Verzehr von zystenhaltigen Beutetieren durch den Endwirt schließt sich der Zyklus. Für den Menschen stellt Verzehr von rohem oder ungerätem Fleisch oder mit infektiösen Oozysten kontaminierten Lebensmitteln die Hauptinfektionsquelle dar. Überdies kann es bei einer Erstinfektion während der Schwangerschaft zu einer kongenitalen Übertragung auf den Fötus kommen, die mit Fehlentwicklungen des Fötus und Fehlgeburten einhergeht.

1.3.3 Immunpathologie

Akute Toxoplasmeninfektionen verlaufen in den meisten immunkompetenten adulten Tieren und Menschen asymptomatisch, da in der Regel eine effektive schützende Immunantwort induziert wird (Dubey and Frenkel, 1998), die zur Entstehung einer symptomlosen, chronisch-persistierenden Infektion führt. Klinische Symptome der Infektion in immunkompetenten Menschen variieren von leichten bis hin zu milden grippeähnlichen Symptomen (Joyson et al., 2001). Kann das Immunsystem die Infektion nicht zügig begrenzen, kommt es zunächst zum Zelltod der infizierten Zellen und dann schlimmstenfalls zu lebensbedrohlichen Organläsionen und z.B. Pneumonien, Retinitis oder Enzephalitiden (Joyson et al., 2001). Mit der verbesserten medizinischen Versorgung gibt es immer mehr Menschen, die langfristig Immunsuppressiva einnehmen müssen (z.B. nach Organ- oder Knochenmarkstransplantationen). Auch die Anzahl immundefizienter AIDS-Patienten steigt zwar langsam, aber kontinuierlich an.

Daher gibt es immer mehr Menschen, die ein kompromittiertes Immunsystem aufweisen und bei denen es zu einer Reaktivierung einer chronischen Toxoplasmeninfektion kommen kann. Eine Reaktivierung resultiert in einer erneuten Stadienkonversion zu Tachyzoiten und deren schneller Vermehrung im zentralen Nervensystem (ZNS) und kann unbehandelt in einer tödlich verlaufenden Toxoplasmen-Enzephalitis (TE) enden (Joynton *et al.*, 2001) (Montoya and Liesenfeld, 2004). Kommt es zu einer kongenitalen Infektion (Primärinfektion einer Schwangeren) kann eine Infektion mit *T. gondii* u.a. zu schweren neurologischen Schäden des sich entwickelnden Fötus führen (Joynton *et al.*, 2001) (Lepage *et al.*, 1998; McLeod *et al.*, 2012). Dies macht die Aufklärung der Mechanismen, die bei der Immunantwort gegen *T. gondii* eine Rolle spielen, medizinisch höchst relevant (Montoya and Liesenfeld, 2004). Die Bandbreite des klinischen Schweregrads einer Infektion mit *T. gondii* ist eine Konsequenz vieler Faktoren einschließlich der Genotypen von Wirt und Parasit bzw. dem Zusammenspiel beider Genotypen (Hunter and Sibley, 2012). In Europa und Nordamerika werden drei klonale Linien bzw. Genotypen der Toxoplasmen unterschieden: Typ I – III (Sibley *et al.*, 2009). Charakteristisch für die Stämme ist die unterschiedliche Virulenz im Tiermodell. Der Genotyp-I Stamm ist mit einer letalen Dosis (LD₁₀₀) von 1 Parasiten in allen Mausstämmen hoch virulent (Sibley *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu sind die Genotyp-II und -III Stämme mit einer LD₁₀₀ von mehr als 1000 Parasiten weniger virulent, wobei sich einzelne Mausstämmen in ihrer Suszeptibilität deutlich unterscheiden können. Interessanterweise können die meisten klinischen Isolate des Menschen dem Genotyp II (z.B. ME49) zugeordnet werden (Weiss and Kim, 2004).

1.3.4 Immunologische Interaktion zwischen Wirt und Parasit

Liegt eine Infektion mit *T. gondii* vor, reagiert das Immunsystem mit einer starken, TH₁-vermittelten Immunantwort (Denkers and Gazzinelli, 1998; Liesenfeld, 1999). Die antiparasitäre Immunantwort auf eine *T. gondii* Infektion (**Abb. 1.5**) erfordert eine frühe Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-12, durch das NK-Zellen und CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen zur IFN γ -Produktion angeregt werden (Gazzinelli *et al.*, 1993; Hunter and Sibley, 2012; Hunter *et al.*, 1994; Johnson, 1992; Khan *et al.*, 1994). Ein weiteres wichtiges Zytokin ist TNF, das vorwiegend in aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet wird, die IFN γ -Wirkung verstärkt und so die Immunantwort gegen *T. gondii* unterstützt (Daubener *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion der IL-12-Produktion abhängig von Chemokinrezeptor 5 (CCR5)- und Toll-like-Rezeptoren (TLR)-Signalen ist (Aliberti *et al.*, 2003; LaRosa *et al.*, 2008; Scanga *et al.*, 2002; Yarovinsky *et al.*, 2005). Der Chemokinrezeptor CCR5 wird auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, inklusive Makrophagen und Dendritischen Zellen (Mueller and Strange, 2004). Auch wichtig für die Erkennung von *T. gondii* scheinen die ubiquitär exprimierten TLRs zu sein (LaRosa *et al.*, 2008), da dendritische Zellen über

TLRs in der Lage sind, Antigen-Muster (z.B. Zellbestandteile wie LPS, Flagellin aber auch mikrobielle RNA- und DNA-Fragmente) zu erkennen (Beutler, 2004). Darüber hinaus konnten für *T. gondii* spezifische Liganden für TLRs identifiziert werden, so wird z.B. ein Toxoplasmen-spezifisches, Profilin-ähnliches Molekül durch TLR11 und TLR12 erkannt, aber auch Toxoplasmen-spezifische Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-verankerte Proteine durch TLR2 und TLR4 (Debierre-Grockiego et al., 2007; Yarovinsky, 2014; Yarovinsky et al., 2005). Eine Studie konnte zeigen, dass eine Deletion einzelner TLRs nur einen geringen Effekt auf die Suszeptibilität eines Wirtes gegenüber einer *T. gondii*-Infektion hat, so dass die Funktionen einzelner TLRs in der *T. gondii* Erkennung womöglich redundant sind oder dass zur Erkennung des Parasiten die gleichzeitige Aktivierung mehrerer TLRs wichtig ist (Gazzinelli and Denkers, 2006). Zusätzlich wird vermutet, dass MyD88 als Adaptorprotein essentiell für die Funktionen von TLRs und diverser Zytokine ist und für eine effektive Kontrolle der Toxoplasmose notwendig ist. (Scanga et al., 2002). IFN γ wird als Antwort auf intrazelluläre Pathogene vom Wirt produziert und führt durch die Bindung an TLRs zur klassischen Aktivierung von Makrophagen (Goerdts et al., 1999). Die wichtigste Rolle in der Abwehr des Parasiten durch das angeborene Immunsystem nimmt jedoch die anschließend induzierte IFN γ -Signalkaskade ein. Die Bedeutung von IFN γ in der Abwehr von *T. gondii* zeigt sich in den IFN γ R^{-/-} und IFN γ ^{-/-} Mauslinien, die beide hoch suszeptibel gegenüber einer *T. gondii* Infektion sind (Deckert-Schluter et al., 1996; Scharton-Kersten et al., 1996). IFN γ stimuliert über den IFN γ R die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*), der die Expression diverser Gene induziert und zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid durch Monozyten und Makrophagen führt. So konnte durch eine Studie mit iNOS^{-/-} Tieren gezeigt werden, dass IFN γ - und iNOS-abhängige Mechanismen in der Abwehr von *T. gondii* während der akuten Phase der Infektion eine wichtige Rolle bei der Abwehr dieser Parasiten spielen (Scharton-Kersten et al., 1997). Der Signalweg induziert zudem die Rekrutierung von IFN γ -induzierten GTPasen (z.B. guanosine nucleotide-binding proteins; GBPs und Immunity Related Guanosine Triphosphatases; IRGs), die zur parasitophoren Vakuole rekrutiert werden (Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2013; Taylor et al., 2004, 2007). Diese Proteine tragen dazu bei, dass das parasitäre Wachstum durch verschiedene Mechanismen ATG5 (*autophagy protein 5*) - abhängig gehemmt wird (Howard et al., 2011; Yamamoto et al., 2012). Insgesamt sind die komplexen Mechanismen die eine effiziente antiparasitäre Immunantwort nach Toxoplasmeninfektion ausmachen, noch nicht vollständig aufgeklärt.

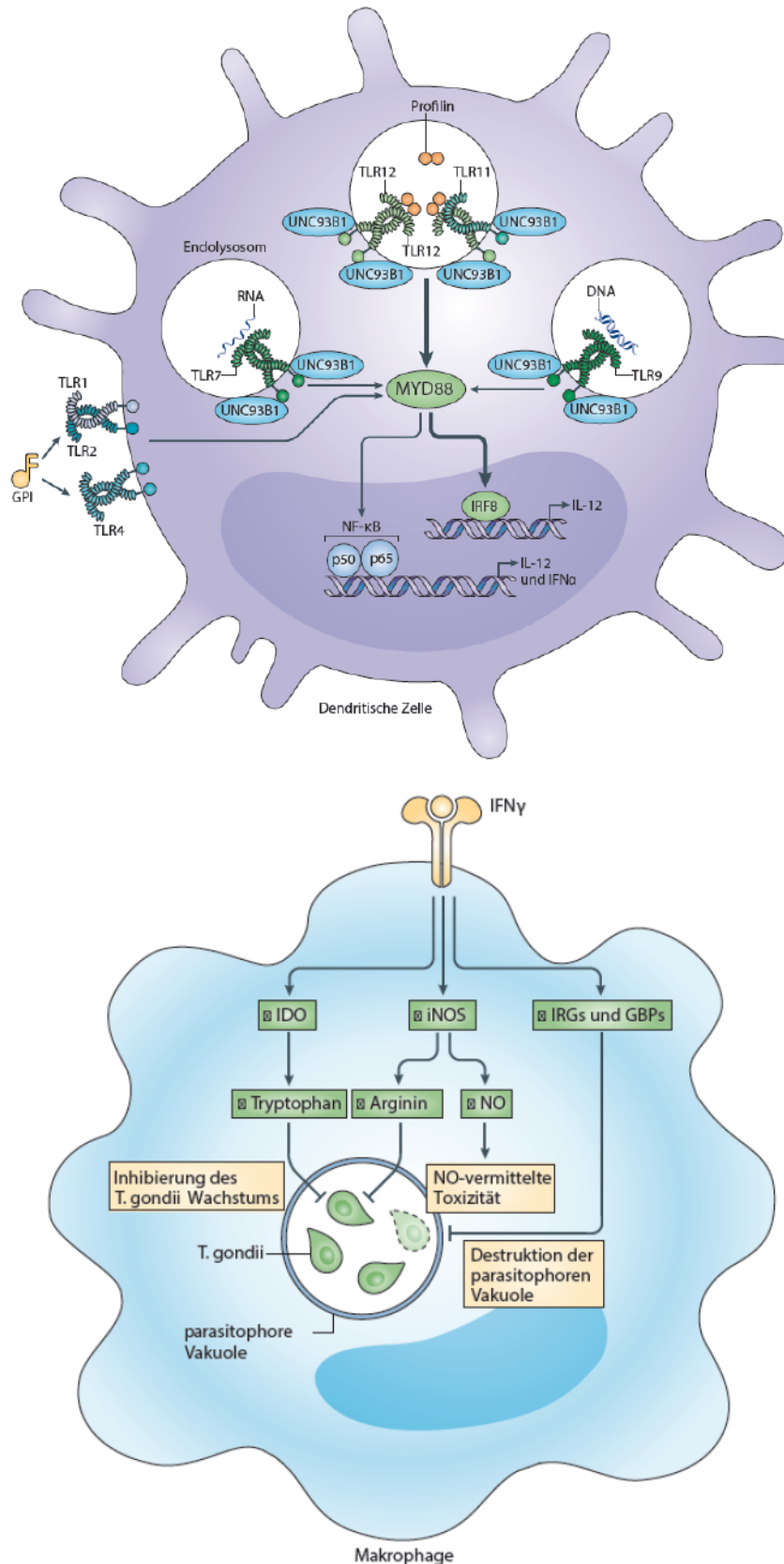


Abb. 1.5: Humorale Immunantwort auf eine Infektion mit *Toxoplasma gondii*. Modifiziert nach (Yarovinsky, 2014).
 Früh nach Infektion werden DCs, Monozyten und Makrophagen aktiviert, die über TLRs *T. gondii* assoziierte Antigene (Profilin, GPI-Anker) erkennen und daraufhin IL-12 bzw. TNF produzieren. Im Rahmen der Immunantwort kommt es daraufhin zur Produktion von IFN γ durch NK-Zellen und CD4 $^+$ /CD8 $^+$ T-Zellen. IFN γ führt über den IFN γ R zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1, der die Expression diverser Gene und auch die Produktion ROS und NO induziert. Der Signalweg vermittelt zudem die Rekrutierung von IFN γ -induzierten GTPasen (GBPs und IRGs), zur parasitophoren Vakuole.

1.4 Zielsetzung

Es ist von erheblicher Bedeutung, ein besseres Verständnis für die Regulation der bei der Leberregeneration ablaufenden Prozesse zu gewinnen, um durch die Entwicklung neuer Medikamente und Therapien die Überlebenschancen nach der Resektion von Lebertumoren oder Lebertransplantationen zu verbessern. Frühere Publikationen zeigten, dass sowohl der LT β R als auch der TNFRp55, zwei Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie, an der Hepatozyten-vermittelten Leberregeneration beteiligt sind und Tiere die weder den LT β R noch den TNFRp55 exprimieren können, ein vermindertes Leberregenerationsvermögen zeigen (Anders *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2009).

Das Hauptziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der Leberregenerationsdefekte in Abwesenheit der LT β R- und TNFRp55-vermittelten Signalwege nach PHx. Dazu wurden LT β R^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Mäuse eingesetzt. Ergänzend wurde durch die Applikation eines TNF-Inhibitors, Etanercept (Enbrel®), in LT β R^{-/-} Tieren der TNFRp55 Signalweg blockiert und funktional LT β R/TNFRp55 doppelt-defiziente Tiere hergestellt. Mittels Etanercept-Behandlung sollte untersucht werden, ob es zu einer Kompensation innerhalb der Signalwege des LT β /LT β R und TNF/TNFRp55 kommt und ob die gleichzeitige Inhibition beider Signalwege die Leberregeneration nach einer PHx völlig gestört ist zum Erliegen bringt. Zusätzlich sollten durch eine Transkriptomanalyse für die Leberregeneration essentielle LT β R-regulierte Gene identifiziert werden.

Die Bedeutung des LT β R Signalweges in der Immunantwort gegen *Toxoplasma gondii* ist bisher noch ungeklärt. Es ist allerdings bekannt, dass der LT β R, ebenso wie TNF, LT α und TNFRp55 für eine effiziente Immunantwort gegen andere Pathogene, wie z.B. *Listeria monocytogenes* und *murines Zytomegalievirus* benötigt wird (Banks *et al.*, 2005; Ehlers *et al.*, 2003; Kutsch *et al.*, 2008). Daher sollten in einem weiteren Teil dieser Dissertation LT β R^{-/-} Tiere mit *T. gondii* infiziert werden, um die Rolle des LT β R in der Abwehr einer *T. gondii* Infektion zu untersuchen. Dazu wurden Serum- und Genexpressionsanalysen in WT und LT β R^{-/-} Tieren während der akuten und chronischen Phase einer *T. gondii* Infektion durchgeführt.

2. Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

A	Aceton	Merck, Darmstadt
	Agarose	Biozym Diagnostik, Hamburg
	Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
B	Betasisodona	<i>TVA OP Inventar</i>
	Blaubrand®intraMARK Mikropipetten	Brand, Wertheim
	BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
C	Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
	Collagenase Typ VIII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Chloroform	Roth, Karlsruhe
D	Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Destilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
	Dithiothreitol (DTT)	Gibco, Paisley
	Dimethylsulfoxid Hybri-Max®(DMSO)	GE Healthcare, München
	DPBS	Gibco, Paisley
	DNase I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
E	Enbrel®(Etanercept)	Pfizer, UK
	Erythrozyten-Lyse-Puffer	Morphisto, Frankfurt am Main
	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
	Ethanol	Merck, Darmstadt
	Ethidiumbromidlösung [1 %]	BD Biosciences, Heidelberg
F	Ficoll Paque™ Plus	GE Healthcare, München
	Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
	Fötales Kälberserum (FCS)	PAN, Eidenbach
G	Go-Taq-Polymerase	Promega, Heidelberg
	Glycerin	Biochrom, Berlin

	L-Glutamin	Biochrom, Berlin
I	Isofluran	DeltaSelect, Dreieich
	Isolation RNA Lysis Reagent	5Prime, Hamburg
	Isopropanol	Merck, Darmstadt
	Isotonische Natriumchloridlösung (0,9%)	DeltaSelect, Dreieich
K	Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L	Loading Dye Solution orange(6x)	Fermentas, St. Leon Roth
M	Massruler DNA-Ladder Mix	Thermo Scientific, Braunschweig
	Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
	2-Mercaptoethanol (50 mM)	Roth, Karlsruhe
	Methanol	Merck, Darmstadt
N	Narketan	Vetoquinol, Ravensburg
	Natriumacetat	Merck, Darmstadt
	Natriumchlorid	VWR, Darmstadt
	Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
	Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
	Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
O	Oligo-(dT)-Primer	Fermentas, St.Leon-Roth
P	Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	PBS Chemikalienpulver	Biochrom, Berlin
	PBS (steril, 0,5l)	Invitrogen, Karlsruhe
	PBS (10x)	Gibco, Paisley
	PCR Nukleotid-Mix (dNTPs)	Fermentas, St.Leon-Roth
	Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Berlin
	Percoll	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Proteinase K (10mg/ml)	Roche, Mannheim
Q	qPCR Master Mix No Rox	Eurogentec, Belgien
R	Reverse Transcription Kit	Invitrogen, Karlsruhe

	RPMI Medium	Gibco, Paisley
S	Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
T	Taq Buffer advanced with Mg ²⁺ (10x)	5Prime, Hamburg
	Taq Polymerase	<i>selfmade AG Pfeffer</i>
	Tissue Tek™ O.C.T™ Compound	Sakura Finetek, Zoeterwoelde, NL
	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
	Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom, Berlin
	Tween® 20	Merck, Darmstadt
U	Ultrapure H ₂ O	Roth, Karlsruhe
W	Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt
X	Xylapan	Vetoquinol, Ravensburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

Blutgas-Analyseröhrchen (Clini Tubes)	Radiometer Medical ApS, Denmark
Capillary Caps	Radiometer Medical ApS, Denmark
Deckgläschen (Microscope Coverslips)	VWR, Darmstadt
FACS- Reaktionsgefäße	BD Biosciences, Heidelberg
Faden: Premilene DS16 4-0	BBD Äskulap, Melsungen
Faden: Safil HR13 5-0	BBD Äskulap, Melsungen
Faden: Dragofil DS19 5-0	BBD Äskulap, Melsungen
INRatio Teststreifen	Inverness, Alere, Köln
Kanülen Sterican	Braun, Wertheim
Kompressen / Tupfer / Wattestäbchen	<i>TVA OP Inventar</i>
Leukoblast	Beiersdorf, Hamburg

Leukofix®	BSN Medical, Hannover
Microsafe Pipetten (INRatio)	Inverness, Alere, Köln
Microtrainer Brand Tubes (EDTA montiert)	<i>TVA OP Inventar</i>
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
Objektträger Starfrost	VWR, Darmstadt
Objektträger Thermo Superfrost Plus	Thermo Scientific, Braunschweig
OP-Hauben (100% Baumwolle)	7days, Berlin
Paraffinblock-Lagerungssystem	Oehmen, Essen
Parafilm M	American National Can, USA
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden BD Falcon, Heidelberg BD Biosciences, Heidelberg Eppendorf, Hamburg Neolab, Heidelberg
Probencup für Serum (Spotchem)	Axonlab, Stuttgart
Reflotron Alkalische Phosphatase (ALP)(Teststreifen)	Roche, Mannheim
Reflotron Pankreas Amylase (p-AMY)(Teststreifen)	Roche, Mannheim
Spritzen Omnifix	Braun, Melsungen
Spotchem™II Liver-1(Teststreifen)	Arkray, Amstelveen, NL
Spotchem™II Blood Urea Nitrogen (Einzelstreifen)	Arkray, Amstelveen, NL
Spotchem™II Amylase (Amy)(Einzelstreifen)	Arkray, Amstelveen, NL
Spotchem™II Glucose (Glu)(Einzelstreifen)	Arkray, Amstelveen, NL
Spotchem™II Cholesterin (Cho)(Einzelstreifen)	Arkray, Amstelveen, NL
Spotchem™II HDL Cholesterin (HDL-c)(Einzelstreifen)	Arkray, Amstelveen, NL
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Tissue Tek Cryomold Intermediate	Sakura Finetek, NL

2.3 OP Instrumente

Schere: <i>Walton scissors</i> (curved / sharp / 9,5 cm)	Fine Science Tools (F.S.T)
Schere: <i>Vannas Spring scissors</i> (curved / 10,5 cm)	Fine Science Tools (F.S.T)
Heiss Retraktor (blunt / 10 cm)	Fine Science Tools (F.S.T)
Hemostat Klemme <i>Allis Baby</i> (4x5 / 12 cm)	Fine Science Tools (F.S.T)
Mikroschere	Fine Science Tools (F.S.T)
Nadelhalter (13 cm)	Fine Science Tools (F.S.T)
Pinzette: <i>Suture Tying Forceps</i> (flat handle / straight / 13 cm)	Fine Science Tools (F.S.T)
Pinzette: Standard <i>Adson pattern with DeBakey</i>	Fine Science Tools (F.S.T)
Pinzette: <i>Eye dressing forceps</i> (curved / 9,5 cm)	Fine Science Tools (F.S.T)

2.4 Kits

FLUKA RNA Isolations Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
In Situ Cell Death Detection Kit, POD	Roche, Mannheim
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche, Mannheim
Lipase Assay	BioTrend, Köln
Mouse CRP DuoSet® ELISA Development Systems	R&D Systems, Minneapolis
Mouse IFN γ DuoSet® ELISA Development Systems	R&D Systems, Minneapolis
Mouse IL-1 β /IL-1F2 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis
Mouse IL-4 DuoSet® ELISA Development Systems	R&D Systems, Minneapolis
Mouse IL-4 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis
Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis
Mouse IL-12 (p40) ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
Mouse TIMP-1 DuoSet® ELISA Development Systems	R&D Systems, Minneapolis
Mouse TNF-alpha/TNFSF1A Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis
Proteome Profiler™ Antibody Array (Mouse Cytokine Array Panel A)	R&D Systems, Minneapolis

QIAshredder™ (50)	Qiagen, Hilden
Quantichrom™ Lipase Assay Kit	BioAssay Systems, USA
RNeasy® Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Kit	R&D Systems, Minneapolis

2.5 Geräte

Abzug	wrt-Laboratorien, Stadtlohn
Analysewaage: Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf
Analysewaage : ABT 120 5 DH	Kern, Buchholz
Axiovert 11 Mikroskop	Zeiss, Jena
Digitalkamera: Powershot G2	Canon, Amsterdam, NL
Ein- / Multikanalpipetten	ThermoFisher Scientific, Bonn
Gefrierschrank -80°C Ultra Low	Sanyo, San Diego, USA
Geldokumentationssystem: <i>BioDocAnalyze</i>	Biometra, Göttingen
Geldokumentationsystem	Bio-Rad, München
INRATIO Gerinnungsmessgerät	Hemosense, USA
Kühlzentrifugen: <i>Biofuge Fresco</i>	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifugen: <i>Megafuge 1.0R</i>	Heraeus, Hanau
Magnetrührer: <i>MR3001 K</i>	Heidolph, Schwabach
MilliQ Synthesis A10	Millipore, Schwalbach
Millipore Elix advantage 3	Millipore, Schwalbach
NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen
PCR Geräte: <i>T1 Thermocycler</i>	Biometra, Göttingen
PCR Geräte: <i>T3 Thermocycler</i>	Biometra, Göttingen
PCR Geräte: <i>T-Gradient</i>	Biometra, Göttingen
pH Meter: MP225	Mettler Toledo, Giessen
Photometer: <i>TECAN Sunrise</i>	Tecan, Männedorf, CH
Photometer: <i>TECAN Rainbow</i>	Tecan, Männedorf, CH
Pipettierhilfe (Pipet-Boy, accu-jet)	Brand, Wertheim

Pipettierhelfer micro	Oehmen, Essen
Proteintransfer-Apparatur : <i>Transblot SD</i>	Bio-Rad, München
Realtime-PCR Maschine: <i>iCycler IQ5</i>	Bio-Rad, München
Reflotron	<i>TVA OP Inventar</i>
Scil Vet abc Plus ⁺	Scil Animal Care, Viernheim
Spannungsquellen: <i>Power Pack P25</i>	Biometra, Göttingen
Spannungsquellen: PS 500 XT	HIS, San Francisco, USA
Spotchem EZ: SP-4430	Axonlab, Stuttgart
Sterilbank: HLB 2472 GS	Hereaus, Hanau
TE2000	Nikon, Düsseldorf
Thermoblöcke, Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge: <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge: <i>Centrifuge 5415 C, miniSpin</i>	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge: <i>Mikro 200</i>	Oehmen, Essen
Ultra-Turrax ^R	IKA-Werke, Staufen
Vortex Schüttler VVR	VWR, Darmstadt
Waage: <i>Precisa 600</i>	Oehmen, Essen
Waage: <i>EMB 2200-0</i>	Kern, Buchholz
Wärmeplatte: HT 007	Minitüb, Tiefenbach
Wasserbad WNB22	Memmert, Schwabach
Zeiss Mikroskop	Zeiss, Jena

2.6 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen (**Tab. 2.1**) wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit hochreinem Wasser aus den Aufbereitungsanlagen MilliQ Synthesis A10 oder Millipore Elix advantage 3 (*Millipore, Schwalbach*) angesetzt und werden als dH₂O bezeichnet. Für RNA-Versuche benötigte Lösungen und Puffer wurden mit DEPC behandelt.

Benötigte Puffer für:	
➤ DNA-Analysen	
DNA-Lysis-Puffer	200mM NaCl 100mM Tris-HCL pH 8,5 5mM EDTA pH 8,0 0,2% SDS (w/v)
TE-Puffer	10mM Tris-HCL pH 8,0 1mM EDTA
TAE-Puffer (50X)	2M Tris-HCL 1M Eisessig (v/v) 0,1M EDTA, pH 8,0
TAE-Puffer (Elektrophoresepuffer)	40mM Tris-HCL 20mM Eisessig (v/v) 2mM EDTA, pH 8,0
dNTP Mix	je 1mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Benötigte Puffer für:	
➤ RNA-Analysen	
DEPC-H ₂ O	0,1% Diethylpyrocarbonat(DEPC) (v/v) in dH ₂ O
80% DEPC-Ethanol	80% Ethanol (v/v) in DEPC-H ₂ O

Benötigte Puffer für:	
➤ Protein-Analysen	
Lysepuffer	140mM NaCl 20mM Tris/HCl 5mM MgCl ₂ 1% NP-40 1 Protease-Inhibitor Tablette (pro 10ml) 1 PhosSTOP-Inhibitor Tablette (pro 10ml) 5mM NaF 2,5mM PMSF, pH 7,6
PBS	137mM NaCl 80,9mM Na ₂ HPO ₄ 2,7mM KCl 1,5mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4

Benötigte Puffer für:	
➤ FACS-Analysen	
Collagenase VIII	100mg/ml in 1x PBS
DNase I	3000U/ml in 1x PBS
FACS-Puffer	1x PBS 2% FCS (v/v) 2mM EDTA
Organ-Verdaupuffer	6% Collagenase VIII (v/v) 1% DNase I (v/v) 93% 1x PBS (v/v)
Stop-Puffer	1% 1x PBS 10mM EDTA

Tab. 2.1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Lösungen und Puffer.

2.7 Synthetische Oligonukelotide

2.7.1 Primer für die Genotypisierung

Die aufgeführten Oligonukleotide (**Tab. 2.2**) wurden von der Firma Metabion (*Martinsried*) synthetisiert und wurden für die Genotypisierung der Versuchstiere eingesetzt.

Bezeichnung	Gen	Sequenz
E 515	TNF-R p55	5'-AGAAATGTCCCAGGTGGAGATCTC-3'
p55R 636	TNF-R p55	5'-GGCTGCAGTCCACGCACTGG-3'
HSV-TK	TNF-R p55 / LT β -R	5'-ATTCGCCAATGACAAGACGCT-3'
LT β -R7	LT β -R	5'-TGTCAGCCGGGGATGTCCTG-3'
LT β -R4	LT β -R	5'-CTGGTATGGGGTTGACAGCG-3'
Sph3	LT β -R 2Lox	5'-CTATGAGGCAATGGGGAAAGAGGG-3'
Sph5	LT β -R 2Lox / 1Lox	5'-GAAGCATTAGCATTGTCCCACGG-3'
Eco3	LT β -R 2Lox	5'-CCCCCAGGGTCTATCTTGGTCCA-3'
Cre-tot 1	Tie2cre	5'-ACGACCAAGTGACAGCAATG-3'
Cre-tot 2	Tie2cre	5'-CTCGACCAGTTTAGTTACCC-3'

Tab. 2.2: Im Rahmen der Arbeit genutzte Primer für die konventionelle Typisierungs-PCR.

2.7.2 Primer für die qRT-PCR

Die aufgelisteten Oligonukleotide (**Tab. 2.3**) wurden von der Firma Metabion (*Martinsried*) synthetisiert. Diese waren bereits auf 100µM voreingestellt. Die jeweiligen Sonden wurden von der Firma Roche (*Mannheim*) bezogen. Weitere Sonden (u.a. für TgB1, mGBP6, mGBP8 und mGBP9) stammten von der Firma TIB MOLBIOL (*Berlin*).

Bezeichnung	Gen	Primersequenz (5'→3')	Sonden#
β-Aktin	Referenzgen: Beta-Aktin	TGACAGGATGCAGAAGGAGA CGCTCAGGAGGAGCAATG	106
Tnip 1	TNFAIP3 interacting protein 1	AGTGACCTGGGCTGAAGCTA CTGGGTCGTAGATCCCGTAG	55
Cyclin D1	Ccnd1	GAGATTGTGCCATCCATGC CTCCTCTTCGCACTTCTGCT	67
G0S2	G0/G1 switch gene 2	TCTCTCCSCTGCACCCTA TCCTGCACACTTCCATCTG	26
Mug1	Murinoglobulin 1	TGAACTATCTCCCACAAGCA GGACAGCTGTGAAATCAGGAG	11
Mug2	Murinoglobulin 2	TAGACACTGCTGGCTTCTCG TCTTCCCTTTGTGGTTGACTT	103
Mug3	Murinoglobulin 3	CATGGCCCTTCTGGAAAGT CTCAGGGCTTTGGAGACAAC	20
pre Mug4	<i>predicted</i> Murinoglobulin 4	ATGGTGGCTTCTCCTCCAC CATGTTTGGACAGAGCATCG	49
Dgkq	Diacylglycerol Kinase theta	CCACCTGCTCGGACTTC ATGGGACATGAAGTTGCAGA	20
Aldh111	Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1	TCCCTACTCCCGTCTTTGA TGCAATCTTCATGGCAACAG	97
Trim30α	Tripartite motif-containing 30	CAACTGCAGAGTTTGGAGGA TGTGTCTGCCTGTCTGACT	98
mKi67	(FHA domain) Interacting nucleolar phosphoprotein (Mki67ip)	GCCGAGTCTGGCATTGAA TTTTCTTCTTCTTTTGCTGAGG	4
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3	GGAAATAACGGTGAAGGTGCT CATGTCAAACGTGAGCGACT	18
IL-6	Interleukin-6	GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA	6
IL-4	Interleukin-4	CATCGGCATTTTGAACGAG CGAGCTCACTCTCTGTGGTG	2
IL-12p40	Interleukin 12 p40 subunit	GATTCAGACTCCAGGGGACA TGTTAGCTTCTGAGGACACATC	27
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	CTTTGCCACGGACGAGAC TGTACTCTGAGGGCTGACACA	13
Light	Herpes glycoprotein D for HVEM on T cells	AGCAGCTGATACAAGAGCGAA CCGGTCAAGCTGGAGTTGG	63
LTα	Lymphotoxin alpha	TCCCTCAGAAGCACTTGACC GAGTTCTGCTTGCTGGGGTA	62
LTβ	Lymphotoxin beta	CCTGGTGACCCTGTTGTTG TGCTCCTGAGCCAATGATCT	76

MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2	GAAAATCATCCAAAAGATACTGAACA CTTTGGTTCTTCCGTTGAGG	26
Cyp7a1	Cytochrome P450 family 7 subfamily a polypeptide 1	TCAAGCAAACACCATTCTG GGCTGCTTTCATTGCTTCA	50
Fgf15	Fibroblast growth factor 15	GCTGGTCCCTATGTCTCAA CGCGGAATCCAACAAAT	69
TGR5	G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar 1)	ATCCCATGGGGTTCTG GAGCAGGTTGGCGATGAC	81
TNFα	Tumor necrosis factor alpha	TCTTCTCATTCTGCTTGTGG GGTCTGGCCATAGAACTGA	49
NFκB (p49/p100)	NF κ B Transcript variant 3 (NF κ B 2)	TTGTCTGACATGGGTCTCCA TGCTTCTTTACCTCTGCTGT	66
IFNβ	Interferon beta	CAGGCAACCTTTAAGCATCAG CCTTTGACCTTTCAAATGCAG	95
IFNγ	Interferon gamma	STCTGGAGGAACTGGCAAAA TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGGTA	63
NTCP	Solute carrier family 10 (sodium / bile acid cotransporter family) member 1 (Slc10a1)	TGAAGGGGGACATGAACCT GTAGATGTATAAGAGGAGAGGCAT	78
FXR	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4 (Nr1h4)	GAAAATCCAATTCAGATTAGTCTCA CCGCGTGTCTGTTAGCAT	83
MRP3	ATP-binding cassette sub-family C (CTFR / MRP) member 3 (Abcc3)	TCCGAAACTACGCACCAGAT CTCATTTCATTTTGCAAGG	79
MRP2	ATP-binding cassette sub-family C (CTFR / MRP) member 2 (Abcc2)	CAAATCCAATTCTCTACCTATGCAC GCCTGCAGTGTGGATCA	92
BSEP	ATP-binding cassette sub-family B (MDR / TAP) member 11 (Abcb11)	AGTGGCTGCTTTTGGTGGT CAGCGCTGAGCAAACATAAG	10
LTβR	Lymphotoxin beta receptor	GCTCCAGGTACCTCCTACTCG ATGCCAGCAGTAGCATTG	21
TgB1	Triple gene block protein (Toxoplasmen-PCR)	GCTAAAGGCGTCATTGCTGTT GGCGGAACCAACGGAAAT	FAM- ATCGCAACGGAG TTCTCCAGACG T-BHQ
mGBP1	Interferon gamma induzierte GTPase 1	CAGACTCCTGGAAAGGGACTC CTTGGACCTGGAACATTCACTGAC	41
mGBP2	Interferon gamma induzierte GTPase 2	TGAGTACCTGGAACATTCACTGAC AGTCGCGGCTCATTAAAGC	17
mGBP3	Interferon gamma induzierte GTPase 3	GGCTGAGGACTGTCCCTGT CATGGTCCACTCGGAAGC	21
mGBP4	Interferon gamma induzierte GTPase 4	GCCAAGATCAAGACCCTCAG CCACGTAGGTTGTCACCAGA	48
mGBP5	Interferon gamma induzierte GTPase 5	TCACTGAAGCTGAAGCAAGG GCGTCAAAAACAAAGCATTTC	48

mGBP6	Interferon gamma induzierte GTPase 6	ATATTTCAACATTTTTGTTCTTGT GAAATGGGAGAAAAATAAATGAAGC	FAM- AGTCATGTTCAAT CTTCTCCCTCTTGT CC-DB
mGBP7	Interferon gamma induzierte GTPase 7	GCAGAGAATCCGGTGCAG TTCCACTAGGCACACAGGA	93
mGBP8	Interferon gamma induzierte GTPase 8	AAGAAGCTGAAGGAACAAAAGGC GAAATGGGAGAAAAATAAATGAAGC	FAM- TGTTTCAGTTGCT GTATCTCTCCGTC CA-TMR
mGBP9	Interferon gamma induzierte GTPase 9	TTCCAAAACCTTCTCCAGTCACAGTA GGCACGCTCCTCTGCAA	FAM- CCAGCAGTGAGG GCTCTATCTGCCT -TMR
GTPBP1	GTP-binding protein 1	GGTGCAGAGCAAAGATGATG ATCTGGAATATCGGGCACAT	75

Tab. 2.3: Im Rahmen der Arbeit verwendete Primer für die qRT-PCR.

2.8 Tierversuche

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß des Tierschutzgesetzes §8 und wurden vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt.

2.8.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden zu mehreren in Plastikkäfigen (GVO) unter einem täglichen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Ernährt wurden sie mit Standardfutter und Wasser *ad libitum*. Versuche und Behandlungen der Mäuse erfolgten mit einem Alter von 10-12 Wochen.

2.8.2 Mauslinien

Als Versuchstiere dienten C57BL/6 Mäuse als Kontrollen und genetisch veränderte, spezifisch-pathogenfreie (SPF) Mäuse der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf.

Mauslinie	Beschreibung	Behandlung
LT β R ^{-/-}	ubiquitär deletiert im Lymphotoxin β Rezeptor	PHx, <i>T. gondii</i> -Infektion, Etanercept Behandlung
TNFRp55 ^{-/-}	ubiquitär deletiert im Tumornekrosefaktor Rezeptor 55 (TNFR1)	PHx, Etanercept Behandlung

CD1	Wildtyp <i>Outbred</i>	<i>T. gondii</i> -Propagation
IFN γ ^{-/-}	ubiquitär deletiert für Interferon gamma	<i>T. gondii</i> –Infektionskontrolle
IRF1 ^{-/-}	ubiquitär deletiert für <i>Interferon regulatory factor 1</i>	<i>T. gondii</i> –Infektionskontrolle
C57BL/6 - WT Tiere	Wildtyp - <i>Littermates</i>	Kontrolltiere

Tab. 2.4: Im Rahmen der Arbeit verwendete Versuchstiere.

3. Methoden

3.1 Tierversuche

3.2 Partielle Hepatektomie (PHx)

Die partielle Hepatektomie bzw. 70 % Leberresektion wurde unter sterilen Bedingungen nach einem etablierten Protokoll durchgeführt (Kap. 3.2.2).

3.2.1 Anästhesie

Die Narkose während der partiellen Hepatektomie und der Scheinoperationen erfolgte mittels Isofluran-Maskeninhalationsnarkose.

3.2.2 Chirurgisches Vorgehen

Die Maus wurde auf einer Thermoplatte platziert und das Abdomen mit einem Einwegrasierer rasiert. Anschließend wurde die Maus steril abgedeckt und mit einer chirurgischen Schere eine Mittellinieninzision (ca. 1,5 cm) unterhalb des Sternums ausgeführt (**Abb. 3.1; 1**). Das Peritoneum wurde angehoben und die Bauchhöhle eröffnet. Nach Einführen eines Retraktors, wurde das *Xiphoid* mit einer Klemme gefasst und nach oben geklappt, so dass die Leber von vorne und oben freigelegt war (**Abb. 3.1; 2**). Das *Ligamentum falciforme* wurde bis zur *V. cava superior* durchtrennt. Mit einem feuchten Q-Tip wurden der rechte und linke Leberlappen angehoben und ein chirurgischer Faden (*DS 19 Dragofil 5-0*), so proximal wie möglich im Hilusbereich der verwachsenden Leberlappen platziert (**Abb. 3.1; 3**). Die Lappen wurden repositioniert, die Fadenenden mit drei Knoten verknötet (**Abb. 3.1; 4**) und die Leberlappen unmittelbar distal des Knotens abgetrennt, so dass ca. 70 % der Gesamtleber reseziert wurden (**Abb. 3.1; 5**). Anschließend wurde das Abdomen mit 5ml sterilem NaCl (0,9 %) gespült und die Wunde mehrschichtig verschlossen (**Abb. 3.1; 6**). Neben der Peritonealnaht, die mittels kontinuierlicher Naht (*HR 13 Safil 5-0*) erfolgte, wurde die Haut durch Einzelhefte verschlossen (*DS 16 Premilene 4-0*) und abschließend mit Betaisodona desinfiziert. Um intraoperativ entstandene Flüssigkeitsverluste (Blutungen, Flüssigkeitsverlagerungen) auszugleichen, wurde der Maus 2 ml steriles NaCl (0,9 %) s.c. in die Flanke injiziert.

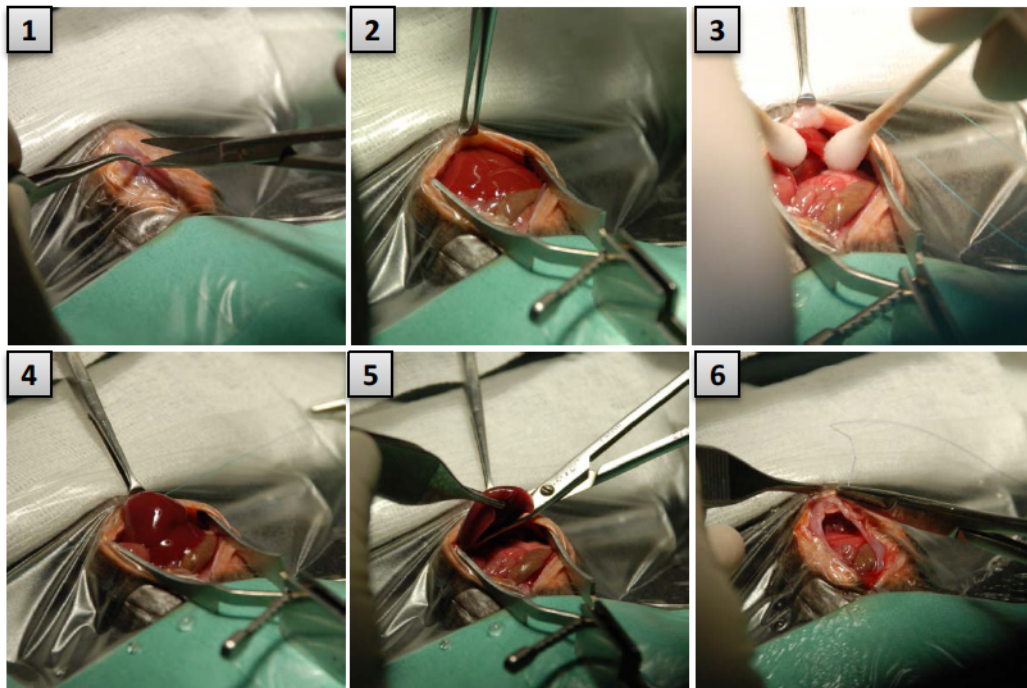


Abb.3.1 (1-6): Partielle Hepatektomie.

3.2.3 Scheinoperation (Sham-OP)

Die Scheinoperation wurde analog zur PHx (d.h. Narkose, Laparotomie, Wundverschluss, Analgesie) ausgeführt. Statt einer Leberresektion erfolgte jedoch lediglich ein durch Q-Tips ausgeübter Druckreiz, um die mechanischen Manipulationen während der PHx zu simulieren. Die postoperative Kontrolle wurde wie bei den partiell hepatektomierten Tieren durchgeführt.

3.2.4 Analgesie

Unmittelbar postoperativ, 24 und 48 Stunden postoperativ wurde den Tieren Rimadyl® in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht (5 mg/ml) s.c. in einem Volumen von 1 µl/g Körpergewicht verabreicht. Damit waren die Tiere über 72 Stunden analgetisch abgedeckt. Bei Schmerzsymptomatik wurde die Analgesie verlängert oder die Tiere aus dem Versuch genommen.

3.2.5 Injektionen mit Etanercept (Enbrel®)

Etanercept lag als Lyophilisat in einer Endkonzentration von 10 mg/ml vor und wurde mit 0,9 % NaCl versetzt. Injektionen erfolgten *s.c.* in den Konzentrationen 5, 10 und 20 mg/kg. Die erste Applikation fand 24 Stunden vor der PHx statt, damit die Tiere zum Zeitpunkt der PHx über einen ausreichenden Etanercept-Serumspiegel verfügen. Die zweite Applikation erfolgte 48 Stunden nach der ersten, also 24 Stunden nach der PHx, um einen ausreichend hohen Etanercept-Spiegel zu erhalten. Die Mortalitätsrate wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen *post PHx* beobachtet.

3.3 Infektion mit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)

T. gondii (Stamm ME49) wurden *in vivo* in Mäusen des Stammes CD1 propagiert. Frische Präparationen von Zystenisolaten (Kap. 3.5.2.2), die aus Maushirnen gewonnen wurden, wurden in einem entsprechenden Volumen von 1x PBS gelöst und die Versuchstiere mit jeweils 20 oder 40 Zysten in einem Volumen von 200 µl *i.p.* infiziert.

Das Überleben der *T. gondii* infizierten Versuchstiere wurde über einen Zeitraum von 60 Tagen *p.i.* bestimmt. Das Gewicht und der Habitus der Tiere wurden in den ersten 12 Tagen *p.i.* (akute Phase) täglich überprüft, später wurden die Tiere 2x pro Woche kontrolliert. Bei schweren Infektionszeichen wurden die Tiere schmerzfrei getötet.

3.4 Versuchsende

Die Leberregeneration nach PHx ist nach ca. 10 Tagen abgeschlossen. Daher wurden die Tiere spätestens 12 Tage nach PHx aus dem Versuch genommen. Das Töten der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation oder durch Entbluten über die *V. cava inferior* unter einer *i.p.* injizierten Narkose aus Ketamin/Xylazin (400 µl; 10 mg/ml Ketamin, 1 mg/ml Xylazin).

Das Versuchsende bei *T. gondii* infizierten Tieren erfolgte durch CO₂ Euthanasie oder Entbluten. Töten durch zervikale Dislokation kann zu Einblutungen ins Gehirn führen und hätte eine weitere Analyse erschwert.

3.5 Entnahme von Untersuchungsmaterial

3.5.1 Blutanalysen

Blutanalysen wurden mit Vollblut, heparinisiertem Vollblut oder Serum durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten und auf diverse Abnahmearten.

3.5.1.1 Entnahme von Vollblut

Bei der Entnahme von Vollblut wurden die Mäuse zunächst mit einer Injektionsnarkose (Kap. 3.4) betäubt. Das Peritoneum wurde eröffnet und das Blut mittels einer 20 G Kanüle aus der *V. cava inferior* kaudal der Mündung der *Venae hepaticae* aspiriert. Zur Blutbildanalyse wurde ca. 50-60 µl Vollblut in ein heparinisiertes oder EDTA imprägniertes Röhrchen überführt und mit dem scil Vet abc Plus⁺ Analysegerät ein mausspezifisches, 4-fach Differentialblutbild erstellt. Das Messprinzip beruhte auf der Impedanztechnologie und Spektralphotometrie. Die Blutentnahme für die Bestimmung der Prothrombin(PT)-Zeit (Gerinnung) erfolgte durch eine submandibuläre Punktion der *Vena temporalis superficialis*, da so zügig eine ausreichende Blutmenge von ca. 50 µl, entnommen werden kann. Der Blutstropfen wurde mit einer MicroSafe Pipette auf die Probenmulde des Teststreifens pipettiert und via INRatio®2 Messgerät die Thromboplastinzeit (INR), die normale und die verlängerte Gerinnungszeit, bestimmt.

3.5.1.2 Serumgewinnung aus Vollblut

Zur Serumgewinnung wurde das Vollblut (Kap. 3.5.1.1) für 30 min bei RT inkubiert und zweimal für 10 min bei 8000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (das Serum) in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.5.1.3 Bestimmungen von Serumparametern

Die Bestimmung der Serumparameter im Blut erfolgte mittels Spotchem 4430. Unter Verwendung verschiedener Reagenzstreifen wurde ein „Serum-Leberprofil“ erstellt und folgende Parameter gemessen: Aspartat-Aminotransferase (AST), die Alanin-Aminotransferase (ALT), Albumin, Total-Prothrombin, Urea, Total-Bilirubin, Glucose, Amylase, Laktat-Dehydrogenase (LDH), HDL-Cholesterin und Total-Cholesterin. Die Reagenzstreifen bestehen aus einem Mehrschicht-Testfeld, in dem sich die notwendigen Reagenzien befinden. Bei Anwesenheit des zu messenden Moleküls/Enzyms kommt es zu einer Farbreaktion, die durch Reflexionsspektroskopie quantifiziert werden kann. Die Alkalische Phosphatase (ALP) wurde mit dem Reflotron bestimmt. Das Prinzip dieser Messung basiert ebenfalls auf der zuvor beschriebenen Technologie.

3.5.1.4 Proteome Profiler (Mouse Cytokine Panel)

Für eine erste Analyse der relativen Zytokinexpression nach Hepatektomie oder Toxoplasmen-Infektion wurde der *Mouse Cytokine Array Panel A*, der bis zu 40 verschiedene Zytokine, Chemokine und Akute Phase Proteine detektieren kann, gemäß den Herstellerangaben verwendet. Auf eine Nitrozellulosemembran, auf der spezifische Antikörper punktförmig gebunden vorliegen, wird Serum aufgebracht, das mit biotinylierten spezifischen Antikörpern gemischt wurde. Antigen/Antikörper-Komplexe werden von den spezifischen Antikörpern auf der Membran immobilisiert und können mit einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase über eine Farbreaktion detektiert werden. Dokumentiert wurde die Intensität des positiven Signals, das einen Aufschluss über die relative Zytokinexpression gibt. Die Auswertung erfolgte durch das Bildbearbeitungsprogramm *Image J*.

3.5.1.5 Enzymgekoppelter Immunoabsorptionsassay (ELISA)

Eine quantitative Konzentrationsbestimmung von Zytokinen im Serum erfolgte mittels verschiedener Quantikine ELISA Kits: Mouse - IL-4, -IL-6, -IFN- γ , -CRP, -IL1- β /IL-1F2, -TIMP-1 und -TNF- α und mit dem Mouse - IL-12 (p40) ELISA Set. Die ELISAs wurden laut Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip dieser Kits beruht auf der „Sandwich-ELISA-Technik“ (**Abb. 3.2**), bei der ein monoklonaler Primärantikörper am Boden einer 96-Well-Multititerplatte vorfixiert wurde, an den das in der Probe enthaltene Antigen spezifisch bindet. Der anschließend zugegebene Zweitantikörper ist Biotin-gekoppelt und bindet ebenfalls spezifisch an das Antigen, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich) entsteht. Die Quantifizierung der Zytokinmenge erfolgt, indem ein Konjugat aus Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase das Antikörper-konjugierte Biotin bindet und die Peroxidase eine enzymatische Farbreaktion nach Zugabe des Substrates 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin (TMB), katalysiert. Jede Reaktion wurde durch Zugabe von 2 N Schwefelsäure (H₂SO₄) beendet. Die Farbintensität wurde mittels Mikroplattenleser photometrisch bei 450 nm bestimmt.

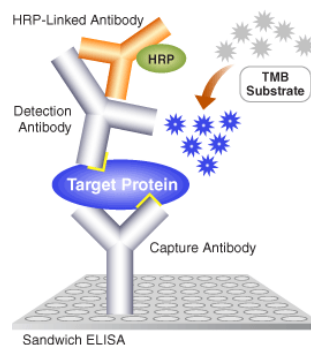


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISAs

(Quelle: <http://www.cstj.co.jp/ddt/images/sandwich.gif>)

3.5.1.6 NO-Assay

Eine quantitative Bestimmung der Stickstoffmonoxid(NO)-Konzentration im Serum erfolgte durch das *Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Assay Kit*. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip des kommerziell erhältlichen Kits beruht auf der Griess-Reaktion und wurde in zwei Schritten durchgeführt. Beim ersten Schritt wird die NO Konzentration basierend auf einer enzymatischen Konversion von Nitrat zu Nitrit durch die Nitrat-Reduktase bestimmt. Im zweiten Schritt wird Nitrit über das Griess-Reagenz bestimmt. Die photometrische Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 540nm lässt auf die gesamte Nitrat-Nitrit-Konzentration (in der Summe als NO bezeichnet) schließen. Die Konzentration wurde, entsprechend der Anleitung des Assays, nach Abzug der Blanks mit der Standardkurve berechnet.

3.5.1.7 Lipase-Assay

Die Lipase Aktivität im Serum wurde mit dem *QuantiChrom™ Lipase Assay Kit* gemessen. Der Assay wurde, wie in den Herstellerangaben beschrieben, durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der Lipase-Aktivität basiert auf einer photometrischen Messung der Umsetzung von Dimercaptopropanol Tributyrat (BALB) mit 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic Säure) (DTNB). Bei dieser Reaktion entstehen SH-Gruppen, die zu einem Farbumschlag führen. Die Farbintensität wurde bei 412nm gemessen.

3.5.1.8 Gallensalzanalyse (Serum)

Die Gallensalzanalyse der Serumproben wurde in Kooperation mit Dr. Diran Herebian (*Kinderklinik, Uniklinikum Düsseldorf, UKD*) durchgeführt. Dafür wurden 25 µl Serum mit 10 µl internem Standard (d4-CA, d4-GCA, d4-GCDCA) (10 µg/ml) und 65 µl Methanol gemischt. Die Messung erfolgte mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (UPLC-MS/MS).

3.5.2 Organentnahmen

Nach dem Entbluten der Versuchstiere (*Kap. 3.1.3*) wurden die folgenden Organe/Gewebe entnommen: Leber, Gehirn, Milz, Niere, Herz, Lunge und Lipom. Diese wurden bis zur weiteren Verarbeitung sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.5.2.1 Bestimmung des LG/KG Quotienten

Um das Verhältnis zwischen Leber- und Körpergewicht zu bestimmen, wurden sowohl die Versuchstiere als auch die regenerierten Leberlappen gewogen nach Versuchsende und der Quotient (LG/KG-Ratio) berechnet.

3.5.2.2 Zystenpräparation aus infizierten Maushirnen

Die Präparation der *T. gondii* Zysten aus infizierten Maushirnen erfolgte mittels CO₂-Euthanasie mit anschließender Gehirnresektion. Zur Entfernung von Blutrückständen wurde das Gehirn 2-3mal in 20 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Gehirn in einer kleinen Petrischale grob zerkleinert, mit 4 ml 1x PBS versetzt und mehrmals durch sukzessiv kleiner werdende Kanülen (18, 20, 22, 23 Gauge) gesogen. Die entstandene Hirnsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, das Zentrifugationsröhrchen 2mal mit 5 ml 1x PBS nachgespült und die Suspension 5 min bei 800 x *g* zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit den Zysten in 1 ml 1x PBS resuspendiert und nach einer weiteren Zugabe von 14 ml 1x PBS, vorsichtig mit 10 ml Ficoll ($\rho = 1,077 \pm 0,001$ g/ml) unterschichtet. Es folgte eine Dichtegradientenzentrifugation (ohne Bremse) für 25 min bei 1000 x *g*. Die Interphase des Dichtegradienten, in dem u.a. auch Zysten vorliegen, wurde abgenommen und aufbewahrt (für eine ggfs. wiederholte Zentrifugation) und der restliche Überstand bis auf 1 ml abgesaugt. Das Zysten-Pellet wurde in dieser Lösung resuspendiert und mit 50 ml 1x PBS vermischt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 1000 x *g*. Der Überstand wurde wieder abgenommen, das Pellet mit den Zysten in ca. 500 μ l Restlösung resuspendiert und 10 μ l dieser Zysten-Suspension zur Zystenanzahlbestimmung auf einen Objektträger, mit 18x18 Deckglas, pipettiert. Zur Lyse der Zysten wurde die gewünschte Zahl an Zysten aus der 500 μ l Zysten-PBS-Suspension in eine 24-Well Platte gegeben und mit 150 μ l Trypsin/EDTA-Lösung resuspendiert. Die Lyse wurde am Mikroskop kontrolliert und durch Zugabe von 500 μ l FCS gestoppt. Die Toxoplasmen wurden in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, die Wells mit 2 ml 1x PBS gespült und bei 15 min bei 1000 x *g* zentrifugiert. Zur Bestimmung der Zystenlast im Gehirn wurde auf den abschließenden Lyseschritt verzichtet.

3.5.2.3 Gallensalzanalyse (Leber)

Die Gallensalzanalyse aus Gewebe wurde in Kooperation mit Dr. Diran Herebian (*Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, UKD*) durchgeführt. Dazu wurden ca. 100 mg der entnommenen Leber eingewogen und mit einem Pistill in 300 μ l Methanol homogenisiert.

Die eigentliche Messung erfolgte via Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (UPLC-MS/MS).

3.5.2.4 Aufbereitungen von Organen für die Zellzahlbestimmung

Zur quantitativen Untersuchung der Zellzahlen in *Toxoplasma*-infizierten Tieren wurden Leber, Lunge und Milz nach einem etablierten Protokoll aufbereitet. Zunächst wurden die Organe in 1x PBS gewaschen, in je 3 ml Verdau-Puffer (Kap. 2.6) überführt und mit einer Pinzette grob zerteilt. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation der Zellsuspension bei 37 °C. Die verdauten Organe wurden durch repetitives Auf- und Abpipettieren homogenisiert, mit 5 ml Stopp-Puffer (Kap. 2.6) versetzt und durch ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Daraufhin folgte bei 4 °C eine 5minütige Zentrifugation bei 700 x g, das Zellpellet wurde dann je nach Organ unterschiedlich bearbeitet. Bei der Milz wurde das Zellpellet mit 3 ml Ery-Lyse-Puffer für 3 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 ml FACS-Puffer (Kap. 2.6) gestoppt, für 5 min bei 700 x g (4 °C) zentrifugiert und das Pellet in 10 ml FACS-Puffer aufgenommen. Es erfolgte eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer. Die Lungen- und Leberaufbereitung erfolgte nach einem Protokoll der AG von Prof. Dr. Thomas Hehlhans (*Institut für Immunologie, Universität Regensburg*). Hierbei wurde das Pellet nach Zentrifugation mit einem Percoll-Gradienten (70 % / 40 %) unterschichtet und für 20 min bei 1000 x g (RT) zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen, Parenchymzellen befanden sich in der oberen, die Erythrozyten in der unteren Phase. Die mittlere Phase beinhaltete Mischpopulationen (Nicht-Parenchymzellen oder Lymphozyten) und wurde mit einer 1 ml Pipette abgenommen, in ein neues 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und ebenfalls mit 10ml FACS-Puffer versetzt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte, wie bei der Milz beschrieben.

3.6 Histopathologie

Von den entnommenen Organen wurden Paraffinschnitte angefertigt. Alle Paraffinschnitte wurden spezifisch gefärbt um histopathologische Befunde zu dokumentieren. Zudem wurden gefärbte Gewebeschnitte hinsichtlich ihrer Zystenlast und Lymphozyteninfiltration nach *Toxoplasmen*-Infektion beurteilt.

3.6.1 Anfertigung und Verarbeitung von Paraffinschnitten

Die Fixierung aller zu untersuchenden Organe erfolgte über Nacht in Formalin 4%, pH 7. Nach Wässerung über mehrere Stunden unter fließendem Leitungswasser erfolgte die Einbettung halbautomatisch über eine Reihe von Isopropanol-Verdünnungen aufsteigender Konzentrationen (12 h 50 %, 2x 1 h 70 %, 1 h 75 %, 2x 1 h 96 %, 3x 1 h 100 %) zu Xylol (2x 1 h) und schließlich zu Paraffin (1 h und 5 h). Die Paraffinschnitte wurden am Schlittenmikrotom mit einer Schnittstärke von 1 µm durchgeführt. Vor den folgenden Färbungen wurden die Schnitte 1h bei ca. 37 °C inkubiert, um ein besseres Haften des Gewebes auf dem Träger zu erreichen. Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden vollautomatisiert gefärbt. Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Standardfärbungen, in Kooperation mit Prof. Dr. med. Helmut E. Gabbert (*Institut für Pathologie, UKD Düsseldorf*), angefertigt.

3.6.2 Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung bot einen guten Überblick über die Morphologie des Gewebes und wurde als Standardfärbung gewählt. Hämatoxilin färbt die basophilen Zellkerne blau und Eosin koloriert die azido- oder eosinophilen, zytoplasmatischen Proteine rot. Die Färbung erfolgte automatisiert.

3.6.2.1 Das Scoring in der HE Auswertung

Um die gefärbten Paraffinschnitte zu beurteilen wurde ein Scoring System erarbeitet (modifiziert nach (*Ishak et al., 1995*)). Beurteilt wurden in Paraffinschnitten die Häufigkeit und der Schweregrad von Lymphozyteninfiltrationen, hämorrhagischen Arealen, Mitosen, Hämolysen und Vakuolisierungen der Hepatozyten. Je grösser die Zahl, umso ausgeprägter die pathologischen Veränderungen in den Organen (1-3 minimal; 4-8 mild; 9-12 moderat; 13-18 ernsthafte Schädigung).

3.6.3 Elastika van Gieson (EvG) Färbung

Die Elastika van Gieson-Färbung wurde ebenfalls vollautomatisiert durchgeführt. Gewählt wurde diese Spezialfärbung (Trichromfärbung) insbesondere zur selektiven Darstellung von Kollagenfasern (Bindegewebe) und elastischen Fasern. Die Kollagenfasern erscheinen im Präparat rot, wohingegen die Zellkerne schwarzbraun bis schwarz, das Zytoplasma gelbbraun und die elastischen Fasern im rötlich-orangen bis gelblichen Farbton gefärbt sind.

3.6.4 Giemsa

Eine Giemsa-Färbung ist sowohl eine modifizierte Differentialfärbung für methanolfixierte Blut- und Knochenmarksausstriche, als auch für zytologisches Material. Die Färbung erfolgte automatisiert. Als Ergebnis der Färbung erscheinen die Zellkerne und andere basophile Strukturen blau und die acidophilen Strukturen orange bis rot.

3.6.5 Perjodsäure-Schiff'sche (PAS) Färbung

Die PAS, auch Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung genannt, wurde wie die HE Färbung auch nach einem histologischen Standardprotokoll, vollautomatisiert, angefertigt. Charakteristisch sind für diese Färbung eine rot-pinke Koloration aller glykogenhaltigen Bestandteile der Zellen und ihrer extrazellulären Matrix (EZM).

3.6.6 TUNEL (*Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling*)

Zum Nachweis von apoptotischen Zellen und zur Ergänzung der histopathologischen Analyse der Paraffinschnitte wurden zwei vergleichbare TUNEL-Assays verwendet. Das Prinzip des Assays besteht darin, dass DNA-Strangbrüche mittels terminaler Desoxyribonukleotid-Transferase (TdT) markiert werden, indem eine Kopplung Digoxigenin-markierter dUTPs (desoxyUridintriphosphate) an freie 3'-OH Enden der Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche, stattfindet. Ein Anti-Fluoreszein Fab-Fragment vom Schaf, das an eine Peroxidase (POD) gebunden ist kann daraufhin zusammen mit dem Farbsubstrat Diaminobenzidin (DAB) die DNA-Strangbrüche lichtmikroskopisch sichtbar machen. Hierbei konnten bereits nach Zugabe des „TUNEL-Reaction-Mix“ apoptotische Zellen im Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden. Beide Assays wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.7 Zellbiologisches Arbeiten

3.7.1 Isolierung und Kultivierung von Cholangiozyten

Die Isolierung primärer Cholangiozyten erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Verena Keitel (*Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, UKD Düsseldorf*) und wurde durch die Doktorandin Maria Reich ausgeführt. Die Cholangiozyten wurden aus den Lebern 6 Wochen alter Mäuse durch Mikrodissektion isoliert.

Dabei wurden Gallengangs-Abschnitte auf ein Kollagengel ausplattiert und in Medium, das mit Wachstumsfaktoren komplementiert war, herangezogen (*Fabris et al., 2006; Vroman and LaRusso, 1996*). Nach 2 Wochen wuchsen die Cholangiozyten aus dem Kollagengel aus und formten einen Monolayer (*Keitel et al., 2010*). Für anschließende Experimente wurden die Zellen in Lysepuffer (*Kap. 2.4*) aufgenommen und die RNA mittels RNeasy Kit laut Herstellerangaben aufbereitet.

3.8 Molekularbiologisches Arbeiten

3.8.1 DNA Analyse

3.8.1.1 Isolation von DNA aus Gewebe

Zur DNA-Isolation für eine Genotypisierung der Versuchstiere (*Kap. 4.2*) wurde eine Schwanzspitzenbiopsie (ca. 0,1-0,3 cm) verwendet. Für die quantitative Real Time PCR (*Kap. 3.8.2.4*) wurden Leber-, Lungen- und Gehirnproben verwendet. Das entsprechende Gewebe wurde mit 500 µl DNA-Lysis-Puffer und 200 µg/ml Proteinase K (10mg/ml) versetzt und inkubiert über Nacht bei 55 °C schüttelnd im Thermoblock. Am nächsten Tag wurden die Proben 10min bei 8000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur DNA-Fällung wurde 500 µl Isopropanol hinzugefügt. Nach mehrmaligem Invertieren wurde 10 min bei 8000 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde mit 500µl 70 % Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert (10 min bei 8000 x g). Der Ethanolüberstand wurde mit einer Kanüle abgesaugt, das Pellet in 50-150 µl TE-Puffer aufgenommen und 2 h bei 56 °C im Thermoblock geschüttelt. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die DNA Proben bei 4°C gelagert.

3.8.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur spezifischen Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten mit einer Länge bis zu 40kb. Eine typische PCR besteht aus durchschnittlich 35 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus einem ersten Denaturierungsschritt in dem zunächst der DNA-Doppelstrang bei einer Temperatur von ca. 94 °C in zwei Einzelstränge denaturiert wird. Es folgt die Hybridisierung der spezifischen Primer an die Einzelstränge, wobei die genutzte Annealing-Temperatur abhängig ist von den eingesetzten Primern. Ausgehend von den angelagerten Primern erfolgt im letzten Schritt die Synthese des neuen Strangs in 5'→3' Richtung (Elongation, 72°C) und ein neuer Reaktionszyklus kann initiiert werden.

Zur exponentiellen Vermehrung der DNA-Sequenzen wurde die thermostabile (Taq) Polymerase verwendet, die ausschließlich zur Genotypisierung der Versuchstiere verwendet wurde (Kap. 4.2). Für die LT β R^{flox/flox} PCR wurde die Go-Taq® DNA Polymerase verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen in einem Gradientencycler unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt (Tab. 3.1).

Versuch	LT β R Genotypisierung																		
Enzym	2 μ l Taq Polymerase (5U/ μ l)																		
Reaktionsansatz (1x)	5 μ l <i>advanced buffer</i> 1 μ l dNTPs (10mM) je 1 μ l Primer LT β -R7 und LT β -R4 (50pmol) (WT) je 1 μ l Primer LT β -R4 und HSV-TK (50pmol) (LTβR^{-/-}) 1 μ l DNA (Kap. 3.3.1.1)(500ng) ad 38 μ l dH ₂ O																		
Programm	<table border="0"> <tr> <td>I.</td> <td>94°C</td> <td>5min</td> </tr> <tr> <td>II.</td> <td>94°C</td> <td>1min</td> </tr> <tr> <td></td> <td>63°C</td> <td>30sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td>72°C</td> <td>1min 30sec</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Schritt II. wurde 29x wiederholt</td> </tr> <tr> <td>III.</td> <td>72°C</td> <td>5min</td> </tr> </table>	I.	94°C	5min	II.	94°C	1min		63°C	30sec		72°C	1min 30sec	Schritt II. wurde 29x wiederholt			III.	72°C	5min
I.	94°C	5min																	
II.	94°C	1min																	
	63°C	30sec																	
	72°C	1min 30sec																	
Schritt II. wurde 29x wiederholt																			
III.	72°C	5min																	
Versuch	TNF-R p55 Genotypisierung																		
Enzym	3 μ l Taq Polymerase (5U/ μ l)																		
Reaktionsansatz (1x)	5 μ l <i>advanced buffer</i> 1 μ l dNTPs (10mM) je 1 μ l Primer p55R 363 und HSV-TK (10pmol) je 2 μ l Primer E515 (10pmol) 1 μ l DNA (Kap. 3.3.1.1)(500ng) ad 36 μ l dH ₂ O																		
Programm	<table border="0"> <tr> <td>I.</td> <td>94°C</td> <td>5min</td> </tr> <tr> <td>II.</td> <td>94°C</td> <td>1min</td> </tr> <tr> <td></td> <td>61°C</td> <td>30sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td>72°C</td> <td>1min 30sec</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Schritt II. wurde 30x wiederholt</td> </tr> <tr> <td>III.</td> <td>72°C</td> <td>5min</td> </tr> </table>	I.	94°C	5min	II.	94°C	1min		61°C	30sec		72°C	1min 30sec	Schritt II. wurde 30x wiederholt			III.	72°C	5min
I.	94°C	5min																	
II.	94°C	1min																	
	61°C	30sec																	
	72°C	1min 30sec																	
Schritt II. wurde 30x wiederholt																			
III.	72°C	5min																	

Versuch	LT β R ^{fllox/fllox} Genotypisierung
Enzym	0,25 μ l Go-Taq [®] DNA Polymerase (5U/ μ l)
Reaktionsansatz (1x)	10 μ l 5x <i>Green or Colorless Go-Taq[®] Reaction buffer</i> 1 μ l dNTPs (10mM) je 0,5 μ l Primer Sph3' und Sph5' (1 μ mol) (2Lox PCR) je 0,5 μ l Primer Eco3' und Sph5' (1 μ mol) (1Lox PCR) 1 μ l DNA (<i>Kap. 3.3.1.1</i>)(500ng) ad 38 μ l dH ₂ O
Programm	I. 94°C 5min II. 94°C 30sec 65°C 30sec 72°C 1min Schritt II. wurde 35x wiederholt III. 72°C 5min
	Deleter-cre (transgen) Genotypisierung
Enzym	2 μ l Taq Polymerase (5U/ μ l)
Reaktionsansatz (1x)	5 μ l <i>advanced buffer</i> 1 μ l dNTPs (10mM) je 1 μ l Primer cre-tot 1 und cre-tot 2 (10 μ mol) 1 μ l DNA (<i>Kap.3.3.1.1</i>)(500ng) ad 39 μ l dH ₂ O
Programm	I. 94°C 5min II. 94°C 30sec 61°C 30sec 72°C 30sec Schritt II. wurde 30x wiederholt III. 72°C 5min

Tab. 3.1: Auflistung der PCR-Programme der konventionellen PCR im Rahmen dieser Arbeit.

3.8.1.3 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die Elektrophorese ermöglicht die Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten, die in einem Gel immobilisiert sind. Dabei wandert negativ geladene DNA innerhalb eines elektrischen Feldes zur Anode. Eine Auftrennung der Fragmente erfolgt dabei in Abhängigkeit von ihrer Größe, kleinere Fragmente wandern schneller. Zur Herstellung der 1-2 %igen Gele wurden entsprechende Mengen von Agarose (w/v) in TAE-Puffer aufgekocht bis eine klare homogene Lösung entstand. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 1 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gelträger einer Elektrophoresekammer gegossen. Die DNA-Proben aus den PCR Reaktionen wurden mit 5 μ l Ladungspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert.

Zusätzlich wurde ein Größenstandard aufgetragen. Die eigentliche Auftrennung erfolgte für ca. 1 h bei einer elektrischen Feldstärke von 0,5-5 V/cm und wurde mit einem Geldokumentationssystem mit UV-Beleuchtung dokumentiert.

3.8.2 RNA Analyse

3.8.2.1 Isolation von RNA aus Geweben und Zellen

Die Methode zur Extraktion von RNA aus gefrorenen Mauslebern (-80 °C) erfolgte nach einem etablierten Protokoll der AG Pfeffer, welches auf der Weiterentwicklung der Einschritt-Flüssigphasen-Separation nach Chomczynski und Sacchi (*Chomczynski and Sacchi, 1987*) basiert. Die Lebern wurden im noch gefrorenen Zustand, sofort nach Zugabe von 1 ml Trizol pro 50-80 mg Gewebe (Invitrogen) mit einem elektrischen Homogenisator zerkleinert. Trizol enthält neben Phenol Guanidinisothiocyanat, welches denaturierend wirkt und dadurch RNasen inaktiviert. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Die Proben wurden mehrmals invertiert und weitere 3 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 15 min bei 4000 x g zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen, wobei sich in der oberen, wässrigen Phase die RNA befindet. In der Inter- und der Phenolphase findet sich die DNA, während sich die Proteine in der organischen Phase sammeln. Die Präzipitation der Ribonukleinsäure erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol, mit anschließendem Invertieren der Probe und einer 10minütigen Inkubation bei RT. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4000 x g. Das entstandene Pellet wurde durch eine Zugabe von 75 %-igem DEPC-Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min, 3500 x g), luftgetrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Das Lösen der RNA erfolgte bei 56 °C mit anschließender Konzentrationsbestimmung. Für eine effiziente RNA-Isolation vieler Gewebeproben wurde das FLUKA-Kit, nach Herstellerangaben, genutzt. Die RNA-Isolation erfolgt hierbei durch eine Phenol-Chloroform-Fällung. Die Isolation von RNA aus primären Cholangiozyten erfolgte über Säulen mit dem *RNeasy Isolations Kit (Qiagen)* nach Herstellerangaben.

3.8.2.2 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde photometrisch, unter Verwendung eines Nano Drop 1000, gemessen. Die Absorption bei 260 nm wurde für die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration genutzt, während die Absorption bei 280 nm für die Bestimmung des Proteingehalts der Lösung herangezogen wurde. Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ zeigt die Reinheit der Probe an. Verunreinigungen können u. a. durch Kontamination mit Proteinen, genomischer DNA

oder durch Vorliegen von aromatischen Substanzen (z.B. Phenol) auftreten. Bei optimaler Aufarbeitung sollte eine RNA-Lösung einen Wert von $\geq 1,9$ erreichen.

DNA	$A_{260} = 1$ OD entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$
RNA	$A_{260} = 1$ OD entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$

Tab. 3.2: Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Bei einem Absorptionswert von 1 OD gelten obengenannte Absorptionswerte für RNA und DNA.

3.8.2.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)

Bei der Reversen Transkription wird RNA in einzelsträngige, komplementäre cDNA (complementary-DNA) umgeschrieben, da RNA in einer PCR von der Taq-Polymerase nicht als Matrize genutzt werden kann. Die Reverse Transkriptase ist spezifisch, daher bleibt die Basensequenz erhalten, weshalb die entstandene cDNA für die Realtime PCR eingesetzt werden kann. Die cDNA-Synthese der RT-PCR erfolgte nach einem etablierten Protokoll.

Versuch	cDNA Synthese
RNA/ Reaktionsansatz (1x)	2-3 μg RNA in 10 μl DEPC-H ₂ O 1 μl oligo dT Primer (10 μmol) 2 Min. 70°C, dann auf Eis
Master Mix (1x)	1 μl dNTPs für RNA (je 10mmol) 4 μl 5x Transkriptionspuffer 2 μl DTT (0,1M) 1 μl RNase out 1 μl Reverse Transkriptase (M-MLV; 200U/ μl) 1h 37°C cDNA-Synthese Enzyminaktivierung 5min 95°C
	80 μl H ₂ O (* je 5 μl für qRT PCR eingesetzt)

Tab. 3.3: Protokoll cDNA- Synthese AG Peffer. RT steht für reverse Transkription.

3.8.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

3.8.2.4.1 Durchführung

Die quantitative qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR (Saiki et al., 1988) und bietet die Möglichkeit, die Menge des amplifizierten Produkts während der Reaktion, d.h. nach

jedem Zyklus, photometrisch zu messen. Durch den Vergleich der Expression des interessierenden Gens mit der Expression eines konstitutiv exprimierten sogenannten *housekeeping Gens* ist es möglich, Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge des eingesetzten Templates (z.B. cDNA aus mRNA) und damit die Expressionsstärke des interessierenden Gens zu schließen. Im Rahmen der Dissertation wurde diese Methode verwendet um: 1. im Microarray identifizierte differentiell regulierte Gene zu verifizieren, um 2. weitere Gene im Verlauf nach partieller Hepatektomie (0, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach PHx) zu charakterisieren und um 3. differentiell regulierte Gene nach einer *T. gondii*-Infektion (0, 7, 12, 14, 30 und 60 Tage *p. i.*) zu identifizieren. Zur Detektion der PCR-Produkte werden spezifische Fluoreszenz-markierte Sonden eingesetzt, die spezifisch in doppelsträngige DNA interkalieren und bei Bindung ein Fluoreszenzsignal emittieren. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produkts zu und wird nach dem Ende jeder Elongation gemessen (*Bioanalytik für Einsteiger, R. Renneberg, Spektrum, 2009*). Der Reaktionsansatz bestand aus 12,5 µl qPCR Mastermix – No ROX, 6,4 µl RNase-freiem Wasser, 0,3 µl der jeweiligen Primer-Paare (*Kap. 2.7.2*), 0,5 µl der jeweiligen Sonde und 5 µl cDNA (teilweise 1:5 verdünnt) (*Kap. 3.8.2.3*). Die qRT-PCR wurde im IQ5 Cycler unter den in **Tab. 3.4** aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Nach Abschluss der qRT-PCR wurde eine Schmelzpunktanalyse (*melting curve analysis*) zur Bestimmung der Reinheit der PCR-Produkte durchgeführt (*Ririe et al., 1997*). Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt letztendlich Auskunft über die Menge und die Reinheit des gebildeten Fragments.

I. DNA Denaturierung	95°C 7min
II. DNA Denaturierung	94°C 20sec
III. Primerhybridisierung / Verlängerung	60°C 1min
IV. Lagerung	4°C ∞
Schritt II.-III. wurden 40x wiederholt	

Tab. 3.4: qRT-PCR Programm.

3.8.2.4.2 Auswertung

Die relative Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte nach der „ $\Delta\Delta$ -CT-Methode“ mit der iQ5 Software Version 2.0. In der qRT-PCR wird der sogenannte „*Threshold Cycle*“ photometrisch bestimmt, das heißt der Zyklus in dem zum ersten Mal ein amplifiziertes Produkt nachgewiesen kann. Durch den Vergleich des CT-Wertes (*'Threshold Cycle-Wert'*) des Zielgens mit dem eines konstitutiv exprimierten *Housekeeping-Gen/Referenzgen* kann die relative Expressionsstärke des Zielgens im Vergleich zum *Housekeeping-Gen/Referenzgen* (β -Aktin) bestimmt werden. Anschließend wird die relative Expressionsstärke des Zielgens in der behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit folgenden Formeln berechnet:

ΔCT	=	$CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$
$-\Delta\Delta CT$	=	$\Delta CT_{\text{Behandlung}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$
Ratio	=	$2^{-\Delta\Delta CT}$
$2^{-\Delta\Delta CT}$	=	$(CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}})_{\text{Behandlung}} - (CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}})_{\text{Kontrolle}}$

Tab. 3.5: Arithmetische Formeln zur Berechnung des Expressionsunterschieds zwischen zwei Gruppen in der qRT-PCR.

3.8.2.5 Microarray-Analyse (Transkriptomanalyse)

Zur Untersuchung des Einflusses des LT β R auf die Leberregeneration nach PHx wurde in Zusammenarbeit mit Miltenyi Biotec GmbH (*Bergisch Gladbach*) ein „one color - Agilent Whole Genome Microarray“ zur differentiellen Genexpressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wird fluoreszenzmarkierte mRNA mit Oligomeren (60meren, die das gesamte Transkriptom der Maus repräsentieren), die in Spots im Überschuss auf einem Glaträger fixiert sind, hybridisiert. Durch die Intensität des Fluoreszenzsignals kann daraufhin die relative Genexpressionsstärke der einzelnen mRNAs im Vergleich zu Kontrollen bestimmt werden. Ausgangsmaterial waren schockgefrorene Leberstücke. Die RNA-Isolation erfolgte via Standard Extraktions Protokoll (Trizol) von Miltenyi. Eine anschließende Quantitäts- und Qualitätskontrolle wurde von Miltenyi durch die *Agilent 2100 Bioanalyzer Plattform* (*Agilent 2100 Bionalyzer Expert Software; Agilent Technologies*) durchgeführt und der „Fold Change“ angegeben. Eine weitere *Microarray-Analyse* derselben Proben erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Andrea Staratschek-Jox (*Institut für Genomics and Immunoregulation, LIMES-Institut-Bonn*) mit der Illumina Plattform.

3.8.3 Proteinanalyse

3.8.3.1 Isolation von Gesamtprotein aus Gewebe

Zur Isolation von Gesamtprotein wurde ca. 50-100 mg Gewebe (Leber) in 1-2 ml Lysepuffer (*Kap. 2.6*) mittels Ultra-Turrax homogenisiert und 30 min bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Unlösliche Bestandteile, wie Membranreste oder extrazelluläres Material wurden in einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt (8000 x g) bei 4 °C entfernt. Der proteinhaltige Überstand wurde zu 200 μ l in PCR-Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4. Ergebnisse

4.1 Hintergrund partielle Hepatektomie

Das Standardmodell für die Hepatozyten-vermittelte Leberregeneration nach akutem Masseverlust ist die partielle Hepatektomie (70 % PHx) in Nagetieren (*Michalopoulos, 2007*). Im ersten Teil dieser Arbeit wurden in einem murinen *in vivo* Modell die Leberregenerationsdefekte bezüglich einer Defizienz des LT β R bzw. des TNFRp55 charakterisiert. Des Weiteren wurden WT und LT β R-defiziente Tiere hinsichtlich ihrer in der Leber stattfindenden Genexpression nach PHx verglichen.

4.2 Genotypisierung

Beide eingesetzten Linien (LT β R^{-/-} und TNFRp55^{-/-}) wurden als heterozygote Zuchten gehalten, um WT Wurfgeschwister als Kontrolltiere zu erhalten. Daher erfolgte vor Beginn der jeweiligen Experimente eine Verifizierung des Genotyps durch eine PCR. Als DNA-Quelle diente ein Stück der Schwanzspitze (Schwanzspitzenbiopsie). Die anschließende PCR erfolgte nach dem in *Kap.3.3.1.2* beschriebenen Protokoll.

4.3 Leberregeneration LT β R- und TNFRp55-defizienter Tiere nach PHx

Zunächst wurde die 70 %ige PHx etabliert (*Kap.3.1.1.2*) und das Überleben beider Genotypen nach dieser akuten Leberschädigung dokumentiert. Zusätzlich wurde die Lebergewicht/Körpergewicht-Ratio (LG/KG-Ratio) bestimmt. **Abbildung 4.1 A** zeigt den Verlauf der Überlebensrate der LT β R^{-/-} Tiere im Vergleich zu wildtypischen Tieren nach PHx. Einige der WT Tiere sterben innerhalb der ersten 72 h nach PHx. Am Versuchsende (Tag 10) weisen WT Tiere eine Überlebensrate von 87,8 % auf. Das Versterben der LT β R^{-/-} Tiere erfolgt im Vergleich zu den Wildtypen bis Tag 5 *post PHx* und es kann nach 10 Tagen eine signifikant niedrigere Überlebensrate von 60,9 % beobachtet werden ($p = 0,0156$). Vergleicht man die Überlebensraten von WT Tieren und TNFRp55^{-/-} Tieren (**Abb. 4.1 B**), fällt auf, dass die TNFRp55^{-/-} Tiere innerhalb von 24-48 h *post PHx* versterben. Die Überlebensrate liegt mit 52,9 % signifikant unter der der hepatektomierten Wildtyp Kontrollen ($p = 0,0392$), die eine Überlebensrate von 83,3 % aufweisen. **Abbildung 4.1 C** zeigt, dass sich die Lebergewicht/Körpergewicht(LG/KG)-Ratio zwischen nicht operierten WT Tieren und LT β R^{-/-} Tieren nicht signifikant unterscheidet ($5,7 \pm 0,18$ % bzw. $5,4 \pm 0,43$ %), die LT β R^{-/-} Tiere aber eine signifikant höhere Varianz aufweisen ($p = 0,0047$).

Die überlebenden $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigen im Verlauf der Leberregeneration und am Versuchsende keinen Unterschied in der LG/KG-Ratio zu den WT Tieren ($4,3 \pm 0,93$ % bzw. $4,3 \pm 0,78$ %). An Tag 10 ist der Verlust der Lebermasse fast vollständig ausgeglichen, allerdings zeigen beide Genotypen noch eine minimal, aber signifikant reduzierte LG/KG-Ratio im Vergleich zu den jeweils nicht operierten Tieren. Der in **Abbildung 4.1 D** dargestellte Vergleich der LG/KG-Ratio von WT und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren zeigt bereits im nicht operierten Zustand einen kleinen, aber signifikanten Unterschied ($5,5 \pm 0,07$ % bzw. $4,9 \pm 0,19$ %; $p = 0,0169$). Die LG/KG-Ratio verläuft bei den $TNFRp55^{-/-}$ Tieren vergleichbar zu der der WT Tiere, allenfalls ist ein kleiner, nicht signifikanter Unterschied 24 h und 48 h nach PHx zu beobachten. Die überlebenden Tiere beider Genotypen haben 10 Tage nach PHx eine signifikant reduzierte LG/KG-Ratio im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Tieren, unterscheiden sich jedoch nicht signifikant voneinander (WT: $4,3 \pm 0,78$ %; $TNFRp55^{-/-}$: $4,4 \pm 0,22$ %).

Bei beiden Genotypen ($LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$) ist in den überlebenden Tieren eine suffiziente Regenerationsfähigkeit der Leber durch kompensatorische Hyperplasie gegeben, obgleich die Überlebensrate von $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren gegenüber den WT Tieren deutlich vermindert ist.

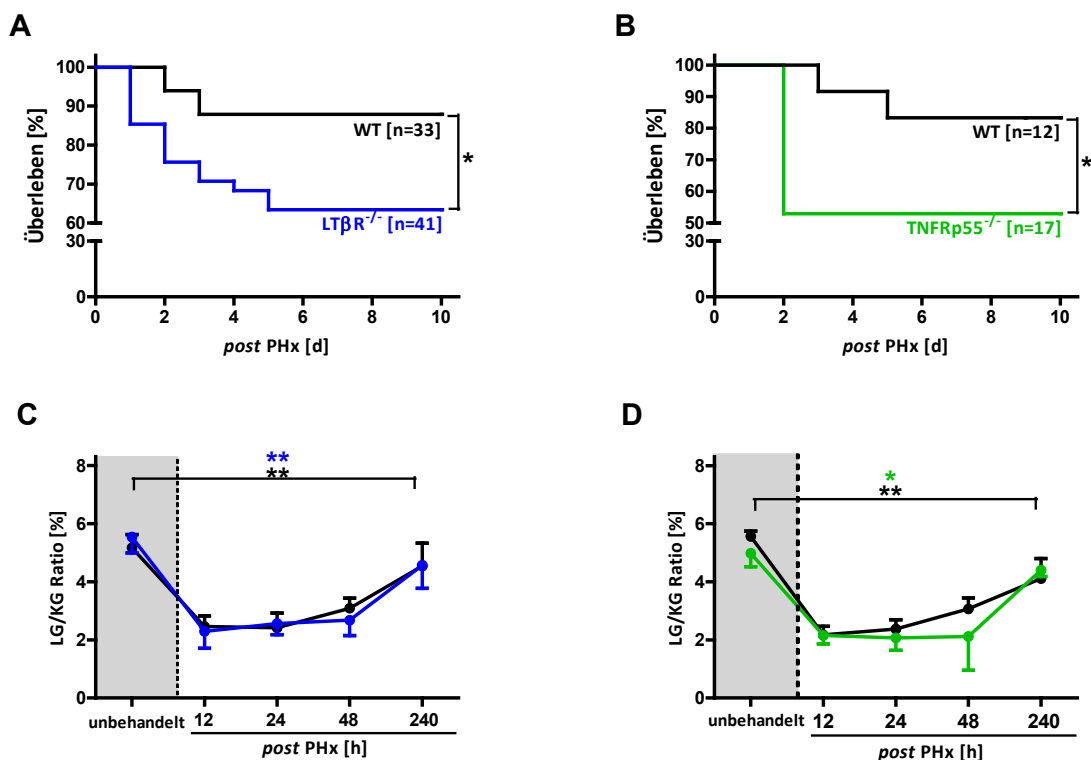


Abb. 4.1 A-D: Überlebenskurven (A, B) und LG/KG-Ratio (C, D) von WT, $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren nicht operiert und nach partieller Hepatektomie. (A) Überlebenskurve WT vs. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in % (B) Überlebenskurve WT vs. $TNFRp55^{-/-}$ Tiere in % (C) LG/KG Ratio WT vs. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in % (D) LG/KG Ratio WT vs. $TNFRp55^{-/-}$ Tiere in %. WT Tiere sind in schwarz, $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere in grün dargestellt. (n = Anzahl der Versuchstiere; h = Stunden; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$)

4.4 Blutanalysen

4.4.1 Serologische Charakterisierung diverser Blutmetabolite

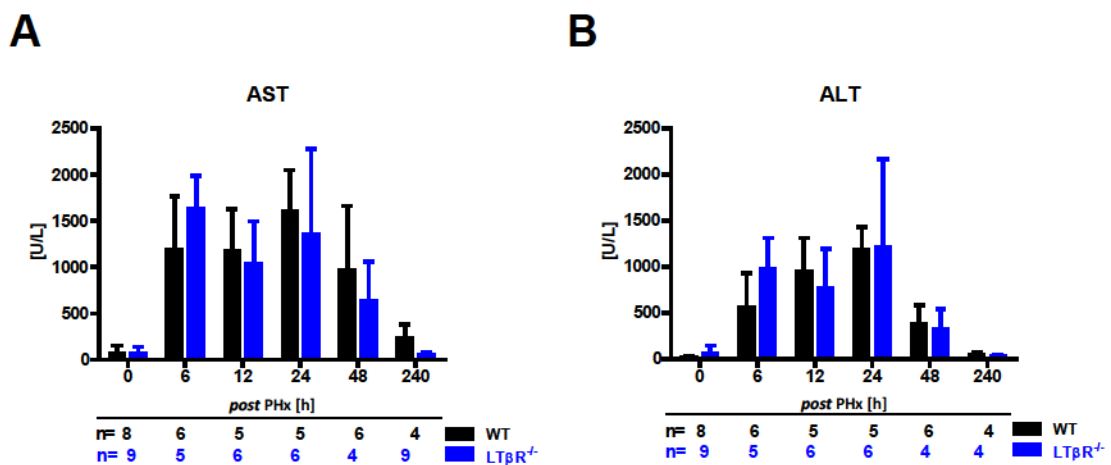
Um Hinweise auf den Verlauf der Leberregeneration bzw. den Beginn und die Ursache der verminderten Leberregeneration bei den $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren zu erhalten, wurden serologische Untersuchungen durchgeführt. Hepatektomierten WT, $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Mäusen wurde 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h *post PHx* Blut aus der *Vena cava inferior* entnommen (Kap. 3.1.4.1.1) und daraus Serum für die jeweiligen Analysen (Kap. 3.1.4.1.2) gewonnen. Als Kontrolle dienten nicht operierte Tiere (0 h). Um die Übersichtlichkeit der Darstellung zu gewährleisten wurden die Ergebnisse für die $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere in separaten Abbildungen dargestellt, wobei jeweils die gleichen WT Daten verwendet wurden. Zur Abklärung der Leberfunktion wurden zunächst die Leber-Transaminasen AST (Aspartat-Aminotransferase) und ALT (Alanin-Aminotransferase) sowie die LDH (Laktatdehydrogenase) bestimmt. Bei einer akuten Schädigung der Hepatozyten steigen sowohl die Leber-Transaminasen als auch die LDH im Serum schnell an und können daher als Maß für eine akute Leberschädigung dienen (Kotoh *et al.*, 2008). Bei den WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren steigen die Serumwerte für AST und ALT bereits 6 h nach 70 %iger PHx deutlich an (AST: $1190,2 \pm 574,5$ U/L bzw. $1632,0 \pm 354,4$ U/L; ALT: $554,5 \pm 377,8$ U/L bzw. $973,2 \pm 338,5$ U/L) und zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (**Abb. 4.2 A, 4.2 B**). Zehn Tage nach PHx sind in beiden Genotypen die AST und ALT Werte gegenüber den nicht operierten Kontrolltieren nur noch minimal erhöht, allerdings nicht signifikant. Die LDH Werte in der **Abbildung 4.2 C** zeigen 6 h bis 48 h nach 70 %iger PHx eine Erhöhung in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, wohingegen WT Tiere erst 24 h nach PHx einen Anstieg in der LDH aufweisen. Der Mittelwert der $LT\beta R^{-/-}$ Mäuse ist dabei 6 h nach PHx signifikant ($p = 0,0041$) gegenüber den WT Mäusen erhöht und weist überdies auch in den weiteren Zeitpunkten *post PHx* (d. h. 12 h, 24 h und 48 h) eine deutliche, aber nicht signifikante Erhöhung im Vergleich zu den WT Tieren auf. Bei Störungen des Bilirubinstoffwechsels infolge einer Leberschädigung (prähepatischer Ikterus) oder Abflussbehinderungen der Galle (posthepatischer Ikterus, Cholestase) tritt eine erhöhte Hämolyse (Hyperbilirubinämie) auf (Steffen & Goeser, Chap.17, 2008). Betrachtet man in **Abbildung 4.2 D** das Gesamtbilirubin der WT Tiere kann man einen Anstieg der Bilirubinwerte 6 h und 48 h nach PHx beobachten. Dabei ist lediglich eine signifikant erhöhte Varianz 6 h nach PHx in partiell hepatektomierten WT gegenüber nicht operierten WT Tieren ($p \leq 0,0001$), sowie ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0145$) zwischen nicht operierten und partiell hepatektomierten WT Tieren 48 h nach PHx gegeben. Dieser Anstieg ist bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nicht zu sehen. $LT\beta R^{-/-}$ Mäuse zeigen im Verlauf der Leberregeneration nur minimale Schwankungen im Gesamtbilirubin. Ein Vergleich nicht operierter WT Tiere mit $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zeigt keinen signifikanten Unterschied ($0,83 \pm 0,10$ mg/dl bzw. $0,61 \pm 0,05$ mg/dl), obgleich 48 h nach PHx die Bilirubinwerte partiell hepatektomierter WT Tiere signifikant gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöht sind ($p = 0,0097$).

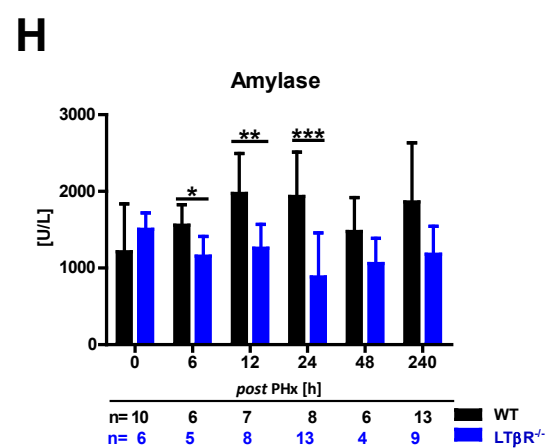
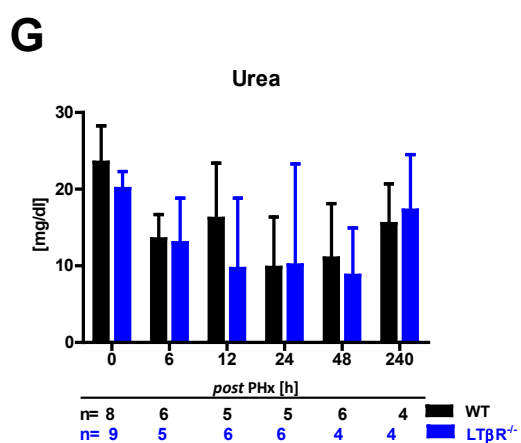
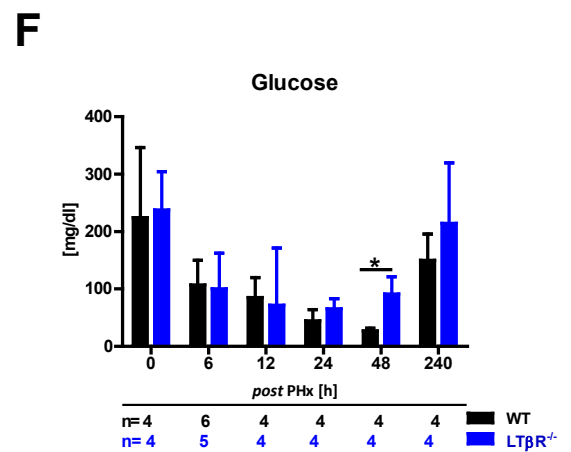
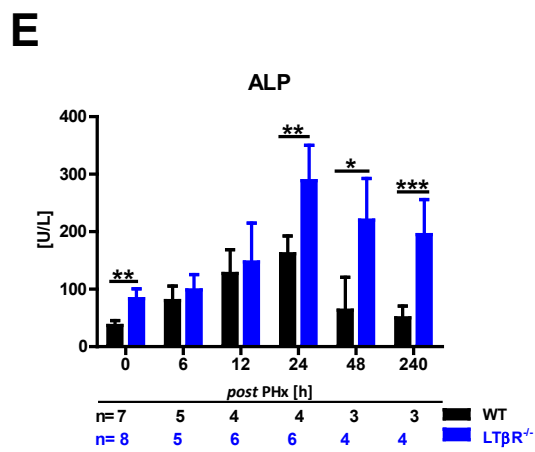
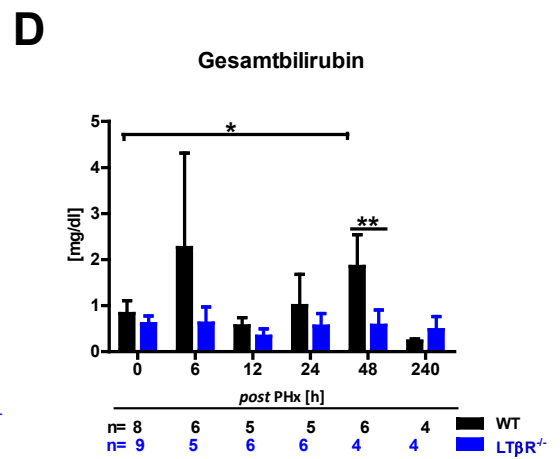
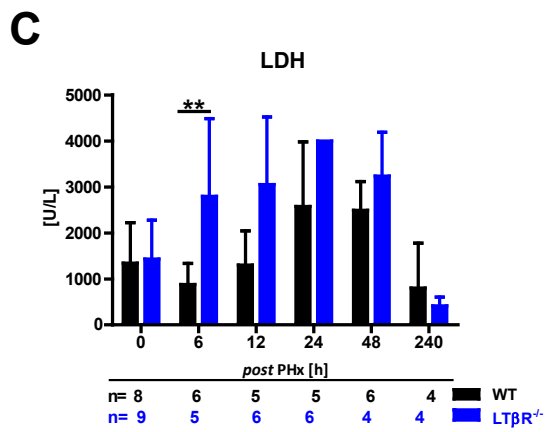
10 Tage nach PHx ist in beiden Linien das Gesamtbilirubin wieder vergleichbar mit den jeweils nicht operierten Kontrolltieren (WT: $0,23 \pm 0,05$ mg/dl; $LT\beta R^{-/-}$: $0,48 \pm 0,28$ mg/dl), jedoch zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere 240 h nach PHx eine signifikant erhöhte Varianz ($p = 0,0170$) gegenüber WT Tieren. Die Alkalische Phosphatase (ALP) gehört zu den Cholestaseenzymen und ist ein spezifischer Indikator für eine intrahepatische Cholestase (Polzien and Ramadori, 1996; Ramaiah, 2007). Schon im nicht operierten Zustand zeigen die $LT\beta R^{-/-}$ Tiere einen signifikant erhöhten ALP-Spiegel gegenüber den WT Tieren ($84 \pm 8,6$ U/L bzw. $37 \pm 4,3$ U/L; $p = 0,0029$) (**Abb. 4.2 E**). Nach 70 %iger PHx ist die ALP-Konzentration im Serum der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zunächst geringfügig und nicht signifikant erhöht (bis einschließlich 12 h *post PHx*), ist dann ab 24 h *post PHx* um das 1,5 bis 2fache signifikant erhöht und weist auch nach 10 Tagen noch einen erheblichen, signifikanten Unterschied zu den WT Tieren auf (240 h: $194,9 \pm 61,3$ U/L bzw. $50,125 \pm 20,6$ U/L; $p \leq 0,0001$). Einen Aufschluss über die Syntheseleistung der Leber ergibt die Messung indirekter Leberparameter wie Glukose (**Abb. 4.2 F**) und Blutharnstoff (Urea) (**Abb. 4.2 G**) (Ramaiah, 2007). Sinkt der Blutzuckerspiegel bzw. die Glukosekonzentration im Serum, weist das auf eine Stoffwechselstörung des Kohlenhydratstoffwechsels (Hypoglykämie) hin (Cryer *et al.*, 2003). In WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, kann ein verminderter Glukosewert nach PHx festgestellt werden, wobei sich die $LT\beta R^{-/-}$ Tiere 48 h *post PHx* signifikant ($p = 0,0244$) von den WT Tieren unterscheiden (**Abb. 4.2 F**). Ein niedriger Serum-Ureagehalt kann während eines akuten Leberversagens Ausdruck einer verminderten Synthese durch die Leber und damit eines eingeschränkten Eiweißmetabolismus sein (Lum and Leal-Khoury, 1989). Die Ureawerte beider Genotypen verändern sich nach PHx nicht signifikant. Allerdings lässt der in **Abbildung 4.2 G** dargestellte Vergleich zwischen nicht operierten und hepatektomierten WT Tieren 6 h *post PHx* einen leichten Abfall des Urea erkennen ($24 \pm 1,7$ mg/dl bzw. $14 \pm 1,3$ mg/dl). Ein Absinken der Ureawerte ist ebenfalls im Vergleich zwischen nicht operierten und partiell hepatektomierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gegeben ($20 \pm 0,7$ mg/dl bzw. $13 \pm 2,6$ mg/dl). Erst 240 h *post PHx* steigt der Ureawert in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren wieder leicht an, wohingegen das Urea 240 h nach PHx in WT Tieren noch immer vermindert vorliegt ($LT\beta R^{-/-}$: $17 \pm 3,6$ mg/dl bzw. $16 \pm 2,6$ mg/dl). Die Konzentration der Pankreas-Amylase (P-AM) im Serum steigt zwar generell nach Operationen im offenen Bauchraum an, das kann aber auch ein Hinweis auf eine akute Pankreatitis sein (Lankisch *et al.*, 1999; Warshaw and Fuller, 1975). Zur Sicherung der Diagnose einer akuten Pankreatitis ist daher auch die Bestimmung der pankreasspezifischen Lipase erforderlich. **Abbildung 4.2 H** zeigt, dass sich die P-AM Werte im Serum beider Genotypen in den Kontrolltieren (0 h) nicht unterscheiden. Nach PHx (6 h, 12 h und 24 h) bleibt der P-AM Wert bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erst konstant (1200 ± 110 U/L bzw. 1300 ± 110 U/L bzw. 820 ± 170 U/L), bei den WT Tieren steigt er dagegen 6 h bis 12 h nach PHx an und bleibt dann bis 24 h *post PHx* hoch (1600 ± 110 U/L bzw. 2000 ± 200 U/L bzw. 1900 ± 210 U/L) und die Unterschiede sind signifikant ($p = 0,0321$ bzw. $p = 0,0058$ bzw. $p = 0,0005$).

Erst 48 h post PHx sinken die P-AM Werte der WT Tiere wieder und es ist kein signifikanter Unterschied mehr zu sehen. Allerdings zeigen die WT Tiere im Gegensatz zu den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren auch 240 h *post PHx* noch leicht, aber nicht signifikant erhöhte Werte. **Abbildung 4.2 I** zeigt nach PHx bei den Lipasewerten weder im Verlauf noch zwischen den Genotypen signifikante Unterschiede. Zehn Tage nach PHx erreichen auch hier die überlebenden Tiere beider Genotypen wieder annähernd ihren Normwert.

Normwerte klinischer Serumparameter	Maus
Alk. Phosphatase [U/L]	35-96
ALT [U/L]	17-77
AST [U/L]	54-298
Gesamtbilirubin [mg/dl]	0-0,9
Urea [mg/dl]	8-33
Glucose [mg/dl]	62-175
Amylase [U/L]	1.000-1.500

Tab. 4.1: Normwerte klinischer Serumparameter in C57BL/6 Mäusen.





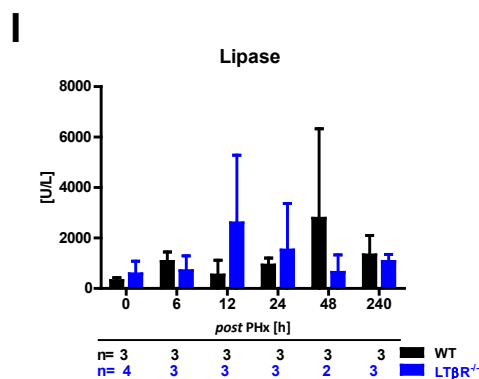


Abb. 4.2 A-I: Serumparameter der WT und LTβR^{-/-} Tiere nicht operiert und nach partieller Hepatektomie. (A) AST (B) ALT (C) LDH (D) Bilirubin (E) ALP (F) Glukose (G) Urea (H) Pankreas-Amylase (I) Lipase-Aktivität. WT Tiere sind in schwarz, LTβR^{-/-} Tiere in blau dargestellt. (n = Anzahl der Versuchstiere; h = Stunden; *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005; n. d. = nicht determinierbar, Wert unter der Nachweisgrenze)

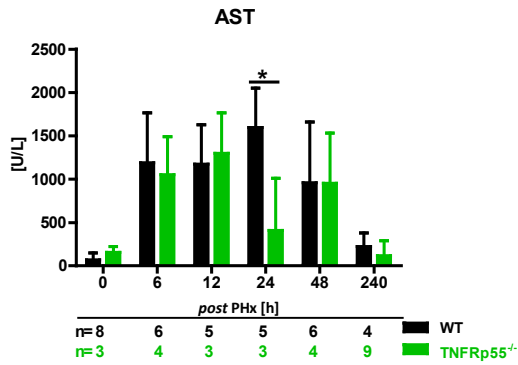
Bei der Analyse des hepatozellulären Schadens in TNFRp55-defizienten Tieren wurden ebenfalls die Leber-Transaminasen AST und ALT und die LDH bestimmt. Die AST Werte (**Abb. 4.3 A**) der Kontrolltiere unterscheiden sich in beiden Genotypen nicht. 6 h nach PHx steigen die AST Werte in WT und TNFRp55^{-/-} Tieren stark an (1200 ± 230 U/L bzw. 1100 ± 230 U/L) und bleiben auch nach 12 h hoch (1200 ± 200 U/L; bzw. 1300 ± 270 U/L). 24 h *post PHx* zeigen sich signifikante Unterschiede ($p = 0,0183$): In den WT Tieren steigt die AST noch weiter an (1600 ± 200 U/L), dagegen fällt die AST in den TNFRp55^{-/-} Tieren stark ab (410 ± 350 U/L). 48 h nach PHx sind die Werte wieder vergleichbar hoch, um 240 h nach PHx wieder nahezu auf den Normalwert zurückzukehren (220 ± 77 U/L bzw. 120 ± 57 U/L). Bei den ALT Werten (**Abb. 4.3 B**) zeigt sich bereits im nicht operierten Zustand ein kleiner, aber signifikanter Unterschied zwischen WT und TNFRp55^{-/-} Tieren (23 ± 4 U/L bzw. $75 \pm 6,6$ U/L; $p \leq 0,0001$). Nach 70 %iger PHx steigen die ALT Werte im Serum zunächst (6 h) in beiden Genotypen an. In den TNFRp55^{-/-} Tieren bleiben die Werte dann auf diesem relativ niedrigen Niveau, um 240 h nach PHx wieder auf die Normwerte zu sinken. Bei den WT Tieren steigen die ALT Werte weiter an und sind 12 h und 24 h nach PHx signifikant gegenüber den TNFRp55^{-/-} Tieren erhöht ($p = 0,0229$ bzw. $p = 0,0010$). 48 h und 240 h nach PHx zeigt sich kein Unterschied mehr zu den LTβR^{-/-} Tieren. Bei der LDH (**Abb. 4.3 C**) steigen die Werte der WT Tiere nach PHx im Vergleich zu den nicht operierten Tieren bis 48 h *post PHx* relativ gleichmäßig an, die Werte der der TNFRp55^{-/-} Tiere sind bereits 6 h *post PHx* deutlich erhöht (WT: 1100 ± 93 U/L; TNFRp55^{-/-}: 3800 ± 210 U/L) und bleiben bis 48 h *post PHx* ähnlich hoch. Auf Grund der hohen Standardabweichung sind die Unterschiede zwischen den Genotypen jedoch nicht statistisch signifikant. Zehn Tage *post PHx* wird auch hier eine Normalisierung der LDH im Serum beobachtet (WT: $798,25 \pm 977,4$ U/L; TNFRp55^{-/-}: $535,67 \pm 450,25$ U/L). Messungen des Gesamtbilirubins im Serum (**Abb. 4.3 D**) zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen nicht operierten WT und TNFRp55^{-/-} Tieren ($p = 0,0053$).

Bei den WT Tieren schwankt der Bilirubin Wert nach 70 %iger PHx. Bei den TNFRp55^{-/-} Tieren ist tendenziell ein Anstieg des Bilirubins zu beobachten und zudem ist 12 h nach PHx ein signifikanter Unterschied zu den WT Tieren zu sehen (WT: 0,56 ± 0,182 mg/dl; TNFRp55^{-/-}: 1,33 ± 0,462 mg/dl; p = 0,0133). 10 Tage nach PHx ist in TNFRp55^{-/-} Tieren das Gesamtbilirubin wieder vergleichbar mit den unbehandelten Kontrolltieren (0 h: 0,2 mg/dl; 240 h: 0,23 ± 0,03 mg/dl), jedoch zeigen 240 h nach PHx die WT Tiere einen signifikant erniedrigten Bilirubinwert (p = 0,0007) gegenüber nicht operierten WT Tieren. **Abbildung 4.3 E** zeigt den Verlauf der ALP Werte nach PHx. Die Genotypen unterscheiden sich deutlich: Bei den WT Tieren steigt der ALP Wert ab 6 h nach PHx nur leicht, aber konstant an, um nach 24 h seinen höchsten Wert zu erreichen (160 ± 14 U/L), danach fällt er wieder ab. Bei den TNFRp55^{-/-} Tieren erhöht sich der ALP Wert ebenso konstant, aber deutlich stärker ebenfalls bis 24 h nach PHx an (390 ± 2,5 U/L) und fällt dann langsamer als beim WT wieder ab. Die Unterschiede sind 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach PHx signifikant (p = 0,0369 bzw. 0,0321 bzw. 0,002 bzw. 0,0053). 10 Tage *post PHx* zeigen die TNFRp55^{-/-} Tiere gegenüber den WT Tieren noch leicht, aber nicht signifikant erhöhte Werte (157,55 ± 81,38 U/L bzw. 50,13 ± 20,59 U/L). Ein Vergleich der Glukosekonzentration im Serum beider Genotypen zeigt, dass die Glukosewerte bei den WT Tieren bis 48 h kontinuierlich absinken, während sie bei den TNFRp55^{-/-} Tieren schwanken (**Abb. 4.3 F**). Auf Grund der hohen Standardabweichungen ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. 10 Tage nach PHx hat sich jedoch die Glukosekonzentration in beiden Genotypen annähernd normalisiert (WT: 149,75 ± 46,22 mg/dl; TNFRp55^{-/-}: 133,29 ± 90,73 mg/dl). Der Verlauf der Ureawerte in **Abbildung 4.3 G** unterscheidet sich zwischen WT bzw. TNFRp55^{-/-} Tieren nach PHx. In unbehandelten Wildtypen ist die Konzentration des Urea im Vergleich zu den TNFRp55^{-/-} Tieren stark reduziert (24 ± 1,7 U/L bzw. 7,3 ± 2,3 U/L; p = 0,006). Im weiteren Verlauf zeigen die WT Tiere gleichbleibend niedrige Werte, bei den TNFRp55^{-/-} Tieren steigen die Ureawerte bis 12 h nach PHx an und unterscheiden sich signifikant von den WT Tieren (9,8 ± 6,57 mg/dl; bzw. 31,7 ± 35,53 mg/dl; p = 0,0377). 24 h und 48 h *post PHx* sinkt der Ureawert in TNFRp55^{-/-} Tieren leicht ab. 240 h nach PHx entspricht der Ureaspiegel in TNFRp55^{-/-} Tieren annähernd der Normwert. WT Tiere zeigen 240 h einen leicht verminderten Ureawert im Vergleich zu nicht operierten WT Tieren (16 ± 2,6 mg/dl bzw. 24 ± 1,7 mg/dl). Der in **Abbildung 4.3 H** dargestellte Vergleich der P-AM im Serum von WT und TNFRp55^{-/-} Tieren zeigt Unterschiede nach PHx. In nicht operierten TNFRp55^{-/-} Tieren ist ein signifikant verminderter Amylasewert gegenüber nicht operierten WT Tieren zu verzeichnen (390 ± 290 U/L bzw. 1200 ± 200 U/L; p = 0,036). Im weiteren Verlauf zeigen die WT Tiere annähernd gleichbleibend erhöhte Werte, bei den TNFRp55^{-/-} Tieren steigt 6 h nach PHx der Amylasewert an (1800 ± 280 U/L), sinkt 12 h *post PHx* im Vergleich zu den WT Tieren signifikant ab (WT: 2000 ± 200 U/L; TNFRp55^{-/-}: 880 ± 120 U/L; p = 0,0088) und steigt dann nochmal leicht an. 10 Tage nach PHx ist die Pankreas-Amylase im Serum von WT und TNFRp55^{-/-} Tieren im Vergleich zu den jeweils nicht

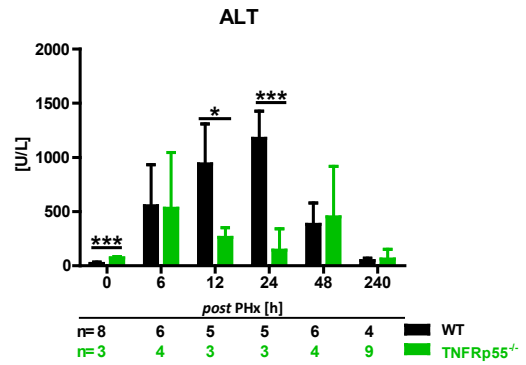
operierten Tieren der jeweiligen Linie noch immer erhöht. Die Amylasewerte der WT Tiere unterscheiden sich jedoch nicht signifikant gegenüber den TNFRp55^{-/-} Tieren. Vergleicht man in **Abbildung 4.3 I** die Lipase-Aktivität in nicht operierten WT und TNFRp55^{-/-} Tieren so zeigen letztere zwar deutlich, aber nicht signifikant erhöhte Werte (310 ± 67 U/L bzw. 1600 ± 920 U/L), allerdings ist die Varianz bei den TNFRp55^{-/-} Tieren signifikant erhöht (p = 0,0104). Nach 70 %iger PHx sinken im Verlauf von 6 h bis 24 h *post PHx* die Lipasewerte in TNFRp55^{-/-} Tieren bis unter die Nachweisgrenze ab, wohingegen WT Tiere 6 h bis 24 h nach PHx eine minimale Erhöhung der Lipase-Aktivität aufweisen. Der Lipasewert ist dabei in WT Tieren 24 h nach PHx gegenüber TNFRp55^{-/-} Tieren erhöht (930 ± 160 U/L bzw. n.d.). 48 h nach PHx steigt die Lipase-Aktivität in beiden Genotypen erneut aber nicht signifikant an (WT: 2784,87 ± 3544,85 U/L; TNFRp55^{-/-}: 594,93 ± 101,54 U/L), die Varianz der Lipasewerte der WT Tiere ist signifikant gegenüber den TNFRp55^{-/-} Tieren erhöht (p = 0,0397). 10 Tage nach PHx sind die Lipasewerte der WT Tiere noch immer gegenüber nicht operierten WT Tieren erhöht (1300 ± 450 U/L bzw. 310 ± 67 U/L), wohingegen die Lipasewerte der TNFRp55^{-/-} Tiere an Tag 10 im Vergleich zu nicht operierten TNFRp55^{-/-} Tieren leicht erniedrigt sind (1100 ± 640 U/L bzw. 1600 ± 920 U/L).

Überraschenderweise zeigen nach PHx LT6R^{-/-} sowie TNFRp55^{-/-} Tiere gegenüber WT Tieren einen vergleichbaren aber nicht erhöhten Anstieg der Leber-Transaminasen. Die LDH-Aktivität hingegen ist in partiell hepatektomierten LT6R- und TNFRp55-defizienten Tieren gegenüber hepatektomierten WT Tieren deutlich erhöht. LT6R^{-/-}-Tiere zeigen im Vergleich zu WT Tieren 6 h post PHx einen signifikant erhöhten LDH Wert. Auch TNFRp55-defiziente Tiere zeigen 6 h postoperativ eine deutlich erhöhte jedoch nicht signifikant unterschiedliche LDH gegenüber den WT Tieren. Darüber hinaus ist die Alkalische Phosphatase in beiden Genotypen signifikant im Vergleich zu WT Tieren erhöht. Im Vergleich zu WT Tieren weisen LT6R^{-/-} Tiere verminderte Bilirubinwerte auf eine beeinträchtigte Leberfunktion hin. TNFRp55^{-/-} Tiere hingegen zeigen im Vergleich zu WT Tieren einen vergleichbaren Anstieg des Gesamtbilirubins und eine Erhöhung des Harnstoff. Ein Vergleich der Amylasewerte nach PHx zeigt bei LT6R^{-/-} sowie TNFRp55^{-/-} Tieren im Vergleich zu WT Tieren eine tendenzielle Verminderung, die auch 240 h nach PHx noch besteht.

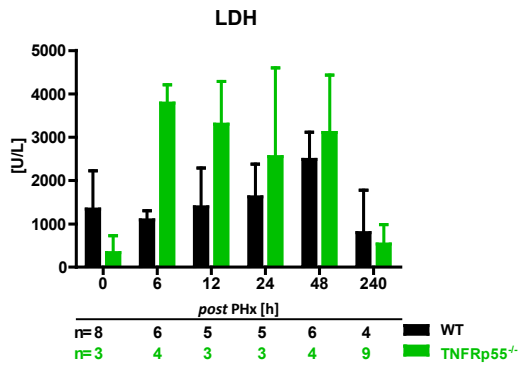
A



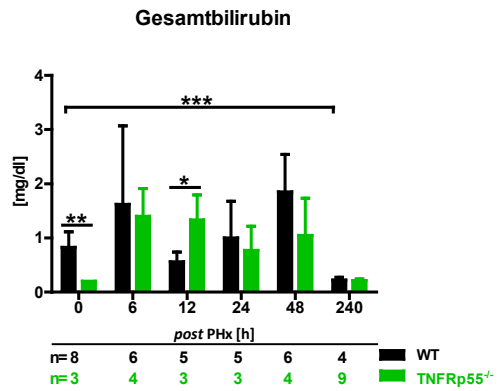
B



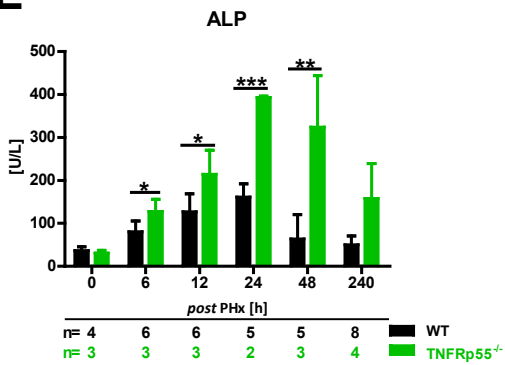
C



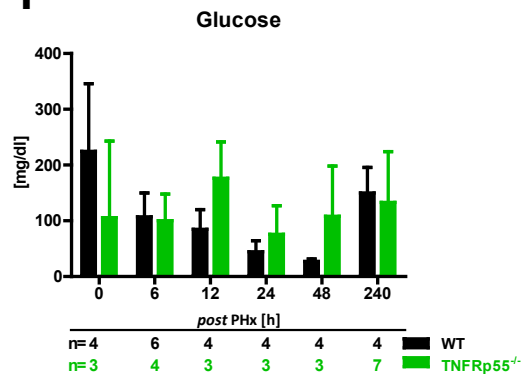
D



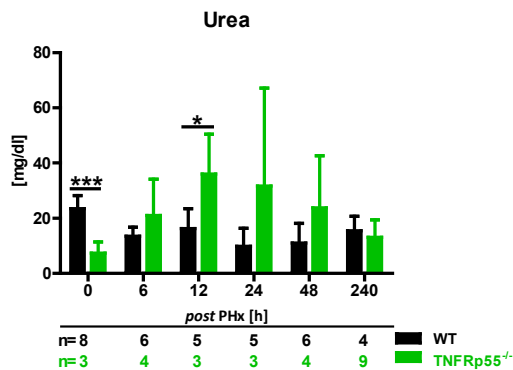
E



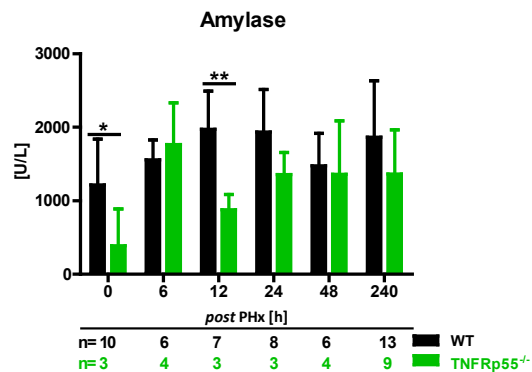
F



G



H



I

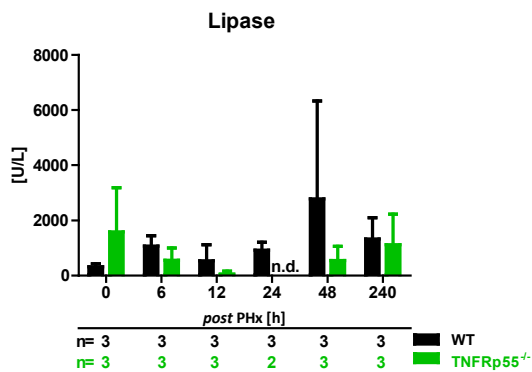


Abb. 4.3 A-I: Serumparameter der WT und TNFRp55^{-/-} Tiere nicht operiert und nach partieller Hepatektomie. (A) AST (B) ALT (C) LDH (D) Bilirubin (E) ALP (F) Glukose (G) Urea (H) Pankreas-Amylase (I) Lipase-Aktivität. WT Tiere sind in schwarz, TNFRp55^{-/-} Tiere in blau dargestellt. (n = Anzahl der Versuchstiere; h = Stunden; *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005; ****p < 0,0001; n. d. = nicht determinierbar, Wert unter der Nachweisgrenze)

4.4.2 Koagulation

Die Leber synthetisiert den überwiegenden Teil der Plasmaproteine, sowie fast alle Gerinnungsfaktoren und Fibrinogen (Wallace *et al.*, 2008). Bei Prothrombin, das in der Leber synthetisiert wird, handelt es sich um die inaktive Vorstufe des Enzyms Thrombin, das für die plasmatische Blutgerinnung von entscheidender Bedeutung ist, da es die Thrombozyten-Aggregation einleitet. Bei schweren Hepatopathien führt eine Syntheseinsuffizienz zum Absinken der Gerinnungsfaktoren im Blut und es entwickeln sich komplexe Gerinnungsstörungen. Auch komplexe Gallengangsverschlüsse können zu Gerinnungsstörungen führen (Irabor *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit wurde daher in WT, $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren das Gesamtprothrombin im Serum bestimmt (0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h nach PHx; **Abb. 4.4 A und B**). Die Werte für die $LT\beta R^{-/-}$ bzw. $TNFRp55^{-/-}$ Tiere sind zur besseren Übersichtlichkeit in getrennten Grafiken dargestellt, wobei die Kontrollwerte jeweils von den gleichen WT Tieren stammen. Das Gesamtprothrombin im Serum nicht operierter $LT\beta R^{-/-}$ Tiere ist im Vergleich zu nicht operierten WT Tieren nicht signifikant erhöht ($4,54 \pm 0,26$ g/dl bzw. $4,75 \pm 0,32$ g/dl). Wie in **Abbildung 4.4 A** dargestellt, kommt es sowohl in WT Tieren als auch in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 6 h nach PHx zu einer starken Abnahme des Gesamtprothrombins. In WT Tieren kommt es nach dem Abfall des Gesamtprothrombins 12 h nach PHx zu einem minimalen Anstieg ($2,8 \pm 0,49$ g/dl), der im weiteren Verlauf (24 h und 48 h) relativ konstant bleibt. Hingegen weisen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Zeitraum von 12 h bis 48 h nach PHx ein gleichbleibend erniedrigtes Gesamtprothrombin auf, das aber nicht signifikant gegenüber den WT Tieren erniedrigt ist. Erst 240 h nach PHx ist ein erneutes Absinken des Gesamtprothrombin in den WT Tieren zu verzeichnen, das unter dem Wert nicht operierter WT Tiere liegt ($1,0 \pm 0,0$ g/dl bzw. $4,8 \pm 0,11$), sich jedoch nicht signifikant von den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ($2,0 \pm 0,0$ g/dl) unterscheidet. Ein Vergleich zwischen nicht operierten WT Tieren und nicht operierten $TNFRp55^{-/-}$ Tieren zeigt (**Abb. 4.4 B**), dass $TNFRp55^{-/-}$ Tiere ein signifikant vermindertes Gesamtprothrombin aufweisen ($4,75 \pm 0,32$ g/dl bzw. $2,0 \pm 0$ g/dl; $p \leq 0,0001$). Im Verlauf nach PHx (6 h, 12 h, 24 h und 48 h) fällt, wie zuvor beschrieben, das Gesamtprothrombin in WT Tieren deutlich ab, bleibt zunächst konstant, bis es 240 h nach PHx nochmals abfällt und signifikant gegenüber $TNFRp55^{-/-}$ Tieren erniedrigt ist ($1,0 \pm 0$ g/dl bzw. $2,0 \pm 0$ g/dl; $p \leq 0,0001$). Das Gesamtprothrombin von $TNFRp55^{-/-}$ Tieren dagegen zeigt keine Schwankungen und bleibt vor und 6 h bis 48 h nach PHx konstant gegenüber WT Tieren vermindert. Zusätzlich zum Gesamtprothrombin wurde die Prothrombinzeit in nicht operierten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 12 h, 18 h und 24 h) nach PHx bestimmt (**Abb. 4.4 C**). Auch die Prothrombinzeit in Sekunden (PT-Zeit) ist ein guter Kontrollparameter bei Lebersynthesestörungen und dient als Suchtest bei Verdacht auf Gerinnungsstörungen durch eine Verminderung eines oder mehrerer Faktoren des Prothrombinkomplexes (*Grant and Neuberger, 1999*). Die gemessene Prothrombinzeit nicht operierter WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigt, dass kein Unterschied zu verzeichnen ist ($8,42 \pm 0,6$ s bzw. $LT\beta R^{-/-}$: $8,9 \pm 0,85$ s). 6 h nach PHx zeigen WT Tiere einen Anstieg der PT Zeit ($9,34 \pm 0,45$ s). 12 h nach PHx kommt es in WT Tieren zu einem weiteren Anstieg in der PT-Zeit, der sich signifikant von nicht operierten WT Tieren unterscheidet ($11,08 \pm 0,63$ s; $p = 0,049$). 18 h *post PHx* ist ein weiterer Anstieg zu verzeichnen ($13,23 \pm 2,18$ s), der sich, vermutlich aufgrund der hohen Standardabweichung, aber nicht signifikant von den nicht operierten WT Tieren unterscheidet. 24 h nach PHx sinkt die PT-Zeit wieder leicht ab ($12,78 \pm 1,23$ s). Im Gegensatz dazu zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere bereits 6 h *post PHx* einen signifikanten höheren Anstieg der PT-Zeit gegenüber den WT Tieren ($2,43$

$\pm 0,94$ s; $p = 0,0193$). Vergleicht man nicht operierte $LT\beta R^{-/-}$ Tiere mit operierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zeigt sich zudem 6 h nach PHx eine signifikanter Anstieg in der PT-Zeit ($2,43 \pm 0,94$ s; $p = 0,00520$).

Die hohen Werte bleiben auch im weiteren Verlauf bis 24 h *post PHx* erhalten, obgleich mit einer hohen Standardabweichung, und liegen im Bereich der PT-Zeit von WT Tieren ($12,50 \pm 1,73$ s). Außerdem ist die PT-Zeit auch 24 h *post PHx* im Vergleich zu den nicht operierten Tieren signifikant erhöht ($12,50 \pm 1,73$ s; $p = 0,0099$).

Zusammenfassend zeigt ein Vergleich von partiell hepatektomierten WT Tieren mit $LT\beta R^{-/-}$ oder $TNFRp55^{-/-}$ Tieren nach PHx ein vermindertes Gesamt-Prothrombin. $TNFRp55^{-/-}$ Tiere weisen bereits im unbehandelten Zustand verminderte Gesamt-Prothrombin-Werte auf. Zusätzlich ist bei $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 6 h postoperativ im Gegensatz zu WT Tieren einen Anstieg in der Prothrombinzeit zu beobachten, die jedoch im weiteren Verlauf nach PHx in beiden Genotypen erhöht ist.

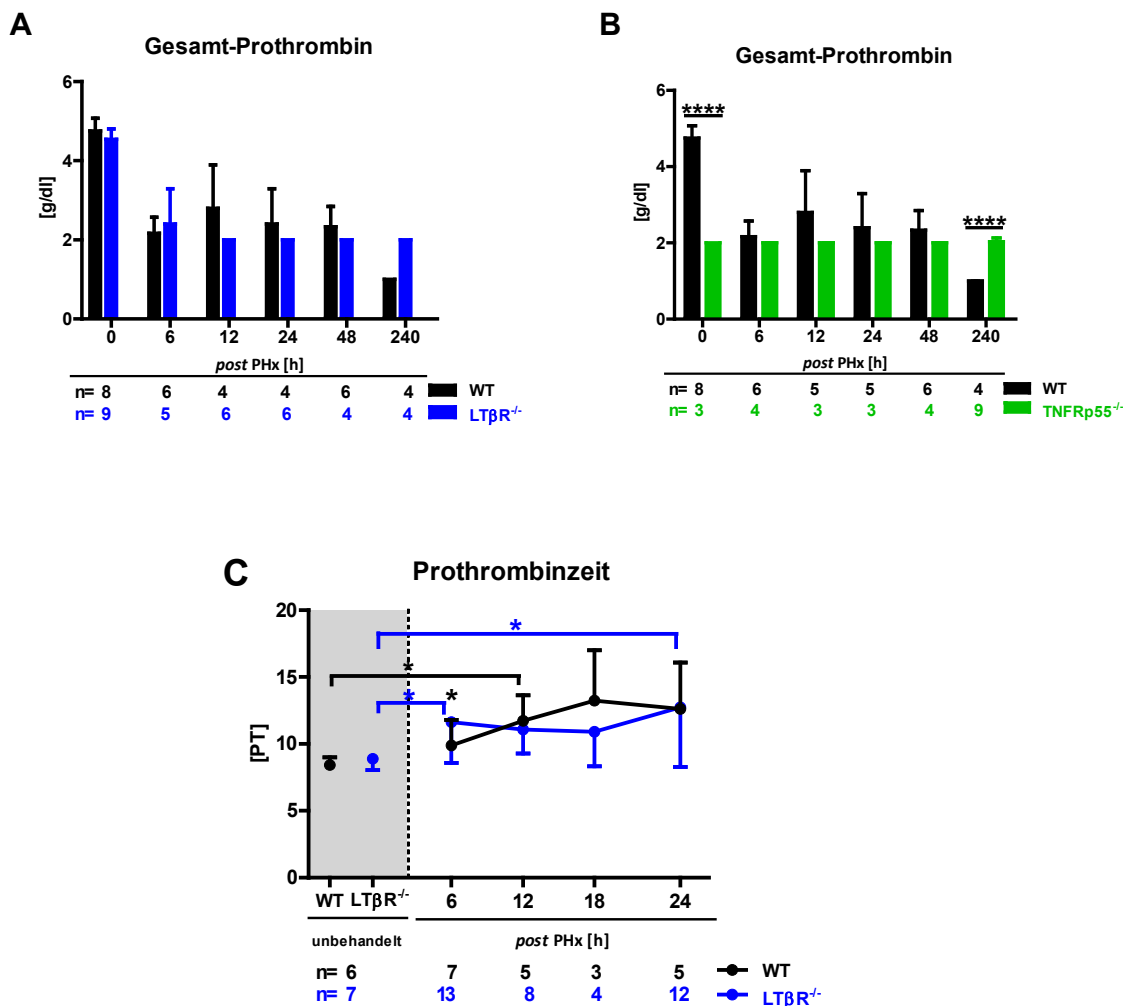


Abb. 4.4 A-C: Koagulationsparameter im Serum von WT, $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren, nicht operiert und nach partieller Hepatektomie. (A) Gesamt-Prothrombin in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren (B) Gesamt-Prothrombin in WT und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren (C) Prothrombinzeit in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. WT Tiere sind in schwarz, $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere in grün dargestellt. (n = Anzahl der Versuchstiere; h = Stunden; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$)

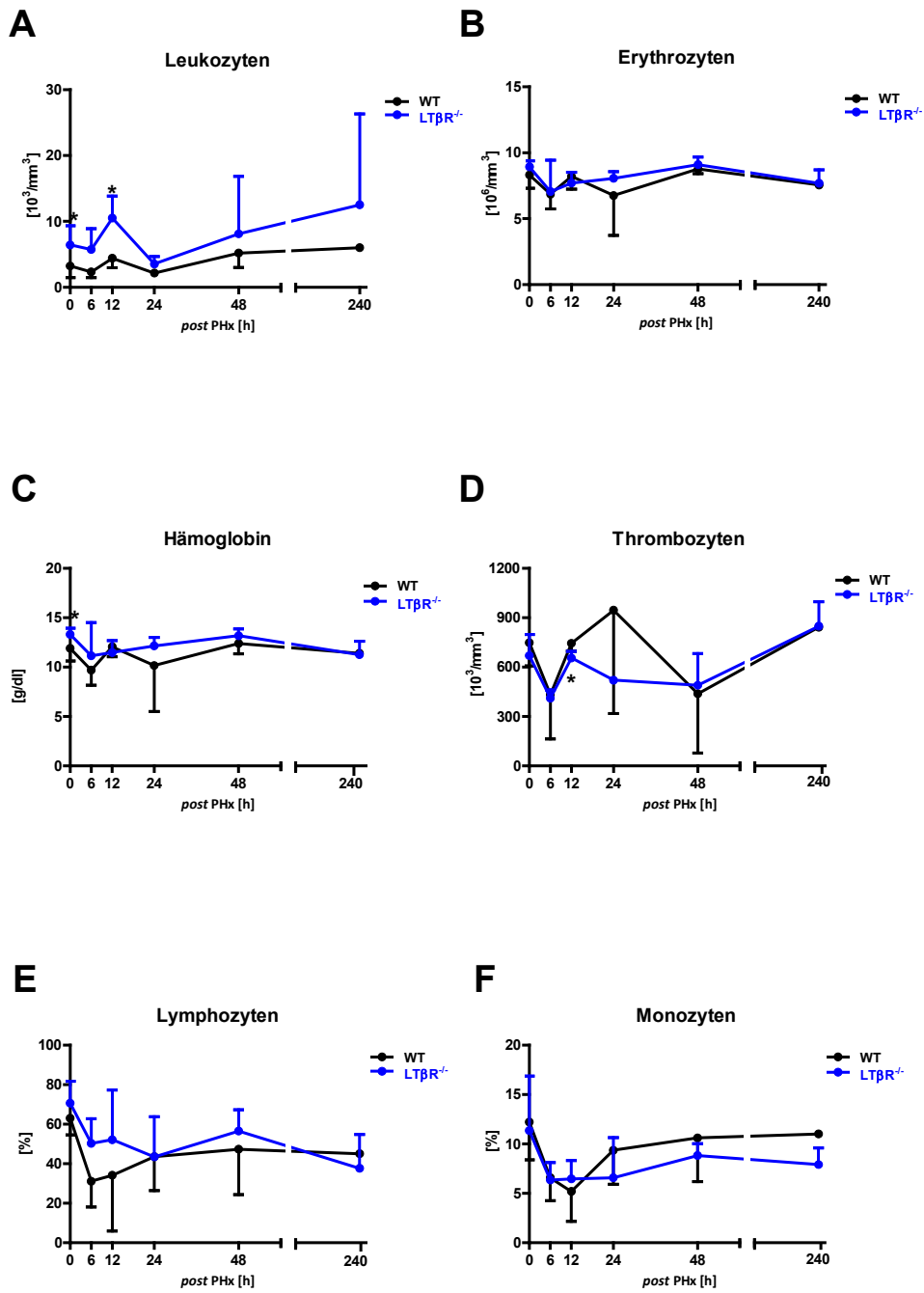
4.4.3 Kleines Blutbild

Wie zuvor in den Serumanalysen (Kap. 4.4.1 und 4.4.2) gezeigt wurde, deuten mehrere Parameter Unterschiede im Verlauf der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie in WT, $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren an. Um diese Unterschiede noch weiter zu charakterisieren, wurde ein kleines Blutbild in allen Genotypen vor und nach partieller Hepatektomie durchgeführt um weitere pathologische Veränderungen nach PHx zu ermitteln. Die Blutentnahme erfolgte 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h *post PHx* aus der *Vena cava inferior* (Kap. 3.1.4.1.1). Die Blutwerte für die $LT\beta R^{-/-}$ bzw. $TNFRp55^{-/-}$ Tiere sind in getrennten Grafiken dargestellt, es wurden jedoch jeweils die Werte der gleichen WT Tiere dargestellt. **Abbildung 4.5 A** zeigt, dass bereits im nicht operierten Zustand $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine signifikant erhöhte Leukozytenzahl im Vergleich zu nicht operierten WT Tieren aufweisen ($6,4 \pm 1,09 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $3,2 \pm 0,67 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $p = 0,0273$). Postoperativ nimmt die Leukozytenzahl in beiden Genotypen zu, wobei sich 12 h *post PHx* $LT\beta R^{-/-}$ Tiere weiterhin durch eine signifikant erhöhte Leukozytenzahl von den WT Tieren unterscheiden ($10,5 \pm 1,93 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $4,4 \pm 0,83 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $p = 0,440$). Auch 48 h nach PHx sind die Leukozytenzahlen der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere erhöht ($8,1 \pm 4,37 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $5,17 \pm 1,1 \cdot 10^3/\text{mm}^3$), jedoch nicht signifikant, allerdings unterscheidet sich die Varianz in den beiden Genotypen signifikant ($p = 0,0484$). Die Erythrozytenzahlen (**Abb. 4.5 B**) weisen sowohl in WT als auch $LT\beta R^{-/-}$ Tieren *post PHx* zwar leichte Schwankungen auf, zwischen den beiden Genotypen besteht jedoch kein Unterschied. Die in **Abbildung 4.5 C** dargestellte Messung des Hämoglobins zeigt ebenfalls im Verlauf nach PHx leichte, nicht signifikante Schwankungen zwischen WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. Lediglich der Vergleich zwischen nicht operierten WT mit $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zeigt einen signifikant erhöhten Hämoglobinwert in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ($11,89 \pm 0,47 \text{ g/dl}$ bzw. $13,30 \pm 0,24 \text{ g/dl}$; $p = 0,0209$). Die Thrombozytenzahlen (**Abb. 4.5 D**) verhalten sich in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen vor PHx ($748 \pm 53,17 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $669 \pm 48,69 \cdot 10^3/\text{mm}^3$) und 6 h nach PHx ähnlich ($432,3 \pm 155 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $411 \pm 28,94 \cdot 10^3/\text{mm}^3$), lediglich 12 h nach PHx zeigen WT Tieren gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren einen signifikant erhöhten Titer ($744,3 \pm 27,35 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $655 \pm 20,3 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $p = 0,0432$). 24 h nach PHx zeigen WT Tiere einen stark erhöhten Titer ($945,7 \pm 362,0 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $520,7 \pm 6,69 \cdot 10^3/\text{mm}^3$), der aber, vermutlich auf Grund der signifikant erhöhten Varianz ($p = 0,0007$), nicht signifikant ist. 10 Tage nach PHx sind keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen zu verzeichnen und die Thrombozytenzahlen gleichen wieder den Normwerten. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist vor und nach PHx im Vergleich zu den WT Tieren tendenziell erhöht (**Abb. 4.5 E**). In WT Tieren kommt es 6 h nach PHx zu einem Absinken des Lymphozytenanteils im Blut (6 h; $31,10 \pm 7,54 \%$), einer Stagnation 12 h nach PHx ($34,13 \pm 16,29 \%$) und einem leichten Anstieg des Lymphozytenanteils 24 h nach PHx ($43,57 \pm 9,94 \%$). 48 h und 240 h postoperativ bleibt der Lymphozytenanteil stabil.

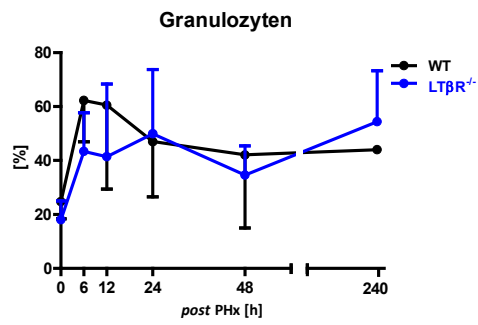
In $LT\beta R^{-/-}$ Tieren kommt es 6 h bis 24 h nach PHx zu einem nur leichten Absinken des Lymphozytenanteils im Blut. 48 h nach PHx ist ein Anstieg des Lymphozytenanteils zu verzeichnen ($56,53 \pm 12,57 \%$), der 240 h nach PHx wieder leicht absinkt und sich dem Wert der WT Tiere annähert ($37,65 \pm 16,44 \%$ bzw. $45 \pm 0,0 \%$). Der prozentuale Anteil der Monozyten der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigt vor und 6 h bis 12 h nach PHx im Vergleich zu WT Tieren keinen Unterschied (**Abb. 4.5 F**). 24 h, 48 h und 240 h nach PHx kommt es in beiden Genotypen tendenziell zu einem leichten Anstieg des Monozytenanteils im Blut, dabei zeigen die WT Tiere gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren leicht erhöhte Werte. Beim Vergleich des Granulozytenanteils (**Abb. 4.5 G**) zeigen nicht operierte WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere ähnliche Werte ($24,74 \pm 2,4 \%$ bzw. $18,03 \pm 2,64 \%$). 6 h und 12 h nach PHx kommt es in WT Tieren, im Gegensatz zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, vorübergehend zu einem Anstieg des Granulozytenanteils. Erst 24 h bis 240 h nach PHx sinkt der Granulozytenanteil der WT Tiere wieder. Wie die **Abbildungen 4.5 H, 4.5 J und 4.5 I** zeigen, sind die Leukozytenzahlen und die Erythrozytenzahlen sowie das Hämoglobin bei WT und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren vergleichbar. Nicht operierte WT Tiere zeigen im Vergleich zu $TNFRp55^{-/-}$ Tieren keinen Unterschied bei den Leukozytenzahlen ($3,23 \pm 0,67 \times 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $3,19 \pm 0,40 \times 10^3/\text{mm}^3$) (**Abb. 4.5 H**). Auch 6 h nach PHx ist kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu erkennen ($2,33 \pm 0,50 \times 10^3/\text{mm}^3$ bzw. $2,03 \pm 0,38 \times 10^3/\text{mm}^3$). Erst 12 h nach PHx zeigen WT Tiere einen Anstieg in den Leukozytenzahlen ($4,4 \pm 0,83 \times 10^3/\text{mm}^3$). $TNFRp55^{-/-}$ Tieren hingegen zeigen 12 h *post PHx* verminderte Leukozytenzahlen ($2 \pm 0,4 \times 10^3/\text{mm}^3$) und lassen erst im weiteren Verlauf nach PHx (24 h und 48 h) wie auch die WT Tiere einen Anstieg erkennen. Auffallend ist die Leukozytenzahl 10 Tage nach PHx, die in beiden Genotypen deutlich gegenüber den jeweils nicht operierten Tieren erhöht ist (WT: $6 \pm 0,0 \times 10^3/\text{mm}^3$; $TNFRp55^{-/-}$: $7,8 \pm 30,18 \times 10^3/\text{mm}^3$). Die in **Abbildung 4.5 I** dargestellte Messung des Hämoglobins zeigt vor und im Verlauf nach PHx in beiden Genotypen minimale, nicht signifikante Schwankungen. Die Erythrozytenzahlen liegen bei nicht operierten WT Tieren bei $8,55 \pm 0,41 \times 10^3/\text{mm}^3$ und in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren bei $8,20 \pm 0,43 \times 10^3/\text{mm}^3$ und zeigen nach PHx nur minimale, nicht signifikante Schwankungen (**Abb. 4.5 J**). Die in **Abbildung 4.5 K** dargestellten Thrombozytenzahlen zeigen einen minimalen Unterschied zwischen nicht operierten WT und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren ($748 \pm 53,17 \times 10^3/\text{mm}^3$ $691,4 \pm 64,77 \times 10^3/\text{mm}^3$). In den WT Tieren kommt es 6 h nach PHx zu einem leichten Abfall der Thrombozytenzahlen ($432,3 \pm 155 \times 10^3/\text{mm}^3$), die dann 24 h *post PHx* über die Normwerte ansteigen ($945,7 \pm 362,0 \times 10^3/\text{mm}^3$) um danach wieder abzusinken und 240 h nach PHx wieder den Normwert zu erreichen. Bei den $TNFRp55^{-/-}$ Tieren sinken die Thrombozytenzahlen bis 24 h nach PHx leicht ab ($452,3 \pm 44,04 \times 10^3/\text{mm}^3$), um bis 240 h *post PHx* wieder auf die Normwerte anzusteigen. Wahrscheinlich aufgrund der teilweise hohen Standardabweichungen sind die Unterschiede nicht signifikant. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten (**Abb. 4.5 L**) verhält sich in nicht operierten und 6 h nach PHx in beiden Genotypen tendenziell ähnlich.

12 h nach PHx kann jedoch ein vorübergehender Anstieg in den TNFRp55^{-/-} Tieren gegenüber den WT Tieren verzeichnet werden (34,13 ± 16,29 % bzw. 52,13 ± 12,57 %). Dieser Anstieg ist nicht signifikant, vermutlich da die Standardabweichung bei den TNFRp55^{-/-} Tieren sehr hoch ist und eine signifikant erhöhte Varianz aufweist (p = 0,0156). 240 h nach PHx entspricht der Lymphozytenanteil der WT Tiere wieder annähernd dem Normwert (45 ± 0,0 %), wohingegen TNFRp55^{-/-} Mäuse einen verminderten Lymphozytenanteil aufweisen (28,1 ± 6,39 %). Der Monozytenanteil der TNFRp55^{-/-} Tiere zeigt vor und 6 h nach PHx im Vergleich zu WT Tieren keinen Unterschied (**Abb. 4.5 M**). 12 h nach PHx weisen TNFRp55^{-/-} Tiere einen Anstieg des Monozytenanteils auf (5,2 ± 17,5 %), wohingegen dieser in TNFRp55^{-/-} Tieren absinkt (9,0 ± 18,5 %). 24 h nach PHx zeigen WT Tiere wieder einen Anstieg des Monozytenanteils, der im weiteren Verlauf (48 h und 240 h) konstant erhöht bleibt. TNFRp55^{-/-} Tiere hingegen zeigen einen gegenläufigen Verlauf, in dem es zu einem Absinken des Monozytenanteils 24 h, 48 h und 240 h nach PHx kommt. 10 Tage nach PHx liegen die Werte der Monozytenanteils in WT Tieren im Normwert (12,21 ± 1,44 %), wohingegen TNFRp55^{-/-} Tiere noch immer einen verminderte Monozytenanteil aufweisen (6,6 ± 2,89 %). Der in **Abbildung 4.5 N** dokumentierte prozentuale Anteil von Granulozyten lässt nach PHx einen unterschiedlichen Verlauf in WT und TNFRp55^{-/-} Tieren erkennen. Nicht operierte Tiere beider Genotypen zeigen keine Unterschiede (7,74 ± 2,4 % bzw. 28,33 ± 2,86 %). In den Wildtypen steigen 6 h *post PHx* die Granulozytenanteile an (6 h; 62,33 ± 8,9 %) bleiben 12 h nach PHx erhöht (60,57 ± 17,97 %) und fallen im weiteren Verlauf ab, obgleich sie sich 240 h nach PHx noch nicht ganz dem Wert nicht operierter WT Tiere angenähert haben (65,3 ± 12,15 %). In TNFRp55^{-/-} Tieren ist der gleiche initiale Anstieg 6 h nach PHx erkennbar, allerdings kommt es 12 h nach PHx zu einem Sinken des Granulozytenanteils (34,30 ± 1,9 %), der danach mehr oder weniger gleichmäßig wieder ansteigt. Der Granulozytenanteil ist in den TNFRp55^{-/-} Tieren gegenüber den WT Tieren 240 h nach PHx erhöht (65,3 ± 13,44 % bzw. 65,3 ± 12,15 %), allerdings nicht signifikant, da die Standardabweichung relativ hoch ist.

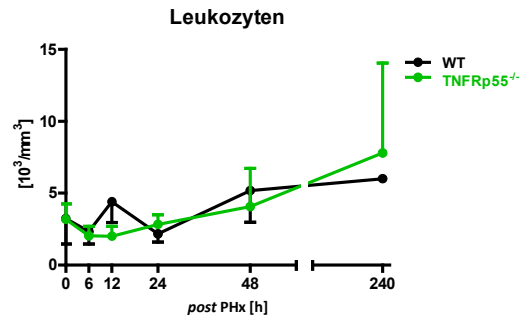
Zusammenfassend weist eine Analyse des Blutbildes nur wenige signifikante Unterschiede zwischen WT und LTβR^{-/-} Tieren vor und nach PHx auf. Im Vergleich zu WT Tieren zeigen LTβR^{-/-} Tiere eine erhöhte Leukozytenzahl, einen erhöhten Hämoglobinwert und eine erniedrigte Thrombozytenzahl. TNFRp55^{-/-} Tiere unterscheiden sich im Verlauf nach PHx lediglich in der Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten und dem prozentualen Anteil der Monozyten von WT Tieren. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.



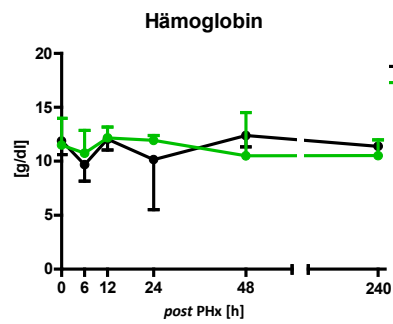
G



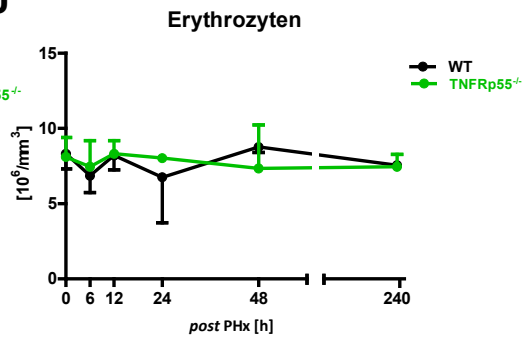
H



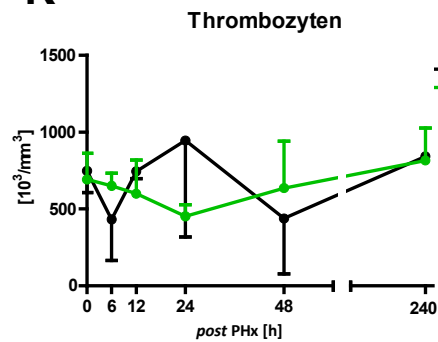
I



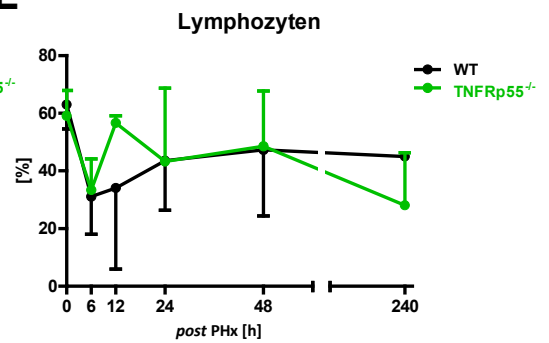
J



K



L



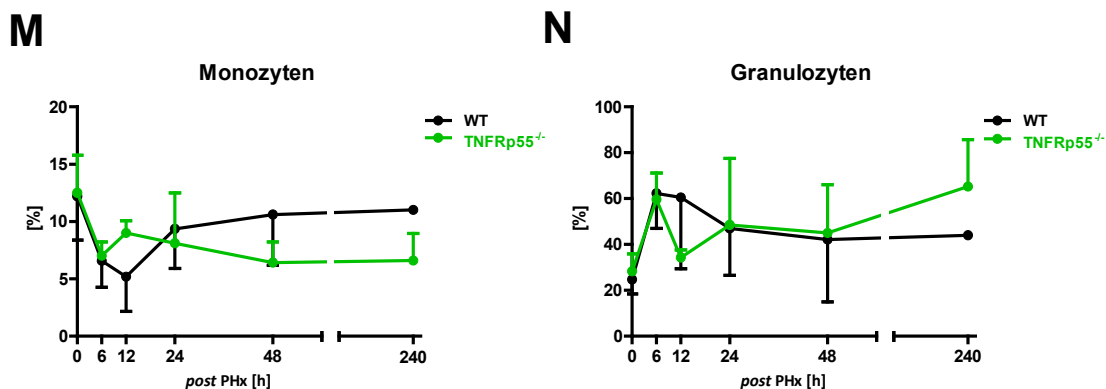


Abb. 4.5 A-N: Kleines Blutbild von WT, LTβR^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Tieren nicht operiert und nach partieller Hepatektomie. (A, H) Erythrozyten (B, I) Leukozyten (C, J) Hämoglobin (D, K) Thrombozyten (E, L) Lymphozyten (F, M) Monozyten und (G, N) Granulozyten. WT Tiere sind in schwarz, LTβR^{-/-} Tiere in blau und TNFRp55^{-/-} Tiere in grün dargestellt. (n = 3; h = Stunden; *p < 0,05)

4.5 Zytokinexpression der LTβR^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Tiere nach partieller Hepatektomie

4.5.1 Zytokinscreening mittels *Mouse Cytokine Array*

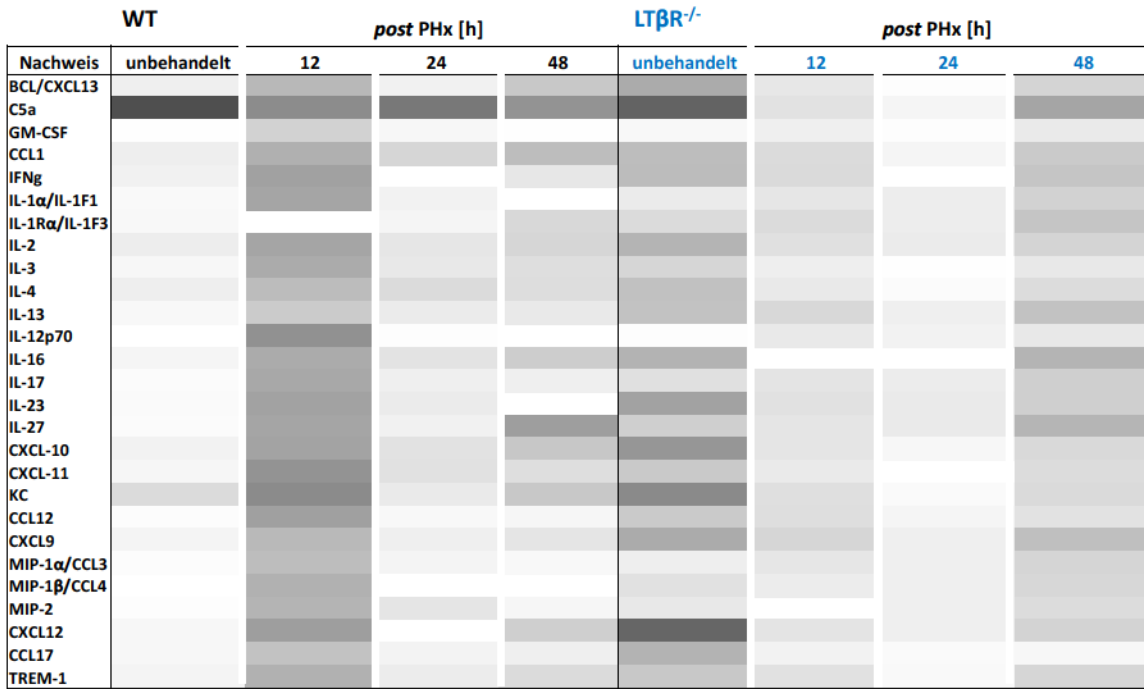
Die hohe Regenerationsfähigkeit der Leber wird entsprechend eines leberspezifischen *Response to Injury Concepts* durch eine Wachstumsfaktor-abhängige Proliferation von Hepatozyten, eine Aktivierung von Zytokin-vermittelten protektiven Programmen in Hepatozyten und eine Freisetzung von Chemokinen, welche die Rekrutierung weiterer, für das Regenerationsgeschehen relevanter Zellen vermittelt, erreicht (Zimmon, 1977). Anhand des *Mouse Cytokine Arrays* (Panel A von R&D Systems, Kap. 3.1.4.1.4) wurden daher vor und 12 h, 24 h und 48 h nach PHx die relativen Spiegel 40 verschiedener Zytokine, Chemokine und Akut Phase Proteine im Serum von je einem WT, LTβR^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Tier bestimmt. Der *Cytokine Array* diene als explorativer Ansatz, der Veränderungen im Zytokinprofil aufdeckt und eine gezielte Analyse mittels ELISA begründen sollte. Die Ergebnisse für die LTβR^{-/-} bzw. TNFRp55^{-/-} Tiere sind in getrennten Grafiken dargestellt, wobei die Kontrollwerte jeweils von den gleichen WT Tieren stammen. In **Abbildung 4.6 A** sind die Zytokine und Chemokine, die die stärksten Unterschiede in der Intensität des Signals zwischen beiden Genotypen aufweisen, zusammengefasst. Zytokine und Chemokine, die keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen aufwiesen, wurden in der Darstellung ausgeschlossen. Betrachtet man das Zytokinprofil nicht operierter Wildtypen gegenüber nicht operierten LTβR^{-/-} Mäusen im Überblick, ist zu erkennen, dass in den WT Tieren nur einige wenige Zytokine höhere Spiegel zeigen (C5a, CD54, M-CSF, TIMP-1), die meisten anderen nicht.

Dagegen zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Mäuse ein anderes Profil: Zwar sind die Zytokine, die auch bei WT Tieren in großer Menge nachgewiesen werden können, ebenfalls in größerer Menge nachweisbar, insgesamt sind aber die Spiegel der meisten anderen Zytokine im Vergleich zum WT erhöht. Nach der partiellen Hepatektomie verschieben sich diese Profile. Im Wildtypen kommt es 12 h nach PHx zu einer Hochregulierung fast aller Zytokine und Chemokine, wohingegen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine Herunterregulation zeigen. 24 h nach PHx kommt es sowohl in den WT Tieren als auch in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zu einer Herabregulation der meisten Zytokine bzw. Chemokine. Deutliche Unterschiede im Expressionsprofil beider Genotypen zeigen sich dabei nur bei vereinzelt Zytokinen bzw. Chemokinen, wie u.a. C5a, CCL1, IL-3, IL-4, IL-12p70, IL-16, CXCL10, CXCL11 und MIP-2. 48 h nach PHx zeigt sich eine gegenläufige Veränderung in den WT Tieren, die vergleichbar mit dem veränderten Expressionsprofil 12 h nach PHx ist: Das relative Vorkommen bestimmter Zytokine (IL-1 α , IL-13, IL-12p70, IL-23, IL-27 und CCL12) steigt wieder an. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere hingegen nähern sich 48 h nach PHx ihrem ursprünglichen Profil im nicht operierten Zustand an, d.h. die Zytokin-/Chemokinspiegel steigen tendenziell wieder. Auffällig sind hierbei die relativen Spiegel von IFN γ , IL-1R α , IL-13, IL-16 und CCL3 in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, die, wie auch in nicht operierten Tieren, höher sind als in den WT Tieren.

Abbildung 4.6 B zeigt das Zytokin- bzw. Chemokinprofil von TNFRp55 $^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu WT Tieren. Das Profil nicht operierter WT und TNFRp55 $^{-/-}$ Tiere erscheint nahezu identisch. Lediglich KC, M-CSF, CCL2 und CXCL17 zeigen in beiden Genotypen ein unterschiedlich starkes Vorkommen. 12 h nach PHx sind die WT Tiere grundsätzlich, wie zuvor beschrieben, durch ein erhöhtes Vorkommen fast aller Zytokine/Chemokine charakterisiert. Im Gegensatz dazu zeigen die TNFRp55 $^{-/-}$ Tiere allgemein nur einen geringen Anstieg der meisten analysierten Zytokine und Chemokine. Ein deutlicher Anstieg ist nur bei G-CSF, CD54, IL-5, IL-16, M-CSF und CCL2 gegeben. 24 h nach PHx verändert sich dieses Profil nur geringfügig, wogegen es 48 h nach PHx zu einem sehr starken Anstieg fast aller Zytokine/Chemokine kommt, der deutlich über dem der WT Tiere 6 h nach PHx liegt.

Zusammengefasst zeigen die Zytokin- und Chemokinprofile der WT, $LT\beta R^{-/-}$ und TNFRp55 $^{-/-}$ Tiere interessante Unterschiede: Insgesamt sind die relativen Werte bei nicht operierten WT Tieren niedrig. 12 h nach PHx steigen die Werte und sinken 24 h nach PHx wieder ab um 48 h post PHx wieder anzusteigen, ohne jedoch so hohe Spiegel wie 12 h nach PHx zu erreichen. Die nicht operierten $LT\beta R^{-/-}$ Tiere hingegen weisen insgesamt relativ hohe Zytokin-/Chemokinspiegel auf, die 12 h nach deutlich und 24 h nach PHx nochmals geringfügig abfallen. 48 h nach PHx steigen die Werte wieder und nähern sich dem Profil nicht operierter Tiere an. TNFRp55 $^{-/-}$ Tiere zeigen 12 h nach PHx nur für einige Zytokine/Chemokine erhöhte Werte, kein allgemeines Sinken der Werte nach 24 h und einen deutlichen Anstieg fast aller Zytokine/Chemokine 48 h nach PHx.

A



B

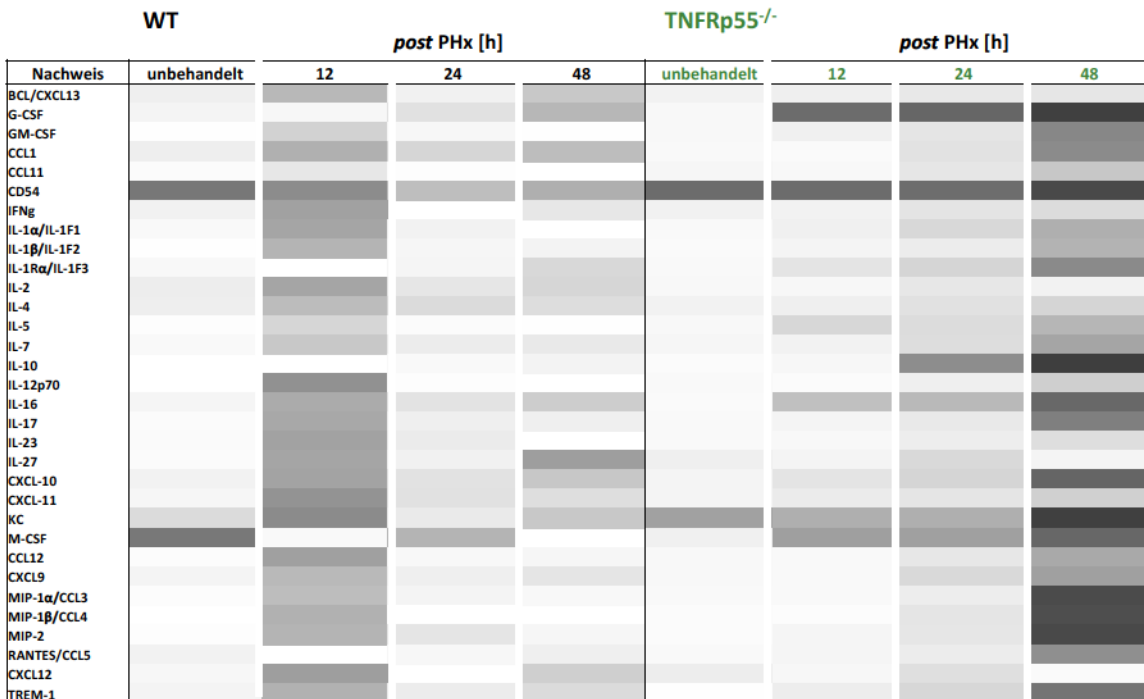


Abb. 4.6 A-B: Darstellung der Expression ausgewählter Zytokine und Chemokine mittels Cytokine Array Panel A von WT, LTβR^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Seren nicht operiert und nach partieller Hepatektomie. (A) WT vs. LTβR^{-/-} Tiere (B) WT vs. TNFRp55^{-/-} Tieren. Dazugehörige Blots sind im Anhang aufgeführt. (h = Stunden; je 1 Serumprobe des entsprechenden Genotypen pro Zeitpunkt vor/nach PHx)

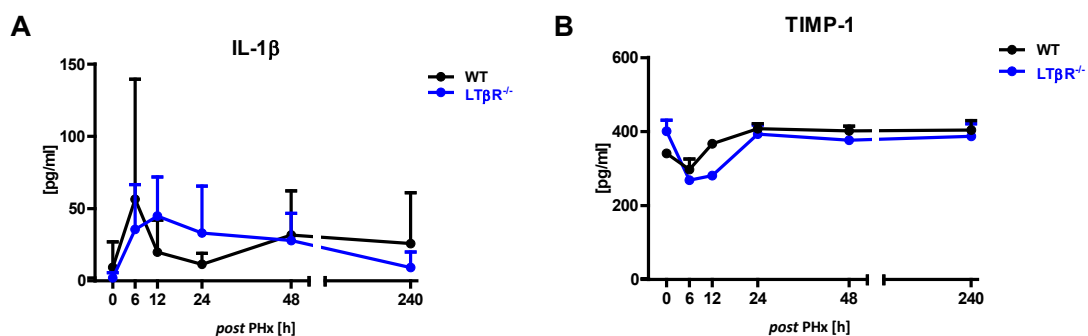
4.5.2 Analyse relevanter Zytokine und der Metalloprotease TIMP-1 bei der Leberregeneration mittels ELISA

Wie in den vorherigen Ergebnissen gezeigt wurde (**Abb. 4.6 A und B**), kommt es in WT Tieren nach einer partiellen Hepatektomie zu einem massiven Anstieg der Zytokinspiegel im Serum. WT Tiere unterscheiden sich dabei erheblich von den Tieren mit einer Defizienz im TNFR bzw. LT β R Signalweg. In der Literatur wird beschrieben, dass Interleukin-1 β im Rahmen einer inflammatorischen Antwort sezerniert wird und bei wichtigen Vorgängen wie der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung sowie der Apoptose involviert ist (*Boulton et al., 1997*). Gleiches wird für die Funktion der Metalloprotease TIMP-1 beschrieben (*Gomez et al., 1997; Hayakawa et al., 1992*). Zu der wichtigsten Antwort nach PHx gehören u.a. die Induktion von Akute-Phase-Proteinen, als entscheidendes Signal für die Freisetzung von TNF und Interleukin-6 in der *Primingphase* der Leberregeneration nach PHx (*Fausto, 2000, 2006*). Daher wurden die Konzentrationen von IL-1 β , TIMP-1, IL-6 und TNF im Serum von WT, LT β R^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Tieren vor und 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h nach PHx mit spezifischen ELISA-Kits bestimmt. Die Zytokinspiegel für die LT β R^{-/-} bzw. TNFRp55^{-/-} Tiere sind in getrennten Grafiken dargestellt, wobei die Kontrollwerte jeweils von den gleichen WT Tieren stammen. **Abbildung 4.7 A** zeigt, dass nicht operierte, sowie operierte WT und LT β R^{-/-} Tiere einen vergleichbaren Verlauf der IL-1 β Konzentration nach PHx aufweisen. 6 h nach PHx lassen WT Tiere einen deutlichen, LT β R^{-/-} Tiere einen etwas geringeren Anstieg erkennen, der jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung in den WT Tieren nicht signifikant ist (56 \pm 41 pg/ml bzw. 36 \pm 18 pg/ml). Wohingegen die IL-1 β Konzentration in WT Tieren 12 h und 24 h nach PHx sinkt, bleiben die Werte von IL-1 β in den LT β R^{-/-} Tieren tendenziell erhöht (12 h: 20 \pm 9,1 pg/ml bzw. 45 \pm 12 pg/ml; 24 h: 11 \pm 3,3 pg/ml bzw. 33 \pm 14 pg/ml). 48 h nach PHx gleichen sich beide Genotypen wieder in ihren IL-1 β Werten an (WT: 32 \pm 15 pg/ml; LT β R^{-/-}: 28 \pm 7,7 pg/ml). 240 h nach PHx kommt es im Gegensatz zu den WT Tieren zu einem Abfall der IL-1 β Konzentration in der LT β R^{-/-} Tieren (26 \pm 14 pg/ml bzw. 9,2 \pm 4,1 pg/ml) der jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant ist. Die Varianzen der beiden Genotypen unterscheiden sich signifikant ($p = 0,0120$). Die Konzentration der Metalloprotease TIMP-1 (**Abb. 4.7 B**) zeigt in den nicht operierten LT β R^{-/-} Tieren im Vergleich zu nicht operierten WT Tieren eine leicht erhöhte Ausgangskonzentration (267 \pm 134 pg/ml bzw. 341 \pm 7,1 pg/ml). Nach PHx ist kein Unterschied im Verlauf der TIMP-1 Konzentration in beiden Genotypen gegeben. 6 h nach PHx sinkt die TIMP-1 Konzentration initial in beiden Genotypen ab (WT: 300 \pm 17 pg/ml; LT β R^{-/-}: 90 \pm 90 pg/ml), steigt dann 12 h und 24 h *post PHx* wieder an und bleibt in beiden Genotypen bis einschließlich 240 h nach PHx gleichbleibend hoch und zeigt eine vergleichbare Konzentration zum Ausgangsniveau nicht operierter Tiere (270 \pm 140 pg/ml; LT β R^{-/-}: 390 \pm 20 pg/ml). Die Konzentrationen von IL-6 (**Abb. 4.7 C**) und TNF (**Abb. 4.7 D**) im Serum hingegen zeigen, dass es in WT und LT β R^{-/-} Tieren zu einem erheblichen Anstieg nach PHx kommt.

Initial, das heißt im nicht operierten Zustand, zeigen WT Tiere niedrigere IL-6 Werte als $LT\beta R^{-/-}$ Tiere (29 ± 19 pg/ml bzw. 57 ± 38 pg/ml) (**Abb. 4.7 C**). Bei WT Tieren steigt die IL-6 Konzentration 6 h und 12 h nach PHx an (130 ± 34 pg/ml bzw. 270 ± 55 pg/ml), bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erreicht sie bereits 6 h nach PHx ihr Maximum (330 ± 88 pg/ml) und sinkt 12 h nach PHx bereits wieder (200 ± 57 pg/ml). Obgleich es in beiden Genotypen im weiteren Verlauf nach PHx (bis 24 h) zu einem Abfall in der IL-6 Konzentration kommt, bleibt die Konzentration von IL-6 in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gegenüber den WT Tieren erhöht (120 ± 40 pg/ml bzw. 78 ± 37 pg/ml). 48 h nach PHx steigt die IL-6 Konzentration beider Genotypen erneut leicht an (WT: 130 ± 34 pg/ml; $LT\beta R^{-/-}$: 330 ± 88 pg/ml), bevor sie 240 h nach PHx wieder leicht absinkt (WT: 61 ± 33 pg/ml; $LT\beta R^{-/-}$: 150 ± 43 pg/ml). Während der gesamten Beobachtungszeit sind Konzentration von IL-6 im Serum von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gegenüber WT Tieren erhöht, diese sind allerdings nicht signifikant unterschiedlich. Die TNF-Konzentration (**Abb. 4.7 D**) ist in nicht operierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gegenüber nicht operierten WT Tieren erhöht (49 ± 49 pg/ml bzw. 0 pg/ml). Nach PHx kommt es in beiden Genotypen 6 h und 12 h nach PHx zu einem Anstieg in der TNF-Konzentration. Das TNF im Serum von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist dabei deutlich gegenüber den WT Tieren erhöht (6 h - WT: 23 ± 19 pg/ml; $LT\beta R^{-/-}$: 100 ± 57 pg/ml; 12 h - WT: 110 ± 22 pg/ml; $LT\beta R^{-/-}$: 240 ± 24 pg/ml). 24 h nach PHx kommt es in beiden Genotypen zu einer Abnahme von TNF im Serum, wobei sich die Konzentration auf das gleiche Niveau einpendelt (58 ± 45 pg/ml bzw. 53 ± 17 pg/ml) und bis 240 h nach PHx unverändert bleibt (240 h - WT: 28 ± 28 pg/ml; $LT\beta R^{-/-}$: $42 \pm 6,8$ pg/ml). Betrachtet man den in **Abbildung 4.7 E** dargestellten Vergleich der IL-1 β Konzentration der beiden Genotypen, ist bereits im nicht operierten Zustand ein leicht erhöhtes Vorkommen von IL-1 β in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren gegenüber WT Tieren zu erkennen (52 ± 29 pg/ml bzw. $9,3 \pm 6,7$ pg/ml). 6 h nach PHx kommt es sowohl in WT Tieren als auch in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren zu einem Anstieg in der IL-1 β Konzentration (56 ± 83 pg/ml bzw. 89 ± 0 pg/ml). Wohingegen die Konzentration von IL-1 β in WT Tieren 12 h nach PHx sinkt und im weiteren Verlauf (24 h bis 240 h *post PHx*) gleichbleibend niedrig bleibt, zeigen $TNFRp55^{-/-}$ Tiere 12 h nach PHx einen weiteren, deutlichen Anstieg von IL-1 β im Serum (WT: 20 ± 22 pg/ml; $TNFRp55^{-/-}$: 310 ± 0 pg/ml). 24 h und 48 h nach PHx sinkt die IL-1 β Konzentration unter das Niveau von WT Tieren, bis es 240 h nach PHx wieder zu einem Anstieg kommt. Dabei ist die IL-1 β Konzentration der $TNFRp55^{-/-}$ Tiere signifikant im Vergleich zu den WT Tieren erhöht ($TNFRp55^{-/-}$: 120 ± 29 pg/ml bzw. 26 ± 14 pg/ml; $p = 0,0153$). Die Konzentration der Metalloprotease TIMP-1 (**Abb. 4.7 F**) zeigt 6 h nach PHx einen Abfall in den WT Tieren, ansonsten jedoch kaum Unterschiede zwischen beiden Genotypen nach PHx. Nicht operierte $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigen eine leicht erhöhte Ausgangskonzentration im Vergleich zu nicht operierten WT Tieren (390 ± 10 pg/ml bzw. $341 \pm 7,1$ pg/ml), die auch 6 h nach PHx zu sehen ist. Danach bleibt die Konzentration von TIMP-1 in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren bis auf minimale Schwankungen unverändert und auf demselben Niveau von WT Tieren. Im Serum nicht operierter WT und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere (**Abb. 4.7 G**) ist eine vergleichbare Menge IL-6

nachzuweisen (29 ± 19 pg/ml bzw. 44 ± 29 pg/ml). Nach PHx zeigen beide Genotypen 6 h und 12 h einen vergleichbaren Anstieg der IL-6 Konzentration. Wohingegen 24 h nach PHx das IL-6 im Serum von WT Tieren absinkt (81 ± 46 pg/ml) und bis auf einen leichten Anstieg 48 h nach PHx (140 ± 99 pg/ml), auch 240 h nach PHx auf einem konstanten Niveau bleibt (91 ± 46 pg/ml), zeigen TNFRp55^{-/-} Tiere 24 h *post PHx* einen weiteren Anstieg, der signifikant gegenüber WT Tieren erhöht ist (463 ± 62 pg/ml; $p = 0,0051$). 48 h nach PHx sinkt die IL-6 Konzentration der TNFRp55^{-/-} Tiere (44 ± 44 pg/ml) deutlich unter den Wert der WT Tiere und erreicht 240 h nach PHx ähnliche Werte (82 ± 50 pg/ml) wie die WT Tiere. Die in der **Abbildung 4.7 H** dokumentierte TNF-Konzentration zeigt einen ähnlichen Verlauf in beiden Genotypen, allerdings weisen TNFRp55^{-/-} Tiere gegenüber WT Tieren zu allen Zeitpunkten eine deutlich erhöhte Konzentration von TNF auf: Bereits im nicht operierten Zustand weisen TNFRp55^{-/-} Tiere gegenüber WT Tieren im Serum eine signifikant erhöhte TNF Konzentration auf (130 ± 18 pg/ml bzw. 0 pg/ml; $p = 0,089$). 6 h nach PHx ist keine Veränderung in der TNF-Konzentration in beiden Genotypen ersichtlich, obgleich TNFRp55^{-/-} Tiere immer noch erhöhte, aber gegenüber WT Tieren nicht signifikante TNF Werte aufweisen (120 ± 120 pg/ml bzw. 29 ± 19 pg/ml). 12 h nach PHx zeigen sowohl WT als auch TNFRp55^{-/-} Tiere einen Anstieg in der TNF-Konzentration, dennoch bleibt die Konzentration in TNFRp55^{-/-} Tieren gegenüber WT Tieren erhöht (279 ± 99 pg/ml bzw. 107 ± 22 pg/ml). 48 h und 240 h nach PHx zeigen beide Genotypen, bis auf leichte Schwankungen, keine weitere Veränderung in der TNF Konzentration, obgleich auch hier die TNF Werte in TNFRp55^{-/-} Tieren gegenüber WT Tieren erhöht sind.

Zusammenfassend zeigt ein Vergleich zwischen WT und LTβR^{-/-} Tieren in der Expression für die Leberregeneration relevanter Zytokine, dass LTβR^{-/-} Tiere im Verlauf nach PHx erhöhte Konzentrationen von TNF und IL-6 aufweisen. Die Konzentrationen von IL-1β und TIMP-1 im Verlauf nach PHx zeigen keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen. TNFRp55^{-/-} Tiere hingegen zeigen insbesondere 12 h nach PHx gegenüber WT Tieren eine deutlich erhöhte Expression von IL-1β und TNF und auch die Expression von IL-6 ist in TNFRp55^{-/-} Tieren im Vergleich zu WT Tieren deutlich erhöht.



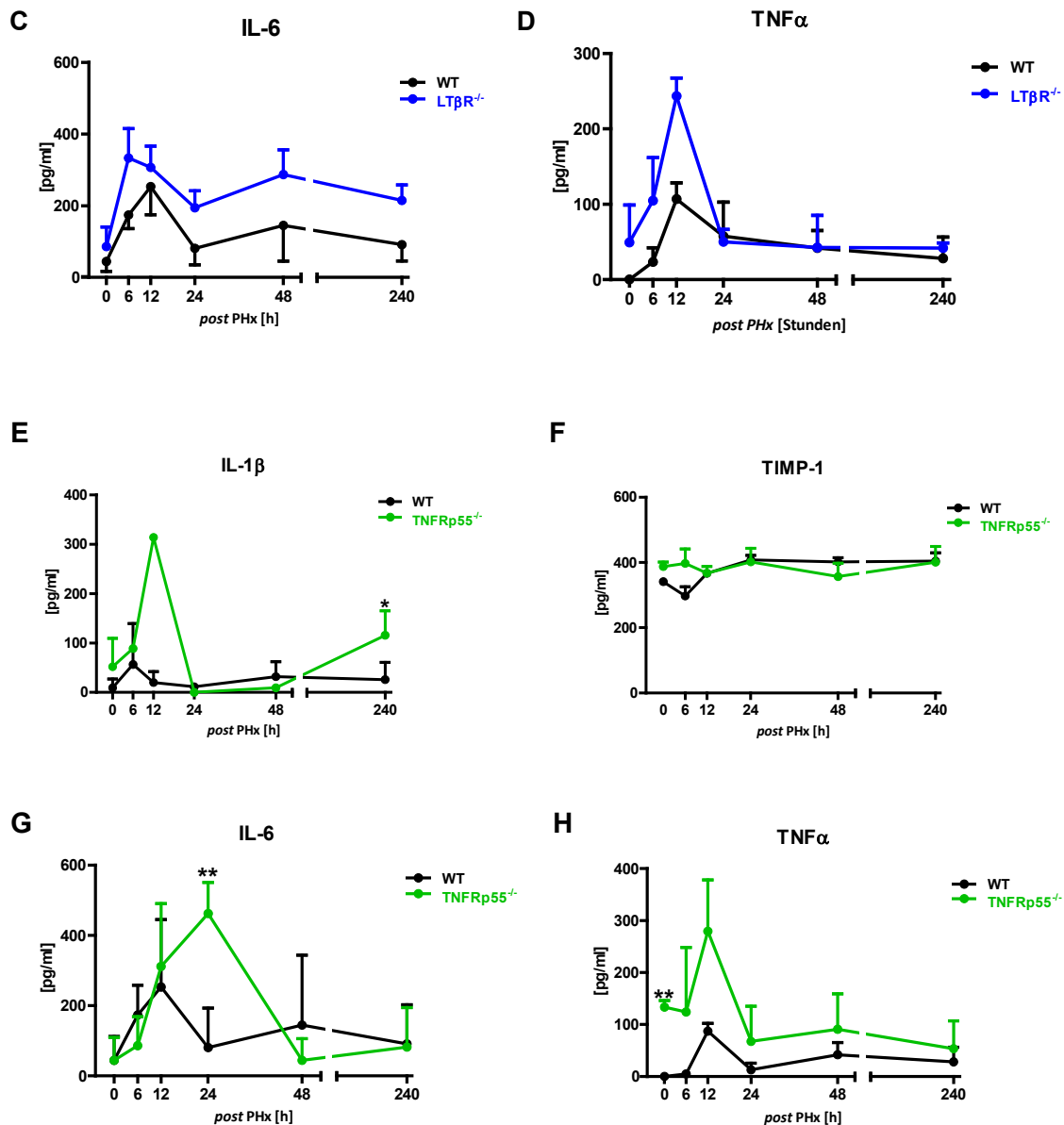


Abb. 4.7 A-H: Zytokinkonzentrationen von IL-1 β , TIMP-1, IL-6 und TNF im Serum von WT, LT β R^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Tieren, nicht operiert und nach partieller Hepatektomie. (A - D) WT vs. LT β R^{-/-} Tiere (E - H) WT vs. TNFRp55^{-/-} Tiere. Dabei zeigen die Abbildungen (A,E) IL-1 β , (B,F) TIMP-1, (C,G) IL-6 und (D,H) TNF α . WT Tiere sind in schwarz, LT β R^{-/-} Tiere in blau und TNFRp55^{-/-} Tiere in grün dargestellt. (n = 3, Anzahl der Versuchsdurchführungen; h = Stunden; *p < 0,05; **p < 0,005)

4.6 Regulation der biliären Homöostase nach partieller Hepatektomie

Die Leber ist durch ihre Enzym- und Transportsysteme das zentrale Organ zur Aufrechterhaltung der Stoffwechsellhomöostase (Wallace *et al.*, 2008). Gallensalze (GS) sind Signalmoleküle mit hormonähnlicher Wirkung, die eine Vielzahl von Stoffwechselfunktionen beeinflussen. Sie sind an der Regulation der Lipid-, Glukose- und Energiehomöostase beteiligt (Meng *et al.*, 2011), machen die

Fette in der Nahrung nutzbar und sind an der Initiierung der Leberregeneration nach PHx beteiligt (Huang *et al.*, 2006). Daher wurde ein Gallensalzprofil der quantitativ prominenten unkonjugierten, Taurin (T)- und Glycin (G)-konjugierten GS von nicht operierten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zu diversen Zeitpunkten (6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h) nach PHx angefertigt. Im Fokus der Analyse standen Serum- sowie Leberproben, die via UPLC-MS/MS (Kap. 3.1.4.1.8 und Kap. 3.1.4.2.3) gemessen wurden.

4.6.1 Analyse der Gallensalze im Serum

In Serumanalysen zeigen WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere 6 h nach PHx einen schnellen Anstieg in der GS-Gesamtkonzentration (**Abb. 4.8 D**). Dabei ist der Anstieg in WT Tieren im Vergleich zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren weniger stark (625.526 ± 230.825 nmol/L bzw. 914.841 ± 129.334 nmol/L). Diese Erhöhung der Gallensalzkonzentration 6 h nach PHx kann in beiden Genotypen bei den unkonjugierten, T- und G-konjugierten GS beider Genotypen verzeichnet werden. 12 h nach PHx weisen WT Tiere einen weiteren Anstieg in der GS-Gesamtkonzentration auf (910.670 ± 527.095 nmol/L). Insbesondere unkonjugierte GS zeigen in den WT Tieren 12 h nach PHx eine deutliche Erhöhung (**Abb. 4.8 A**), wohingegen die Spiegel T- und G-konjugierter GS nur minimal ansteigen (**Tab. 4.2**). Dagegen fällt im Serum von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren die GS-Gesamtkonzentration 12 h nach PHx bereits wieder ab (466.401 ± 233.483 nmol/L), wobei der größte Abfall in den unkonjugierten GS vorzufinden ist (3fach) und T- sowie G-konjugierte GS eine 2fache Reduktion zeigen (**Tab. 4.2**). 24 h nach PHx kommt es auch in WT Tieren zu einer deutlichen Reduktion der GS im Serum (172.088 ± 144.188 nmol/L). Zwar fallen auch in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren die Gesamt GS-Spiegel 24 h nach PHx weiter ab (366.167 ± 334.475 nmol/L), jedoch deutlich langsamer als in den WT Tieren, so dass die $LT\beta R^{-/-}$ Tiere insgesamt höhere Werte bei den Gesamt GS (**Abb. 4.8 D**), den unkonjugierten, den T- und den G-konjugierten GS 24 h nach PHx zeigen (unkonj. GS - 6.796 ± 4.699 nmol/L bzw. 10.805 ± 3.564 nmol/L; T-konj. GS - 120.978 ± 104.674 nmol/L bzw. 263.520 ± 234.436 nmol/L; G-konj. GS - 44.313 ± 36.617 nmol/L bzw. 92.733 ± 108.935 nmol/L; **Abb. 4.8 A-C**; **Tab. 4.2**). Im weiteren Verlauf (48 h und 240 h) sinkt die GS-Gesamtkonzentrationen im Serum beider Genotypen weiter ab (**Abb. 4.8 D**) bis sie annähernd ihren Normwert erreichen (48 h - WT: 111.269 ± 22.542 nmol/L; $LT\beta R^{-/-}$: 172.844 ± 71.058 nmol/L; 240 h - WT: 1.154 ± 504 nmol/L; $LT\beta R^{-/-}$: 1.333 ± 352 nmol/L). Für eine genauere Analyse des GS-Profiles wurden die quantitativ prominenten GS (CA, T-CA, DCA, T-DCA, CDCA, T-CDCA, LCA, T-LCA und LCAS) separat dargestellt (**Abb. 4.9 A-I**). Der Verlauf ist bei einigen GS sehr ähnlich (**Abb. 4.9 A-D** und **F**) und zeigt ein tendenzielles Ansteigen in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 6 h und 12 h nach PHx. Bei CA und DCA (**Abb. 4.9A** und **C**) ist der Anstieg 6 h (CA: 16.993 ± 12.705 nmol/L bzw. 14.676 ± 14.584 nmol/L; DCA:

589 ± 283 nmol/L bzw. 478 ± 40 nmol/L) und 12 h (CA: WT: 35.389 ± 24.786 nmol/L bzw. 12.171 ± 9.436 nmol/L; DCA: 572 ± 288 nmol/L bzw. 543 ± 516 nmol/L) nach PHx in WT Tieren im Vergleich zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren größer. T-DCA und T-CDCA (**Abb. 4.9D und F**) hingegen zeigen 6 h (T-DCA: 3.508 ± 1.005 nmol/L bzw. 5.981 ± 2.393 nmol/L; T-CDCA: 2.871 ± 767 nmol/L bzw. 7.149 ± 2.761 nmol/L) und 12 h (T-DCA: 2.096 ± 1.314 nmol/L bzw. 4.565 ± 5.104 nmol/L; T-CDCA: 3.646 ± 1.938 nmol/L bzw. 5.363 ± 7.303 nmol/L) nach PHx eher verminderte Werte im Serum von WT Tieren im Vergleich zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. Bei T-CA (**Abb. 4.9B**) ist das Vorkommen im Serum erst 6 h nach PHx in WT Tieren gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erniedrigt (279.987 ± 145.416 nmol/L bzw. 429.567 ± 142.081 nmol/L), sinkt dann wieder und ist 12 h nach PHx gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöht (410.383 ± 292.362 nmol/L bzw. 226.946 ± 128.918 nmol/L). 24 h und 48 h nach PHx zeigen sowohl WT als auch $LT\beta R^{-/-}$ Tiere einen Abfall in den GS an, wobei dieser in WT Tieren deutlich stärker im Vergleich zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist. 240 h nach PHx sinken die GS in Serum beider Genotypen soweit, dass sie annähernd ihren Ausgangswert erreichen. Bei CDCA, LCA, T-LCA und LCAS (**Abb. 4.9E und G-I**) zeigt sich ein umgekehrter Verlauf. Beide Genotypen zeigen bereits im nicht operierten Zustand relativ hohe Werte, fallen jedoch 6 h und 12 h postoperativ sehr stark bei LCA, T-LCA und LCAS ab (6 h - LCA: 22 ± 5 nmol/L bzw. 18 ± 1 nmol/L; T-LCA: 23 ± 9 nmol/L bzw. 22 ± 4 nmol/L; LCAS: 6 ± 0 nmol/L bzw. 5 ± 1 nmol/L; 12 h - LCA: 17 ± 4 nmol/L bzw. 18 ± 1 nmol/L; T-LCA: 16 ± 7 nmol/L bzw. 20 ± 21 nmol/L; LCAS: 6 ± 0 nmol/L bzw. 4 ± 3 nmol/L) bzw. steigen bei CDCA (6 h - 127 ± 79 nmol/L bzw. 87 ± 70 nmol/L; 12 h - 176 ± 98 nmol/L bzw. 176 ± 213 nmol/L) an. 24 h nach PHx steigen die Werte wieder annähernd auf das Level nicht operierter WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere an, mit Ausnahme von LCAS, welches in beiden Genotypen nur minimal ansteigt (86 ± 5 nmol/L bzw. 5 ± 1 nmol/L). Die Werte für LCA und LCAS sind dabei in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren signifikant gegenüber WT Tieren erhöht (LCA - 152 ± 13 nmol/L bzw. 87 ± 15 nmol/L, p = 0,0054; LCAS - 139 ± 7 nmol/L bzw. 86 ± 5 nmol/L, p = 0,0004). Daraufhin erfolgt 48 h nach PHx ein erneuter starker Abfall, der auch noch 240 h nach PHx gegeben ist.

Insgesamt gibt es nach PHx in beiden Genotypen eine differentielle Regulierung der Gallensalze im Serum. Diese scheint in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren dereguliert zu sein. Beide Genotypen zeigen 6 h nach PHx einen schnellen und deutlichen Anstieg der GS im Serum, wobei die Erhöhung der GS in WT Tieren stärker ist. Während es 12 h nach PHx in WT Tieren zu einem weiteren Anstieg der GS kommt, der 24 h nach PHx wieder abfällt, zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tieren bereits 12 h nach PHx ein Sinken der GS im Serum. Es zeigt sich jedoch, dass diese deutlich langsamer als in den WT Tieren abfallen und daher länger im Serum akkumulieren. Zusätzlich zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere 24 h post PHx eine Erhöhung des toxischen LCA.

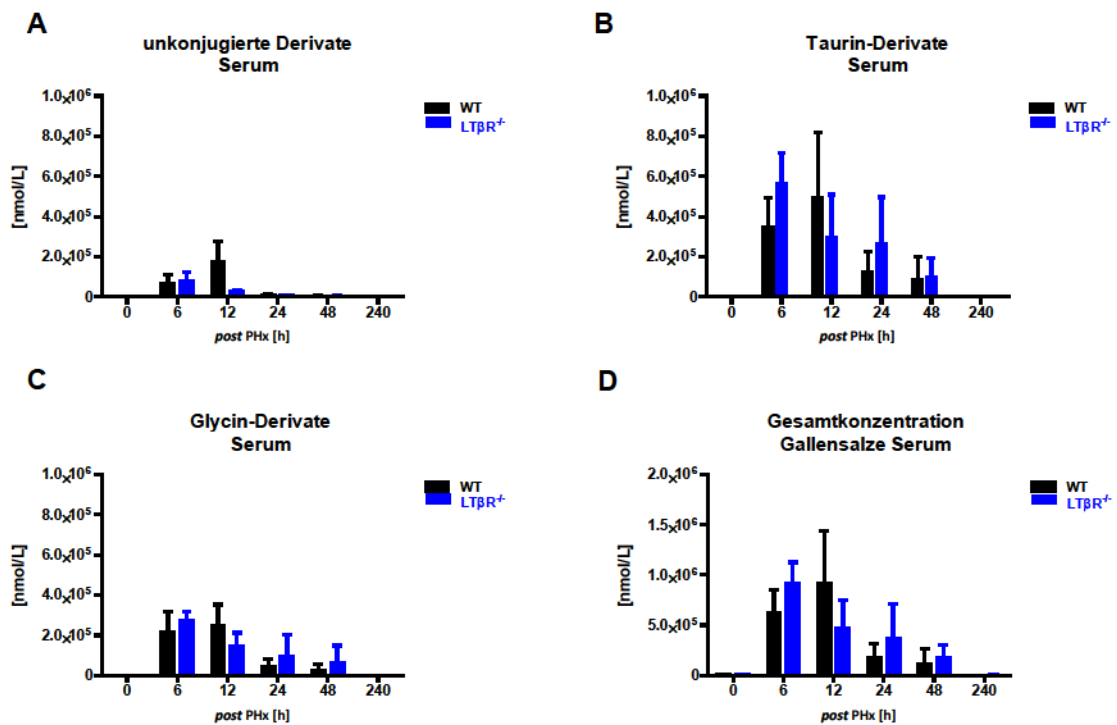


Abb. 4.8 A-D: GS Konzentrationen im Serum von WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, nicht operiert und zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h nach PHx. Konzentration (A) unkonjugierter GS (B) T-konjugierter GS und (C) G-konjugierter GS. (D) GS Gesamtkonzentration. WT Tiere sind in schwarz und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau dargestellt. (n = 3, Anzahl der Versuchsdurchführungen; h = Stunden)

Serum

		post PHx [h]					
Gallensalze [nmol/L]		0	6	12	24	48	240
Unkonjugiert	WT	1.758,0	65.396,0	175.610,0	6.796,0	3.512,0	582,0
	$LT\beta R^{-/-}$	1.442,0	79.473,0	30.577,0	10.805,0	5.206,0	919,0
T-konjugiert	WT	407,0	347.775,0	492.326,0	120.978,0	83.467,0	623,0
	$LT\beta R^{-/-}$	530,0	564.768,0	297.410,0	263.520,0	139.318,0	474,0
G-konjugiert	WT	811,0	212.355,0	242.734,0	44.313,0	23.586,0	63,0
	$LT\beta R^{-/-}$	714,0	270.600,0	144.430,0	92.733,0	34.912,0	62,0

Tab. 4.2: Konzentrationen unkonjugierter, T- und G-konjugierter GS im Serum von WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, nicht operiert und zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h nach PHx. WT Tiere sind in schwarz und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau dargestellt. Werte sind als Mittelwert aus n = 3 (Anzahl der Versuchsdurchführungen) angegeben.

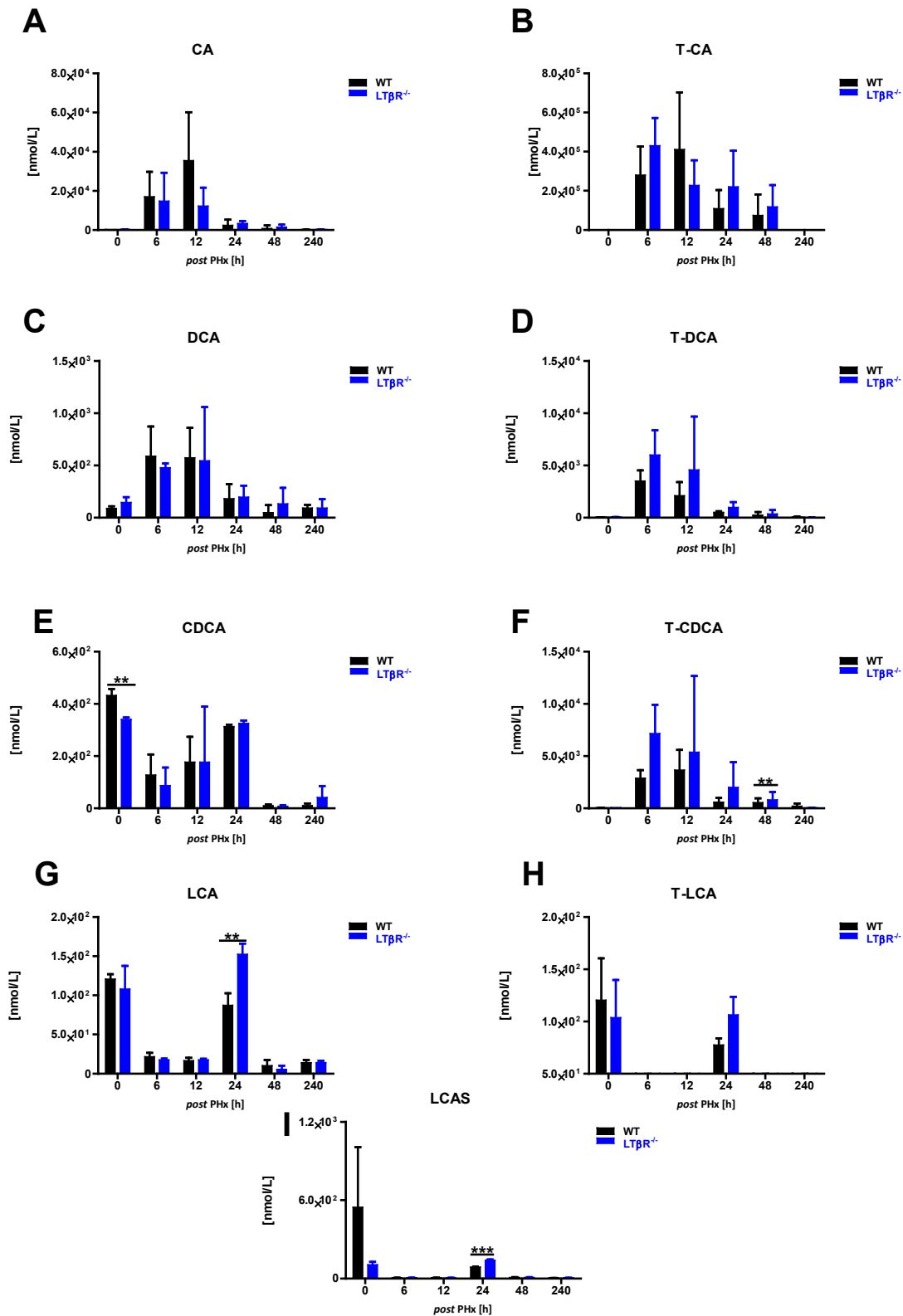


Abb. 4.9 A-I: Konzentration ausgewählter GS im Serum von WT und LTβR^{-/-} Tieren, nicht operiert und zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h nach PHx. (A) CA (B) T-CA (C) DCA (D) T-DCA (E) CDCA (F) T-CDCA (G) LCA (H) T-LCA (I) LCAS. WT Tiere sind in schwarz und LTβR^{-/-} Tiere in blau dargestellt. Eine Liste der Abkürzungen aller GS sind dem Anhang beigefügt. (n = 3, Anzahl der Versuchsdurchführungen; h = Stunden; **p < 0,005; ***p < 0,0005)

4.6.2 Analyse der Gallensalze in der Leber

Eine Analyse der GS-Konzentrationen in der Leber zeigt bereits in nicht operierten WT Tieren gegenüber nicht operierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöhte Gesamt GS Werte (220 ± 79 nmol/L bzw. 150 ± 26 nmol/L; **Abb. 4.10 D**), für die hauptsächlich die unkonjugierten GS verantwortlich sind ($58 \pm 34,9$ nmol/L bzw. $33 \pm 14,7$ nmol/L; **Abb. 4.10 A**). 6 h postoperativ ist ein erheblicher Anstieg der GS-Gesamtkonzentration in beiden Genotypen erkennbar (WT: 190.792 ± 226.495 nmol/L; $LT\beta R^{-/-}$: 434.605 ± 493.195 nmol/L). Für die fast doppelt so hohen Werte der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere sind die T- und G-konjugierten Derivate verantwortlich (2fach bzw. 7fach erhöht), die unkonjugierten GS in WT Tieren sind gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren leicht erhöht (20.118 ± 16.479 nmol/L bzw. 17.734 ± 17.059 nmol/L; **Tab. 4.3 und Abb. 4.10 B-D**). Während die Gesamtkonzentration der GS in WT Tieren 12 h nach PHx weiter ansteigt (663.995 ± 260.814 nmol/L), sinken die GS in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren schon wieder ab (172.418 ± 178.269 nmol/L). Unkonjugierte sowie T-konjugierte GS der WT Tiere sind dabei signifikant gegenüber den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöht (unkonj. GS - 32.919 ± 5.071 nmol/L bzw. 9.684 ± 8.298 nmol/L; $p = 0,029$; T-konj. GS - 409.665 ± 140.341 nmol/L bzw. 56.820 ± 14.762 nmol/L; $p = 0,0465$). Wohingegen 24 h *post PHx* die Werte der WT Tiere auf die Kontrollwerte absinken, weisen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere signifikant erhöhte GS-Gesamtwerte im Vergleich zu den WT Tieren auf (2.028 ± 240 nmol/L bzw. 135 ± 131 nmol/L; $p = 0,0022$). Der signifikante Unterschied zwischen WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 24 h nach PHx zeigt sich dabei sowohl in den unkonjugierten sowie T-konjugierten GS (unkonj. GS - 48 ± 38 nmol/L bzw. 280 ± 39 nmol/L; $p = 0,001$; T-konj. GS - 146 ± 92 nmol/L bzw. 1.435 ± 182 nmol/L; $p = 0,004$). 48 h nach PHx steigt die GS-Gesamtkonzentration in beiden Genotypen wieder mäßig an. Die GS-Konzentration der WT Tiere ist dabei signifikant gegenüber den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöht (43.217 ± 5.267 nmol/L bzw. 7.899 ± 1.416 nmol/L; $p = 0,0004$; **Abb. 4.10 D**). Auch in den unkonjugierten, sowie T- und G-konjugierten GS zeigt sich der signifikante Unterschied zwischen WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 48 h nach PHx (unkonj. GS: 4.162 ± 1.254 nmol/L bzw. 1.267 ± 569 nmol/L; $p = 0,0219$; T-konj. GS: 29.153 ± 4.838 nmol/L bzw. 6.192 ± 1.101 nmol/L; $p = 0,0013$; G-konj. GS: 9.901 ± 2.915 nmol/L bzw. 440 ± 418 nmol/L; $p = 0,0308$; **Abb. 4.10 A-C**). Zehn Tage nach PHx kommt es zu einem erneuten Anstieg der GS-Gesamtkonzentration in beiden Genotypen. Hierbei ist der Anstieg in den WT Tieren nur minimal (62.982 ± 20.289 nmol/L), wohingegen der Anstieg der GS in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren markanter ist (81.259 ± 8.111 nmol/L). Unkonjugierte sowie T-konjugierte GS sind in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gegenüber WT Tieren erhöht (unkonj. GS: 11.146 ± 5.337 nmol/L bzw. 4.731 ± 1728 nmol/L; T-konj. GS: 68.172 ± 5.879 nmol/L bzw. 55.500 ± 18.796 nmol/L). Gegensätzlich verhalten sich die Werte der G-konjugierten GS, die in den WT Tieren signifikant gegenüber den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöht sind (2.669 ± 294 nmol/L; $LT\beta R^{-/-}$: 1.773 ± 144 nmol/L; $p = 0,006$). Insgesamt zeigt sich, dass beide Genotypen auch 10 Tage nach PHx deutlich erhöhte Werte gegenüber den nicht operierten Tieren aufweisen (**Tab. 4.3**).

Für eine genauere Analyse des GS-Profiles wurden die quantitativ prominentesten GS (CA, T-CA, DCA, T-DCA, CDCA, T-CDCA, LCA, T-LCA und LCAS) separat dargestellt (**Abb. 4.11 A-I**). Tendenziell steigen in WT Tieren und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 6 h und 12 h nach PHx viele GS an. Beide Genotypen zeigen 6 h nach PHx eine Erhöhung von CA und T-CA (**Abb. 4.11 A und B**), die 12 h nach PHx deutlich in WT Tieren erhöht sind und sich signifikant von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren unterscheiden (CA: 5.866 ± 1.504 nmol/L bzw. 182 ± 240 nmol/L; $p = 0,0151$; T-CA: 341.450 ± 125.569 nmol/L bzw. 26.562 ± 10.804 nmol/L; $p = 0,0438$). Hingegen sind DCA, T-DCA, CDCA, T-CDCA, LCA, T-LCA und LCAS im Vergleich zu WT Tieren in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöht (**Abb. 4.11 C-I**). Insbesondere T-LCA (**Abb. 4.11 H**) ist 6 h nach PHx signifikant in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gegenüber WT Tieren erhöht ($83 \pm 15,3$ nmol/L bzw. $27 \pm 12,2$ nmol/L; $p = 0,0075$). Dies gilt auch für LCA (**Abb. 4.11 G**). 12 h nach PHx ($82 \pm 6,51$ nmol/L bzw. $48 \pm 1,41$ nmol/L; $p = 0,0063$). 24 h und 48 h nach PHx sinken die GS in der Leber beider Genotypen soweit, dass sie annähernd ihren Ausgangswert erreichen. Zudem sind die Werte von T-CA 24 h nach PHx in WT Tieren gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren signifikant erhöht ($1.213 \pm 139,9$ nmol/L bzw. $89 \pm 19,1$ nmol/L; $p = 0,041$; **Abb. 4.11 B**). Auch 48 h nach PHx weisen WT Tiere ein signifikant erhöhtes T-CA gegenüber den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren auf (23.893 ± 3.799 nmol/L bzw. 4.682 ± 726 nmol/L; $p = 0,040$). Die Werte von CA sowie T-CDCA sind 48 h nach PHx signifikant in WT Tieren gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöht (CA: 594 ± 190 nmol/L bzw. $143 \pm 64,5$ nmol/L; $p = 0,0179$; T-CDCA: 611 ± 212 nmol/L bzw. $202 \pm 64,5$ nmol/L; $p = 0,0332$; **Abb. 4.11 A und F**). Überraschenderweise zeigen sowohl WT als auch $LT\beta R^{-/-}$ Tiere 240 h nach PHx einen erneuten Anstieg bei den Leber-GS an, wobei der Anstieg von CDCA, T-CDCA und LCA in WT Tieren niedriger im Vergleich zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist (**Abb. 4.11 E-G**).

Zusammenfassend gibt es nach PHx auch in der Leber beider Genotypen eine differentielle Regulierung der GS, wobei diese in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren dereguliert zu sein scheint. 6 und 12 h nach PHx zeigen beide Genotypen einen erheblichen Anstieg in der GS-Gesamtkonzentration in der Leber. Bei den in den WT Tieren erhöhten GS handelt es sich überwiegend um hydrophile 3OH-GS (CA, T-CA), dagegen zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere vermehrt hydrophobere 2OH- und OH-GS (HDCA, DCA, CDCA bzw. LCA und ihre Konjugate). Wohingegen 24 h post PHx die GS Werte der WT Tiere absinken, weisen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere noch immer signifikant erhöhte GS Gesamtwerte auf. Interessanterweise kommt es in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 6 h postoperativ zu einem deutlichen Anstieg des toxischen LCA und T-LCA, was durch das erhöhte T-CDCA verursacht sein könnte.

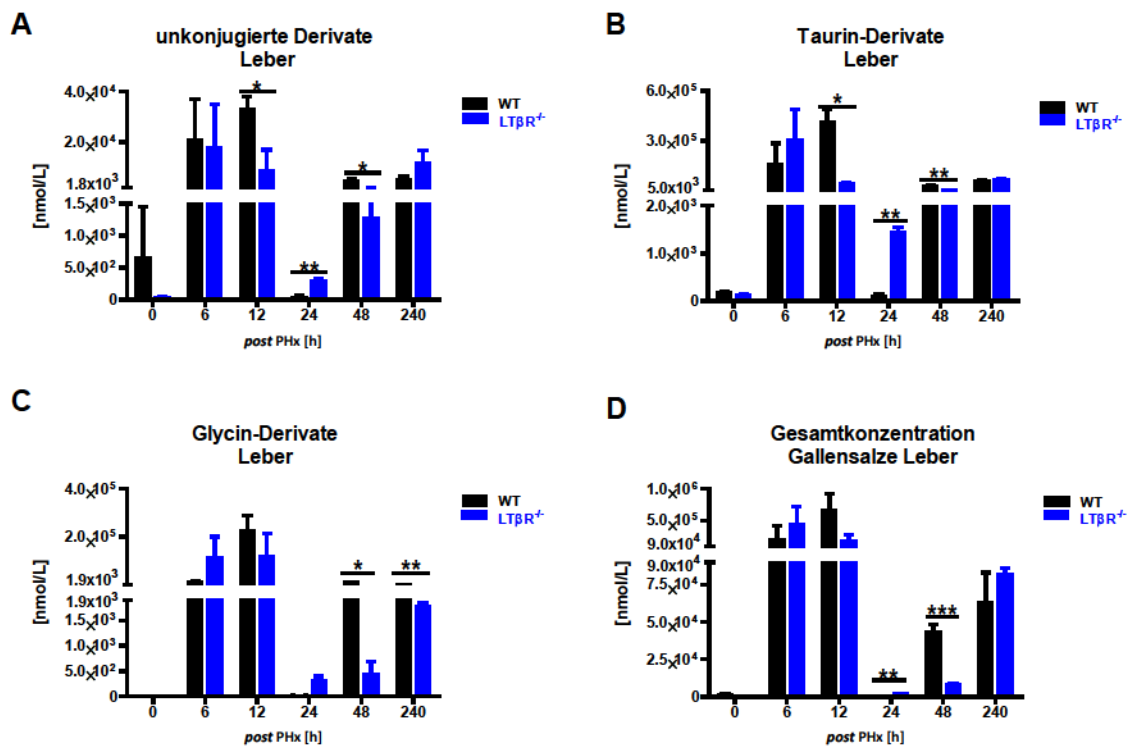


Abb. 4.10 A-D: GS Konzentrationen in der Leber von WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, nicht operiert und zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h nach PHx. Konzentration (A) unkonjugierter GS (B) Konzentration T-konjugierter GS (C) Konzentration G-konjugierter GS. (D) GS-Gesamtkonzentration. WT Tiere sind in schwarz und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau dargestellt. (n = 3, Anzahl der Versuchsdurchführungen; h = Stunden; *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005)

Leber

		post PHx [h]					
Gallensalze [nmol/L]		0	6	12	24	48	240
Unkonjugiert	WT	58,0	20.118,0	32.919,0	48,0	4.162,0	4.731,0
	$LT\beta R^{-/-}$	33,0	17.734,0	9.684,0	280,0	1.267,0	11.146,0
T-konjugiert	WT	161,0	159.011,0	409.665,0	146,0	29.153,0	55.500,0
	$LT\beta R^{-/-}$	117,0	301.743,0	56.820,0	1.435,0	6.192,0	68.172,0
G-konjugiert	WT	1,0	16.617,0	221.428,0	8,0	9.901,0	2.669,0
	$LT\beta R^{-/-}$	0,0	115.070,0	118.404,0	313,0	440,0	1.773,0

Tab. 4.3: Gesamtkonzentrationen unkonjugierter, T- und G-konjugierter GS in der Leber von WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, nicht operiert und zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h nach PHx. WT Tiere sind in schwarz und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau dargestellt. Werte sind als Mittelwert aus n = 3 (Anzahl der Versuchsdurchführungen) angegeben.

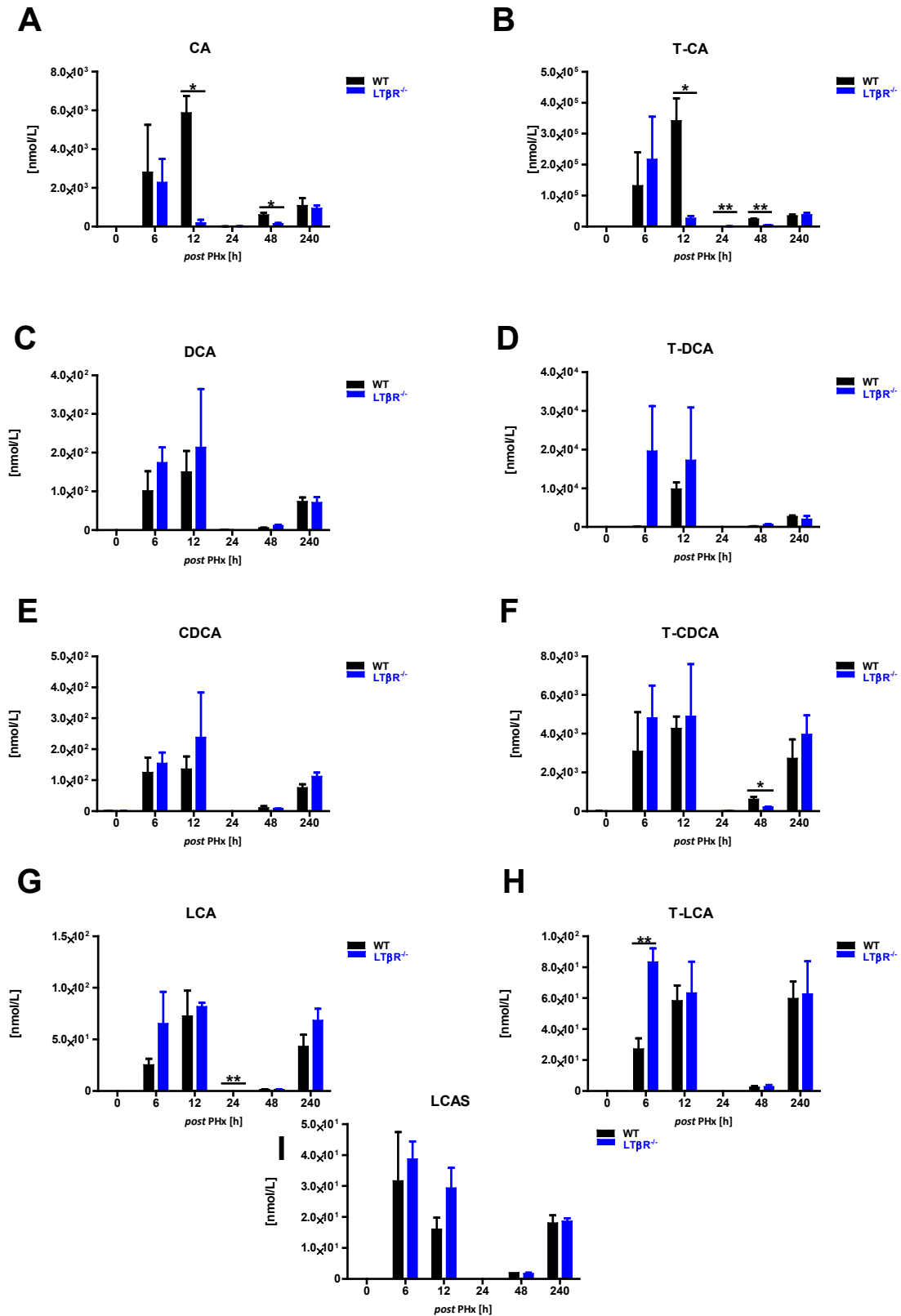


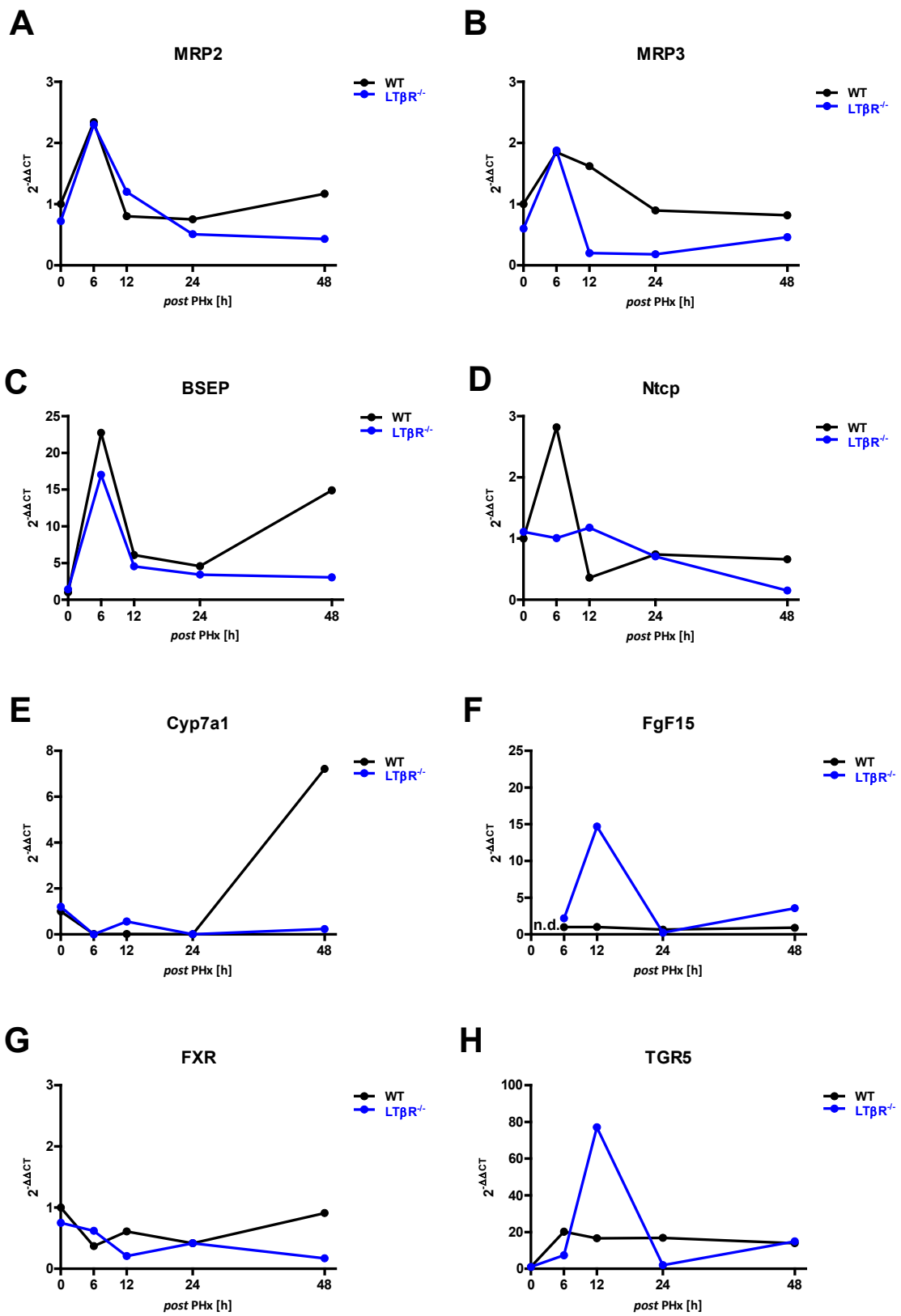
Abb. 4.11 A-I: Konzentration ausgewählter GS in der Leber von WT und LTβR^{-/-} Tieren, nicht operiert und zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 240 h nach PHx. (A) CA (B) T-CA (C) DCA (D) T-DCA (E) CDCA (F) T-CDCA (G) LCA (H) T-LCA (I) LCAS. WT Tiere sind in schwarz und LTβR^{-/-} Tiere in blau dargestellt. Eine Liste der Abkürzungen aller GS ist dem Kap. 1.2.7 zu entnehmen. (n = 3, Anzahl der Versuchsdurchführungen; h = Stunden; *p < 0,05; **p < 0,005)

4.6.3 Analyse der Gallensalzregulation in der Leber auf Genexpressionsebene

In diesem Versuchsteil wurde RNA aus den Lebern von nicht operierten und partiell hepatektomierten Tieren beider Genotypen (WT bzw. $LT\beta R^{-/-}$) zu 4 verschiedenen Zeitpunkten nach PHx (6 h, 12 h, 24 h und 48 h) isoliert (Kap. 3.3.2.1) und eine quantitative Real-Time PCR (Kap. 3.3.2.4) für ausgewählte, im enterohepatischen Kreislauf relevanten, Gene durchgeführt (**Abbildungen 4.12 A-H**). BSEP (*Bile Salt Export Pump*) und MRP2 (*Multidrug Resistance Protein 2*) exportieren konjugierte GS aktiv aus dem Hepatozyten apikal in die Kanalikuli (Keitel et al., 2008; Song et al., 2008; Trauner and Boyer, 2003). Insgesamt weist die Expression beider Proteine (**Abb. 4.12 A und C**) in partiell hepatektomierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren bis 24 h postoperativ keine charakteristischen Unterschiede zu WT Tieren auf. Dabei zeigen WT Tiere 6 h nach PHx eine 23-fache Induktion der Expression von BSEP und eine 2,5-fache Induktion von MRP2, wohingegen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine 16-fache Induktion in der BSEP mRNA und ebenfalls eine 2,5-fache Induktion der MRP2 mRNA aufweisen. Allerdings zeigen WT Tiere 48 h nach PHx eine deutliche Erhöhung der BSEP Expression (15-fach), die in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nicht zu sehen ist. Die MRP2 Expression ist 48 h nach PHx in den WT Tieren gegenüber den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ebenfalls erhöht. BSEP wird von FXR (Farnesoid-X-Rezeptor) positiv reguliert. Allerdings erfolgt die Regulierung der FXR-Aktivität nicht über die Expression (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000), so dass es kein Widerspruch ist, dass für beide Genotypen nach PHx keine differentielle Regulierung der FXR Expression auf mRNA Ebene gefunden wurde (**Abb. 4.12 G**). Bei MRP3 (*Multidrug Resistance Protein 3*) handelt es sich um einen basolateralen Transporter, der ATP-abhängig überwiegend konjugierte GS aus dem Hepatozyten in die Portalvene transportiert und damit erhöhte, d.h. potenziell toxische GS-Spiegel im Hepatozyten vermindert (Zelcer et al., 2006). Die Expression von MRP3 (**Abb. 4.12 B**) lässt auf RNA-Ebene bei $LT\beta R^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu WT Tieren eine differentielle Regulation erkennen. In WT Tieren kommt es 6 h nach PHx erst zu einem 2-fachen Anstieg in der MRP3 mRNA, 12 h und 24 h nach PHx wird die Expression langsam reduziert und zeigt 48 h nach PHx eine Expression vergleichbar mit nicht operierten WT Tieren. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigen 6 h nach PHx einen vergleichbaren Anstieg der MRP3 mRNA (2-fach). 12 h und 24 h nach PHx kommt es allerdings zu einer deutlich reduzierten Expression von MRP3, die erst 48 h nach PHx wieder langsam auf das Niveau der nicht operierten Tiere ansteigt. WT Tiere zeigen 6 h nach PHx eine deutliche, 3-fache Induktion der Ntcp (*Natrium-taurocholate-cotransporting-polypeptide*) Expression (**Abb. 4.12 D**), das weist auf eine frühe und effiziente Gallensalzextraktion aus der Portalvene hin (Keitel et al., 2008; Li and Chiang, 2012; Trauner and Boyer, 2003). $LT\beta R^{-/-}$ Tiere hingegen zeigen 6 h und 12 h nach PHx keinen Anstieg der Ntcp Expression und weisen darüber hinaus 24 h bzw. 48 h nach PHx eine deutlich reduzierte Expression von Ntcp auf. TGR5 (*G-protein-coupled bile acid receptor; Gpbar-1*) ist ein ist ein Membran-gebundener GS-Rezeptor, der ein wichtiger Regulator der Gallensalzhomöostase ist und vor einem GS Überschuss nach einer PHx

schützt (Pean et al., 2013). WT Tieren zeigen postoperativ (6 h bis 48 h) eine 20-fache Induktion der TGR5 Expression, dagegen lassen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere 12 h *post PHx* einen deutlich stärkeren, 80-fachen Anstieg der TGR5 Expression erkennen (**Abb. 4.12 H**). Cyp7A1 (Cholesterin-7 α -Hydroxylase) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der *de novo* Gallensalz Synthese aus Cholesterin (Keitel et al., 2008; Trauner and Boyer, 2003; Uriarte et al., 2013). Die Cyp7A1 Expression ist in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren bis einschließlich 48 h *post PHx* nicht erhöht, steigt aber in den WT Tieren 48 h *post PHx* um das 7-fache stark an (**Abb. 4.12 E**). FgF15, das in cholestatischen Lebern häufig erhöht vorliegt, hemmt die Expression von Cyp7a1 (Keitel et al., 2008; Uriarte et al., 2013). FgF15 ist in beiden Genotypen in den nicht operierten Kontrolltieren nicht nachweisbar. Wohingegen eine Erhöhung der Expression von FgF15 in WT Tieren fehlt, was den beschriebenen Anstieg der Cyp7A1 Expression in diesem Genotypen erklären könnte, zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere einen 15-fachen Anstieg der FgF15 mRNA 12 h *post PHx*, einen Abfall der FgF15 Expression 24 h nach PHx und einen geringeren, 3-fachen Anstieg 48 h nach PHx (**Abb. 4.12 F**). Diese vergleichsweise hohe FgF15 Expression könnte die fehlende Cyp7A1 Expression in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erklären. Zusätzlich wurden Cholangiozyten nicht operierter Tiere beider Genotypen isoliert, kultiviert und die Expression von TGR5, FXR, MRP2 und $LT\beta R$ mittels qRT-PCR analysiert (**Abb. 4.12 I-L**). Sowohl TGR5 (**Abb. 4.12 I**) als auch FXR (**Abb. 4.12 J**) werden in beiden Genotypen exprimiert, allerdings zeigen Cholangiozyten von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gegenüber WT Tieren eine 4-fache höhere Expression von TGR5 sowie eine 5-fache höhere Expression von FXR. Dagegen ist die Expression von MRP3 in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu WT Tieren leicht vermindert (**Abb. 4.12 K**). Zusätzlich ist eine Expression des $LT\beta R$ auf kultivierten Cholangiozyten von WT Tieren vorzufinden, die, wie erwartet, in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nicht gegeben ist (**Abb. 4.12 L**).

Insgesamt zeigt eine Analyse der Expression von für den enterohepatischen Kreislauf relevanten Transportern nach PHx eine differentielle Regulation in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. Der Export der GS aus dem Hepatozyten über BSEP und MRP2 scheint in beiden Genotypen stattzufinden. Allerdings zeigen WT Tiere 48 h nach PHx eine weitere Erhöhung der BSEP Expression, die in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nicht zu beobachten ist. Auffällig ist die Expression von MRP3 12 h und 24 h nach PHx, die in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gegenüber WT Tieren deutlich reduziert ist. Demnach scheinen die Hepatozyten der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere nicht in der Lage zu sein, GS mit der gleichen Effizienz basolateral über MRP3 auszuschleusen wie WT Hepatozyten. Zudem zeigen WT Tiere 6 h nach PHx eine deutliche Induktion der Ntcp Expression, die in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nicht vorzufinden ist. Darüber hinaus kommt es ausschließlich in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren postoperativ zu einer Induktion der FgF15 und TGR5 Expression die zu einer Inhibition der Cyp7a1 mRNA führen könnte.



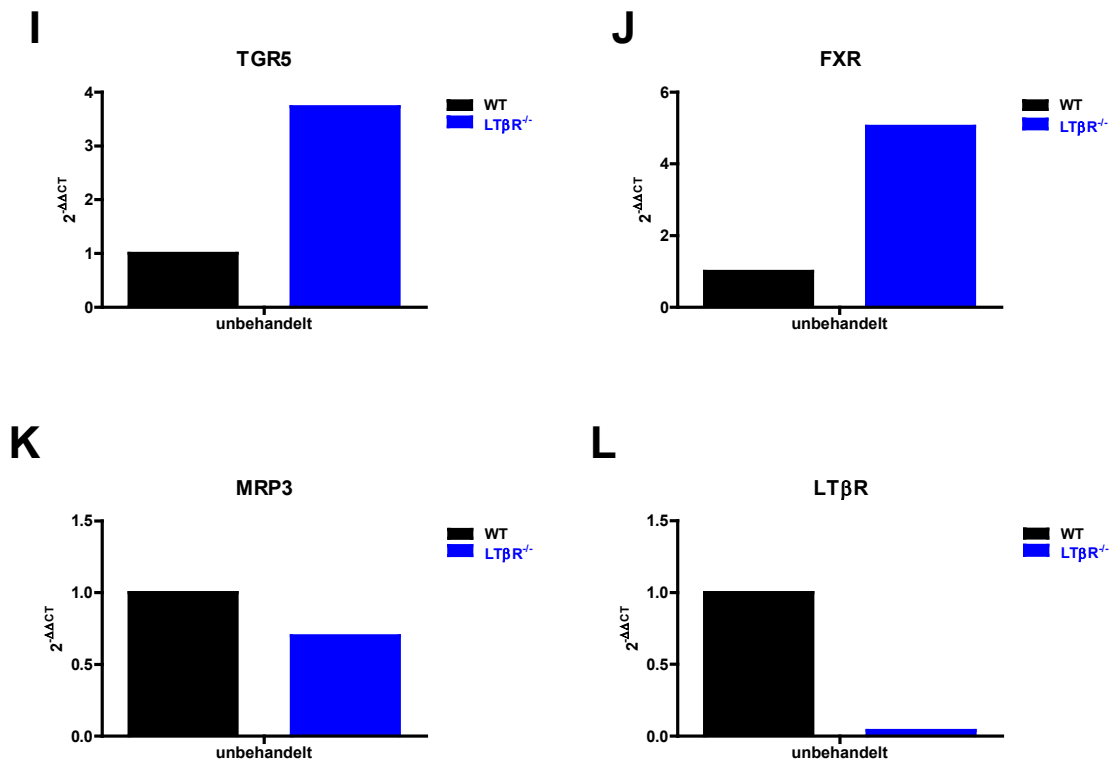


Abb. 4.12 A-H: Genexpression von Gallensalz-Transportern, Enzymen und Rezeptoren in WT und LTβR^{-/-} Tieren, unbehandelt, nach partieller Hepatektomie und *in vitro* Kultur. Die relative Genexpression der WT Tiere ($2^{-\Delta\Delta CT}$) wurde nach Schein-OP als '1' definiert und alle Genexpressionswerte auf diesen Wert bezogen. Werte < 1 stehen für eine verminderte und Werte > 1 für eine erhöhte Genexpression. Die Abbildungen zeigen den $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert der Expression von (A) MRP2 (B) MRP3 (C) BSEP (D) Ntcp (E) Cyp7a1 (F) Fgf15 (G) FXR und (H) TGR5 in der Leber. (I-L): Genexpression von (I) TGR5 (J) FXR (K) MRP3 und (L) LTβR auf isolierten und kultivierten Cholangiozyten von WT und LTβR^{-/-} Tieren. WT Tiere sind in schwarz und LTβR^{-/-} Tiere in blau dargestellt. (n = 3; jeweils Triplikate)

4.7 Histopathologie der regenerierenden Leber nach PHx

Mitglieder der TNF Liganden und Rezeptor Superfamilien sind funktionell an der Organogenese sekundärer lymphatischer Organe beteiligt. LTβR-defiziente Mäuse besitzen keinerlei periphere oder mesenteriale Lymphknoten oder Peyer'sche Plaques. Zudem weisen sie erhebliche Lymphozyteninfiltrationen um perivaskuläre Areale der Lunge, der Leber, des Pankreas, der *Glandula submandibularis*, im Fettgewebe und den Nieren auf und zeigen eine größtenteils zerstörte Milzarchitektur (*Fu and Chaplin, 1999; Futterer et al., 1998*). TNFRp55-defiziente Mäuse hingegen besitzen intakte Lymphknoten, jedoch keine Peyer'sche Plaques und zeigen ebenfalls Missbildungen in ihrer Milzarchitektur (*Koni et al., 1997; Neumann et al., 1996*). Aufgrund dieser Entwicklungsdefekte wurden histologische Untersuchungen der Leber vor und nach partieller Hepatektomie (12 h, 24 h und 48 h *post PHx*) durchgeführt. Es wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen, TUNEL-Färbungen, sowie Giemsa-, Elastika van Giesson- und PAS-Färbungen durchgeführt (*Kap. 3.1.4.3*).

Im Fokus der folgenden Analyse steht die HE-Färbung und ergänzend die TUNEL-Färbung, da die weiteren Färbungen keine eindeutigen Rückschlüsse auf einen $LT\beta R$ -spezifischen Phänotyp nach partieller Hepatektomie ergeben (Daten im Anhang „nicht gezeigte Daten“). Zur Quantifizierung morphologischer Unterschiede wurde ein Scoring etabliert (**Tab. 4.4**). Beim Vergleich der Leberarchitektur nicht operierter WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere fallen zunächst die für den $LT\beta R$ Phänotypen charakteristischen Lymphozyteninfiltrate auf (**Abb. 4.13 A und B**). Weitere morphologische Unterschiede zeigen sich überdies in den $LT\beta R^{-/-}$ Lebern, die im Gegensatz zur WT Leber punktuell extramedulläre Hämatopoese aufweisen (**Abb. 4.13 B**). Zudem scheint der Feinbau der Leber in diesen $LT\beta R$ -defizienten Tieren gestört, da die Sinusoide stark erweitert sind und eine Hyperzellularität aufweisen. Die TUNEL-Färbung (**Abb. 4.13 A und B**) ist hierbei in beiden Genotypen unauffällig. Eine Analyse nach partieller Hepatektomie zeigt 12 h *post PHx* eine verminderte Lymphozyteninfiltration in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren (**Abb. 4.13 D**). Beide Genotypen lassen Fettvakuolen in den Hepatozyten erkennen. Überdies ist eine Vergrößerung der parenchymalen Zellen zu erkennen und eine TUNEL-Färbung (**Abb. 4.13 C und D**) lässt erste TUNEL-positive Areale in beiden Genotypen erkennen. **Abbildungen 4.13 E und F** zeigen, dass 24 h nach PHx noch immer eine Vergrößerung der Hepatozyten bzw. der Nuklei mit vereinzelt Mitosen in WT sowie $LT\beta R^{-/-}$ Lebern zu erkennen ist. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere weisen darüber hinaus erweiterte Lymphgefäße auf, die mit ödematösen Veränderungen um die Portalfelder einhergehen, und zeigen zudem Gewebslücken („*hepatocyte dropouts*“) die durch Ansammlungen von Zelltrümmern charakterisiert sind (Daten nicht gezeigt). Beide Genotypen sind in der HE- sowie TUNEL-Färbung durch Mikroinfarkte gekennzeichnet, wobei sich die nekrotischen Areale in ihrer Größe und der Häufigkeit des Auftretens zwischen beiden Genotypen deutlich unterscheiden (**Abb. 4.13 E und F**): Im Gegensatz zu WT Tieren zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere doppelt so viele Nekrosen, einen moderaten Anstieg an Lymphozyteninfiltraten und einen moderaten Anstieg an Fettvakuolen in den Hepatozyten (**Tab. 4.4**). 48 h nach PHx lassen WT Tiere eine beinahe wiederhergestellte Lebermorphologie, vergleichbar zu nicht operierten Tieren, erkennen (**Abb. 4.13 G**). Im Gegensatz dazu weisen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere noch immer vermehrt Nekrosen auf (**Abb. 4.13 H**) und zeigen weiterhin Fettvakuolen in den Hepatozyten. Eine TUNEL-Färbung (**Abb. 4.13 G und H**) ist zu diesem Zeitpunkt in beiden Genotypen unauffällig.

Grundsätzlich weisen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere bereits im nicht operierten Zustand eine veränderte, durch Lymphozyteninfiltrate und extramedulläre Hämatopoese gekennzeichnete Leber auf. Im Laufe der Leberregeneration nach PHx kommt es zu massiven Veränderungen der Lebermorphologie, die durch eine Hyperzellularität und Fettvakuolen in den Hepatozyten bzw. Nekrosen und TUNEL-positive Areale in beiden Genotypen begleitet wird. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigen dabei im Vergleich zu WT Tieren einen erheblichen Anstieg im Ausmaß und der Anzahl von Nekrosen bzw. lassen auch durch das Auftreten

von erweiterten Lymphgefäßen und ödematösen Veränderungen deutliche Unterschiede zum Wildtypen erkennen.

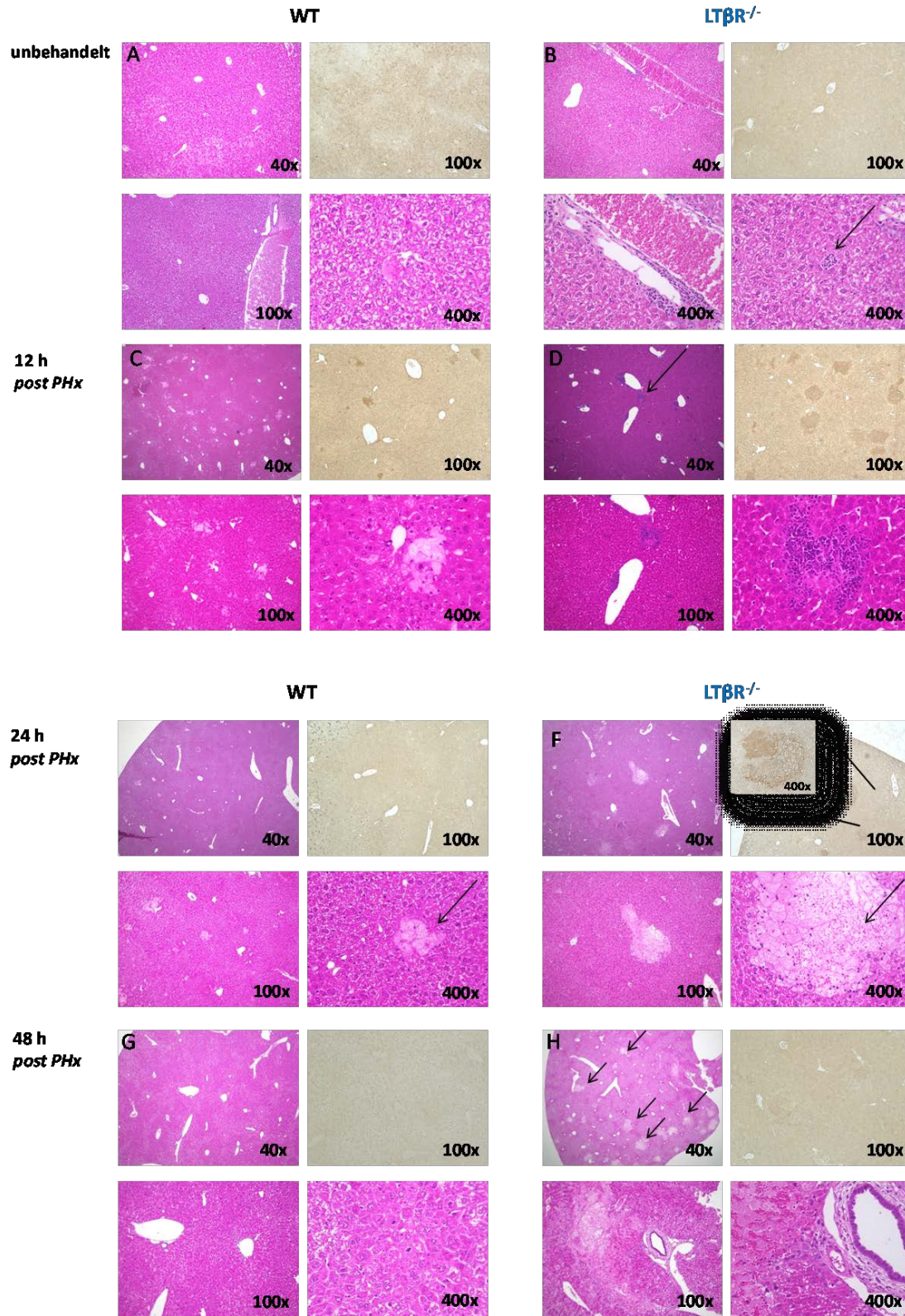


Abb. 4.13 A-H: HE- und TUNEL-Färbung vor und 12 h, 24 h und 48 h nach PHx in WT und LTβR^{-/-} Tieren. (A) WT nicht operiert (B) LTβR^{-/-} nicht operiert (C) WT 12 h nach PHx (D) LTβR^{-/-} 12 h nach PHx (E) WT 24 h nach PHx (F) LTβR^{-/-} 24 h nach PHx (G) WT 48 h nach PHx (H) LTβR^{-/-} 48 h nach PHx. Der Pfeil in (B) zeigt eine extramedulläre Hämatopoese, der Pfeil in (D) zeigt exemplarisch eine Lymphozyteninfiltration und die Pfeile in (E), (F) und (H) zeigen Nekrosen. TUNEL-Färbungen befinden sich jeweils rechts oben. (Vergrößerungen wie angegeben)

Histologische Leberparameter		<i>post PHx</i>			
		Kontrolle	12h	24h	48h
Hämorrhagische Areale	WT	1	7	6	7
	LT β R ^{-/-}	2	5	13	14
Lymphozyten Infiltrate	WT	-	-	-	4
	LT β R ^{-/-}	8	5	9	4
Mitosen	WT	-	-	1	5
	LT β R ^{-/-}	-	-	1	5
Hämolyse	WT	2	3	1	6
	LT β R ^{-/-}	10	5	2	9
Vakuolisierte Hepatozyten	WT	4	5	5	9
	LT β R ^{-/-}	6	4	9	5

*Score modifiziert nach (Ishak et al., 1995): 1-3 minimale, 4-8 milde, 9-12 moderate, 13-18 ernsthafte Schädigung

Tab. 4.4: Pathologische Veränderungen in der Leber vor und 12 h, 24 h und 48 h nach PHx in WT und LT β R^{-/-} Tieren. Quantifiziert wurde das Auftreten von: Nekrosen, Lymphozyteninfiltraten, Mitosen, Hämolyse und vakuolisierten Hepatozyten in jeweils 3 Schnitten pro Genotyp und Zeitpunkt nach PHx. Die Einstufung des Schweregrades pathologischer Veränderungen in der Leber erfolgte modifiziert nach (Ishak et al., 1995).

4.8 Identifizierungen von essentiellen LT β R-regulierten Genen für die Leberregeneration

4.8.1 Microarray Analyse der Genexpression in der Leber nach PHx

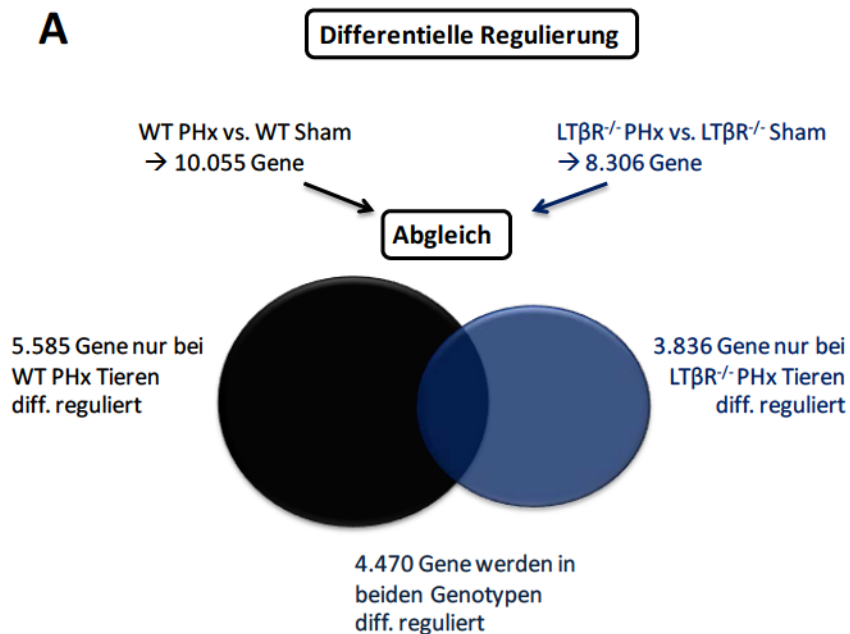
Da gezeigt wurde, dass es im Mausmodell ca. 12 h nach einer PHx zu einer Infiltration von Lymphozyten in die Leber kommt und auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiertes LT β (LT $\alpha_1\beta_2$) essentiell für eine effiziente Leberregeneration ist (Tumanov et al., 2009), wurde dieser Zeitpunkt gewählt, um Expressionsanalysen, sogenannte *Microarrays* (Kap. 3.3.2.5), von Lebern hepatektomierter LT β R^{-/-} Tiere im Vergleich zu WT Tieren durchzuführen. Dadurch sollten essentielle LT β R-regulierte Gene identifiziert werden, die an der Leberregeneration beteiligt sind.

Als Negativkontrollen dienten scheinoperierte Tiere beider Genotypen, um so mögliche Einflüsse durch die Begleitumstände der PHx (u.a. Narkose, Analgesie und Wundheilung) bzw. den operationsbedingten Stress auf die Genexpression zu eliminieren zu können. Ein erster *Microarray* (einschließlich RNA-Isolierung) wurde von einem kommerziellen Anbieter durchgeführt (*Affymetrix Whole Genome Mapping Arrays*, Miltenyi). Die bioinformatische Auswertung erfolgte in Kooperation mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum Düsseldorf (BMFZ; René Deenen). Tiere, deren RNA Probe in der Qualitätskontrolle (*Boxplot*) einen zu geringen Korrelationskoeffizienten (schlechte technische Qualität) aufwiesen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. In die bioinformatische Analyse wurden daher pro Genotyp je 6 partiell hepatektomierte Tiere und 3 scheinoperierte Tiere aufgenommen. Die Auswertung (*low level analysis*) beinhaltete die Normalisierung der Rohdaten und die Berechnung der relativen Genexpression zwischen hepatektomierten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. Als *Cutoff* wurden Änderungen in der Genexpressionsstärke um den Faktor ≥ 2 (mind. Verdopplung bzw. Halbierung) festgelegt. Identifiziert wurden insgesamt 10.055 Gene im Vergleich von scheinoperierten Wildtypen mit partiell hepatektomierten WT Tieren (**Abb. 4.14 A**). 8.306 Gene wurden im Vergleich von scheinoperierten $LT\beta R^{-/-}$ mit partiell hepatektomierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren identifiziert. Nach dem Abgleich beider Genlisten wurden 4.470 Gene identifiziert, die in beiden Genotypen differentiell reguliert wurden. 5.585 Gene sind postoperativ nur in Wildtyp Lebern differentiell reguliert und 3.836 Gene nur in $LT\beta R^{-/-}$ Lebern. Eine weitere Analyse (*high level analysis*) galt ähnlich regulierten Genen (*Cluster analysis*), Gene, die sich bestimmten funktionellen Gruppen (*Gene Ontology (GO) analysis*) und Gene die sich bekannten Signaltransduktionswegen, zuordnen lassen (*Pathway analysis*). Die *Cluster* und die *Pathway* Analyse ergaben keine auswertbaren Erkenntnisse. Die GO Analyse ergab bei den differentiell regulierten Genen (23.000 Begriffe) eine Zuordnung von 13.593 Genen zu "biologische Prozesse" (*biological process*), 1.980 Gene wurden dem GO-Begriff „zelluläre Komponente“ (*cellular component*) zugeordnet und 7.700 Gene dem Begriff "molekulare Funktionen" (*molecular function*). Dabei sind Gene, die eine Funktion in der Transkription und Genexpression bzw. in der Regulation der Transkription und Genexpression haben, nur in Wildtyp Lebern überrepräsentiert (**Abb. 4.14 B**), wohingegen Gene, die an der Regulation von metabolischen Prozessen beteiligt sind, und Gene, die eine Funktion in der Nukleotid Bindung bzw. in Organellen ausüben, in beiden Genotypen überrepräsentiert sind. Ein weiterer *Microarray* inklusive der bioinformatischen Auswertung wurde in Kooperation mit dem *Life and Medical Sciences* Institut (LIMES (Bonn); Joachim Schultze) durchgeführt. Die Auswertung des zweiten *Microarrays* erfolgte für je 5 partiell hepatektomierte Tiere und je 4 scheinoperierte Tiere beider Genotypen nach Ausschluss der technischen Versager. Änderungen in der Genexpressionsstärke um den Faktor $\geq 1,5$ wurden als relevante Änderung (*Cutoff*) festgelegt. Eine Hauptkomponentenanalyse (*PCA analysis*), welche die Dimensionalität des Datensatzes reduziert, zeigte, dass sich durch drei Variablen

(Hauptkomponenten) hepatektomierte WT Tiere deutlich von den hepatektomierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren abgrenzen lassen (**Abb. 4.14 F**). Daraufhin wurden differentiell regulierte Gene aus drei Vergleichen gegenübergestellt: WT Sham vs. WT PHx; $LT\beta R^{-/-}$ Sham vs. $LT\beta R^{-/-}$ PHx und WT PHx vs. $LT\beta R^{-/-}$ PHx). Identifiziert wurden 1.500 differentiell regulierte Gene im Vergleich von scheinoperierten WT Tieren mit partiell hepatektomierten WT Tieren (**Abb. 4.14 C**). 709 differentiell regulierte Gene konnten im Vergleich von scheinoperierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren mit partiell hepatektomierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren identifiziert werden (**Abb. 4.14 D**). Es zeigt sich jeweils deutlich, dass sich in beiden Genotypen die scheinoperierten Tiere auf Grund ihres Genexpressionsmusters deutlich von den hepatektomierten Tieren unterscheiden lassen. Ein Abgleich der Daten partiell hepatektomierter WT Tiere mit partiell hepatektomierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren identifizierte 209 differentiell regulierte Gene (**Abb. 4.14 E**), wobei die Unterscheidung der beiden Genotypen hier nicht so eindeutig ist. Ein Abgleich partiell hepatektomierter WT Tiere mit $LT\beta R^{-/-}$ Tieren identifizierte Gene, die eine Rolle in den $LT\beta R$ -vermittelten Prozessen in der Leberregeneration nach PHx einnehmen. Dieser Datensatz wurde manuell analysiert und die Gene in funktionelle Gruppen eingeteilt: Dabei wurden folgende Kriterien festgelegt: A (lila) Gene, die an der Leberregeneration beteiligt und $LT\beta R$ -unabhängig sind. B (blau) Gene, die an der Leberregeneration beteiligt und $LT\beta R$ -abhängig sind. C (gelb) Gene, die eine Funktion in der Leberregeneration ausüben und ggf. den Verlust des fehlenden $LT\beta R$ kompensieren. D (grün) Gene, die vermutlich eine Expressionsvariante in partiell hepatektomierten Tieren darstellen. E (orange) Gene, die nicht an der Leberregeneration beteiligt, aber $LT\beta R$ -abhängig sind und F (grau) Gene, die keiner direkten Gruppe zuzuordnen sind. Identifiziert wurden in der Gruppe A (lila) 388 differentiell regulierte Gene, in Gruppe B (blau) wurden 54 differentiell regulierte Gene, in Gruppe C (gelb) 8 differentiell regulierte Gene, in Gruppe D (grün) 13 differentiell regulierte Gene und in Gruppe E (orange) 117 differentiell regulierte Gene identifiziert. Darüber hinaus wurden 993 differentiell regulierte Gene in der Gruppe F (grau) identifiziert (**Abb. 4.14 G**). Gene, die am stärksten differentiell im Vergleich partiell hepatektomierter WT Tiere zu partiell hepatektomierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren exprimiert werden und der Gruppe C angehören, sind: Murinoglobulin 2 (*Mug2*) das eine 20-fache Expressionsteigerung zeigt und Aldehyd Dehydrogenase 1, Familie L1 (*Aldh1l1*) das eine 2-fache Induktion zeigt, wohingegen Diacylglycerol theta (*Dgkq*) eine 1,9-fache und *GO/G1 switch protein 2* (*GOS2*) eine 2-fache Reduktion aufweisen. Eine *Gene Ontology* (GO) Analyse der einzelnen Gruppen zeigte, dass die 35 am stärksten differentiell regulierten Gene der 54 Gene in der Gruppe B (blau) u.a den GO-Termini Metabolismus, Strukturgen, Regulator/Inhibitor, Wachstumsfaktor, Transkriptionsfaktor oder Koagulationsfaktor zugeordnet werden können. Analog können in der Gruppe C (gelb) 8 Gene den GO-Termini Metabolismus, Homöostase, Inflammation, Inhibitor oder *Signalling* zugeordnet werden. Die 5 am stärksten differentiell regulierten Gene der 13 Gene der Gruppe D (grün) können den Termini Strukturgen, Proliferation/Differenzierung oder Transport

zugeordnet werden. Eine weitere GO Analyse der Gruppe B (blau, Gene, die an der Leberregeneration beteiligt und $LT\beta R$ -abhängig sind; Daten nicht gezeigt), lässt erkennen, dass sich die überrepräsentierten GO-Termini im Bereich "biologische Prozesse" hauptsächlich dem Cholesterinmetabolismus bzw. der Fettsäure-Biosynthese, und der Regulierung der Koagulation zuordnen lassen.

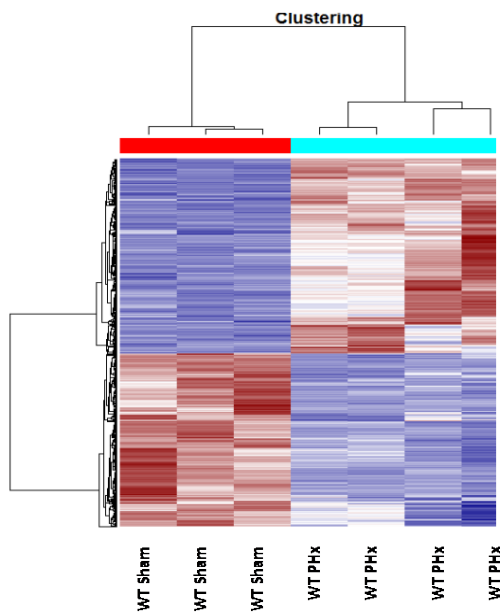
*Die Ergebnisse der Microarrays, ermöglichen eine Identifizierung von Genen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an den $LT\beta R$ -vermittelten Effekten beteiligt sind. Bei einem Abgleich differenziell regulierter Gene konnte eine Zuordnung von an der Leberregeneration beteiligten und $LT\beta R$ -abhängigen Gene getroffen werden. Die am stärksten differenziell exprimierten Gene wurden identifiziert: *Mug2*, *Aldh111*, *Dgkq* und *GOS2*.*



B

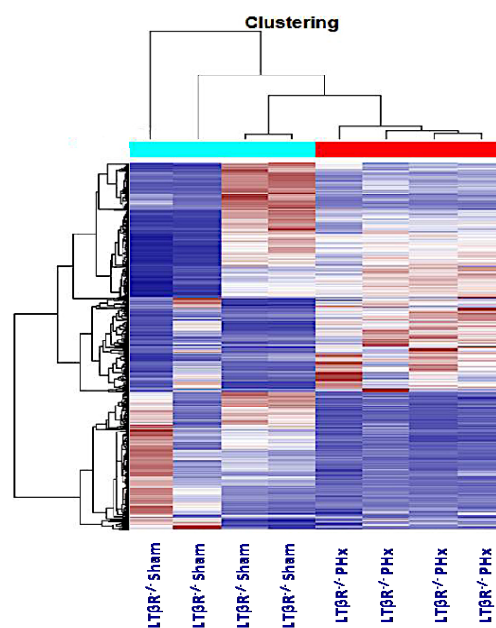
	☾			●			☾		
	WT			WT & LTβR ^{-/-}			LTβR ^{-/-}		
GO Term	% in Set	% in Total	+	% in Set	% in Total	+	% in Set	% in Total	+
transcription & gene expression	15,94	7,76	+						
regulation of transcription & gene expression	15,94	11,76	+						
regulation of transcription & gene expression	22,71	11,78							
regulation of transcription & gene expression	23,35	13,16	+						
regulation of transcription & gene expression	23,35	12,45							
regulation of transcription & gene expression	35,74	18,95	+						
transcription & gene expression	29,68	11,80	+						
transcription & gene expression	24,37	11,44	+						
transcription & gene expression	15,94	11,49	+						
transcription & gene expression	23,35	13,19	+						
transcription & gene expression	23,35	13,18	+						
transcription & gene expression	23,45	14,26							
transcription & gene expression	23,35	12,64							
transcription & gene expression	23,40	14,09	+						
transcription & gene expression	22,71	11,83							
transcription & gene expression	23,35	13,85							
transcription & gene expression	24,55	14,15	+						
transcription & gene expression				14,62	7,97	+			
transcription & gene expression				5,32	5,16	+			
transcription & gene expression				17,41	10,47	+			
transcription & gene expression				5,32	5,91	+			
transcription & gene expression				3,73	2,16	+			
transcription & gene expression				14,62	10,26				
transcription & gene expression				14,62	9,87				
transcription & gene expression				14,62	9,87	+			
transcription & gene expression				14,62	8,06				
transcription & gene expression				20,94	11,70		17,97	11,70	+
transcription & gene expression							4,68	2,84	+
transcription & gene expression	48,32	31,23	+	40,85	31,23	+	42,82	31,23	+
transcription & gene expression	56,81	47,34	+	59,93	47,34	+	65,40	47,34	+
transcription & gene expression	44,27	22,31	+	36,10	22,31	+	38,00	22,31	+
transcription & gene expression	44,27	38,70		44,78	38,70		47,54	38,70	
transcription & gene expression	44,27	34,14		44,78	34,14		47,54	34,14	
transcription & gene expression	44,27	38,67	+	44,78	38,67	+	47,54	38,67	+
transcription & gene expression	44,27	34,10		44,78	34,10		47,54	34,10	
transcription & gene expression	44,27	43,47	+	52,28	43,47	+	56,44	43,47	+
transcription & gene expression				22,46	22,28	+	25,86	22,28	+
transcription & gene expression				5,37	5,07	+	10,07	5,07	+
transcription & gene expression	7,19	3,32	+				6,91	3,32	+
transcription & gene expression	16,26	13,23	+	0,39	13,23	-			
transcription & gene expression	82,31	62,15	+	59,10	62,15	-	67,51	62,15	+

C WT Sham vs. WT PHx



1.500 diff. regulierte Gene

D LTβR^{-/-} Sham vs. LTβR^{-/-} PHx



709 diff. regulierte Gene

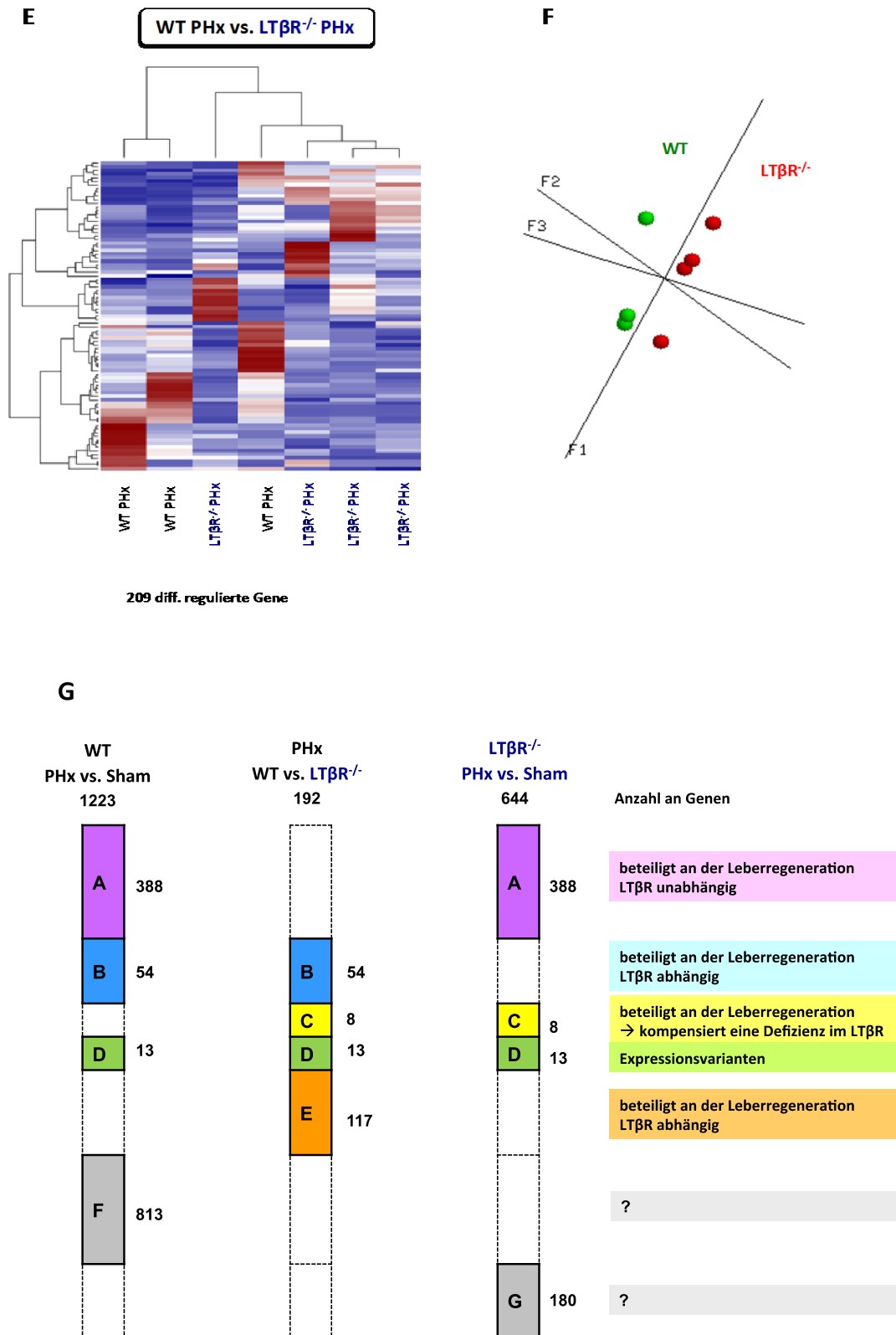


Abb. 4.14 A-G: Exemplarische Darstellungen der Auswertung der Microarray Analyse 12 h nach PHx im Vergleich von WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. (A-B) Durchführung des Microarrays durch „Miltenyi“: (A) Graphische Darstellung der *low level analysis* (B) Tabellarische Auflistung der *GO Analysis* (C-F) Durchführung des Microarrays durch das „LIMES“: (C) Heatmap WT Sham vs. WT PHx (D) Heatmap $LT\beta R^{-/-}$ Sham vs. $LT\beta R^{-/-}$ PHx (E) Heatmap WT PHx vs. $LT\beta R^{-/-}$ PHx (F) **PCA Analysis** WT PHx vs. $LT\beta R^{-/-}$ PHx (G) Manuelle Analyse der LIMES Daten: Abgleich WT PHx vs. $LT\beta R^{-/-}$ PHx mit graphischer Zuordnung differenziell regulierter Gene nach ihrer vermutlichen Funktion.

4.8.2 Verifizierung und weitere Charakterisierung der Genexpression mittels qRT-PCR

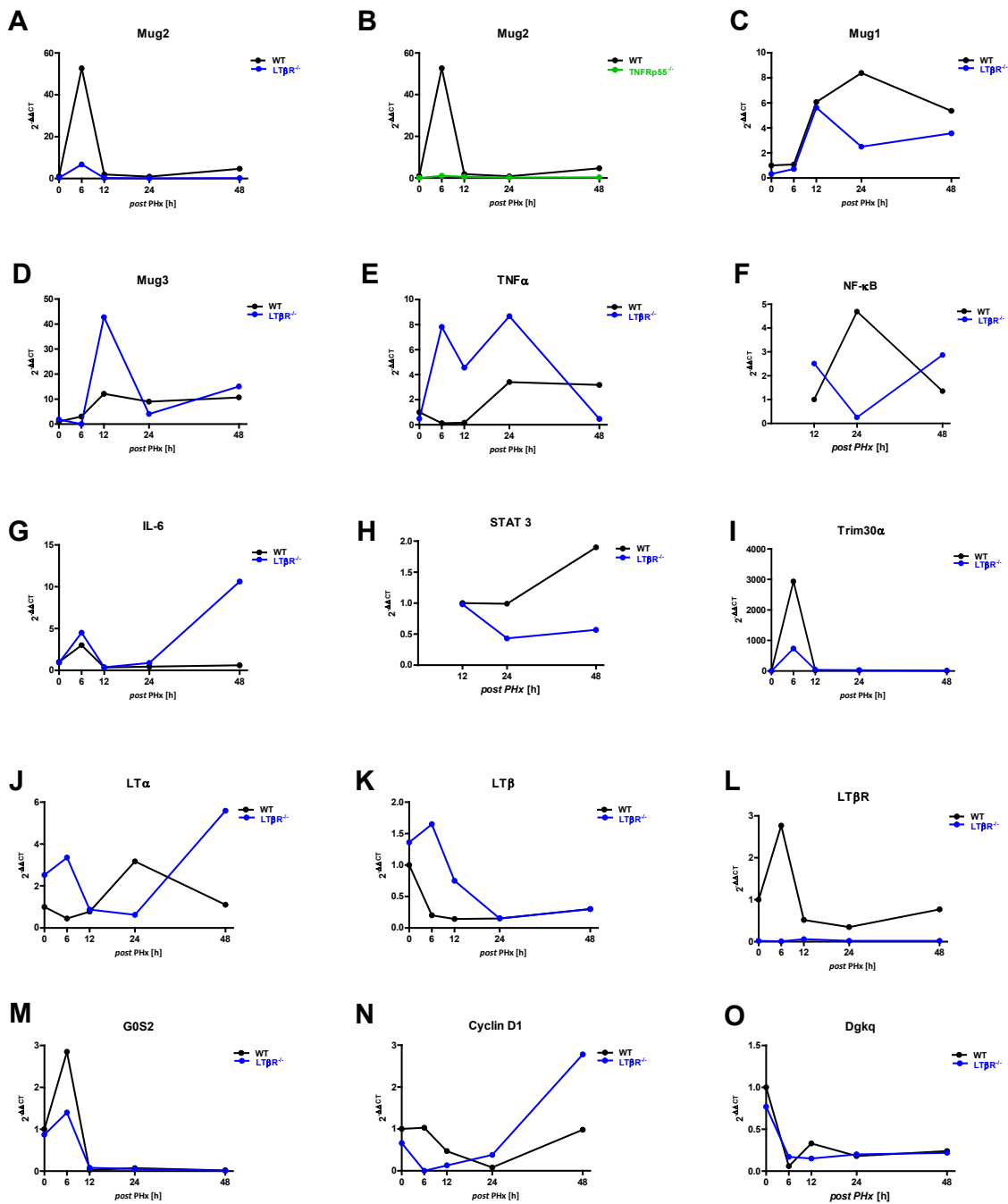
Die in der *Microarray* Analyse identifizierten differentiell regulierten Gene (*Kap. 4.8.1*) wurden mittels quantitativer Real-Time PCR (*Kap. 3.8.2.4*) verifiziert und das Expressionsprofil weiterer postulierter relevanter Gene in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren bestimmt. Grundsätzlich galt es zu untersuchen, ob es auch zu weiteren Zeitpunkten (6 h, 24 h und 48 h) nach PHx zu einer veränderten Genexpression der zum Zeitpunkt 12 h am stärksten differentiell exprimierten Gene kommt. Daher wurde RNA aus den Lebern von scheinoperierten und partiell hepatektomierten Tieren der beiden Genotypen (WT bzw. $LT\beta R^{-/-}$) isoliert (*Kap. 3.8.2.1*) und für eine quantitative Real-Time PCR eingesetzt. Die relative Genexpression der WT Tiere ($2^{-\Delta\Delta CT}$) wurde nach Schein-OP als '1' definiert und alle Genexpressionswerte auf diesen Wert bezogen. Werte < 1 stehen für eine Reduktion und Werte > 1 für eine Stimulation der Genexpression. Die in **Abbildung 4.15 A** dargestellte Expression des im *Microarray* am stärksten differentiell regulierten Gens Murinoglobulin 2 (Mug2) konnte durch die qRT-PCR bestätigt werden. Mug2 sowie Mug1 und Mug3 gehören zur Familie der $\alpha 2$ -Makroglobuline, die zu den Proteinen der Akuten-Phase gehören und IL-6-abhängig reguliert werden (*Ikari et al., 2001*). Die Werte der Mug2 Expression für die $LT\beta R^{-/-}$ bzw. $TNFRp55^{-/-}$ Tiere sind in getrennten Grafiken dargestellt, wobei die Kontrollwerte jeweils von den gleichen WT Tieren stammen. In WT Tieren zeigt sich 6 h nach PHx eine 50-fache Induktion in der Expression von Mug2. Die Expression der Mug2 mRNA in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren hingegen ist im Vergleich zu WT Tieren nicht erhöht. Auch in die $TNFRp55^{-/-}$ Tieren ist im Vergleich zu WT Tieren keine Induktion der Mug2 mRNA nach PHx zu verzeichnen (**Abb. 4.15 B**). Murinoglobulin 1 (Mug1), ein anderes Familienmitglied der $\alpha 2$ -Makroglobuline, zeigt sowohl in WT als auch in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 12 h nach PHx eine 6-fache Induktion (**Abb. 4.15 C**). Wohingegen WT Tiere 24 h nach PHx einen weiteren Anstieg (8fach) in der Mug1 Expression zeigen, fällt die Expression der Mug1 mRNA in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren um den Faktor 2 ab. 48 h nach PHx fällt auch die Expression der Mug1 mRNA in WT Tieren ab, obgleich noch immer eine 6fache Induktion im Vergleich zu der relativen Expression in scheinoperierten Tieren erkennbar ist. In $LT\beta R^{-/-}$ Tieren hingegen steigt die Expression von Mug1 28 h *post PHx* zwar wieder leicht an (4-fachen Induktion im Vergleich zu scheinoperierten WT Tieren) aber insgesamt eine dennoch erniedrigte Expression von Mug1 im Vergleich zu WT Tieren 48 h *post PHx*. Die Expression des Murinoglobulin 3 (Mug3) ist 12 h *post PHx* in WT Tieren um das 10fache induziert und zeigt auch 24 h und 48 h nach PHx eine konstante, 10-fach erhöhte Expression (**Abb. 4.15 D**). In $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist 12 h nach PHx eine noch stärkere Induktion (40-fach) der Mug3 mRNA gegeben. 24 h und 48 h nach PHx fällt diese Induktion von Mug3 jedoch schnell ab und zeigt eine vergleichbare Expression zu WT Tieren. Da bekannt ist, dass TNF und Interleukin-6 zu den wichtigsten Komponenten in der Initiation der Leberregeneration gehören (*DeAngelis et al., 2012; Fausto, 2001; Fausto et al., 2006*), lag auch die

Expression dieser Zytokine und weiterer Zielgene im $LT\beta R$ -vermittelten Signalweg (u.a. $NF-\kappa B$, $STAT3$ und $Trim30\alpha$) im Fokus der quantitativen Genexpressionsanalyse. In den WT Tieren weist die TNF mRNA (**Abb. 4.15 E**) erst 24 h *post PHx* einen 4-fachen Anstieg in der Expression auf, der auch 48 h nach PHx gegeben ist und zudem mit einer 5-fachen Induktion der $NF-\kappa B$ ($p50$) mRNA einhergeht (**Abb. 4.15 F**). In $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist bereits 6 h nach PHx eine 8-fache Induktion der TNF mRNA zu erkennen, die nach einem kurzen Abfall 12 h nach PHx , erneut 24 h postoperativ um das 9-fache induziert wird. 48 h nach PHx sinkt die Expression der TNF mRNA jedoch wieder deutlich ab. Ein Unterschied zwischen WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren im Expressionslevel der Interleukin-6 mRNA (**Abb. 4.15 G**) ist in scheinoperierten Tieren bzw. kurz nach PHx nicht gegeben. Sowohl in WT Tieren als auch in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren kann 6 h nach PHx eine 4fache Induktion der $IL-6$ mRNA beobachtet werden. 12 h nach PHx kommt es in beiden Genotypen zu einem Abfall in der Expression von $IL-6$, die auch 24 h nach PHx in beiden Genotypen gegeben ist und keine Induktion in der $IL-6$ mRNA aufweist. Wohingegen in WT Tieren auch 48 h nach PHx keine Induktion der $IL-6$ mRNA zu verzeichnen ist, kommt es in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zu einem weiteren Anstieg und lässt eine 11-fach erhöhte Expression von $IL-6$ erkennen. Eine Analyse der Expression von $STAT3$ zeigt erst 48 h nach PHx eine 2-fache Induktion in WT Tieren, wohingegen die Expression von $STAT3$ in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nicht erhöht ist (**Abb. 4.15 H**). Die Expression von $Trim30\alpha$ zeigt postoperativ einen unterschiedlichen Verlauf in den beiden Genotypen (**Abb. 4.15 I**). Hierbei zeigen WT Tiere im Gegensatz zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 6 h nach PHx einen deutlichen Anstieg in der Expression der $Trim30\alpha$ mRNA, die um das 3000-fache erhöht ist. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere hingegen weisen 6 h nach PHx nur eine ca. 1000-fache Induktion in der $Trim30\alpha$ Expression auf. 12 h nach PHx fällt die Expression von $Trim30\alpha$ in beiden Genotypen deutlich ab und es ist auch im weiteren Verlauf (24 h und 48 h) *post PHx* kein weiterer Anstieg zu verzeichnen. Die in **Abb. 4.15 J** dargestellte Expression von $LT\alpha$ lässt eine bereits in scheinoperierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 2,5-fache stärkere Expression im Vergleich zu WT Tieren erkennen. Postoperativ zeigen WT Tiere erst 24 h *post PHx* einen Anstieg in der $LT\alpha$ mRNA (3,5-fach), die 48 h nach PHx wieder absinkt. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere hingegen lassen 6 h nach PHx eine 3-fache Induktion in der $LT\alpha$ mRNA erkennen, diese fällt jedoch 12 h und 24 h nach PHx ab und zeigt erst 48 h nach PHx einen weiteren Anstieg und ist damit im Vergleich zu WT Tieren (48 h) um das 6-fache erhöht. Die Expression der $LT\beta$ mRNA zeigt ebenfalls bereits in scheinoperierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren eine 1,5-fach stärkere Expression im Vergleich zu WT Tieren (**Abb. 4.15 K**). Während WT Tiere postoperativ keine Induktion in der $LT\beta$ mRNA erkennen lassen und eine 0,7-fache Reduktion 6 h bis 48 h nach PHx aufweisen, zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere 6 h nach PHx eine 1,7-fache Induktion in der Expression von $LT\beta$. 12 h bis 48 h nach PHx sinkt die Expression der $LT\beta$ mRNA auch in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren und es ist eine mit den WT Tieren vergleichbare Reduktion (0,7-fach) zu sehen. Eine weitere Analyse galt dem Vergleich bzw. Verlauf der $LT\beta R$ Expression in scheinoperierten und partiell hepatektomierten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren (**Abb. 4.15 L**).

WT Tiere lassen 6 h *post PHx* eine 3-fache Induktion in der LT β R Expression erkennen, die 12 h nach PHx unter die Expression der nicht scheinoperierten Tiere fällt und auch 24 h und 48 h nach PHx ist kein weiterer Anstieg in der LT β R Expression zu beobachten. LT β R^{-/-} Tiere lassen, wie erwartet, keine Expression der LT β R mRNA erkennen. In den *Microarrays* wurden, wie beschrieben, weitere differentiell regulierte Gene identifiziert, wie u. a. GOS2, Cyclin D1 und Dgkq, deren Expression nach PHx mittels qRT-PCR genauer analysiert wurde. Die Expression von GOS2 ist 6 h nach PHx in WT Tieren um das 3-fache erhöht, wohingegen LT β R^{-/-} Tiere nur einen 1,5-fachen Anstieg in der Expression von GOS2 aufweisen (**Abb. 4.15 M**). 12 h nach PHx fällt die Expression der GOS2 mRNA in beiden Genotypen deutlich ab und es ist 24 h bis 48 h nach PHx keine Expression von GOS2 zu erkennen. Die in **Abbildung 4.15 N** dargestellte Expression von CyclinD1 zeigt, dass es in WT Tieren 12 h und 24 h nach PHx zu einer ca. 0,5-fachen Reduktion der CyclinD1 mRNA kommt, die erst 48 h nach PHx wieder eine mit scheinoperierten WT Tieren vergleichbare Expression zeigt. LT β R^{-/-} Tiere hingegen zeigen 6 h nach PHx eine deutlich reduzierte Expression von CyclinD1, die bis 24 h nach PHx gegeben ist und unter 1 liegt. Erst 48 h nach PHx ist im Vergleich zu WT Tieren (48 h *post PHx*) eine 3-fache Induktion der CyclinD1 mRNA zu verzeichnen. Die Expression der Dgkq mRNA zeigt postoperativ in beiden Genotypen keine Veränderungen (**Abb. 4.15 O**). Anders verhält sich die Expression der Ki67 mRNA (**Abb. 4.15 P**): Während WT Tiere 6 h nach PHx eine ungefähr 300-fache Induktion der Ki67 Expression zeigen, weisen LT β R^{-/-} Tiere einen nur 100-fachen Anstieg in der Ki67 mRNA auf. 12 h nach PHx kommt es in beiden Genotypen zu einem Abfall der Ki67 Expression und es ist auch im weiteren Verlauf, das heißt 24 h und 48 h nach PHx, kein weiterer Anstieg in WT oder LT β R^{-/-} Tieren zu erkennen. Die Analyse der in **Abbildung 4.15 Q** dargestellten Expression von Aldh1l1 lässt 12 h nach PHx einen 8-fachen Anstieg in WT Tieren erkennen. Zwar sinkt die Expression von Aldh1l1 24 h und 48 h nach PHx in WT Tieren ab, zeigt aber immer noch eine insgesamt 3-fache Induktion der Aldh1l1 mRNA. LT β R^{-/-} Tiere hingegen weisen postoperativ einen steten Anstieg in der Aldh1l1 mRNA auf. 6 h nach PHx ist ein 5-facher Anstieg in der Expression von Aldh1l1 zu verzeichnen, dieser ist 12 h und 24 h nach PHx um das 14-fache induziert und lässt 48 h nach PHx einen 23-fach erhöhte Expression der Aldh1l1 mRNA erkennen. Die Expression von Tnip1 zeigt in beiden Genotypen 6 h nach PHx eine 4-fache Induktion (**Abb. 4.15 R**). Wohingegen 12 h und 24 h nach PHx die Expression von Tnip1 in WT Tieren unter 1 absinkt, lassen LT β R^{-/-} Tiere 12 h *post PHx* nur eine kurzzeitige Reduktion erkennen und weisen 24 h nach PHx einen 9-fachen Anstieg in der Tnip1 mRNA auf. 48 h nach PHx zeigen sowohl WT als auch LT β R^{-/-} Tiere eine 3-fach erhöhte Expression von Tnip1.

Grundsätzlich bestätigt die qRT-PCR die Ergebnisse für die in der Microarray-Analyse differentielle Regulierung der Gene (Mug2, GOS2, Dgkq und Aldh1l1). Eine Analyse weiterer Familienmitglieder der α 2-Makroglobuline zeigt, dass die Expression von Mug1 insbesondere 24 h nach PHx stärker in WT

Tieren erhöht ist, wohingegen für die Expression der *Mug3* mRNA 12 h nach PHx ein deutlichen Anstieg in den *LTβR*^{-/-} Tieren zu verzeichnen ist. Zusätzlich konnte 6 h nach PHx eine starke Induktion in der Expression von *Trim30α*, *Ki67*, *G0S2* und *LTβR* identifiziert werden, wohingegen *LTβR*^{-/-} Tiere keine bzw. eine weniger starke Induktionen aufweisen. Die Expression der *IL-6*, *Aldh11l*, *CyclinD1* und *IL-6* mRNA verläuft in beiden Genotypen initial ähnlich und unterscheidet sich erst spät nach PHx. Die Expression der *LTα* mRNA zeigt einen komplett gegenläufige Expression in beiden Genotypen; die Expression von *TNF* und *LTβ* ist in *LTβR*^{-/-} Tieren im Vergleich zu WT Tieren deutlich stärker.



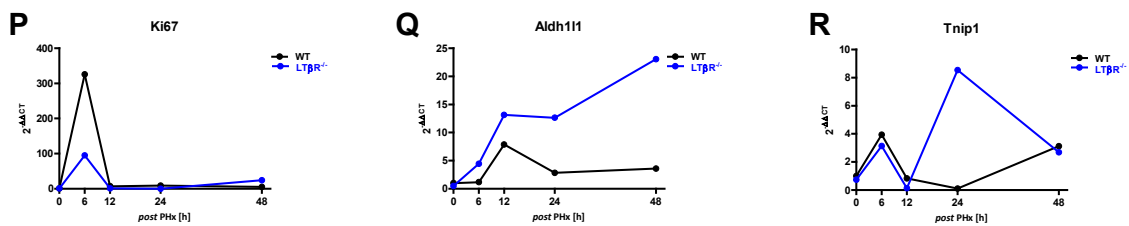


Abb. 4.15 A-O: Quantitative RT-PCR Analyse differenziell regulierter Gene von partiell hepatektomierten WT, $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren. Die relative Genexpression der scheinoperierten WT Tiere wurde als 1 definiert und alle weiteren Werte auf diesen Wert bezogen. Werte < 1 stehen für eine Reduktion und Werte > 1 für eine Stimulation der Genexpression. Die Abbildungen zeigen den $2^{-\Delta\Delta CT}$ Wert von: (A) $Mug2$ ($LT\beta R^{-/-}$) (B) $Mug2$ ($TNFRp55^{-/-}$) (C) $Mug1$ (D) $Mug3$ (E) $TNF\alpha$ (F) $IL-6$ (G) $Trim30\alpha$ (H) $LT\alpha$ (I) $LT\beta$ (J) $LT\beta R$ (K) $GOS2$ (L) $CyclinD1$ (M) $Ki67$ (N) $Aldh11l1$ und (O) $Tnfr1$. WT Tiere sind in schwarz, $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere in grün dargestellt. ($n = 3$, Anzahl der Versuchsdurchführungen in Triplikaten; h = Stunden)

4.9 Inhibierung des TNFR Signalweges durch Etanercept (Enbrel®) in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren

4.9.1 Einfluss einer Etanercept Behandlung auf das Überleben nach PHx

Sowohl $LT\beta R^{-/-}$ als auch $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigen Defizite in der Leberregeneration (*Anders et al., 2005; Shimizu et al., 2009; Yamada et al., 1997*) (Abb. 4.1 A und B). Dies lässt vermuten, dass ein Ausfall beider Signalwege die Leberregeneration komplett verhindert. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde ein TNF/ $LT\alpha$ -Antagonist, Etanercept (Enbrel®) eingesetzt. Etanercept ist ein dimeres Fusionsprotein, bei dem zwei humane $TNFRp75$ -Bindungsdomänen an den F_c -Teil des menschlichen Immunglobulins (IgG1) gekoppelt sind (*Nestorov et al., 2006*). Es fängt TNF ab und verhindert eine Bindung an den zellulären Rezeptor, so dass TNF vermittelte Signalwege nicht aktiviert werden. Eine Applikation von Etanercept blockiert in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren den $TNFRp55$ und den $TNFRp75$ Signalweg. TNF ist schon wenige Minuten nach PHx für die Initiation der Leberregeneration wichtig (*Fausto, 2001; Fausto et al., 2006*). Die genaue Dosierung des Etanercept wurde zunächst in Vorversuchen ermittelt. Ziel war es, dass WT Tiere mit einer Etanercept Behandlung nach PHx die gleiche Letalität wie $TNFRp55^{-/-}$ Tiere nach PHx zeigen. Des Weiteren musste die Dosierung so gewählt werden, dass Etanercept behandelte $TNFRp55^{-/-}$ Tiere nach PHx keine erhöhte Letalität aufweisen. Da in der Literatur unterschiedliche Dosierungen und Applikationsfrequenzen von Etanercept beschrieben sind und bisher keine Anwendung in der Leberregeneration publiziert wurde, wurden verschiedene Dosierungen: 5 $\mu\text{g/g KG}$ (ET5), 10 $\mu\text{g/g KG}$ (ET10) und 20 $\mu\text{g/g KG}$ (ET20) Etanercept ausgetestet und das Überleben nach PHx dokumentiert. Um ausreichende Serumspiegel zu erreichen, wurde das Etanercept 24 h vor und 24 h nach PHx *i.p.* verabreicht. Zudem wurden Kontrollen mitgeführt, das heißt WT, $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere die partiell hepatektomiert wurden, aber keine Behandlung

mit Etanercept erhielten. Vergleicht man die in **Abbildung 4.16 A** dargestellten Überlebenskurven der unbehandelten und Etanercept-behandelten, partiell hepatektomierten Wildtyp Tiere sieht man bereits nach einer Applikation von 5 µg/g Etanercept einen gering negativen Effekt auf die Überlebensrate (73,3 % bzw. PHxET5: 60 %). Eine Verdopplung der Etanercept-Konzentration (PHxET10) verstärkt diesen Effekt und lässt eine verminderte Überlebensrate von 46,7 % erkennen. Injiziert man WT Tieren 20 µg/g Etanercept, ist das Überleben signifikant (20 %; $p = 0,0209$) im Vergleich zu unbehandelten hepatektomierten WT Tieren verringert. Die Analyse der hepatektomierten und mit 10 µg/g KG Enbrel behandelten TNFRp55^{-/-} Tiere lässt nur einen geringen Effekt des Enbrel auf das Überleben nach PHx im Vergleich zu unbehandelten TNFRp55^{-/-} Tieren erkennen (40 % bzw. 55,6 %, **Abb. 4.16 C**). In partiell hepatektomierten LTβR^{-/-} Tieren führt eine Behandlung mit 5 µg/g KG Etanercept zu einer bereits auf 60 % erhöhten Mortalität (**Abb. 4.16 B**). Injiziert man dieser Linie jedoch 10 µg/g KG Etanercept, beträgt die Letalität 100 %, d.h. es kommt wahrscheinlich zu einem kompletten Ausfall der Leberregeneration. Somit kann nach PHx ein deutlich signifikanter Unterschied ($p = 0,0082$) im Überleben zwischen unbehandelten und Etanercept-behandelten LTβR^{-/-} (PHxET10) Tieren identifiziert werden, und auch ein Vergleich der Überlebensraten von PHxET10 WT Tieren mit PHxET10 LTβR^{-/-} Tieren (**Abb. 4.16 D**) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0223$).

Partiell hepatektomierte, mit 10 µg/g KG Etanercept behandelte TNFRp55^{-/-} Tiere lassen keinen zusätzlichen negativen Effekt auf ihre Überlebensrate erkennen. Hingegen zeigen WT Tiere nach einer Etanercept Behandlung mit 10 µg/g KG eine vergleichbare Überlebensrate wie unbehandelte, partiell hepatektomierte TNFRp55^{-/-} Tiere. Insgesamt zeigt sich durch eine zweimalige Behandlung (i.p.) der LTβR^{-/-} Tiere mit 10 µg/g KG Etanercept, dass wenn beide Signalwege, das heißt der LTβR und der TNFRp55 Signalweg ausgeschaltet sind, keine Leberregeneration mehr stattfindet. Daher wurde für die weiteren Versuche eine Dosierung von 10 µg/g KG Etanercept gewählt.

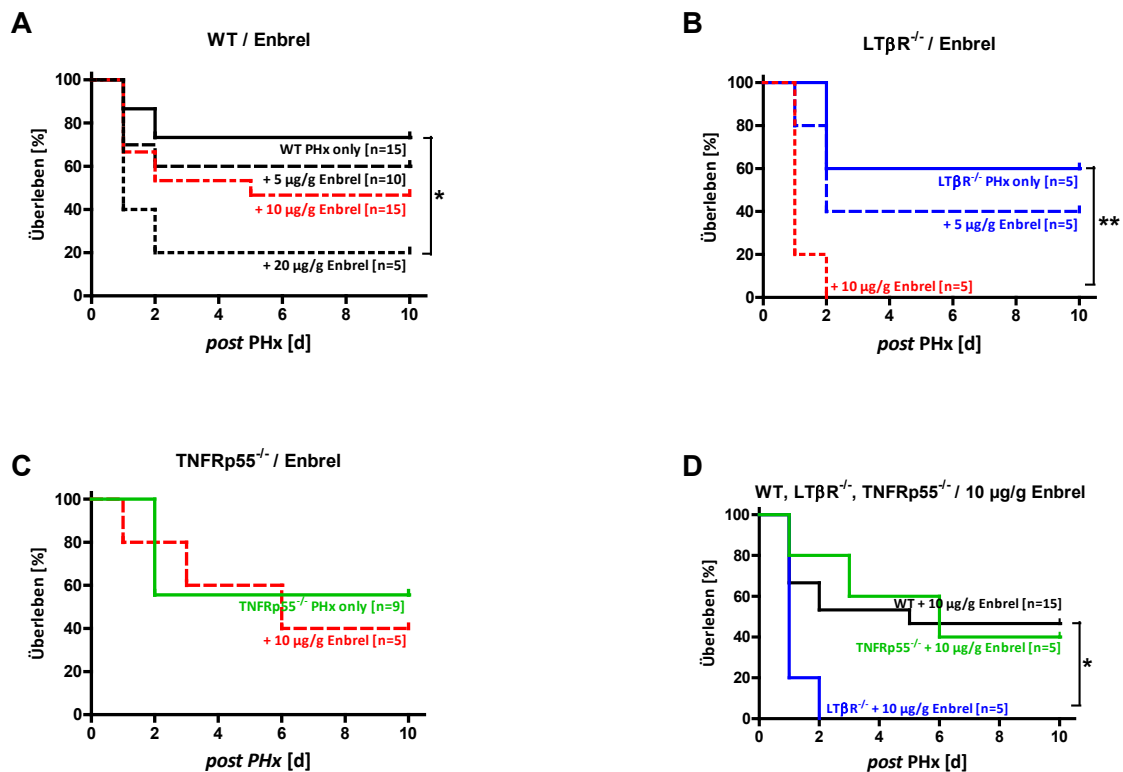


Abb. 4.16 A-D: Überlebenskurven von WT, LTβR^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Tieren mit und ohne Etanercept Behandlung nach partieller Hepatektomie. (A) Überlebenskurve nach PHx in %: WT unbehandelt vs. WT + Etanercept (B) Überlebenskurve nach PHx in %: LTβR^{-/-} unbehandelt vs. LTβR^{-/-} + Etanercept (C) Überlebenskurve nach PHx in %: TNFRp55^{-/-} unbehandelt vs. TNFRp55^{-/-} + Etanercept (D) Überlebenskurve nach PHx in %: WT, LTβR^{-/-} und TNFRp55^{-/-} Tiere + 10 µg/g KG Etanercept. WT Tiere sind in schwarz, LTβR^{-/-} Tiere in blau und TNFRp55^{-/-} Tiere in grün dargestellt. Die rote Linie in Abb. 4.16 A-C zeigt in allen Genotypen den Verlauf nach PHx nach einer zweimaligen Behandlung mit 10 µg/g KG Etanercept. Abbildung 4.16 D zeigt eine Zusammenfassung aller Genotypen mit einer zweimaligen Behandlung mit 10 µg/g KG Etanercept. (n = Anzahl der Versuchstiere; d = Tage; *p < 0,05**; p < 0,005)

4.9.2 Serumanalyse diverser Blutmetabolite nach PHx unter Etanercept Behandlung

Für die folgenden Analysen wurde die Etanercept Behandlung immer 24 h vor und 24 h nach PHx in einer Konzentration von 10 µg/g KG verabreicht. Unbehandelte Kontrollen (PHx und keine Etanercept Behandlung) und mit 10 µg/g KG Etanercept behandelte partiell hepatektomierte WT und LTβR^{-/-} Mäuse (PHxET10) wurde 24 h, 48 h und 240 h *post PHx* Blut aus der *Vena cava inferior* entnommen (Kap. 3.1.4.1.1) und aus diesem Blut Serum für die folgenden Analysen gewonnen. Der 240 h Wert konnte nur in den WT Tieren bestimmt werden, da wie in Kap. 4.9.1 gezeigt, alle LTβR^{-/-} Tiere nach Etanercept Behandlung mit 10 µg/g KG innerhalb von 48 h nach PHx verstarben. Sowohl in behandelten WT Tieren (PHxET10), als auch in behandelten LTβR^{-/-} Tieren (PHxET10) kann bereits 24 h *post PHx* ein vergleichbarer, deutlicher Anstieg der Transaminasen-Aktivität (AST und ALT) verzeichnet werden (AST: 816 ± 109 U/L bzw. 906 ± 60 U/L; ALT: 786 ± 129 U/L bzw. 843 ± 82 U/L;

Abb. 4.17 A und 4.17 B). In PHxET10 WT Tieren und PHxET10 $LT\beta R^{-/-}$ Tieren kam es zu einem Anstieg der LDH-Konzentration bereits 24 h postoperativ (3169 ± 519 U/L bzw. 3132 ± 535 U/L; **Abb. 4.17 C**). Das Serumalbumin (**Abb. 4.17 D**) zeigt 24 h nach PHx in den PHxET10 $LT\beta R^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu WT Tieren eine Abnahme ($1,7 \pm 0,18$ g/dl bzw. $2 \pm 0,17$ g/dl). Wohingegen 48 h und 240 h nach PHxET10 in WT Tieren das Serumalbumin auf einem konstanten Level bleibt, sinkt es in PHxET10 $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 48 h *post PHx* noch weiter ab ($2 \pm 0,14$ g/dl bzw. 1 ± 0 g/dl). Eine Messung des Prothrombins (**Abb. 4.17 E**) zeigt in beiden Genotypen einen vergleichbaren Verlauf zum zuvor beschriebene Albumin. Unbehandelte WT Tiere und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere weisen keine Unterschiede im Prothrombin auf ($4,1 \pm 0,10$ g/dl bzw. $4,0 \pm 0,09$ g/dl). Wohingegen WT Tiere 24 h bis 240 h nach PHx gleichbleibende Prothrombinwerte zeigen, sinkt der Prothrombinwert in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nach 24 h ($3,5 \pm 0,26$ g/dl) und steigt auch 48 h nach PHx nicht an ($2,2 \pm 0$ g/dl). Vergleicht man das Gesamtbilirubin beider PHxET10 Genotypen (**Abbildung 4.17 F**), kann man 24 h nach PHx eine Erhöhung der Bilirubinwerte erkennen ($1,9 \pm 0,62$ mg/dl bzw. $1,7 \pm 0,65$ mg/dl), 48 h *post PHx* sinkt das Bilirubin in beiden Genotypen vergleichbar und liegt wieder auf demselben Niveau wie die Bilirubinwerte der unbehandelten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere ($1,1 \pm 0$ mg/dl bzw. $1,2 \pm 0$ mg/dl). Auffallend sind die Serumwerte der ALP in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren (**Abb. 4.17 G**), die bereits vor einer Behandlung mit Etanercept signifikant ($p = 0,0029$) gegenüber den WT Tieren erhöht sind ($84 \pm 8,6$ U/L bzw. $37 \pm 4,3$ U/L; $p = 0,0029$). 24 h nach PHx ist in beiden PHxET10 Genotypen (WT und $LT\beta R^{-/-}$) ein deutlicher Anstieg der ALP zu erkennen (340 ± 130 U/L bzw. 300 ± 65 U/L), der jedoch nicht signifikant ist, da hohe Standardabweichungen vorlagen. Während in WT Tieren die ALP 48 h nach PHx minimal weiter steigt, zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine deutliche Erhöhung (480 ± 52 U/L bzw. 670 ± 0 U/L), die jedoch nicht signifikant unterschiedlich ist.

Zusammenfassend lassen sich in beiden Genotypen nach einer Behandlung mit 10 μ g/g KG Etanercept (Enbrel[®]) und anschließender partieller Hepatektomie deutlich erhöhte Lebertransaminasen-Aktivitäten erkennen, die von einer erhöhten ALP und leicht erhöhten Bilirubinwerten begleitet werden. Mit Etanercept-behandelte $LT\beta R^{-/-}$ Tiere weisen überdies 24 h und 48 h nach PHx ein vermindertes Albumin und Prothrombin im Serum auf, das in WT Tieren nicht zu verzeichnen ist.

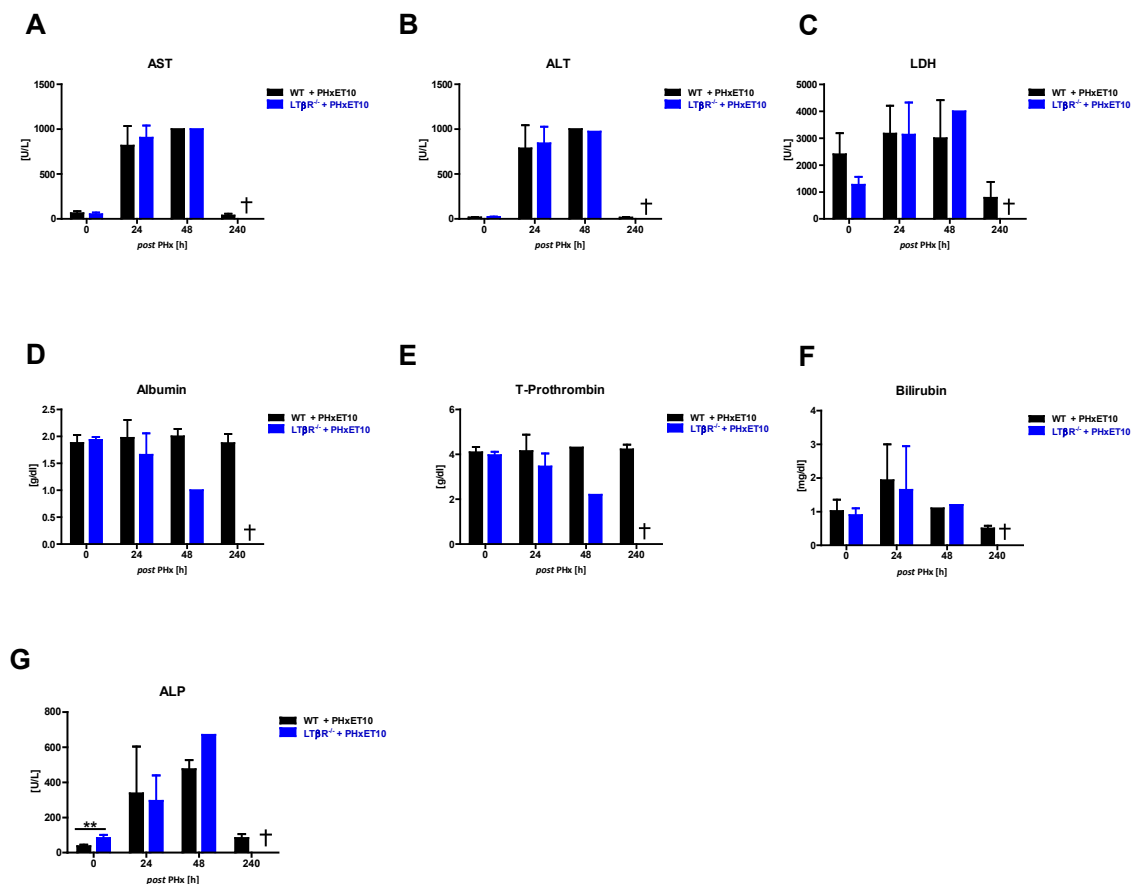


Abb. 4.17 A-G: Serumparameter von WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren vor und 24 h, 48 h und 240 h nach PHx mit einer Behandlung mit 10 $\mu\text{g/kg}$ KG Etanercept (PHxET10). (A) AST (B) ALT (C) LDH (D) Albumin (E) T-Prothrombin (F) Bilirubin (G) ALP. WT Tiere sind in schwarz, $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau dargestellt. (n = 3; Anzahl der Versuchstiere; h = Stunden; † = nicht determiniert; da 240 h nach PHx in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 100% Letalität; p = Signifikanz; ***p < 0,005)

4.10 Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Akute Toxoplasmeninfektionen verlaufen in den meisten immunkompetenten adulten Tieren und Menschen asymptomatisch, da in der Regel eine effektive schützende Immunantwort induziert wird, die zur Entstehung einer symptomlosen chronisch-persistierenden Infektion führt. Kann das Immunsystem die Infektion nicht zügig begrenzen, kommt es zu verbreitetem Zelltod und Organläsionen, die in Pneumonien oder Encephaliden resultieren können (Schluter et al., 2003).

4.11 Überleben nach einer Infektion mit *T. gondii*

Eine entscheidende Rolle für den $LT\beta R$, während der Immunantwort gegen Pathogene wie z.B. *Listeria monocytogenes* und murines Zytomegalievirus wurde bereits in der Literatur beschrieben (Banks et al., 2005; Ehlers et al., 2003; Kutsch et al., 2008).

Ob es eine Rolle für den LT β R im Rahmen einer Infektion mit *T. gondii* gibt, wurde bislang noch nicht untersucht und ist Teil dieser Arbeit. Zur Analyse wurden zunächst WT und LT β R^{-/-} Mäuse *i.p.* mit 20 oder 40 Zysten des *T. gondii* Stammes ME49 infiziert (Kap. 3.1.2) und der Verlauf des Überlebens beider Genotypen über einen Zeitraum von 60 Tagen dokumentiert (**Abb. 4.18 A und B**). Parallel wurden IFR1^{-/-} oder IFN γ ^{-/-} Tiere mit 20 Zysten infiziert. IFR1^{-/-} oder IFN γ ^{-/-} Tiere sind durch eine 100%ige Mortalität in der akuten Phase einer *T. gondii* Infektion charakterisiert (Huang *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 1994; Scharton-Kersten *et al.*, 1996) und dienen als Nachweis, dass die verwendeten Zystenpräparation zu einer erfolgreichen Infektion führt (Daten nicht gezeigt). Es zeigt sich bereits nach einer Infektion mit 20 Zysten, dass LT β R^{-/-} Tiere im Vergleich zu WT Tieren eine höhere Suszeptibilität gegenüber *T. gondii* haben (**Abb. 4.18 A**). Nach 60 Tagen *p.i.* sind nur 20 % der WT Tiere verstorben, wohingegen LT β R^{-/-} Tiere eine Mortalität von 70 % aufweisen ($p = 0,0230$). Außerdem erliegen LT β R^{-/-} Tiere der Infektion bereits ab Tag 19 *p.i.*, wohingegen WT Tiere erst ab Tag 31 *p.i.* versterben. Eine Beurteilung des Zustands (Habitus) der Tiere während der Infektion erfolgte nach den Kriterien: Fell-(pflege), Gewicht und Verhalten. Beide Genotypen zeigen nach einer Infektion mit *T. gondii* typische Symptome wie aufgesträubtes Fell, Gewichtsverlust und Apathie. Infiziert man beide Genotypen mit 40 Zysten, steigt die Mortalität und somit die Suszeptibilität der LT β R^{-/-} Tiere gegenüber einer *T. gondii* Infektion dramatisch an. Während infizierte WT Tiere 60 Tage *p.i.* nur zu 8,3 % versterben, zeigt sich bei den infizierten LT β R^{-/-} Tieren eine signifikant erhöhte Mortalität ($p \leq 0,0001$) von 90,9 % (**Abb. 4.18 B**). Ein Auftreten von Krankheitszeichen (aufgesträubtes Fell, Gewichtsverlust, Apathie) ist in beiden Genotypen gegeben. Ein Teil der infizierten LT β R^{-/-} Tiere erliegt der Infektion zwischen Tag 12 *p.i.* bis Tag 21 *p.i.*, weitere LT β R^{-/-} Tiere versterben in einem Zeitraum von Tag 34 *p.i.* bis 49 *p.i.* (**Abb. 4.18 B**). Für die weiteren Experimente wurden daher immer 40 Zysten für die Infektion eingesetzt. Zusätzlich wurde das Körpergewicht über den Zeitraum der akuten Phase (Tag 1 *p.i.* bis ca. Tag 12 *p.i.*) dokumentiert und mit dem Geschlecht des jeweiligen Genotypen verglichen (**Abb. 4.18 C und D**), dabei wird ersichtlich, dass auch bei einer Korrelation von Körpergewicht und Geschlecht Unterschiede zwischen WT und LT β R^{-/-} Tieren bestehen. Sowohl bei einer 20 Zysten-Infektion als auch bei einer 40 Zysten-Infektion weisen weibliche LT β R^{-/-} Tiere einen signifikant höheren Gewichtsverlust gegenüber männlichen Tieren auf ($p \leq 0,0001$). Darüber hinaus zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen WT und LT β R^{-/-} Tieren ($p \leq 0,0001$) und im Vergleich von männlichen WT und LT β R^{-/-} Tieren ($p \leq 0,0001$).

*Insgesamt zeigen LT β R^{-/-} Tiere einen charakteristischen Phänotyp beim Überleben nach einer T. gondii Infektion. Obgleich LT β R^{-/-} Tiere im Vergleich zu anderen suszeptiblen Genotypen erst relativ spät versterben, lassen sie eine erhöhte Mortalität von 70 % nach einer Infektion mit 20 Zysten erkennen. Nach einer Infektion mit 40 Zysten steigt die Mortalität deutlich auf 90,9 % an, wobei ein Teil der Tiere zwischen Tag 19 *p.i.* bis Tag 21 *p.i.* und ein weiterer Teil von Tag 34 bis Tag 49 *p.i.* verstirbt.*

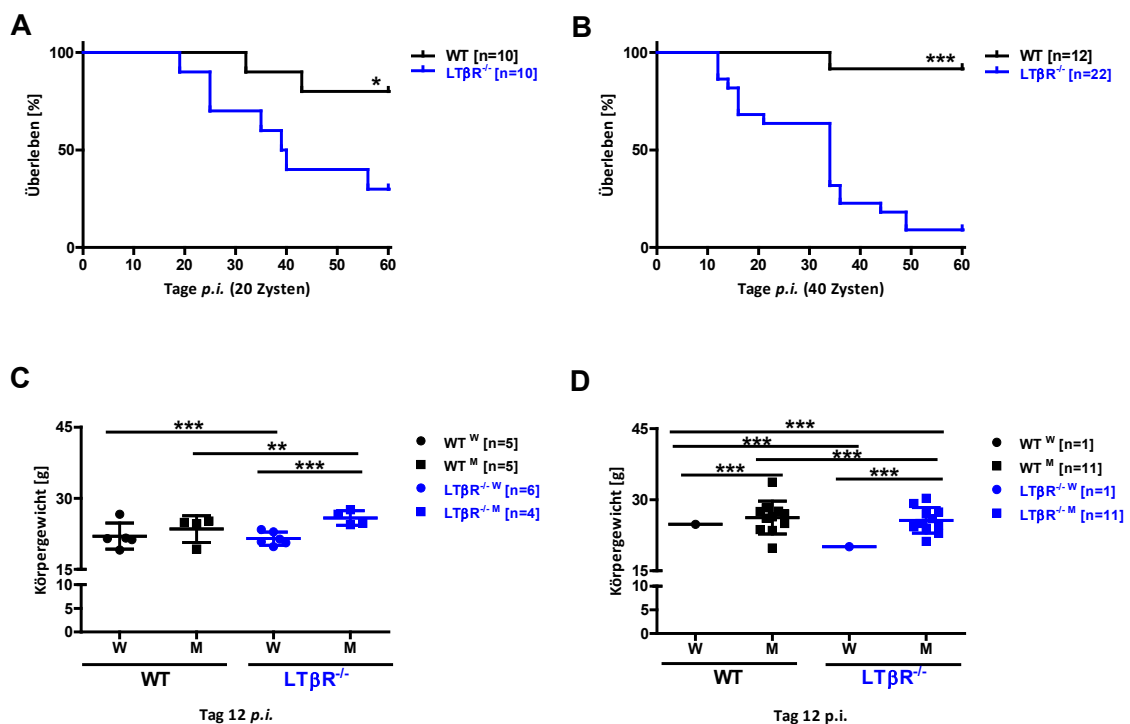


Abb. 4.18 A-D: Überlebenskurven (A, B) Körpergewicht vs. Gender (C, D) in WT und $LT\beta R^{-/-}$ bei einer *T. gondii*-Infektion *i. p.* mit 20 und 40 Zysten. (A) Überlebenskurven nach einer 20 Zysten Infektion in % (B) Überlebenskurven nach einer 40 Zysten Infektion in % (C) Körpergewicht [g] vs. Geschlecht nach einer 20 Zysten Infektion an Tag 12 *p.i.*. (D) Körpergewicht [g] vs. Geschlecht nach einer 40 Zysten Infektion an Tag 12 *p.i.*. WT Tiere sind in schwarz und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau dargestellt. (n = Anzahl der Versuchstiere; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$)

4.12 Serologische Charakterisierung nach einer Infektion mit *T. gondii*

Eine Analyse des Serums infizierter WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere sollte erste Hinweise über die Auswirkungen einer Infektion mit *T. gondii* in beiden Genotypen geben. Je 3 nicht infizierten und 3 infizierten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen wurden zu definierten Zeitpunkten nach Infektion (Tag 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30, 36 und 60 *p.i.*) aus dem Versuch genommen, Blut aus der *Vena cava inferior* entnommen (Kap. 3.1.4.1.1) und aus dem Blut Serum für die jeweiligen Analysen (Kap. 3.1.4.1.2) gewonnen. Eine Ausnahme ist lediglich bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren an Tag 30 *p.i.* und in beiden Genotypen an Tag 36 *p.i.* gegeben, da aufgrund der erhöhten Mortalität zu diesen Zeitpunkten nur noch jeweils 2 Versuchstiere zur Verfügung standen. Zur Untersuchung eines hepatozellulären Schadens wurden die Leber-Transaminasen AST (Aspartat-Aminotransferase) und ALT (Alanin-Aminotransferase) sowie die LDH (Laktatdehydrogenase) bestimmt. Sowohl die AST als auch die ALT Werte lassen bereits früh nach einer Infektion mit *T. gondii* (Tag 5 *p.i.*) einen Anstieg in beiden Genotypen erkennen, wobei die Standardabweichungen der WT Tiere tendenziell höher sind (**Abb. 4.19 A und B**).

An Tag 14 *p.i.* zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu WT Tieren einen signifikanten Anstieg von AST ($240 \pm 8,5$ U/L bzw. $110 \pm 4,9$ U/L; $p = 0,0002$). Auffällig ist in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren eine signifikante Erhöhung beider Parameter gegenüber WT Tieren an Tag 60 *p.i.* (AST: $91 \pm 2,1$ U/L bzw. $58 \pm 3,2$ U/L, $p = 0,0010$; ALT: $27 \pm 1,5$ U/L bzw. $12 \pm 0,67$ U/L, $p = 0,0009$). Nach Infektion zeigen auch die LDH Werte in der **Abbildung 4.19 C** einen leichten Anstieg bei den WT Tieren. Das LDH im Serum von den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist dabei gegenüber WT Tieren signifikant erhöht an den Tagen 14 *p.i.* (2300 ± 28 U/L bzw. 1800 ± 170 U/L; $p = 0,0272$), 21 *p.i.* (2600 ± 110 U/L bzw. 1400 ± 250 U/L; $p = 0,0136$) und 60 *p.i.* (3200 ± 340 U/L bzw. 1500 ± 130 U/L; $p = 0,0080$). Betrachtet man in **Abbildung 4.19 D** den Verlauf des Gesamtbilirubins nach einer Infektion mit *T. gondii* kann man ebenfalls eine Erhöhung der Werte in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu WT Tieren erkennen. Mäuse mit einer Defizienz im $LT\beta R^{-/-}$ weisen bereits 5 Tage nach Infektion einen signifikanten Anstieg gegenüber WT Tieren im Bilirubin auf ($0,83 \pm 0,1$ g/dl bzw. $0,5 \pm 0,06$ g/dl; $p = 0,0341$). Nach einem vorübergehenden Absinken des Bilirubins in beiden Genotypen bis Tag 14 *p.i.*, kommt es ab Tag 21 *p.i.* sowohl in WT als auch in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zu einem erneuten Anstieg des Serum-Bilirubins ($1,2 \pm 0,4$ g/dl bzw. $1,2 \pm 0,2$ g/dl). Die Bilirubinwerte der WT Tiere sinken im weiteren Verlauf wieder ab bis sie an Tag 60 *p.i.* ein vergleichbares Niveau wie unbehandelte WT Tiere aufweisen. Die Serumwerte des Bilirubins in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren hingegen schwanken stark und sind auch an Tag 60 *p.i.* signifikant gegenüber den WT Tieren erhöht ($2 \pm 0,03$ g/dl bzw. $0,5 \pm 0,1$ g/dl; $p = 0,0001$). Weitere Parameter wie das Prothrombin oder Albumin lassen im Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* keinen eindeutigen Unterschied zwischen WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erkennen (Daten nicht gezeigt).

Eine Analyse diverser Blutparameter im Rahmen einer T. gondii Infektion zeigt in beiden Genotypen einen Anstieg in den Transaminasen AST und ALT und in der LDH, wobei $LT\beta R^{-/-}$ Tiere tendenziell noch höhere Werte als die WT Tiere zeigen, insbesondere an Tag 60 p.i.

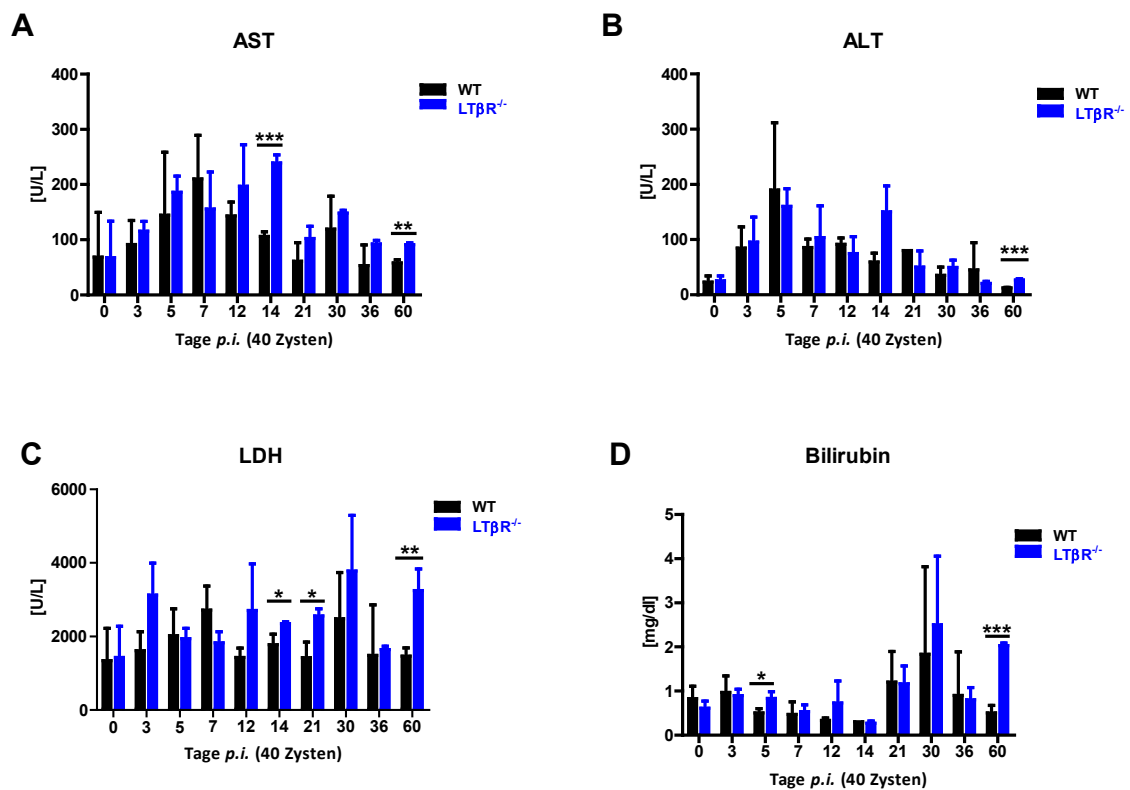


Abb. 4.19 A-D: Serumparameter der WT und LTβR^{-/-} Tiere vor sowie 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30, 36 und 60 Tage nach einer *T. gondii*-Infektion *i.p.* mit 40 Zysten. (A) AST (B) ALT (C) LDH (D) Bilirubin. WT Tiere sind in schwarz und LTβR^{-/-} Tiere in blau dargestellt. (n = 3, Anzahl der Versuchstiere (Ausnahme: n = 2 bei den LTβR^{-/-} Tieren für den Tag 30 *p.i.* und in beiden Genotypen n = 2 für den Tag 36 *p.i.*); *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005)

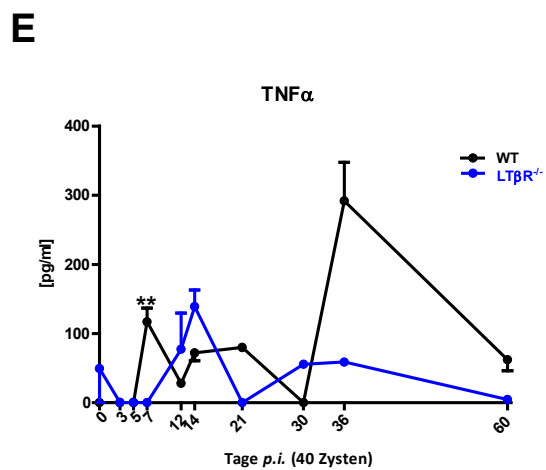
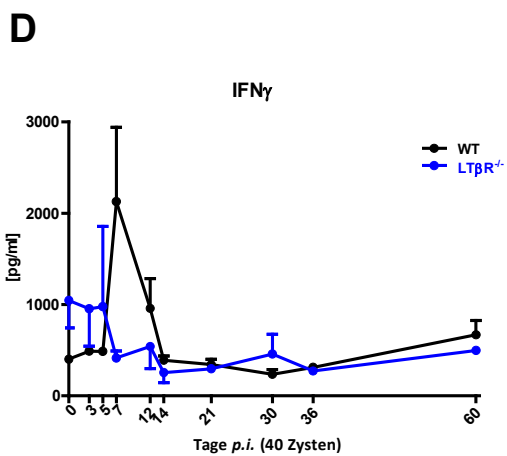
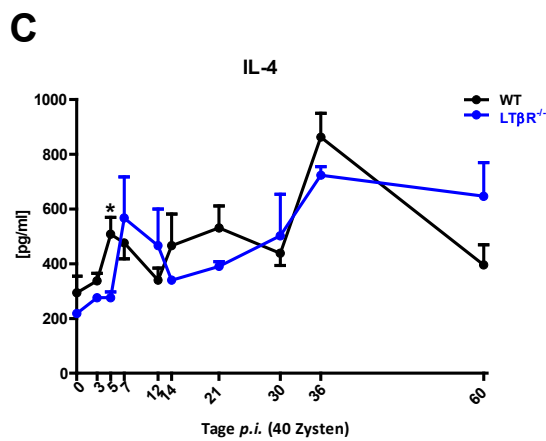
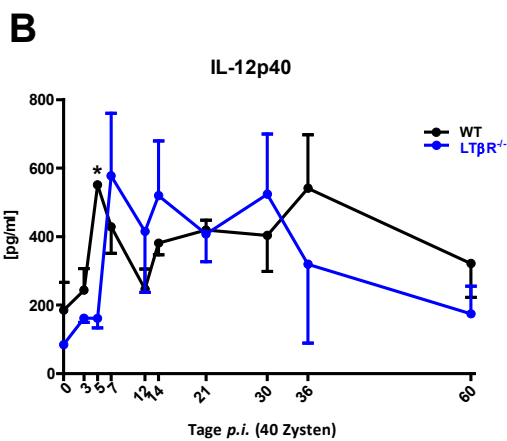
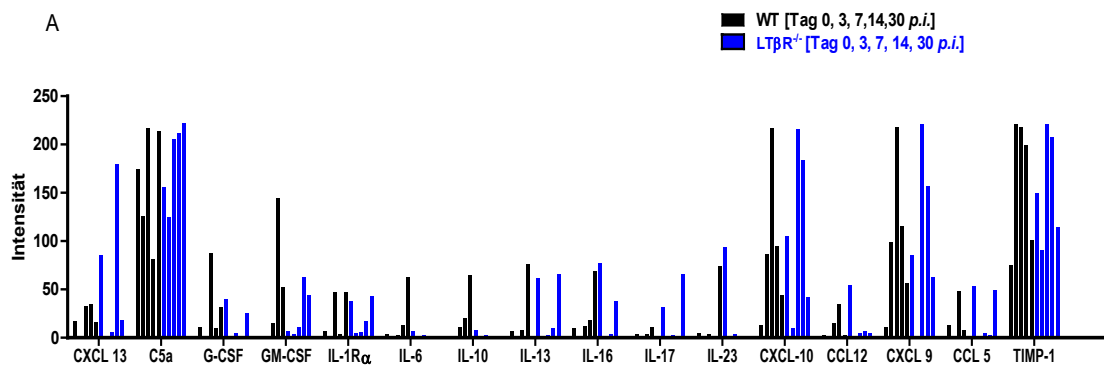
4.13 Zytokinexpression in Toxoplasma-infizierten WT und LTβR^{-/-} Tieren

Mithilfe des Mouse Cytokine Arrays (Panel A von R&D Systems, Kap. 3.1.4.1.4) wurde die relative Expressionsstärke 40 verschiedener Zytokine, Chemokine und Akute-Phase-Proteine im Serum beider Genotypen an den Tagen 0, 3, 7, 14 und 30 *p.i.* bestimmt (**Abb. 4.20 A**). Zytokine und Chemokine, die die stärksten Unterschiede in der Intensität ihres Signals zwischen beiden Genotypen aufzeigen wurden in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Tendenziell können in nicht infizierten WT Tieren nur geringe Spiegel der analysierten Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden, Ausnahme ist TIMP1, für das relativ hohe Werte gefunden werden.

Die Werte der analysierten Zytokine/Chemokine steigen in der Regel nach der Infektion und erreichen an Tag 14 *p.i.* bzw. Tag 30 *p.i.* (CXCL-13, C5a, GM-CSF, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16 und IL-23) ihr Maximum; Ausnahmen sind C5a, G-CSF, IL-1Rα, CXCL-10, CXCL-9 oder TIMP-1 bei denen bereits an Tag 7 *p.i.* das Maximum zu finden ist. Demgegenüber scheint die Chemokin-/Zytokinexpression bei den LTβR^{-/-} Tieren dereguliert.

Bei nicht infizierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren liegen bereits die Werte der Chemokine bzw. Zytokine CXCL13, G-CSF, IL-1 α , IL-13, IL-16, IL-17, IL-23, CXCL-10, CCL12, CXCL-9, CCL5 und TIMP-1 über denen der nicht infizierten WT Tiere. Tendenziell sinken die Spiegel dann nach Infektion, steigen dann wieder und erreichen an Tag 30 *p.i.* (C5a, G-CSF, IL-1 α , IL-13, IL-16, IL-17 und TIMP-1) ihr Maximum. Die Zytokine bzw. die Chemokine IL-6, IL-10, IL-23 und CCL12 steigen nach Infektion nicht an. Im Vergleich zu WT Tieren zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Mäuse daher nach Infektion verminderte Spiegel von IL-6, IL-10, CCL12 und IL-23, erhöhte Spiegel von CXCL13, C5a, CXCL-10, TIMP-1 und eine differentielle Regulation für G-CSF, GM-CSF, IL-13, IL-16, IL-17, IL-23 und CCL5. Zusätzlich zum *Mouse Cytokine Array* wurden mittels ELISA einige klassische Zytokine der unspezifischen Immunantwort im Serum analysiert (**Abb. 4.20 B-F**). Es wurden je 3 Tiere pro Genotyp an den Tagen 0, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30, 36, 60 *p.i.* gemessen. Eine Ausnahme ist in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren an Tag 30 *p.i.* und in beiden Genotypen an Tag 36 *p.i.* gegeben, da aufgrund der erhöhten Mortalität zu diesen Zeitpunkten nur noch 2 Versuchstiere zur Verfügung standen. Die Zeitpunkte wurden bewusst eng gewählt, damit die zu untersuchenden Parameter über den gesamten Zeitraum hinweg, vor allem auch im Übergang von der akuten in die chronische Phase, bestimmt werden konnten. Der Fokus lag hierbei auf Zytokinen, die eine T-Zell Antwort generieren (IL-12p40), eine TH₁/TH₂ Polarisierung herbeiführen (IL-4 und IFN γ) bzw. eine schützende Immunantwort zur Kontrolle des Parasiten induzieren (TNF) (*Bliss et al., 1999; Yarovinsky, 2014*). Außerdem wurden Stickstoffmonoxid (NO-Metaboliten NO₂/NO₃), als Parameter für die induzierte Parasitenabwehr gemessen. Der IL-12p40 Spiegel (**Abb. 4.20 B**) steigt 5 Tage nach Infektion in den WT Tieren an ($468,6 \pm 81,9$ pg/ml) und ist gegenüber den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ($161,3 \pm 28$ pg/ml) signifikant erhöht ($p = 0,0238$). Bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erfolgt der Anstieg des IL-12p40 Spiegels erst an Tag 7 *p.i.* ($577,1 \pm 182,5$ pg/ml). Bei den WT Tieren sinkt der IL-12p40 Spiegel dann bis Tag 12 *p.i.* ($247 \pm 58,44$ pg/ml) und steigt dann bis Tag 36 *p.i.* wieder an ($541,0 \pm 56,5$ pg/ml). Bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist dieser Abfall und darauffolgende Anstieg nicht zu beobachten, die Werte schwanken stark, liegen dann aber an Tag 30 *p.i.* und Tag 60 *p.i.* deutlich unter den WT Tieren ($321,3 \pm 98,2$ pg/ml bzw. $174,7 \pm 80,7$ pg/ml). Die Konzentration von IL-4 (**Abb. 4.20 C**) ist in WT Tieren im Vergleich zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren an Tag 5 *p.i.* signifikant erhöht ($507,7 \pm 62,14$ pg/ml bzw. $275,8 \pm 21,0$ pg/ml; $p = 0,0241$). In $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist erst an Tag 7 *p.i.* ein Anstieg in der IL-4 Konzentration erkennbar ($567,2 \pm 149,6$ pg/ml). WT Tiere zeigen zwischen Tag 7 *p.i.* und Tag 12 *p.i.* einen Abfall von IL-4, das dann an Tag 14 *p.i.* und Tag 21 *p.i.* wieder minimal ansteigt, dann vorübergehend fällt (Tag 30) und an Tag 36 *p.i.* wieder deutlich steigt ($862,7 \pm 86,67$ pg/ml). $LT\beta R^{-/-}$ Tiere hingegen lassen erst an Tag 12 *p.i.* einen Abfall von IL-4 erkennen ($466,3 \pm 133,6$ pg/ml), das im weiteren Verlauf (Tag 14 *p.i.* bis Tag 36 *p.i.*) langsam ansteigt. An Tag 60 *p.i.* fallen die IL-4 Spiegel im Serum beider Genotypen wieder ab, wobei die IL-4 Level von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gegenüber WT Tieren erhöht sind ($646,6 \pm 123$ pg/ml bzw. $395,8 \pm 73,6$ pg/ml).

Betrachtet man die IFN γ Expression in **Abbildung 4.20 D**, kann man an Tag 7 *p.i.* in WT Tieren einen deutlichen Anstieg erkennen ($2128 \pm 814,4$ pg/ml). Im weiteren Verlauf der Infektion sinkt die Konzentration von IFN γ in WT Tieren zwischen Tag 12 *p.i.* und Tag 14 *p.i.* wieder ab und bleibt bis Tag 60 *p.i.* auf einem konstanten Level ($667,6 \pm 158,8$ pg/ml). Zwar zeigen LT β R $^{-/-}$ Mäuse vor Infektion einen gegenüber WT Tieren höheren IFN γ Spiegel ($400,9 \pm 6,8$ pg/ml bzw. $1.045 \pm 173,8$ pg/ml), lassen aber nach einer Infektion mit *T. gondii* keine Induktion von IFN γ erkennen, die Spiegel sinken an Tag 7 *p.i.* ($414,2 \pm 44,52$ pg/ml) und bleiben im gesamten Verlauf auf diesem Niveau. Bei der Konzentration von TNF (**Abb. 4.20 E**) im Serum von WT Tieren zeigt sich an Tag 7 *p.i.* eine signifikante Erhöhung gegenüber LT β R $^{-/-}$ Tieren ($117,1 \pm 9,7$ pg/ml bzw. $8,53 \pm 8,53$ pg/ml; $p = 0,0072$). Tag 12 *p.i.* sinken die Werte der WT Tiere wieder ($28,04 \pm 5,1$ pg/ml), steigen vorübergehend an (Tag 14 *p.i.* und 21 *p.i.*) und sinken dann an Tag 30 *p.i.* wieder fast auf 0. An Tag 36 *p.i.* zeigt sich dann ein dramatischer Anstieg ($291,77 \pm 22,3$ pg/ml), danach fallen die Werte bis Tag 60 *p.i.* wieder ($62,06 \pm 15,9$ pg/ml). Im Gegensatz dazu ist der TNF Spiegel vor der Infektion im Vergleich zu WT Tieren in LT β R $^{-/-}$ Tieren erhöht (0 pg/ml bzw. $98,98$ pg/ml), steigt aber nach Infektion erst an Tag 12 *p.i.* an ($77,35 \pm 52,03$ pg/ml) und erreicht sein Maximum an Tag 14 *p.i.* ($138,8 \pm 24,12$ pg/ml). Danach fällt er ab (Tag 21 *p.i.*) und steigt dann an Tag 30 *p.i.* und 36 *p.i.* nur wenig an ($55,59 \pm 0$ pg/ml bzw. $58,82 \pm 0$ pg/ml) und liegt an Tag 60 *p.i.* bei $4,7 \pm 4,7$ pg/ml. Die Konzentration von NO (**Abb. 4.20 F**) im Serum von WT Mäusen ist bereits an Tag 5 *p.i.* signifikant gegenüber LT β R $^{-/-}$ Tieren erhöht ($52,27 \pm 8,1$ pg/ml bzw. $17,14 \pm 5,5$ pg/ml; $p = 0,0229$) und steigt an Tag 7 *p.i.* weiter signifikant gegenüber LT β R $^{-/-}$ Tieren an ($316,8 \pm 69,43$ pg/ml bzw. $42,80 \pm 16,78$ pg/ml; $p = 0,0185$). Dieser Anstieg von NO-Metaboliten ist bei den LT β R $^{-/-}$ Tieren zeitlich verschoben und erst an Tag 12 *p.i.* nachweisbar ($184 \pm 44,22$ pg/ml) aber erreicht nicht die Werte der WT Tiere. Wohingegen die NO-Metaboliten Konzentration in WT Tieren wieder absinkt und keinen weiteren Anstieg verzeichnen lässt, zeigen LT β R $^{-/-}$ Tiere einen weiteren kleinen Peak an Tag 30 *p.i.* ($179,8 \pm 76$ pg/ml). *Eine Analyse diverser Chemokine und Zytokine nach Infektion mit T. gondii sowie die Analyse klassischer, an der unspezifischen Immunantwort beteiligter Faktoren zeigt, dass im Gegensatz zu WT Mäusen in LT β R $^{-/-}$ Tieren keine Induktion von IL-6, IL-10 und IFN γ nachgewiesen werden kann und dass überdies, die Zytokinantwort der LT β R $^{-/-}$ Tiere verzögert und generell dereguliert abläuft.*



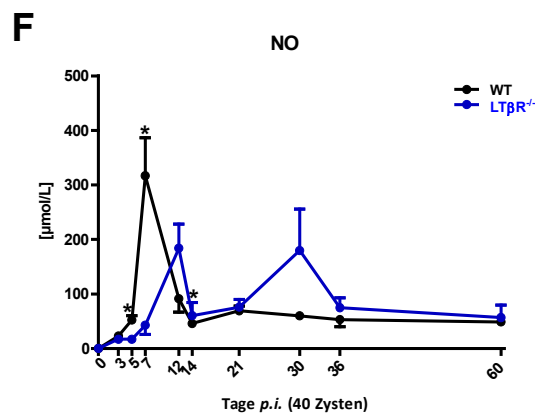


Abb. 4.20 A-F: Cytokine Array Panel A (Abb. 4.20 A) und ELISA von IL-12p40, IL-4, IFN γ , TNF (Abb. 4.20 B-E) und der kolorimetrische Assay von NO (Abb. 4.20 F) im Serum von WT und LT β R^{-/-} Tieren im Verlauf einer *T. gondii* Infektion *i.p.* mit 40 Zysten. (A) Cytokine Array Panel A: Balkendiagramm ausgewählter, differentiell regulierter Zytokine WT und LT β R^{-/-} Tiere an Tag 0, 3, 7, 14 und 30 *p.i.*. Dazugehörige Blots sind im Anhang aufgeführt. (B-E) ELISA: Zytokinexpression von WT und LT β R^{-/-} Tieren an Tag 0, 3, 5, 7, 12, 14, 30, 36 und 60 *p.i.*. (B) IL-12p40 (C) IL-4 (D) IFN γ (E) TNF α (F) Kolorimetrischer Assay von NO. WT Tiere sind in schwarz und LT β R^{-/-} Tiere in blau dargestellt. (n = 3, Anzahl der Versuchstiere (Ausnahme: n = 2 bei den LT β R^{-/-} Tieren für den Tag 30 *p.i.* und in beiden Genotypen n=2 für den Tag 36 *p.i.*); *p < 0,05; **p < 0,005)

4.14 Histopathologie von Leber, Lunge und Gehirn nach einer Infektion mit *T. gondii*

Histopathologische Veränderungen (z.B. Organläsionen) und die Zystenanzahl nach einer Infektion mit *T. gondii* wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Paraffinschnitten (Kap. 3.1.4.3.2) von Leber, Lunge, Herz, Niere, Gehirn und Milz an den Tagen 0, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30, 36 und 60 *p.i.* bestimmt. Dargestellt sind exemplarische HE-Färbungen von der Lunge, der Leber und dem Gehirn von jeweils einem Tier des jeweiligen Genotyps. Zur Quantifizierung morphologischer Unterschiede zwischen WT und LT β R^{-/-} Tieren wurde ein histologisches Scoring von HE-Schnitten basierend auf Lymphozyteninfiltraten und Zysten angewandt (Tab. 4.5 und Tab. 4.6). Histologische Veränderungen waren in beiden Genotypen in Herz, Niere und Milz (Daten nicht gezeigt) - am ausgeprägtesten aber in Lunge, Leber und Gehirn - zu erkennen. LT β R-defiziente Mäuse besitzen, wie bereits erwähnt, im nicht infizierten Zustand charakteristische Lymphozyteninfiltrate, die um perivaskuläre Areale der Lunge, der Milz und der Leber liegen (Futterer *et al.*, 1998). Während WT Tiere an Tag 7 *p.i.* nur kleine Infiltrate zeigen, ist in LT β R^{-/-} Tieren ein deutlicher Anstieg großflächiger, inflammatorischer Infiltrate in der Lunge zu sehen (Abb. 4.21 C und D). Im weiteren Verlauf der Infektion lässt sich spätestens an Tag 21 *p.i.* im Lungengewebe der WT Tiere eine Regression der Infiltrate erkennen, wohingegen LT β R^{-/-} Tieren noch immer große inflammatorische Areale aufweisen (Abb. 4.21 E und F), die auf eine chronische interstitielle Pneumonitis hinweisen (Tab. 4.5). Neben Unterschieden zwischen WT und LT β R^{-/-} Mäusen im Ausmaß der Inflammationsherde in der Lunge kann zudem ein

Unterschied im Auftreten erster Gewebezysten von *T. gondii* nachgewiesen werden. WT Tiere lassen erst an Tag 14 *p.i.* Zysten erkennen, wohingegen in $LT\beta R^{-/-}$ Tiere bereits an Tag 5 *p.i.* Zysten im Lungengewebe zu sehen sind (Tab. 4.6). Beide Genotypen zeigen bereits ab Tag 7 *p.i.* Zysten in der Leber (Tab. 4.6). Darüber hinaus weisen Mäuse mit einer Defizienz im $LT\beta R$ im Vergleich zu WT Tieren eine deutliche Zunahme großflächiger Infiltrate im Lebergewebe von Tag 7 *p.i.* bis Tag 21 *p.i.* und an Tag 21 *p.i.* im Vergleich zu WT Tieren zusätzliche Fettvakuolen in den Hepatozyten auf (Abb. 4.22 C-F). Auch in Gehirnschnitten sind Zysten von *T. gondii* in beiden Genotypen nachweisbar. Wohingegen WT Tiere relativ spät, das heißt ab Tag 30 *p.i.*, Zysten aufweisen, sind in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren bereits ab Tag 14 *p.i.* Zysten in einer deutlich erhöhten Anzahl zu erkennen (Tab. 4.6). An Tag 60 *p.i.* ist der Unterschied in der Zystenlast im Gehirngewebe zwischen WT und $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen noch deutlicher, $LT\beta R^{-/-}$ Tiere weisen eine um den Faktor 2 erhöhte Zystenlast auf (Abb. 4.23 A und B). *Insgesamt weisen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere nach einer Infektion mit *T. gondii* neben ihren charakteristischen kleinen Lymphozyteninfiltraten einen massiven Anstieg großflächiger inflammatorischer Infiltrate im Lungen- und im Lebergewebe auf. Darüber hinaus werden die histopathologischen Veränderungen in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren durch ein früheres, und um Faktor 2 gesteigertes Vorkommen von Zysten begleitet.*

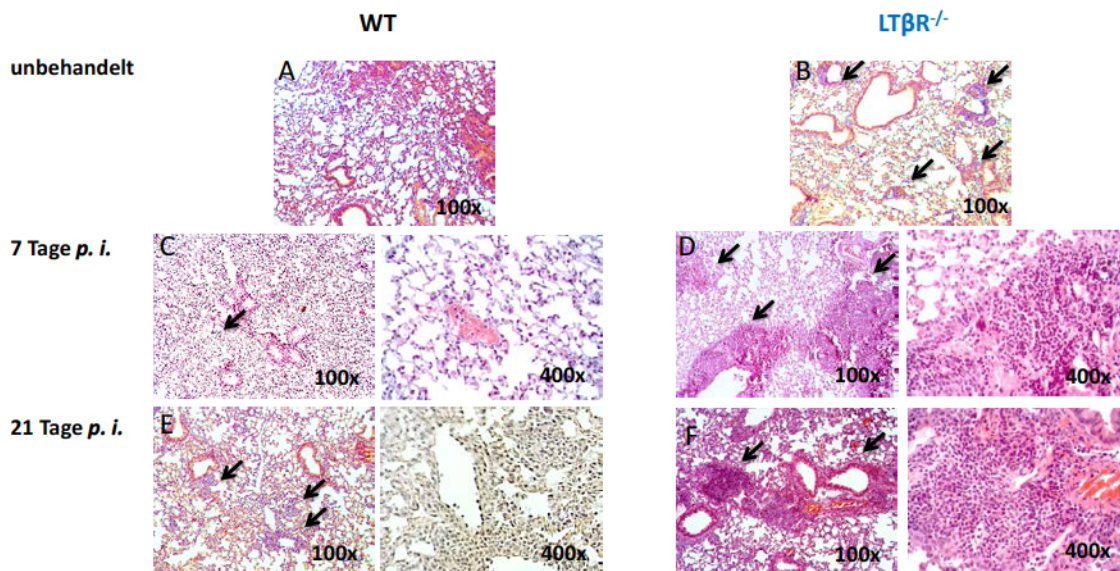


Abb. 4.21 A-F: H&E-Färbungen der Lunge von Wildtyp und $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen vor und nach Infektion mit 40 Zysten von *T. gondii* ME49 an den Tagen 0, 7 und 21 *p.i.*. Pfeile zeigen inflammatorische Areale an. (Vergrößerung wie angegeben, 100x und 400x).

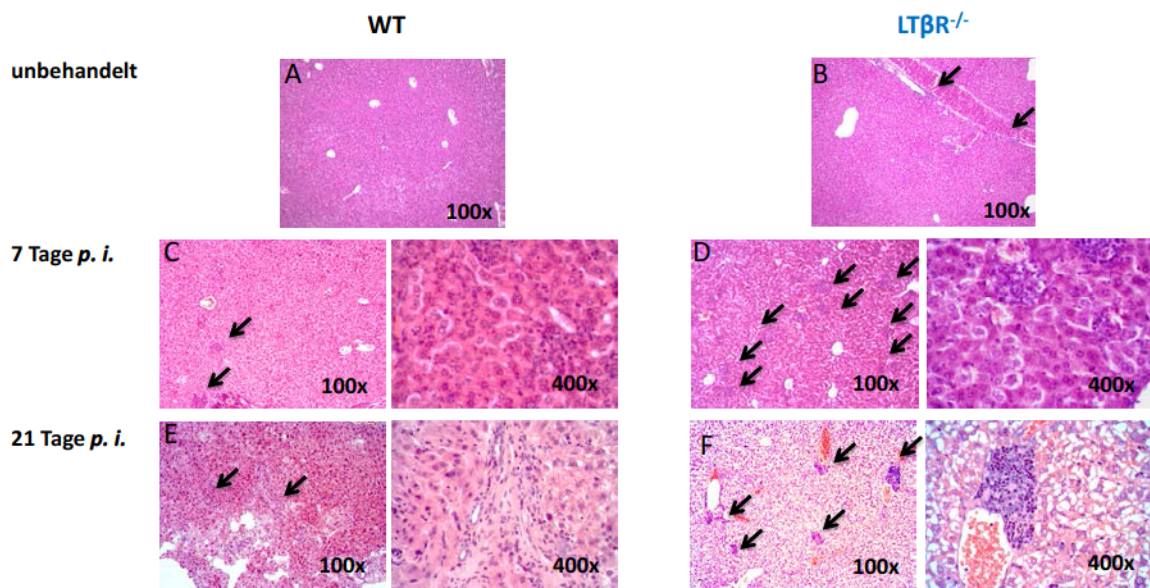


Abb. 4.22 A-F: H&E-Färbungen der Leber von Wildtyp und LTβR^{-/-} Mäusen nach *i.p.* Infektion mit 40 Zysten *T. gondii* ME49 an den Tagen 0, 7 und 21 *p. i.*. Pfeile zeigen inflammatorische Areale an. (Vergrößerung wie angegeben, 100x und 400x).

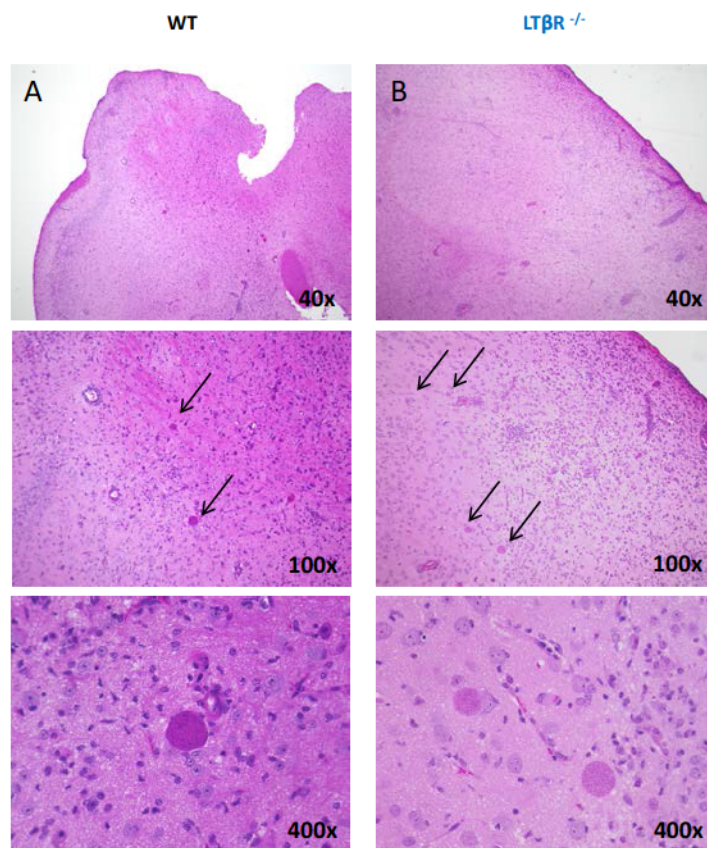


Abb. 4.23 A-B: H&E-Färbung des Gehirns von Wildtyp und LTβR^{-/-} Mäusen nach *i.p.* Infektion mit 40 Zysten *T. gondii* ME49 am Tag 60 *p. i.*. (A) WT Tiere (B) LTβR^{-/-} Tiere. Pfeile zeigen Zysten. (Vergrößerung wie angegeben, 100x und 400x).

Lymphozyten Infiltrate [H/E]

Organ	Genotyp	3	5	7	12	14	21	30	36	Tage <i>p.i.</i> (40 Zysten)
Leber	WT	-	-	++	++	-	+	-	-	
	LTβR ^{-/-}	+	++	++	+++	+	-	-	-	
Lunge	WT	-	-	+	++	-	(+)	-	-	
	LTβR ^{-/-}	++	+++	+++	++	++	++	++	++	
Gehirn	WT	-	-	(+)	+	-	-	-	-	
	LTβR ^{-/-}	-	-	(+)	(+)	-	+	-	-	
Milz	WT	-	-	-	+	-	-	-	-	
	LTβR ^{-/-}	-	-	(+)	(+)	+	+	-	-	
Herz	WT	-	-	-	+	-	+	(+)	-	
	LTβR ^{-/-}	-	-	+	++	-	-	+	+	
Niere	WT	+	+	+	+	++	-	-	-	
	LTβR ^{-/-}	(+)	+	(+)	(+)	+	+	+	-	

Tab. 4.5: Scoring histologischer Befunde: Auftreten von lymphozytären Infiltraten in Leber, Lunge, Gehirn, Milz, Herz und Niere von Wildtyp und LTβR^{-/-} Mäusen nach *i.p.* Infektion mit 40 Zysten *T. gondii* ME49 an den Tagen 0, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30 und 36 *p.i.*. Score: + minimales Auftreten; ++ mittelschweres Auftreten; +++ schwerwiegendes Auftreten (abzüglich der charakteristischen Lymphozyteninfiltrate in LTβR^{-/-} Mäusen).

Zysten [H/E]

Organ	Genotyp	0	3	5	7	12	14	21	30	36	Tag ^e <i>p.i.</i> (40 Zysten)
Leber	WT	-	-	-	3-4	2-3	-	-	-	-	
	LTβR ^{-/-}	-	-	-	2-3	4-5	5-8	-	-	-	
Lunge	WT	-	-	-	-	-	4	-	-	-	
	LTβR ^{-/-}	-	-	(1)	2	4	2	-	-	-	
Gehirn	WT	-	-	-	-	-	(1)	(1)	1-2	2-5	
	LTβR ^{-/-}	-	-	-	-	-	2-3	3-4	6-15	13-18	
Milz	WT	-	-	-	-	(1)	(1)	-	-	-	
	LTβR ^{-/-}	-	-	-	-	-	(1)	-	-	-	
Herz	WT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LTβR ^{-/-}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Niere	WT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LTβR ^{-/-}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

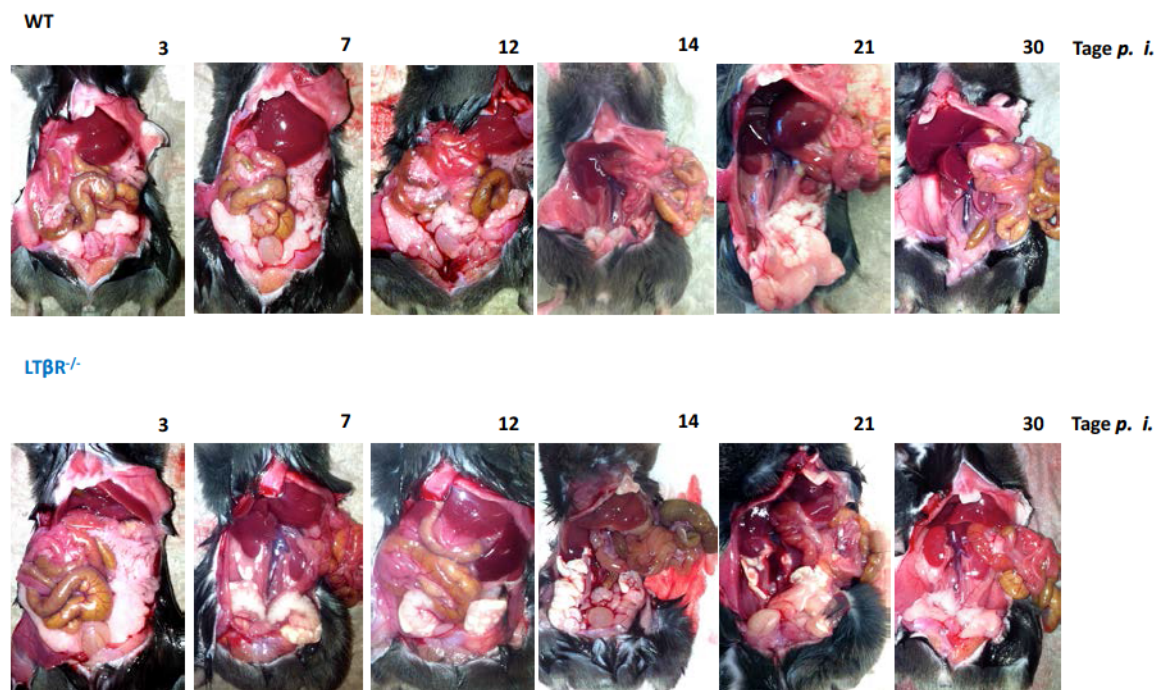
Tab. 4.6: Scoring histologischer Befunde: Auftreten von Zysten in Leber, Lunge, Gehirn, Milz, Herz und Nieren von Wildtyp und LTβR^{-/-} Mäusen nach *i.p.* Infektion mit 40 Zysten *T. gondii* ME49 an den Tagen 0, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30 und 36 *p.i.*.

4.15 Lipombildung im Retroperitonealraum

Neben den typischen *T. gondii*-induzierten pathologischen Veränderungen in Leber, Lunge und Gehirn (Kap. 4.14) kann in beiden Genotypen *p.i.* makroskopisch ein Auftreten lipomartiger Tumore im Retroperitonealraum beobachtet werden. Der Verlauf der Lipombildung wurde in WT und LTβR^{-/-} Tieren nach einer Toxoplasmen-Infektion fotografisch dokumentiert (Abb. 4.24 A). In WT Tieren können ab Tag 7 *p.i.* erste Anzeichen in der Entstehung von Lipomen beobachtet werden, wobei es bereits ab Tag 12 *p.i.* zu einer Regression derselben kommt. Bei LTβR^{-/-} Tiere treten ebenfalls ab Tag 7 *p.i.* erste Anzeichen in der Ausbildung von Lipomen auf. Hierbei verzögert sich die Regression, da diese Lipome im Gegensatz zu denen der WT Tieren bis Tag 14 *p.i.* stark vergrößert vorliegen und erst an Tag 21 *p.i.* langsam zurückgehen (Abb. 4.24 A).

Überraschenderweise sind in der akuten Phase in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren weitere lipomartige Geschwüre auch im Bereich der Leber zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). An Tag 14 *p.i.* wurde einem $LT\beta R^{-/-}$ Tier ein Teil eines Tumors entnommen, ein H&E gefärbter Gewebeschnitt hergestellt und untersucht (Abb. 4.24 B). Die histologische Untersuchung des Gewebes bestätigte die Vermutung, dass es sich bei dem entnommenen Gewebe um ein Lipom handelt. Lipome werden als langsam wachsende, geschwulstartige Ansammlungen von Fettgewebe (gutartige Tumore) bezeichnet (Martinez *et al.*, 2003). Sie liegen abgekapselt vor und sind meist von einer sehr dünnen Bindegewebskapsel umgeben. Das vorliegende Lipom zeigt kleine Lipoblasten und große Lipozyten (Adipozyten), ist von Blutgefäßen durchzogen und weist zudem am Randsaum des Gewebes nekrotische Bereiche mit nukleären Ablagerungen von Lymphozyten auf.

Neben histopathologischen Veränderungen wie u.a. Lymphozyteninfiltraten und Gewebezysten, sind im Retroperitonealraum nach einer Infektion mit *T. gondii* in WT sowie $LT\beta R^{-/-}$ Tieren Lipome zu finden. Im Gegensatz zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, die eine verstärkte Ausprägung dieser Lipome bis Tag 21 *p.i.* zeigen, weisen WT Tiere eine schnelle Rückbildung ab Tag 12 *p.i.* auf.



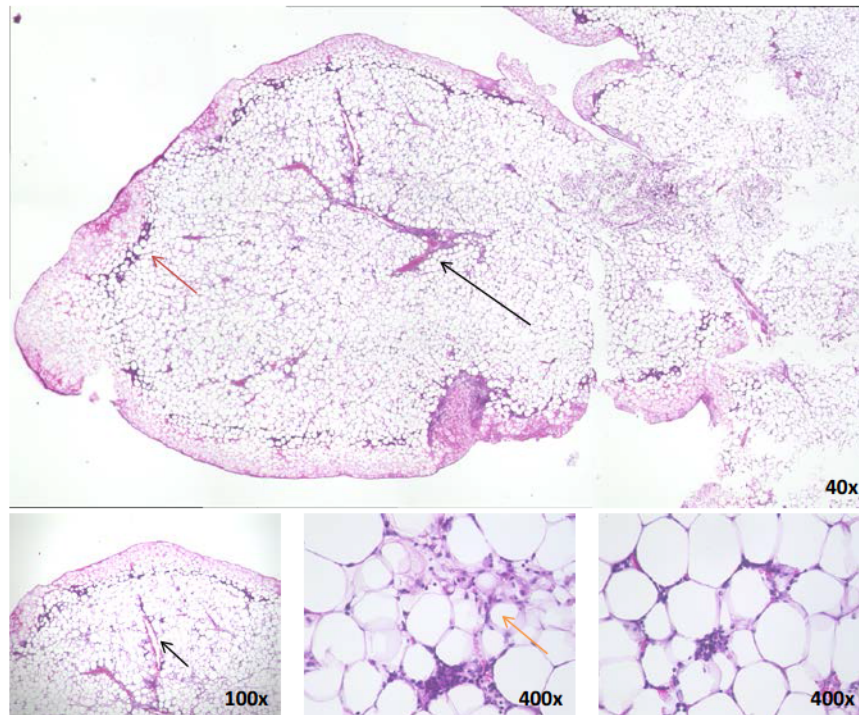


Abb. 4.24 A-B: Makroskopische Darstellung der Lipome und H&E gefärbter Schnitt eines Lipoms nach *i.p.* Infektion mit 40 Zysten *T. gondii* ME49. (A) Makroskopische Aufnahmen von infizierten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren an den Tagen 3, 7, 12, 14, 21 und 30 *p.i.* (B) H&E-Färbung eines Lipoms einer $LT\beta R^{-/-}$ Maus am Tag 14 *p.i.* Pfeile zeigen histologische Auffälligkeiten an: rot = nekrotische Bereiche; schwarz = Blutgefäße und orange = Lipozyt. (Vergrößerung wie angegeben, 40x, 100x und 400x).

4.16 Parasitenlast

Nach Isolierung von DNA aus verschiedenen Organen (Hirn und Lunge) von je 3 WT als auch $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nach einer Infektion mit je 40 Zysten des Toxoplasmen Stammes ME49 wurde an den Tagen 0, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30 und 36 *p.i.* die Parasitenlast durch eine Toxoplasmen-spezifische quantitative Real-Time PCR (Kap. 3.3.2.4) mit Toxoplasma-spezifischen Primern bestimmt. Eine Ausnahme ist in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren an Tag 30 *p.i.* und in beiden Genotypen an Tag 36 *p.i.* gegeben, da aufgrund der erhöhten Mortalität zu diesen Zeitpunkten lediglich 2 Versuchstiere zur Verfügung standen. Der Nachweis von Zysten im Gehirn definiert den Übergang von der akuten zur chronischen Phase. In nicht infizierten Tieren beider Genotypen sind mittels qRT-PCR keine Parasiten nachzuweisen (Abbildung 4.25 A). Im Verlauf nach Infektion zeigt sich von Tag 3 *p.i.* bis Tag 21 *p.i.* ein steter Anstieg der Parasitenlast in der Lunge von WT und $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen. Auffällig ist dabei, dass Mäuse mit einer Defizienz im $LT\beta R$ eine erhöhte Parasitenlast u.a. an Tag 21 *p.i.* aufweisen (WT: 1.0×10^{10} ; $LT\beta R^{-/-}$: 1.0×10^{12}). In der chronischen Phase ist ein Rückgang der Parasitenlast in beiden Genotypen zu verzeichnen.

Eine quantitative Analyse der Parasitenlast im Gehirn zeigt einen ähnlichen Verlauf in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren (**Abb. 4.25 B**). Beide Genotypen lassen einen Anstieg der Parasitenzahlen erkennen, wobei $LT\beta R^{-/-}$ Tiere gegenüber WT Tieren eine erhöhte Parasitenlast, speziell an Tag 12 *p.i.* (1.0×10^{14} bzw. 1.0×10^6) und Tag 14 *p.i.* (1.0×10^{15} bzw. 1.0×10^{10}) aufweisen. Eine Regression der Parasitenlast in $LT\beta R^{-/-}$ Gehirnen bleibt aus. Neben einer quantitativen Bestimmung der Zystenzahlen im Gehirn mittels qRT-PCR wurden die Zystenzahlen durch Isolierung der Zysten aus dem Gehirn (*Kap. 3.1.4.2.2*) ermittelt. Durch diese Bestimmung der Zystenzahlen im Gehirn von WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren kann der massive Anstieg der Zystenzahlen in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren bestätigt werden (**Abb. 4.25 C**). Im Vergleich zu WT Tieren können in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren signifikant erhöhte Werte an den Tagen 14 *p.i.* ($233,3 \pm 33,3$ Zysten bzw. $666,7 \pm 88,2$ Zysten; $p = 0,0101$), 21 *p.i.* ($466,7 \pm 66,7$ Zysten bzw. $844,4 \pm 72,85$ Zysten; $p = 0,0187$), 30 *p.i.* ($700 \pm 57,74$ Zysten bzw. 1900 ± 100 Zysten; $p = 0,0015$) und 36 *p.i.* ($1350 \pm 28,9$ Zysten bzw. $2350 \pm 144,3$ Zysten; $p = 0,0025$) nachgewiesen werden.

Insgesamt weist die quantitative Analyse der Parasitenlast generell mehr Toxoplasmen-DNA in der Lunge und dem Gehirn von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nach. Die Zystenzahl im Gehirn von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist dabei, insbesondere in der chronischen Phase, ungefähr um den Faktor $\sim 1,7$ erhöht.

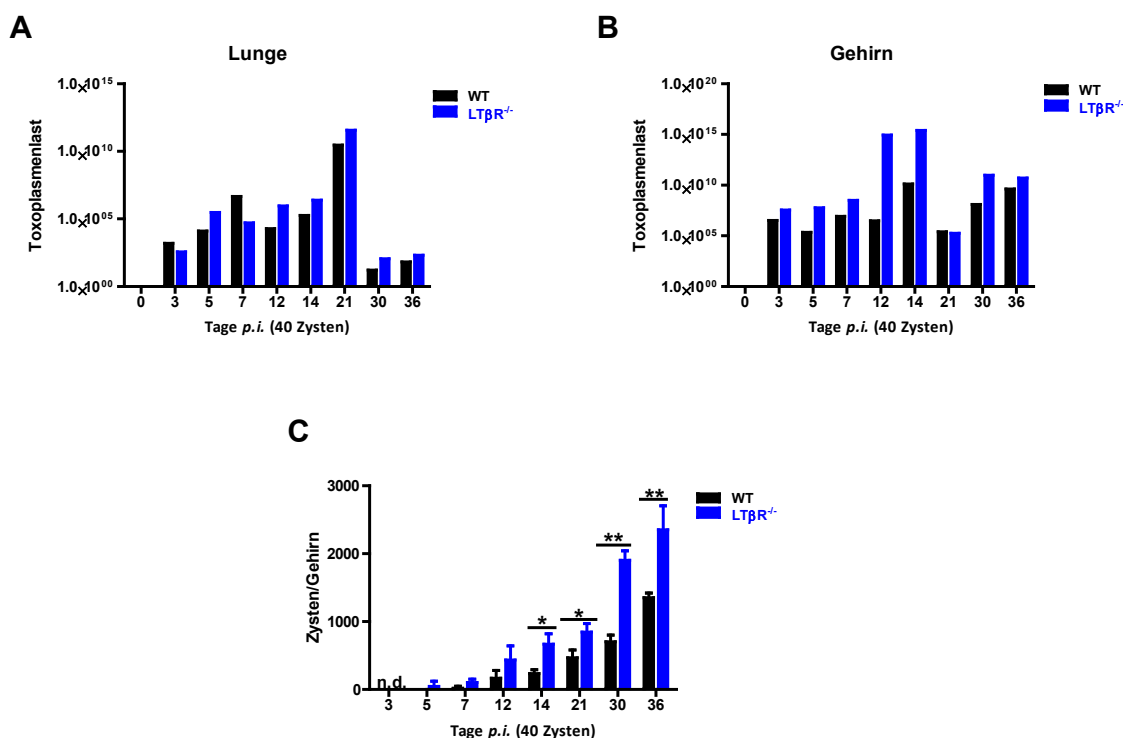


Abb. 4.25 A-C: Bestimmung der Parasitenlast in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nach *i. p.* Infektion mit 40 Zysten *T. gondii* ME49 an den Tagen 0, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30 und 36 *p.i.*. (A) quantitative RT-PCR der Toxoplasmen-DNA in der Lunge (B) quantitative RT-PCR der Toxoplasmen-DNA im Gehirn (C) Zystenzahl im Gehirn. (n = 3, Anzahl der Versuchstiere (Ausnahme: n = 2 bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren für die Tage 30 *p.i.* und 36 *p.i.*); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$)

4.17 Charakterisierung der Milz nach einer *T. gondii* Infektion

Parasitäre Infektionen führen in der Regel zu einer Milzvergrößerung (Splenomegalie) (Hoffman et al., 1984; Kim et al., 2009). Eine Vergrößerung der Milz kann als Immunantwort zur Entwicklung protektiver Reaktionen verstanden werden und kann mit einer Vergrößerung von Leber, Lunge oder Herz einhergehen. Um eine Beteiligung der Organe an der Immunantwort gegen *T. gondii* bzw. weitere Veränderungen durch die Infektion zu untersuchen, wurden nach der intraperitonealen Infektion mit 40 Zysten Milz, Leber und Lunge in je 3 WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30, 36 p.i.) nach Infektion entnommen, gewogen und ihre Zellzahl bestimmt (Kap. 3.1.4.2.4). Eine Ausnahme ist in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren an Tag 30 p.i. und in beiden Genotypen an Tag 36 p.i. gegeben, da aufgrund der erhöhten Mortalität zu diesen Zeitpunkten lediglich 2 Versuchstiere zur Verfügung standen. Das Milzgewicht nicht infizierter $LT\beta R^{-/-}$ Tiere lässt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu WT Tieren erkennen ($0,146 \pm 0,02$ g bzw. $0,153 \pm 0,02$ g; **Abb. 4.26 A**). In der akuten Phase ist ein Anstieg des Milzgewichts in beiden Genotypen zu verzeichnen, der bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren jedoch nur minimal ist. In WT Tieren ist das Milzgewicht gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren signifikant an den Tagen 5 p.i. ($0,15 \pm 0$ g bzw. $0,10 \pm 0$ g; $p = 0,0101$), 7 p.i. ($0,18 \pm 0$ g bzw. $0,13 \pm 0$ g; $p = 0,0036$), 12 p.i. ($0,31 \pm 0,03$ g bzw. $0,16 \pm 0,02$ g; $p = 0,0221$), 14 p.i. ($0,36 \pm 0,02$ g bzw. $0,18 \pm 0,01$ g; $p = 0,0025$) und 21 p.i. ($0,36 \pm 0,02$ g bzw. $0,13 \pm 0,02$ g; $p = 0,0020$) erhöht. Die Erhöhung des Milzgewichts in den WT Tieren geht dabei mit einer ebenfalls erhöhten Zellzahl einher, die signifikant im Vergleich zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren an Tag 3 p.i. ($5,1 \times 10^8$ Zellen/Milz bzw. $2,7 \times 10^8$ Zellen/Milz; $p = 0,0123$) und 14 p.i. ($2,8 \times 10^9$ Zellen/Milz bzw. $1,5 \times 10^9$ Zellen/Milz; $p = 0,0491$) erhöht ist (**Abb. 4.26 B**). An Tag 30 sinkt das Milzgewicht in den WT Tieren, ist aber gegenüber den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren immer noch signifikant erhöht ($0,17 \pm 0$ g bzw. $0,12 \pm 0,0$ g; $p = 0,0020$). An Tag 36 p.i. sinkt das Milzgewicht wieder auf den Wert vor Infektion ab, so dass kein Unterschied zwischen den WT und $LT\beta R^{-/-}$ Milzgewichten gegeben ist ($0,12 \pm 0,01$ g bzw. $0,10 \pm 0$ g). Die Zellzahlen der Milz an den Tagen 30 p.i. und 36 p.i. zeigen keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen und nähern sich denen nicht infizierter Tiere an. Histologische Untersuchungen von H&E-gefärbten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Milzschnitten hinsichtlich Veränderungen in der Milzarchitektur nach einer Infektion mit *T. gondii* zeigen nur geringe Umstrukturierungen (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt zeigen nur WT Tiere einen Anstieg des Milzgewichtes zwischen den Tagen 5 p.i. und 30 p.i.. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere weisen nur einen minimalen Anstieg des Milzgewichtes auf. Bei beiden Mauslinien erfolgt eine Erhöhung der Zellzahl, die in WT Tieren jedoch an Tag 14 p.i. signifikant gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöht ist.

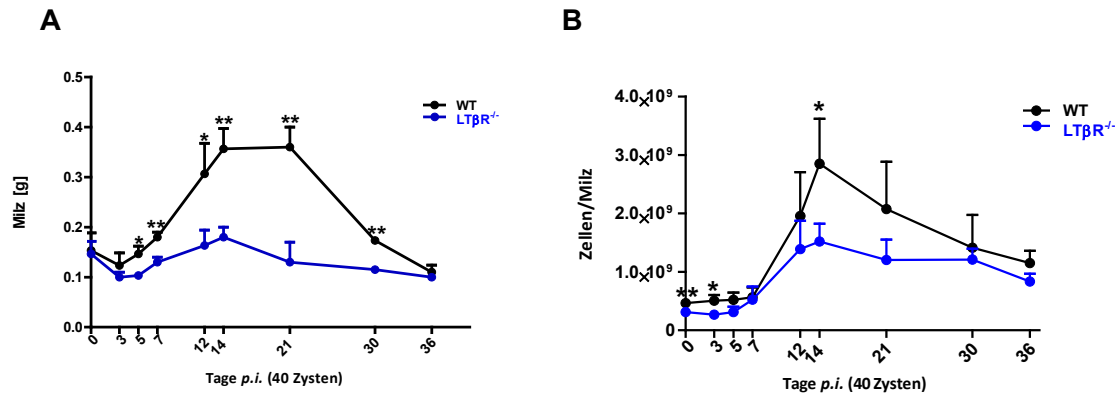


Abb. 4.26 A-B: Milzgewicht und Zellzahl in WT und LTβR^{-/-} Tieren nach *i.p.* Infektion mit 40 Zysten *T. gondii* ME49 an den Tagen 0, 3, 5, 7, 12, 14, 21, 30 und 36 *p.i.*. (A) Milzgewicht (B) Zellzahl/Milz. (n = 3, Anzahl der Versuchstiere (Ausnahme: n = 2 bei den LTβR^{-/-} Tieren für den Tag 30 *p.i.* und in beiden Genotypen für den Tag 36 *p.i.*); *p < 0,05; **p < 0,005)

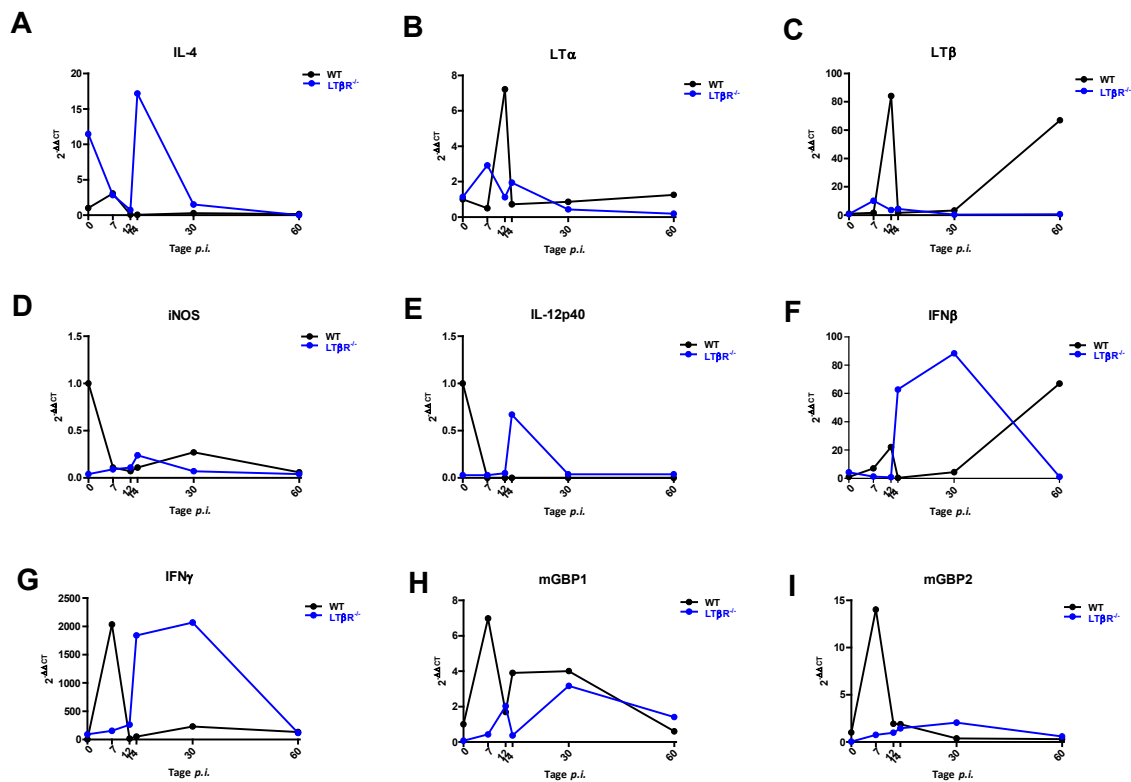
4.18 Genexpression in der Lunge und Milz während einer *T. gondii*-Infektion

Nach der Isolierung von RNA aus Lunge und Milz *T. gondii*-infizierter Tiere beider Genotypen (WT und LTβR^{-/-}) wurde die Genexpression mittels quantitativer RT-PCR (Kap. 3.3.2.4) bestimmt. Die Zeitpunkte wurden folgendermaßen gewählt: 0, 7, 12, 14, 30 und 60 Tage nach Infektion. Die relative Genexpression nicht infizierter WT Tiere (2^{-ΔΔCT}) wurde als '1' definiert und alle weiteren Genexpressionswerte auf diesen Wert bezogen. Werte < 1 stehen für eine Herunterregulation und Werte > 1 für eine Stimulation der Genexpression. Die in **Abbildung 4.27 A** dargestellte Expression von IL-4 in der Lunge zeigt 7 Tage nach Infektion eine 3-fache Induktion der IL-4 Expression in WT Tieren. Im weiteren Verlauf nach Infektion ist in WT Tieren keine weitere Erhöhung der IL-4 mRNA zu sehen. Gegensätzlich verhält sich die Expression in LTβR^{-/-} Tieren, die bereits nicht infiziert eine 11-fach erhöhte Expression von IL-4 zeigt, die nach Infektion geringer wird und an Tag 14 *p.i.* wieder kurz steigt, um danach wieder deutlich zu sinken. Wie in **Abbildung 4.27 B** und **C** dargestellt ist in der Lunge von WT Tieren an Tag 12 *p.i.* eine ungefähr 8-fache Erhöhung der Expression der LTα mRNA und eine 80-fache Induktion der LTβ mRNA gegeben. LTβR^{-/-} Tiere zeigen in der Lunge einen früheren (Tag 7), aber geringeren Anstieg der LTα (3-fach) und LTβ mRNA (10-fach). Im Vergleich zu WT Tieren zeigen LTβR^{-/-} Tiere bereits vor Infektion eine deutlich verminderte iNOS Expression in der Lunge (**Abb. 4.27 D**). Nach einer Infektion mit *T. gondii* sinkt in WT Tieren die Expression der iNOS und bleibt im gesamten Untersuchungszeitraum deutlich unter 1. Infizierte LTβR^{-/-} Tiere lassen ebenfalls keine Induktion der iNOS mRNA erkennen. Die Expression der IL-12p40 mRNA (**Abb. 4.27 E**) in der Lunge von nicht infizierten LTβR^{-/-} Tieren ist unter der Nachweisgrenze. Nach einer Infektion mit *T. gondii* sinkt in WT Tieren die Expression von IL-12p40 unter 1 und bleibt bis zum Versuchsende in diesem Bereich. Infizierte LTβR^{-/-} Tiere lassen an Tag 14 *p.i.* eine Induktion der IL-12 mRNA erkennen.

Die Expression von IFN β in der Lunge infizierter WT Tiere steigt am Tag 12 *p.i.* um das 21-fache, sinkt dann wieder und zeigt einen weiteren, 65-fachen Anstieg an Tag 60 *p.i.* (**Abb. 4.27 F**). LT β R^{-/-} Tiere zeigen an Tag 14 *p.i.* eine gegenüber den WT Tieren deutlich erhöhte Expression von IFN β , die an Tag 30 *p.i.* weiter ansteigt und eine insgesamt 90-fache Induktion der IFN β mRNA zeigt. An Tag 60 *p.i.* sind die Werte wieder vergleichbar mit den nicht infizierten Tieren. Die Expression der IFN γ mRNA (**Abb. 4.27 G**) in der Lunge von WT Tieren lässt 7 Tage nach Infektion eine deutliche, 2000-fache Induktion erkennen. Die relative Expression sinkt wieder auf die Normwerte und zeigt an Tag 30 *p.i.* eine weitere, 250-fache Erhöhung der IFN γ mRNA. In LT β R^{-/-} Tieren ist im Gegensatz zu WT Tieren erst später, an Tag 14 *p.i.* ebenfalls eine ca. 200-fache Induktion der IFN γ mRNA gegeben, die auch am Tag 30 *p.i.* noch zu sehen ist. Da mGBPs (murine Guanylat-bindende Proteine) die mit am stärksten durch IFN γ -induzierten Gene sind (*Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2013*), wurde auch deren Expression im Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* in WT und LT β R^{-/-} Tieren untersucht. In der Lunge von WT Tieren kann bereits früh nach Infektion, Tag 7 *p.i.* ein Anstieg der Expression von mGBP2, mGBP4 und mGBP5 nachgewiesen werden, danach sinkt die Expression wieder (**Abb. 4.27 I, K und L**). Die Expression in den LT β R^{-/-} Tieren ist vor Infektion im Vergleich zu den WT Tieren erniedrigt und wird nach Infektion nicht induziert. Die Expression von mGBP6 und mGBP9 steigt in WT Tieren nach Infektion ebenfalls vorübergehend an, allerdings erst an Tag 12 *p.i.* (mGBP6: 20-fach; mGBP9: 63-fach). Bei den LT β R^{-/-} Tieren zeigen mGBP6 und mGBP9 ebenfalls erniedrigte Werte vor Infektion und kein Anstieg der Expression dieser Gene nach Infektion (**Abb. 4.27 M und P**). Die Expression von mGBP1 (**Abb. 4.27 H**) steigt in WT Tieren 7 Tage nach Infektion an, sinkt an Tag 12 *p.i.* wieder, um an Tag 14 *p.i.* erneut anzusteigen und an Tag 60 *p.i.* wieder annähernd auf den Wert vor Infektion zurückzukehren. LT β R^{-/-} Tiere zeigen diesen doppelten Anstieg ebenfalls, allerdings zeitverzögert: der erste Anstieg ist an Tag 14 *p.i.* zu sehen (2-fach), der zweite an Tag 30 *p.i.* (3-fach). Die mGBP3 Expression (**Abb. 4.27 J**) zeigt in den WT Tieren an Tag 7 *p.i.* einen vorübergehenden Anstieg, danach sinken die Werte deutlich unter 1. Die LT β R^{-/-} Tiere zeigen vor Infektion eine deutlich niedrigere Expression der mGBPs als die WT Tiere, zeigen dann aber einen zwar absolut gesehen niedrigeren, aber deutlichen und anhaltenderen Anstieg in der Expression von mGBP3 (Tag 7 *p.i.* bis Tag 12 *p.i.*) nach Infektion. Ein ähnliches Expressionsmuster ist für beide Genotypen bei mGBP8 (**Abb. 4.27 O**) zu beobachten: Ein Anstieg der Expression an Tag 7 *p.i.* bei den WT Tieren, ein geringerer aber anhaltenderer Anstieg (Tag 7 *p.i.* bis Tag 12 *p.i.*) bei den LT β R^{-/-} Tieren. Die Expression von mGBP7 sinkt in den WT Tieren nach Infektion deutlich ab und bleibt auf diesem niedrigen Level (**Abb. 4.27 N**). In den LT β R^{-/-} Tieren ist die mGBP7 Expression vor Infektion im Vergleich zu den WT Tieren deutlich erniedrigt, steigt nach Infektion geringfügig an (Tag 7 *p.i.*) und sinkt dann wieder. GTPBP1 (*GTP-Binding Protein 1*) ist strukturell vergleichbar mit den mGBPs und seine Expression ist eine mit mGBPs nicht verwandte GTPase, welche ebenfalls als IFN γ induzierbar beschrieben wurde (*Degrandi*

et al., 2007; Senju et al., 2000). Die GTPBP1 Expression steigt in den WT Tieren nach Infektion an Tag 12 *p.i.* vorübergehend, aber deutlich um das 20-fache an. In den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist ein kleiner, vorübergehender, 6-facher Anstieg an Tag 14 *p.i.* zu beobachten.

Generell weisen WT Tiere im Rahmen einer *T. gondii* Infektion in der Lunge früh nach Infektion eine erhöhte Expression aller mGBPs, insbesondere von mGBP9 auf (mit Ausnahme von mGBP7) auf, wohingegen infizierte $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in der Lunge im allgemeinen eine reduzierte (mGBP2, mGBP3, mGBP4, mGBP5, mGBP6, mGBP8 und mGBP9) bzw. zumindest verzögerte (mGBP1) Expression aufweisen.



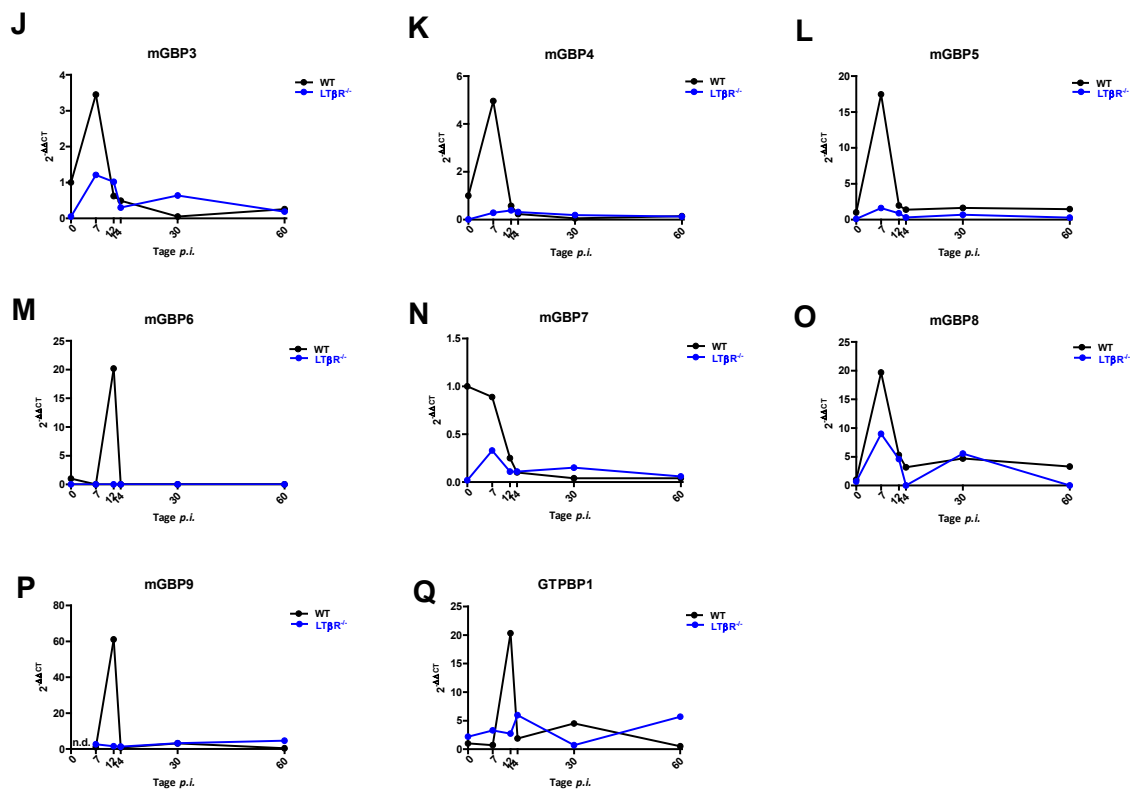


Abb. 4.27 A-Q: Quantitative RT-PCR Analyse differentiell regulierter Gene in der Lunge nach *i. p.* Infektion mit 40 Zysten *T. gondii* ME49 an den Tagen 0, 7, 12, 14, 30 und 60 *p.i.* in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. Die relative Genexpression nicht infizierter WT Tiere ($2^{\Delta\Delta CT}$) wurde als '1' definiert und alle Genexpressionswerte auf diesen Wert bezogen. Werte < 1 stehen für eine Reduktion und Werte > 1 für eine Stimulation der Genexpression. Die Abbildungen zeigen den $2^{\Delta\Delta CT}$ Wert von: (A) IL-4 (B) $LT\alpha$ (C) $LT\beta$ (D) iNOS (E) IL-12p40 (F) IFN β (G) IFN γ (H) mGBP1 (I) mGBP2 (J) mGBP3 (K) mGBP4 (L) mGBP5 (M) mGBP6 (N) mGBP7 (O) mGBP8 (P) mGBP9 (Q) GTPBP1. WT Tiere sind in schwarz und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau dargestellt. (n = 3, Anzahl der Versuche in Triplikaten)

Bei einer Analyse der Genexpression von IL-4 mRNA in der Milz ist nach einem initialen Abfall an Tag 7 an Tag 12 *p.i.* in WT Tieren eine ca. 2-fache Induktion der Expression (**Abb. 4.28 A**) zu beobachten. Im weiteren Verlauf nach Infektion ist in der Milz von WT Tieren keine weitere Erhöhung in der IL-4 mRNA gegeben. Infizierte $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigen ebenfalls einen Abfall, aber keinen anschließenden Anstieg der IL-4 Expression. Die $LT\alpha$ Expression sinkt in der Milz der WT Tiere nach Infektion deutlich ab und bleibt während des gesamten Beobachtungszeitraums auf diesem Level. In nicht infizierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren liegt die relative $LT\alpha$ Expression deutlich unter der der WT Tiere und steigt im Laufe der Infektion nicht an (**Abb. 4.28 B**). Die Expression von $LT\beta$ (**Abb. 4.28 C**) lässt in der Milz von WT Tieren zwischen Tag 14 *p.i.* bis Tag 60 *p.i.* einen 7-9-fachen Anstieg erkennen. In $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist bereits an Tag 7 *p.i.* ein 2-facher Anstieg der $LT\beta$ mRNA zu sehen, der bis Tag 30 *p.i.* gleichbleibend erhöht bleibt und erst an Tag 60 *p.i.* absinkt. Die in **Abbildung 4.28 D** dargestellte Expression der iNOS mRNA hingegen zeigt in der Milz von infizierten WT Tieren eine 150-fache Induktion an Tag 14 *p.i.*, die bereits an Tag 30 *p.i.* wieder absinkt. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere lassen ebenfalls an Tag 14 *p.i.* einen Anstieg in der Expression der iNOS mRNA erkennen, im Vergleich zu WT Tieren jedoch nur um das ca. 50-fache. Im weiteren Verlauf ist in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ebenfalls eine Reduktion der iNOS Expression zu verzeichnen.

Die Expression von IFN β (**Abb. 4.28 E**) ist in nicht infizierten LT β R^{-/-} Tieren leicht erhöht (1,4-fach), zeigt nach Infektion jedoch in beiden Genotypen einen ähnlichen Verlauf: Zunächst sinkt die Expression (Tag 7 *p.i.*), steigt dann bis Tag 14 *p.i.* wieder an, um dann erneut abzusinken. Das Expressionsprofil für IFN γ verläuft in den WT Tieren ähnlich (**Abb. 4.28 F**). Die nicht infizierten LT β R^{-/-} Tiere zeigen ebenfalls eine etwas höhere Expression (2-fach) im Vergleich zu den WT Tieren, die nach Infektion ebenso abfällt, dann allerdings ist kein erneuter Anstieg zu beobachten. In der Milz von WT Tieren kann an Tag 12 *p.i.* ein 26-facher Anstieg der Expression von mGBP1 nachgewiesen werden, danach sinkt die Expression wieder annähernd auf den Wert vor Infektion (**Abb. 4.28 G**). Die LT β R^{-/-} Tiere haben vor Infektion etwas höhere Werte als die WT Tiere, zeigen dann aber eine zwar absolut gesehen niedrigere, aber anhaltende Expression (8-fach) von mGBP1 (Tag 14 *p.i.* bis Tag 60 *p.i.*) nach Infektion. Die Expression von mGBP2, mGBP3, mGBP4 und mGBP5 (**Abb. 4.28 H bis 4.28 K**) steigt in WT Tieren nach Infektion ebenfalls vorübergehend an, allerdings erst an Tag 14 *p.i.* (mGBP2/3: 2,5-fach; mGBP4: 6-fach; mGBP5: 90-fach). Bei den LT β R^{-/-} Tieren zeigen mGBP2 und mGBP4 ebenfalls erniedrigte Werte vor Infektion und keinen Anstieg der Expression dieser Gene nach Infektion (**Abb. 4.28 H und J**). Die mGBP3 Expression (**Abb. 4.28 I**) zeigt in den LT β R^{-/-} Tieren an Tag 7 *p.i.* einen vorübergehenden minimalen 1,3-fachen Anstieg, danach sinken die Werte deutlich unter 1. Die Expression von mGBP5 (**Abb. 4.28 K**) ist bereits in nicht infizierten LT β R^{-/-} Tieren 20-fach gegenüber WT Tieren erhöht, sinkt bis Tag 12 *p.i.*, steigt an Tag 14 *p.i.* wieder an (16-fach), um von Tag 30 *p.i.* bis Tag 60 *p.i.* erneut zu sinken. Die Expression von mGBP7 sinkt in den WT Tieren nach Infektion deutlich ab und bleibt auf diesem niedrigen Level (**Abb. 4.28 L**). In den LT β R^{-/-} Tieren ist die mGBP7 Expression vor und nach Infektion im Vergleich zu den WT Tieren deutlich erniedrigt und es ist kein Anstieg der Expression zu beobachten.

*Zusammenfassend ist eine differentielle Expression der analysierten Gene zwischen WT und LT β R^{-/-} Tieren im Verlauf einer *T. gondii* Infektion auch in der Milz zu beobachten. LT β R^{-/-} Tiere weisen tendenziell eine stark verminderte und zeitlich verzögerte Expression verschiedener immunrelevanter Gene auf. Die Expression von IFN β und IFN γ ist ebenfalls reduziert und zeitverzögert in LT β R^{-/-} Tieren, das erklärt die fehlende/verminderte Expression der meisten mGBPs.*

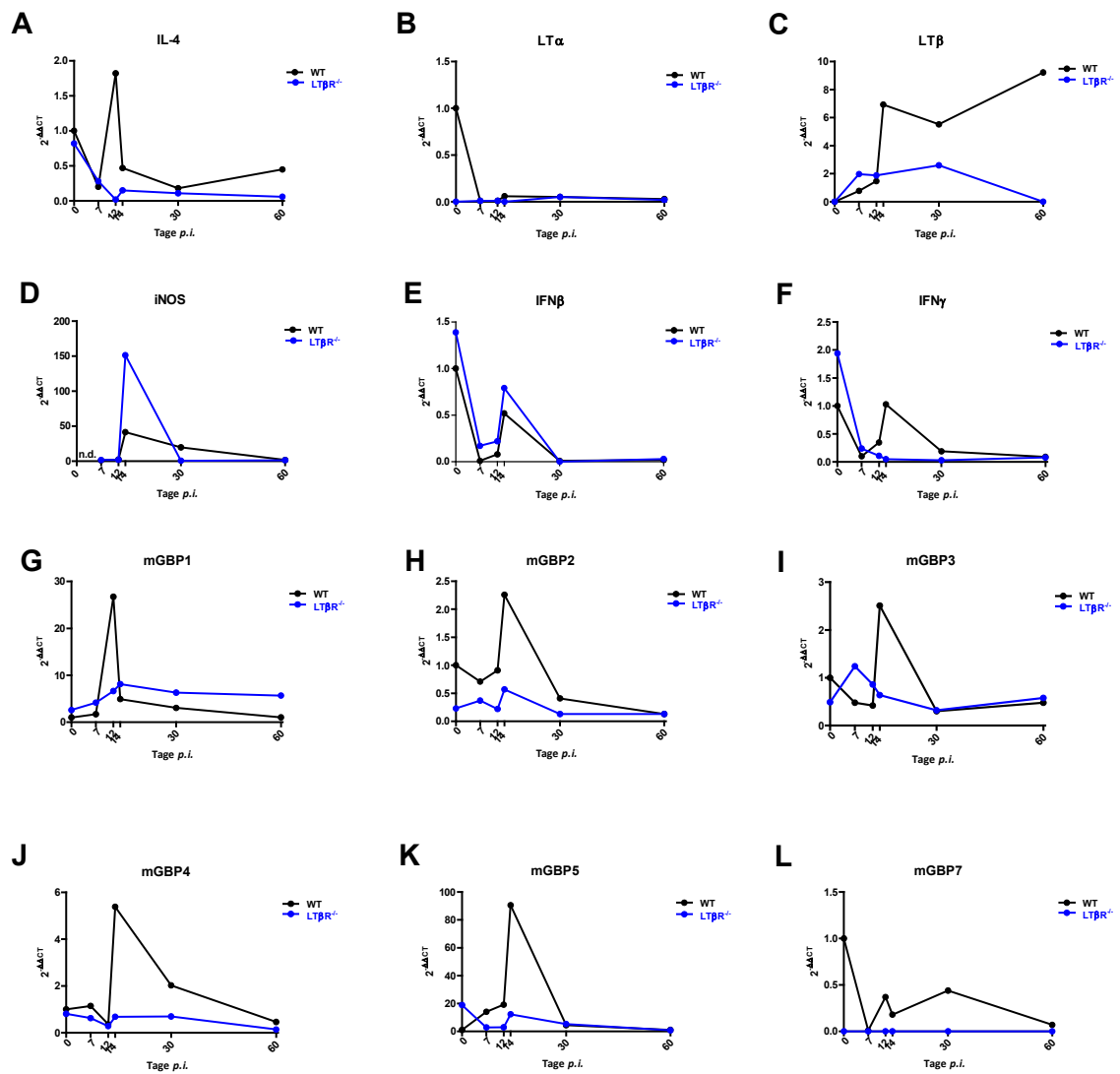


Abb. 4.28 A-L: Quantitative RT-PCR Analyse differenziell regulierter Gene in der Milz nach *i. p.* Infektion mit 40 Zysten *T. gondii* ME49 an den Tagen 0, 7, 12, 14, 30 und 60 *p. i.* in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. Die relative Genexpression nicht infizierter WT Tiere ($2^{-\Delta\Delta CT}$) wurde als '1' definiert und alle Genexpressionswerte auf diesen Wert bezogen. Werte < 1 stehen für eine Reduktion und Werte > 1 für eine Stimulation der Genexpression. Die Abbildungen zeigen den $2^{-\Delta\Delta CT}$ Wert von: (A) IL-4 (B) $LT\alpha$ (C) $LT\beta$ (D) iNOS (E) $IFN\beta$ (F) $IFN\gamma$ (G) mGBP1 (H) mGBP2 (I) mGBP3 (J) mGBP4 (K) mGBP5 (L) mGBP7. WT Tiere sind in schwarz und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere in blau dargestellt. (n = 3; Anzahl der Versuche in Triplikaten)

5. Diskussion

5.1 $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigen ein vermindertes Überleben nach PHx

Die Leber ist ein einzigartiges Organ, das die Fähigkeit besitzt sich nach Resektion oder Schädigung zu regenerieren. Diese Funktion wird vorwiegend von reifen Hepatozyten ausgeführt, die sich normalerweise nicht teilen (Koniaris *et al.*, 2003). Die 70 %-ige Leberresektion stellt im Mausmodell einen maximalen regenerativen Reiz dar. So kommt es bei ungestörter Regeneration zu einer geordneten Abfolge von Regenerationsschritten. Diese führen über eine synchrone Progression eines großen Anteils der reifen Leberzellen durch den Zellzyklus zur Wiederherstellung des ursprünglichen Lebervolumens innerhalb weniger Tage (Fausto, 2001). Die Proliferation der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie ist eine wichtige Komponente der Leberregeneration, und jüngste Studien zeigten, dass Kernmitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie eine wichtige Rolle bei regulatorischen Prozessen des Leberwachstums bzw. der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx) spielen. Anders *et al.* zeigten, dass $LT\beta R$ -defiziente Mäuse ein vermindertes Leberregenerationsvermögen besitzen und neben einer verminderten DNA-Synthese vermehrt Nekrosen in der Leber und einen erhöhten Anteil apoptotischer Hepatozyten im Vergleich zu WT Tieren aufweisen (Anders *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnte zunächst bestätigt werden, dass der Signalweg über den $LT\beta R$ bzw. seine Liganden wichtig ist und eine Rolle in der Leberregeneration nach PHx spielt: Tiere mit einer Defizienz im $LT\beta R$ weisen eine signifikant niedrigere Überlebensrate von 60,9 % nach PHx auf wohingegen WT Tiere ein Überleben von 87,8 % zeigen. Kontrovers zu der Veröffentlichung von Anders *et al.* verhalten sich jedoch die Überlebensraten. So zeigten diese ein Überleben der WT Tiere von 100 % und der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere von ca. 40 % (Anders *et al.*, 2005). Diese Differenzen können zum einen in den experimentellen Tierzahlen begründet liegen, da in dieser Arbeit für WT Tiere $n=33$ und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere $n=41$ Tiere eingesetzt wurden, wohingegen bei Anders *et al.* nur 10 Tiere für den Wildtypen und 9 $LT\beta R^{-/-}$ Tiere untersucht wurden. Zum anderen kann der unterschiedliche Verlauf der Überlebensraten an der Operationstechnik liegen, die das Überleben sowie die Wundheilung ebenfalls beeinflussen kann. Überlebten $LT\beta R^{-/-}$ Tiere den Eingriff zeigten diese eine suffiziente Regeneration und wiesen makroskopisch keine morphologischen Unterschiede der regenerierten Lebermasse zu WT Tieren auf. Bereits wenige Stunden nach Verlust von funktionellem Lebergewebe beginnen die ersten metabolischen Veränderungen, die zu einer Hyperplasie der Hepatozyten, das heißt zu einer Vergrößerung des Hepatozytenvolumens führen. Die synchrone Teilung der normalerweise mitoseinaktiven Hepatozyten ist ein streng regulierter Prozess,

denn die physiologische Lebermasse korreliert eng mit dem Körpergewicht, wobei die Leber ca. 5 % des Körpergewichtes ausmacht.

In dieser Arbeit konnten nach PHx in der regenerativen Phase zwischen überlebenden WT Tieren und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der KG/LG-Ratio festgestellt werden. Überlebten die Tiere den Eingriff, zeigten sowohl WT Tiere als auch $LT\beta R^{-/-}$ Tiere spätestens nach 10 Tagen eine beinahe vollständige Wiederherstellung der physiologischen Lebermasse. Interessanterweise zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu WT Tieren keine verlangsamte Regeneration nach PHx. Dass beide Genotypen 10 Tage nach PHx noch eine minimal, aber signifikant reduzierte KG/LG-Ratio im Vergleich zu nicht operierten Tieren haben, liegt daran, dass nach der Resektion ein Teilstück der ligierten Leberlappen (distal der Ligatur) aus technischen Gründen in der Leber verbleiben muss und daher beim Abwiegen der resezierten Leberlappen nicht in die Messung eingeht. Eine mikroskopische Analyse nicht operierter $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigte die bereits durch Futterer *et al.*, beschriebenen Lymphozyteninfiltrate (portal sinusoid) und eine durch extramedulläre Hämatopoese gekennzeichnete Leber (Futterer *et al.*, 1998). Eine extramedulläre Hämatopoese steht dabei im Zusammenhang mit chronischen myeloproliferativen Erkrankungen oder einer direkten Schädigung des blutbildenden Knochenmarks, wobei es sich um eine Verdrängung der physiologischen Hämatopoese aus dem Knochenmarks handelt (Kim, 2010). Überdies konnte in dieser Arbeit die Leber der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere durch stark erweiterte Sinusoide und eine Hyperzellularität charakterisiert werden. Die Regenerationsphase nach PHx war in beiden Genotypen durch einen Anstieg von Mikroinfarkten und lymphozytären Infiltraten im Lebergewebe und durch das Auftreten von Fettvakuolen in den Hepatozyten gekennzeichnet, wobei das Ausmaß und das Auftreten von Nekrosen bzw. apoptotischen Arealen in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 24 h bis 48 h Stunden nach PHx deutlich gegenüber WT Tieren erhöht war. Diese Beobachtungen entsprechen denen von Anders *et al.* die ebenfalls in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 48 h nach PHx ein erhöhtes Vorkommen von nekrotischen Arealen sowie 24 h bis 48 h nach PHx eine erhöhte Anzahl von apoptotischen Hepatozyten nachweisen konnten (Anders *et al.*, 2005). Das Entstehen von Fettvakuolen ist ein Anzeichen für den Stress, der durch eine funktionale Mehrbelastung des verbleibenden Lebergewebes und einer Veränderung des portalen Blutdrucks nach PHx entsteht (Vollmar *et al.*, 1994). Insgesamt muss die portale Zirkulation aufrechterhalten werden, obgleich die Leber nach PHx nur ein Drittel ihrer physiologischen Lebermasse besitzt. Der Fluss des portalen Blutes erhöht sich dabei theoretisch um das Dreifache (Michalopoulos, 2010). Morsiani *et al.* zeigten, dass es durch eine funktionale Mehrbelastung des Leberparenchyms innerhalb weniger Stunden zu einer Einlagerung von Triglyzeriden kommt, die zu einem Anschwellen der Hepatozyten führt bzw. zur Bildung intrazellulärer Vakuolen (blasenförmige Lipideinlagerungen) (Morsiani *et al.*, 1995). Zudem wurde in anderen Studien eine Erhöhung der Druck- und Scherkräfte bzw. Auswirkungen der portalen Mehrdurchblutung nach PHx beobachtet, die charakteristische Veränderungen, wie u.a. Dilatation der sinusoidalen Strombahnen oder

Disse'schen Räume und ödematös geschwollene Hepatozyten mit Auflockerung der Parenchymzellverbände, im Lebergewebe hervorrufen (*Abshagen et al., 2008; Abshagen et al., 2006; Um et al., 1994*). Eine derartige Beobachtung konnte auch 24 h nach PHx in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gemacht werden. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere wiesen im Vergleich zu WT Tieren erweiterte Lymphgefäße auf, die mit ödematösen Veränderungen um die Portalfelder einhergingen und zeigten überdies Gewebslücken mit Ansammlungen von Zelltrümmern (*hepatocyte dropouts*).

TNFRp55-defiziente Tiere zeigen eine Inhibition in der DNA Replikation und eine Mortalität von über 50 % nach PHx (*Yamada et al., 1997; Yamada et al., 1998*). Eine erhöhte Mortalität der $TNFRp55^{-/-}$ nach PHx konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden. $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigten ein Überleben von 53 % und verstarben entgegen der Aussagen anderer Autoren innerhalb der ersten 44-48 h nach PHx, wohingegen WT Tiere ein Überleben von 83,3 % aufwiesen und postoperativ an den Tagen 3 bis 5 *post PHx* verstarben. *Yamada et al.* zeigten, dass $TNFRp55^{-/-}$ Tiere einen Defekt in der Wiederherstellung der Lebermasse aufweisen und mindestens 2 Wochen postoperativ brauchen, um den Verlust auszugleichen (*Yamada et al., 1997*). Dies widerspricht den Beobachtungen in dieser Arbeit. Überlebten $TNFRp55^{-/-}$ Tiere die PHx, zeigte sich kein Unterschied in der Wiederherstellung der Lebermasse im Vergleich zu WT Tieren und es konnte 10 Tage nach PHx eine beinahe vollständige Wiederherstellung der physiologischen Lebermasse festgestellt werden. Lediglich 48 h *post PHx* zeigten $TNFRp55^{-/-}$ Tiere eine minimale, aber nicht signifikant reduzierte KG/LG-Ratio. Darüber hinaus, zeigten $TNFRp55^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu WT Tieren bereits im nicht operierten Zustand eine leicht verminderte, aber nicht signifikant unterschiedliche KG/LG-Ratio, aus der eventuell Rückschlüsse auf Probleme in der Regulation des Lebergewichtes bei diesen Genotypen gezogen werden können. Histologisch wurden auch für $TNFRp55^{-/-}$ Tiere 24 h bis 30 h nach PHx ein Auftreten von Fettvakuolen in den Hepatozyten beschrieben (*Yamada et al., 1998*) die mit den multiplen Effekten von Zytokinen auf den Lipid Metabolismus zu tun haben (*Hardardottir et al., 1994*), die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

5.2 $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigen eine beeinträchtigte Leberregeneration und Kompensation von Leberschäden nach PHx

Die molekularen Signale, die den Prozess der Leberregeneration kontrollieren sind u.a. Serum Faktoren, Wachstumsfaktoren, Hormone und Nährstoffe (*Michalopoulos, 1990*). Dabei ist die Leberregeneration, induziert durch einen Verlust an Lebermasse viel mehr durch funktionale als anatomische Faktoren beherrscht (*Pahlavan et al., 2006*). Eine regenerierende Leber muss die Funktionen einer normalen Leber ausüben, einschließlich der Synthese der Enzyme, die für die Albumin-Synthese, den Bilirubin-Metabolismus, Koagulations-Faktoren, der Detoxifikation und der

Bildung von Galle verantwortlich sind, sowie die Aufrechterhaltung diverser biochemischer Signalwege (*Pahlavan et al., 2006*). Fraglich ist, ob die Funktionalität der Leber im Verlauf nach PHx sowohl in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren als auch in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren gegeben ist bzw. ob 10 Tage nach PHx die regenerierte Leber beider Genotypen dem nicht operierten Zustand vor PHx entspricht. Kann die Leber neben der Regeneration ihre eigentliche Funktion nicht mehr richtig ausüben, werden Schäden induziert. Heilen diese Schäden nicht effizient aus, verliert die Leber ihre Fähigkeit zur Regeneration und es kann nach fulminantem Verlauf zu einem akuten Leberversagen kommen (*Shimizu et al., 2009*). Demnach ist eine Beurteilung des Schweregrades des postoperativen Leberschadens notwendig. Nach PHx kommt es sowohl in WT als auch in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zu einem schnellen Anstieg der Lebertransaminasen AST und ALT, die als Maß für eine Leberschädigung dienen. Dies bestätigen *Anders et al.* die nach PHx erhöhte AST Werte in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren feststellen konnten und wird auch von *Tumanov et al.* unterstützt, die ebenfalls in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 24 h und 48 h nach PHx einen massiven Anstieg in den Transaminasen AST und ALT beschreiben (*Tumanov et al., 2009*). Ein Anstieg der Lebertransaminasen liegt laut *Tumanov et al.* daran, dass es wie bereits beschrieben, zu einem Anstieg von nekrotischen Arealen und Apoptose der Hepatozyten kommt (*Tumanov et al., 2009*). Das Stoffwechsel-Enzym LDH kommt in fast allen Zellen und Organen vor, frei im Blut allerdings nur in sehr geringer Konzentration. Findet man erhöhte LDH-Werte im Blutserum, kann dies darauf hinweisen, dass die Leber geschädigt ist (*Kotoh et al., 2008*). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Lebertransaminasen von einem Anstieg der LDH-Werte begleitet wird, die in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren auffallend hoch sind. Überlebende $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigen keine dauerhaft erhöhten Transaminasen oder LDH Werte, das lässt vermuten, dass die fehlenden $LT\beta R$ -vermittelten Signalwege in diesen Tieren kompensiert werden können. Der Bilirubinspiegel nach PHx ist im Vergleich zu WT Tieren in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren deutlich reduziert. Darüber hinaus zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine weniger effiziente Koagulation, da ihre Prothrombinzeit und das Prothrombin postoperativ im Vergleich zu WT Tieren vermindert sind. Eine Schädigung der Hepatozyten bzw. eine entzündliche Reaktion in der Leber kann zu einer Proliferation des Gallengangendothels führen und könnte die deutlich erhöhten ALP Werte erklären, die die $LT\beta R^{-/-}$ Tiere insbesondere 24 h, 48 h und 240 h *post PHx* aufweisen. Weil Thrombozyten früh nach einem akuten Schaden mit Endothelzellen interagieren wird auch ihnen eine Rolle in der Initiation der Leberregeneration zugeschrieben (*Lesurtel et al., 2006*). Thrombozyten und Leukozyten im zirkulierenden Blut und in der Anwesenheit von Kupferzellen sind notwendig für eine effiziente regenerative Antwort der Leber (*Taub, 2004*). Eine Analyse des Blutbildes wies bereits im nicht operierten Zustand in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren einen signifikant erhöhten Leukozytentiter im Vergleich zu nicht operierten WT Tieren auf und auch postoperativ konnte ein Anstieg in der Leukozytenzahl beider Genotypen verzeichnet werden. Zudem war der Thrombozytentiter 12 h und 24 h *post PHx* in WT Tieren signifikant gegenüber $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erhöht.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren die Beeinträchtigung der Leberfunktion nach PHx nicht effizient kompensiert werden kann.

Eine Beurteilung der postoperativen Leberschäden in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren durch Shimizu *et al.* zeigte ebenfalls einen Anstieg in der Lebertransaminase ALT nach PHx, der jedoch vergleichbar mit WT Tieren war und sich bereits 96 h nach PHx erholt hat (Shimizu *et al.*, 2009). Diese Beobachtung konnte nur bedingt bestätigt werden, da die Transaminase ALT in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren nur eine minimale Erhöhung in den ersten Stunden nach PHx, jedoch insgesamt eine verminderte ALT Aktivität im Vergleich zu den WT Tieren zeigte und darüber hinaus nach 48 h wieder anstieg. Auch die AST Aktivität war zwar erhöht, aber insbesondere 24 h nach PHx signifikant vermindert im Vergleich zu WT Tieren und ließ ebenfalls einen erneuten Anstieg 48 h nach PHx in den $TNFRp55^{-/-}$ Tieren erkennen. Zudem konnte postoperativ ein deutlicher Anstieg in der LDH-Werte beobachtet werden, die sich wie zuvor bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren beschrieben, deutlich von den WT Tieren unterscheiden und stärker erhöhte Werte aufweisen. Erst 240 h nach PHx konnten in allen Parametern vergleichbare Werte zu nicht operierten WT und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren gefunden werden. Auffällig ist zudem, dass die Messung des Prothrombin bereits signifikant vor und nach PHx vermindert in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren vorliegt und sich deutlich von den WT Tieren unterscheidet. Hypothetisch lassen generell verminderte Prothrombinwerte auf eine verminderte Syntheseleistung der Leber schließen, die mit einer beeinträchtigten Wundheilung assoziiert sein kann. Eine Schädigung der Hepatozyten bzw. eine entzündliche Reaktion in der Leber mit deutlich erhöhten ALP Werten wurde für $TNFRp55^{-/-}$ Tiere durch Shimizu *et al.* beschrieben, der einen auffallenden Anstieg 96 h und 168 h nach PHx verzeichnete. Die ALP Werte unterschieden sich dabei signifikant von den nur leichten ansteigenden Werten in WT Tieren (Shimizu *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls ein Anstieg der ALP in WT und $TNFRp55^{-/-}$ Tieren beobachtet werden. Anders als bei Shimizu *et al.* beschrieben, liegen erhöhte ALP Werte bereits 6 h nach PHx vor und steigen bis 24 h nach PHx weiter an. $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigen hierbei signifikant erhöhte Werte gegenüber den WT Tieren und weisen auch 240 h nach PHx noch eine erhöhte ALP auf. Der in der Literatur nach PHx in WT Tieren beschriebene Anstieg der Thrombozyten- und Leukozytenzahlen im zirkulierenden Blut (Taub, 2004) scheint ebenfalls durch eine Defizienz im $TNFRp55$ gestört bzw. verzögert. Wohingegen es in WT Tieren 12 h und 24 h nach PHx zu einem Anstieg der Thrombozytenzahlen kommt, fallen diese in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren ab und lassen erst 48 h und 240 h nach PHx einen erneuten Anstieg erkennen, der mit einem Anstieg der Leukozytenzahlen einhergeht. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, warum die ersten 48 h postoperativ in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren besonders kritisch sind, und dass neben der Regenerationsfähigkeit auch die Kompensation der beeinträchtigten Leberfunktionen nach PHx in den $TNFRp55^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu den WT Tieren gestört ist.

5.3 $LT\beta R^{-/-}$ und $TNFRp55^{-/-}$ Tiere zeigen eine unkontrollierte und verzögerte Zytokinantwort nach PHx

Die Zytokinantwort nach PHx ist relativ gut charakterisiert und umfasst die Sekretion von verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF und TGF α). Zu der wichtigsten Funktion der Zytokine gehört die Induktion von Akute-Phase-Proteinen, die für die Initiierung der Leberregeneration in der *Primingphase* nach PHx durch TNF und IL-6 von Bedeutung sind (Fausto, 2000, 2006) und sowohl die Apoptose als auch das Überleben der Hepatozyten regulieren (Cressman et al., 1996; Fausto et al., 2006; Michalopoulos, 2007; Taub, 2004; Yamada et al., 1997). IL-6 ist ein gut studiertes Zytokin mit einer signifikanten Rolle in der Hepatozyten-vermittelten Regeneration, das die Translokation von STAT3 induziert (Cressman et al., 1996). TNF reguliert zusammen mit IL-6 die Akute-Phase-Antwort, es reguliert und fungiert als kritischer und starker Mediator von Entzündungen, Zellschäden, Apoptose und Wundheilung. Neben der Initiation der Leberregeneration durch IL-6 und TNF konnten Tumanov et al. zeigen, dass es ca. 12 h nach PHx zu einer Infiltration von Lymphozyten in die Leber kommt und dass auf der Oberfläche von diesen infiltrierenden T-Zellen exprimiertes $LT\beta$ ($LT\alpha_1\beta_2$) essentiell für eine effiziente Leberregeneration ist (Tumanov et al., 2009). Insgesamt wurde bewiesen, dass die Expression von $LT\beta$ auf T-Zellen zu einer Interaktion T-Zellen mit $LT\beta R$ -exprimierenden Hepatozyten führt, und in diesen die Produktion von IL-6 induziert, welches wiederum STAT3 aktiviert zu einem besseren Überleben nach akutem Leberschaden führt (Tumanov et al., 2009). Eine erhöhte bzw. differentiell regulierte Expression der genannten Zytokine konnte auch im vorliegenden Modell nachgewiesen werden, so ließ sich ein nach PHx erwarteter Anstieg der im Blut zirkulierenden Mengen von IL-6 und TNF in WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nachweisen. Während die IL-6 Konzentration bereits 6 h *post PHx* in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren um das 8-fache erhöht war, stieg die TNF Konzentration leicht verzögert 12 h *post PHx* an (5-fach). Im Wildtypen ist die Ausschüttung beider Zytokine jedoch insgesamt stärker, da es 12 h *post PHx* zu einem 9-fachen Anstieg der IL-6 Konzentration und einem 100-fachen Anstieg der TNF Konzentration kam. Dass der $LT\beta R$ eine Rolle in der Induktion von IL-6 spielt, wurde erstmals durch Tumanov et al. beschrieben, die zeigten, dass $LT\beta R$ - und $TNFRp55$ -vermittelte Signale für die IL-6 Produktion nach PHx notwendig sind (Tumanov et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit war jedoch überraschend, dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere bereits im unbehandelten Zustand eine stärkere Expression von IL-6 und TNF im Vergleich zu den WT Tieren aufwiesen. Demnach galt es zu untersuchen, ob $LT\beta R^{-/-}$ Tiere ein generell verändertes Zytokinprofil besitzen bzw. ob oder wie sich deren Zytokinexpression nach PHx verändert. Eine Studie von Ruddell et al. konnte bereits Veränderungen in der Zytokinexpression von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nachweisen. Es wurde gezeigt, dass in unbehandelten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren die Zytokinkonzentrationen 2- bis 3-fach höher als in WT Tieren sind und diese Tiere nach einem *Choline-Deficient, Ethionine-supplemented* (CDE)-induziertem Leberschaden Defekte in der Produktion von $LT\beta$, TNF und IFN γ zeigen (Ruddell et al., 2009).

Eine Analyse diverser Zytokine, Chemokine und Akute-Phase-Proteine mittels *Mouse Cytokine Array* betätigte diese Aussage nur zum Teil. Die Spiegel der analysierten Zytokine nicht operierter $LT\beta R^{-/-}$ Tiere waren im Vergleich zu nicht operierten WT Tieren generell erhöht. 12 h und 24 h nach PHx verschob sich das Zytokinprofil beider Genotypen, so dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu WT Tieren deutlich niedrigere Spiegel für diverse Zytokine (wie u.a. IL-4, C5a, IFN γ , CCL1, IL-3, IL-4, IL-12p70, IL-16, CXCL10, CXCL11 und MIP-2) zeigten. Interessanterweise führt laut Literatur u.a. die Sezernierung von IL-4 nach PHx zu einer Rekrutierung von Eosinophilen, die die Proliferation von Hepatozyten induzieren (Goh *et al.*, 2013). Eine fehlende IL-4 Produktion führt zu einer verminderten Produktion von IgM, das für die Aktivierung des Komplementsystems und somit für eine effiziente Leberregeneration von Bedeutung ist (DeAngelis *et al.*, 2012). Weil Komplement auch die Induktion von IL-6 reguliert (Strey *et al.*, 2003) konnten DeAngelis *et al.* zeigen, dass in $IL-4^{-/-}$ Tieren eine reduzierte Komplementaktivierung zu einer niedrigeren IL-6 Induktion und damit zu Störungen in der *Primingphase* der Leberregeneration und insgesamt zu Defekten in der Hepatozytenproliferation führt (DeAngelis *et al.*, 2012). Da sich erst 48 h nach PHx, das heißt zeitlich verzögert, die $LT\beta R^{-/-}$ Tiere ihrem ursprünglichen Zytokinprofil wieder annähern, wohingegen WT Tiere bereits 24 h nach PHx ihr Zytokinprofil wieder vergleichsweise normalisiert haben, wurde hier gezeigt, dass sich $LT\beta R^{-/-}$ Tiere vor und nach PHx in ihrem Zytokinprofil gegenüber WT Tieren grundsätzlich unterscheiden. Die insgesamt verminderte Zytokinexpression in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nach PHx kann ein Hinweis auf einen Defekt in der Induktion essentieller Zytokine und Chemokine in der *Primingphase* der Leberregeneration sein. Dieser Defekt bzw. die Deregulation des Zytokinprofils nach PHx kann zudem eine weitere Ursache für die kritische postoperative Phase und das Sterben der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere sein.

Für Tiere mit einer Defizienz im TNFRp55 wurde bereits beschrieben, dass sie verminderte IL-6 Konzentrationen, eine Inhibition in der STAT3 Aktivierung und Defekte in der Leberregeneration zeigen (Shimizu *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 1997). Demnach ist eine durch TNF-Rezeptoren vermittelte Signaltransduktion für einen IL-6-medierten Signalweg essentiell für die Initiierung der Leberregeneration (Yamada *et al.*, 1997). Diese Beobachtung konnte durch eine Analyse der Zytokinantwort von TNFRp55 $^{-/-}$ Tieren nur bedingt bestätigt bzw. widerlegt werden. Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl TNFRp55 $^{-/-}$ Tiere als auch WT Tiere einen vergleichbaren IL-6 Anstieg 12 h nach PHx aufweisen. Des Weiteren zeigen TNFRp55 $^{-/-}$ Tiere einen deutlichen Anstieg von IL-6 24 h *post PHx*, der signifikant gegenüber WT Tieren erhöht war. Was zu diesem massiven Anstieg von IL-6 in TNFRp55 $^{-/-}$ Tieren 24 h nach PHx führt, bleibt unklar, da sowohl Shimizu *et al.* als auch Yamada *et al.* einen gegensätzlichen Verlauf im Serum IL-6 zeigen: Shimizu *et al.* zeigten einen vergleichbaren Verlauf der IL-6 Werte in WT und TNFRp55 $^{-/-}$ Tieren, mit einem Peak 6 h *post PHx* und konnten aber eine generell verminderte IL-6 Produktion in TNFRp55 $^{-/-}$ Tieren nachweisen (Shimizu *et al.*, 2005).

Bei Yamada *et al.* zeigten WT Tiere bereits 2 h *post PHx* einen massiven Anstieg von IL-6, der bereits 5 h *post PHx* wieder dem Ausgangswert vor PHx entspricht. Auch hier konnte in TNFRp55^{-/-} Tieren kein direkter Anstieg der IL-6 Konzentration im Serum gemessen werden (Yamada *et al.*, 1998). Im Serum gemessenes IL-6 gibt möglicherweise nur einen Hinweis auf die eigentlich relevanten Zytokinspiegel in der Leber nach PHx, außerdem könnten sie durch Parameter wie u.a. die OP-Technik, Mauslinie oder das Alter der Versuchstiere beeinflusst werden. Im Vergleich nicht operierter WT Tiere mit nicht operierten TNFRp55^{-/-} Tieren hinsichtlich der TNF Expression ließ sich eine signifikant erhöhte Produktion von TNF in den TNFRp55^{-/-} Tieren dokumentieren. 12 h nach PHx zeigten WT Tiere zwar einen 100-fachen Anstieg von TNF, TNFRp55^{-/-} Tiere dagegen nur eine Verdopplung ihres absoluten TNF Spiegels, dieser ist jedoch auf Grund der bereits vor PHx erhöhten Werte in den TNFRp55^{-/-} Tiere insgesamt deutlich erhöht. Diese Beobachtung wurde zuvor auch durch Yamada *et al.* beschrieben, die darüber hinaus auch eine erhöhte Expression der TNF mRNA in TNFRp55^{-/-} Tieren mittels quantitativer RT-PCR nachweisen konnten (Yamada *et al.*, 1998). Unklar bleibt, ob eine erhöhte Konzentration von TNF ursächlich für das frühe Sterben der TNFRp55^{-/-} Tiere nach PHx ist, da hepatisches TNF, das zwar einerseits essentiell für eine effiziente Leberregeneration ist und dem eine Rolle in der Wundheilung zugesprochen wird (Akerman *et al.*, 1992) auch möglicherweise eine schädigende Rolle durch die Induktion einer unkontrollierten inflammatorischen Antwort zugesprochen wird (Horn *et al.*, 2000). Eine weitere Störung der Leberregeneration in TNFRp55^{-/-} Tieren wird möglicherweise durch eine vermehrte Ausschüttung von IL-1 β induziert. IL-1 β könnte eine wichtige Rolle spielen, da es u.a. bei septischen Zuständen stark erhöht ist und eine signifikante Inhibition der Hepatozytenproliferation bewirken kann (Furutani *et al.*, 1995). Wohingegen LT β R^{-/-} Tiere und WT Tiere nach PHx nur einen leichten Anstieg von IL-1 β aufwiesen, zeigten TNFRp55^{-/-} Tiere besonders 12 h nach PHx einen deutlichen Anstieg von IL-1 β im Serum. Eine Analyse weiterer Zytokine und Chemokine mittels *Mouse Cytokine Array* zeigte in TNFRp55^{-/-} Tieren zwar im Vergleich zu WT Tieren eine verzögerte Zytokinantwort, die erst 48 h nach PHx induziert wurde, aber hinsichtlich ihrer Expressionsstärke den WT Tieren überlegen ist. Lediglich ein Defekt in der Produktion der Zytokine IFN γ , IL-2 und CXCL13 konnte in TNFRp55^{-/-} Tieren nachgewiesen werden. Insgesamt zeigen TNFRp55^{-/-} Tiere, dass es nach PHx zu einer verzögerten, aber starken Zytokinantwort kommt, die allerdings einer unkontrollierten inflammatorischen Antwort gleicht und sich negativ auf das Überleben nach PHx auswirken kann.

5.4 Identifizierung von LT β R-relevanten, Leberregenerations-abhängigen Genen mittels *Microarrayanalyse*

Die Leberregeneration nach PHx führt zu einer synchronen Proliferation von Hepatozyten und kann somit eine schnelle Restoration der Lebermasse herbeiführen. Ein Verständnis für die Mechanismen die diesen komplexen Prozess regulieren, ist von großer klinischer Bedeutung. *Microarrayanalysen* haben gezeigt, dass massive Veränderungen der Genexpression mit einer PHx einhergehen und dass diese Veränderungen bereits deutlich vor der eigentlichen DNA Replikation stattfinden (*Li et al., 2009*). Durch *Microarrays* können genomweite Interaktions- und Regulationsnetzwerke analysiert werden, auch in komplexen *in vivo* Modellen, wie die Leberregeneration nach 70 %-iger PHx in der Maus. Da bereits durch Tumanov *et al.* gezeigt wurde, dass es im Mausmodell ca. 12 h nach einer PHx zu einer Infiltration von Lymphozyten in die Leber kommt und auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiertes LT β (LT $\alpha_1\beta_2$) essentiell für eine effiziente Leberregeneration ist (*Tumanov et al., 2009*), wurde dieser Zeitpunkt für eine *Microarrayanalyse* gewählt, um LT β R-regulierte Gene, die relevant für die Leberregeneration nach PHx sind, zu identifizieren. Es ist beschrieben, dass die Leberregeneration nach einem Verlust von funktionaler Lebermasse aus drei fundamentalen Phasen besteht: Die Initiations- oder *Primingphase* 0h bis 12 h *post PHx*, die Proliferationsphase 12 h bis 72 h nach PHx und die Terminationsphase 72 h bis 168 h nach PHx (*Fausto, 2000*). Der regenerative Prozess involviert dabei die Aktivität von hunderten von Genen und die Aktivierung vieler Signalwege (*Li et al., 2009*). In der *Primingphase* werden u.a. Gene exprimiert, die eine Funktion als Transkriptionsfaktoren, in Signalwegen, als Hormone, Zytokine oder Wachstumsfaktoren haben (*Jiang et al., 2011; Li et al., 2009*). Die Proliferationsphase zeigt die meisten auffälligen Veränderungen 12 h *post PHx*, die mit einer Herunterregulation von Genen assoziiert ist, die eine Funktion im Lipid Metabolismus haben bzw. durch eine Hochregulation von Genen, die eine Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion (*White et al., 2005*) und Angiogenese einnehmen (*Li et al., 2009*). In der Ratte wurden 12h bis 18 h nach PHx 122 Gene beschrieben die stark hochreguliert eine Funktion als Akute-Phase-Protein haben, involviert in der extrazellulären Matrix sind oder als ribosomale Proteine und Serin-Proteasen fungieren (*Fukuhara et al., 2003*). Stark herunterreguliert lag u.a. die Alkohol-Dehydrogenase vor sowie BAT, ein Leberenzym das die Konjugation von Gallensalzen mit Glycin und Taurin katalysiert und 6 h bis 12 h nach PHx vermindert vorliegt (*Furutani et al., 1995*). 30 h nach PHx werden in der Maus Gene exprimiert, die eine Funktion im Zellzyklus bzw. in der DNA-Replikation haben (*Li et al., 2009*). Dies ist nicht verwunderlich, da es u.a. in der Ratte 24-36 h *post PHx* zum Peak in der Mitose der Hepatozyten kommt (*Jiang et al., 2011*). Hingegen ist die Terminationsphase durch eine Expression von Genen charakterisiert, die assoziiert sind mit Zelldifferenzierung, Translation und der extrazellulären Matrix.

Eine erste Transkriptomanalyse mittels *Microarray* in dieser Arbeit konnte nach einem Ausschluss von differentiell regulierten Genen, die nicht unmittelbar an der Leberregeneration beteiligt sind, insgesamt 4.470 Gene identifizieren, die 12 h nach PHx in hepatektomierten WT und hepatektomierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren differentiell reguliert wurden. 5.585 Gene waren 12 h postoperativ nur im Wildtypen differentiell reguliert und 3.836 Gene nur in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. Eine *Gene Ontology* (GO) Analyse ergab, dass Gene, die eine Funktion in der Transkription und Genexpression bzw. in der Regulation der Transkription und Genexpression haben, nur im Wildtypen überrepräsentiert sind, wohingegen Gene, die an der Regulation von metabolischen Prozessen beteiligt sind, und Gene, die eine Funktion in der Nukleotid Bindung bzw. in Organellen ausüben, in beiden Genotypen reguliert vorgefunden werden. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass WT Tiere 12 h nach PHx Gene exprimieren, die eine Funktion in der Transkription bzw. der Expression haben bzw. diese regulieren, wohingegen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere hier Defekte zu haben scheinen. Nach PHx müssen die Restlebern beider Genotypen metabolisch reagieren. Demnach ist es nicht überraschend, dass sowohl WT als auch $LT\beta R^{-/-}$ Tiere Gene induzieren, die an der Regulation von metabolischen Prozessen beteiligt sind, da $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Normalzustand (vor PHx) eine normale Leberfunktion aufweisen. Bestätigt wird dies durch die Literatur, da Jiang *et al.* in der Ratte zeigen konnten, dass 2-168 h nach PHx metabolische Gene differentiell exprimiert bzw. reguliert werden (Jiang *et al.*, 2011).

In einem weiteren *Microarray* (12 h nach PHx), konnten nach dem Ausschluss differentiell regulierter Gene, die nicht unmittelbar an der Leberregeneration beteiligt sind, in hepatektomierten WT und hepatektomierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren 209 differentiell regulierte Gene identifiziert werden, die eine Änderung in der Genexpressionsstärke um den Faktor $\geq 1,5$ aufwiesen. Hervorzuheben sind 54 differentiell regulierte Gene, die an der Leberregeneration beteiligt und $LT\beta R$ -abhängig sind (Gruppe B, blau). Durch eine weitere GO Analyse konnten 35 dieser am stärksten differentiell regulierten 54 Gene den GO-Termini Metabolismus, Strukturgen, Regulator/Inhibitor, Wachstumsfaktor oder Koagulationsfaktor zugeordnet werden. Die überrepräsentierten GO-Termini, die in der Gruppe der an der Leberregeneration beteiligten und $LT\beta R$ -abhängigen differentiell regulierten Gene vertreten sind, wurden in einer weiteren *Pathway* Analyse dem Cholesterinmetabolismus bzw. der Fettsäure-Biosynthese, und der Regulierung der Koagulation zugeordnet. Dies widerlegt die Aussage von Li *et al.*, die nur 4 h nach PHx Gene nachweisen konnten, die am Cholesterinmetabolismus bzw. an der Cholesterinbiosynthese beteiligt sind (Li *et al.*, 2009). Dass WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere 12 h nach PHx keine Expression diverser, an der Leberregeneration beteiligten Zytokine oder Transkriptionsfaktoren aufwiesen, kann damit begründet werden, dass der Zeitpunkt 12 h nach PHx zwar relevant für die $LT\beta R$ -abhängige Leberregeneration ist (Tumanov *et al.*, 2009), aber hinsichtlich einer differentiellen Regulation von Transkriptionsfaktoren oder Zytokinen zu spät gewählt ist, da diese bereits zu früheren Zeitpunkten nach PHx eine Rolle spielen. Insgesamt konnten 12h nach PHx keine $LT\beta R$ -regulierten an der Leberregeneration beteiligten Schlüsselfaktoren (wie u.a. NF- κ B) nachgewiesen

werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass der LT β R eine Rolle im Cholesterinmetabolismus, der Regulierung der Koagulation bzw. einen generellen Einfluss in metabolischen Prozessen nach PHx hat.

5.5 Dereguliertes Expressionsprofil nach PHx: WT vs. LT β R^{-/-} Tiere

Die im *Microarray* am stärksten differentiell regulierten Gene, die eine Funktion in der Leberregeneration haben und LT β R-abhängig sind, lassen sich wie folgt definieren: Murinoglobulin 2 (Mug2), Aldehyd Dehydrogenase 1, Familie L1 (Aldh1l1), Diacylglycerol Kinase theta (Dgkq) und Zellzyklus Wechsel Gen (GOS2). Zum einen wurde untersucht, ob es auch zu weiteren Zeitpunkten *post PHx* zu einer veränderten Genexpression der zum Zeitpunkt 12 h am stärksten differentiell exprimierten Gene kommt. Zum anderen wurde das Expressionsprofil weiterer postulierter, für die Leberregeneration relevanter Gene in WT und LT β R^{-/-} Tieren untersucht. Die Expression des im *Microarray* am stärksten differentiell regulierten Gens Mug2 wurde unabhängig durch eine quantitative RT-PCR bestätigt und wies in LT β R^{-/-} Tieren neben der verminderten Expression 12 h nach PHx, speziell 6 h nach PHx eine 50-fach verminderte Expression im Vergleich zu WT Tieren auf. Auch für TNFRp55^{-/-} Tiere konnte ein Ausbleiben einer Expression der Mug2 mRNA zu diversen Zeitpunkten nach PHx gezeigt werden. Mug2 gehört neben Mug1 und Mug3 zur Familie der α 2-Makroglobuline, die zu den Proteinen der Akuten-Phase gehören, IL-6-abhängig reguliert werden und als Murinoglobuline nur in Mäusen vorkommen (humanes Homolog: α -2-Makroglobulin) (Umans *et al.*, 1999). Diese Proteine verfügen neben ihrer Funktion als Protease-Inhibitoren (*protease scavenger*) noch über die Fähigkeit Zytokine (wie u.a. TNF α , IL6 und LT β) zu binden (Ikari *et al.*, 2001). Mug1 zeigte 24 h und 48 h nach PHx eine verminderte Expression in den LT β R^{-/-} Tieren, wohingegen WT Tiere insbesondere 24 h nach PHx eine bis zu 8-fach erhöhte Induktion aufwiesen. Umans *et al.*, zeigten u.a., dass Mug1-defiziente Tiere ein vermindertes Überleben nach einer CDE-induzierten Pankreatitis und vermehrt Schädigungen der Leber aufwiesen, die durch Nekrosen, vakuolisierten Hepatozyten und inflammatorische Infiltrate gekennzeichnet waren (Umans *et al.*, 1999). Demnach scheint Mug1 eine wichtige Rolle als Protease-Inhibitor und Zytokin-Carrier zu haben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression von Mug3 in LT β R^{-/-} Tieren 12 h *post PHx* um das 40-fache erhöht war, wohingegen die Expression von Mug3 in WT Tieren nur 11-fach erhöht vorlag. Warum die Expression von Mug3 markant in LT β R^{-/-} Tieren induziert wird ist unklar, da beschrieben wurde, dass eine Inaktivierung des Mug1 Gens keine erhöhte Expression der anderen Murinoglobulin Isoformen induziert (Lorent *et al.*, 1994; Overbergh *et al.*, 1994; Overbergh *et al.*, 1991) und daher eine mögliche Kompensation einer Mug1 und Mug2 Defizienz in LT β R^{-/-} Tieren durch eine erhöhte Mug3 Expression weitestgehend ausgeschlossen erscheint. Es scheint jedoch, dass speziell Mug2 eine wichtige Rolle in der LT β R-abhängigen Leberregeneration spielt und daher

Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein muss. TNF und Lymphotoxin gehören zur gleichen Familie von strukturell verwandten Zytokinen (Smith *et al.*, 1994). Das LT α Homotrimer bindet wie TNF den TNFRp55 und TNFRp75 Rezeptor, wohingegen das LT β Heterotrimer den LT β R bindet (Hehlgans and Pfeffer, 2005). Die Expression von TNF und IL-6 gehört zu den wichtigsten Komponenten der frühen *Primingphase der* Leberregeneration. In der vorliegenden Arbeit ist die Expression von TNF in LT β R^{-/-} Tieren im Vergleich zu WT Tieren erhöht (4- bis 8-fach) und erfolgt früher (6 h *post PHx*). In den WT Tieren weist die TNF mRNA erst 24 h *post PHx* einen 4-fachen Anstieg in der Expression auf, die mit einer Induktion der NF- κ B mRNA einhergeht. Demzufolge kann nach PHx auf mRNA Ebene eine gesteigerte Produktion von TNF in LT β R^{-/-} Tieren nachgewiesen werden, welche zu einer frühen Aktivierung von NF- κ B führt. Es wurde bereits durch Yamada *et al.* gezeigt, dass TNFRp55^{-/-} Tiere einen Defekt in der Expression der IL-6 mRNA aufweisen, wohingegen WT Tiere einen Anstieg der IL-6 Expression bereits 4 h postoperativ aufweisen (Yamada *et al.*, 1997). Eine 3-fach erhöhte Expression der IL-6 mRNA konnte auch in der vorliegenden Arbeit in WT Tieren nachgewiesen werden und bestätigt die Beobachtungen von Yamada *et al.*. Im Gegensatz dazu, zeigten LT β R^{-/-} Tiere bereits 6 h nach PHx eine 5-fach erhöhte und 48 h nach PHx eine 11-fach erhöhte Expression der IL-6 mRNA. Ein Defekt in der Expression von IL-6 ist in LT β R^{-/-} Tieren demnach nicht gegeben. Tumanov *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von LT β durch T-Zellen zu einer Interaktion von LT/LT β R führt, die eine Produktion von IL-6 induziert, STAT3 aktiviert und zu einem besseren Überleben nach akutem Leberschaden führt (Tumanov *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte ein Anstieg von STAT3 auf Transkriptionsebene nur 48 h postoperativ in WT Tieren nachgewiesen werden. In LT β R^{-/-} Tieren ließ sich, wie bereits erwähnt, ein Anstieg in der Expression von IL-6 zwar identifizieren, jedoch bleibt unklar welche Mechanismen diesem Anstieg zugrunde liegen, da ein Anstieg in der Expression der STAT3 mRNA ausblieb. Interessanterweise wies die Expression der Trim30 α mRNA, 6 h *post PHx* in WT Tieren eine um den Faktor 3000 deutlich stimulierte Induktion auf, wohingegen LT β R^{-/-} Tiere eine deutlich verminderte Expression zeigten. Trim30 α gehört zur Familie der *tripartite-motif* (TRIM) Proteine die involviert sind in der Regulation der Zellproliferation, Differenzierung, Entwicklung, Onkogenese und Apoptose (Nisole *et al.*, 2005). Studien haben gezeigt, dass TRIM Familienmitglieder eine kritische Funktion in der angeborenen Immunantwort haben. Zudem wiesen Shi *et al.* als auch Wimmer *et al.* nach, dass TRIM30 α als negativer Regulator der TLR-induzierten NF- κ B Aktivierung ein Zielgen des LT β R Signalweges ist und eine LT β R-induzierte TRIM30 α Expression die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen inhibiert sowie negativ mit der TNF Expression korreliert (Shi *et al.*, 2008; Wimmer *et al.*, 2012). Die verminderte Expression von Trim30 α nach PHx in LT β R^{-/-} Tieren kann daher die erhöhte Expression der TNF mRNA nach PHx erklären, die wiederum die beschriebene, leicht erhöhte Expression der IL-6 mRNA in LT β R^{-/-} Tieren erklären könnte. Des Weiteren könnte die verminderte Expression von Trim30 α auch die erhöhten Werte von TNF und IL-6 im Serum von LT β R^{-/-} Tieren erklären.

Entgegen den Beobachtungen von Anders *et al.*, die einen Anstieg in der Expression der LT α mRNA 4 h *post PHx* und ein Abfallen 12 h nach PHx zeigten, konnte in dieser Arbeit lediglich 24 h postoperativ ein 3-facher Anstieg der LT α Expression in WT Tieren identifiziert werden (Anders *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben, dass LT β R^{-/-} Tiere 6 h postoperativ einen 3-fachen Anstieg der LT α mRNA zeigen, der 12 h und 24 h nach PHx absinkt und nach 48 h *post PHx* wieder ansteigt. Des Weiteren zeigte Anders *et al.* eine relativ konstante Expression der LT β mRNA in WT Tieren mit einem kleinen Anstieg 12 h *post PHx* (Anders *et al.*, 2005). Entgegen dieser Beobachtung wurde in dieser Arbeit eine eher verminderte Expression der LT β mRNA nach PHx nachgewiesen. Lediglich 6 h postoperativ konnte ein leichter Anstieg in der Expression von LT β in LT β R^{-/-} Tieren verzeichnet werden, der im weiteren Verlauf eine mit WT Tieren vergleichbar verminderte Expression aufwies. Die Expression von Aldh1l1, dem eine Rolle im Metabolismus zugeordnet wird (Katalyse der Konversion von 10-Formyltetrahydrofolat im Glycin-Stoffwechsel) ließ in den LT β R^{-/-} Tieren nach PHx einen Anstieg erkennen, der 48 h nach PHx um das 25-fache erhöht war. WT Tiere zeigen lediglich 12 h nach PHx einen kurzfristigen 7-fachen Anstieg der Aldh1l1 mRNA. Das transkriptionelle Profil der WT Tiere hinsichtlich der Aldh1l1 Expression ist kongruent mit den in der Literatur aufgeführten Daten. Fukuhara *et al.* bewiesen, dass die Aldehyddehydrogenasen (ALDH), zu der auch die Aldh1l1 gehört, 48 h bis 72 h nach PHx im WT herunterreguliert werden (Fukuhara *et al.*, 2003). Gene denen eine Funktion im Zellzyklus oder in der Zellproliferation zugeordnet wird, wurden in beiden Genotypen differentiell reguliert vorgefunden. G0S2 führt dazu, dass die Hepatozyten aus der Ruhephase (G0) in die G1-Phase übertreten und den Zellzyklus stufenweise durchlaufen (Nagino and Nimura, 2001). In dieser Arbeit konnte nur 6 h nach PHx ein Anstieg in der G0S2 mRNA nachgewiesen werden, die 3-fach in WT Tieren und nur 1,5-fach in LT β R^{-/-} Tiere erhöht war. Zu weiteren Zeitpunkten nach PHx zeigten beide Genotypen eine verminderte Expression der G0S2 mRNA. Die verminderte Expression von G0S2 in LT β R^{-/-} Tieren könnte nur grenzwertig ausreichen um den Hepatozyten den Eintritt in die G1-Phase zu erlauben bzw. den Eintritt in die G1-Phase zu verzögern. Eine fehlende/verzögerte Mitose der Hepatozyten könnte zu Letalität der LT β R^{-/-} Tieren beitragen. In der nachfolgenden S-Phase wird die DNA repliziert, so dass S-Phase-Aktivatoren, wie u.a. das Gen CyclinD1 benötigt werden. Sowohl vor als auch 6h nach PHx zeigten WT Tiere eine konstante Expression der CyclinD1 mRNA, die in LT β R^{-/-} Tieren nicht vorzufinden ist bzw. zeigten LT β R-defiziente Tiere eine verzögerte, erst nach 48 h 3-fach erhöhte Expression von Cyclin D1. Mullany *et al.* zeigten, dass CyclinD1 einen proliferativen Effekt während der Leberregeneration hat (Mullany *et al.*, 2008). Demnach weist der in LT β R^{-/-} Tieren verzögerte Anstieg in der Expression von CyclinD1 auf eine Deregulation der CyclinD1 Expression hin, die vermuten lässt, dass Hepatozyten von LT β R^{-/-} Tieren verspätet in die S-Phase eintreten und gegebenenfalls auch die DNA-Replikation zeitlich verzögert stattfindet. Diese Hypothese wird durch

die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 bestätigt, der 6h nach PHx nur einen 100-fachen Anstieg in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zeigt, wohingegen WT Tiere 6 h postoperativ einen 300-fachen Anstieg der Ki67 mRNA aufweisen. Außerdem zeigten bereits Anders *et al.*, dass in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren die DNA-Synthese vermindert und verspätet abläuft (Anders *et al.*, 2005). Unklar bleibt, ob diese Deregulation ursächlich für das Versterben der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass DGKs (Diacylglycerol-Kinasen) Diacylglycerol phosphorylieren, was schließlich zur Aktivierung von Phosphatasen führt (Merida *et al.*, 2008). Cai und Sewer *et al.* zeigten zudem, dass die Expression und Aktivierung der Diacylglycerol-Kinase Theta (Dgkq) eine Antwort auf eine Stimulation von Zellen durch GS ist und beschrieben, dass Dgkq eine wichtige Rolle in der hepatischen GS-regulierten Glucose-Produktion hat (Cai and Sewer, 2013). In dieser Arbeit wurde jedoch in beiden Genotypen eine verminderte Expression der Dgkq mRNA *post PHx* gefunden, dies weist somit auf eine verminderte GS-regulierte Glucose-Produktion hin. Zusammenfassend konnte mittels qRT-PCR bewiesen werden, dass bereits 6 h nach PHx transkriptionelle Unterschiede zwischen WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tieren vorzufinden sind. Neben Mug2, das möglicherweise eine wichtige Rolle in der $LT\beta R$ -abhängigen Leberregeneration spielt, konnte in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren eine verminderte und zeitlich verzögerte Expression der Zellzyklusgene CyclinD1 und G0S2 sowie des Proliferationsmarkers Ki67 nachgewiesen werden. Zudem zeigten $LT\beta R^{-/-}$ Tiere einen deutlichen Anstieg in der Expression der mRNA für die Zytokine TNF und IL-6, der neben einer frühen Aktivierung von NF- κ B ebenfalls die These unterstützt, dass es postoperativ in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zu einer unkontrollierten inflammatorischen Antwort kommt, die sich negativ auf das Überleben nach PHx auswirken könnte. Eine Analyse des transkriptionellen Profils zu früheren Zeitpunkten (2 h bis 4 h *post PHx*) könnte deshalb weitere Hinweise über differentiell regulierte $LT\beta R$ - und Leberregenerations-abhängige Gene ergeben.

5.6 Die Akkumulation von toxischen GS nach PHx charakterisiert in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren eine Cholestase

Eine Erhöhung der Gallensalze beschleunigt die Zellproliferation und ist laut Huang *et al.* möglicherweise das entscheidende Signal für die Initiation der Leberregeneration (Huang *et al.*, 2006). Eine Störung im enterohepatischen Kreislauf mit insuffizienter GS-Synthese nach PHx geht mit einer Inhibition der Leberregeneration einher (Meng *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 1994; Ueda *et al.*, 2002). GS sind darüber hinaus auch toxisch und ein Anstieg der hepatischen GS, wie sie in cholestatischen Lebererkrankungen gegeben sind, induzieren Apoptose und Nekrose (Kullak-Ublick *et al.*, 2000). Keitel *et al.* bestätigten, dass dauerhaft erhöhte GS-Level zu schweren Leberschäden führen und überdies die Bildung von Tumoren fördern. Aufgrund dessen muss der GS-Pool streng reguliert werden (Keitel *et al.*, 2008). Gerloff *et al.* beschrieben, dass die verbleibenden Hepatozyten

während der frühen Phase nach PHx einem erhöhten GS-Spiegel exponiert sind und es erst 48 h *post PHx* zu einer Abnahme der hepatischen GS kommt (Gerloff *et al.*, 1999). Tendenziell können diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In beiden Genotypen kommt es nach PHx zu einem massiven Anstieg der GS, wobei die WT Tiere 12 h nach PHx ihren Peak erreichen, $LT\beta R^{-/-}$ Tiere bereits nach 6 h. Während allerdings die GS Spiegel der WT Tiere nach 24 h bereits wieder deutlich absinken, fallen die GS-Spiegel in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren deutlich langsamer ab und sind 24 h nach PHx noch immer signifikant gegenüber den WT Tieren erhöht. Zusammenfassend weisen beide Genotypen während der frühen Regenerationsphase ein dereguliertes GS-Profil auf. Dabei sind $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Gegensatz zu WT Tieren anscheinend nicht in der Lage diesen Zustand zügig zu überwinden und es kommt zu einer Akkumulation von GS. Überdies konnten postoperativ tendenziell vermehrt hydrophile 3OH GS (CA, M-CA) in den WT Tieren nachgewiesen werden und ein geringerer Anteil von toxischen 2OH und OH GS wie LCA, T-LCA und LCAS. In $LT\beta R^{-/-}$ Tieren sind u.a. LCA und seine Konjugate 24 h *post PHx* im Serum erhöht und es werden zusätzlich vermehrt die toxischen Glycin-GS gebildet. LCA ist laut Literatur in hohen Konzentrationen extrem toxisch und induziert Apoptose in Hepatozyten, die zur Entstehung nekrotischer Areale in der Leber führen kann (Hofmann *et al.*, 1999). So bestätigten Fickert *et al.*, dass eine Fütterung mit 1% LCA zu biliären Infarkten und Cholangitis führt und in einer beinahe 100 %igen Letalität nach 14 Tagen resultiert (Fickert *et al.*, 2006). Diese toxische Eigenschaft könnte das erhöhte Vorkommen und Ausmaß von nekrotischen Arealen in $LT\beta R^{-/-}$ Lebergewebe postoperativ und die erhöhte Letalität nach PHx erklären.

Zudem zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere 6 h *post PHx* erhöhte Glycin(G)-GS Spiegel. G-konjugierte GS sind insgesamt toxischer als unkonjugierte oder Taurin-konjugierte GS, weil sie protoniert vorliegen, und daher nicht aktiv in die Zelle transportiert werden müssen, sondern die Zellmembran in Abhängigkeit von pKa und lokalem pH frei permeieren können (Stamp & Jenkins, 2008). Es wurde gezeigt dass G-CDCA in Hepatozyten die IL-6 induzierte Aktivierung von STAT3 beeinträchtigt und erhöhte Werte dadurch zu einem Gallensalz-induzierten Leberschaden *in vitro* führen können (Graf *et al.*, 2008; Graf *et al.*, 2006). Eine verminderte STAT3 Expression nach PHx in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren wurde mittels quantitativer RT-PCR bereits im vorherigen Kapitel gezeigt und korreliert mit den erhöhten G-CDCA Konzentrationen 24 h postoperativ im Serum von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren. Humane Zellen schützen sich vor der toxischen Wirkung der Glycin-konjugierten GS u.a. durch die Bildung eines sogenannten HCO_3^- -*Umbrellas*, der durch die Sekretion von HCO_3^- entsteht (Beuers *et al.*, 2010). Das HCO_3^- deprotoniert die Glycin-GS und verhindert damit deren ungehinderte Diffusion in die Zelle. Beim Menschen führt eine Erhöhung der Glycin-GS zur Induktion der TGR5 Expression, TGR5 erhöht wiederum den cAMP Spiegel und führt zu einer Aktivierung des Anion Exchange Proteins2 (AE2). AE2 ist der Haupt-Exporter von HCO_3^- und eine gesteigerte Aktivität führt zu einem vermehrten HCO_3^- Export aus der Zelle (Beuers *et al.*, 2010).

Normalerweise werden in Mäusen GS hauptsächlich Taurin-konjugiert, die Glycin-Konjugation spielt nur eine untergeordnete Rolle und murine Zellen sind sensibler gegenüber den toxischen Wirkungen von G-GS.

Bisher ist nicht gezeigt, dass murine Zellen einen effektiven HCO_3^- -Umbrella besitzen und es wäre denkbar, dass murine Zellen nicht in der Lage sind, durch Bildung eines effizienten HCO_3^- -Umbrellas auf erhöhte Glycin-GS Spiegel zu reagieren. Interessanterweise zeigen auch nicht operierte, *in vitro* ausgewachsene Cholangiozyten der $\text{LT}\beta\text{R}^{-/-}$ Tiere eine generell erhöhte Expression von TGR5 im Vergleich zu den WT Tieren. Liegt eine Akkumulation von GS in Hepatozyten vor, dient als weiterer Schutzmechanismus eine Repression der GS-Synthese über eine negative transkriptionelle Regulation des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms Cyp7A1 (Chiang, 2009). Der GS-Rezeptor FXR kontrolliert dabei die *de novo* Synthese von Cyp7A1, verbessert die Konjugation und Detoxifikation von GS und erhöht den kanikulären und basolateralen Efflux, um die Zelle vor einer intrazellulären Akkumulation toxischer GS (Chiang, 2002, 2003; Russell, 2003) und damit einem möglichen Leberschaden zu schützen (Keitel et al., 2008). Dass insbesondere FXR-abhängige Wege eine wichtige Funktion in der Regulation von GS einnimmt, ist in der Literatur belegt. Song et al. zeigten, dass BSEP, ein GS-Exporter, von FXR positiv reguliert wird (Song et al., 2008). Sinal et al. konnten nachweisen, dass $\text{FXR}^{-/-}$ Tiere nach GS-Fütterung einen Defekt in der Herunterregulation von Cyp7A1 und Cyp8B aufweisen, der zu erhöhten Serum GS-Werten und einer Mortalitätsrate von 30 % an Tag 7 führt (Sinal et al., 2000). Meng et al. beschrieben FXR überdies als primären GS-Sensor, der nach einem Leberschaden, den erhöhten GS-Influx detektiert und eine effiziente Leberregeneration fördert (Meng et al., 2011). Überdies resultiert eine Aktivierung von FXR durch GS in einem Anstieg der Expression des endokrinen Hormons FgF15 (Fibroblasten Wachstumsfaktor 15; humanes Homolog FgF19 (Uriarte et al., 2013)) im Hepatozyten (Inagaki et al., 2005), welches sekretiert wird und an den Rezeptor FgFR4, der auf benachbarten Hepatozyten exprimiert wird, bindet. Eine Stimulation von FgFR4 durch FgF15 führt zur Dimerisierung des Rezeptors, Autophosphorylisation und einer Aktivierung des JNK Signalweges, der zu einer Repression der Cyp7A1 Transkription führt (Holt et al., 2003). Dieser Mechanismus erlaubt der Leber, die GS-Synthese effizient zu regulieren und auf Veränderungen der GS-Level zu reagieren, um einen konstanten Pool von GS zu gewährleisten (Li and Chiang, 2012). Uriarte et al. zeigten zudem, dass FgF15 als essentielles Hormon an der Regulation der GS während der Leberregeneration nach PHx beteiligt ist und $\text{FgF15}^{-/-}$ Tiere erhöhte intrahepatische GS-Level sowie eine erhöhte Mortalität nach PHx aufweisen (Uriarte et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit sind $\text{LT}\beta\text{R}^{-/-}$ Tiere durch eine erhöhte FgF15 Expression 12 h *post PHx* gekennzeichnet, die bei WT Tieren fehlt. Vermutlich ist aufgrund dessen die Cyp7A1 Synthese in den $\text{LT}\beta\text{R}^{-/-}$ Tieren bis 48 h *post PHx* nicht erhöht, steigt aber in den WT Tieren 48 h *post PHx* stark an. Zudem ist in $\text{LT}\beta\text{R}^{-/-}$ Tieren 6 h *post PHx* ein starker postoperativer Anstieg in der TGR5 Expression zu erkennen, der ebenfalls die Neusynthese von GS via Cyp7A1 drosseln kann. Eine Expression von TGR5 führt demnach ähnlich wie

FgF15 zur Inhibition der Expression von Cyp7A1. Allerdings konnte für beide Genotypen keine differentielle Regulierung der FXR Expression gezeigt werden, was dadurch begündet werden kann, dass eine Regulierung der FXR-Aktivität vermutlich nicht transkriptionell erfolgt (*persönliche Mitteilung von V. Keitel*). Meier und Stieger *et al.* zeigten, dass BSEP^{-/-} Tiere eine Akkumulation von GS in den Hepatozyten aufweisen, die einerseits zu einer erhöhten basolateralen GS-Exkretion und andererseits zu einer Inhibition der *de novo* GS-Synthese führte (*Meier and Stieger, 2002*). Entsprechendes konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, da die Expression der Proteine BSEP und MRP2 in partiell hepatektomierten LTβR^{-/-} Tieren bis 24 h postoperativ keine charakteristischen Unterschiede zu WT Tieren aufwiesen. Demzufolge scheint unmittelbar nach PHx der aktive Export konjugierter GS aus dem Hepatozyten apikal in die Kanikuli in beiden Genotypen zu funktionieren. Allerdings zeigen WT Tiere 48 h nach PHx eine deutliche Erhöhung der BSEP Expression, die in den LTβR^{-/-} Tieren nicht zu sehen ist. Unter normalen physiologischen Konditionen ist der basolaterale Efflux konjugierter GS in das portale Blut nebensächlich. Unter cholestatischen Bedingungen, kann dieser Efflux jedoch die gestörte kanikuläre GS-Sekretion teilweise kompensieren, da überschüssige oder toxische GS aus dem Hepatozyten gepumpt werden (*Hirohashi et al., 2000*). Dies wird durch eine Hochregulation der Expression des basolateralen Exporters MRP3 erreicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression des Proteins MRP3 bei LTβR^{-/-} Tieren im Vergleich zu WT Tieren eine differentielle Regulation erkennen lässt. Insgesamt scheinen die Hepatozyten der LTβR^{-/-} Tiere durch eine nur geringe Expression von MRP3 früh nach PHx nicht in der Lage zu sein, GS mit der gleichen Effizienz basolateral über MRP3 auszuschleusen wie WT Hepatozyten und sind damit anfälliger für toxische intrazelluläre GS-Spiegel. Gleichzeitig scheint die Aufnahme von GS aus dem Pfortaderblut in die Hepatozyten über eine reduzierte Expression von Ntcp in LTβR^{-/-} Tieren reduziert. GS inhibieren nicht nur die Expression von Cyp7A1 sondern auch die von GS-Importern wie u.a. Ntcp durch FXR-SHP-abhängige Mechanismen (*Denson et al., 2001*), die ebenfalls Hepatozyten vor einer Akkumulation toxischer GS schützen können (*Jung et al., 2002*). Unter normalen physiologischen Bedingungen extrahiert die Leber effizient GS aus der portalen Zirkulation, so dass die GS-Konzentration in der systemischen Zirkulation sehr gering ist (*Li and Chiang, 2012*). Überdies mediiert TNF nach PHx oder Leberschaden über eine *heopatozyte nuclear factor 1* (HNF1)-abhängige Herunterregulation von Transportern wie Ntcp oder OATPs die basolaterale GS-Aufnahme (*Geier et al., 2003; Gerloff et al., 1999*). Diese adaptive Herunterregulation wird ebenfalls als schützende Antwort interpretiert, um eine Überlastung der Hepatozyten mit GS zu limitieren, demnach scheint TNF ein zentraler Regulator von Transporter Genen während der Leberregeneration zu sein (*Geier et al., 2003*). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass WT Tiere früh nach PHx eine deutliche Induktion der Ntcp Expression zeigen, dies weist auf eine frühe und effiziente GS-Extraktion aus der Portalvene hin. LTβR^{-/-} Tiere hingegen zeigen keinen Anstieg der Ntcp Expression und weisen nach

PHx eine deutlich reduzierte Expression von Ntcp auf. Dementsprechend kann geschlossen werden, dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere kaum oder nur wenig GS aus der Portalvene in die Hepatozyten aufnehmen können, was wiederum den Anstieg der GS im Serum der $LT\beta R^{-/-}$ Tieren erklären könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere nach PHx einem größeren metabolischen Stress ausgesetzt sind, insbesondere hinsichtlich der Homöostase von GS und der Regulation des enterohepatischen Kreislaufs. Regulatorische Schutzmechanismen der Hepatozyten, durch eine Inhibition der GS-Synthese über die Expression von Cyp7A1 und eine verminderte Expression von Ntcp sind nicht ausreichend, um die Hepatozyten der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere adäquat vor einer Akkumulation der GS und deren toxischer Wirkung zu schützen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der $LT\beta R$ essentiell für eine effiziente Regulation des enterohepatischen Kreislauf nach PHx ist: Liegt ein Defekt im $LT\beta R$ vor, kommt es zu einer Akkumulation von GS im Hepatozyten und zu einem Anstieg von toxischen GS und ihren Konjugaten im Serum, die sich schlussendlich in einer Cholestase manifestieren und das Überleben nach PHx negativ beeinflussen können. Überdies kann eine Schädigung der Hepatozyten bzw. eine entzündliche Reaktion in der Leber zu einer Proliferation des Gallengangendothels führen und somit die deutlich erhöhten ALP-Werte erklären, die die $LT\beta R^{-/-}$ Tiere insbesondere 24 h, 48 h und 240 h *post PHx* aufweisen. Takeda *et al.* postulierten bereits eine Einteilung des Leberversagens nach Leberresektionen in zwei Formen: die cholestatische Form mit alleiniger Proliferation von Hepatozyten und perisinusoidaler Fibrose und den „nicht-regenerierenden“ Typ, charakterisiert durch Apoptose von Hepatozyten (Takeda *et al.*, 2002).

*Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die in den $LT\beta R$ -defizienten Tieren beschriebenen Defekte in der Leberregeneration und die damit verbundene deutlich erhöhte Letalität nach PHx verschiedene Ursachen haben könnten: Einerseits die im Vergleich zu WT Tieren erhöhte Akkumulation von toxischen GS (Cholestase) in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, andererseits die Deregulation des Zytokinprofils im allgemeinen und die veränderte Expression spezifischer, für die Leberregeneration unmittelbar relevanter Zytokine wie TNF und IL-6. Die histopathologischen Veränderungen (u.a. verstärktes Auftreten von großen nekrotischen Arealen), die mit einer Erhöhung der Transaminasen, der LDH und der ALP einhergehen, sind mit beiden Beobachtungen zu vereinbaren. Sowohl erhöhte GS Werte als auch erhöhte TNF Werte können zur Induktion von Apoptose in Hepatozyten führen. Die nach PHx differentiell regulierten Gene, die an der Progression von Zellen durch den Zellzyklus beteiligt sind und in den $LT\beta R$ -defizienten Tiere vermindert exprimiert werden, könnten in einem verzögerten oder nicht statt findendem Eintritt der Hepatozyten in den Zellzyklus resultieren, was ebenfalls für die verminderte Überlebensrate dieser Tiere verantwortlich sein könnte. In den Microarrays wurden neben Genen für Proteine, die zu den eher erwarteten funktionalen Molekülgruppen gehören (z.B. Zellzyklusgene, Gene des Fett-/Cholesterinstoffwechsel) auch *Mug2*,*

ein Proteaseinhibitor, gefunden, dass in $LT\beta R$ -Hepatozyten kaum induziert wird. Ob die fehlende Expression von *Mug2*, das nach PHx in $LT\beta R$ -defizienten Tieren zu beobachten war, eine entscheidende Rolle in der Leberregeneration spielt, und in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren möglicherweise ein Schlüsselgen für das Überleben nach PHx darstellt, bleibt unklar und muss in weiteren Analysen, z.B. in einer *Mug2*^{-/-} Mauslinie bzw. in mit anti-*Mug2* Antikörpern behandelten Tieren geklärt werden.

5.7 Etanercept-behandelte $LT\beta R^{-/-}$ Tiere versterben innerhalb von 48 Stunden nach PHx

TNF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das eine Vielzahl von biologischen Effekten wie u.a. Apoptose, inflammatorische Prozesse und auch die Proliferation von Hepatozyten induzieren kann (Fujita et al., 2000; Shimizu et al., 2005; Yamada et al., 1997). Sowohl TNF als auch $LT\alpha$ interagieren als Homotrimere mit den homologen TNF-Rezeptoren p55 und p75 (Yamada et al., 1998). Der kanonische Signalweg über TNFRp55 wird für die Initiation der Leberregeneration benötigt. Mäuse ohne funktionellen TNFRp55 zeigen eine erhöhte Sterblichkeit nach PHx (Yamada et al., 1998). Im Gegensatz zu TNFRp55-vermittelten Signalen können $LT\beta R$ -vermittelte Signale sowohl über den kanonischen, als auch über den sogenannten alternativen NF- κ B-Signalweg weitergeleitet werden (Dejardin et al., 2002; Haybaeck et al., 2009; Muller and Siebenlist, 2003). Interessanterweise wurde durch Madge and May et al. vorgeschlagen, dass der Signalweg über den $LT\beta R$ einen *Cross-talk* zwischen dem klassischen und alternativen Signalweg ermöglicht (Madge and May, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen der Ausfall beider Signalwege, das heißt eine Inhibition des TNFRp55 Signalweges und des $LT\beta R$ Signalweges auf das Überleben nach PHx hat. Es sollte untersucht werden, ob nach PHx ein Signalweg in der Lage ist, einen Defekt im anderen Signalweg zu mindestens bis zu einem gewissen Grad zu kompensieren. Zunächst wurde versucht, durch eine Verpaarung von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren mit TNFRp55^{-/-} Tieren $LT\beta R/TNFRp55^{-/-}$ Tiere zu generieren. Da jedoch die Gene beider Rezeptoren ($LT\beta R$ und TNFRp55) auf dem Chromosom 6 sehr nahe beieinander liegen, war die Zucht bisher nicht erfolgreich da das notwendige *Crossing-over* im Laufe dieser Promotionsarbeit nicht stattgefunden hat (Daten nicht gezeigt). Alternativ wurde eine Applikation des TNF-Inhibitors Etanercept (Enbrel®), einem löslichen TNFRp75-F_c Fusionsprotein, gewählt. Durch die Bildung eines Komplexes aus TNF und Etanercept ist TNF nicht mehr in der Lage, an die membrangebundenen TNF-Rezeptoren zu binden und die TNF-spezifischen Signalwege nicht mehr zu aktivieren. Zudem wurde Etanercept bereits erfolgreich als Therapeutikum im Rahmen der humanen rheumatischen Arthritis eingesetzt und in der inflammatorischen Erkrankung der Psoriasis (Gottlieb et al., 2003; Leonardi et al., 2003; Moreland et al., 1999; Papp et al., 2005; Weinblatt et al., 1999).

Ziel war es, durch Etanercept den TNFR Signalweg in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren zu blockieren und somit funktional $LT\beta R/TNFRp55$ -defiziente Tiere herzustellen. Bereits Akerman *et al.* zeigten, dass eine Blockierung der TNF-Signalkaskade durch spezifische anti-TNF Antikörper, die Leberregeneration in WT Tieren inhibiert und somit ein essentieller Faktor für das *Priming* der Hepatozyten in der Leberregeneration ist (Akerman *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit zeigte ein erster Vorversuch, dass WT Tiere nach einer Applikation von 10 $\mu\text{g/g}$ KG Etanercept einen vergleichbaren Phänotyp im Überleben nach PHx (47 % Überleben) aufweisen, wie $TNFRp55^{-/-}$ Tiere (53 % Überleben). Dass die Überlebensrate der Etanercept-behandelten WT Tiere unter dem der $TNFRp55^{-/-}$ Tiere liegt, könnte zum einen durch den zusätzlichen Stress einer Etanercept-Injektion erklärt werden, zum anderen ist in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren lediglich der $TNFRp55$ Signalweg blockiert, wohingegen in Etanercept-behandelten WT Tieren beide TNFR-Signalwege ($TNFRp55$ und $TNFRp75$) inhibiert sind. Um zu kontrollieren, ob es einen zusätzlichen Effekt bzgl. des Überlebens nach PHx durch die Etanercept-Behandlung gibt, wurden $TNFRp55^{-/-}$ Tiere mit 10 $\mu\text{g/g}$ KG Etanercept behandelt. Aufgrund eines nur geringen beobachteten Unterschieds auf das Überleben nach PHx (40 % Überleben) im Vergleich zu nicht Etanercept behandelten $TNFRp55^{-/-}$ Tieren (53 % Überleben) sind keine weiteren gravierenden Effekte durch die Applikation von Etanercept nachweisbar. Im spezifischen Versuchsziel, das heißt bei der Behandlung mit 10 $\mu\text{g/g}$ KG Etanercept in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren konnte ein kompletter Ausfall beider Signalwege, das heißt des $LT\beta R$ - und des $TNFRp55$ -Signalweges erzielt werden. Die suffiziente Leberregeneration nach PHx wurde durch diese Behandlung vollständig verhindert und zeigte in den Etanercept behandelten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren eine 100 % Letalität 48 h postoperativ. Erhöhte Serumparameter, wie z.B. AST, ALP und Bilirubin, nach einer Applikation von Etanercept und anschließender PHx konnten ebenfalls massive Leberschäden bestätigen, die Tiere zeigten im Prinzip jedoch ähnliche Anstiege dieser Parameter wie nicht Etanercept behandelte Tiere beider Genotypen. Weitere Analysen wie z.B. *Microarrays*, qRT-PCR oder ELISAs wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Ergebnisse solcher Versuche könnten zum Verständnis der Leberregeneration wesentlich beitragen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Applikation von 10 $\mu\text{g/g}$ KG Etanercept in $LT\beta R^{-/-}$ Tiere erfolgreich funktional $LT\beta R/TNFRp55^{-/-}$ Tiere imitieren kann. Zusätzlich konnte belegt werden, dass $TNFRp55$ - und $LT\beta R$ -vermittelte Signale innerhalb der ersten 48 h nach PHx absolut notwendig für eine effiziente Leberregeneration und für das Überleben sind. Diese Erkenntnisse bieten die Möglichkeit mit Hilfe von funktionalen $LT\beta R/TNFRp55^{-/-}$ Tieren, in einem definierten Zeitrahmen, weitere Untersuchungen hinsichtlich essentieller $TNFRp55$ - bzw. $LT\beta R$ -vermittelter Signale im 70 % Hepatektomie Modell durchzuführen.

5.8 $LT\beta R^{-/-}$ Tiere sind suszeptibel gegenüber einer Infektion mit *T. gondii*

Nach einer Infektion des Organismus mit Pathogenen kommt es zunächst zur Aktivierung der angeborenen, unspezifischen Immunantwort, die anschließend die Aktivierung der spezifischen Immunantwort induziert. Für eine effektive und schützende Immunantwort ist sowohl eine intakte Struktur der lymphatischen Organe notwendig, als auch die Aktivierung von Effektorfunktionen. $LT\beta R$ -regulierte anti-parasitäre Effektormechanismen gegen *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) sind bisher noch nicht untersucht. Es ist allerdings bekannt, dass der $LT\beta R$, ebenso wie TNF, $LT\alpha$ und TNFRp55 für eine effiziente Immunantwort gegen andere Pathogene, wie z.B. *Listeria monocytogenes* eine entscheidende Rolle spielt (Hehlgans and Pfeffer, 2005; Kutsch et al., 2008). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal dokumentiert, dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu WT Tieren suszeptibler gegenüber einer *T. gondii* Infektion sind; es versterben nach einer Infektion mit 20 Zysten (in einem Zeitraum von 60 Tagen) ca. 70 % der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere, jedoch nur ca. 20 % der WT Tiere. Dabei versterben die $LT\beta R^{-/-}$ Tiere früher (Tag 20 *p.i.*) als die WT Tiere (Tag 30 *p.i.*). Der Verlauf der Toxoplasmose (Auftreten von Krankheitszeichen wie aufgestäubtes Fell, Gewichtsverlust, Apathie) ist in beiden Genotypen ähnlich. Infiziert man beide Mauslinien mit 40 Zysten steigt die Mortalität der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere gegenüber einer *T. gondii* Infektion dramatisch an. Während nur 8 % der infizierten WT Tiere versterben, zeigen infizierte $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine signifikant erhöhte Mortalität von 91 %. Der Todeszeitpunkt verschiebt sich dabei kaum bei den WT Tieren, $LT\beta R^{-/-}$ Tiere versterben bei einer Infektion mit 40 Zysten schon deutlich früher, nämlich ab Tag 12 *p.i.* Die unterschiedlichen Mortalitätsraten bei den WT Tieren sind auf Unterschiede in der Virulenz der Parasitenpräparationen zurückzuführen. Publierte Daten von anderen immundefizienten, gegenüber *T. gondii* suszeptiblen Mauslinien zeigten einen vergleichbaren Verlauf der Überlebenskurve. So sind $LT\alpha^{-/-}$ und $TNF^{-/-}$ Mäuse gegenüber einer Infektion mit *T. gondii* sehr anfällig und sterben an einer durch den Parasiten ausgelösten, akuten nekrotisierenden Enzephalitis (Schluter et al., 2003a). Eine weitere Studie zeigte, dass eine Infektion von $TNFRp55^{-/-}$ und $iNOS^{-/-}$ Tieren mit *T. gondii* ebenfalls zu einer letalen Toxoplasmenezephalitis führt, wohingegen $TNFRp75$ bei der Immunantwort gegen Toxoplasmen keine Rolle zu spielen scheint (Silva et al., 2002; Silva et al., 2009; Yap et al., 1998). Für $LT\beta R^{-/-}$ Tiere wird ein ähnlicher Phänotyp nach Toxoplasmeninfektion erwartet, da beide Rezeptoren, $LT\beta R$ und $TNFRp55$, zur gleichen Supergenfamilie gehören und auch in anderen Infektionsmodellen einen vergleichbaren Phänotyp zeigen. Lediglich $IFN\gamma$ -Rezeptor-defiziente Tiere oder $IFR1^{-/-}$ Tieren weisen einen anderen Verlauf als $LT\beta R^{-/-}$ Tiere auf und versterben zu 100 %, und zwar relativ früh, 2-3 Tage, nach der Infektion, in der akuten Phase (Deckert-Schluter et al., 1998b; Deckert-Schluter et al.; Khan et al., 1994; Scharton-Kersten et al., 1996). Darüber hinaus konnte durch diese Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Suszeptibilität gegenüber *T. gondii* geschlechtsspezifisch zu sein scheint, und dass sowohl bei einer 20 Zysten- als auch bei einer 40 Zysten-Infektion weibliche $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine

höhere Sensitivität im Vergleich zu männlichen Tieren aufweisen. Dies ist anders als bei den Beobachtungen von Krücken *et al.*, die zeigten, dass im Rahmen einer Infektion mit *Plasmodium chabaudi*, $LT\beta R^{-/-}$ weibliche Tiere eine erhöhte Resistenz gegenüber Malaria aufweisen, wohingegen männliche $LT\beta R^{-/-}$ Tiere vermehrt diesem Parasiten erliegen (Krücken *et al.*, 2005). Ob die Testosteron-Spiegel von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren sich nachteilig auf eine Infektion mit *T. gondii* auswirken könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Bei WT Tieren führt eine Toxoplasmeninfektion zur Aktivierung des Immunsystems, dessen Effektormechanismen die Parasiten kontrollieren. Im frühen, akuten Stadium der Infektion liegen die Toxoplasmen als sich schnell teilende Tachyzoiten vor. Die Tachyzoiten stellen dabei die hauptsächlich pathogene Form der Toxoplasmen dar. Durch Bildung von Zysten, vorwiegend im Gehirn und der Muskulatur können die Parasiten im weiteren Verlauf dem Immunsystem entgehen und dauerhaft im Wirt überleben. In dieser chronischen Phase liegen die Parasiten in den Zysten als langsam wachsende Bradyzoiten vor (Innes, 2010). Interessanterweise verläuft die Sterbekurve bei den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nicht linear: Es sieht so aus, als ob ein Teil der Tiere (ca. 35 %) der Infektion relativ früh in der akuten Phase, zwischen Tag 12 und Tag 20 *p.i.*, erliegt. Danach flacht die Kurve ab und erst ab Tag 34 *p.i.* (chronische Phase) sterben erneut Tiere. Auf Grund der geringen Tierzahlen kann die Hypothese einer unimodalen Verteilung der Sterbezeitpunkte nicht mit ausreichender Signifikanz widerlegt werden, daher sollte das Experiment mit erhöhter Tierzahl wiederholt werden. Zudem wäre es interessant zu untersuchen, ob der $LT\beta R$ eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der chronischen Phase einer Toxoplasmeninfektion spielt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass erstens das Immunsystem in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren durch den fehlenden $LT\beta R$ -Signalweg nicht effizient aktiviert werden kann, und daher Tiere relativ früh z.B. an der erhöhten Parasitenlast (Tachyzoiten) sterben. Bei einigen Tieren könnte diese ineffiziente Immunreaktion zunächst ausreichen, um die Infektion in die chronische Phase zu drängen, ist jedoch unzureichend um die chronische Phase aufrecht zu erhalten und es kommt zu einer Reaktivierung von Bradyzoiten. Das könnte die hohe Mortalität in der späteren Phase der Infektion erklären.

5.9 Eine unzureichende Kontrolle der Parasitenlast induziert ausgeprägte Schäden in der Lunge und Leber von *T. gondii*-infizierten $LT\beta R^{-/-}$ Tieren

Histologische Untersuchungen besitzen für den Nachweis von *T. gondii* grundsätzlich keine hohe Sensitivität. Ist zusätzlich eine geringe Anzahl an Gewebezysten in dem jeweiligen Gewebe vorhanden, ist die Wahrscheinlichkeit, eine solche Zyste in dem Gewebeschnitt nachzuweisen, nicht sehr groß. Aussagekräftig ist die histologische Untersuchung daher nur im positiven Fall, ist dann jedoch ein Beweis für eine Infektion mit dem Parasiten.

LT β R-defiziente Mäuse besitzen bereits im nicht infizierten Zustand charakteristische Lymphozyteninfiltrate in den perivaskulären Arealen der Lunge, der Leber, des Pankreas, der *Glandula submandibularis*, im Fettgewebe und den Nieren (Futterer *et al.*, 1998). Nach einer Infektion mit *T. gondii* zeigten sich bereits in der akuten Phase in Herz, Niere und Milz - am ausgeprägtesten aber in Lunge, Leber und Gehirn - histologische Veränderungen in WT und LT β R^{-/-} Tieren. Insbesondere LT β R^{-/-} Tiere zeichneten sich durch eine verstärkte Einwanderung von Leukozyten aus Blutgefäßen in das umliegende Gewebe und einem Anstieg der Parasitenlast aus. Dies entspricht den Beobachtungen von Silva *et al.* die nach einer 10 Zysten-Infektion mit *T. gondii* zeigten, dass in WT, TNFRp55^{-/-}, iNOS^{-/-} und IFN γ ^{-/-} Tieren bereits an Tag 7 bis 9 *p.i.* ein Gewebeparasitismus in peripheren Organen (Lunge, Leber, Milz) vorliegt. Lungenläsionen gingen einher mit einem Parasitenbefall und inflammatorischen Arealen in den Alveolarwänden und dem interstitiellen Gewebe (Silva *et al.*, 2009). Überdies entwickeln TNFRp55^{-/-} und iNOS^{-/-} Tiere eine Pneumonitis, die auch nach der akuten Phase persistiert, wohingegen WT Tiere den Parasiten in den peripheren Organen bereits an Tag 20 *p.i.* eliminiert hatten (Silva *et al.*, 2002). In der Lunge von LT β R^{-/-} Tieren ist im Vergleich zu WT Tieren, die nur partiell auftretende kleine Infiltrate zeigen, ebenfalls bereits ab Tag 7 *p.i.* ein deutlicher Anstieg großflächiger zellulärer Infiltrate gegeben. Zudem wiesen LT β R^{-/-} Tiere bereits an Tag 7 *p.i.* Zysten im Lungengewebe auf, wohingegen in WT Tieren erst an Tag 14 *p.i.* ein Befall von Zysten nachzuweisen war. Die Beobachtungen von Silva *et al.*, dass spätestens an Tag 21 *p.i.* im Lungengewebe der WT Tiere eine Regression der Infiltrate erkennbar war, konnten überdies in dieser Arbeit bestätigt werden, wohingegen LT β R^{-/-} Tiere zu diesem Zeitpunkt noch immer große inflammatorische Areale aufwiesen, die auf eine chronische interstitielle Pneumonitis hindeuten. Eine Bestimmung der Parasitenlast durch eine Toxoplasmen-spezifische quantitative Real-Time PCR in der Lunge bestätigte zusätzlich, dass Mäuse mit einer Defizienz im LT β R im Vergleich zum Wildtypen eine erhöhte Parasitenlast in der Lunge u.a. an Tag 21 *p.i.* aufweisen, wohingegen in der chronischen Phase (ab Tag 30 *p.i.*) eine Regression der Parasitenlast in überlebenden Tieren beider Genotypen zu verzeichnen war. Des Weiteren zeigten Silva *et al.*, dass nach einer Infektion mit *T. gondii* die Leber erste Läsionen an Tag 5 *p.i.* aufweist, die durch inflammatorische Areale im Parenchym und um das Portalfeld charakterisiert sind. Sie konnten zeigen, dass WT Tiere und TNFRp55^{-/-} an Tag 8 *p.i.* einen vergleichbaren Anstieg an Läsionen aufweisen, wobei an Tag 14 *p.i.* die Läsionen mit der Regression der Parasitenlast rückläufig sind (Silva *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit zeigten Mäuse mit einer Defizienz im LT β R einen im Vergleich zum Wildtypen deutlicheren Anstieg großflächiger Infiltrate im Lebergewebe von Tag 7 bis Tag 21 *p.i.* Darüber hinaus waren in den LT β R^{-/-} Tieren ab Tag 7 *p.i.* Zysten im Lebergewebe und an Tag 21 *p.i.* Fetteinlagerungen in den Hepatozyten erkennbar. Überdies wurde zum ersten Mal beobachtet, dass sowohl WT Tiere als auch LT β R^{-/-} Tiere ab Tag 7 *p.i.* lipomartige Geschwüre im Peritonealraum und im Bereich der Leber

aufwiesen. Das Ausmaß dieser Lipome war dabei in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren deutlich gegenüber WT Tieren erhöht und die Lipome persistierten länger. Die Ursache für das Entstehen der Lipome bleibt unklar und wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben. Zudem konnte in beiden Genotypen ein Anstieg der Lebertransaminase AST und ALT verzeichnet werden, die als Maß für eine Leberschädigung durch den Parasiten dienen. Auffällig ist dabei ein gleichbleibend erhöhtes AST in der chronischen Phase von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, das auch an Tag 60 *p.i.* signifikant gegenüber den WT Tieren erhöht ist. Der Verlauf der LDH Werte in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist ähnlich und ist ebenfalls ein Hinweis auf eine Leberschädigung. Silva *et al.* zeigten im Gehirn von $TNFRp55^{-/-}$ und $iNOS^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu WT Tieren eine höhere Parasitenlast und einen graduellen Anstieg des Parasitismus. Dieser Anstieg war assoziiert mit pathologischen Läsionen, die zu einer letalen Meningoenzephalitis und zu einer 100 %igen Letalität bei den $TNFRp55^{-/-}$ und $iNOS^{-/-}$ Tieren zwischen Tag 30 und 40 *p.i.* führten (Silva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2009). Zudem zeigten Schlüter *et al.*, dass auch infizierte $TNF^{-/-}$, $LT\alpha^{-/-}$ und $TNF/LT\alpha^{-/-}$ Tiere im Vergleich zum WT eine progressive, nekrotisierende Enzephalitis im Gehirn aufweisen, die letztendlich zur Letalität bei diesen defizienten Mauslinien beitrug (Schluter *et al.*, 2003a). Histologische Untersuchungen des Gehirns infizierter WT und $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigten ebenfalls ab Tag 14 *p.i.* eine deutlich erhöhte Anzahl von Zysten in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, wohingegen WT Tiere erst spät in der chronischen Phase, das heißt ab Tag 30 *p.i.*, Zysten aufwiesen. Verifiziert wurde diese Beobachtung durch eine Bestimmung der Zystenanzahlen mittels Isolierung der Zysten aus dem Gehirn und einer Toxoplasmen-spezifischen quantitativen Real-Time PCR mit verschiedenen Geweben. Auch hier zeigten $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine signifikant erhöhte Zystenanzahl gegenüber WT Tieren. An Tag 60 *p.i.* ist ein Unterschied in der Zystenlast noch deutlicher, da $LT\beta R^{-/-}$ Mäuse eine um den Faktor 2 erhöhte Zystenlast im Vergleich zu WT Tieren aufweisen. Grundsätzlich weisen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere nach einer Infektion mit *T. gondii* neben ihren charakteristischen Lymphozyteninfiltraten einen massiven Anstieg immunpathologischer Veränderungen im Lungen- und im Lebergewebe auf. Diese werden speziell in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren durch ein verfrühtes und erhöhtes Vorkommen von Zysten in Lunge, Leber und Gehirn begleitet. Der Schweregrad der Läsionen im Lungengewebe von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren, deren Ausmaß in der chronischen Phase allerdings zurückgeht, lässt auf eine chronisch interstitielle Pneumonitis schließen. Der deutlich erhöhte Anstieg des Parasitismus im Gehirn der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere ist vergleichbar mit dem Parasitismus in $TNFRp55^{-/-}$ und $iNOS^{-/-}$ Tieren. Dies ist in Übereinstimmung mit vorliegenden Daten, da der $TNFRp55$ wie der $LT\beta R$ ein Mitglied der TNFR-Superfamilie ist und bereits in anderen Infektionsmodellen (z.B. *L. Monocytogenes*, *Plasmodium*) einen vergleichbaren Phänotyp aufweist. Aus dem massiven Anstieg der Parasitenlast in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren kann man schließen, dass eine progressive Toxoplasmenenzephalitis ursächlich für die erhöhte Letalität nach einer Toxoplasmen-Infektion ist und $LT\beta R$ -vermittelte Signale wichtig sind, um den Anstieg der Parasitenlast zu kontrollieren.

5.10 LT β R^{-/-} Tiere zeigen Defekte in der Produktion von IFN γ und NO

Eine Toxoplasmeninfektion führt zu einer Aktivierung des Immunsystems, dessen Effektormechanismen die Parasiten abtöten sollen. Während der frühen, akuten Phase der Infektion wird durch die Tachyzoiten zunächst vor allem in dendritischen Zellen, später aber auch in Makrophagen und Neutrophilen, die Freisetzung von IL-12 induziert (Hunter and Sibley, 2012). Einerseits kommt es dadurch zu einer Freisetzung von IFN γ und TNF, andererseits zur Aktivierung einer spezifischen Immunantwort vom T_h1-Typ. Die antimikrobiellen Aktivitäten von IFN γ und TNF einerseits und die spezifische T_h1-Antwort andererseits, führen zur Begrenzung der *T. gondii* Infektion und zur Etablierung der chronischen Phase (Aliberti, 2005). IFN γ und TNF induzieren unter anderem die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffintermediaten (z.B. NO), die die Parasitenvermehrung inhibieren (Schluter et al., 2003a). Dass diese unspezifischen, antimikrobiellen Effektorsysteme der frühen, angeborenen Immunantwort essentiell für eine Eingrenzung von bakteriellen, parasitischen und viralen Infektionen sind, zeigen Experimente mit IFN γ R oder TNFRp55-defizienten Mauslinien, die beide deutliche Defekte in der Abwehr von *T. gondii* aufweisen (Deckert-Schluter et al., 1998a; Deckert-Schluter et al., 1996). Dabei wird aus der Literatur immer deutlicher, welche zentrale Rolle die Produktion von TNF für die Kontrolle des Parasiten *in vivo* spielt (Gazzinelli et al., 1993; Johnson, 1992). Silva et al. bestätigten, dass TNFRp55^{-/-} Mäuse den Parasiten nur unzureichend kontrollieren können u.a. aufgrund niedrigerer Spiegel von induzierbarer NO-Synthase (iNOS) (Silva et al., 2009). Für TNF^{-/-} und LT α ^{-/-} Mäuse konnte gezeigt werden, dass sie suszeptibler gegenüber Toxoplasmeninfektionen sind: Sie zeigen verminderte intrazerebrale NO-Synthespiegel, früh nach Infektion eine verminderte Anzahl parasitenspezifischer, IFN γ produzierender T-Zellen, verminderte Werte für toxoplasmenspezifisches IgM und IgG und einen erhöhten intrazerebralen und intrasplenischen IFN γ Spiegel (Schluter et al., 2003b). Eine Analyse der IL-12p40 Serumspiegel in dieser Arbeit zeigte, dass es bereits 5 Tage nach Infektion zu einem erheblichen Anstieg der IL-12p40 Konzentration in den WT Tieren kommt, die sich signifikant von den LT β R^{-/-} Tieren unterscheidet. Tiere mit einer Defizienz im LT β R zeigen verzögert an Tag 7 *p.i.* einen Anstieg von IL-12p40 im Serum, der durch einen weiteren Anstieg an Tag 14 *p.i.* begleitet wird. Im Übergang zur chronischen Phase, zeigen WT Tiere einen weiteren Peak von IL-12p40 an Tag 36 *p.i.*, wohingegen LT β R^{-/-} Tiere einen weiteren Anstieg bereits an Tag 30 *p.i.* aufweisen. Dass sich die verzögerte Induktion von IL-12p40 in LT β R^{-/-} Tieren nachteilig auf das Überleben und eine effiziente Immunabwehr gegenüber *T. gondii* auswirken, kann durch Studien von Scanga et al. bestätigt werden, die zeigten, dass eine Inhibition von IL-12, bzw. der Subgruppen IL-12p40 und IL-12p35 die Suszeptibilität gegenüber *T. gondii* erhöht (Gazzinelli et al., 1994; Scanga et al., 2002; Scharton-Kersten et al., 1997). Eine Analyse der IFN γ Serumspiegel zeigt, dass es bei LT β R^{-/-} Tieren, im Gegensatz zu den WT Tieren, an Tag 7 *p.i.* zu keinem Anstieg der Serumwerte für IFN γ kommt und

auch später kein deutlicher Anstieg von IFN γ im Serum zu beobachten ist. Parallel dazu zeigte eine Analyse der TNF Serumspiegel, dass es bei LT β R $^{-/-}$ Tieren, im Gegensatz zu den WT Tieren, die an Tag 7 und 36 *p.i.* einen deutlichen Anstieg zeigen, erst an Tag 14 *p.i.* zu einem einmaligen und verzögerten Anstieg von TNF kommt. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da in der Literatur beschrieben wird, dass eine über Makrophagen induzierte IFN γ -Antwort gegen *T. gondii* TNF-abhängig ist (Chao *et al.*, 1993; Langermans *et al.*, 1992). Auch die NO Konzentration im Serum als Maß für die antiparasitäre Immunantwort steigt in LT β R $^{-/-}$ Tieren nach einer Infektion mit *T. gondii* nicht wie bei WT Tieren an und weist einen ähnlichen Phänotyp wie TNFRp55 $^{-/-}$ Tiere auf (Silva *et al.*, 2009). Während WT Tiere signifikant erhöhte NO Konzentrationen an Tag 5 und Tag 7 *p.i.* zeigen, lassen LT β R $^{-/-}$ Tiere eine verspätete und verminderte Expression erkennen und weisen lediglich 14 Tage *p.i.* eine signifikant erhöhte NO Konzentration gegenüber WT Tieren auf. Die verzögerte NO-Produktion in LT β R $^{-/-}$ Tieren korreliert mit dem Vorkommen von Gewebezysten und könnte ursächlich für den unkontrollierten Anstieg der Parasitenlast sein, da durch Fox *et al.* beschrieben wurde, dass die Synthese von NO einen Arginin Mangel hervorruft, der wiederum die *T. gondii* Replikation inhibiert (Fox *et al.*, 2004). Allerdings zeigten Scharton-Kersten *et al.*, dass iNOS $^{-/-}$ Tiere im Gegensatz zu IFN γ $^{-/-}$ Tieren zumindest in der akuten Phase der Infektion die Parasiten-Replikation kontrollieren können (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). Demzufolge kann man vermuten, dass während einer Infektion mit *T. gondii* NO zwar eine Rolle in der Eliminierung des Parasiten einnimmt, aber teilweise IFN γ -unabhängig induziert wird. In LT β R $^{-/-}$ Tieren wird jedoch nach einer Infektion mit *T. gondii* weder IFN γ noch zeitnah NO produziert, so dass eine Eliminierung bzw. Inhibition der Replikation des Parasiten nicht oder nur eingeschränkt stattfindet. Im Blut zirkulierende Zytokinmengen von IL-4 lassen im Vergleich zu WT Tieren lediglich an Tag 7 *p.i.* eine verzögerte Produktion von IL-4 in LT β R $^{-/-}$ Tieren erkennen. Interessanterweise konnte bei einer Analyse weiterer Zytokine und Chemokine in infizierten LT β R $^{-/-}$ Tieren neben einer fehlenden IFN γ -Produktion auch keine Expression von IL-6, IL-10 und IL-23 beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von Studien mit IRF8 $^{-/-}$ Tieren, die nach einer Infektion mit *T. gondii* zwar Defekte in der IFN γ und IL-12 Produktion, jedoch eine normale Expression von TNF, IL-6 und IL-1 aufwiesen (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). Allerdings kann ein Defekt in der Expression von IL-10 in LT β R $^{-/-}$ Tieren ursächlich für den Anstieg der lymphozytären Infiltrate sein und neben dem fehlenden NO die Replikation des Parasiten fördern, da Linke und Hunter *et al.* zeigten, dass die Abwesenheit von IL-10, einem anti-inflammatorischen Zytokin, in Infektionen mit *Plasmodium chabaudi* oder *Trypanosoma cruzi* zu einer letalen inflammatorischen Antwort führt, die durch einen deutlichen Anstieg der Parasitämie charakterisiert sind (Hunter *et al.*, 1997; Linke *et al.*, 1996). Bestätigt wird dies durch Krücken *et al.*, die eine deregulierte Expression von IL-1, IL-4, IL-10, IFN γ und TNF in der Milz von *Plasmodium chabaudi*-infizierten LT β R $^{-/-}$ Tieren zeigten (Krücken *et al.*, 2005).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse daraufhin, dass auch $LT\beta R$ -vermittelte Signale für unspezifische, antiparasitäre Mechanismen bei der Toxoplasmenabwehr eine wichtige Rolle spielen und ihr Fehlen führt zu einem frühen Versterben der Tiere in der akuten Phase der Infektion. Zudem wurde erstmalig gezeigt, dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Gegensatz zu WT Tieren offenbar keine oder nur eine geringe Beteiligung der Milz im Rahmen der Immunantwort aufweisen: Wohingegen WT Tiere nach Infektion eine Erhöhung der Zellularität und eine damit verbundene Vergrößerung der Milz zeigen, ist in $LT\beta R^{-/-}$ Tiere kein Anstieg des Milzgewichtes und eine nur gering erhöhte Zellularität nachzuweisen. Da in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren IL-12p40 verzögert und IFN γ gar nicht hochreguliert werden, ist es naheliegend, dass auch die Induktion einer spezifischen T-Zell Antwort in diesen Tieren verzögert abläuft. Das könnte die erhöhte Mortalität in der chronischen Phase der Infektion erklären.

5.11 *T. gondii*-infizierte $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigen Defekte in der transkriptionellen Antwort

Es ist bekannt, dass der $LT\beta R$, ebenso wie TNF, $LT\alpha$ und TNFRp55 essentiell für eine effiziente Immunantwort ist. Eine Infektion mit dem murinen Zytomegalovirus (MCMV) zeigt, dass der $LT\beta$ - $LT\beta R$ Signalweg essentiell für das Überleben ist, da sowohl $LT\alpha$ -, $LT\beta$ - und $LT\beta R$ -defiziente Mäuse eine erhöhte Replikation des Pathogens und einen Defekt in der Induktion von IFN β aufweisen und der Infektion relativ schnell erliegen (Banks *et al.*, 2005; Benedict *et al.*, 2001). Auch bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* wurde eine essentielle Rolle des $LT\beta R$ -Signalweges gezeigt. Ehlers *et al.* konnten nachweisen, dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine erhöhte Sterblichkeit gegenüber den Kontrollmäusen aufweisen (Ehlers *et al.*, 2003). Bestätigt wurde dies durch Kutsch *et al.*, die dem $LT\beta R$ Signalweg eine essentielle Funktion bei der Aktivierung einer Typ I und Typ II IFN γ -medierten Immunantwort zuwiesen (Kutsch *et al.*, 2008). Da in der vorliegenden Arbeit bereits durch Serumanalysen gezeigt wurde, dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere nach einer Infektion mit *T. gondii* einen Defekt in der Induktion von IFN γ und eine verzögerte Produktion von NO haben, wurde erstmals die Rolle des $LT\beta R$ für die Abwehr einer *T. gondii* Infektion auch auf transkriptioneller Ebene in der Milz und Lunge charakterisiert. In der Lunge von WT Tieren zeigte sich, dass bereits früh in der Infektion, an den Tagen 7 und 12 *p.i.*, eine deutliche Induktion der Expression von $LT\alpha$ und $LT\beta$ (die ebenfalls Mitglieder der TNF/TNFR Kernfamilie sind), sowie IFN β und IFN γ gegeben war. Die Expression von IL-4 war moderat, wohingegen iNOS und IL-12p40 keine Induktion erkennen ließen. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere hingegen zeigten in der akuten Phase eine geringe Expression von $LT\alpha$ und $LT\beta$ und ebenfalls keine Induktion von iNOS und IL-12p40. Dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere im Vergleich zu WT Tieren eine reduzierte Expression von $LT\alpha$ und $LT\beta$ zeigen, weist auf eine unzureichende antiparasitäre Immunantwort in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren hin. Die Bedeutung von $LT\alpha$ hinsichtlich der Pathogenkontrolle wurde bereits für die murine Tuberkulose

beschrieben, in der $LT\alpha^{-/-}$ Tiere unstrukturierte Granulome in der Lunge bildeten (Roach et al., 2001). Überraschenderweise war die Expression von IL-4, IFN β und IFN γ in der Lunge von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren an Tag 14 bis 30 *p.i.* deutlich induziert und zeigte darüber hinaus im Vergleich zu WT Tieren eine stärkere Expression von IFN β und IL-4.

Im Gehirn weisen laut Schlüter et al., auch $TNF^{-/-}$, $LT\alpha^{-/-}$ und $TNF/LT\alpha^{-/-}$ Tiere eine Induktion von IFN γ auf (Schlüter et al., 2003a), die aber nicht ausreichend ist, um den letalen Ausgang einer Infektion mit *T. gondii* zu verhindern. Auch $TNF^{-/-}$, $LT\alpha^{-/-}$ und $TNF/LT\alpha^{-/-}$ Tiere zeigen einen Defekt in der intrazerebralen Expression von iNOS (Schlüter et al., 2003a). Eine von der Lunge divergente Expression zeigte sich in der Milz von *T. gondii* infizierten WT und $LT\beta R^{-/-}$ Mäusen. In WT Tieren lässt die Milz an den Tagen 12 und 14 *p.i.* eine Induktion der Expression von LT β und iNOS erkennen. Die Induktion der IL-4 und IFN γ mRNA ist moderat und eine Induktion von LT α und IFN β nicht determinierbar. $LT\beta R^{-/-}$ Tiere hingegen zeigen einen deutlichen Anstieg der iNOS mRNA an Tag 14 *p.i.* und eine reduzierte Induktion von LT β . Im Gegensatz zur Expression in der Lunge ist in der Milz von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren keine Induktion der Gene LT α , IL-4, IFN β und IFN γ gegeben. Da Kutsch et al. in Milzzellen von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren einen Anstieg von IFN γ im Rahmen einer Infektion mit *L. monocytogenes* nachweisen konnten wurde die Aussage getroffen, dass eine frühe Produktion von IFN γ notwendig für das Überleben nach einer Infektion mit intrazellulären Bakterien (z.B. *T. gondii*) ist (Yarovinsky, 2014) und nicht zu späteren Zeitpunkten kompensiert werden kann (Kutsch et al., 2008). Ob diese Schlussfolgerung auch im Rahmen einer *T. gondii* Infektion für $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zutrifft, kann nur vermutet werden. Dafür sprechen jedoch die Überlebensraten, die trotz der stark reduzierten Induktion von IFN β und IFN γ eine erhöhte Mortalität der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigen. Über die Ursache der differentiellen Expression von immunrelevanten Genen in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren in Lunge und Milz kann zum jetzigen Kenntnisstand nur spekuliert werden. Man kann hierbei in Betracht ziehen, dass im Rahmen einer Infektion mit *T. gondii* möglicherweise eine organspezifische Regulation der Immunantwort stattfindet und sich die Defizienz im LT βR in den unterschiedlichen Organen auf unterschiedliche Weise auswirkt. Zudem könnte die unterschiedliche Parasitenlast der jeweiligen Organe ein unterschiedliches Transkriptionsprofil induzieren.

5.12 Differentielle Expression der IFN γ -abhängigen mGBPs in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren

Interferone, speziell IFN γ , induzieren die Immunantwort gegenüber intrazellulären Pathogenen (Huang et al., 1993) und sind bekannt für die Stimulation der Expression einer Vielzahl von Genen, insbesondere der *Immunity Related GTPasen (IRGs)* und der Familie der p65 Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) (Boehm et al., 1998; Boehm et al., 1997). Die p65 GBPs sind dabei die am stärksten IFN γ -induzierten Gene (Degrandi et al., 2013; Kresse et al., 2008), die von Kim et al. als essentiell für die Immunantwort gegenüber intrazellulären Pathogenen, inklusive *T. gondii* beschrieben wurden

(Kim et al., 2012). Degrandi et al. konnten zudem zeigen, dass mGBP2 *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen *T. gondii* (ME49 Stamm) in C57BL/6 Mäusen spielt und durch eine Infektion mit *T. gondii* die Expression aller mGBPs stark induziert wird (Degrandi et al., 2007). Dabei wurde gezeigt, dass diese Proteine in einer *T. gondii*-spezifischen Immunantwort durch eine Kooperation mit IRGs den Parasiten töten (Degrandi et al., 2013; Feng et al., 2004; Haldar et al., 2013; Selleck et al., 2013; Taylor et al., 2000). Da $LT\beta R^{-/-}$ Tiere eine verzögerte Expression von IFN γ in der Lunge und einen Defekt in der Induktion von IFN γ in der Milz aufwiesen und es in der Literatur kontroverse Beobachtungen hinsichtlich der Expression von IFN γ nach *T. gondii* Infektionen gibt, ergab sich die Frage, ob die Expression der mGBPs in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren induziert wird. Unterstützt wurde diese Fragestellung durch Beobachtungen von Taylor et al., die zeigten, dass Mäuse mit einer Defizienz im IFN γ -induzierten IRGM3 hoch suszeptibel gegenüber einer Infektion mit *T. gondii* sind (Taylor et al., 2000). In der Lunge von WT Tieren zeigte sich in Übereinstimmung mit Daten von Degrandi et al. (Degrandi et al., 2007), dass bereits früh in der Infektion, das heißt an Tag 7 *p.i.*, die Expression der meisten mGBPs (mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP4, mGBP5 und mGBP8) deutlich induziert war. Eine Induktion der Expression von mGBP6 und mGBP9 war leicht verzögert. Eine Ausnahme bildet mGBP7, das keine Induktion der Expression aufwies. In $LT\beta R$ -defizienten Mäusen zeigte sich ein genereller Defekt in der Induktion der meisten mGBPs. Lediglich für mGBP1, mGBP3 und mGBP8 konnte eine verzögerte und deutlich reduzierte Induktion in der akuten Phase (Tag 7 und 12 *p.i.*) und in der chronischen Phase (Tag 30 *p.i.*) nachgewiesen werden. Ein von der Lunge abweichendes Bild der mGBP Induktion zeigt sich in der Milz von *T. gondii* infizierten Mäusen. Die Transkripte von mGBP2, mGBP3 und mGBP4 waren in WT Tieren an Tag 14 *p.i.* geringfügig induziert, hingegen waren sowohl mGBP1 als auch mGBP5 deutlich induziert. Wie in der Lunge, zeigte mGBP7 auch in der Milz keine Induktion. In $LT\beta R^{-/-}$ Tieren ist eine geringe Induktion der mGBP1 und mGBP3 mRNA an den Tagen 7 *p.i.* und 14 *p.i.* vorhanden, wobei diese Expression deutlich unter der Expression der WT Tiere liegt. Die Expression aller weiteren mGBPs (mGBP2, mGBP4, mGBP5 und mGBP7) ist im Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* nicht vorhanden. Generell ist in WT Tieren wie erwartet, eine starke Induktion der mGBPs im Rahmen einer effektiven IFN γ -induzierten transkriptionellen Antwort in der Milz und der Lunge gegeben, die in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren weitgehend ausfällt. Da die mGBPs eine bedeutende Rolle in der Abwehr der Toxoplasmeninfektion spielen, liegt die Vermutung nahe, dass die fehlende Induktion dieser Effektorgene ursächlich für die erhöhte Suszeptibilität der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere gegenüber *T. gondii* verantwortlich ist.

*Diese Ergebnisse belegen eine essentielle Rolle des $LT\beta R$ in der Immunantwort gegen *T. gondii*. Die vermehrt auftretenden pathologischen Veränderungen in Lunge, Leber und Gehirn lassen sich auf die erhöhte Parasitenlast zurückführen, die in den $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nachgewiesen wurde. Ursächlich für die*

erhöhte Parasitenlast könnte die fehlenden NO Produktion in diesen Tieren sein, da die Erreger nicht effizient eliminiert werden können. Gleichzeitig zeigen $LT\beta R^{-/-}$ Tiere einen Defekt in der IFN γ Expression, der dazu führt, dass IFN γ -abhängige Gene (mGBPs) nicht induziert werden können. Da mGBPs eine entscheidende Funktion in der Abwehr intrazellulärer Pathogene übernehmen, kann dieser Mangel, zusammen mit der verminderten NO-Produktion die Suszeptibilität der $LT\beta R^{-/-}$ Tiere gegenüber einer *T. gondii* Infektion erklären. Sowohl in WT Tieren als auch $LT\beta R^{-/-}$ Tieren konnten nach einer Toxoplasmeninfektion transient Lipome nachgewiesen werden. Ob diese Lipome für den Infektionsverlauf relevant sind, ist noch unklar. Sollte sich der bimodale Verlauf der Überlebenskurve in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nach *T. gondii* Infektion in weiteren Versuchen mit erhöhten Tierzahlen bestätigen und tatsächlich darauf beruhen, dass $LT\beta R^{-/-}$ Tiere nicht in der Lage sind, während der chronischen Phase der Infektion die adaptive Immunität aufrecht zu erhalten, könnte diese Linie ein interessantes Modell zur Reaktivierung einer chronischen Toxoplasmose darstellen.

5.13 Ausblick

Im Modell der 70 %-igen PHx konnte erstmals eine Rolle des $LT\beta R$ für eine effiziente Regulation des enterohepatischen Kreislaufs nach PHx nachgewiesen werden. Ein Defekt im $LT\beta R$ führt zu einer Akkumulation von GS im Hepatozyten und zu einem Anstieg von toxischen GS im Serum, die schlussendlich in einer Cholestase resultieren und das Überleben nach PHx negativ beeinflussen. Zwar kommt es auch bei WT Tieren zu einem Anstieg der GS nach PHx, jedoch scheinen diese in der Lage zu sein, die GS Homöostase schnell wieder zu normalisieren. Um festzustellen, ob die Deregulation der GS ursächlich für die höhere Mortalität nach PHx ist, sollten WT Tiere vor PHx mit 0,2-1% CA gefüttert werden und untersucht werden, ob sie einen mit $LT\beta R^{-/-}$ Tieren vergleichbaren Phänotyp aufweisen. Parallel zur CA-Fütterung sollte als Ergänzung bei $LT\beta R^{-/-}$ eine Diät mit dem GS-Komplexbinder Cholestyramin (2%) durchgeführt werden, um zu sehen, ob sich die Überlebensrate nach PHx verbessert: Bereits durch Uriarte *et al.* wurde gezeigt, dass eine Diät mit Cholestyramin in $Fgf15^{-/-}$ Tieren, die nach PHx einen vergleichbaren Phänotyp wie $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zeigen, zu einem Absinken erhöhter GS Werte führt und das Überleben nach PHx erhöht (Uriarte *et al.*, 2013). Durch Ogura *et al.* wurde beschrieben, dass der Pregnan X Rezeptor (PXR) eine Akkumulation von GS verhindern bzw. regulieren kann, indem er toxische GS über den Fremdstoffmetabolismus eliminiert. Daher wäre es ebenfalls von großem Interesse zu untersuchen, ob eine Behandlung von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nach PHx mit dem PXR-Aktivator Pregnenolone-16 α -Carbonitril (PCN) zu einer verbesserten Überlebensrate führt. Zudem konnten Yamada *et al.* zeigen, dass eine IL-6 Behandlung zu einer effizienteren Leberregeneration nach PHx mit gesteigerten Überlebensraten in $TNFRp55^{-/-}$ Tieren führt (Yamada *et al.*, 1997) und es wäre daher interessant zu beobachten, ob eine Applikation von IL-6 auch in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren das Überleben nach PHx steigert.

Das würde bedeuten, dass die $LT\beta R$ und $TNFRp55$ Signalwege ähnliche Effektormechanismen auslösen. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die *Mug2* Expression in WT Tieren im Gegensatz zu $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nach PHx deutlich hochreguliert wird. Zunächst sollte geklärt werden, ob sich die fehlende Expression von *Mug2* nur auf transkriptioneller Ebene abspielt oder auch auf Proteinebene nachgewiesen werden kann. Erste Vorversuche konnten mittels Massenspektroskopie-Analyse bereits *Mug2* in WT Tieren nach PHx nachweisen. Um dann zu bestätigen, dass *Mug2* eine wichtige Rolle in der Leberregeneration spielt, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden, ob durch eine *Mug2* Supplementierung das Überleben nach PHx in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren gesteigert wird. Obwohl die Leberregeneration in Nagern 240 h nach PHx als abgeschlossen gilt, konnten zu diesem Zeitpunkt noch immer erhöhte ALP Werte in $LT\beta R^{-/-}$ Tieren nachgewiesen werden und auch die GS-Konzentrationen sowohl im Serum als auch in der Leber waren wieder leicht erhöht. Daher stellt sich die Frage, ob die überlebenden $LT\beta R^{-/-}$ Tiere zwar den Verlust von Lebermasse ausgleichen können, aber die Funktionalität der Leber noch nicht vollständig wiederhergestellt ist. Zur Klärung dieser Fragestellung könnten zusätzliche Analysen zwischen 48 h und 240 h *post PHx* und auch zu noch späteren Zeitpunkten sinnvoll sein. Ergänzend zur Deregulation der GS-Transporter und GS-Rezeptoren auf mRNA Expressionsebene könnte auch eine Fehllokalisierung dieser Moleküle für die erhöhten GS-Werte verantwortlich sein. Daher sollten der histochemische Nachweis der Lokalisation der kanikulären und sinusoidalen hepatischen Transporter nach PHx analysiert werden. Eine zusätzliche Analyse der Struktur und Bildung der Gallengänge im regenerierenden bzw. regenerierten Lebergewebe von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren mittels Zytokeratin(CK)8 und CK19- oder *Periodic acid-Schiff(PAS)-Staining* könnte Hinweise darauf geben, ob die Mikroarchitektur der Leber in diesen Tieren nach PHx intakt ist. Weiterhin könnte sowohl ein *Laminin-Staining* als auch ein Angiogeneseassay wichtige Anhaltspunkte zum Aufbau und zur Funktionalität der regenerierenden bzw. regenerierten Leber liefern. Da $TNFRp55$ -defiziente Tiere auch Defekte in der Leberregeneration nach 70%iger PHx zeigen und einen mit $LT\beta R^{-/-}$ Tieren vergleichbaren Phänotyp aufweisen, wäre es ebenfalls interessant zu untersuchen, ob $TNFRp55^{-/-}$ Tiere ebenfalls eine Akkumulation von GS zeigen. Durch eine Behandlung von $LT\beta R^{-/-}$ Tieren mit 10 $\mu\text{g/g KG}$ Etanercept konnte ein kompletter Ausfall beider Signalwege ($LT\beta R$ und $TNFRp55$) imitiert werden. In weiteren Untersuchungen sollten mit Hilfe von funktional $LT\beta R/TNFRp55^{-/-}$ Tieren weitere Untersuchungen hinsichtlich essentieller $TNFRp55$ - bzw. $LT\beta R$ -vermittelte Signale in der Leberregeneration nach PHx durchgeführt werden, um zu analysieren, in wie weit sich beide Signalwege überschneiden bzw. ergänzen. Da bislang konventionelle $LT\beta R$ -defiziente Tiere für die Analyse der $LT\beta R$ -vermittelten Leberregeneration nach PHx eingesetzt wurden, denen der $LT\beta R$ auf allen Zellen fehlt, kann noch keine genaue Aussage darüber gemacht werden, welche Zellreihe für die $LT\beta R$ -vermittelten Signale in der Leberregeneration verantwortlich ist.

Mittels konditional LT β R-defizienten Mauslinien, die spezifisch in Hepatozyten, Endothelzellen bzw. Makrophagen/Granulozyten LT β R-defizient sind, kann die Zellreihe erst identifiziert werden und ihre Rolle nach PHx dann genauer analysiert werden.

Zur Ergänzung und weiteren Charakterisierung der Rolle LT β R-vermittelter Signale nach einer *T. gondii* Infektion, wäre es zunächst sinnvoll die jeweiligen Tierzahlen für die Bestimmung der Überlebenskinetik nach einer Infektion mit 40 Zysten zu erhöhen, um den bimodalen Verlauf zu verifizieren. Da LT β R^{-/-} Tiere sowohl histologisch als auch transkriptionell einen deutlichen Anstieg in der Parasitenlast zeigen, wäre es ebenfalls von Bedeutung den Verlauf der Replikation des Parasiten bzw. die Konversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten in LT β R^{-/-} Tieren im Vergleich zu WT Tieren nachzuweisen. Darüber hinaus könnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie weitere Unterschiede zwischen WT Tieren und LT β R^{-/-} Tieren in den verschiedenen immunrelevanten Zellpopulationen identifiziert werden, um zu klären, in welcher Phase der Immunantwort (z.B. angeborene Immunantwort vs. spezifische Immunantwort) sich die Unterschiede manifestieren. Da in der vorliegenden Arbeit bereits ein Defekt in der Expression IFN γ -abhängiger Gene (mGBPs) in LT β R^{-/-} Tiere nachgewiesen wurde, wäre es von großem Interesse mittels Konfokalmikroskopie, *in vitro* Studien IFN γ -behandelter Zellen beider Genotypen, hinsichtlich der Lokalisation und Funktion der verschiedenen mGBPs an der Toxoplasma parasitophoren Vakuole zu untersuchen. Von Bedeutung wäre zudem, ob eine Applikation von IFN γ in LT β R^{-/-} Tieren die Überlebensraten nach einer Infektion mit *T. gondii* positiv beeinflusst, was zu erwarten wäre bzw. ob sich der LT β R-defiziente Phänotyp durch die IFN γ Behandlung komplett aufheben lässt, oder nicht. Letzteres wäre ein Hinweis darauf, dass der LT β R neben der Induktion von IFN γ noch weitere, bisher unbekannte Funktionen hat.

6. Literaturverzeichnis

Abshagen, K., Eipel, C., Kalff, J.C., Menger, M.D., and Vollmar, B. (2008). Kupffer cells are mandatory for adequate liver regeneration by mediating hyperperfusion via modulation of vasoactive proteins. *Microcirculation* 15, 37-47.

Abshagen, K., Eipel, C., Menger, M.D., and Vollmar, B. (2006). Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *The Journal of surgical research* 134, 354-362.

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. *The American journal of physiology* 263, G579-585.

Aliberti, J., Valenzuela, J.G., Carruthers, V.B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., Reis e Sousa, C., Fairlamb, A., Ribeiro, J.M., and Sher, A. (2003). Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nature immunology* 4, 485-490.

Aliberti, J. (2005). Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature reviews Immunology* 5, 162-170.

Alimzhanov, M.B., Kuprash, D.V., Kosco-Vilbois, M.H., Luz, A., Turetskaya, R.L., Tarakhovsky, A., Rajewsky, K., Nedospasov, S.A., and Pfeffer, K. (1997). Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9302-9307.

Alison, M.R., Golding, M.H., and Sarraf, C.E. (1996). Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell proliferation* 29, 373-402.

Alison, M.R., Islam, S., and Lim, S. (2009). Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *The Journal of pathology* 217, 282-298.

Anders, R.A., Subudhi, S.K., Wang, J., Pfeffer, K., and Fu, Y.X. (2005). Contribution of the lymphotoxin beta receptor to liver regeneration. *Journal of immunology* 175, 1295-1300.

Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., and Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179.

Ansel, K.M., Ngo, V.N., Hyman, P.L., Luther, S.A., Forster, R., Sedgwick, J.D., Browning, J.L., Lipp, M., and Cyster, J.G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309-314.

Anwer, M.S., and Hegner, D. (1978). Effect of organic anions on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 359, 1027-1030.

Anwer, M.S., and Stieger, B. (2014). Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 466, 77-89.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Banks, T.A., Rickert, S., Benedict, C.A., Ma, L., Ko, M., Meier, J., Ha, W., Schneider, K., Granger, S.W., Turovskaya, O., *et al.* (2005). A lymphotoxin-IFN-beta axis essential for lymphocyte survival revealed during cytomegalovirus infection. *Journal of immunology* 174, 7217-7225.

Banks, T.A., Rouse, B.T., Kerley, M.K., Blair, P.J., Godfrey, V.L., Kuklin, N.A., Bouley, D.M., Thomas, J., Kanangat, S., and Mucenski, M.L. (1995). Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *Journal of immunology* 155, 1685-1693.

Banks, T.A., Rickert, S., Benedict, C.A., Ma, L., Ko, M., Meier, J., Ha, W., Schneider, K., Granger, S.W., Turovskaya, O., *et al.* (2005). A lymphotoxin-IFN-beta axis essential for lymphocyte survival revealed during cytomegalovirus infection. *Journal of immunology* 174, 7217-7225.

Benedict, C.A., Banks, T.A., Senderowicz, L., Ko, M., Britt, W.J., Angulo, A., Ghazal, P., and Ware, C.F. (2001). Lymphotoxins and cytomegalovirus cooperatively induce interferon-beta, establishing host-virus detente. *Immunity* 15, 617-626.

- Berger, D.P., Nanche, D., Crowley, M.T., Koni, P.A., Flavell, R.A., and Oldstone, M.B. (1999). Lymphotoxin-beta-deficient mice show defective antiviral immunity. *Virology* 260, 136-147.
- Beuers, U., Hohenester, S., de Buy Wenniger, L.J., Kremer, A.E., Jansen, P.L., and Elferink, R.P. (2010). The biliary HCO₃⁻ umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology* 52, 1489-1496.
- Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-263.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Futterer, A., Pfeffer, K., and Howard, J.C. (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *Journal of immunology* 161, 6715-6723.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology* 15, 749-795.
- Bilzer, M., Roggel, F., and Gerbes, A.L. (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 26, 1175-1186.
- Black, M.W., and Boothroyd, J.C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64, 607-623.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Blindenbacher, A., Wang, X., Langer, I., Savino, R., Terracciano, L., and Heim, M.H. (2003). Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 38, 674-682.
- Bluethmann, H., Rothe, J., Schultze, N., Tkachuk, M., and Koebel, P. (1994). Establishment of the role of IL-6 and TNF receptor 1 using gene knockout mice. *Journal of leukocyte biology* 56, 565-570.
- Bliss, S.K., Zhang, Y., and Denkers, E.Y. (1999). Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *Journal of immunology* 163, 2081-2088.
- Bolesta, S., and Haber, S.L. (2002). Hepatotoxicity associated with chronic acetaminophen administration in patients without risk factors. *The Annals of pharmacotherapy* 36, 331-333.
- Bonizzi, G., Bebien, M., Otero, D.C., Johnson-Vroom, K.E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A.G., Aronow, B.J., Ghosh, G., Rickert, R.C., *et al.* (2004). Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *The EMBO journal* 23, 4202-4210.
- 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.
- Browning, J.L., Dougas, I., Ngam-ek, A., Bourdon, P.R., Ehrenfels, B.N., Miatkowski, K., Zafari, M., Yampaglia, A.M., Lawton, P., Meier, W., *et al.* (1995). Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. *Journal of immunology* 154, 33-46.
- Browning, J.L., Ngam-ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, E.P., Hession, C., O'Brine-Greco, B., Foley, S.F., and Ware, C.F. (1993). Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 72, 847-856.
- Browning, J.L., Sizing, I.D., Lawton, P., Bourdon, P.R., Rennert, P.D., Majeau, G.R., Ambrose, C.M., Hession, C., Miatkowski, K., Griffiths, D.A., *et al.* (1997). Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *Journal of immunology* 159, 3288-3298.
- Bucher, N.L. (1963). Regeneration of Mammalian Liver. *International review of cytology* 15, 245-300.
- Budd, G.T., Green, S., Baker, L.H., Hersh, E.P., Weick, J.K., and Osborne, C.K. (1991). A Southwest Oncology Group phase II Trial of recombinant tumor necrosis factor in metastatic breast cancer. *Cancer* 68, 1694-1695.
- Cai, K., and Sewer, M.B. (2013). Diacylglycerol kinase theta couples farnesoid X receptor-dependent bile acid signalling to Akt activation and glucose homeostasis in hepatocytes. *The Biochemical journal* 454, 267-274.

- Cataldegirmen, G., Zeng, S., Feirt, N., Ippagunta, N., Dun, H., Qu, W., Lu, Y., Rong, L.L., Hofmann, M.A., Kislinger, T., *et al.* (2005). RAGE limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of TNF-alpha and NF-kappaB. *The Journal of experimental medicine* 201, 473-484.
- Chao, C.C., Hu, S., Gekker, G., Novick, W.J., Jr., Remington, J.S., and Peterson, P.K. (1993). Effects of cytokines on multiplication of *Toxoplasma gondii* in microglial cells. *Journal of immunology* 150, 3404-3410.
- Chaudhary, P.M., Eby, M.T., Jasmin, A., Kumar, A., Liu, L., and Hood, L. (2000). Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene* 19, 4451-4460.
- Chen, Z.J., Parent, L., and Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of I kappa B alpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 84, 853-862.
- Chiang, J.Y. (2002). Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocrine reviews* 23, 443-463.
- Chiang, J.Y. (2003). Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 284, G349-356.
- Chiang, J.Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of lipid research* 50, 1955-1966.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-159.
- Collette, Y., Gilles, A., Pontarotti, P., and Olive, D. (2003). A co-evolution perspective of the TNFSF and TNFRSF families in the immune system. *Trends in immunology* 24, 387-394.
- Corti, A., Merli, S., Bagnasco, L., D'Ambrosio, F., Marino, M., and Cassani, G. (1995). Identification of two forms (31-33 and 48 kD) of the urinary soluble p55 tumor necrosis factor receptor that are differentially N- and O-glycosylated. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 15, 143-152.
- 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.
- Crowe, P.D., VanArsdale, T.L., Walter, B.N., Ware, C.F., Hession, C., Ehrenfels, B., Browning, J.L., Din, W.S., Goodwin, R.G., and Smith, C.A. (1994). A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* 264, 707-710.
- Crowe, P.D., Walter, B.N., Mohler, K.M., Otten-Evans, C., Black, R.A., and Ware, C.F. (1995). A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 181, 1205-1210.
- Cryer, P.E., Davis, S.N., and Shamon, H. (2003). Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes care* 26, 1902-1912.
- DeAngelis, R.A., Markiewski, M.M., Kourtzelis, I., Rafail, S., Syriga, M., Sandor, A., Maurya, M.R., Gupta, S., Subramaniam, S., and Lambris, J.D. (2012). A complement-IL-4 regulatory circuit controls liver regeneration. *Journal of immunology* 188, 641-648.
- Csanaky, I.L., Aleksunes, L.M., Tanaka, Y., and Klaassen, C.D. (2009). Role of hepatic transporters in prevention of bile acid toxicity after partial hepatectomy in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 297, G419-433.
- Daubener, W., Remscheid, C., Nockemann, S., Pilz, K., Seghrouchni, S., Mackenzie, C., and Hadding, U. (1996). Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *European journal of immunology* 26, 487-492.
- DeAngelis, R.A., Markiewski, M.M., Kourtzelis, I., Rafail, S., Syriga, M., Sandor, A., Maurya, M.R., Gupta, S., Subramaniam, S., and Lambris, J.D. (2012). A complement-IL-4 regulatory circuit controls liver regeneration. *Journal of immunology* 188, 641-648.
- Debierre-Grockiego, F., Campos, M.A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M.G., Mansur, D.S., Weingart, R., Schmidt, R.R., Golenbock, D.T., *et al.* (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* 179, 1129-1137.
- Deckert-Schluter, M., Bluethmann, H., Rang, A., Hof, H., and Schluter, D. (1998a). Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *Journal of immunology* 160, 3427-3436.

- Deckert-Schluter, M., Bluethmann, H., Rang, A., Hof, H., and Schluter, D. (1998b). Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *Journal of immunology* *160*, 3427-3436.
- Deckert-Schluter, M., Rang, A., Weiner, D., Huang, S., Wiestler, O.D., Hof, H., and Schluter, D. (1996). Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *75*, 827-841.
- Degrandi, D., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Kresse, A., Wurthner, J., Kurig, S., Beer, S., and Pfeffer, K. (2007). Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *Journal of immunology* *179*, 7729-7740.
- Degrandi, D., Kravets, E., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klumpers, V., Lahme, S., Wischmann, E., Mausberg, A.K., Beer-Hammer, S., and Pfeffer, K. (2013). Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 294-299.
- Dejardin, E., Droin, N.M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z.W., Karin, M., Ware, C.F., and Green, D.R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* *17*, 525-535.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* *284*, 309-313.
- Denson, L.A., Sturm, E., Echevarria, W., Zimmerman, T.L., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Karpen, S.J. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* *121*, 140-147.
- Denkers, E.Y., and Gazzinelli, R.T. (1998). Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical microbiology reviews* *11*, 569-588.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., and Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* *12*, 419-429.
- Dubey, J.P. (1992). Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. *The Journal of parasitology* *78*, 151-153.
- Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses and public health* *57*, 60-73.
- Dubey, J.P., and Frenkel, J.K. (1998). Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary parasitology* *77*, 1-32.
- Dubey, J.P., and Welcome, F.L. (1988). *Toxoplasma gondii*-induced abortion in sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association* *193*, 697-700.
- Ehlers, S., Holscher, C., Scheu, S., Tertilt, C., Hehlhans, T., Suwinski, J., Endres, R., and Pfeffer, K. (2003). The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of immunology* *170*, 5210-5218.
- Fabris, L., Cadamuro, M., Fiorotto, R., Roskams, T., Spirli, C., Melero, S., Sonzogni, A., Joplin, R.E., Okolicsanyi, L., and Strazzabosco, M. (2006). Effects of angiogenic factor overexpression by human and rodent cholangiocytes in polycystic liver diseases. *Hepatology* *43*, 1001-1012.
- Fausto, N. (2000). Liver regeneration. *Journal of hepatology* *32*, 19-31.
- Fausto, N. (2001). Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* *7*, 835-844.
- Fausto, N., and Campbell, J.S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development* *120*, 117-130.
- Fausto, N. (2006). Involvement of the innate immune system in liver regeneration and injury. *Journal of hepatology* *45*, 347-349.
- Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology* *43*, S45-53.

- Feng, C.G., Collazo-Custodio, C.M., Eckhaus, M., Hieny, S., Belkaid, Y., Elkins, K., Jankovic, D., Taylor, G.A., and Sher, A. (2004). Mice deficient in LRG-47 display increased susceptibility to mycobacterial infection associated with the induction of lymphopenia. *Journal of immunology* 172, 1163-1168.
- Fickert, P., Fuchsbichler, A., Marschall, H.U., Wagner, M., Zollner, G., Krause, R., Zatloukal, K., Jaeschke, H., Denk, H., and Trauner, M. (2006). Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice. *The American journal of pathology* 168, 410-422.
- Flisiak, R. (1997). Role of Ito cells in the liver function. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists* 48, 139-145.
- 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 & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 6, 417-427.
- Force, W.R., Glass, A.A., Benedict, C.A., Cheung, T.C., Lama, J., and Ware, C.F. (2000). Discrete signaling regions in the lymphotoxin-beta receptor for tumor necrosis factor receptor-associated factor binding, subcellular localization, and activation of cell death and NF-kappaB pathways. *The Journal of biological chemistry* 275, 11121-11129.
- Fox, B.A., Gigley, J.P., and Bzik, D.J. (2004). *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *International journal for parasitology* 34, 323-331.
- Fougere-Deschatrette, C., Imaizumi-Scherrer, T., Strick-Marchand, H., Morosan, S., Charneau, P., Kremendorf, D., Faust, D.M., and Weiss, M.C. (2006). Plasticity of hepatic cell differentiation: bipotential adult mouse liver clonal cell lines competent to differentiate in vitro and in vivo. *Stem cells* 24, 2098-2109.
- FrancaVilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Coetzee, M., Makowka, L., Barone, M., Van Thiel, D.H., and Starzl, T.E. (1988). Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplantation proceedings* 20, 494-497.
- Frenkel, J.K. (1970). Pursuing toxoplasma. *The Journal of infectious diseases* 122, 553-559.
- Fu, Y.X., and Chaplin, D.D. (1999). Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annual review of immunology* 17, 399-433.
- Fuchs, P., Strehli, S., Dworzak, M., Himmler, A., and Ambros, P.F. (1992). Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13 [corrected]. *Genomics* 13, 219-224.
- Fujita, M., Furukawa, H., Hattori, M., Todo, S., Ishida, Y., and Nagashima, K. (2000). Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 13, 152-157.
- Fukuhara, Y., Hirasawa, A., Li, X.K., Kawasaki, M., Fujino, M., Funeshima, N., Katsuma, S., Shiojima, S., Yamada, M., Okuyama, T., *et al.* (2003). Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Journal of hepatology* 38, 784-792.
- Furutani, M., Arii, S., Higashitsuji, H., Mise, M., Fukumoto, M., Takano, S., Nakayama, H., Imamura, M., and Fujita, J. (1995). Reduced expression of kan-1 (encoding putative bile acid-CoA-amino acid N-acyltransferase) mRNA in livers of rats after partial hepatectomy and during sepsis. *The Biochemical journal* 311 (Pt 1), 203-208.
- Furchtgott, L.A., Chow, C.C., and Periwal, V. (2009). A model of liver regeneration. *Biophysical journal* 96, 3926-3935.
- Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M.H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9, 59-70.
- Garcea, G., and Maddern, G.J. (2009). Liver failure after major hepatic resection. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* 16, 145-155.
- Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S., and Sher, A. (1993). Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6115-6119.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., and Sher, A. (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* 153, 2533-2543.
- Gazzinelli, R.T., and Denkers, E.Y. (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature reviews Immunology* 6, 895-906.

- Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., and Sher, A. (1993). Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infect Agents Dis* 2, 139-149.
- Geier, A., and Trautwein, C. (2007). Bile acids are "homeotrophic" sensors of the functional hepatic capacity and regulate adaptive growth during liver regeneration. *Hepatology* 45, 251-253.
- Geier, A., Dietrich, C.G., Voigt, S., Kim, S.K., Gerloff, T., Kullak-Ublick, G.A., Lorenzen, J., Matern, S., and Garton, C. (2003). Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* 38, 345-354.
- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A.F., and Meier, P.J. (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *The Journal of biological chemistry* 273, 10046-10050.
- Gerloff, T., Geier, A., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Matern, S., and Garton, C. (1999). Differential expression of basolateral and canalicular organic anion transporters during regeneration of rat liver. *Gastroenterology* 117, 1408-1415.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* 16, 225-260.
- Goerdts, S., Politz, O., Schledzewski, K., Birk, R., Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Klemke, C.D., Dippel, E., Kodelja, V., *et al.* (1999). Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 67, 222-226.
- Goh, Y.P., Henderson, N.C., Heredia, J.E., Red Eagle, A., Odgaard, J.I., Lehwald, N., Nguyen, K.D., Sheppard, D., Mukundan, L., Locksley, R.M., *et al.* (2013). Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 9914-9919.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European journal of cell biology* 74, 111-122.
- Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., *et al.* (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Molecular cell* 6, 517-526.
- Gottlieb, A.B., Matheson, R.T., Lowe, N., Krueger, G.G., Kang, S., Goffe, B.S., Gaspari, A.A., Ling, M., Weinstein, G.D., Nayak, A., *et al.* (2003). A randomized trial of etanercept as monotherapy for psoriasis. *Archives of dermatology* 139, 1627-1632; discussion 1632.
- Graf, D., Haselow, K., Munks, I., Bode, J.G., and Haussinger, D. (2008). Caspase-mediated cleavage of the signal-transducing IL-6 receptor subunit gp130. *Archives of biochemistry and biophysics* 477, 330-338.
- Graf, D., Kohlmann, C., Haselow, K., Gehrman, T., Bode, J.G., and Haussinger, D. (2006). Bile acids inhibit interleukin-6 signaling via gp130 receptor-dependent and -independent pathways in rat liver. *Hepatology* 44, 1206-1217.
- Grant, A., and Neuberger, J. (1999). Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice. *British Society of Gastroenterology. Gut* 45 Suppl 4, IV1-IV11.
- Grell, M. (1995). Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm* 47, 8-17.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., and Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 570-575.
- Haldar, A.K., Saka, H.A., Piro, A.S., Dunn, J.D., Henry, S.C., Taylor, G.A., Frickel, E.M., Valdivia, R.H., and Coers, J. (2013). IRG and GBP host resistance factors target aberrant, "non-self" vacuoles characterized by the missing of "self" IRGM proteins. *PLoS pathogens* 9, e1003414.
- Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (1996). Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Seminars in liver disease* 16, 129-136.
- Haglund, U.H., Noren, A., Urdzik, J., and Duraj, F.F. (2008). Right hemihepatectomy. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 12, 1283-1287.

- Hardardottir, I., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (1994). Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. *Current opinion in lipidology* 5, 207-215.
- Harrop, J.A., Reddy, M., Dede, K., Brigham-Burke, M., Lyn, S., Tan, K.B., Silverman, C., Eichman, C., DiPrinzio, R., Spampinato, J., *et al.* (1998). Antibodies to TR2 (herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines. *Journal of immunology* 161, 1786-1794.
- Hasegawa, E., Kobayashi, M., Kawamura, Y., Yatsuji, H., Sezaki, H., Hosaka, T., Akuta, N., Suzuki, F., Suzuki, Y., Arase, Y., *et al.* (2007). Efficacy and anticarcinogenic activity of interferon for hepatitis C virus-related compensated cirrhosis in patients with genotype 1b low viral load or genotype 2. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 37, 793-800.
- Häussinger, D., *Liver Regeneration. De Gruyter Textbook, 1st Edition, 2011*
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E., and Iwata, K. (1992). Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS letters* 298, 29-32.
- Haybaeck, J., Zeller, N., Wolf, M.J., Weber, A., Wagner, U., Kurrer, M.O., Bremer, J., Iezzi, G., Graf, R., Clavien, P.A., *et al.* (2009). A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer cell* 16, 295-308.
- Hehlgans, T., Muller, P., Stopfer, P., and Mannel, D.N. (2003). Activation of the lymphotoxin-beta receptor induces NFkappaB-dependent interleukin-6 and MIP-2 secretion in mouse fibrosarcoma cells. *European cytokine network* 14, 103-107.
- Hehlgans, T., and Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.
- Helling, T.S. (2006). Liver failure following partial hepatectomy. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 8, 165-174.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., and Sugiyama, Y. (1999). Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *The Journal of biological chemistry* 274, 15181-15185.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., Takikawa, H., and Sugiyama, Y. (2000). ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *The Journal of biological chemistry* 275, 2905-2910.
- Hoffman, S.L., Masbar, S., Hussein, P.R., Soewarta, A., Harun, S., Marwoto, H.A., Campbell, J.R., Smrkovski, L., Purnomo, and Wiady, I. (1984). Absence of malaria mortality in villagers with chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* treated with chloroquine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 175-178.
- Hofmann, M., Zgouras, D., Samaras, P., Schumann, C., Henzel, K., Zimmer, G., and Leuschner, U. (1999). Small and large unilamellar vesicle membranes as model system for bile acid diffusion in hepatocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 368, 198-206.
- Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang, D.Y., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., *et al.* (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes & development* 17, 1581-1591.
- Howard, J.C., Hunn, J.P., and Steinfeldt, T. (2011). The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Current opinion in microbiology* 14, 414-421.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259, 1742-1745.
- 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.
- Hunter, C.A., Ellis-Neyes, L.A., Slifer, T., Kanaly, S., Grunig, G., Fort, M., Rennick, D., and Araujo, F.G. (1997). IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of immunology* 158, 3311-3316.
- Hunter, C.A., and Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature reviews Microbiology* 10, 766-778.

- Hunter, C.A., Subauste, C.S., Van Cleave, V.H., and Remington, J.S. (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infection and immunity* 62, 2818-2824.
- Ikari, Y., Mulvihill, E., and Schwartz, S.M. (2001). alpha 1-Proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and alpha 2-macroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 11798-11803.
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., *et al.* (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell metabolism* 2, 217-225.
- Innes, E.A. (2010). A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses and public health* 57, 1-7.
- Irabor D.O., (2012). The Risk of Impaired Coagulation in Surgical Jaundice: An Analysis of Routine Parameters. *Surgical Science*, 3, 116-199.
- Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., Denk, H., Desmet, V., Korb, G., MacSween, R.N., *et al.* (1995). Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology* 22, 696-699.
- Jackson, M.H., and Hutchison, W.M. (1993). Unwanted cats--physical condition, *Toxoplasma* infection and ectoparasites. *The British veterinary journal* 149, 295-297.
- Jacob, C.O., Hwang, F., Lewis, G.D., and Stall, A.M. (1991). Tumor necrosis factor alpha in murine systemic lupus erythematosus disease models: implications for genetic predisposition and immune regulation. *Cytokine* 3, 551-561.
- Jacobs, M., Brown, N., Allie, N., and Ryffel, B. (2000). Fatal *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-LT-alpha-deficient mice. *Clinical immunology* 94, 192-199.
- Jiang, Y., Zhang, L.X., Chang, C.F., Wang, G.P., Shi, R.J., Yang, Y.J., and Xu, C.S. (2011). The number of the genes in a functional category matters during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Journal of cellular biochemistry* 112, 3194-3205.
- Johnson, L.L. (1992). SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infection and immunity* 60, 3719-3724.
- Joyson; D.H., Wreghitt, T.J. (2001). *Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide*. Cambridge University Press, UK
- Jung, D., Podvynec, M., Meyer, U.A., Mangelsdorf, D.J., Fried, M., Meier, P.J., and Kullak-Ublick, G.A. (2002). Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* 122, 1954-1966.
- Keitel, V., Burdelski, M., Warskulat, U., Kuhlkamp, T., Keppler, D., Haussinger, D., and Kubitz, R. (2005). Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 41, 1160-1172.
- Keitel, V., Kubitz, R., and Haussinger, D. (2008). Endocrine and paracrine role of bile acids. *World journal of gastroenterology : WJG* 14, 5620-5629.
- Keitel, V., Ullmer, C., and Haussinger, D. (2010). The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes. *Biological chemistry* 391, 785-789.
- Khan, I.A., Matsuura, T., and Kasper, L.H. (1994). Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infection and immunity* 62, 1639-1642.
- Kim, J.H., Kang, K.I., Kang, W.C., Sohn, H.J., Jean, Y.H., Park, B.K., Kim, Y., and Kim, D.Y. (2009). Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. *Journal of veterinary science* 10, 147-151.
- Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Bradfield, C.J., and MacMicking, J.D. (2012). IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell host & microbe* 12, 432-444.
- Kim, C.H. (2010). Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of blood medicine* 1, 13-19.
- Kipp, H., and Arias, I.M. (2002). Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annual review of physiology* 64, 595-608.

- Kir, S., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2011). Roles of FGF19 in liver metabolism. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 76, 139-144.
- Knight, B., and Yeoh, G.C. (2005). TNF/LTalpha double knockout mice display abnormal inflammatory and regenerative responses to acute and chronic liver injury. *Cell and tissue research* 319, 61-70.
- Kollmar O (2000) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung am Lebertransplantat des Schweins nach warmer und kalter Ischämie sowie nach normothermer extrakorporaler Leberperfusion. Diss. Humboldt-Universität, Berlin; zitiert als: *Kollmar O*
- Koni, P.A., Sacca, R., Lawton, P., Browning, J.L., Ruddle, N.H., and Flavell, R.A. (1997). Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 6, 491-500.
- Koniaris, L.G., McKillop, I.H., Schwartz, S.I., and Zimmers, T.A. (2003). Liver regeneration. *Journal of the American College of Surgeons* 197, 634-659.
- Kountouras, J., Boura, P., and Lygidakis, N.J. (2001). Liver regeneration after hepatectomy. *Hepato-gastroenterology* 48, 556-562.
- Kresse, A., Konermann, C., Degrandi, D., Beuter-Gunia, C., Wuerthner, J., Pfeffer, K., and Beer, S. (2008). Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC genomics* 9, 158.
- Krinke GJ (2004) Normative Histology of Organs. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, Amsterdam et al., pp 133-166.
- Krucken, J., Braun, J.V., Dkhil, M.A., Grunwald, A., and Wunderlich, F. (2005). Deletion of LTbetaR augments male susceptibility to *Plasmodium chabaudi*. *Parasite immunology* 27, 205-212.
- Kubitz, R., D'Urso, D., Keppler, D., and Haussinger, D. (1997). Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* 113, 1438-1442.
- Kubitz, R., Wettstein, M., Warskulat, U., and Haussinger, D. (1999). Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 116, 401-410.
- T. Kubota, K. Takabe, Yang et al. (1997). Minimum sizes for remnant and transplanted liver in rats. *J. Hep. Bil. Pancr. Surg.*, 4, p. 398.
- Kullak-Ublick, G.A., Ismail, M.G., Kubitz, R., Schmitt, M., Haussinger, D., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Beuers, U., and Paumgartner, G. (2000). Stable expression and functional characterization of a Na⁺-taurocholate cotransporting green fluorescent protein in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Cytotechnology* 34, 1-9.
- Kumaraguru, U., Davis, I.A., Deshpande, S., Tevethia, S.S., and Rouse, B.T. (2001). Lymphotoxin alpha^{-/-} mice develop functionally impaired CD8⁺ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *Journal of immunology* 166, 1066-1074.
- Kutsch, S., Degrandi, D., and Pfeffer, K. (2008). Immediate lymphotoxin beta receptor-mediated transcriptional response in host defense against *L. monocytogenes*. *Immunobiology* 213, 353-366.
- Langermans, J.A., Van der Hulst, M.E., Nibbering, P.H., Hiemstra, P.S., Fransen, L., and Van Furth, R. (1992). IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *Journal of immunology* 148, 568-574.
- Lankisch, P.G., Burchard-Reckert, S., and Lehnick, D. (1999). Underestimation of acute pancreatitis: patients with only a small increase in amylase/lipase levels can also have or develop severe acute pancreatitis. *Gut* 44, 542-544.
- LaRosa, D.F., Stumhofer, J.S., Gelman, A.E., Rahman, A.H., Taylor, D.K., Hunter, C.A., and Turka, L.A. (2008). T cell expression of MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3855-3860.
- Lemckert, F.A., Sedgwick, J.D., and Korner, H. (1997). Gene targeting in C57BL/6 ES cells. Successful germ line transmission using recipient BALB/c blastocysts developmentally matured in vitro. *Nucleic acids research* 25, 917-918.
- Leonardi, C.L., Powers, J.L., Matheson, R.T., Goffe, B.S., Zitnik, R., Wang, A., Gottlieb, A.B., and Etanercept Psoriasis Study, G. (2003). Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *The New England journal of medicine* 349, 2014-2022.

- Lepage, A.C., Buzoni-Gatel, D., Bout, D.T., and Kasper, L.H. (1998). Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* *161*, 4902-4908.
- 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.
- Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). The IKKbeta subunit of IkkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *The Journal of experimental medicine* *189*, 1839-1845.
- Li, J., Campbell, J.S., Mitchell, C., McMahan, R.S., Yu, X., Riehle, K.J., Bumgarner, R.E., and Fausto, N. (2009). Relationships between deficits in tissue mass and transcriptional programs after partial hepatectomy in mice. *The American journal of pathology* *175*, 947-957.
- Li, T., and Chiang, J.Y. (2012). Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases. *Journal of lipids* *2012*, 754067.
- Linke, A., Kuhn, R., Muller, W., Honarvar, N., Li, C., and Langhorne, J. (1996). *Plasmodium chabaudi chabaudi*: differential susceptibility of gene-targeted mice deficient in IL-10 to an erythrocytic-stage infection. *Experimental parasitology* *84*, 253-263.
- Li, T., and Chiang, J.Y. (2012). Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases. *Journal of lipids* *2012*, 754067.
- Liesenfeld, O. (1999). Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology* *201*, 229-239.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., and Liu, Z.G. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & development* *13*, 2514-2526.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487-501.
- Loetscher, H., Pan, Y.C., Lahm, H.W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., and Lesslauer, W. (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* *61*, 351-359.
- Lorent, K., Overbergh, L., Delabie, J., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1994). Distribution of mRNA coding for alpha-2-macroglobulin, the murinoglobulins, the alpha-2-macroglobulin receptor and the alpha-2-macroglobulin receptor associated protein during mouse embryogenesis and in adult tissues. *Differentiation; research in biological diversity* *55*, 213-223.
- Lowes, K.N., Brennan, B.A., Yeoh, G.C., and Olynyk, J.K. (1999). Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *The American journal of pathology* *154*, 537-541.
- Lowes, K.N., Croager, E.J., Olynyk, J.K., Abraham, L.J., and Yeoh, G.C. (2003). Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *Journal of gastroenterology and hepatology* *18*, 4-12.
- Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Molecular cell* *6*, 507-515.
- Lucas, R., Tacchini-Cottier, F., Guler, R., Vesin, D., Jemelín, S., Olleros, M.L., Marchal, G., Browning, J.L., Vassalli, P., and Garcia, I. (1999). A role for lymphotoxin beta receptor in host defense against *Mycobacterium bovis* BCG infection. *European journal of immunology* *29*, 4002-4010.
- Lum, G., and Leal-Khoury, S. (1989). Significance of low serum urea nitrogen concentrations. *Clinical chemistry* *35*, 639-640.
- Meng, Z., Liu, N., Fu, X., Wang, X., Wang, Y.D., Chen, W.D., Zhang, L., Forman, B.M., and Huang, W. (2011). Insufficient bile acid signaling impairs liver repair in CYP27(-/-) mice. *Journal of hepatology* *55*, 885-895.
- Lund, F.E., Partida-Sanchez, S., Lee, B.O., Kusser, K.L., Hartson, L., Hogan, R.J., Woodland, D.L., and Randall, T.D. (2002). Lymphotoxin-alpha-deficient mice make delayed, but effective, T and B cell responses to influenza. *Journal of immunology* *169*, 5236-5243.
- Madge, L.A., and May, M.J. (2010). Classical NF-kappaB activation negatively regulates noncanonical NF-kappaB-dependent CXCL12 expression. *The Journal of biological chemistry* *285*, 38069-38077.
- Magez, S., Stijlemans, B., Caljon, G., Eugster, H.P., and De Baetselier, P. (2002). Control of experimental *Trypanosoma brucei* infections occurs independently of lymphotoxin-alpha induction. *Infection and immunity* *70*, 1342-1351.

- Makino, H., Togo, S., Kubota, T., Morioka, D., Morita, T., Kobayashi, T., Tanaka, K., Shimizu, T., Matsuo, K., Nagashima, Y., *et al.* (2005). A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *The Journal of surgical research* *127*, 171-176.
- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., and Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* *284*, 1362-1365.
- Marsters, S.A., Ayres, T.M., Skubatch, M., Gray, C.L., Rothe, M., and Ashkenazi, A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *The Journal of biological chemistry* *272*, 14029-14032.
- Mauri, D.N., Ebner, R., Montgomery, R.I., Kochel, K.D., Cheung, T.C., Yu, G.L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., *et al.* (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* *8*, 21-30.
- Martinez, C.A., Palma, R.T., and Waisberg, J. (2003). Giant retroperitoneal lipoma: a case report. *Arquivos de gastroenterologia* *40*, 251-255.
- McCuskey, R.S. (2008). The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. *Anatomical record* *291*, 661-671.
- McLeod, R., Boyer, K.M., Lee, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., Noble, A.G., Withers, S., Swisher, C.N., Heydemann, P.T., *et al.* (2012). Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* *54*, 1595-1605.
- Meier, P.J. (1995). Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *The American journal of physiology* *269*, G801-812.
- Meier, P.J., and Stieger, B. (2002). Bile salt transporters. *Annual review of physiology* *64*, 635-661.
- Meng, Z., Liu, N., Fu, X., Wang, X., Wang, Y.D., Chen, W.D., Zhang, L., Forman, B.M., and Huang, W. (2011). Insufficient bile acid signaling impairs liver repair in CYP27(-/-) mice. *Journal of hepatology* *55*, 885-895.
- Merida, I., Avila-Flores, A., and Merino, E. (2008). Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *The Biochemical journal* *409*, 1-18.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., *et al.* (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* *278*, 860-866.
- Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* *276*, 60-66.
- Michalopoulos, G.K. (1990). Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *4*, 176-187.
- Michalopoulos, G.K. (2007). Liver regeneration. *Journal of cellular physiology* *213*, 286-300.
- Michalopoulos, G.K. (2010). Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *The American journal of pathology* *176*, 2-13.
- Minagawa, M., Oya, H., Yamamoto, S., Shimizu, T., Bannai, M., Kawamura, H., Hatakeyama, K., and Abo, T. (2000). Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation. *Hepatology* *31*, 907-915.
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., and Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* *87*, 427-436.
- Montoya, J.G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* *363*, 1965-1976.
- Morel, Y., Schiano de Colella, J.M., Harrop, J., Deen, K.C., Holmes, S.D., Wattam, T.A., Khandekar, S.S., Truneh, A., Sweet, R.W., Gastaut, J.A., *et al.* (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *Journal of immunology* *165*, 4397-4404.
- Moreland, L.W., Schiff, M.H., Baumgartner, S.W., Tindall, E.A., Fleischmann, R.M., Bulpitt, K.J., Weaver, A.L., Keystone, E.C., Furst, D.E., Mease, P.J., *et al.* (1999). Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Annals of internal medicine* *130*, 478-486.

- Morsiani, E., Mazzoni, M., Aleotti, A., Gorini, P., and Ricci, D. (1995). Increased sinusoidal wall permeability and liver fatty change after two-thirds hepatectomy: an ultrastructural study in the rat. *Hepatology* 21, 539-544.
- Mueller, A., and Strange, P.G. (2004). The chemokine receptor, CCR5. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 35-38.
- Mullany, L.K., White, P., Hanse, E.A., Nelsen, C.J., Goggin, M.M., Mullany, J.E., Anttila, C.K., Greenbaum, L.E., Kaestner, K.H., and Albrecht, J.H. (2008). Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo. *Cell cycle* 7, 2215-2224.
- Muller, J.R., and Siebenlist, U. (2003). Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 278, 12006-12012.
- Nagino, M., and Nimura, Y. (2001). [Combined portal vein and liver resection for biliary cancer]. *Nihon Geka Gakkai zasshi* 102, 815-819.
- Nakano, H., Oshima, H., Chung, W., Williams-Abbott, L., Ware, C.F., Yagita, H., and Okumura, K. (1996). TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *The Journal of biological chemistry* 271, 14661-14664.
- Nathanson, M.H., and Boyer, J.L. (1991). Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14, 551-566.
- Nestorov, I., Zitnik, R., DeVries, T., Nakanishi, A.M., Wang, A., and Banfield, C. (2006). Pharmacokinetics of subcutaneously administered etanercept in subjects with psoriasis. *British journal of clinical pharmacology* 62, 435-445.
- Nisole, S., Stoye, J.P., and Saib, A. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nature reviews Microbiology* 3, 799-808.
- Neumann, B., Luz, A., Pfeffer, K., and Holzmann, B. (1996). Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine* 184, 259-264.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998). ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Molecular cell* 2, 389-395.
- Overbergh, L., Hilliker, C., Lorent, K., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1994). Identification of four genes coding for isoforms of murinoglobulin, the monomeric mouse alpha 2-macroglobulin: characterization of the exons coding for the bait region. *Genomics* 22, 530-539.
- Overbergh, L., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1991). Molecular characterization of the murinoglobulins. *The Journal of biological chemistry* 266, 16903-16910.
- Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M., and Grompe, M. (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *The American journal of pathology* 151, 1273-1280.
- Pahlavan, P.S., Feldmann, R.E., Jr., Zavos, C., and Kountouras, J. (2006). Prometheus' challenge: molecular, cellular and systemic aspects of liver regeneration. *The Journal of surgical research* 134, 238-251.
- Papp, K.A., Tying, S., Lahfa, M., Prinz, J., Griffiths, C.E., Nakanishi, A.M., Zitnik, R., van de Kerkhof, P.C., Melvin, L., and Etanercept Psoriasis Study, G. (2005). A global phase III randomized controlled trial of etanercept in psoriasis: safety, efficacy, and effect of dose reduction. *The British journal of dermatology* 152, 1304-1312.
- Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W.D., Savatski, L., Adamson, J.W., Ning, G., Kaestner, K.H., Rossi, J.M., Zaret, K.S., and Duncan, S.A. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nature genetics* 34, 292-296.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., and Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *The Journal of experimental medicine* 184, 1397-1411.
- Pasparakis, M., Kousteni, S., Peschon, J., and Kollias, G. (2000). Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles. *Cellular immunology* 201, 33-41.
- Pean, N., Doignon, I., Garcin, I., Besnard, A., Julien, B., Liu, B., Branchereau, S., Spraul, A., Guettier, C., Humbert, L., et al. (2013). The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice. *Hepatology* 58, 1451-1460.

- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Kronke, M., and Mak, T.W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73, 457-467.
- Polzien, F., and Ramadori, G. (1996). Increased intercellular adhesion molecule-1 serum concentration in cholestasis. *Journal of hepatology* 25, 877-886.
- Rahman, T.M., and Hodgson, H.J. (2000). Animal models of acute hepatic failure. *International journal of experimental pathology* 81, 145-157.
- Ramaiah, S.K. (2007). A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 45, 1551-1557.
- Remouchamps, C., Boutaffala, L., Ganef, C., and Dejardin, E. (2011). Biology and signal transduction pathways of the Lymphotoxin-alpha/LTbetaR system. *Cytokine & growth factor reviews* 22, 301-310.
- Rennert, P.D., James, D., Mackay, F., Browning, J.L., and Hochman, P.S. (1998). Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity* 9, 71-79.
- Riehle, K.J., Dan, Y.Y., Campbell, J.S., and Fausto, N. (2011). New concepts in liver regeneration. *Journal of gastroenterology and hepatology* 26 Suppl 1, 203-212.
- Riemann u.a., *Gastroenterologie* (2010). Kap. 8.4 Leberzelluntergang und -regeneration, A. Geier, C. Trautwein, 1237-1246.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., and Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 245, 154-160.
- Roach, D.R., Briscoe, H., Saunders, B., France, M.P., Riminton, S., and Britton, W.J. (2001). Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *The Journal of experimental medicine* 193, 239-246.
- Roskams, T., Katoonizadeh, A., and Komuta, M. (2010). Hepatic progenitor cells: an update. *Clinics in liver disease* 14, 705-718.
- Roskams, T.A., Libbrecht, L., and Desmet, V.J. (2003). Progenitor cells in diseased human liver. *Seminars in liver disease* 23, 385-396.
- Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., and Bluethmann, H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364, 798-802.
- Ruben, S.M., Klement, J.F., Coleman, T.A., Maher, M., Chen, C.H., and Rosen, C.A. (1992). I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity. *Genes & development* 6, 745-760.
- Ruddell, R.G., Knight, B., Tirnitz-Parker, J.E., Akhurst, B., Summerville, L., Subramaniam, V.N., Olynyk, J.K., and Ramm, G.A. (2009). Lymphotoxin-beta receptor signaling regulates hepatic stellate cell function and wound healing in a murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 49, 227-239.
- Russell, D.W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry* 72, 137-174.
- Ryseck, R.P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., and Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Molecular and cellular biology* 12, 674-684.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sandgren, E.P., Palmiter, R.D., Heckel, J.L., Daugherty, C.C., Brinster, R.L., and Degen, J.L. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 66, 245-256.
- Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., and Sher, A. (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *Journal of immunology* 168, 5997-6001.

- Scharton-Kersten, T.M., Wynn, T.A., Denkers, E.Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R.T., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *Journal of immunology* *157*, 4045-4054.
- Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Magram, J., and Sher, A. (1997). Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *The Journal of experimental medicine* *185*, 1261-1273.
- Scheu, S., Alferink, J., Potzel, T., Barchet, W., Kalinke, U., and Pfeffer, K. (2002). Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. *The Journal of experimental medicine* *195*, 1613-1624.
- Schiebler TH, Schmidt W (Hrsg.) unter Mitarbeit von Arnold G et al. (2002) Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen. Nachdruck der 8. Aufl. Springer, Berlin et al.
- Schluter, D., Kwok, L.Y., Lutjen, S., Soltek, S., Hoffmann, S., Korner, H., and Deckert, M. (2003). Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *Journal of immunology* *170*, 6172-6182.
- Schoenfeld, H.J., Poeschl, B., Frey, J.R., Loetscher, H., Hunziker, W., Lustig, A., and Zulauf, M. (1991). Efficient purification of recombinant human tumor necrosis factor beta from *Escherichia coli* yields biologically active protein with a trimeric structure that binds to both tumor necrosis factor receptors. *The Journal of biological chemistry* *266*, 3863-3869.
- Sedger, L.M., Hou, S., Osvath, S.R., Glaccum, M.B., Peschon, J.J., van Rooijen, N., and Hyland, L. (2002). Bone marrow B cell apoptosis during in vivo influenza virus infection requires TNF-alpha and lymphotoxin-alpha. *Journal of immunology* *169*, 6193-6201.
- Selden, C., Khalil, M., and Hodgson, H.J. (1999). What keeps hepatocytes on the straight and narrow? Maintaining differentiated function in the liver. *Gut* *44*, 443-446.
- Selleck, E.M., Fentress, S.J., Beatty, W.L., Degrandi, D., Pfeffer, K., Virgin, H.W.t., Macmicking, J.D., and Sibley, L.D. (2013). Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* *9*, e1003320.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* *47*, 921-928.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., et al. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* *293*, 1495-1499.
- Senju, S., Iyama, K., Kudo, H., Aizawa, S., and Nishimura, Y. (2000). Immunocytochemical analyses and targeted gene disruption of GTPBP1. *Molecular and cellular biology* *20*, 6195-6200.
- Shi, C.S., and Kehrl, J.H. (1997). Activation of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, but not NF-kappaB, by the tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 through a TNF receptor-associated factor 2- and germinal center kinase related-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* *272*, 32102-32107.
- Shi, M., Deng, W., Bi, E., Mao, K., Ji, Y., Lin, G., Wu, X., Tao, Z., Li, Z., Cai, X., et al. (2008). TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nature immunology* *9*, 369-377.
- Shimizu, S., Yamada, Y., Okuno, M., Ohnishi, H., Osawa, Y., Seishima, M., and Moriwaki, H. (2005). Liver injury induced by lipopolysaccharide is mediated by TNFR-1 but not by TNFR-2 or Fas in mice. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* *31*, 136-142.
- Shimizu, T., Togo, S., Kumamoto, T., Makino, H., Morita, T., Tanaka, K., Kubota, T., Ichikawa, Y., Nagasima, Y., Okazaki, Y., et al. (2009). Gene expression during liver regeneration after partial hepatectomy in mice lacking type 1 tumor necrosis factor receptor. *The Journal of surgical research* *152*, 178-188.
- Shu, H.B., Halpin, D.R., and Goeddel, D.V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* *6*, 751-763.
- Sibley, L.D., Khan, A., Ajioka, J.W., and Rosenthal, B.M. (2009). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* *364*, 2749-2761.
- Silva, N.M., Vieira, J.C., Carneiro, C.M., and Tafuri, W.L. (2009). *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. *Experimental parasitology* *123*, 65-72.

- Silva, N.M., Tafuri, W.L., Alvarez-Leite, J.I., Mineo, J.R., and Gazzinelli, R.T. (2002). *Toxoplasma gondii*: in vivo expression of BAG-5 and cyst formation is independent of TNF p55 receptor and inducible nitric oxide synthase functions. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 261-270.
- Sinal, C.J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J.M., Lambert, G., and Gonzalez, F.J. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102, 731-744.
- Skullman, S., Ihse, I., and Larsson, J. (1990). Influence of malnutrition on regeneration and composition of the liver in rats. *Acta chirurgica Scandinavica* 156, 717-722.
- Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
- Song, X., Kaimal, R., Yan, B., and Deng, R. (2008). Liver receptor homolog 1 transcriptionally regulates human bile salt export pump expression. *Journal of lipid research* 49, 973-984.
- Spahn, T.W., Maaser, C., Eckmann, L., Heidemann, J., Luger, A., Newberry, R., Domschke, W., Herbst, H., and Kucharzik, T. (2004). The lymphotoxin-beta receptor is critical for control of murine *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Gastroenterology* 127, 1463-1473.
- Stamp, D. & Jenkins, G. (2008). An Overview of Bile-Acid Synthesis, Chemistry and Function. *Issues in Toxicology; Bile Acids: Toxicology and Bioactivity*, Chapter 1.1.
- Steffen & Goeser (2008). *Icterus, Cholestase und Leberparenchymerkrankungen*. 5. Auflage (Chap.17), *Internistische Differenzialdiagnostik, Ausgewählte evidenzbasierte Entscheidungsprozesse und diagnostische Pfade*.
- Stocker, E., and Pfeifer, U. (1965). [On the manner of proliferation of the liver parenchyma after partial hepatectomy. Autoradiography studies using 3H-thymidine]. *Die Naturwissenschaften* 52, 663.
- Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E., and Lambris, J.D. (2003). The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *The Journal of experimental medicine* 198, 913-923.
- Suresh, M., Lanier, G., Large, M.K., Whitmire, J.K., Altman, J.D., Ruddle, N.H., and Ahmed, R. (2002). Role of lymphotoxin alpha in T-cell responses during an acute viral infection. *Journal of virology* 76, 3943-3951.
- Suzuki, H., Iyomasa, S., Nimura, Y., and Yoshida, S. (1994). Internal biliary drainage, unlike external drainage, does not suppress the regeneration of cholestatic rat liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 20, 1318-1322.
- Takeda, K., Togo, S., Kunihiro, O., Fujii, Y., Kurosawa, H., Tanaka, K., Endo, I., Takimoto, A., Sekido, H., Hara, M., *et al.* (2002). Clinicohistological features of liver failure after excessive hepatectomy. *Hepato-gastroenterology* 49, 354-358.
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 836-847.
- Taub, R. (1996). Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10, 413-427.
- Taylor, G.A., Collazo, C.M., Yap, G.S., Nguyen, K., Gregorio, T.A., Taylor, L.S., Eagleson, B., Secret, L., Southon, E.A., Reid, S.W., *et al.* (2000). Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 751-755.
- Taylor, G.A., Feng, C.G., and Sher, A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nature reviews Immunology* 4, 100-109.
- Taylor, G.A., Feng, C.G., and Sher, A. (2007). Control of IFN-gamma-mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-related GTPases (p47 GTPases). *Microbes and infection / Institut Pasteur* 9, 1644-1651.
- Tenter, A.M., Heckerroth, A.R., and Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology* 30, 1217-1258.
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., and Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30, 1425-1433.

- Toren, A., Neumann, Y., Rosner, E., Schiby, G., Paret, G., Biniaminov, M., Amariglio, N., Mark, Z., Mandel, M., Kenet, G., *et al.* (1996). Pediatric small cell variant of Ki-1 (CD30) + T-cell lymphoma with germ-line configuration of the T-cell receptor gene. *Acta oncologica* *35*, 243-245.
- Traber, K.E., Okamoto, H., Kurono, C., Baba, M., Saliou, C., Soji, T., Packer, L., and Okamoto, T. (1999). Anti-rheumatic compound aurothioglucose inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced HIV-1 replication in latently infected OM10.1 and Ach2 cells. *International immunology* *11*, 143-150.
- Trauner, M., Arrese, M., Lee, H., Boyer, J.L., and Karpen, S.J. (1998). Endotoxin downregulates rat hepatic ntcp gene expression via decreased activity of critical transcription factors. *The Journal of clinical investigation* *101*, 2092-2100.
- Trauner, M., and Boyer, J.L. (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiological reviews* *83*, 633-671.
- Tumanov, A.V., Koroleva, E.P., Christiansen, P.A., Khan, M.A., Ruddy, M.J., Burnette, B., Papa, S., Franzoso, G., Nedospasov, S.A., Fu, Y.X., *et al.* (2009). T cell-derived lymphotoxin regulates liver regeneration. *Gastroenterology* *136*, 694-704 e694.
- Ueda, J., Chijiwa, K., Nakano, K., Zhao, G., and Tanaka, M. (2002). Lack of intestinal bile results in delayed liver regeneration of normal rat liver after hepatectomy accompanied by impaired cyclin E-associated kinase activity. *Surgery* *131*, 564-573.
- Um, S.H., Nishida, O., Tokubayashi, M., Kimura, F., Takimoto, Y., Yoshioka, H., Inque, R., and Kita, T. (1994). Hemodynamic changes after ligation of a major branch of the portal vein in rats: comparison with rats with portal vein constriction. *Hepatology* *19*, 202-209.
- Umans, L., Serneels, L., Overbergh, L., Stas, L., and Van Leuven, F. (1999). alpha2-macroglobulin- and murinoglobulin-1-deficient mice. A mouse model for acute pancreatitis. *The American journal of pathology* *155*, 983-993.
- Uriarte, I., Fernandez-Barrena, M.G., Monte, M.J., Latasa, M.U., Chang, H.C., Carotti, S., Vespasiani-Gentilucci, U., Morini, S., Vicente, E., Concepcion, A.R., *et al.* (2013). Identification of fibroblast growth factor 15 as a novel mediator of liver regeneration and its application in the prevention of post-resection liver failure in mice. *Gut* *62*, 899-910.
- Vollmar, B., Glasz, J., Leiderer, R., Post, S., and Menger, M.D. (1994). Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *The American journal of pathology* *145*, 1421-1431.
- Vroman, B., and LaRusso, N.F. (1996). Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *74*, 303-313.
- Wallace, K., Burt, A.D., and Wright, M.C. (2008). Liver fibrosis. *The Biochemical journal* *411*, 1-18.
- Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L.C., and Forman, B.M. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Molecular cell* *3*, 543-553.
- Wang, J., Chun, T., Lo, J.C., Wu, Q., Wang, Y., Foster, A., Roca, K., Chen, M., Tamada, K., Chen, L., *et al.* (2001). The critical role of LIGHT, a TNF family member, in T cell development. *Journal of immunology* *167*, 5099-5105.
- Ware, C.F. (2005). Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annual review of immunology* *23*, 787-819.
- Warshaw, A.L., and Fuller, A.F., Jr. (1975). Specificity of increased renal clearance of amylase in diagnosis of acute pancreatitis. *The New England journal of medicine* *292*, 325-328.
- Waterfield, M.R., Zhang, M., Norman, L.P., and Sun, S.C. (2003). NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Molecular cell* *11*, 685-694.
- Weiss, L.M., and Kim, K. (2004). The International Congress on Toxoplasmosis. *International journal for parasitology* *34*, 249-252.
- Weinblatt, M.E., Kremer, J.M., Bankhurst, A.D., Bulpitt, K.J., Fleischmann, R.M., Fox, R.I., Jackson, C.G., Lange, M., and Burge, D.J. (1999). A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *The New England journal of medicine* *340*, 253-259.
- White, P., Brestelli, J.E., Kaestner, K.H., and Greenbaum, L.E. (2005). Identification of transcriptional networks during liver regeneration. *The Journal of biological chemistry* *280*, 3715-3722.

Wilhelm, P., Riminton, D.S., Ritter, U., Lemckert, F.A., Scheidig, C., Hoek, R., Sedgwick, J.D., and Korner, H. (2002). Membrane lymphotoxin contributes to anti-leishmanial immunity by controlling structural integrity of lymphoid organs. *European journal of immunology* 32, 1993-2003.

Wimmer, N., Huber, B., Barabas, N., Rohrl, J., Pfeffer, K., and Hehlgans, T. (2012). Lymphotoxin beta receptor activation on macrophages induces cross-tolerance to TLR4 and TLR9 ligands. *Journal of immunology* 188, 3426-3433.

Wolf DC. Evaluation of size, shape and consistency of liver. *Clinical Methods: The History, Physical and Laboratory Examinations*, Walker HK, Hall WD, Hurst JW, Boston: Butterworths. 3rd edition; Chapter 94, 1990.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1441-1446.

Yamada, Y., Webber, E.M., Kirillova, I., Peschon, J.J., and Fausto, N. (1998). Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology* 28, 959-970.

Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., *et al.* (2012). A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 37, 302-313.

Yap, G.S., Schariton-Kersten, T., Charest, H., and Sher, A. (1998). Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *Journal of immunology* 160, 1340-1345.

Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., *et al.* (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.

Yarovinsky, F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature reviews Immunology* 14, 109-121.

Zelcer, N., van de Wetering, K., de Waart, R., Scheffer, G.L., Marschall, H.U., Wielinga, P.R., Kuil, A., Kunne, C., Smith, A., van der Valk, M., *et al.* (2006). Mice lacking Mrp3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides. *Journal of hepatology* 44, 768-775.

Zhai, Y., Guo, R., Hsu, T.L., Yu, G.L., Ni, J., Kwon, B.S., Jiang, G.W., Lu, J., Tan, J., Ugustus, M., *et al.* (1998). LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *The Journal of clinical investigation* 102, 1142-1151.

Zimmon, D.S. (1977). The hepatic vasculature and its response to hepatic injury: a working hypothesis. *The Yale journal of biology and medicine* 50, 497-506.

7. Anhang

7.1 Nicht gezeigte Daten

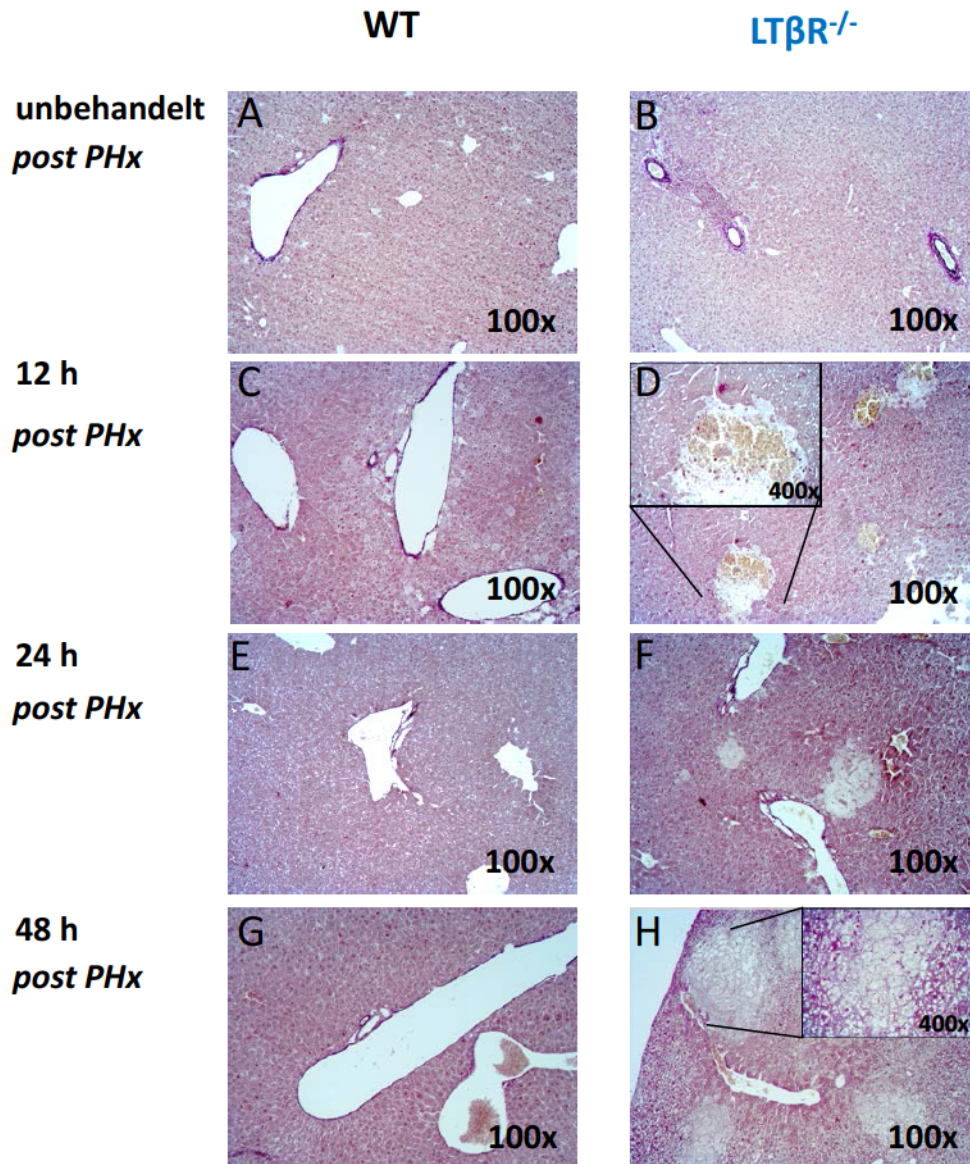


Abb. 7.1 A-H: EvG-Färbung vor und 12 h, 24 h und 48 h nach PHx in WT und LT β R^{-/-} Tieren. (A) WT nicht operiert (B) LT β R^{-/-} nicht operiert (C) WT 12 h nach PHx (D) LT β R^{-/-} 12 h nach PHx (E) WT 24 h nach PHx (F) LT β R^{-/-} 24 h nach PHx (G) WT 48 h nach PHx (H) LT β R^{-/-} 48 h nach PHx. (Vergrößerungen wie angegeben)

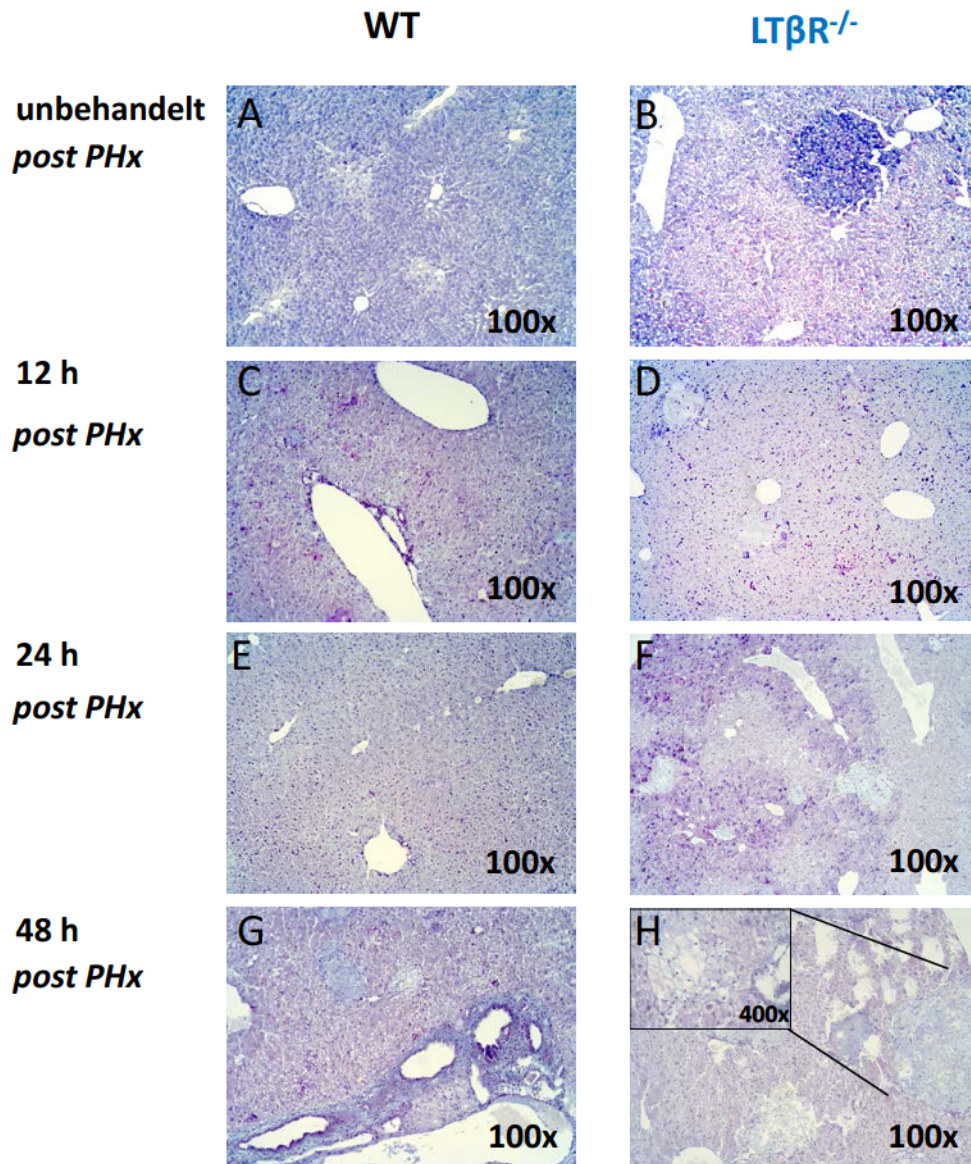


Abb. 7.2 A-H: PAS-Färbung vor und 12 h, 24 h und 48 h nach PHx in WT und LT β R^{-/-} Tieren. (A) WT nicht operiert (B) LT β R^{-/-} nicht operiert (C) WT 12 h nach PHx (D) LT β R^{-/-} 12 h nach PHx (E) WT 24 h nach PHx (F) LT β R^{-/-} 24 h nach PHx (G) WT 48 h nach PHx (H) LT β R^{-/-} 48 h nach PHx. (Vergrößerungen wie angegeben)

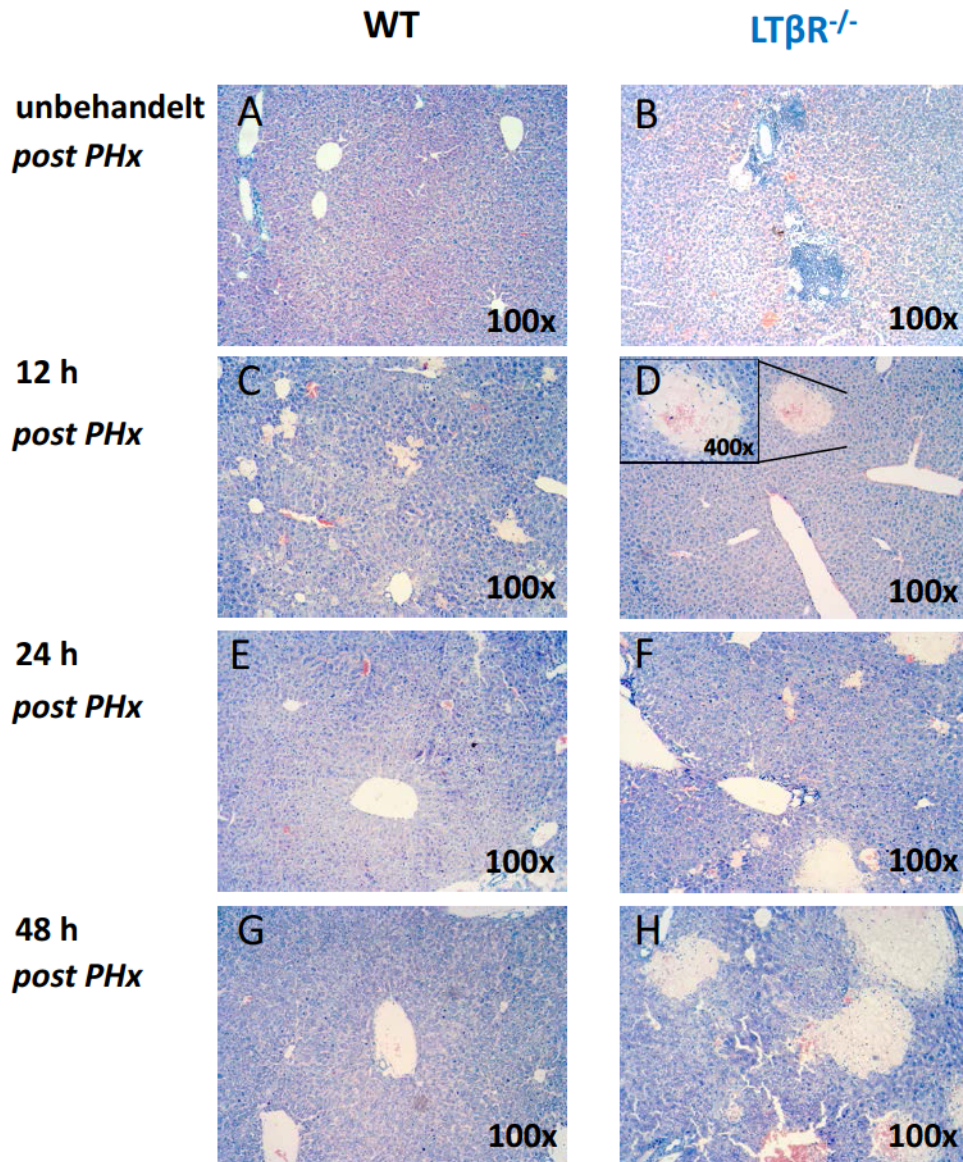


Abb. 7.3 A-H: Giemsa-Färbung vor und 12 h, 24 h und 48 h nach PHx in WT und LT β R^{-/-} Tieren. (A) WT nicht operiert (B) LT β R^{-/-} nicht operiert (C) WT 12 h nach PHx (D) LT β R^{-/-} 12 h nach PHx (E) WT 24 h nach PHx (F) LT β R^{-/-} 24 h nach PHx (G) WT 48 h nach PHx (H) LT β R^{-/-} 48 h nach PHx. (Vergrößerungen wie angegeben)

Verpaarung der Parentalgeneration (P)
 TNFRp55^{-/-} x LTβR^{-/-}



Alle Nachkommen sind heterozygot (het/het)



Verpaarung der F1 Generation
 het/het X het/het



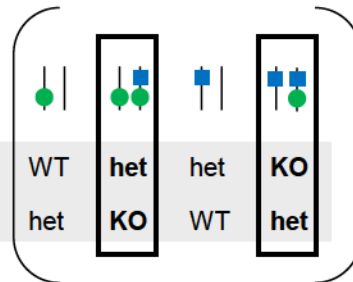
Gameten der F1



Crossing Over

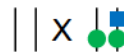


Typisierung PCR	■ WT	het	het	KO
	● KO	het	het	WT



Nur eine dieser Möglichkeiten kann auftreten.

Verpaarung der F2
 (wenn ein *Crossing Over* stattgefunden hat)
 het/KO X WT



Typisierung PCR	■ WT	het
	● het	het

Verpaarung der F3
 het/het X het/het



Typisierung PCR	■ WT	WT	het	KO
	● WT	het	WT	KO

Abb. 7.4: Verpaarungsschema zur Generierung von LTβR/TNFRp55-defizienten Tieren. Tiere der TNFRp55^{-/-} Mauslinie sind in grün gekennzeichnet. Tiere der LTβR^{-/-} Mauslinie in blau gekennzeichnet.

7.2 Publikationen

Publikation im Rahmen der Diplomarbeit:

1. Wunderlich, C. M.; Delic, D.; Behnke, K.; Meryk, A.; Stroehle, P.; Chaurasia, B.; Al-Quraishy, S.; Wunderlich, F.; Brüning, J. C.; Wunderlich, F. T.; Cutting edge: Inhibition of IL-6 trans-signaling protects from Malaria-induced lethality in mice. *Journal of Immunology* 188 (9), 4141-4144 (2012)

Publikation im Rahmen der Dissertation:

1. Behnke, K.; Sorg, R. Ursula; K. Pfeffer; LT β R is essential for upregulation of IFN induced mGBPs and survival after *T. gondii* infection. *Journal of Immunology* (*in preparation*)

2. Sorg, R. Ursula*; Behnke, K.*; Herebian, D.; Häussinger, D.; Keitel, V.; K. Pfeffer; The role of the lymphotoxin- β receptor (LT β R) in hepatocyte-mediated liver regeneration. (*in preparation*)

* both authors contributed equally to this work

7.3 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für seine Unterstützung und Motivation sowie die Gelegenheit, an diesem sehr interessanten Thema zu arbeiten. Es war eine schöne Zeit! Danke!

Herrn Prof. Dr. Eckhard Lammert, Institut für Stoffwechselfysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Übernahme des Gutachtens seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Meiner Betreuerin Dr. Ursula Sorg danke ich für ihre stete und liebevolle Unterstützung innerhalb meiner Dissertation. Du warst immer für mich da und bist mir mehr als eine Betreuerin!

Bei meinen Mentoren Prof. Dr. Walter Däubener und Prof. Dr. Karl Lang möchte ich mich für die konstruktiven Gespräche und Ideen bedanken.

Bei dem Graduiertenkolleg 1045/2 „*Modulation of host cell functions as a new approach to treating viral and bacterial infections*“ möchte ich mich für die Finanzierung im Rahmen der Promotion bedanken.

Dr. Diran Herebian danke ich für die überaus nette und gute Zusammenarbeit hinsichtlich der Gallensalzanalysen.

Ich bedanke mich bei Frau PD Dr. med. Verena Keitel und Maria Reich für die hilfreiche Beurteilung der Gallensalz-Daten sowie die Übernahme der Cholangiozyten-Isolierung.

Ein großer Dank geht an Daniel und Jens für eure Unterstützung, anregende Gespräche und unzählige gemeinsame, lustige Stunden und an Eric und David, ich werde euer Lachen und das „Pläne schmieden“ sehr vermissen! Was passiert jetzt eigentlich mit dem Teddybär?!

Ich danke meinem Schreibraum, insbesondere Anja und Regine, für einen tollen Arbeitsalltag, jede Menge Spaß und Unterstützung; Sonja für ihre Leckereien und Frankie für seine Hilfe am PC! Mit euch war jeder Tag schön und auch diverse Feierabende ein Highlight!

Außerdem danke ich den restlichen Mitgliedern der AG Pfeffer, AG Scheu, AG Däubener und AG Kalscheuer für viele lustige Stunden, Kooperationen und die einmalige Arbeitsatmosphäre!

Der größte Dank gilt jedoch meiner Oma und Mutter, die mich seit frühester Kindheit mit einem großen Interesse für Medizin und Biologie aufgezogen haben, meinen Freunden, besonders Eve und Katrin, die mir während der gesamten Zeit emotional beiseite standen und immer an mich geglaubt haben, und meinem Freund Tobias, der meine Launen ertragen hat und für mich da war!

7.4 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.

Düsseldorf, _____

(Kristina Behnke)