

Vergleichende Untersuchung zur relativen Genexpression in der
Embryonalphase der murinen Leber und im postnatalen Regenerationsmodell
der partiellen Hepatektomie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Biol. Urda Rüdric
geboren am 23. Oktober 1980 in Berlin

2011

Referent: Privatdozent Dr. med. M. Ott
Korreferent: Professor Dr. rer. nat. A. Kispert

Tag der Promotion: 17.05.2011

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Jochheim-Richter, A.; Rüdric, U.; Koczan, D.; Hillemann, T.; Tewes, S.; Petry, M.; Kispert, A.; Sharma, A. D.; Attaran, F.; Manns, M. P. & Ott, M. (2006), 'Gene expression analysis identifies novel genes participating in early murine liver development and adult liver regeneration.', *Differentiation* **74**(4), 167--173.

ZUSAMMENFASSUNG

Viele verschiedene Signalwege sind an der Entwicklung und Regeneration eines komplexen Organs wie der Leber beteiligt, deren Steuerung zeitlich und lokal präzise erfolgen muss. In der Literatur gibt es bereits einige Daten, die zeigen, dass Signalkaskaden sowohl in der Entwicklung als auch in der Regeneration der Leber eine Rolle spielen. So ist zum Beispiel die zunächst in der regenerierenden Leber entdeckte der Hgf/ c-met Signalkaskade wesentlich an der Entwicklung der Leber beteiligt. Neuere Daten zeigen des Weiteren eine Aktivierung von Prozessen/ Signalkaskaden, die bisher vorrangig in der embryonalen Entwicklung aufzufinden waren, auch bei Erkrankungen der Leber. Zusätzlich ist in beiden Prozessen das Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen von großer Bedeutung.

Um Hinweise auf neue Gene bzw. Genexpressionsmuster zu erhalten, sind Microarrays eine gute Möglichkeit, tausende von Genen und deren Expression zu einem definierten Zeitpunkt zu analysieren. Ein von Jochheim und Kollegen durchgeführter Microarray-Vergleich mit embryonalem Lebergewebe verschiedener Stadien identifizierte 4242 Gene und ESTs. In Cluster-Analysen kristallisierten sich unter den von uns gewählten Bedingungen 130 Gene heraus, die beim Vergleich der Stadien untereinander und im Vergleich zur adulten Leber eine deutlich regulierte Expression aufwiesen.

Durch die in den Mikroarrays identifizierten Gene ergeben sich somit neue Ansatzpunkte, die zur weiteren Klärung der komplexen Prozesse, die während der Leberregeneration ablaufen, dienen können. Im nächsten Schritt wurde zunächst die Expression der Gene vom Tag E 9.5 p.c. in der regenerierenden Leber untersucht. Diese Phase ist gekennzeichnet durch die Migration der Zellen von der Leberknospe in das Septum Transversum und von einer verstärkten Proliferation dieser Zellen.

Die Expressionsanalysen der Gene in der regenerierenden Leber geben einen ersten Überblick über die verschiedenen Prozesse, die in die Regeneration vermutlich involviert sind. Gene, die auch in der regenerierenden Leber exprimiert werden, können grob in Gruppen eingeteilt werden. Zum einen sind einige Gene in Prozesse involviert, die zu einem epithelialen mesenchymalen Übergang in Zellen führen können, und zum anderen steht ein Teil der Gene im Zusammenhang mit dem Sonic Hedgehog Signalweg. Eine weitere Gruppe von Genen ist an der Etablierung des Zytoskeletts beteiligt, während für einige Gene bisher kaum Daten über deren Funktion existieren.

Die Analyse der Expression in der regenerierenden Leber gibt jedoch per se keinen Aufschluss über die Funktion der Expression der Gene. In einem nächsten Schritt wurde ein System etabliert, das orientierende Hinweise auf mögliche Funktionen liefern kann. Ein qPCR Panel wurde erstellt, welches 42 Gene beinhaltet, mit denen der hepatische Phänotyp einer Zelle beschrieben werden kann. Als erster Zelltyp wurden die ALDPC ausgewählt, da diese als Hepatozytenvorläuferzellen betrachtet werden können und in Abhängigkeit der Kulturbedingungen, in einen hepatozytenähnlichen als auch cholangiozytenähnlichen Zelltyp differenzieren können. Die Etablierung des Systems erfolgt mit ALDPC, die via lentiviralen Gentransfer verschiedene Gene des Tages E 9.5 p.c. überexprimieren. In einem ersten Schritt wurden vier Gene des Tages E 9.5 p.c. (Pitx2a/b, Midkine und Cyclind2) überexprimiert und die Genexpressionsprofile mit dem qPCR Panel analysiert. Die Überexpression von Cyclin d2, Midkine und Pitx2a/ b deuten daraufhin, dass diese Gene einen positiven Einfluss auf die Proliferation der Zellen haben. Daneben lassen die Daten von Pitx2a/b einen Effekt auf die EMT/MET von Zellen vermuten. Erste Daten von Pitx2a und b zeigen eine Heraufregulierung von Claudin1 und Gbj1, von Proteinen, die für „Gap“ bzw. „Tight-Junctions“ wichtig sind. Dies könnte auf eine Rolle bei der Etablierung der Morphologie der Hepatozyten bzw. bei der MET hinweisen.

Schlagwörter: Leber, Entwicklung, Regeneration

SUMMARY

Various signal pathways are involved in the development and regeneration of complex organs such as the liver and these should be temporally as well as locally regulated in a precise manner. Some of these signal pathways play a role in both processes. For example, the Hgf/ c-met signal pathway, originally found in the regenerating liver, is considerably participating in the development of the liver. Recent data show, that the activation of signalling pathways, which are preferentially active in the developing liver, plays a role in the regenerating liver as well. Adding to the complexity, the cooperation of different cell types is important for the completion of both processes, development and regeneration.

To identify new genes and expression patterns, microarrays are a valuable tool to analyse thousands of genes at a defined time point. Jochheim and colleagues collected microarray data from liver samples of different stages of the developmental liver and compared these data. 4242 genes and ESTs were found to be expressed and, further cluster analysis reduced the number of genes to 130. As a criterion for selection, only genes that were highly upregulated in one of the analysed stages were chosen for further analysis.

Some of these 130 genes were hypothesised to provide new clues for processes participating in the regenerating liver. In a next step, the expression of all genes from embryonic day 9.5 p.c. were analysed in the regenerating liver. Day E 9.5 p.c. is characterised by migration of cells from the liver bud into the septum transversum and the increased proliferation of these cells.

The analysis of these genes in the regenerating liver was thought to give a first overview of processes involved in regeneration. Most of the genes can be separated in groups. One part of the genes is involved in the epithelial mesenchymal transition of cells and a second part is directly or indirectly connected to the sonic hedgehog pathway. A third group belongs to cytoskeletal proteins. A few genes are not linked to any known pathway and literature search has given only a limited amount of data.

Although these analyses gave new hints for gene networks involved in the developing and regenerating liver, their function in these processes and cell types remained to be investigated. In a next step, we therefore established a system, which could reveal new details in a fast and easy way. A qPCR panel with 42 genes whose regulation is characteristic for the hepatic phenotype was created. For our experiments, liver progenitor cells, named ALDPC, were used. ALDPCs are a bipotential cells, which are able to differentiate - depending on the culture conditions - either towards a hepatic or cholangiocytic phenotype. For the system, ALDPC's were transduced with lentiviral vectors expressing the sequence of a day E 9.5 p.c. regulated gene. In a first step we overexpressed three different genes from day E 9.5 p.c. (Pitx2a/ b, Cyclind2 and Midkine) and analysed the gene expression after three days with the qPCR panel. Overexpression of Cyclin d2, Midkine and Pitx2a/ b exhibited a pro-proliferative effect in these cells. Pitx2a/b also appeared to have an effect on the EMT/MET: In these cells, overexpression of Pitx2a/ b led to an increased expression of Claudin1 and Gbj1, proteins being part of the gap and tight junctions. This suggests a role for Pitx2 in formation of the epithelial phenotype in mature hepatocytes.

Keywords: Liver, development, regeneration

0. INHALTSVERZEICHNIS

0. INHALTSVERZEICHNIS.....	6
I. EINLEITUNG	10
1.1. DIE LEBER	10
1.1.1. FUNKTION UND AUFBAU.....	10
1.1.2. DIE ZELLEN DER LEBER.....	11
1.1.2.1. Epitheliale Zellen	11
1.1.2.2. Nicht epitheliale Zellen.....	12
1.2. DIE ENTWICKLUNG DER LEBER.....	13
1.2.1. ORGANOGENESE	13
1.2.2. BEGINN DER HEPATISCHEN ENTWICKLUNG.....	14
1.2.3. DETERMINIERUNG DES HEPATISCHEN ENTODERMS	15
1.2.4. WACHSTUM DES HEPATISCHEN ENTODERM IN DER LEBERANLAGE	16
1.2.5. DIFFERENZIERUNG DER HEPATOBLASTEN	18
1.2.6. AUSBILDUNG DER LEBERSTRUKTUR.....	20
1.3. LEBERREGENERATION.....	20
1.3.1. VERLAUF DER REGENERATION NACH TEILRESEKTION DER LEBER.....	20
1.3.2. STARTSIGNAL.....	21
1.3.3. INITIATION ODER PRIMING DER HEPATOZYTEN	22
1.3.3.1. Die Zytokine <i>Tnfa</i> und <i>Interleukin 6</i>	23
1.3.3.3. <i>Termination der Initiation</i>	24
1.3.4. PROGRESSIONSPHASE	24
1.3.4.1. Wachstumsfaktor <i>Hgf</i>	25
1.3.4.2. Weitere Mitogene	25
1.3.5. MATRIXPROTEINE.....	26
1.3.6. ZEITLICHER VERLAUF UND ZELLZYKLUS.....	26
1.3.7. STOPP-SIGNAL	27
1.3.8. DIE FUNKTION DER LEBER WÄHREND DER REGENERATION.....	28
1.4. ENTWICKLUNG VS. REGENERATION DER LEBER	28
II. ZIEL DER ARBEIT.....	31
III. MATERIAL UND METHODEN	32
3.1. ALLGEMEINES	32
3.1.1. MATERIAL	32
3.1.2. CHEMIKALIEN	32
3.1.3. GERÄTE	32
3.1.4. GRÖßENSTANDARDS	33
3.1.5. VEKTOREN	33
3.1.5.1. Vektor <i>pMD2.G</i>	34
3.1.5.2. Vektor <i>psPAX2</i>	34
3.1.5.3. Vektor <i>pCR[®]4 - TOPO[®]</i>	35
3.1.6. PRIMER	35

3.1.6.2. Primer für Abs. 4.1.2.....	36
3.1.6.3. Primer für Abs. 4.1.3.1.....	36
3.1.6.4. Primer für Abs. 4.1.3.2.....	36
3.1.6.5. Primer für Abs. 4.1.3.3.....	37
3.1.6.6. Primer für Abs. 4.1.3.4.....	37
3.1.6.7. Primer für Abs. 4.1.3.5.....	37
3.1.6.8. Primer für Abs. 4.1.3.6.....	38
3.1.6.9. Primer für Abs. 4.1.3.7.....	38
a) Primer für Abs. 4.1.3.7.1.....	38
b) Primer für Abs. 4.1.3.7.2.....	38
c) Primer für Abs. 4.1.3.7.3.....	39
3.1.6.10. Primer für Klonierung/ Sequenzierung.....	39
3.1.6.11. Primer des hepatischen Panels (HP - Set).....	39
3.1.7. SOFTWARE.....	41
3.2. TIEREXPERIMENTELLE VERSUCHE	42
3.2.1. ALLGEMEINES	42
3.2.2. PROTOKOLL DER HEPATOZYTENISOLATION.....	42
3.2.3. PROTOKOLL DER PARTIELLEN HEPATEKTOMIE	43
3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN.....	43
3.3.1. ISOLIERUNG DER RNA.....	43
3.3.1.1. Isolierung der RNA aus Gewebe.....	43
3.3.1.2. Isolierung der RNA aus Zellkultur.....	44
3.3.2. HERSTELLUNG DER CDNA.....	44
3.3.2.1. DNase I Verdau	44
3.3.2.2. cDNA Synthese	44
3.3.3. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	44
3.3.3.1. Konventionelle PCR	44
3.3.3.2. Quantitative Real Time PCR (qPCR)	45
3.3.4. KLONIERUNG	47
3.3.4.1. Restriktion	47
3.3.4.2. Glätten überhängender Enden doppelsträngiger DNA.....	47
3.3.4.3. Dephosphorylierung linearer doppelsträngiger DNA.....	47
3.3.4.4. Ethanol - Fällung	47
3.3.4.5. PCIA - Extraktion	48
3.3.4.6. Ligation	48
3.3.4.7. TA - TOPO Cloning.....	48
3.3.5. SEQUENZIERUNG.....	48
3.3.6. AGAROSE GELELEKTROPHORESE.....	48
3.3.6.1. Isolierung der DNA aus den Agarosegelen.....	49
3.3.7. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	49
3.3.7.1. Bestimmung der DNA – Konzentration.....	49
3.3.7.2. Bestimmung der RNA – Konzentration	49
3.4. MICROARRAY	50
3.4.1. PRÄPARIERUNG DES GEWEBES	50
3.4.2. AMPLIFIZIERUNG, HYBRIDISIERUNG UND SCANNING	50
3.4.3. DATENANALYSE	50

3.5. ZELLKULTUR	51
3.5.1. BAKTERIENKULTUR.....	51
3.5.1.1. <i>Allgemeine Kulturbedingungen</i>	51
3.5.1.1.1. <i>Verwendete Stämme</i>	51
3.5.1.2. <i>Medien für molekularbiologische Arbeiten</i>	51
3.5.1.3. <i>Transformation in E. coli</i>	52
3.5.1.4. <i>Mini - Präparation von DNA aus E.coli</i>	52
3.5.1.5. <i>Midi – Präparation von DNA aus E. coli</i>	53
3.5.1.6. <i>Mega – Präparation von DNA aus E. coli</i>	53
3.5.2. ZELLKULTUR.....	53
3.5.2.1. <i>Verwendete Zelllinien</i>	53
3.5.2.2. <i>Konservierung lebensfähiger Zellen durch Einfrieren</i>	53
3.5.2.3. <i>Zellpassage</i>	54
3.5.2.4. <i>Bestimmung der Zellzahl (mit dem Hämozytometer nach Neubauer)</i>	54
3.5.3. PRIMÄRE ZELLEN	54
3.5.3.1. <i>ALDPC</i>	54
3.5.3.2. <i>Hepatozyten</i>	55
3.5.3.3. <i>Kollagenbeschichtung von Plastikpetrischalen und Deckgläsern</i>	55
3.5.3.4. <i>Percoll Gradient</i>	55
3.6. HERSTELLUNG DER VIREN	55
3.6.1. TRANSFEKTION	56
3.6.2. ERNTEN DER VIREN	56
3.6.3. KONZENTRIERUNG VON VIRALEN ÜBERSTAND FÜR EINEN HÖHEREN TITER.....	56
3.6.4. BESTIMMUNG DES VIRUSTITERS	57
3.6.5. TRANSDUKTION VON ZELLEN	57
3.6.6. FACS ANALYSE	58
IV. ERGEBNISSE.....	59
4.1. GENEXPRESSIONSPROFILE NACH PARTIELLER HEPATEKTOMIE	59
4.1.1. ZUSAMMENFASSUNG DER CDNA MICROARRAYS.....	59
4.1.2. VERLAUF DER REGENERATION NACH PARTIELLER HEPATEKTOMIE IN DER MAUS	62
4.1.3. PROFILE DER IN DEN CDNA MICROARRAYS DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENE.....	64
4.1.3.1. <i>Zellzyklus und RNA</i>	64
4.1.3.1.1. <i>Basonuclin1 (Acc.Nr.: NM_007562.2)</i>	64
4.1.3.1.2. <i>Cyclin d2 (Acc.Nr.: NM_009829.3)</i>	64
4.1.3.1.3. <i>Ankyrin D1 (Acc.Nr.: NM_013468.3)</i>	65
4.1.3.1.4. <i>Mest (Acc.Nr.: NM_008590.1)</i>	65
4.1.3.2. <i>Transkriptionsfaktoren</i>	68
4.1.3.2.1. <i>Pitx2 (Acc.Nr.: NM_001042502.1)</i>	68
4.1.3.2.2. <i>Zic1 (Acc.Nr.: NM_009573.3)</i>	68
4.1.3.2.3. <i>Twist1 (Acc.Nr.: NM_011658.2)</i>	69
4.1.3.2.4. <i>Sox11 (Acc.Nr.: NM_009234.6)</i>	70
4.1.3.2.5. <i>Nr2f1 (Acc.Nr.: NM_010151.2)</i>	73
4.1.3.2.6. <i>Gtf2h1 (Acc.Nr.: NM_008186.4)</i>	73
4.1.3.2.7. <i>Hmga2 (Acc.Nr.: NM_010441.2)</i>	73
4.1.3.2.8. <i>Meox 1 (Acc.Nr.: NM_010791.3)</i>	74
4.1.3.2.9. <i>Shox2 (Acc.Nr.: NM_013665.1)</i>	77

4.1.3.2.10.	<i>Gli1</i> (Acc.Nr.: NM_010296.2).....	77
4.1.3.2.11.	<i>Foxd1</i> (Acc.Nr.: NM_008242.2).....	77
4.1.3.2.12.	<i>Hoxa1</i> (Acc.Nr.: NM_010449.4).....	78
4.1.3.2.13.	<i>Hoxd4</i> (Acc.Nr.: NM_010469.2).....	81
4.1.3.3.	Wachstumsfaktoren.....	82
4.1.3.3.1.	<i>Gap43</i> (Acc.Nr.: NM008083).....	82
4.1.3.3.2.	<i>Midkine</i> (Acc.Nr.: M34094).....	82
4.1.3.3.3.	<i>Igfbp5</i> (Acc.nr.: L12447).....	83
4.1.3.3.4.	<i>Necdin</i> (Acc.Nr.: NM_010882.3).....	84
4.1.3.4.	Transport.....	87
4.1.3.5.	Zelladhäsion.....	89
4.1.3.5.1.	<i>Emid2</i> (Acc.Nr.: NM_024474.2).....	89
4.1.3.5.2.	<i>Punc</i> (Acc.Nr.: NM_008988.2).....	89
4.1.3.5.3.	<i>TenascinC</i> (Acc.Nr.: NM_011607.2).....	89
4.1.3.6.	weitere Gene.....	92
4.1.3.6.1.	<i>H1fx</i> (Acc.Nr.: NM_198622.1).....	92
4.1.3.6.2.	<i>Sh3bgr</i> (Acc.Nr.: NM_015825.2).....	92
4.1.3.6.3.	<i>Hsd11b2</i> (Acc.Nr.: NM_008289.2).....	92
4.1.3.7.	Zytoskelett.....	94
4.1.3.7.1.	Gene der Myosin Proteinfamilie.....	94
4.1.3.7.2.	Gene der Aktin Proteinfamilie.....	96
4.1.3.7.3.	Weitere Zytoskelettproteine.....	97
4.2.	ANALYSE AUSGEWÄHLTER GENE IN ZELLKULTURSYSTEMEN.....	100
4.2.1.	EXPRESSION DER GENE VOM TAG 9.5 P.C. IN ZELLKULTUREN.....	101
4.2.2.	ÜBEREXPRESSION VON AUSGEWÄHLTEN GENEN.....	103
4.2.2.1.	Klonierung konstitutiv exprimierender lentiviraler Vektoren.....	104
4.2.2.2.	Überexpression der Gene.....	105
4.2.2.2.1.	Genexpressionsprofil nach Überexpression von <i>Pitx2a</i>	106
4.2.2.2.2.	Genexpressionsprofil nach Überexpression von <i>Pitx2b</i>	109
4.2.2.2.3.	Genexpressionsprofil nach Überexpression von <i>Midkine</i>	112
4.2.2.2.4.	Genexpressionsprofil nach Überexpression von <i>Cyclin d2</i>	114
4.3.	ZUSAMMENFASSUNG.....	116
V.	DISKUSSION.....	125
VI.	LITERATUR.....	136
VII.	ANHANG.....	167
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	167
9.2.	GENE UND DEREN BEZEICHNUNG.....	168
9.3.	CHEMIKALIEN.....	169
9.4.	MAßEINHEITEN.....	170
X.	DANKSAGUNG.....	171
XI.	ERKLÄRUNG.....	172
XII.	LEBENS LAUF.....	173

I. EINLEITUNG

1.1. DIE LEBER

1.1.1. FUNKTION UND AUFBAU

Die Leber nimmt im Organismus aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen und Eigenschaften eine ungewöhnliche Position ein. Sie übernimmt eine zentrale Rolle in der metabolischen Homöostasis des Organismus durch die Regulierung der verschiedenen Metabolismen und Haushalte (z. Bsp.: Kohlenhydrat-, Fettstoffwechsel und Mineral-, Vitaminhaushalt) ein.

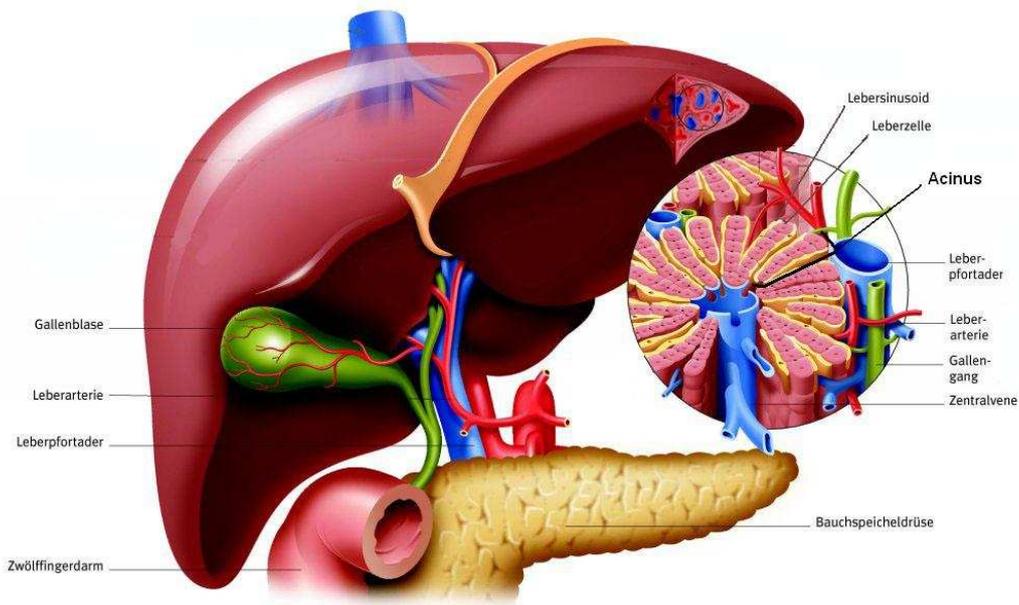


Abbildung 1.1 Aufbau der Leber (modifiziert)

Quelle: <http://www.bertelsmann-bkk.de/meine-gesundheit/lexika/gesundheitslexikon/l.html>

Die dafür verantwortliche funktionelle Grundeinheit der Leber ist der Acinus, der sich vom Pfortaderast entlang der Sinusoide bis zum Lebervenenast erstreckt (Abb.1.1). Während das nährstoffreiche Blut in einer acinären Passage an etwa 20-30 Parenchymzellen vorbei fließt, werden die benötigten Moleküle herausfiltriert. Aufgrund des Metabolit-, Sauerstoff- und Hormongradienten während einer Passage sind die Parenchymzellen in einem Acinus funktionell heterogen und weisen unterschiedliche Genexpressionsmuster auf (2).

Während periportale Hepatozyten eine hohe Aktivität im Glykogenabbau, der Gluconeogenese und der Fettsäureoxidation aufweisen, sind perivenöse Hepatozyten hauptsächlich an der Glykogensynthese, Glykolyse, Lipogenese beteiligt. Die Hepatozyten (Scavenger- oder

Fängerzellen) am perivenösen Ende des Leberacinus grenzen sich durch das Enzym Glutaminsynthetase von anderen Hepatozyten ab. Sie entfernen mit hoher Affinität Ammoniak und zur intrazellulären Kommunikation dienende Signalstoffe, bevor das Blut in die Lebervene und damit wieder in den Körperkreislauf gelangt (2).

Als Speicherorgan ist die Leber verantwortlich für die Aufnahme und Speicherung der über das Blut herangetragenen Nährstoffe, Vitamine und Elektrolyte und für die Biosynthese und Sekretion von Triacylglycerinen, Phosphoglyceriden und Sphingolipiden und den Cholesterinstoffwechsel. Parallel dazu synthetisiert die Leber eine Vielzahl von Proteinen, wie Serumproteine, Blutgerinnungsfaktoren, Retinol - bindende Proteine, die zum Teil ins Blut abgegeben werden. Bei Bedarf kann die Leber die gespeicherten Substrate in den Blutkreislauf abgeben und dadurch den Energiebedarf der anderen Organe und Gewebe im Körper decken (1, 2).

Neben der Speicherung dient die Leber als Ausscheidungsorgan. Die Gallenkanälchen, welche von benachbarten Hepatozyten gebildet werden und durch „tight junctions“ (engl.: dichte Verbindung) abgedichtet sind, vereinigen sich zu immer größeren Gallengängen, in denen die Galle in den Verdauungstrakt befördert wird. Der Gallensaft besteht zum größten Teil aus Wasser, anorganischen Elektrolyten und Abbauprodukte wie Bilirubin, Hormone und Medikamente (1, 2).

Eine weitere wichtige Funktion der Leber ist die Entgiftung des Körpers. Durch metabolische Umwandlungsprozesse und biliäre Exkretion kann der Körper von toxischen Substanzen befreit werden. Neben dem Abbau von körperfremden Stoffen wie Arzneimitteln werden auch körpereigene Stoffe wie Ammoniak in wasserunlösliche Produkte umgewandelt und über die Galle oder Niere ausgeschieden werden (1, 2)

1.1.2. DIE ZELLEN DER LEBER

Die Leber besteht aus verschiedenen spezialisierten Zelltypen, wobei die Hepatozyten, welche die meisten Funktionen ausüben, mit einem Anteil von ca. 80% der Zellmasse den größten Teil des Lebergewebes ausmachen.

1.1.2.1. Epitheliale Zellen

Hepatozyten, 20 – 50µm große polyedrische Zellen, bilden ein dichtes polarisiertes Epithel und sind über „gap-junctions“ miteinander verbunden (Abb. 1.2).

Sie unterscheiden sich von anderen Zellen durch einen gut ausgebauten Golgi - Apparat und durch eine Vielzahl von Organellen wie Mitochondrien, Peroxisomen, raues und glattes endoplasmatisches Retikulum aus. Ein besonderes Merkmal der Hepatozyten ist die Polyploidie.

Die basolaterale Membran der Hepatozyten ist den Sinusoiden (kleines Blutgefäß) bzw. dem Dissé - Raum zugewandt. An der apikalen Membran formen sich Gallenkanälchen, welche durch „tight junctions“ und Desmosomen abgedichtet sind. Durch diese Architektur ist ein vektorieller Transport zwischen Blut und Galle möglich (Abb. 1.2).

Neben den Hepatozyten gibt es Gallengangsepithelzellen (Cholangiozyten), die sich wie auch Hepatozyten während der embryonalen Entwicklung aus den sog. Hepatoblasten differenzieren. Cholangiozyten modifizieren die Gallenflüssigkeit durch Sekretion von Hydrogencarbonat und Wasser. Des Weiteren sind diese Zellen fähig, mit Hilfe Na^+ - abhängiger Transportersysteme Glukose und Gallensäure zu resorbieren (3, 44).

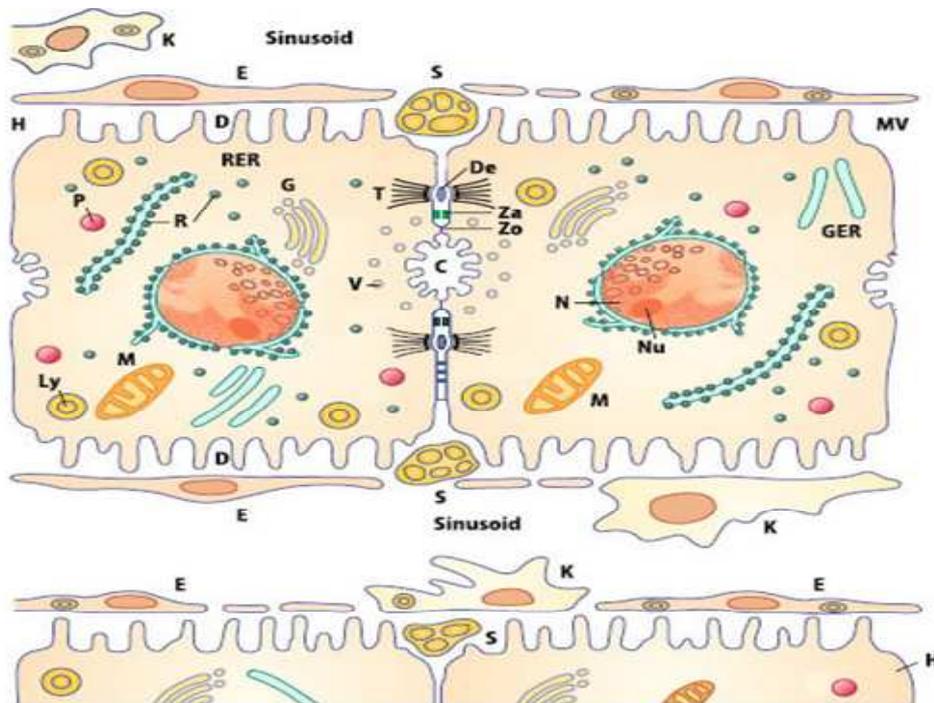


Abbildung 1.2 Zellen der Leber und ihre anatomischen Beziehungen

C = Gallecanaliculus; D = Disséscher Raum; De = Desmosom; E = Endothelzellen; G = Golgi – Apparat; GER = glattes endoplasmatisches Retikulum; H = Hepatozyt; K = Kupffer – Zelle; Ly = Lysosomen; M = Mitochondrien; Mv = Mikrovilli; N = Zellkern; Nu = Nucleolus; P = Peroxisomen; R = Ribosomen; RER = raues endoplasmatisches Retikulum; S = Sternzellen; T = Tonofilamente; V = pericanaliculäre Vesikel, Za = Zona adhärens; Zo = Zonula occludens (tight junctions) (2, modifiziert)

1.1.2.2. Nicht epitheliale Zellen

Endothelzellen, welche ungefähr 3% der Zellen der Leber ausmachen, sind flache organellarme Zellen ohne Basalmembran. Sie bilden ein fenestriertes Epithel, das für die Bestandteile des Blutplasmas durchlässig ist, nicht jedoch z.B. für Granulozyten. (Abb. 1.2) (1).

Die aus dem Knochenmark stammenden Kupfferzellen sind permanente in der Leber lokalisierte Makrophagen, die sich in den Sinusoiden an die Endothelzellen anlagern. Sie stellen rund 2% der Zellen in der Leber dar (Abb. 1.2). Die mononukleären Makrophagen sind essentiell für die Phagozytose von fremden und infektiösen Partikeln und für die Produktion von Zytokinen. Bei einem Leberschaden schütten diese Zellen den Tumornekrosefaktor α (Tnf α) und Interleukin 6 (Il-6) aus, umso eine Akutphase-Antwort zu bewirken (5, 2).

Die Sternzellen, erstmals 1876 beschrieben, befinden sich innerhalb des Dissé - Raumes und nehmen rund 1,4% der Zellen in der Leber ein (Abb. 1.2). Sie können in einem ruhenden und aktivierten Zustand in der Leber vorliegen. Im Ruhezustand sind sie befähigt, Fette und Vitamin A aufzunehmen, zu speichern und bei Bedarf wieder freizusetzen (6, 7, 8). Des Weiteren sind sie wichtig bei der Bildung der extrazellulären Matrix, da sie sowohl Kollagen Typ I, III, IV als auch Laminin produzieren können. Die Sternzellen synthetisieren ca. 80% der Gesamtmenge dieser Moleküle in der Leber. Die durch Leberschäden hervorgerufene Ausschüttung von Zytokinen

(hauptsächlich PDGF, TGF β und TNF α) löst eine Aktivierung der Sternzellen aus, was zu einer verstärkten Proliferation und Umwandlung zu myofibroblasten-ähnlichen Zellen führt. In diesen Zustand setzen sie ihre Fetttropfen und das Vitamin A frei und exprimieren Matrix-Metalloproteinasen und α -Aktin. Durch die Änderung ihrer Funktion beeinflussen sie den Verlauf der Fibrogenese in chronischen Erkrankungen der Leber unterschiedlicher Ätiologie (9, 8).

Pit Zellen wurden erstmals 1976 von Wisse und Kollegen (396) beschrieben und befinden sich an der sinusoidalen Oberfläche der Endothelzellen. Diese sehr kurzlebigen, hochmobilen Killerlymphozyten weisen eine hohe Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen und virusinfizierten Hepatozyten auf (10).

Eine weitere Gruppe stellen die Vorläufer- und Ovalzellen dar, welche sich sowohl in Hepatozyten als auch in Cholangiozyten differenzieren können. Diese Zellen sind vermutlich im Bereich der Heringschen Kanäle lokalisiert. Bei Leberschäden, die nicht durch proliferierende Hepatozyten regeneriert werden können, kommt es zu einer Stimulierung dieser Zellen, die dann zur Heilung des Leberschadens beitragen (11).

1.2. DIE ENTWICKLUNG DER LEBER

1.2.1. ORGANOGENESE

Erstmals ist die Anlage der Leber als anatomischer Auswuchs der ventralen Vorderdarndomäne des Entoderms am Tag E 8.5-9.0 post coitum (p.c.) zu sehen (12). Zu diesem Zeitpunkt bis zur Geburt fungiert die fötale Leber als Ort der Hämatopoese (13). Während dieses Stadiums ist die Leberknospe noch durch eine Grundmembran vom Septum Transversum getrennt. Vom Tag E 9.5 p.c. an beginnt diese porös zu werden und die Zellen wandern in das Septum Transversum ein (14).

Sobald im Entoderm die Leberanlage spezifiziert ist, werden die in der Leberknospe befindlichen Zellen als Hepatoblasten bezeichnet. Diese sind zu einem späteren Zeitpunkt fähig, sich in Hepatozyten oder in Cholangiozyten zu differenzieren (15, 16).

Bis zum Tag E 12 p.c. verbleiben die durch ihr im Verhältnis zum Zytoplasma sehr großen Kerne charakteristischen Hepatoblasten in einem morphologisch undifferenzierten Zustand (14). Die Differenzierung vom Hepatoblasten zum Hepatozyten nimmt mehrere Tage in der Entwicklung des Embryos der Maus ein. Im Elektronenmikroskop lässt sich diese Differenzierung durch die Veränderung der Gestalt von länglichen Zellen am Tag E 12 p.c. über kugelförmig am Tag E 18 p.c. bis zu der charakteristischen polygonalen Form kurz vor der Geburt nachvollziehen (17). Die Zunahme von Zellorganellen wie dem rauen endoplasmatischen Retikulum und des Golgi - Apparates um den Tag E 12 p.c. und die beginnende Anreicherung von Glykogen und die Anwesenheit von Peroxisomen ab Tag E 18 p.c. sind weitere Indizien für die Differenzierung der Zellen (18, 14). Von Tag E 18.5 p.c. an rückt die laterale Oberfläche der Hepatozyten näher an die Epithelzellen. Die Gallengänge sind durch die von der apikalen Membran flankierenden junctionellen Komplexen zu erkennen (19, 20, 21). Die Hepatozyten selbst bilden ihre polygonale Form mit einem großen Zytoplasma/ Kern Verhältnis, kleinen runden euchromatischen Kernen und ausgedehnten Glykogen Ablagerungen aus (17, 14).

In den späteren Phasen der embryonalen Entwicklung beginnt die fötale Leber sich sowohl strukturell als auch enzymatisch auf die metabolisch erforderlichen Funktionen in der postnatalen Phase vorzubereiten.

1.2.2. BEGINN DER HEPATISCHEN ENTWICKLUNG

Klassische Transplantationsversuche von LeDouarin (12) mit Embryonen von Hühnern zeigen, dass durch das Vorhandensein des Herzmesoderms die hepatische Entwicklung in der angrenzenden ventralen Vorderdarmdomäne des Entoderms ab Tag E 8 p.c. aktiviert wird. Neben dem Herzen unterstützen sowohl Signale vom Septum Transversum als auch Interaktionen mit Endothelzellen die Entwicklung der Leber (26) (Abb. 1.3).

Die Expression hepatischer mRNA-Marker in kultiviertem ventralem Entoderm vom Tag E 8 p.c. wird durch die Anwesenheit von Herzmesoderm hervorgerufen, wobei der Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) eine wesentliche Rolle spielt (27). Die Zugabe von exogenen FGF1 und FGF2 zum kultivierten ventralen Entoderm führt zur Expression von frühen leberspezifischen Genen einschließlich *Afp* (α -Fetoprotein) und *Albumin* (28, 29, 27). Die differenzierende Wirkung von FGF auf das Entoderm wird dabei wesentlich über dessen Konzentration beeinflusst. Bei Abwesenheit von FGFs werden verstärkt pankreatische Gene exprimiert, wohingegen eine sehr hohe Konzentration die Expression von Markergenen der Lunge fördert (30).

Zusätzlich zu ihrer Funktion während der frühen Phase der hepatischen Entwicklung beeinflussen die FGFs in späteren Stadien (E 10-20 p.c.) die Zellmorphologie, -proliferation und das Überleben des fötalen Organs (31, 27). Da jedoch in *Fgf1*^{-/-} *Fgf2*^{-/-} Mäusen kein Leberdefekt zu erkennen ist, deutet dies auf ein komplexes Wirkungsnetz der FGFs hin (32).

Zunächst nahm man an, dass die FGF-Signalkaskade alleine verantwortlich für den Start der hepatischen Entwicklung ist, *in vitro* Experimente zeigten jedoch den Einfluss einer weiteren Proteinfamilie, der knochenmorphogenetischen Proteine (BMP) (33). BMPs, Mitglieder der transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β) Familie, wirken als parakrine Signale. Sie sind im Herzmesoderm nur in geringen Mengen, im Septum Transversum jedoch in hoher Konzentration vertreten (34, 26).

In vitro Experimenten von Rossi und Kollegen (33) mit kultiviertem ventralem Entoderm in Anwesenheit von Herzmesoderm und Septum Transversum veränderte sich durch Zugabe von Noggin das Genexpressionsprofil. In Anwesenheit von Noggin waren verstärkt pankreatische Gene, nicht jedoch hepatische Gene nachzuweisen. Die Zugabe von BMPs, jedoch nicht von FGFs, konnte die durch Noggin hervorgerufene Blockierung der hepatischen Genexpression aufheben. Weitere Untersuchungen der BMPs deckten Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Gata4 auf, der essentiell für die Expression von *Albumin* und anderen hepatischen Genen ist, nach (33).

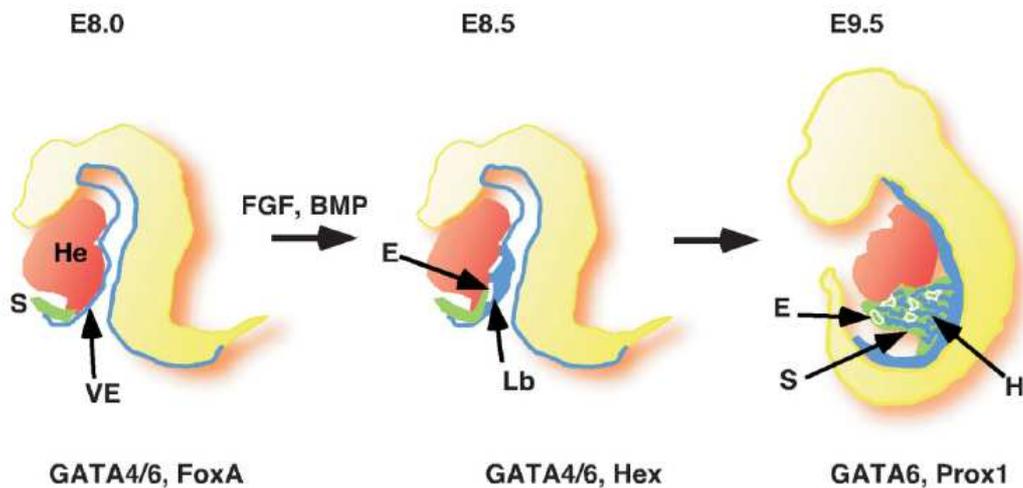


Abbildung 1.3 Überblick über die frühen Stadien der Leberentwicklung im Mausembryo

Ein Teil des Entoderms (blaue Fläche) ist nahe dem Herzen (rote Fläche) und dem Septum Transversum (grüne Fläche) lokalisiert. Als Antwort auf die induktiven Signale dieser spezifischen Gewebe, einschließlich der BMPs und FGFs, beginnt das ventrale Entoderm mit dem Start der hepatischen Entwicklung. Ab Tag E 8.5 p.c. formt das Entoderm die Leberknospe (blaue Fläche) und die Expression verschiedener leberspezifischer mRNAs beginnt. Endothelzellen (weiße Fläche) umgeben die Knospe und sind in den weiteren Stadien wichtig für die Expansion der Hepatoblasten. Ab Tag E 9.5 p.c. wandern Hepatoblasten in das Septum Transversum ein (He - Herz; S - Septum Transversum; VE: ventral Entoderm; FGF: Fibroblastenwachstumsfaktor; BMP: knochenmorphogenetisches Protein; E: Endothelzellen; Lb: Leberknospe; H: Hepatoblasten) (35)

Erst die richtige Kombination von BMPs und FGFs ermöglicht die Expression hepatischer Gene, wodurch die hepatische Entwicklung im ventralen Entoderm beginnt (16, 26).

Eine dritte Komponente für den Beginn der hepatischen Entwicklung sind die Endothelzellen. Sowohl Endothelzellen als auch die entstehenden vaskulären Strukturen sind für die Entstehung der Blutgefäße und deren Aufgaben in der Leber, wie der Verteilung des Sauerstoffs, der Metabolite und der Blutzellen, wichtig.

Zunächst umgeben Endothelzellen die Leberknospe. Sobald die Hepatoblasten beginnen vom Entoderm in das Septum Transversum einzuwandern, wandern die Endothelzellen in die Leberknospe ein und aggregieren als Sinusoide. Der Zusammenhang zwischen Leberentwicklung und Endothelzellen verdeutlichte sich bei Studien an *Flk1*^{-/-} Mäusen. In diesen Mäusen bilden sich keine reifen Endothelzellen und die Entwicklung der Leber stoppte unmittelbar vor der Bildung der vaskulären Strukturen. Obwohl die Verdickung des Entoderms und die initiale Expression der leberspezifischen Gene wie Albumin nicht beeinflusst wurde, blieb die notwendige Migration und Proliferation der Hepatoblasten in das umgebende Septum Transversum aus (36, 26).

1.2.3. DETERMINIERUNG DES HEPATISCHEN ENTODERMS

Die Bestimmung zeichnet sich durch das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren aus. Dies verdeutlicht sich sehr schön bei der Regulierung der Expression des Gens *Albumin*.

Albumin wird ab den Tag E 9.5 p.c. im hepatischen Entoderm exprimiert und ist einer der frühesten Marker der Leber. Die Expression der Albumin mRNA ist auf die Leber beschränkt und

eine der wenigen hepatischen mRNAs, die nicht im Darm oder anderen entodermalen Organen vorkommt (37).

Biochemische Studien der Transkriptionselemente von *Albumin* offenbarten Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Foxa und Gata, welche im kompakten Chromatin binden und internucleosomale Bindungen aufbrechen können (38, 39, 40, 41). Nach der durch beide Faktoren beeinflussten Öffnung des Chromatins können weitere Transkriptionsfaktoren wie Nf1 und C/ebp β an den Albuminhancer binden, wodurch die leberspezifische Expression startet (41). In anderen Geweben sind die Faktoren Foxa und Gata zwar auch an den Albuminhancer gebunden, jedoch findet aufgrund des Fehlens der anderen Transkriptionsfaktoren keine Transkription statt (42, 43). Neben dem Albuminhancer binden Foxa und Gata auch an andere Promotoren wie z. Bsp. an den Promoter des leberspezifischen Transkriptionsfaktors *Hex* (44).

Die Mitglieder der Forkhead box a Proteinfamilie werden sowohl in der fötalen und adulten Leber als auch in anderem Entoderm abstammenden Geweben exprimiert (45, 46). Die Inaktivierung der *Foxa*-Faktoren führt während der Entwicklung der Maus zu Defekten in der Bauchspeicheldrüse, einer reduzierten Expression von leberspezifischen Genen und einer erhöhten Sterblichkeit der Mäusen kurz nach der Geburt (47).

Die Mitglieder der Gata Familie gehören zu den Zink Finger Transkriptionsfaktoren und sind wichtig unter anderem für die Entwicklung des hämatopoetischen Systems (48). Für die Entwicklung der Leber sind die Transkriptionsfaktoren Gata6 und Gata4 von Bedeutung, die an der Bestimmung des hepatischen Zellschicksals im Entoderm, der Expansion der Leberanlage und der Expression von hepatischen Genen beteiligt sind. Allerdings deuten Knockout Studien darauf hin, dass die Gata Transkriptionsfaktoren teilweise redundant sind (49, 33).

1.2.4. WACHSTUM DES HEPATISCHEN ENTODERM IN DER LEBERANLAGE

Mit Beginn der zweiten Phase wandern die mesodermalen Zellen in das Septum transversum ein, während das bereits spezifizierete hepatische Entoderm sich weiter differenziert (12, 50).

Das Septum transversum definiert eine Region im embryonalen Körperhohlraum, in dem sich lose in Kollagen eingebettete mesenchymale Zellen befinden (37). Die mesenchymalen Komponenten vom Septum transversum sind in der Leberanlage essentiell für die Proliferation der Hepatoblasten (12, 51) (Abb. 1.4).

In der Phase des Einwanderns der Zellen in das Septum transversum sind die evolutionär konservierten Homeodomän - Transkriptionsfaktoren Hex und Prox1 von Bedeutung. Die Expression des Transkriptionsfaktors Hex, ebenfalls einer der frühesten hepatischen Marker, wird durch BMPs und FGFs beeinflusst (52, 53). Das Fehlen des Transkriptionsfaktors Hex führt nach der hepatischen Spezifizierung am Tag E 9.5 p.c. zum Stillstand der Leberentwicklung (54). Die Hämatopoese wird dadurch stark beeinträchtigt und, das nach der Spezifizierung folgende morphogenetische Auswachsen der Leber bleibt aus. Die mRNAs wichtiger hepatischer Gene wie *Albumin*, *Afp*, *Hnf4 α* und *Hnf6* sind nicht nachweisbar (54). Die durch Hex beeinflusste Expression von *Hnf4 α* und *Hnf6* führt in späteren Stadien zu einer abnormalen Differenzierung der Hepatoblasten und zu einer Unterbrechung während der Entwicklung der hepatischen Architektur (55).

Fast zeitgleich mit Hex beginnt das Wirken des Transkriptionsfaktors Prox1. *Prox1*^{-/-} Mäuse sterben ab Tag E 14 p.c. und besitzen eine um 70% verkleinerte Leber (56). Obwohl die initiale hepatische Genexpression in diesen Embryonen erfolgt, das hepatische Entoderm sich entwickelt und die Proliferation der Zellen beginnt, verbleiben die Zellen von der Grundmembran umgeben

und können nicht ins Septum Transversum einwandern. Das Fehlen von Prox1 führt zu einer verstärkten Expression von Matrixproteinen wie E-Cadherin und Kollagen IV, was vermutlich das fehlende Einwandern in das Septum Transversum bedingt. Dies deutet für Prox1 auf eine Rolle bei der Etablierung der leberspezifischen extrazellulären Matrix hin (57). Diese Verbindung zeigt wie wichtig die extrazelluläre Matrix bei der Ausbildung der Leber und der Differenzierung der Hepatoblasten ist. Der Einfluss der extrazellulären Matrix erfolgt vermutlich indirekt über die Bindung und der damit verbundenen Konzentrierung von Signalmolekülen oder direkt durch die Vermittlung intrazellulärer Signale, unter anderem über die Interaktion mit Integrinen (58). Daneben scheint Prox1 den Transkriptionsfaktor Hnf4 α bei der Regulierung der Expression von Cyp7a1 negativ zu beeinflussen, was weiter auf eine Rolle bei der Regulierung von Genen für funktionelle Aspekte der Leber hindeutet (59).

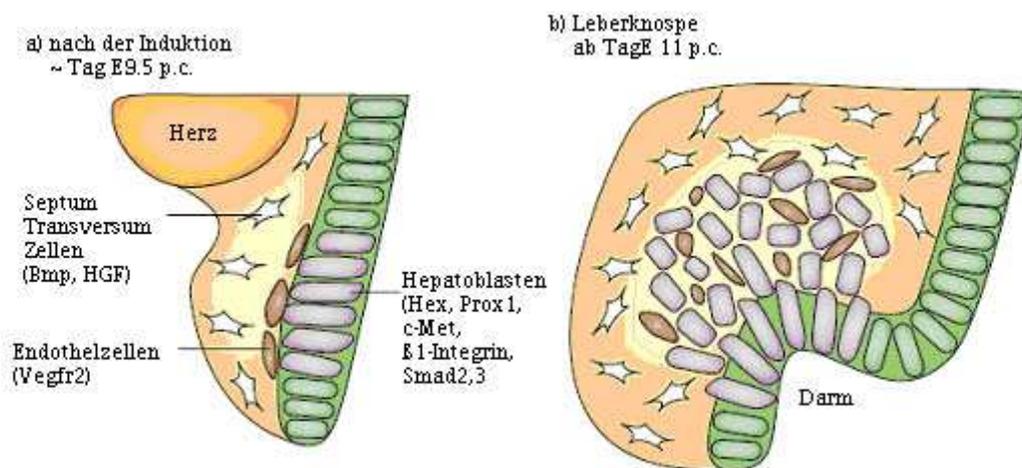


Abbildung 1.4 Wachstum der hepatischen Leberanlage

Nach der Anlage der hepatischen Knospe beginnt die Expansion der Zellen in das Septum Transversum. Sezernierte Moleküle wie das VEGF (Endothelzellen) oder Hgf (Zellen des Septum Transversum), aber auch die Expression von leberspezifischen Genen wie Prox1, Hex oder Met signalisieren den Hepatoblasten den Start der Expansion. b) Die Lebermorphogenese ist markiert durch der Umgestaltung der extrazellulären Matrix und der E-Cadherin basierenden Verbindungen zwischen den Zellen und der Proliferation und Migration in das umgebenden Septum Transversum (Beige). Das hepatische Entoderm geht in dieser Periode vom Epithel- zu nicht polarisierten Zellen über. Während des Auswuchses vereinigen sich die Endothelzellen lose im Raum des Septum Transversum und formen Vesikeln, die später die Blutgefäße bilden. Hämatopoetische Zellen wandern in die wachsende Leber ein und, das Organ distanziert sich vom Darmepithelium, (Bmp: knochenmorphogenetisches Protein; cMet: Hgf Rezeptor; Hgf: Hepatozytenwachstumsfaktor; Vegfr2: vaskulärer Endothelwachstums-faktorrezeptor 2) (65)

Nachdem die Leberknospe angelegt ist und die Expansion in das Septum Transversum beginnt, nehmen Wachstumsfaktoren zunehmend eine größere Rolle bei der Entwicklung der Leber ein. Besondere Bedeutung kommt dabei dem Hepatozytenwachstumsfaktor (Hgf) zu. Ursprünglich als ein regulierender Faktor in der Leberregeneration identifiziert, wird er bereits vor Tag E 11.5 p.c. im Septum Transversum exprimiert. Zur selben Zeit erfolgt die Expression des dazugehörigen Rezeptors Met auf den embryonalen Hepatozyten (60, 61, 62, 63). Da Hgf in mesenchymalen Zellen und Met in Epithelzellen exprimiert wird, scheint hierüber die Interaktion zwischen dem

Mesenchym und Epithelzellen zu erfolgen (62, 63). Studien mit *Hgf*^{-/-} und *Met*^{-/-} Mäusen deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von Hgf/ Met und der Proliferation der sich entwickelnden Leber hin. Die homozygote Inaktivierung führt zu einer embryonalen Letalität während des Zeitraums Tag E 13-16 p.c. aufgrund von Hypoproliferation und Apoptose des hepatischen Parenchyms. Ein ähnlicher Phänotyp wird in *Jun*^{-/-} Mausembryonen beobachtet, womit der Hgf/ Met/ Jun vermittelte Signalkaskade in der frühe hepatische Entwicklung eine wichtige Bedeutung zukommt (64, 52).

Neben Hgf ist TGF β ein weiteres wichtiges Signalmolekül während der Entwicklung der Leber. Obwohl es in der Regeneration antiproliferierend wirkt, ist es in der Entwicklung wichtig für die weitere Expansion der Leberknospe (65). Die Bindung von TGF β an seinen Rezeptor führt zu einer Komplexbildung der Smad-Proteine, welche als Transkriptionsfaktoren die Expression der TGF β Zielgene aktivieren (66). Die heterozygote Inaktivierung von *Smad2* und *Smad3* führt zu einer reduzierten Proliferation der Leberzellen verbunden mit einer erhöhten Zellsterblichkeit. Die Expression hepatischer Gene war nicht beeinflusst, jedoch fehlte den sich entwickelnden hepatischen Zellen die Fähigkeit Zell-Zellkontakte auszubilden (67). Ähnlich wie bei den *Prox1*^{-/-} Mäusen zeigte sich eine verringerte $\beta 1$ *Integrin* Expression. Der Knockout von $\beta 1$ *Integrin* bestätigt die Bedeutung der extrazellulären Matrix in der Kontrolle der Hepatogenese (68). Da Zugabe von Hgf zu kultivierten Leberexplantaten von *Smad2*^{+/-}; *Smad3*^{+/-} Mäusen den Phänotyp aufhebt, scheinen Überschneidungen bei den verschiedenen Signalkaskaden zu existieren (67). Dies zeigt, dass Teile der Signalkaskaden redundant und viele Signalwege untereinander miteinander verbunden sind.

1.2.5. DIFFERENZIERUNG DER HEPATOBLASTEN

Die Differenzierung von Zellen erfolgt durch eine Veränderung der Genexpressionsmuster, die primär durch Transkriptionsfaktoren bewirkt wird. Eine besondere Stellung in der Leber nehmen dabei die hepatischen Kernfaktoren HNF1 β und α , HNF6 und HNF4 α (HNF; Hepatic nuclear factor) ein, die sowohl eine Vielzahl von leberspezifischen Genen aktivieren als auch sich gegenseitig regulieren (65, 69, 71).

Anhand von Markergenen lässt sich die beginnende Differenzierung der Hepatoblasten in Cholangiozyten ab Tag E 13.5 p.c. erkennen (70, 72). Die Differenzierung der Gallenepithelzellen wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor HNF6 beeinflusst. Die *Hnf6* Expression startet mit dem Beginn der Leberentwicklung und erfolgt in hepatischen Gallengängen sowie der Gallenblase (73, 74). Zwischen den Tagen E 12-15 p.c. nimmt die Expression von *Hnf6* in Hepatozyten ab in Gallenepithelzellen dagegen zu.

Das Fehlen von *Hnf6* führt zu einer fehlenden Gallenblase und rudimentären Ausbildungen der intra- und extrahepatischen Gallengänge (75). Eine verringerte *HNF1 β* Expression in diesen *Hnf6*^{-/-} Mäusen weist auf eine regulierende *Hnf6*/*Hnf1 β* Kaskade in der Differenzierung der Gallenepithelzellen hin (76, 75).

Die Differenzierung der Hepatoblasten in funktionelle Hepatozyten lässt sich ebenfalls, neben der morphologischen Veränderung, anhand der Veränderung Genexpressionsmuster nachvollziehen. Einer der frühesten Marker der Hepatoblasten ist das Afp. Der Gehalt dieser mRNA nimmt während der Differenzierung der Hepatoblasten langsam ab und ist nach der Geburt nicht mehr nachweisbar. Albumin, ein weiteres wichtiges Markerprotein für Hepatozyten ist ab Tag E 9.5 p.c. detektierbar. Im Gegensatz zu Afp nimmt die Expression von Albumin während der Differenzierung stetig zu und wird auch in der adulten Leber weiter exprimiert (77, 78). In der späten Entwicklung (beginnend mit der perinatalen Phase) starten die Hepatozyten

mit der Produktion metabolischer Enzyme wie Glucose-6-Phosphatase (G6pase) oder Tyrosineaminotransferase (79). Einige Tage nach der Geburt beginnt die Expression von Enzymen wie der Serindehydratase und der Tryptophanoxygenase in Hepatozyten (80; 82, 81).

Von besonderer Bedeutung bei der Differenzierung der Hepatozyten ist der Transkriptionsfaktor Hnf4 α , der maßgeblich an der Differenzierung der Hepatoblasten beteiligt ist. Hnf4 α reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die in fast allen wichtigen metabolischen Prozessen der Leber involviert sind (83). Hnf4 α ist unter anderem unentbehrlich für die Expression der Apolipoproteinen (*ApoaII*, *cII*, *cIII*) als auch für *Erythropoietin*, *Transferrin* und Retinol - bindende Proteine (84, 85). Ferner hat die Expression von Hnf4 α einen antiproliferativen Effekt auf Zellen (88). Besondere Bedeutung nimmt Hnf4 α bei der Aktivierung der Expression von *Pck1* (Phosphoenolpyruvatecarboxykinase 1) und *G6pase* ein, da diese Gene verlässliche Indikator für die Differenzierung der Hepatozyten sind (89, 90). Bei der Regulierung der hepatischen Gene zeigt sich, wie wichtig kombinatorische Proteininteraktionen zwischen den verschiedenen Hnf Faktoren sind. So interagieren Hnf4 α und Hnf6 synergistisch bei der Expressionskontrolle der *G6pase* (91, 93).

Neben der Differenzierung der Hepatoblasten ist *Hnf4 α* an der Ausbildung des extraembryonalen Entoderms und bei der Leberarchitektur beteiligt. In *Hnf4 α* defizienten Mausembryonen ist eine hohe Sterblichkeit bereits vor Beginn der Leberentwicklung zu beobachten, welche auf eine regulierende Funktion des Faktors bei der Bildung des extraembryonalen Entoderms hindeutet (92, 94). Die *Hnf4 α* mRNA ist erstmals detektierbar in Maus Blastozysten ab Tag E 4.5 p.c., ab Tag E 8.5 p.c. in der Leber nachweisbar und ab Tag E 10 p.c. in der Pankreas und Niere (95, 96). Während der fortschreitenden embryonalen Entwicklung (Tag E 10-14 p.c.) ist Hnf4 α essentiell für die Differenzierung der Hepatozyten und der Beibehaltung ihrer funktionellen Aktivität. Es erlaubt den parenchymalen Zellen, sowohl ihre epitheliale Gestalt als auch die physiologische Leberarchitektur auszubilden. In *Hnf4 α loxP/loxP* Lebern, in denen die Expression von *Hnf4 α* abhängig von der Aktivität des AFP-Promoters herabreguliert ist, zeigte sich am Tag E 18.5 p.c. eine reduzierte hepatische Glykogensynthese aufgrund einer abnehmenden Expression der Glykogensynthase, *Pck1* und *G6pase*. Die Expression der *Albumin* and *AFP* mRNAs waren unverändert (97).

Neben Transkriptionsfaktoren sind Zytokine und Wachstumsfaktoren weitere wichtige Faktoren bei der Differenzierung der Hepatoblasten.

In der späten fötalen bis zur neonatalen Phase wandern die hämatopoetischen Zellen in die Milz und das Knochenmark. Parallel dazu steigt in der Leber der Anteil der lebertypischen nichtparenchymalen Zellen. Diese können, wie auch in der Leberregeneration, Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten. Hgf und Oncostatin M (OSM) sind fähig, die Expression von hepatischen Differenzierungsmarkern zu kontrollieren. Neben der Wirkung von Hgf auf die Expansion der Leberanlage beeinflusst der Wachstumsfaktor die Differenzierung der Hepatozyten (99). *In vitro* Experimente mit fötalen hepatischen Zellen wurde eine verstärkte Expression von hepatischen Differenzierungsmarkern durch die Zugabe von Hgf und OSM beobachtet. So wird die Expression von *Albumin* sowohl von Hgf als auch OSM unterstützt (98, 99).

OSM, ab Tag E 12.5p.c. vorwiegend von hämatopoetischen Zellen produziert, bindet an den gp130 Rezeptor und aktiviert den STAT3 Signalweg, der wie auch der gp130 Rezeptor eine wichtige Funktion in der Leberregeneration ausübt (100, 101). Die Wirkung von OSM ist sehr vielfältig und unabhängig von den jeweiligen Zelltypen (100). Die Expression von *JAK1*, *Dshp2* und

Shc in fötalen hepatischen Zellen unterstreicht die Funktion von OSM als ein parakriner Faktor in der hepatischen Entwicklung (102).

1.2.6. AUSBILDUNG DER LEBERSTRUKTUR

Durch den Knockout von $\beta 1$ *Integrin* in Mäusen zeigte sich wie bei *Prox1* eine Unfähigkeit der Zellen in das Septum Transversum einzuwandern, was eine Verhinderung der weiteren Expansion der Leberknospe mit sich zieht (68).

Während der Hepatogenese kommt es zu drastischen Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (103). Der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Expression von hepatischen Genen *in vitro* deutet auf eine Funktion der extrazellulären Matrix sowohl im Aufbau der Leberstruktur als auch in der Differenzierung der Hepatozyten hin (104, 105, 106, 107, 108). Die extrazelluläre Matrix des Mesenchyms besteht aus einer Vielzahl von Proteinen wie Laminin, Fibrogen, Kollagen I und IV und Fibronectin (103, 105).

Bei der Aufklärung dieser Prozesse könnte durch Studien an *Hnf4 α loxP/loxP Afp.cre* Hepatozyten gezeigt werden, dass *Hnf4 α* positiven Einfluss auf die Expression von *E-Cadherin* und Konnexinproteinen wie *Konnexin 32* und *26* hat. Die verringerte Expression von Zelladhäsion- und Zelljunctionsmolekülen führte zu einem verminderten Zell-Zellkontakt. Nur rudimentäre Zellverbindungen konnten identifiziert werden. Zusätzlich fehlen den Zellen die Glykogeneinlagerungen und besitzen nur ein kleines Zytoplasma/ Kern Verhältnis mit missgestalteten Kernen. Somit zeigte sich, dass die Expression von Zelladhäsions- und Zelljunctionsmolekülen wichtig ist für die Differenzierung der Hepatozyten, und das *Hnf4 α* maßgeblich an deren Expression beteiligt ist (87).

1.3. LEBERREGENERATION

Durch ihre Funktion in der Entgiftung des Körpers nimmt die Leber bei den Organen eine besondere Stellung ein. Im Laufe der Evolution entwickelte der Organismus eine besonders effiziente und schnelle Reaktion, um die Leber bei Verletzung zu regenerieren und den Körper vor einen möglichen Ausfall der Leber zu schützen. Obwohl Hepatozyten eine lange Lebensdauer aufweisen und normalerweise nicht in den Zellzyklus eintreten, können sie den Zellverlust mit Proliferation effektiv kompensieren.

Die Restauration des verlorenen Gewebes ist eine perfekt vom Körper abgestimmte Antwort, um so die benötigte Leistung der Leber wieder zu erlangen. Bei Lebertransplantationen im Menschen nehmen kleine Transplantate sehr schnell an Masse zu, während große Transplantate an Masse verlieren und sich so letztendlich immer das optimale Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht wieder einstellt (109, 110).

1.3.1. VERLAUF DER REGENERATION NACH TEILRESEKTION DER LEBER

1931 führten Higgins und Anderson partielle Hepatektomien durch und etablierten ein Model zur Untersuchung der Leberregeneration (111). Sie entfernten 2/3 der Leber in der Ratte und lieferten den experimentellen Beweis, dass die Leber nach ungefähr einer Woche ihre Masse restauriert hatte. Simpson und Finckh (112) bewiesen weiter, dass die Regenerationskapazität der Leber beinahe unbegrenzt ist. Nach fünf Hepatektomien, wobei die Leber zwischen den

In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts wiesen Experimente auf eine Bedeutung des Blutstromes für den Regenerationsprozess hin, da die Unterbrechung des portalen Blutstroms eine Verzögerung der regenerativen Antwort bedingte (118, 119, 120). Daneben steht das aus bereits anderen Prozessen bekannte Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) zur Diskussion. Der Verlust von 70% der Leber sowie der daraus resultierende erhöhte Blutdruck verstärken den Stress an der Oberfläche der verbliebenen Leberzellen und führt möglicherweise parallel zu einer Ausschüttung von NO (121).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der vermutlich über die Blutzirkulation in die Leber gelangt, scheint LPS (Lipopolysaccharid) zu sein (122). LPS interagiert mit Rezeptoren wie den Toll-like Rezeptoren (Tlr) auf der Oberfläche von Kupfferzellen und aktiviert durch diese Bindung eine Vielzahl von intrazellulären Kaskaden, unter anderen den MyD88 vermittelten Signalweg. Dieses Signaladaptermolekül bindet an fast alle Tlrs sowie an die Interleukin 1 und 18 Rezeptoren (123). Während *Tlr*-defiziente Mäuse keine abnormale Leberregeneration aufwiesen, zeigte sich in *MyD88* defizienten Mäusen eine verringerte Aktivierung von $Tnf\alpha$ und Il-6 und damit eine nachfolgende Blockierung von Stat3 sowie die Expression von Stat3 Zielgenen (124, 125).

Durch die Zugabe von LPS erfolgt eine Zytokinsekretion, die mit der Antwort nach Teilresektion vergleichbar ist. Die anschließende Depletion von Kupfferzellen zeigte eine verringerte $Tnf\alpha$ Sekretion, aber eine normale Il-6 Sekretion, was auf ein Aufgabe der Kupfferzellen bei der $Tnf\alpha$ Sekretion hindeutet, während Il-6 auch von anderen Zellen produziert wird (126).

1.3.3. INITIATION ODER PRIMING DER HEPATOZYTEN

Der als frühe Phase bezeichnete Abschnitt der partiellen Hepatektomie findet innerhalb der ersten fünf Stunden statt (127). Sie ist gekennzeichnet durch den Eintritt der Hepatozyten in den Zellzyklus bzw. dem Übergang von der G0 Phase in die G1 Phase, in der es zu einer Akkumulation von CyclinD1 kommt. Dieser nach einer Verletzung auftretende Eintritt ist stark beeinflusst durch eine Veränderung im Zytokinhaushalt, die eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren bedingt (121) (Abb. 1.5).

Zytokine binden an spezifischen Rezeptoren und generieren intrazelluläre Signale. Im Unterschied zu Wachstumsfaktoren haben sie die Fähigkeit, selektive intrazelluläre Signalwege zu aktivieren, die nicht mit der Mitogenese verbunden sind (128, 129). Die starke Zunahme des mRNA und Serumgehaltes von $TNF\alpha$ und Il-6 kurz nach der Teilresektion deuten auf die wichtige Rolle der Zytokine während der Regeneration hin (126).

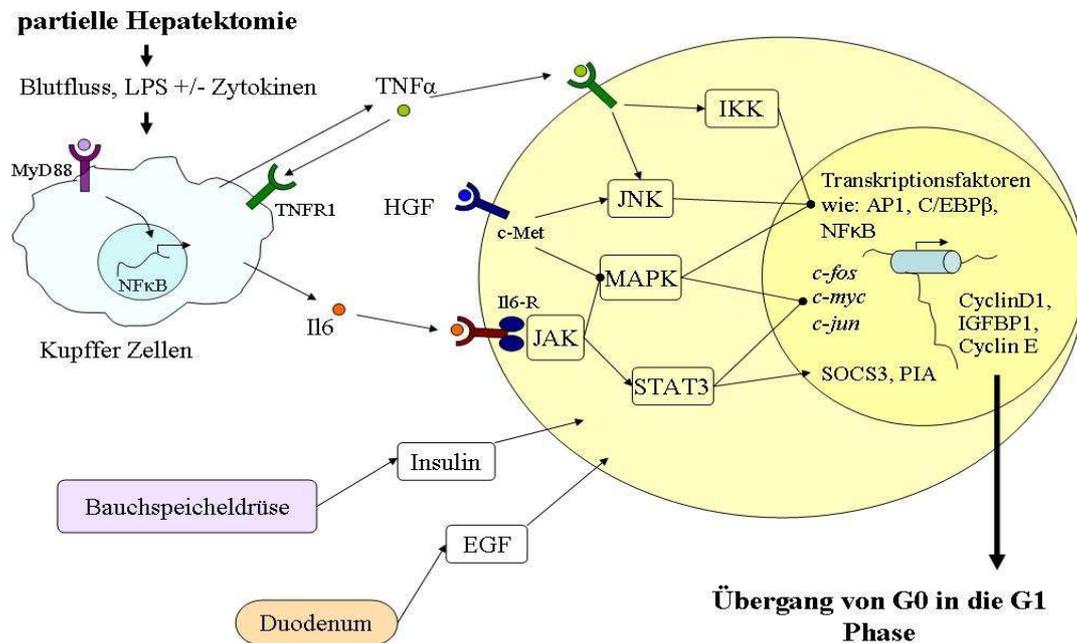


Abbildung 1.6 Initiation nach partieller Hepatektomie

1.3.3.1. Die Zytokine *Tnfa* und Interleukin 6

Tnfa und *Il-6* sind wichtige Komponenten der frühen Signalkaskaden und regulieren eine große Anzahl der früh exprimierten Gene (Abb. 1.6) (130, 131, 132).

Die Ausschüttung von *Tnfa* und *Il-6* durch nichtparenchymalen Zellen (133) wenige Minuten nach der partiellen Hepatektomie bewirkt den Übergang der ruhenden Hepatozyten in die G1-Phase und führt die Zellen in die S-Phase. Daneben wird die Synthese weiterer Proteine durch die Aktivierung von DNA - bindenden Proteinen wie *NFκB* und *Stat3* gefördert (134, 135).

Tnfa bindet an einen Rezeptor auf Kupfferzellen und aktiviert die Synthese weiterer Zytokine, einschließlich *Il-6*, und aktiviert Transkriptionsfaktoren wie *Ap1*, *C/ebp* und *NFκB*. Die Erfordernis von *Tnfa* für eine normale Proliferation zeigte sich bei *Tnfr1*^{-/-} Mäusen (*Tnf* Rezeptor 1). Die Überlebensrate dieser Mäuse nach einer partiellen Hepatektomie sank um 50% und, diese waren nicht fähig, die Lebermasse innerhalb von 2 Wochen zu erneuern (136). Das Fehlen des Rezeptors für *Tnfa* führte zu einer verschlechterten Aktivierung von *Il-6* und bedingte nachfolgend Defekte in der DNA-Synthese (136). Obwohl *Tnfr1*^{-/-} Mäuse vielfältige Defekte haben, erscheinen *Tnfa*^{-/-} Mäuse phänotypisch normal, was auf eine Redundanz z.B. durch *Lymphotoxin α* zurückzuführen sein könnte (137, 138, 139).

In *Il-6*^{-/-} Mäusen ist ebenfalls eine abnormale G1-Phase und reduzierte S-Phase zu beobachten. Wie auch bei *Tnfr*^{-/-} Mäusen kommt es zu einer reduzierten Aktivierung von *Stat3*, die zu einer abnormalen Expression von Genen wie *AP1*, *myc* und *CyclinD1* führt. Der Effekt scheint auf Hepatozyten beschränkt zu sein, da in nichtparenchymalen Zellen die DNA-Synthese normal abläuft (140).

Nach der Aktivierung bindet Il-6 an den gp80-Rezeptor, was durch intra- oder intermolekulare Phosphorylierung zur Aktivierung der an den Rezeptor assoziierten Januskinase (JAK) führt. Die aktivierte JAK phosphoryliert die an dem Rezeptor gebundenen Stat - Proteine. Durch die Phosphorylierung bilden sich Homo- und Heterodimer, die in den Kern wandern und die Transkription der Zielgene wie *c-fos*, *c-myc* und *c-jun* aktivieren (141, 129). Wie Tnf α scheint auch Il-6 nicht zwingend erforderlich für die Aktivierung des Prozesses zu sein, da die Rekonstruktion der Leber in *Il-6* defizienten Mäusen nur verzögert ablief (140).

Neben dem Stat Signalweg gibt es weitere für den Verlauf der Regeneration wichtige Signalkaskaden. Die Aktivierung der Mapk Signalkaskade ist für die Progression der G1-Phase und im weiteren Verlauf der Regeneration für die zelluläre Proliferation nötig (143). In Anwesenheit von MEK Inhibitoren fehlt die Akkumulation von *Cyclin D1* mRNA und, die DNA-Replikation wird verhindert. Die Aktivierung der Mek/ Erk ist nur in regenerierenden Hepatozyten beobachtbar (143).

Der Jnk/c-Jun Signalweg ist eine weitere wichtige Signalkaskade, die den Eintritt vieler Zellen von der G0- in die G1-Phase des Zellzyklus unterstützt (144). *c-Jun* defiziente Mäuse weisen eine erhöhte Sterblichkeit nach partieller Hepatektomie auf und einen ineffizienten Übergang von der G1- in die S-Phase. Die nichtparenchymalen Zellen blieben davon unbeeinflusst. Da c-Jun sowohl bei der Aktivierung der CDK's als auch bei der Regulierung von p21/ waf1 eine kontrollierende Funktion übernimmt, könnte dies eine Erklärung der Ergebnisse sein (144, 145).

1.3.3.3. Termination der Initiation

Um die Phase der Initiation zu terminieren wird in den Zellen eine zytokinvermittelte Signaltransduktion aktiviert, die das Ende der Initiation einleitet. Verschiedene Proteine wie Socs's oder Pias's deaktivieren durch Dephosphorylierung die Jaks, Rezeptoren und Stats.

Die Genexpression der Socs's (suppressors of cytokine signalling) erfolgt durch die Il-6, Lif, Il-11 und OSM vermittelten Aktivierung der Jak/ Stat-Kaskade. Da die Socs-Proteine über die Jak/ Stat-Kaskade aktiviert werden und später die Stat vermittelte Signaltransduktion inhibieren, zählen sie zu den klassischen Feedback Inhibitoren (129). Die beiden Proteine Stat3 und Socs3 sind bereits acht Stunden nach partieller Hepatektomie nicht mehr nachweisbar (146).

Die Pias, Gu/RNA helicase II bindende Proteine, sind wichtige transkriptionelle Ko-Regulatoren des Jak/ Stat-Kaskade und inhibieren ebenfalls die Stat1 und Stat3 Signalkaskade (129).

1.3.4. PROGRESSIONSPHASE

Während die Phase der Initiation von der Aktivierung der Zytokine und den damit verbundenen Übergang der Hepatozyten von der G0- zur G1-Phase geprägt ist, nehmen Wachstumsfaktoren die führende Rolle in der anschließenden Phase der Progression ein. Diese erlauben den in der G1-Phase befindlichen Hepatozyten, den nächsten Kontrollpunkt des Zellzyklus zu überwinden und die anschließenden Phasen zu durchlaufen.

Wachstumsfaktoren oder Mitogene sind in der Lage, Hepatozyten in Kultur zu stimulieren, sodass sie in die S-Phase eintreten. Die wichtigsten Wachstumsfaktoren gehören zur Hgf und EGF Rezeptor Ligand - Familie. Weitere Faktoren sind unter anderem der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und TGF α . (147, 148). Ko-Mitogene wie Insulin verstärken den Effekt.

Nach partieller Hepatektomie ist ein starker Anstieg der Wachstumsfaktoren im Blutserum zu verzeichnen. Dieses Serum kann sogar zur DNA-Synthese in Hepatozyten in gesunden Ratten

führen (149). Dabei zeigte sich ein Genexpressionsprofil, das dem kurz nach einer partiellen Hepatektomie ähnelt.

1.3.4.1. Wachstumsfaktor Hgf

Wie schon in der Entwicklung ist Hgf und sein Rezeptor c-Met auch in der Regeneration von Bedeutung. Bei einer Verletzung der Leber steigt die Konzentration von Hgf im Blut und in der Leber innerhalb der ersten Stunde um das 20fache an bei konstant hohen Spiegel in den folgenden Tagen (150).

Hgf wird in mesenchymalen Zellen produziert und entfaltet seine parakrine Wirkung durch die Bindung an den spezifischen Rezeptor cMet (147, 151). Das als inaktives, in der extrazellulären Matrix gebundene sekretierte präHgf wird nach der Verletzung der Leber durch Proteasen wie der urokinase-type plasminogen Aktivator (uPA) aktiviert und bindet an c-Met (152). Der Rezeptor cMet kann zwar beide Formen binden, die Aktivierung der weiteren Signalkaskade erfolgt aber erst durch die Bindung des aktiven Hgf. Durch diese Bindung werden viele verschiedene Signalkaskaden, unter anderen die PI3K-AKT, Ras-Erk-MAPK, JNK - Kaskaden aktiviert (145, 143, 153, 154).

Des Weiteren bedingt die Aktivierung von c-Met die Degradierung des Komplexes in dem β -Catenin gebunden ist. Durch dies wird β -Catenin freigesetzt, kann in den Kern wandern und die Expression früher Gene wie *Cyclin D1/ A* und PCNA reguliert (121, 155, Abs. 1.4). Die Überexpression von Hgf in Mäusen bewirkt eine verstärkte Expression von *c-myc* und *c-jun* und eine verkürzte Regeneration der Leber (110).

1.3.4.2. Weitere Mitogene

TGF α , hauptsächlich in Kupfferzellen produziert, liegt in zwei verschiedenen Formen vor. Während das membrangebundene Vorläuferprotein verantwortlich für die Aktivität während der Replikation ist, tritt die abgespaltene Form nur in Hepatozyten auf, die sich bereits in der Replikation befinden (156). In der Entwicklung, Regeneration und in kultivierten Hepatozyten ist die vorübergehende Expression von TGF α assoziiert mit der DNA Replikation. Vier Stunden nach partieller Hepatektomie steigt die Anzahl der TGF α - Transkripte und erreicht 18 – 24 Stunden nach der partiellen Hepatektomie das Maximum (157). Die Zugabe von Anti-TGF α Antikörpern hat einen inhibierenden Einfluss auf die DNA-Synthese nach partieller Hepatektomie (156, 158). Bei TGF α überexprimierende Mäuse zeigte sich eine Zunahme im Lebergewicht, eine ständige Proliferation der Hepatozyten sowie ein erhöhtes Krebsrisiko aufwiesen (159, 160).

EGF aktiviert die DNA-Synthese in kultivierten primären Hepatozyten. Der Wachstumsfaktor wird kontinuierlich durch die Brunner'schen Drüsen im Darm produziert und gelangt über die portale Zirkulation zur Leber. In der Leber wird EGF ähnlich wie Hgf in der periportalen Matrix gelagert (116). Der Effekt auf die DNA-Synthese kann durch Insulin verstärkt werden.

Insulin gehört zu den Ko-Mitogenen, die keinen direkten stimulierenden Effekt auf die proliferierenden Hepatozyten haben, aber fähig sind, die Wirkung von Mitogenen zu erhöhen und von inhibierenden Substanzen zu reduzieren. In diese Gruppe gehören neben Insulin auch Hormone und Neurotransmitter wie Glucagon, Noradrenalin, Thyroidhormon, Parathyroidhormon, Kalzium und Vitamin D.

Phase herbeiführen (140, 172, 144). Anschließend treten die Zellen in die S-Phase ein, die nach ca. 30-32 Stunden beginnt und ihr Maximum zwischen 36-40 Stunden nach der Operation erreicht (159, 160). Der Übergang in die S-Phase ist gekennzeichnet durch die Phosphorylierung von pRb, der erhöhten Expression von Genen wie PCNA, *Cyclin A* und DNA Polymerase (140, 172, 173, 174).

Der Übergang von der G2-Phase in die M-Phase wird über den Tagesrhythmus reguliert und findet jeden Tag zur selben Zeit statt, unabhängig vom Zeitpunkt der Operation (175, 176). Ein möglicher Regulator dieses Zyklus könnte die Kinase Wee1 sein, deren mRNA und Protein Anhäufung stark der zirkadiären Regulierung folgt. Zur Tageszeit ist eine hohe Expression dieses Protein zu beobachten und parallel dazu eine Inhibierung der Kinaseaktivität des Cdk2/ CyclinB1 Komplexes. Bei einem geringen Wee1 Gehalt treten die Hepatozyten dann in die M-Phase ein. In diesem Zeitfenster kann der Cdk2/ CyclinB1 Komplex durch die Dephosphorylierung von Cdk2 aktiviert werden (176).

Während der Replikation scheinen die Hepatozyten nicht zu dedifferenzieren und sind weiterhin fähig, ihren metabolischen und synthetischen Funktionen nach zu kommen (69, 117). Der Beginn der DNA-Synthese der nichtparenchymalen Zellen erfolgt nach den Hepatozyten. Das Maximum der DNA-Synthese der Cholangiozyten ist ca. 48 Stunden nach partieller Hepatektomie erreicht und bei den Kupfferzellen nach 72 Stunden, einzig die Endothelzellen erreichen ihr Maximum erst nach 96 Stunden (116, 177). Diese Daten variieren jedoch von Spezies zu Spezies und auch innerhalb einer Spezies. Wenn die Originalmasse der Leber erreicht ist, kommt es zu einem abrupten Stopp der Regeneration und, die Hepatozyten gehen wieder in die G0-Phase über (116).

1.3.7. STOPP-SIGNAL

Nach 72 Stunden ist die DNA - Synthese in den meisten Zellen der Leber abgeschlossen. Veränderungen in der Histologie der Leber folgen. Sobald die Leber ihre ursprüngliche Masse erreicht hat und wieder voll funktionstüchtig ist, endet der Prozess der Regeneration.

Während des Voranschreitens der Regeneration werden verschiedene durch Wachstumsfaktoren und Zytokine beeinflusste Kontrollpunkte durchlaufen, über die der Verlauf der Regeneration überwacht wird. Ein wichtiger Regulationsmechanismus wurde bereits weiter oben erwähnt. Weiter geht man davon aus, dass Tgf β als ein Stoppsignal für den Prozess dient. Tgf β wird von Sternzellen sekretiert und führt bei Überexpression zu Leberfibrose und Apoptose (116, 178).

Die verschiedenen Isoformen von TGF β werden in der Leber nur schwach exprimiert, jedoch führt die partielle Hepatektomie zu einem Anstieg der TGF β mRNA, der nach rund 2-3 Tagen ein Plateau erreicht. Der Anstieg der mRNA steht zunächst nicht mit der Aktivität von TGF β in Zusammenhang, da hier die Smad-Proteine eine wesentliche Rolle spielen (179). Smad Proteine sind in der ruhenden Leber aktiv und tragen zur Aufrechterhaltung der G0-Phase in den Hepatozyten bei. Zeitgleich zum Anstieg der TGF β Expression werden Inhibitoren des TGF β -SMAD Signalweges aktiviert, die mit den aktivierten Smad Komplexe bilden und diese dadurch inhibieren. Erst nach der Hauptproliferationsphase und mit dem Beginn der Rekonstitution der Lebermasse nehmen diese ab und setzen damit die Smad Protein frei. Diese Regulierung erklärt die TGF β Resistenz der Hepatozyten während der proliferierenden Phase (180). Ein anderer potentieller Kandidat für ein Regenerations-Stoppsignal ist Activin A. Dieser autokrine Wachstumsinhibitor blockiert die Mitogenese bei Hepatozyten. In der adulten Leber nicht

detektierbar, nimmt die Konzentration nach partieller Hepatektomie stark zu (181, 182). ActinvinA kann die Reduzierung der Lebermasse durch Apoptose regulieren.

1.3.8. DIE FUNKTION DER LEBER WÄHREND DER REGENERATION

Während der Regeneration muss der verbliebene Teil der Leber weiterhin den metabolischen Aufgaben für den ganzen Organismus nachkommen. Viele der ersten, sehr schnell und stark exprimierten Gene kodieren Enzyme und Proteine für die Regulierung der Gluconeogenese, umso den Glukosemetabolismus aufrecht zu erhalten (131, 132, 183, 184, 185). Eins der ersten und stark exprimierten Gene ist die G6Pase, dessen Expression innerhalb der ersten 30 Minuten stark ansteigt. Ein akuter Insulinabfall und die Zunahme des Glykogengehaltes kurz nach der partiellen Hepatektomie schützt die Leber vor einer Hypoglykämie (186, 187). Die schnell ansteigende Expression von Genen wie *Pck1* und *Igfbp1* und die abfallende Expression von Genen wie *L-pyruvate kinase*, *Glucokinase* gestatten der verbliebenen Leber, das Gleichgewicht im Glukosehaushalt zu erhalten (188, 189, 185).

Die Expression von leberspezifischen Genen, wie *Igfbp1*, *G6pase* und α -*Fibrinogen* wird durch Transkriptionsfaktoren wie HNF1 reguliert, dessen transkriptionelle Aktivität durch Faktoren wie Stat3 und AP1 beim Start der Regeneration erhöht wird (190).

1.4. ENTWICKLUNG VS. REGENERATION DER LEBER

Während der Entwicklung werden verschiedene Gene exprimiert und Signalkaskaden aktiviert, die auch während der Regeneration der Leber aufzufinden sind, vor allem solche Gene, die in Zusammenhang mit Proliferation, Migration und Differenzierung stehen. Für einige Gene gibt es dafür bereits zahlreiche veröffentlichte Daten. Der Ablauf der beiden Prozesse lässt sich grob vergleichend zusammenfassen: zunächst erfolgt die Induktion des Startsignals (in der Entwicklung durch die Fgf's und Bmp's; in der Regeneration durch Zytokine wie Interleukin 6), weiter kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (in der Entwicklung: Hex, Prox1, Hnf's; in der Regeneration: c-myc, c-jun, Ap1 und Hnf's) und anschließend zu Aktivierung bzw. Expression verschiedener Wachstumsfaktoren wie Hgf, Egf oder Tgf α/β . Abschließend kommt es in den beiden Prozessen zur Ausbildung des Epithels und zu einem voll funktionstüchtigen Organ, welches die metabolischen Aufgaben für den Organismus übernehmen kann.

Eine sehr wichtige Gruppe stellen die Transkriptionsfaktoren dar, wobei an erster Stelle die hepatische Kernfaktoren (Hnf1a/ b, Hnf4a, Hnf6) (69) zu nennen sind. Einer der wichtigsten ist Hnf4 α , der in der sich entwickelnden und regenerierenden Leber die Expression von Genen reguliert, zu denen diverse Transkriptionsfaktoren und verschiedene metabolische Faktoren gehören (191). Ein weiterer hepatischer „Kernfaktor“ ist Hnf6, der in der Entwicklung für die Differenzierung der Hepatoblasten mitverantwortlich ist (Abs. 2.5.1) und die Proliferation der Hepatozyten in der regenerierenden Leber durch die transkriptionelle Aktivierung von Zellzyklus regulierenden Genen stimuliert (192). Daneben sind weitere Transkriptionsfaktoren wie Hex und Foxa2 vermutlich ebenfalls in beiden Prozessen involviert (Abs. 2.4.1 und 2.3, 132, 193).

Ein wichtiger Prozess, der in der Entwicklung eine große Rolle spielt und vermutlich auch in der Regeneration der Leber, ist der epithelial-mesenchymale Übergang (EMT). Die EMT, ursprünglich von Embryologen beschrieben, beeinflusst die Bildung von Gewebeschichten aus einzelnen epithelialen Schichten während der Gastrulation (194). In der Entwicklung werden mesodermale

und entodermale Mesenchyme generiert, die in die MET übergehen und sekundäre Epithel bilden. Diese durchlaufen erneute Runden der EMT/MET und organisieren sich so zu den verschiedenen Geweben (194). Aber auch bei der Wundheilung bzw. Regeneration ist die EMT/MET von Bedeutung, da durch sie die epithelialen Zellen die Fähigkeit zum migrieren erlangen. In der Leber sind drei Typen von Zellen befähigt die EMT bzw. MET zu durchlaufen – Hepatozyten, Cholangiozyten und hepatische Sternzellen (194).

Der Prozess ist in mehreren Schritten unterteilt und, ein erstes Anzeichen ist die Auflösung der basalen Membran (204). Darauf folgend ist der Verlauf gekennzeichnet durch den Verlust von E-Cadherin, den Verlust von Markern der Polarität und einer Reorganisation des Zytoskeletts der epithelialen Zellen (196). Die daraus resultierende Umgestaltung des epithelialen zu einem fibroblasten ähnlichen mobilen Phänotyps erlaubt es den epithelialen Zellen zu migrieren (194). E-cadherin, dessen Herabregulierung einen der wichtigsten Schritte in der EMT markiert, ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität einiger embryonaler und adulter Gewebe. Weitere neben E-Cadherin herabregulierte Faktoren sind Occludin und Claudin1 (194). Für die Herabregulierung sind verschiedene Transkriptionsfaktoren wie E47, Twist1 oder Hmga2 verantwortlich, die das genetische Programm, welches die Expression epithelialer und mesenchymaler Gene reguliert, aktivieren. Die Aktivierung bewirkt eine Heraufregulierung von Tgf β , was nachfolgend zu einer Herabregulierung von E-Cadherin führt. Die Regulierung von Tgf β ist primär durch Snail und den Smad Proteine geregelt (194, 194). An dieser Stelle ist auch eine Rolle des Hgf/c-met Signalweges, welcher Snail reguliert, zu beobachten (205, 206).

Hierbei zeigt sich auch die Rolle der extrazellulären Matrix, in der viele Wachstumsfaktoren wie Hgf gebunden sind. Die Wachstumsfaktoren sind ebenfalls für die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden verantwortlich, wie z. Bsp. der Ras-Erk-MAPK Signalkaskade, und beeinflussen so die Proliferation und Differenzierung der Zellen (143, 145, 153, 154). Der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Proliferation und Differenzierung der Zellen ist sowohl in der Entwicklung als auch in der Regeneration der Leber von Bedeutung (103, 104, 86, 87, 191).

In der regenerierenden Leber ist der schnelle Abbau der extrazellulären Matrix wichtig, um die darin gebundenen Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle freizusetzen und einen schnellen Start der Regeneration zu gewährleisten (161, 162, 121). Dafür sind Matrix-Metalloproteinasen wichtige Faktoren, welche kurz nach Beginn der Regeneration aktiviert werden (136, 163, 166).

Der Metabolismus ist in den beiden Prozessen unterschiedlich. In der sich entwickelnden Leber ist das metabolische Wirkungsspektrum der Hepatoblasten nur sehr gering ausgeprägt und bezieht sich nur auf die Expression von einigen wenigen Genen wie Albumin. Erst kurz vor bzw. nach der Geburt werden die Proteine exprimiert, die für den Metabolismus der adulten Leber wichtig sind. In der regenerierenden Leber dagegen muss nach einer Verletzung der Metabolismus dem verbliebenen Gewebe angepasst werden, so dass trotz allem der Organismus weiter existieren kann.

Weiterhin sind in beiden Prozessen verschiedene Signalwege involviert. Für Signalkaskaden wie der Stat3 Signalkaskade, oder des Jnk/c-Jun Signalweges ist es bereits bekannt, dass sie in beiden Prozesse involviert sind (142, 144, 218, 197).

Für die in der Entwicklung des Embryos weiteren sehr bedeutenden Signalwege gehören Sonic Hedgehog und Wnt, über die bis jetzt nur wenige Daten in Bezug auf die regenerierende Leber vorliegen.

Der Sonic Hedgehog Signalweg ist in der Entwicklung für die Organisation der Organe, der Rechts-links-Symmetrie und für die korrekte Bildung von Gliedmaßenanlagen verantwortlich.

Der Sonic Hedgehog Signalweg wird aktiviert durch die Bindung des Hedgehog-Proteins an den Rezeptor Patched (Ptch). Die Bindung bewirkt die Weiterleitung eines membranständigen Proteins, Smoothed (Smo), in das Zellinnere und die Verhinderung der Degradation des regulatorischen Proteins Ci (Cubitus interruptus). Das Protein Ci wird nachfolgend nicht mehr abgebaut, diffundiert in den Zellkern und reguliert dort die Genexpression (198, 199). Bei verschiedenen Leberkrankheiten konnte eine Aktivierung des Signalweges nachgewiesen werden, wobei der Signalweg dabei scheinbar einen epithelialen mesenchymalen Übergang in den Zellen bewirkt (357, 358, 200). In der regenerierenden Leber zeigten Ochoa B. und Kollegen (359) dass durch die partielle Hepatektomie die Produktion der Liganden induziert und der Signalweg aktiviert wird.

Der Wnt Signalweg wird in der Zelle ähnlich wie der Shh Signalweg durch äußere Signale aktiviert. Der Signalweg ist nach seinem Liganden „Wnt“ benannt. „Wnt“ ist ein Signalprotein, das als lokaler Mediator eine wichtige Funktion in dieser grundlegenden Signalkaskade während der Entwicklung von Organen einnimmt. An der Signaltransduktion des Wnt Signalweges sind zahlreiche Proteine beteiligt. Nach derzeitigem Wissensstand bindet das Wnt Signalprotein an den Rezeptor Frizzled, welcher das Protein Dishevelled aktiviert. Dieses wirkt inhibierend auf einen Proteinkomplex (bestehend aus GSK-3 β , dem Tumor-suppressor Protein APC und Axin-1), der normalerweise β -Catenin abbaut. Durch die Unterdrückung der Degradation von β -Catenin sammelt sich dieses im Zytoplasma und im Zellkern an. Im Zellkern bildet das β -Catenin mit TCF einen Protein-Komplex und aktiviert so spezifische Zielgene (201). Bisherige Untersuchungen des Wnt Signalweges in der regenerierenden Leber zeigten, dass die Aktivierung von β -Catenin nach einer Verletzung der Leber erfolgt, die Regeneration der Leber unterstützt und Einfluss auf die Zell-Zelladhäsion während der strukturellen Reorganisation hat (202, 203). Die Zielgene des Wnt-Signalweges, zu denen unter anderen c-myc, c-jun, Cyclin2, uPAR, Bmp's und Fgf's, Sox Gene, Twist1, Pitx2 und E-Cadherin (<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>), sind sehr vielfältig. Anhand der Zielgene des Wnt-Signalweges wird sehr deutlich, wie weit auch die unterschiedlichen Signalwege und Prozesse mit einander verbunden sind.

II. ZIEL DER ARBEIT

Sowohl die Entwicklung als auch die Regeneration eines komplexen Organs wie der Leber unterliegt einer präzisen zeitlichen und lokalen Steuerung der Expression zahlreicher Gene.

Wir haben für die vorliegende Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass zahlreiche dieser Mechanismen und Steuerungsprozesse redundant ausgelegt sind. Wir sind daher der Frage nachgegangen, ob Gene, die in der embryonalen Leberentwicklung differentiell reguliert werden, auch einer Regulation in der Regeneration der adulten Leber unterliegen. In der Literatur sind bereits Daten über vereinzelte Signalkaskaden, wie z. Bsp. der Hgf/ c-met Signalkaskade, zu finden, die in beiden Prozessen involviert sind. Unterstützung findet diese Hypothese in diversen Analysen von Genexpressionsmustern von anderen Organen während der Regeneration und embryonalen Entwicklung (183, 207).

Globale mRNA - Microarrays ermöglichen die parallele Analyse tausender von Genen und die Identifizierung von Genclustern durch Vergleich von cDNA's unterschiedlicher Gewebe nach Anwendung bioinformatischer Algorithmen. Für die Analyse der Genexpression während der Entwicklung wurden drei bestimmte Zeitpunkte gewählt: Am Tag E 9.5p.c. ist die Leber erstmals makroskopisch sichtbar (12). Der Tag E 11.5 p.c. liegt einige Stunden vor den ersten sichtbaren Veränderungen der Hepatoblasten in Richtung einer polaren, polyglonalen Morphologie (ab ca. Tag E 12 p.c.) (14, 18). Ab Tag E 13.5 p.c. beginnt die Migration der hämatopoetischen Zellen in die Milz (22, 23, 24, 25).

Durch die Auswahl der Kriterien bei der Datenanalyse der Microarrays können verschiedene Datensets herausgearbeitet werden. Hier wurden Sets erstellt, deren Kriterium darin bestand, dass die Gene nur zu einem der ausgewählten Zeitpunkte stark exprimiert werden. Für die weitere Herausarbeitung von Genen, die in beiden Prozessen eine Rolle spielen, wurde damit begonnen, die Expression der Gene des gewonnenen Datensets in der regenerierenden Leber zu untersuchen. Hierfür wurde das Modell der partiellen Hepatektomie gewählt.

Gene, die in beiden Prozessen exprimiert werden, stellen Kandidatengene für weitere Untersuchungen dar. Hierfür wurde zunächst ein System etabliert, was einfach zu handhaben ist und einen Überblick nach der Herauf- oder Herabregulierung der Gene in einen hepatischen Kontext bietet.

 III. MATERIAL UND METHODEN

3.1. ALLGEMEINES

3.1.1. MATERIAL

So weit nicht anders vermerkt wurde das Verbrauchsmaterial von den Firmen Sarstedt oder Biozym bezogen. Glasartikel, wie Erlmeyerkolben oder Flaschen, wurden von der Firma Duran Schott erworben.

3.1.2. CHEMIKALIEN

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Carl Roth, Sigma Aldrich und AppliChem mit den Reinheitsgrad Ph.Eur. bestellt.

Zum Desinfizieren und Reinigen von Oberflächen wurde aus 96% vergälltem Ethanol eine 70%ige Lösung hergestellt und genutzt.

Wenn bei Lösungen oder Puffern keine Zusammensetzung in Klammern angegeben ist, wurden Fertiglösungen von den oben angegebenen Firmen gekauft. Selbst angefertigte Puffer, Lösungen und Nährmedien wurden für 15 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert oder sterilfiltriert.

3.1.3. GERÄTE

Gerät	Firma
Rührer	Ikamag
Waage	Satorius
Gefriertrockenanlage	Christ
Vortexer	Heidolph
Bakterienschüttler	Thermo Fisher Scientific
pH – Meter	inoLab
Pipetboy	Intergra Science
Wasserbad	Gfl
Mikroskop	Nikon
Pipetten	Gilson
Sterile Arbeitsbank/ Brutschränke	Hereaus
Absauggerät	Vacubrand
Netzgeräte	Biorad
System für Gelektrophorese	Biorad
iCycler/ PCR MASchine	Biorad
Netzgerät	Biorad
Geldoc – System	Biorad

Heizblock	Eppendorf
Zentrifuge	Eppendorf
Bioanalyser	Agilent
FACScalibur und LSRII	BD Bioscience
Pumpenmischer	Dräger
ElisaReader	Biotek
Lightcycler 480	Roche applied science
Photometer	Eppendorf
Autoklav	Melag

3.1.4. GRÖßENSTANDARDS

Bezeichnung	Anwendung	Bezugsquelle/ Referenz
DNA Marker O´Gene Ruler™ 1kb Plus	DNA – Größenstandard (75 – 20.000bp)	Fa. Fermentas
RNA Marker 6000	RNA - Größenstandard	Fa. Ambion

Tabelle 3.1 *Verwendete Standards zur Bestimmung der Größe von DNA und RNA in den jeweiligen Methoden*

3.1.5. VEKTOREN

Vektor	Verwendungszweck	Referenz/ Bezugsquelle
pMD2.G	Helferplasmid für die Produktion von Retroviren (<i>Envelope</i>)	(http://tronolab.epfl.ch) Vektorkarte Abb. 3.1; S.37
psPAX2	Helferplasmid für die Produktion von Retroviren (Strukturproteine und reverse Transkriptase)	(http://tronolab.epfl.ch) Vektorkarte Abb. 3.2; S. 38
pCR [®] 4 - TOPO [®]	Prokaryotischer Expressionsvektor: Matrize zur Amplifizierung der Zielgenen	Invitrogen (Karlsruhe) Vektorkarte Abb. 3.3; S.38
pSffv-IRES-eGfp	Vektor für die Produktion von Lentiviren (Zielgenvektor)	Freundlicherweise von Dr. Axel Schambach zur Verfügung gestellt, mod. Vektorkarte Abb. 4.2.4; S.121

3.1.5.1. Vektor pMD2.G

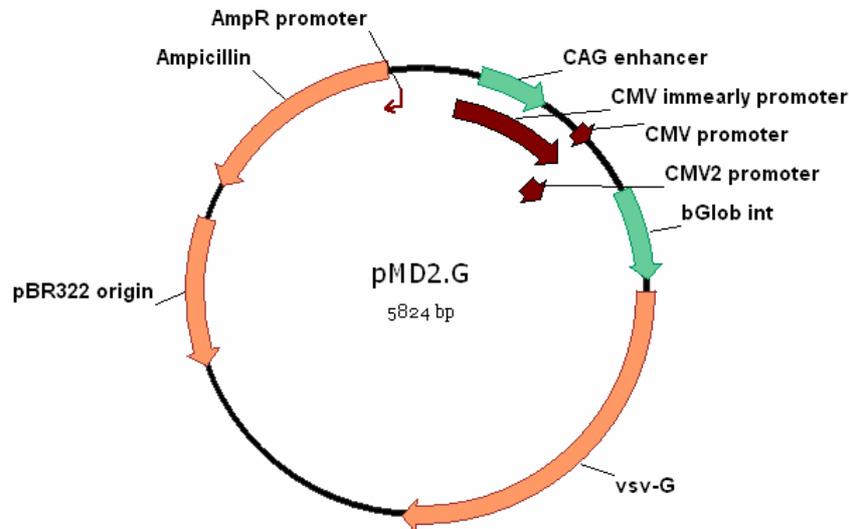


Abbildung 3.1 Vektorkarte des lentiviralen Helferplasmids pMD2.G

ampR: Ampicillin-Resistenz Gen; *bp*: basenpaare; *vsv-G*: vaskuläres Stomatitis Virus Glycoprotein; *CAG*: chicken β actin; *CMV*: humanes Cytomegalievirus

3.1.5.2. Vektor psPAX2

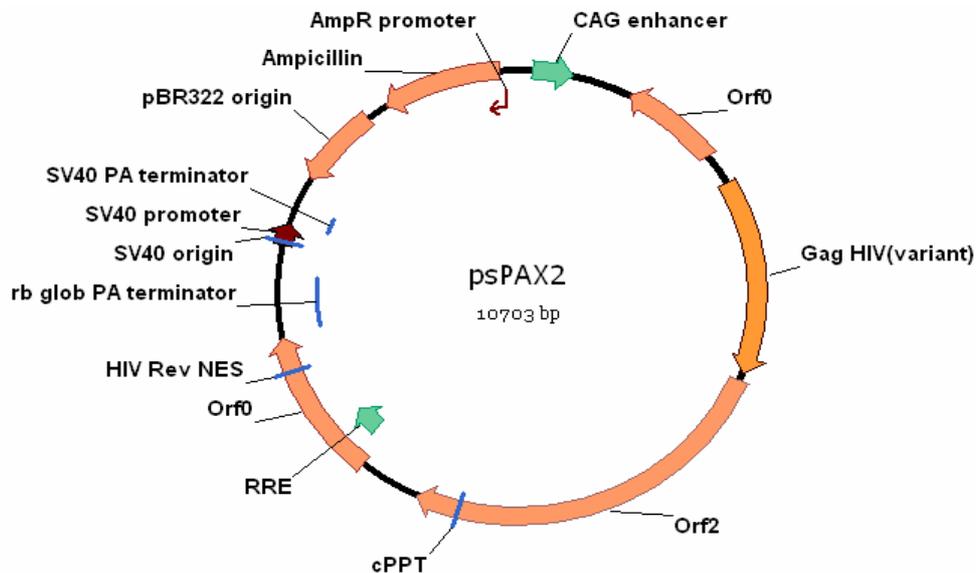
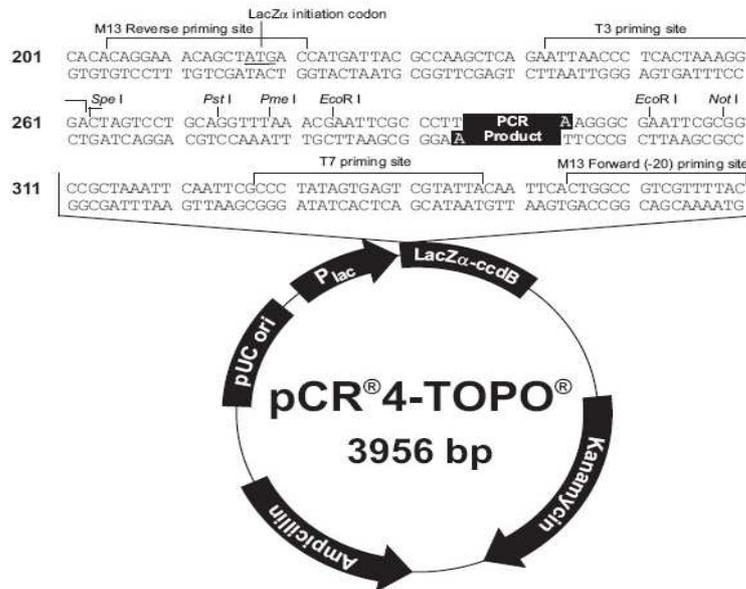


Abbildung 3.2 Vektorkarte des lentiviralen Helferplasmids psPAX2

Orf: Open reading frame (offenes Leseraster); *cPPT*: Polypurin Tract; *RRE*: rev-responsive element; *HIV rev NES*: nukleäres Export Signal des HIV Rev Proteins; *SV 40 ori/ promoter/ terminator*: origin of replication des Simian Virus 40/ Promoter und Terminator; *ampR*: Ampicillin-Resistenz; *CAG*: chicken β actin enhancer; *Gag*: gruppenspezifische Antigene; *bp* basenpaare.

3.1.5.3. Vektor pCR[®]4 - TOPO[®]Abbildung 3.3: pCR[®]4-TOPO[®]

Vektor von der Fa. Invitrogen zum Sequenzieren der Gene pUC ori = pUC origin of replication des pUC; P_{lac} = Sequenz des lac Promoters; LacZ α -ccdB = DNA-Gyrase-Inhibitor mit fusioniert LacZ α -Fragment; M13 Reverse priming site, T3 priming site, T7 priming site und M13 Forward (-20) priming site = Sequenzen für Primer zum Sequenzieren; SpeI, PstI, PmeI, EcoRI und NotI = Restriktionsenzyme; bp = basenpaare

3.1.6. PRIMER

Die Primer wurden bei den Firmen Operon und Sigma Aldrich bestellt. Für einige Gene wurde zu Beginn der Arbeit TaqMan - Sonden für die qPCR verwendet. Diese sind am 5' Ende mit FAM und am 3' Ende mit TAMRA markiert.

Als Referenzgene wurden Gapdh und β -Actin verwendet, da beide Gene konstant in der Zelle exprimiert wurden. Sie wurden in den durchgeführten qPCRs als Kontrolle der geladenen cDNA-Mengen parallel amplifiziert.

Für die Klonierung der Gene wurden Schnittstellen an das 5' Ende des Primers angefügt.

3.1.6.1. Primer für Referenzgene

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Gapdh_For	qPCR	CCTGCACCACCAACTGCTTA
Gapdh_Rev	qPCR	TCATGAGCCCTTCCACAAT
Gapdh_Sonde	qPCR	CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAA
β -Actin_For	qPCR	AGCCATGTACGTAGCCATCC
β -Actin_Rev	qPCR	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

3.1.6.2. Primer für Abs. 4.1.2.

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Cyclina2_for	qPCR	GAGAATGTCAACCCCGAAAA
Cyclina2_rev	qPCR	CTTGCTGCGGGTAAAGAGAC
Wee1_for	qPCR	TGTGAGGAAGAGGAGGAGGA
Wee1_rev	qPCR	CAGAAAGTAGGCGGTCTGAAG
Hgf_for	qPCR	GGGATTCGCAGTACCCTCAC
Hgf_rev	qPCR	ATGGTGATTTCAGCCCCATCT
Hgf_Sonde	qPCR	TCCCGACAACCTTCAAATGCAAGGA

3.1.6.3. Primer für Abs. 4.1.3.1.

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Basonuclin1_for	qPCR	ATGAAGACGCATGAGAAGAA
Basonuclin1_rev	qPCR	AGGTTCGAGCTGTGTCTGTC
Cyclind2_for	qPCR	TCCAAACATGGTTCATTGTA
Cyclind2_rev	qPCR	GCTAATCAGCACCAAAGTT
AnkyrinD1_For	qPCR	GGTGAATGGTGTCTAATTGC
AnkyrinD1_Rev	qPCR	CGACATCATGTGATCTGGTA
AnkyrinD1_Sonde	qPCR	CACTTGCATAAAGCTATTCAAGGTACTTTT
Mest_For	qPCR	CCCTTGCTAAGAAGAAAACC
Mest_Rev	qPCR	GCCCCTAGGCTGTTATTTAC

3.1.6.4. Primer für Abs. 4.1.3.2.

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Pitx2_for	qPCR	AGCTGTGCAAGAATGGCTTT
Pitx2_rev	qPCR	TGAGAGGACAGGGGATTGAC
Zic1_for	qPCR	CAACAAAACCTTTCAGCACCA
Zic1_rev	qPCR	CCTTTTGTGGATCTTGAGGT
Twist1_for	qPCR	GTCCAGCTC GCCAGTCTCT
Twist1_rev	qPCR	CATCTTGGAGTCCAGCTCGT
Sox11_for	qPCR	CCAGGACATAACGTACCAAC
Sox11_rev	qPCR	GTACAGTGAAAAGGGAACAA
Nr2f1_for	qPCR	AAAGCCTGCAGGAGAAATCA
Nr2f1_rev	qPCR	GCTCGATGACAGAGGAGGAC
Gtf2h1_for	qPCR	GTATGTGGCTGTTGGGGAAC
Gtf2h1_rev	qPCR	CTTTTCTTGGAAATGGGCAGA
Hmga2_for	qPCR	AAGGCAGCAAAAACAAGAGC
Hmga2_rev	qPCR	GCAGGCTTCTTCTGAACGAC
Meox1_for	qPCR	CCCACCACAACCTACCTGACC

Meox1_rev	qPCR	CCCTTCACACGTTTCCACTT
Shox2_for	qPCR	GAGGTGTCCCCTGAACTGAA
Shox2_rev	qPCR	CAGCTCGTTGAGTTGTTCCA
Gli1_for	qPCR	TGTTGTGGGAGGGAAGAAAC
Gli1_rev	qPCR	TGGCAGGGCTCTGACTAACT
Foxd1_for	qPCR	CTACTCGTACATCGCGCTCA
Foxd1_rev	qPCR	CTCCCGGTAGTAAGGGAAGC
Hoxa1_for	qPCR	GCCCTGGCCACGTATAATAA
Hoxa1_rev	qPCR	TCCAACTTTCCCTGTTTTGG
Hoxd4_for	qPCR	CACCCTGTGTCTGTCTGAGC
Hoxd4_rev	qPCR	AAGGTCGTCAGGTCCGTATG

3.1.6.5. Primer für Abs. 4.1.3.3.

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Gap43_For	qPCR	GAAGTTTCCTCTCCTGTCCT
Gap43_Rev	qPCR	ATTACCAAAAACCTCGCCATA
Gap43_Sonde	qPCR	AACAGTGTGGCTTAAACATTTGTTTCTT
Midkine_for	qPCR	CCCTGCAACTGGAAGAAG
Midkine_rev	qPCR	CCTTTCCTTTTTCCTTTCTTG
Igfbp5_For	qPCR	GACTCCTTCAGATTCCGAGA
Igfbp5_Rev	qPCR	AGAGGACAGAGCTACGGTGT
Igfbp5_Sonde	qPCR	CTACCGGTTGTTTTTGGTTTTTGTGTTTTGTT
Necdin_for	qPCR	CTCATGTGGTACGTGTTGGT
Necdin_rev	qPCR	CAGAGGAGCTAGACAGGGTG

3.1.6.6. Primer für Abs. 4.1.3.4.

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Crabp1_for	qPCR	CTTCGAGGAGGAGACAGTGG
Crabp1_rev	qPCR	CAGCTCTCGGGTCCAGTAAG
Crabp2_For	qPCR	TTGAGGAAATGCTAAAAGC
Crabp2_Rev	qPCR	ACACCATTTTGTTCCTACTC

3.1.6.7. Primer für Abs. 4.1.3.5

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Emid2_for	qPCR	GGCAGAGAGGGTCCTTATCC
Emid2_rev	qPCR	GACCTCCTCGCTTCATCTTG
Punc_for	qPCR	CCCTCAGTGAAGGACAGAC
Punc_rev	qPCR	GGAGATGCCTTGCTTGTA

TenascinC_for	qPCR	CGAGAGAGTGGGCTAAACAT
TenascinC_rev	qPCR	CCCATCCACTGTATGTTTCCT

3.1.6.8. Primer für Abs. 4.1.3.6.

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
H1fx_for	qPCR	ATCTACGCTGAGGCCAGGA
H1fx_rev	qPCR	TCACCTGCAGTAGCGTATCG
Sh3bgr_for	qPCR	GGACATAGCTGGGGATGAAG
Sh3bgr_rev	qPCR	TCTTTTGCCGAGAAGAAGGA
Hsd11b2_for	qPCR	GCGTGACCTCTGTTCTCCTC
Hsd11b2_rev	qPCR	GATATTGAGGCCAGCGTTGT

3.1.6.9. Primer für Abs. 4.1.3.7.

a) Primer für Abs. 4.1.3.7.1

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Myl2_for	qPCR	CGTGTTTCCTCACGATGTTTG
Myl2_rev	qPCR	CCTCTCTGCTTGTGTGGTCA
Myl3_for	qPCR	AATCCTACCCAGGCAGAGGT
Myl3_rev	qPCR	TGCCAGTGTCCCTTGTTCCTTG
Myl4_for	qPCR	CCCAAGCCTGAAGAGATGAG
Myl4_rev	qPCR	ACTGTGCCGTTGCTTTCTTT
Myl7_for	qPCR	AGCTCGGGAGGGTAAGTGTT
Myl7_rev	qPCR	TTCTCCCCGAAGAGTGTGAG
Myh6_for	qPCR	GGCACAGAAGATGCTGACAA
Myh6_rev	qPCR	CTGCCCTTGGTGACATACT
Myh7_for	qPCR	CGCCTATGAGGAGTCTCTGG
Myh7_rev	qPCR	TCGGATCTTCTCCAGCTCAT

b) Primer für Abs. 4.1.3.7.2.

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Acta2_for	qPCR	TGTGCTGGACTCTGGAGATG
Acta2_rev	qPCR	GAAGGAATAGCCACGCTCAG
Actc1_for	qPCR	TCTCTTCCAGCCCTCTTTCA
Actc1_rev	qPCR	ATGGTGGTGCCCTCCAGATAG

c) Primer für Abs. 4.1.3.7.3.

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
TroponinT2_for	qPCR	AGGCTCTGTCCAACATGA
TroponinT2_rev	qPCR	TCCTTGGCCTTCTCTCTC
Tnni1_for	qPCR	TCTCAGTGCCCTTCAGGACT
Tnni1_rev	qPCR	CCTTCAGCTTCAGGTCCTTG
Mybpc3_for	qPCR	CAAAGAAGTCCCTGCTCCAG
Mybpc3_rev	qPCR	CTGTGGTCGCATCAGAAAGA

3.1.6.10. Primer für Klonierung/ Sequenzierung

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Mdk for EcoRI	Klonierung	GCGCGAATTCAGACAAGATGCAGCACCGAG
Mdk rev BgIII	Klonierung	GCGCAGATCTTTAGTCCTTTTCTTTTCC
CyclinD2_for_BgIII	Klonierung	GCAGATCTGGCTATGGAGCTGCTGTG
CyclinD2_rev_BgIII	Klonierung	GCAGATCTCACAGGTCAACATCCCGCA
Pitx2_For_BamHI (Isoform a und b)	Klonierung	GCGGATCCGGGAATGGAGACCAATTG
Pitx2_Rev_BgIII (Isoform a und b)	Klonierung	GCAGATCTTACACCCGGCCGGTCTGACTG
M13_For	Sequenzierung	GTAAAACGACGGCCAG
M13_Rev	Sequenzierung	CAGGAAACAGCTATGAC
5'für lentiviralen Vektor	Sequenzierung	AGGTTTAAACTACGGGATCC
3'für lentiviralen Vektor	Sequenzierung	GCTTCGGCCAGTAACGTTAG

3.1.6.11. Primer des hepatischen Panels (HP - Set)

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' -> 3'
Actinβ_for	qPCR	AGCCATGTACGTAGCCATCC
Actinβ_rev	qPCR	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA
Albumin_for	qPCR	CTCAGGTGTCAACCCCAA
Albumin_rev	qPCR	TCCACACAAGGCAGTCTC
Afp_for	qPCR	CACTCTCCTCGTGGATGTGA
Afp_rev	qPCR	ACCTCCAGGCAACAACCA
Apoa1_for	qPCR	GTGGCTCTGGTCTTTCCTGAC
Apoa1_rev	qPCR	ACGGTTGAACCCAGAGTGTC
Apoa4_for	qPCR	GCATCTAGCCCAGGAAACTG
Apoa4_rev	qPCR	ATGTATGGGGTCAGCTGGAG
Apob_for	qPCR	GCGAAATGACTGGTGAGCA
Apob_rev	qPCR	ACGGGGACTCAGAAACAATG
Apoc3_for	qPCR	ACATGGAACAAGCCTCCAAG

Apoc3_rev	qPCR	TGGTTGGTCCTCAGGGTTAG
Foxm1b_for	qPCR	AGCGTTAAGCAGGAACTGGA
Foxm1b_rev	qPCR	GGAAGTGGTCCTCAATCCAA
Aat_for	qPCR	AGGTTAGCCCAGATCCACT
Aat_for	qPCR	ATTGTTGAAGATTCGGGTGA
Cps1_for	qPCR	GATCGCTCCATCTTCTCAGC
Cps1_rev	qPCR	AGGGGTAGCCCACAGAGTTT
Fah_for	qPCR	AATGGATGCAACCTGAGACC
Fah_rev	qPCR	CCCTGGCAGTGACCTGTTAT
G6pc_for	qPCR	TCTGTCCCGGATCTACCTTG
G6pc_rev	qPCR	GTAGAATCCAAGCGCGAAAC
Gys2_for	qPCR	AGCTGAATGCACAGTGATGG
Gys2_rev	qPCR	GCAAGAATCGTCTGGAGAGC
Tat_for	qPCR	ATGGTGGGAATTGAGATGGA
Tat_rev	qPCR	TGCCTTCAGCACAGTGGTAG
Tdo_for	qPCR	AGGGAACAAAATCCATGACG
Tdo_rev	qPCR	TTCCAGAACCGAGAACTGCT
Ttr_for	qPCR	TTCGACTCTTCCTCCTTTGC
Ttr_rev	qPCR	GCATCCAGGACTTTGACCAT
Ugt1a_for	qPCR	ACACCGGAACTAGACCATCG
Ugt1a_rev	qPCR	ATACCATGGGAGCCAGAGTG
Cyp2a5_for	qPCR	GACCGAATGAAGATGCCCTA
Cyp2a5_rev	qPCR	CGAAACTTGGTGTCCTTGGT
Cyp3a11_for	qPCR	CAGCTTGGTGCTCCTCTACC
Cyp3a11_rev	qPCR	TCAAACAACCCCCATGTTTT
Cyp7a1_for	qPCR	GAGCCCTGAAGCAATGAAAG
Cyp7a1_rev	qPCR	GCTGTCCGGATATTCAAGGA
Foxa1_for	qPCR	TTGAGAGTATTGAAAGGCAGTGCT
Foxa1_for	qPCR	AATGCATCCAGAATGTAAGGTGAA
Foxa2_for	qPCR	GTCCATTTTGTGGGGCTGAT
Foxa2_rev	qPCR	CACCATTACGCCTTCAACCA
C/ebpa_for	qPCR	AAGAAGTCGGTGGACAAGAACAG
C/ebpa_rev	qPCR	GTTGCGTTGTTTGGCTTTATCTC
C/ebp β _for	qPCR	ACAAAACCAAAAACATCAACAACC
C/ebp β _rev	qPCR	GGACTACGCAACACACGTGTAACT
Hnf1a_for	qPCR	AGGGCACACCCATGAAGAC
Hnf1a_rev	qPCR	TGCCCTGCGTGGGTGAAT
Hnf1b_for	qPCR	ACAATCCCCAGCAATCTCAG
Hnf1b_rev	qPCR	AGAGAACTGGACGGGCTGTA
Hnf4a_for	qPCR	TGCCAACCTCAATTCATCCA
Hnf4a_rev	qPCR	GCTCGAGGCTCCGTAGTGT

Onecut1_for	qPCR	GAAAATAAGCGTCCGTCCAAG
Onecut1_rev	qPCR	CTGGCATTTCATGAAGAAGTTGC
Gata4_for	qPCR	GCAGCAGCAGTGAAGAGATG
Gata4_rev	qPCR	GCGATGTCTGAGTGACAGGA
Gata6_for	qPCR	TGTTACCGGAGCAAGCTTTT
Gata6_rev	qPCR	GCCAACTGTACACCACAAC
Cdh1_for	qPCR	ACTGTGAAGGGACGGTCAAC
Cdh1_rev	qPCR	TGTCCCGGGTATCATCATCT
Cdh2_for	qPCR	CCCCTCAGGTGTTACCTCAA
Cdh2_rev	qPCR	CGGTTGATGGTCCAGTTTCT
Krt8_for	qPCR	ATCGAGATCACCACCTACCG
Krt8_rev	qPCR	TGAAGCCAGGGCTAGTGAGT
Krt18_for	qPCR	CGAGGCACTCAAGGAAGAAC
Krt18_rev	qPCR	CTTGGTGGTGACAACTGTGG
Krt7_for	qPCR	CTCCCTGGACTTGGATGGTA
Krt7_rev	qPCR	ACGCTGGTTCTTCAAGGTGT
Krt19_for	qPCR	CTCGGATTGAGGAGCTGAAC
Krt19_rev	qPCR	TCACGCTCTGGATCTGTGAC
Epcam_for	qPCR	GATCATCGCTGTCATTGTGG
Epcam_rev	qPCR	CACGGCTAGGCATTAAGCTC
Gjb1_for	qPCR	GTCCCTGCAGCTTATCTTGG
Gjb1_rev	qPCR	CGGAACACCACACTGATGAC
Cldn1_for	qPCR	CGTGGTGTGGGTAAGAGGT
Cldn1_rev	qPCR	AGGTCTGGCGACATTAGTGG
Ocln_for	qPCR	CCTCCAATGGCAAAGTGAAT
Ocln_rev	qPCR	CTCCCCACCTGTTCGTGTAGT
Tbx3_for	qPCR	TTGCAAAGGGTTTTTCGAGAC
Tbx3_rev	qPCR	ATGGAGACAGCAGGAGAGGA
Hex_for	qPCR	CAAGACTTGCCCAGTGAACA
Hex_rev	qPCR	TAGCCTTTATCCCCCTCGAT
Sox17_for	qPCR	CTCGGGGATGTAAAGGTGAA
Sox17_rev	qPCR	CTTAGCTCTGCGTTGTGCAG

3.1.7. SOFTWARE

Klonierung, Sequenzanalysen:
 RNA und DNA Messung/ Auswertung:
 Auswertung der Agarosegele:
 Auswertung der FACS – Daten:
 Erstellen von Primer:
 Sigma Plot und Microsoft Office

Vector NTI Version 10 (Fa. Invitrogen)
 2100 expert software (Fa. Agilent)
 Quantitiy one Version 4.0.1 (Fa. Biorad)
 FlowJo und CellQuest (Fa. BDIS)
 Primer 3 (v. 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/>)

3.2. TIEREXPERIMENTELLE VERSUCHE

3.2.1. ALLGEMEINES

Alle Versuche erfolgten an sechs bis acht Wochen alten Balb/C Mäusen unter Einhaltung der tierschutzrechtlichen Bedingungen. Bis zur Durchführung der Experimente wurden die Versuchstiere unter standardisierten Bedingungen im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten. In klimatisierten Räumen wurde stets eine Temperatur von 20-24°C, eine Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus eingehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen in Gruppen von bis zu 5 Tieren, nach Elterntieren und Geschlecht getrennt. Futter (Fa. Altromin) und Trinkwasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

3.2.2. PROTOKOLL DER HEPATOZYTENISOLATION

Alle für die Versuche notwendigen primären murinen Hepatozyten wurden freundlicherweise von Dr. oec. troph. Marcus Iken durch Leberperfusion nach Berry und Friend (210) isoliert.

Das Herauslösen der Leberzellen erfolgte durch eine retrograde Perfusion des Organs mit Collagenase NB4 (Fa. Serva) aus dem Lebergewebe. Die während der Isolation verwendeten Perfusionslösungen und Medien wurden auf 37°C vorgewärmt und über eine Rollenpumpe appliziert. Alle Schritte der Isolation fanden unter sterilen Arbeitsbedingungen statt. Verwendete Lösungen, Instrumente und Behälter wurden vorab autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Der Transport und eine kurzfristige Lagerung der Zellen erfolgten auf Eis.

In Abhängigkeit des Körpergewichtes wurden die Mäuse mit einem Rompun/ Ketamin Gemisch (Rompun/ Ketamin – Gemisch: 0,05ml 2% Xylazin (Rompun, Fa. Bayer Vital GmbH), 0,2ml Ketanest (Ketamin, Fa. Parker Davis GmbH), 2,2ml NaCl; Dosis: 10µl/g KG) *intraperitoneal* narkotisiert. Nach der Kontrolle der Narkose wurde der Maus das Abdomen geöffnet und stumpf die *Vena cava inferior* präpariert (Operationsbesteck (Fa. Aesculap)). Für die retrograde Perfusion der Leber *in situ* wurde in die *Vena cava inferior* ein Venenverweilkatheter (24G, Fa. BBraun) eingeführt. Oberhalb der Leber wurde die *Vena cava inferior* abgeklemmt und die *Vena portae* knapp unter der Leber eröffnet. Das Leberperfusionsmedium (Fa. Invitrogen) wurde 12,5 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 8ml/min appliziert, bis die Leber möglichst vollständig blutleer ist. Im Anschluss wurde die Leber für 5-10 Minuten mit „Liver Digest“ Medium (Fa. Invitrogen, mit 400 - 480 mg/L Collagenase NB4 versetzt (Menge ist abhängig von der Lot-Charge.)) perfundiert. Die Perfusion wurde gestoppt sobald die Hepatozyten sich auf leichten Druck mit der Pinzette aus dem Zellverband lösten. Nach Entfernung der Gallenblase wurde die Leber entnommen und in einem Glasgefäß, in dem bereits 50 ml William's E Medium (Fa. Pan Biotech) vorgelegt waren, mit einer Pinzette zerrissen und die Leberzellen ausgeschüttelt. Die Leberkapselreste wurden entfernt und die Zellsuspension durch einen 70µm Nylonfilter filtriert. Die Zellsuspension wurde auf 50 ml Röhrchen aufgeteilt und bei 4°C bei 50 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet erneut in 50ml Williams E resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet in ~20 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Vitalität und die Zellausbeute wurden mit der Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung ermittelt.

3.2.3. PROTOKOLL DER PARTIELLEN HEPATEKTOMIE

Alle partiellen Hepatektomien wurden freundlicherweise von Herrn Qinggong Yuan durchgeführt.

Die Methode der partiellen Hepatektomie wurde 1931 von Higgins und Anderson (111) eingeführt und wird so seitdem ohne große Änderungen durchgeführt.

Die Mäuse wurden in den Morgenstunden zwischen 8:00 und 11:00 unter keimarmen Bedingungen gemäß dem Protokoll von Higgins und Anderson operiert. Vor dem Eingriff erfolgte bei jedem Tier eine Allgemeinnarkose, die durch intraperitoneale Injektion von 10 µl/g Mäusekörpergewicht eines Anaesthetikagemisches (Abs. 3.2.2.) vollzogen wurde. Nach erfolgreicher Narkose wurde die Bauchseite rasiert und der Operationsbereich desinfiziert. Mit einem medianen Schnitt entlang der *Linea alba* wurde die Bauchhöhle geöffnet und die Leber freigelegt. Es erfolgte bei jeder Maus eine 70% Hepatektomie. Dafür wurde der linkslaterale, linksmediane und der rechtsmediane Lappen separat mit einer Ligatur entfernt. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Verhinderung einer Verletzung der Pfortader, der Gallenblase und der ableitenden Gallenwege gewidmet. Anschließend wurde die Bauchhöhle und die Haut mit einer medizinischen Naht verschlossen. Das entnommene Gewebe wurde in den sich anschließenden Versuchen als Kontrollansatz (0 Std.) genutzt. Nach der Operation wurden die Tiere in Einzelkäfige mit Einstreu gegeben, ihnen stand Trinkwasser und 20 %ige Dextroselösung zur freien Verfügung. Bis zum Aufwachen der Tiere aus der Narkose wurde ihnen Wärme mittels einer Rotlichtlampe gespendet und sie standen unter besonderer Beobachtung. Nach Erholung von der Allgemeinnarkose zeigte jede Maus wieder normale Aktivität. Tiere, bei denen die Regeneration des Gewebes über mehrere Tage beobachtet wurde, erhielten nach 24 Std. wieder ihr normales Trockenfutter *ad libitum*. Nach Ablauf der spezifischen Zeitpunkten (2 - 48 Stunden) wurden die Tiere betäubt, die Bauchhöhle geöffnet und das Lebergewebe entnommen. Durch das Durchtrennen der *Vena cava* wurden die Tiere getötet. Das entnommene Gewebe wurde für die späteren Analysen -80°C gelagert.

Material: Operationsbesteck (Fa. Aeskulap), Faden (Fa. Ethicon; Ethibond® Excel geflochten, beschichtet, nicht resorbierbar; 6/0metric 0,7) sterile Gaze (Fa. Beese; Sterilkompresse®) Kanüle (Fa. Sterican®; Gr.17 24Gx25mm; 0,4x12mm)

3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN

3.3.1. ISOLIERUNG DER RNA

3.3.1.1. Isolierung der RNA aus Gewebe

Die Isolierung erfolgte entsprechend der Anleitung des RNeasy Mini Kits der Fa. Qiagen.

Das Gewebe (10-30 mg) wurde mit einem Skalpell auf Eis in kleine Teile geschnitten und in RLT Puffer (Fa. Qiagen) gegeben. Durch mehrmaliges Herauf- und Herunterpipettieren mit der 1000µl Pipette (Fa. Gilson) und mit Hilfe des Qiasredder (Fa. Qiagen) wurde das Gewebe weiter mechanisch zerstört. Bei härterem Gewebe wurde das Gewebe mittels eines Mörsers mechanisch zerstört. Der in den Proben befindliche RLT Puffer lysiert die Zellen zusätzlich. Nach Zugabe von 70% Ethanol zum Lysat, wurde dieses auf eine Säule des RNeasy Mini Kit gegeben

und für eine Minute bei 10.000g zentrifugiert. Die Säule wurde sowohl mit RW1 als auch mit dem RP Puffer gewaschen. Nach dem Entfernen möglicher Ethanolreste durch Zentrifugieren erfolgte die Eluierung der RNA aus der Säule mit Wasser. Die Lagerung, bis zur weiteren Verarbeitung, erfolgte bei -80°C.

3.3.1.2. *Isolierung der RNA aus Zellkultur*

Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit PBS (Fa. Invitrogen) gewaschen und durch die Zugabe des RLT Puffers (Fa. Qiagen) lysiert. Das Lysat wurde mit 70% Ethanol versetzt, mit einer Spritze (1ml, Kanüle 24G, BBraun) homogenisiert und auf eine Säule des RNeasy Mini Kits (Fa. Qiagen) gegeben. Die weitere Probenverarbeitung erfolgte wie oben (Abs. 3.3.1.1.) beschrieben.

3.3.2. HERSTELLUNG DER CDNA

3.3.2.1. *DNase I Verdau*

Vor der Umschreibung der RNA erfolgte die Degradation der genomischen DNA mit einer DNase, um die Messung von genomischer DNA bei der qPCR zu vermeiden.

Für den Abbau der genomische DNA wurden 250ng – 5µg Gesamt RNA mit DNase I gemäß dem Protokoll der Fa. Fermentas behandelt. Die Vorbereitungen fanden auf Eis statt. Die gewünschte Menge Gesamt RNA (max. 7µl) wurden mit 1µl 10x Reaktionspuffer, 1µl RNasin (Fa. Promega), 1µl DNase I (RNase-free) versetzt. Wenn weniger als 7µl Gesamt RNA verwendet wurden, wurde der Ansatz mit RNase freiem Wasser auf 10µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Der Verdau erfolgte für 30 Minuten bei 37°C. Durch die Zugabe von 1µl 25mM EDTA und das Erwärmen des Ansatzes bei 65°C für 10 Minuten wurde die DNase inaktiviert.

3.3.2.2. *cDNA Synthese*

Die Umschreibung der Gesamt RNA aus Zellkulturproben erfolgte mit der iScript (Fa. Biorad) gemäß dem Protokoll der Fa. Biorad. In einem Ansatz kann bis zu 1µg Gesamt RNA umgeschrieben werden. Als Primer wurden Hexamere und Oligo(dT) verwendet, die sich bereits im 5x Reaktionsmix des Kits befinden.

Für die Umschreibung der Gesamt RNA aus Lebergewebe wurde die SuperScript III Reverse Transkriptase (Fa. Invitrogen) genutzt, da bei dieser reversen Transkriptase bis zu 5µg Gesamt RNA eingesetzt und cDNA Fragmente bis 12,3kbp erstellen werden können. Das Protokoll wurde entsprechend den Angaben der Fa. Invitrogen durchgeführt. Als Primer wurden Oligo(dT) verwendet, die mit einem Großteil der isolierten mRNAs über deren 3'Poly-A Schwanz zu hybridisieren können.

3.3.3. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

3.3.3.1. *Konventionelle PCR*

Für z. Bsp. das Testen von neuen Primern wurde die Taq Polymerase der Firma Qiagen genutzt. Zum Amplifizieren der Fragmente wurde folgender Ansatz verwendet.

Beispiel für PCR - Mix: (Fa. Qiagen)	32,75µl Wasser (Bidest)	
	5,00µl 10x Puffer	
	10,00µl Q – Lösung	
	1,00µl dNTP's (10mM, Fa. Abgene)	
	1,00µl je 5' und 3' Primer (10pmol)	
	0,20µl Polymerase (5U/µl)	
	1,00µl cDNA (1:10 verdünnt)	
	50,00µl	
PCR – Programm:	1.	94°C 10min (Initiale Denaturierung)
	2.	94°C 30sek (Denaturierung)
	3.	56°C 30sek (Annealing)
	4.	72°C 30sek (Elongation)
		Schritt 2 bis 4: 35x wiederholen
	5.	72°C 10min
	6.	4°C unbegrenzt

Die Pfu Polymerase (Fa. Promega), welche eine Korrekturlesefunktion besitzt, wurde zum Amplifizieren von Gene genutzt, die später überexprimiert werden sollen. Der Ansatz wurde entsprechend dem Protokoll der Firma Promega hergestellt. Die Konzentration der Primer (Abs. 3.1.6.9) und die Nucleotide (Fa. Abgene) wurden wie oben angegeben eingesetzt.

Die Elongationszeit zur Amplifizierung der Fragmente richtet sich nach der Länge der zu synthetisierenden DNA. Die Pfu Polymerase hat eine Synthesegeschwindigkeit von 500bp pro Minute, während die Taq Polymerase eine Synthesegeschwindigkeit mind. 2000bp/Minute besitzt.

3.3.3.2. Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Die quantitative PCR dient sowohl zum Nachweis als auch zum Quantifizieren spezifischer mRNAs. Die Methode basiert auf der Veränderung in der Fluoreszenz die proportional mit der Anzahl der PCR Fragmente ansteigt. Während der PCR Zyklen wird die Fluoreszenz gemessen und auf einen Amplifizierungsplot dargestellt, was die Beobachtung der PCR Reaktion über den ganzen Zeitraum erlaubt.

In dieser Arbeit wurden TaqMan Sonden und der fluoreszierende Farbstoff SYBRGreen zur Quantifizierung verwendet. Die Methode der TaqMan Sonde ist sehr spezifisch, da die Sequenz der Sonde zwischen den Primern und somit im Gen liegen muss. Die TaqMan Sonden weisen an einen Ende ein Fluorophor (FAM) und am anderen Ende einen Quencher (TAMRA) auf und binden wie der 5' und 3' Primer in der Annealingphase an die cDNA. Wenn die Taq Polymerase den Primer anhand der Matrize verlängert und auf die Sonde trifft wird diese durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Das durch den Quencher inhibierte Fluorophor wird freigesetzt und die dadurch auftretende Fluoreszenz kann gemessen.

SYBRGreen dagegen interkaliert unspezifisch mit doppelsträngiger DNA, die während der Reaktion amplifiziert wurde. Um unspezifische Produkte zu vermeiden ist die Eliminierung der genomischen DNA vor der cDNA Synthese sehr wichtig. In einer anschließenden Schmelzkurve kann anhand der erhöhten Werte untersucht werden, ob sich in dem Ansatz ein oder mehrere Fragment befinden. Der Temperaturpunkt, an dem die DNA in einer Schmelzkurve denaturiert

wird, ist charakterisiert durch Freisetzung des SYBRGreen. Verschieden lange DNA Produkte ergeben verschiedene Schmelzpunkte und können als erhöhte Werte in einen Graphen dargestellt werden. Eine Sequenzierung ermöglicht die Prüfung des PCR Fragment zusätzlich. Durch die Wahl der Primer und Optimierung der PCR ist diese Methode auch für die Quantifizierung anwendbar und spezifisch.

Die Quantifizierung der mRNA Expression der verschiedenen Gene erfolgte über eine Standardkurve, welche meist aus genomischer DNA (Fa. Promega) erstellt wurde. Bei einigen Genen wurde cDNA's von Geweben verwendet, in denen die Gene stark exprimiert werden. Die Bestimmung der Konzentration der cDNA erfolgte mit dem Fotometer (Fa. Eppendorf) nach der Aufreinigung der cDNA mit dem QIAquick PCR Kit (Fa. Qiagen) entsprechend der Anleitung der Firma. Für Gapdh wurde ebenfalls eine Standardkurve ermittelt. Die Werte für die zu untersuchenden Gene wurden anschließend auf Gapdh normalisiert.

Für die qPCR mit SYBRGreen (Fa. Biorad) wurde folgender Ansatz zusammengemischt.

2,5 µl cDNA (aus einer 1:10 Verdünnung)
0,5 µl 5' Primer [10pM]
0,5 µl 3' Primer [10pM]
12,5 µl Mastermix (Fa. Biorad)
<u>8,5 µl Wasser (Bidest)</u>
25,0µl

In weißen 96er Platten (Fa. Biozym) wurden 2,5µl cDNA vorgelegt und danach 22,5µl Mastermix zugefügt. Das Verschließen der Platten erfolgte mit den dazugehörigen Folien (Fa. Biozym).

PCR – Programm:	1.	94°C 15min	(Initiale Denaturierung, Aktivierung)
	2.	94°C 10sek	(Denaturierung)
	3.	56°C 10sek	(Annealing)
	4.	72°C 10sek	(Elongation)
			Schritt 2 bis 4: 40 x wiederholen
5.	4°C unbegrenzt		

Nach der Elongation erfolgte die Fluoreszenzmessung des eingebauten SYBRGreen.

Bei neuen Primern unter Verwendung von SYBRGreen erfolgte nach Schritt 4 die Schmelzkurve. Diese startet bei 55°C und wurde kontinuierlich um 0,5°C in 80 Zyklen auf 95°C erhöht. Nach jedem Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung des SYBRGreen.

Beim Verwenden von TaqMan Sonden erfolgt die Herstellung des Mastermixes entsprechend der Anleitung des qRT-PCR Kits (for Probe Assay, No ROX) der Fa. Eurogentec. Zusätzlich zu den Primern wurde die Sonde in einer Endkonzentration von 100nM hinzugefügt. Statt des SYBRGreen Mastermix der Fa. Biorad wurde das qRT-PCR Kit (for Probe Assay, No ROX) entsprechend dem Protokoll der Fa. Eurogentec benutzt.

3.3.4. Klonierung

3.3.4.1. Restriktion

Der Einsatz von Restriktionsendonukleasen ist eine schnelle und einfache Methode zur Überprüfung oder Modifizierung von Plasmiden. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, meist palindromische DNA-Sequenzen, an denen sie die DNA spalten.

Für die Restriktion wurde 1 µg DNA mit 1 Unit der Restriktionsendonuklease in vom Hersteller NEB angegebenen Restriktionspuffer bei der optimalen Aktivitätstemperatur verdaut.

Für einen Kontrollverdau wurden 0,5 bis 1 µg DNA in einen 20 µl Ansatz mit dem gewünschten Enzym meist für ca. eine Stunde bei 37°C verdaut. Die Analyse des Kontrollverdaus erfolgte nach einer Agarosegelelektrophorese (Abs. 3.3.6.) unter UV-Licht.

Sollte die DNA später aufgereinigt und weiterverarbeitet werden, wurde meist mehr µg DNA eingesetzt und der Ansatz für mind. 4–5 Stunden bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung für 20 Minuten bei 65°C.

Eine Unit definiert die Menge Enzym, die benötigt wird um 1 µg λ DNA in einer Stunde in einen Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl zu verdauen. Die Lagerung der Enzyme erfolgte bei -20°C. Verwendete Enzyme wurden von der Fa. NEB.

3.3.4.2. Glätten überhängender Enden doppelsträngiger DNA

Um überhängende Enden doppelsträngiger DNA aufzufüllen, wurde die DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (Fa. NEB) verwendet. Die Reaktion wurde entsprechend dem Protokoll der Firma NEB durchgeführt. Zu einem 50 µl Restriktionsansatz wurden 2 µl dNTPs [10 mM] (Fa. Abgene) und 1 µl Klenow-Polymerase hinzugefügt. Die Polymerase kann in jeden Restriktionspuffer der Firma NEB arbeiten. Das Auffüllen der DNA Enden erfolgte für 20 Minuten bei 37°C. Danach wurde zum Stoppen der Reaktion 5 µl EDTA [0,1 M] hinzugefügt und der Ansatz für 20 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert. Die Durchführung der Reaktion erfolgte sofort nach dem Restriktionsverdau. Danach kann die DNA weiterverarbeitet (Dephosphorylierung der 5' Enden, Aufreinigung über ein Agarosegel) oder bei -20°C gelagert werden.

3.3.4.3. Dephosphorylierung linearer doppelsträngiger DNA

Die Dephosphorylierung des 5' Endes eines linearisierten Vektors dient dazu eine Selbstligation zu verhindern und dadurch die Effizienz der Klonierung zu erhöhen.

Der Ansatz für die Dephosphorylierung wurde gemäß dem Protokoll der Fa. Fermentas pipettiert. Zu einem 50 µl Restriktionsansatz wurden 5 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl der Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP, Fa. Fermentas) zugefügt.

Die Dephosphorylierung erfolgte für 15 Minuten bei 37°C. Die Zugabe von EDTA mit einer Endkonzentration von 5 mM und das anschließenden Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten führte zur Inaktivierung der Phosphatase. Danach wurde der Ansatz über ein Agarosegel aufgereinigt.

3.3.4.4. Ethanol - Fällung

Zu der wässrigen DNA – Lösung wurde 0,1 Vol. 3M Natriumacetatlösung und 2,5 Vol. 96%iger unvergällter Ethanol hinzugefügt. Nach der Fällung (z. Bsp. über Nacht bei -20°C) wurde der

Ansatz für 15 Minuten bei höchster Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 Minuten bei höchster Geschwindigkeit bei 4°C), getrocknet und anschließend in sterilen Bidest aufgenommen.

3.3.4.5. PCIA - Extraktion

Dieser Arbeitsschritt dient der Entfernung von Proteinen aus der DNA – Präparation.

Dafür wurde die DNA – Probe mit 1Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzen, mit dem Vortexer vermischt und für 5 Minuten bei höchster Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform versetzt. Nach kurzem Vermischen mit dem Vortexer wurde dieser Ansatz für 5 Minuten bei höchster Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA kann durch eine anschließende Ethanolfällung präzipitiert werden.

3.3.4.6. Ligation

Mithilfe der T4 DNA Ligase werden die freie 5'-Phosphatgruppe des einzubauenden DNA Fragmente mit der freien 3'-Hydroxylgruppe der Vektor DNA unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung ligiert.

Für die Ligation wurde die Vektor DNA und das Fragment im Verhältnis meist 1:5 vermischt und mit 5U der T4 DNA Ligase (Fa. Fermentas) sowie 2µl des zugehörigen 10x Puffer versetzt. Die Ligation fand über Nacht bei 16°C statt. Danach erfolgte die Transformation des Ligationsansatz in kompetente *E.coli* Zellen (Abs. 3.5.1.3.) oder die Lagerung bei -20°C.

3.3.4.7. TA - TOPO Cloning

Für die Sequenzierung von PCR Fragmenten wurden diese in den pCR®4-TOPO® Vektor (Fa. Invitrogen) kloniert. Der Reaktionsansatz wurde gemäß der Angaben der Fa. Invitrogen pipettiert. Die Reaktion erfolgte für exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur und wurde dann sofort auf Eis gestellt. Danach wurde der Ansatz in TOP10 Zellen (Fa. Invitrogen) transformiert (Abs. 4.1.3.) oder bei -20°C gelagert.

3.3.5. SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierungen erfolgten über die Firma GATC. Dafür wurden ca. 1µg Plasmid in einem Endvolumen von 30µl vorbereitet und zur Firma verschickt. Bei Verwendung des pCR®4-TOPO® Vektors wurden zur Sequenzierung die Primer M13forward oder M13revers verwendet (Abs. 3.1.6.9.).

Bei Sequenzierungen von anderen Vektoren wurden die benötigten Primer (Abs. 3.1.6.) mit einer Konzentration von 10pmol zusammen mit der Probe verschickt.

3.3.6. AGAROSE GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 100V in einem 1 – 2%igen Agarosegel. Um die DNA unter UV – Licht sichtbar zu machen wurde der Agarose (Fa. peqlab) in einer Konzentration von 0,25µg/ml Ethidiumbromid (Konz. 10mg/ml) zugefügt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet

und zum Auftragen wurden die Proben mit 6x Ladepuffer (10mM Tris-HCl (pH7,6), 0,15% Orange G, 0,03% Xylene Cyanol FF, 60% Glycerol, 60mM EDTA) versetzt. Die Analyse der Gele erfolgte mit dem Geldoc der Firma Biorad. Zur Analyse der Fragmentgröße wurde ein Größenstandard mit aufgetragen (Abs. 3.1.4.)

3.3.6.1. *Isolierung der DNA aus den Agarosegelen*

Zur Isolierung der DNA aus Agarosegelen wurde ein Silika-Material verwendet. Das Silika-Material bindet DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze. Die DNA kann nach einem Waschschrift mit einem Salz-Ethanol-Puffer durch gering konzentrierte Salzlösungen wieder eluiert werden (211).

Nach dem Herausschneiden der Banden aus dem Agarosegel erfolgte die Isolierung der Fragmente entsprechend dem Protokoll des QIAquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen).

Kurz zusammengefasst wurden die gewogenen Gelstück mit je 100mg Gel 300µl Puffer QG versetzt. Bei 50°C erfolgte das Lösen der Agarose. Der Ansatz wurde auf die Säulen gegeben und für eine Minute bei 8000g zentrifugiert. Entsprechend der Anleitung der Firma wurde die Säule mit den Puffer QG und PE gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit getrocknet. Danach wurde die Membran der Säule mit 30µl 20% TE – Puffer (pH 8,0) benetzt und für eine Minute stehen gelassen, um dann bei maximaler Geschwindigkeit die DNA zu eluieren.

3.3.7. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

3.3.7.1. *Bestimmung der DNA – Konzentration*

Die Bestimmung der Konzentration von DNA fand mit dem Fotometer statt. Die Bestimmung der Konzentration der isolierten DNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260nm. Eine Absorption von eins entspricht einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA. Durch die Messung der Absorption bei 280nm parallel kann die Reinheit der DNA über das Verhältnis A260:A280 bestimmt werden. Verunreinigungen mit Proteinen senken den Wert signifikant. Reine DNA-Lösung besitzt eine Ratio A260:A280 von 1,8.

3.3.7.2. *Bestimmung der RNA – Konzentration*

Die Messung von geringen RNA Mengen erfolgte mit dem RNA Nano 6000 Kit (Fa. Agilent) im Bioanalyser (Fa. Agilent). Für den Chip wurde gemäß dem Protokoll der Fa. Agilent das Gel vorbereitet und auf den Chip aufgetragen. Danach wurde der Ladepuffer in jedes Well pipettiert und die Proben hinzugefügt. Nach kurzem Aufkochen (3 Minuten bei 72°C) wurde ebenfalls der RNA Marker (Abs. 3.1.4.) hinzugefügt. Der fertige Chip wurde horizontal auf einem Vortexer geschüttelt, in den Bioanalyser eingelegt und gemessen. Vor und nach dem Messen wurde der Analyser mit einen RNaseZAP (Fa. Sigma Aldrich) und Wasser gefüllten Chip gereinigt.

Daneben wurden die RNA Konzentration, wenn genügend Probenmaterial vorhanden war, mit dem Fotometer gemessen Die Bestimmung der Konzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 260nm. Eine Absorption von eins entspricht einer Konzentration von 40µg/ml RNA. Durch die Messung der Absorption bei 280nm parallel kann die Reinheit der RNA über das Verhältnis A260:A280 bestimmt wurden. Eine reine RNA Lösung hat einen Wert >1,7. Verunreinigungen mit Proteinen und Degradation der RNA senken den Wert signifikant.

3.4. MICROARRAY

3.4.1. PRÄPARIERUNG DES GEWEBES

Männliche und weibliche Balb/C Mäuse wurden abends zusammengesetzt. Am nächsten Tag wurden die weiblichen Tiere auf einen vaginalen Plug geprüft. Beim Vorhandensein des Plugs wurde dieser Tag als E 0.5 p.c. bezeichnet. Für die Gewinnung des Lebergewebes der embryonalen Tage 9.5, 11.5 und 13.5 p.c. wurden die extraembryonischen Teile des Embryos entfernt und die Leberanlage präpariert. Für die Probe Embryo Tag 7.5 p.c. wurde der ganze Embryo verwendet. Ebenfalls wurde Gewebe der Leber von 8 Wochen alten Balb/C Mäusen gewonnen. Die Gewebeproben wurden bei -80°C gelagert. Die RNA wurde aus dem Gewebe wie oben (Abs. 3.3.1) isoliert, mit DNase verdaut (Abs. 3.3.2.1) und die Qualität im Agilent 2100 Bioanalyser (Abs. 3.3.7.2) überprüft.

3.4.2. AMPLIFIZIERUNG, HYBRIDISIERUNG UND SCANNING

Mehrere RNA Proben der definierten Stadien wurden vereinigt und gemäß dem Gibco Superscript Protokoll umgeschrieben (Fa. GIBCO-BRL – Invitrogen). Nach der Synthese wurde die cDNA mit Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (Fa. Carl Roth; Abs. 3.3.4.6) aufgereinigt und mit einer Ethanol-fällung (Abs. 3.3.4.5) präzipitiert. Biotin-marktierte cRNA wurde folgend gemäß dem Protokoll der Fa. Enzo Biochem mit dem entsprechend ENZO BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Fa. Enzo Biochem) synthetisiert. Die amplifizierte, markierte und aufgereinigte cRNA wurde durch die Erhitzung bei 94°C für 35 Minuten fragmentiert (Puffer: 40 mM Trisacetat, 100 mM Kaliumacetat, 30 mM Magnesiumacetat, pH 8.1). Vor der Hybridisierung mit dem Microarray Chip wurde die RNA erneut für 5 Minuten bei 99°C denaturiert und dann für 5 Minuten bei 45°C erhitzt. Anschließend wurden 15mg cRNA in 300ml Hybridisierungslösung (Kontrolloligo B2; 20 Eukariot. hyb. Kontrolle; Herring sperm; acetylated BSA und 2 x Hyb. buffer) mit den Microarray Chips hybridisiert. Als Microarray chips wurden die Murine Genome U74A Set Version 2 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) Arrays genutzt, welche die Sequenzen von 12 488 Genen/EST beinhalten.

Die Hybridisierungen erfolgten bei 45°C für 16-17 Stunden. Nach der Hybridisierung wurden die Microarray Chips gewaschen und in die GeneChip Fluidics station (Fluidics station 400; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) überführt. Gemäß dem Protokoll EukGE-WS2 wurde der Chip in dieser Station weiterbearbeitet. Dieses Protokoll beinhaltet zwei weitere Waschschriffe, dem Färben und Waschschriffe nach dem Färben. Nach dem Waschen wurden die Microarray Chips mit fluoreszierenden Streptavidin inkubiert. Um das Signal zu verstärken wurde eine zweite biotinylierten gekoppelten Antikörper/ Streptavidin Reaktion durchgeführt. Anschließend wurden die hybridisierten Microarray Chips mit dem GeneChip System confocal scanner (Hewlett-Packard, CA, USA) vermessen.

3.4.3. DATENANALYSE

Alle Proben wurden in zweifacher Ausführung präpariert und hybridisiert. Nur die detektierten bzw. nicht detektierten Transkripte von beiden Hybridisierungen wurden für weitere Analysen verwendet. Für die Auswertung der Daten wurde die Affymetrix GeneChip 4.0 und Microsoft Excel Software genutzt (208).

Im Weiteren wurde eine „correlation coefficient clustering“ mit der Data Mining Tool 3.0 (Fa. Affymetrix) Software durchgeführt. Im Detail, die Signale der Werte von beiden Microarrays der jeweiligen Proben (Embryo Tag E 7.5 p.c., embryonalen Leber Tag 9.5 p.c., 11.5 p.c., 13.5 p.c. und vier Proben der adulten Leber) wurden genutzt um stadiumsspezifische Gencluster zu erstellen. Durch bestimmte Kriterien, die mit Hilfe der Software MAS5.0 (MicroArray Suite 5.0, Affymetrix) erstellt wurden, wurde die Stringenz erhöht. Signale die einen Wert über 100 erreichten wurden in den verschiedenen Proben mit den P für Anwesenheit markiert. Signale die in einem der getesteten Stadien und im Vergleich zu den anderen Stadien gering waren wurden für weitere Analysen zusammengefasst. Durch die Analyse wurden 130 Gene identifiziert, die mit Hilfe von Gene Ontology (Ashburner, 2000) gruppiert und mit der TreeView 1.60 visualisiert wurden (Michael Eisen, Stanford University); (www.rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm) (209).

3.5. ZELLKULTUR

3.5.1. BAKTERIENKULTUR

3.5.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Die Amplifizierung der Plasmid DNA fand in Stämmen von *Escherichia coli* (*E. coli*) statt. Für kürzere Lagerung wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten und für die Vorbereitung eine Plasmid DNA Isolierung in LB Flüssigmedium kultiviert. Die Inkubation der Bakterien erfolgte bei 37°C und die Lagerung für kürzere Zeit bei 4°C. Alle verwendeten Plasmide enthalten das Gen für *Ampicillin-Resistenz* (*ampR*) und ermöglicht so eine Selektion plasmidtragender Bakterien in Anwesenheit von Antibiotika.

Für die Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden die Bakterien bei -80°C als Glycerolstock gelagert. Dafür wurden die Bakterienkultur mit Glycerol auf eine Endkonzentration von 15% versetzt.

3.5.1.1.1. Verwendete Stämme

Stbl3 (Fa. Invitrogen): F⁻ *mcrB mrr hsdS20*(r_B⁻, m_B⁻) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Str^R) *xyl-5 λ⁻ leu mtl-1*
Dieser Stamm ist endA1+

TOP10 (Fa. Invitrogen): F⁻ *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

3.5.1.2. Medien für molekularbiologische Arbeiten

Bei antibiotikumresistenten *E. coli* wurde zu Kultivierung das Antibiotikum dem Medium bzw. dem Agar nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur < 50°C zugesetzt.

Ampicillin (Fa. Ratiopharm) wurde mit einer Endkonzentration von 80µg/ml zugesetzt.

Medium	Zusammensetzung
LB Medium (Luria Bertani Medium)	10g/l Trypton (Fa. BD Bioscience) 5g/l Hefeextrakt (Fa. BD Bioscience) 10g/l NaCl pH mit NaOH auf 7,5 einstellen
LB - Agar	LB – Medium mit zusätzlich 15g/l Agar
S.O.C. Medium	20g/l Casein 10g/l Hefeextrakt 0,58g/l NaCl 0,2g/l KCl pH mit NaOH auf 7 einstellen
vor Gebrauch:	10ml/l 2M Glukose* 5ml/l 2M MgCl ₂ * 5ml/l 2M MgSO ₄ * * Diese Lösungen wurden sterilfiltriert.

3.5.1.3. Transformation in *E. coli*

Zu dem Ligationsansatz (Abs. 3.3.4.6.) wurden 100µl kompetente *E.coli* (Fa. Invitrogen) gegeben und für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wurde der Ansatz für 30 Sekunden in den auf 42°C vorgewärmten Heizblock gestellt und anschließend wieder auf Eis. Zum Ansatz wurde 1ml S.O.C. Medium hinzugefügt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 5 Minuten bei 8000g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet im restlichen Medium gelöst. Diese Suspension wurde dann auf bereits vorgewärmten LB Platten mit dem gewünschten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert (212).

3.5.1.4. Mini - Präparation von DNA aus *E.coli*

Am Vorabend der Präparation wurde in 3 ml LB Medium und dem nötigen Antibiotikum eine *E. coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und für 45 Sekunden bei 16000g zentrifugiert. Die Aufarbeitung des Bakterienpellets erfolgte entsprechend der Anleitung des Kits peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (S-Line, Fa. peqlab). Mit Hilfe des P1 Puffer wurde das Pellet resuspendiert und mit dem Puffer P2 die Bakterien lysiert. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lysisreaktion mit dem gekühlten Puffer P3 gestoppt und für 10 Minuten bei 10000g zentrifugiert. Der

Überstand wurde auf ein DNA bindende Säule gegeben und zentrifugiert. Die Säule wurde mit den Waschpuffern gereinigt und in einem abschließenden Zentrifugierungsschritt getrocknet. Anschließend wurde die DNA mit dem Elutionspuffer des Kits herausgelöst.

3.5.1.5. *Midi – Präparation von DNA aus E. coli*

Für diese Präparation wurde 50 bis 100ml LB – Medium und dem entsprechenden Antibiotikum mit einer *E. coli* Kolonie angeimpft. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde dieser Ansatz mit dem Nucleobond Xtra Midi (Fa. Machery & Nagerl) aufgearbeitet. Die Präparation ist im Prinzip ähnlich wie die Mini Präparation im vorhergehenden Abschnitt. Nach der Eluierung der Plasmid DNA wird das Eluat mit 0,7 Volumen 100% Isopropanol versetzt und für 15 Minuten bei 4°C und höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wird mit 75% Ethanol gewaschen, bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in ~100µl 1x TE – Puffer aufgenommen.

3.5.1.6. *Mega – Präparation von DNA aus E. coli*

Für diese Präparation wurde zunächst eine Vorkultur angelegt. Dafür wurde eine Bakterienkolonie in 5ml LB Medium mit Antibiotikum über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus dieser Kultur wurde am nächsten Tag die Hauptkultur mit 500ml angesetzt, welche ebenfalls über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Die Kultur wurde am nächsten Tag durch zentrifugieren sedimentiert und aus dem Bakterienpellet die Plasmid DNA mit dem Nucleobond PC 2000 (Fa. Machery & Nagerl) entsprechend dem Protokoll der Firma isoliert. Die Isolierung ist vergleichbar mit der Midi – Präparation im vorhergehenden Abschnitt.

3.5.2. ZELLKULTUR

Alle Arbeiten mit Zellkulturen fanden unter der sterilen Arbeitsbank statt.

So weit nichts anderes vermerkt, erfolgte die Kultivierung der Zellen im CO₂ Inkubator bei 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit und 37°C in DMEM (Fa. Invitrogen, 4,5 g/L Glukose, 4mM L-Glutamin und 110 mg/L Natriumpyruvat) mit 10% FCS (Fa. PAA, EU geprüft), 1mM L-Glutamin (Fa. PAA, 100mM) und 1% Penicillin/ Streptomycin (Fa. Biochrom, 10.000Units/ 10mg/ml).

3.5.2.1. *Verwendete Zelllinien*

Hepa1.6: Maus Hepatom, Zelllinie stammt vom dem BW7756 Tumor, der in dem Mausstamm C57L auftrat (DSMZ, Braunschweig)

HEK 293T: Es handelt sich hierbei um eine humane embryonale Nierenzelllinie, welche durch stabile Transfektion der adenoviralen E1A-Region immortalisiert wurde. Zusätzlich enthält sie das *SV 40 large T Antigen* (DSMZ, Braunschweig). Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat., Dr. med. A. Schambach (MHH, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Für die Virusproduktion sollten die Zellen nur bis zur 25 Passagen genutzt werden.

3.5.2.2. *Konservierung lebensfähiger Zellen durch Einfrieren*

Zur Konservierung von Zellen wurden diese in kleine Portionen ($3 - 4 \times 10^6$) eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut. Um die Bildung größerer Eiskristalle zu verhindern wurden die

Zellen in Medium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und langsam eingefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -196°C . Bei Bedarf wurden die Zellen in den Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Kulturmedium überführt. Durch die Zentrifugierung, Verwerfen des Überstandes und dem anschließenden Resuspendieren mit 5 ml Kulturmedium wurde das toxisch wirkende DMSO aus der Zellsuspension entfernt. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen in einer kleinen Kulturflasche.

3.5.2.3. Zellpassage

In der Regel wurden die Zellen zweimal die Woche bzw. wenn die Flaschen zu 80% konfluent war gesplittet. Nach Abnahme des Medium mit Hilfe der Absaugpumpe wurde der Zellrasen zunächst 2 – 3x mit sterilem PBS (Fa. Invitrogen) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde die 10x Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. PromoCell) 1:5 verdünnt und je nach Flaschengröße eine entsprechende Menge auf den Zellrasen gegeben. Der Ablösungsprozess fand im CO_2 – Inkubator, bis die Zellen sich ablösen und in kleinen Gruppen schwimmen, statt. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch FCS haltigen Medium wurde die Suspension in ein steriles 50ml Röhrchen überführt. Die Zentrifugierung erfolgte für Zelllinien für 5 Minuten bei $\sim 100\text{g}$ und für primäre Zellen bei $\sim 17\text{g}$. Anschließend wurde das Medium abgenommen, das Pellet in einem geeigneten Medium resuspendiert und die Zellen je nach Bedarf ausgesät.

3.5.2.4. Bestimmung der Zellzahl (mit dem Hämozytometer nach Neubauer)

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden $10\mu\text{l}$ Zellsuspension mit $90\mu\text{l}$ Trypanblau (Fa. Fluka) in einem zweiten Reaktionsgefäß gemischt und in die Neubauer Zählkammer gegeben. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die vier großen Quadrate ausgezählt. Nach Multiplizieren des Mittelwertes der Zellzahlen mit 1×10^4 erhält man unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zellzahl/ ml. Da nur tote Zellen den Farbstoff durch die nicht mehr intakte Zellmembran aufnehmen können, sind diese unter dem Mikroskop blau gefärbt und unter Berücksichtigung dieser, kann eine Aussage über die Vitalität der Zellsuspension gemacht werden.

3.5.3. PRIMÄRE ZELLEN

3.5.3.1. ALDPC

Für die Herstellung der ALDPC wurden zunächst Hepatozyten aus einer C57Bl/6 Maus isoliert. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit einem Percoll Gradienten aufgereinigt, um tote Zellen vor dem Aussäen zu entfernen. Anschließend wurden 1×10^6 Hepatozyten/ per well in einer 6well Primaria Platten (Fa. BD Bioscience) ausgesät und mit HCM (Fa. Lonza; HBM+ Zusätze) für zwei Tage kultiviert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumaustausch. Nach 21 Tagen wurde das Medium gegen Williams E Medium (Fa. Pan Biotech) mit 50ng/ml EGF (Fa. Peprotech), 30ng/ml IGF-II (Fa. Peprotech), $10\mu\text{g/ml}$ Insulin (Fa. Sigma Aldrich) und 10% FCS (Fa. PAA) ersetzt. Drei bis sechs Wochen nach Aussaat können kleine Kolonien der ALDPC beobachtet werden. Diese Kolonien wurden weiter kultiviert bzw. kryokonserviert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in mit Kollagen beschichteten Platten (Abs. 3.5.3.3) mit einem Mediumwechsel aller 2 Tage. In Abhängigkeit der Zelldichte wurden die Zellen aller 2-4

Tage passagiert. Ausgesät wurden zwischen 1×10^6 und 4×10^6 in Abhängigkeit der Kulturfläche. Die Verdopplungszeit dieser Zellen beträgt rund 30 Stunden.

3.5.3.2. *Hepatozyten*

Nach der Isolierung wurden die Hepatozyten je nach Bedarf in mit Kollagen beschichteten Kulturschalen oder in Primaria Platten mit einer Zelldichte von ca. 11.000 per cm^2 ausgesät (Fa. BD Bioscience). Die Kultivierung fand im CO_2 – Inkubator statt (Abs. 3.4.2.).

Dafür wurde zunächst vorgewärmtes HCM (Fa. Lonza, HBM + Zusätze) und 5% FCS (Fa. PAA) in den Kulturschalen vorgelegt und darin die Zellen ausgesät. Durch anschließendes Schwenken wurden die Zellen verteilt. Etwa anderthalb Stunden nach Aussaat erfolgte der Austausch des Medium, um tote Zellen zu entfernen. Zur weiteren Kultivierung wurde das Medium aller zwei Tage gewechselt.

3.5.3.3. *Kollagenbeschichtung von Plastikpetrischalen und Deckgläschen*

Das lyophilisierte Kollagen (Fa. Roche Applied Science) aus Rattenschwänzen wurde in 0,2% Essigsäure aufgelöst und auf eine Konzentration von 1,5 mg/ml eingestellt. Zur Beschichtungen der Kulturschalen wurde die KollagenstammLösung auf die Kulturfläche pipettiert und sorgfältig verteilt. Nach ein paar Sekunden wurde der Überschuss abgenommen und für weitere Anwendungen aufgehoben. Unter der sterilen Sicherheitswerkbank trockneten die beschichteten Schalen und wurde bis zur Verwendung maximal aber eine Woche bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Schalen mit sterilem PBS (Fa. Invitrogen) gewaschen, um mögliche Essigsäurerest zu entfernen.

3.5.3.4. *Percoll Gradient*

Für den Gradienten wurden 5ml 50% Percoll (100% Percoll (Fa. GE Healthcare) 1:1 mit PBS (Fa. Invitrogen) vermischt) in einem 50ml Röhrchen (Fa. Greiner) vorgelegt. Mit einer Pipette wurde dann vorsichtig auf diese Schicht 2ml 25% Percoll (100% Percoll 1:4 mit PBS vermischt) aufgetragen. Auf diesen Gradienten wurden folgend 3ml der vorher isolierten Hepatozytenzellsuspension (Abs. 3.2.2.) gegeben. Der Gradient wurde bei $1000g$ bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. In der oberen Phase befinden sich tote Zellen und Zelltrümmer und in der mittleren Phase große und leichtere Zellen mit einer oftmals geringen Vitalität. Das Pellet beinhaltet ca. 7-30% des Ausgangsmaterials und diese Zellen haben eine Vitalität von $\sim 96\%$. Die Zellen wurden mit der Pipette aufgenommen in DMEM (Fa. Invitrogen) übertragen und erneut für 5 Minuten bei $20-50g$ bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in dem gewünschten Medium aufgenommen, erneut ausgezählt und anschließend ausgesät.

3.6. HERSTELLUNG DER VIREN

Alle S2 Arbeiten wurden an einen speziell dafür ausgestatteten Arbeitsplatz durchgeführt. Zum Reinigen und Desinfizieren der Oberflächen wurde eine 1% Incidin Perfekt Lösung (Fa. Ecolab) genutzt. Glasartikeln und wiederbenutzbare Plastartikeln wurden in einer 1% Korsorex Plus Lösung (Fa. Bode) bis zur weiteren Reinigung gelagert. Flüssigabfall wurde in einer Flasche

gesammelt in der bereits Incidin Perfekt vorgelegt wurde, so dass die Endkonzentration von Incidin Perfekt 1% betrug, anschließend wurde der Flüssigabfall autoklaviert.

3.6.1. TRANSFEKTION

Für die Transfektion wurden 24 Stunden vorher $4,5 \times 10^6$ HEK293T in 10cm Kulturschalen in DMEM (Abs. 3.5.2.) ausgesät. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gegen 9ml frisch angesetzte Transfektionsmedium ausgetauscht. Das Transfektionsmedium setzt sich aus DMEM (Abs. 3.5.2.) mit 10mM HEPES (pH7,5, Fa. Applichem) und 25 μ M Chloroquine (25 mM, in PBS (Fa. Invitrogen) gelöst) zusammen.

Nach dem Auftauen der Plasmide und der weiteren Komponenten (2,5M CaCl₂, 2x HBS Puffer) wurde der Transfektionsansatz angesetzt.

Für eine 10cm Kulturplatte wurden von den einzelnen Plasmide (Abs. 3.1.5.) folgende Mengen benötigt:

- 12,0 μ g lentivirales Plasmid
- 14,0 μ g psPAX2 (gag-pol-rev Plasmid)
- 1,5 μ g pMDG.2 (zelltoxisch) (vsv-g Plasmid)

Alle drei Plasmid wurden in einem Reaktionsgefäß vermischt, mit Wasser auf 450 μ l aufgefüllt und mit 50 μ l 2,5M CaCl₂ Lösung versetzt. In einem 14ml Röhrchen wurden 500 μ l 2 x HBS – Puffer (50mM Hepes, 280mM NaCl, 1,5mM Na₂HPO₄, pH ~7,2 Lagerung -80°C) vorgelegt. Unter Produktion von Luftblasen wurde der DNA/ CaCl₂ Mix tropfenweise dazugegeben. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend in das Medium der HEK293T getropft und durch leichtes Schwenken verteilen.

3.6.2. ERNTEN DER VIREN

Zwölf Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium gegen 8ml frisches Transfektionsmedium ohne Chloroquine ausgetauscht. Nach weiteren zwölf Stunden wurde der Überstand vorsichtig mit einer 30ml Spritze abgenommen, durch einen 0,45 μ m Filter in ein 14ml Röhrchen filtriert und in kleine Aliquots bei -80°C gelagert. Zu den Zellen wurde erneut frisches Transfektionsmedium geben. Aller 12 Stunden, bis zu 72 Stunden nach Transfektion, kann der sich im Überstand befindliche Virus geerntet werden, wobei der Überstand nach 36 bzw. 48 Stunden den höchsten Titer aufweist.

3.6.3. KONZENTRIERUNG VON VIRALEN ÜBERSTAND FÜR EINEN HÖHEREN TITER

Zur Konzentration wurden die Überstände der verschiedenen Ernten vereinigt und in die Filtereinheit der Centricon Puls 70 (Fa. Millipore) gegeben. Die Säule wurde bei 3500g für ungefähr 15-20 Minuten zentrifugiert. Die Zeit kann entsprechend der Menge des Überstands variieren. Nachdem die gewünschte Menge des Überstandes durch den Filter passiert ist, wurde der Filter auf dem mitgelieferten Auffangbehälter gesteckt und bei 1000g für zwei Minuten zentrifugiert. Der sich im Auffangbehälter befindliche Überstand wurde in kleine Volumen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.6.4. BESTIMMUNG DES VIRUSTITERS

Der Titer wurde mit der Zelllinie Hepa1-6 bestimmt. Für die Transduktion wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen per well in einer 24 well Platte ausgesät und verschiedene Volumen des Überstandes mit den lentiviralen Partikel dazugegeben. Die Kultivierung erfolgte in einem Endvolumen von 500µl DMEM (Abs. 3.5.2.), welches mit Protaminsulfat versetzt wurde. Die Endkonzentration vom Protaminsulfat (4mg/ml in PBS (Fa. Invitrogen) gelöst, -20°C) beträgt 4µg/ml. Vor dem Benutzen von Protaminsulfat sollte es bei 37°C erwärmen bis es eine milchige Trübung annimmt.

Nach spätestens 12 Stunden wurde das Medium gewechselt und für die Expression von eGFP die Zellen in frischem DMEM (Abs. 3.5.2.) für weitere 2-3 Tage kultiviert.

Für die Analyse der eGFP positiven Zellen wurden diese mit Hilfe von einem Trypsin/ EDTA Gemisch von den Kulturschalen abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und herunterzentrifugiert (Abs. 3.5.2.3). Das Pellet wurde in 500µl FACS – Puffer (PBS (Fa. Invitrogen) mit 2% FCS (Fa. PAA) und 2mM EDTA) aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Im Durchflusszytometer (*Fluorescence-activated-cell-sorter*, FACS) wurde der prozentuale Anteil von eGFP positiven Zellen von der Gesamtzellzahl bestimmt (Abs. 3.6.6.). Anhand der Daten lässt sich der Titer bestimmen.

$$\text{Titer (infektöse Partikel/ml)} = \text{MOI} * \text{ausgesäte Zellen} * \mu\text{l des viralen Überstandes}$$

$$\text{MOI} = -2 \ln (1 - \text{„Transduktionseffizienz in \%“} / 100)$$

Zellzahl	Virusüberstand [ml]	Gesamtvol [ml]	Verdünnungsfaktor	gemessene Transduktionseffizienz in %	reale Transduktionseffizienz*	gemessene MOI	Titer = MOI*Zellzahl* Verdünnungsfaktor
150000	0,0000	0,5000	0	0,520	0,000	0,000	0
150000	0,0100	0,5000	50	5,190	4,670	0,096	1.434.769
150000	0,0200	0,5000	25	9,750	9,230	0,194	1.452.620

Mittel 1.443.694

Tabelle 3.2: Beispielrechnung für die Bestimmung des Titers

Reale Transduktionseffizienz ergibt sich aus gemessener Transduktionseffizienz abzüglich Eigenfluoreszenz von nicht transduzierten Zellen (rund 0,52 Prozent)

3.6.5. TRANSDUKTION VON ZELLEN

Eine MOI von eins ist erforderlich um rund 67% der Zellen zu transduzieren. Dabei werden etwa 33% eine Kopie tragen und je 33% keine bzw. 2 oder mehr Kopien tragen. Für eine MOI von eins bei 200.000 Zellen benötigt man 200.000 infektiöse Partikel.

Die Transduktion der Zellen erfolgte wie bei der Bestimmung des Titers (Abs. 3.6.4.). Eine bestimmte Zellzahl wurde ausgesät und, der gewünschten MOI entsprechend, xµl Überstand mit lentiviralen Partikel hinzugefügt. Das zum Kultivieren verwendete Medium enthält Protaminsulfat mit einer Endkonzentration von 4µg/ml. Nach ca. 12 Stunden wurde das Medium gewechselt.

3.6.6. FACS ANALYSE

Die Durchflusszytometrie ermöglicht auf schnelle und effiziente Art die Struktur, Größe sowie die intra- und extrazellulären Proteinexpression einzelner Zellen zu analysieren. Das Prinzip des Durchflusszytometers (*Fluorescence activated cellsorter*, FACS) beruht auf der Markierung von Proteinen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen und deren Anregung in einem laminaren Zellstrom über monochromatisches Laserlicht. Über die unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluorochrome kann so eine Charakterisierung der intra- und extrazellulären Zusammensetzung von Zellen erfolgen. Zusätzlich kann über das Vorwärtsstreulicht (*Forwardscatter*, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (*Sidescatter*, SSC) die relative Größe und Granularität von (un-) markierten Zellen ermittelt werden. Für die FACS Messungen wurde das FACS Calibur™ der Firma BD Bioscience verwendet.

Zur quantitativen Auswertung der eGFP positiven Zellen wurde die Anzahl der fluoreszierenden Zellen im Durchflusszytometer FACS Calibur™ bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst aus der Kulturschale herausgelöst (Abs. 3.5.2.3.) und nach der Zentrifugierung in einem adäquaten Volumen FACS Puffer (PBS (Fa. Invitrogen) mit 2% FCS und 2mM EDTA) aufgenommen. Bis zur Messung können die Zellen auf Eis gelagert und wurden kurz vor der Messung erneut gut durchmischt. Die Einstellung und Messung erfolgt entsprechend der Anleitung der Fa. BD Bioscience. Zur Reinigung und Wartung wurden die von der Fa. BD Bioscience empfohlenen Lösungen verwendet.

IV. ERGEBNISSE

4.1. GENEXPRESSIONSPROFILE NACH PARTIELLER HEPATEKTOMIE**4.1.1. ZUSAMMENFASSUNG DER CDNA MICROARRAYS**

Das Auffinden neuer Überlappungen zwischen den Genexpressionsmustern der Entwicklung und der Regeneration der Leber sollen helfen, das bisherige Wissen weiter zu vervollständigen und neue Details über die komplexen Genexpressionsmuster des Hepatozyten zu erlangen.

2002 führten Jochheim und Kollegen (208) cRNA Microarrays (Murine Genome U74A Set Version 2, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) mit RNA Proben aus dem Gesamtembryo von Tag 7.5 p.c., aus Lebergewebe der Tagen E 9.5 p.c., E 11.5 p.c. und E 13.5 p.c. sowie aus dem Gewebe der adulten Leber durch. Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte unter Anwendung der Data Mining Tool 3.0 Software (Affymetrix, St. Clara, Arg). Für jeden Zeitpunkt wurden jeweils zwei Microarrays durchgeführt und die Daten der beiden Sets in einen Scattergraphen gegeneinander geprüft. Fast alle signifikanten Daten liegen innerhalb der 2fachen Distanz, was auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Experimentbedingungen schließen lässt (z.B. Tag E 9.5 p.c. Abb. 4.1., S. 61).

In weiteren Clusteranalysen wurde jeweils der Microarray Datensatz von einem Stadium mit den Microarray Datensätzen aller anderen Stadien verglichen (209). Beim Vergleich aller Stadien untereinander zeigte sich eine zunehmende Veränderung der Genexpressionsprofile während der Leberentwicklung (Abb. 4.2, S. 61). Unter den gewählten mathematischen Bedingungen bei der Auswertung wurden Gene gefunden, die ein besonders starkes Signal zu nur einem der drei Zeitpunkte der fötalen Leberentwicklung aufweisen und kein Signal in der adulten Leber zeigen. Dies führte zu einer Eingrenzung auf 130 Genen (Abb. 4.3., S. 62).

Für rund ein Drittel der 130 Gene zeigte sich eine starke Expression am Tag E 9.5 p.c. Die Mehrheit dieser Gene ist an Prozessen des Zellwachstums und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt. Die neun Gene, welche am Tag E 11.5 p.c. stark exprimiert wurden, sind in verschiedenen metabolischen Prozessen involviert. Rund 60% der 130 Gene wurden am Tag E 13.5 p.c. stark exprimiert. Die meisten Gene dieses Zeitpunktes sind funktionell mit Prozessen der Hämatopoese vernetzt, was im Einklang mit der Funktion der Leber als Ort der Hämatopoese während der Entwicklung steht. Im Kontrast zu den früheren Stadien sind weniger Gene an Prozessen der Entwicklung und Differenzierung beteiligt.

Die 130 identifizierten Gene sind nach verschiedenen Kriterien eingeteilt und in der Abbildung 4.3 dargestellt. Da die frühe Phase der Leberentwicklung (Tag E 9.5 p.c.) von Entwicklung und Zellwachstum geprägt ist, wurden zunächst diese Gene im Regenerationsmodell der partiellen Hepatektomie untersucht. Über viele Gene ist bisher im Zusammenhang mit der Leber nichts bekannt und teilweise auch über die Gene selbst nicht.

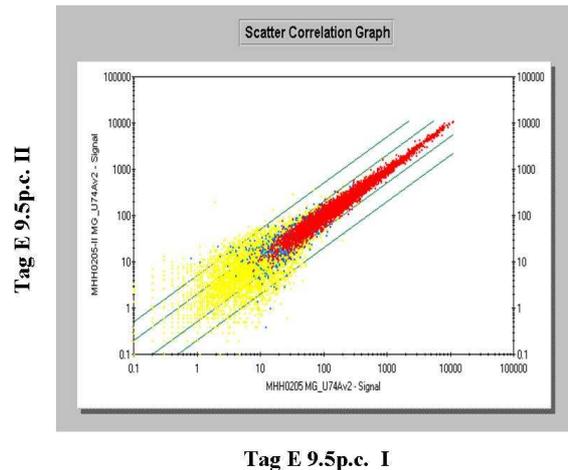


Abbildung 4.1 exemplarische Clusteranalyse für die beiden cDNA Microarrays von Tag E 9.5 p.c.

Beschreibung für Abb. 4.1 (s.o.) und 4.2 (s.u.) Die Signalwerte sind in einem zweidimensionalen Scattergraphen mit Hilfe der Data Mining Tool 3.0 (Affymetrix) dargestellt. X- und Y-Achse sind logarithmisch skaliert. Die Farben geben die detektierten Werte der beiden verglichenen Microarrays, errechnet über den MAS 5.0 Algorithmus, wieder. Rot steht für signifikant detektierte Signale in beiden Microarrays, blau für Signale, die nur in einem Microarray detektiert wurden bzw. unter dem gesetzten Schwellenwerte liegen und gelb für nicht signifikante Werte. Die symmetrischen Linien markieren die Grenze der 2 bzw. 5fachen Distanz der Signale voneinander. Diese Clusteranalysen erfolgten ebenfalls für Tag E 7.5 p.c., Tag E 11.5 p.c., Tag E 13.5 p.c. und adulter Leber (Daten nicht gezeigt)

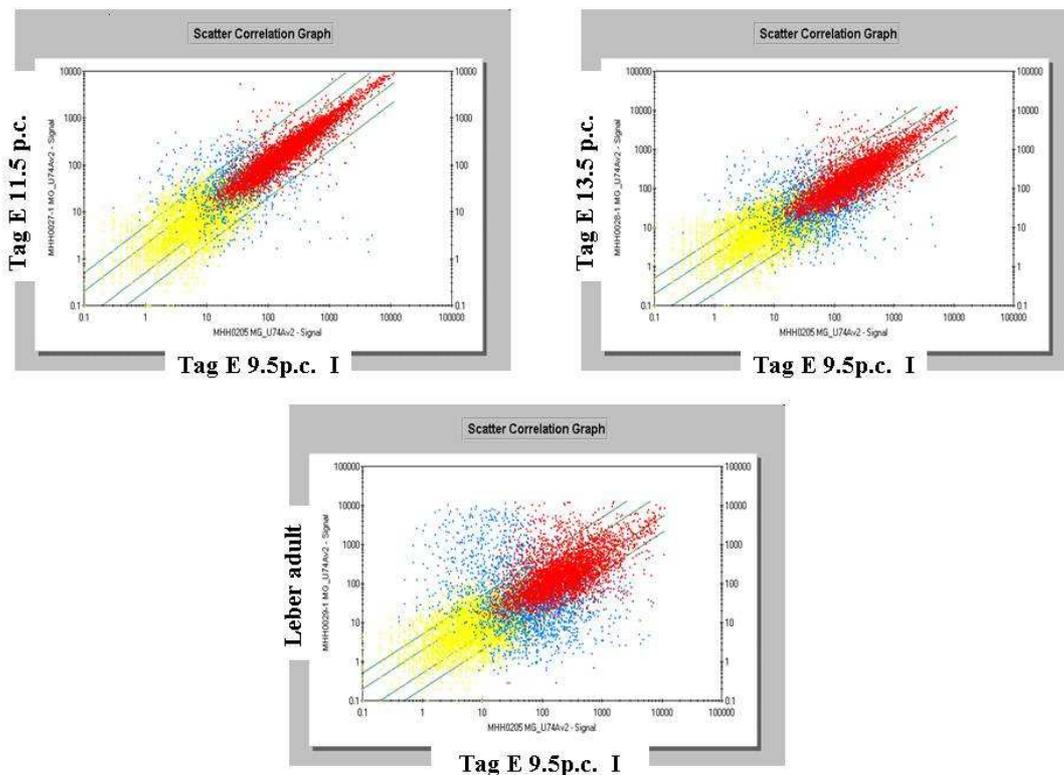


Abbildung 4.2 Clusteranalysenvergleich der Daten von Tag E 9.5 p.c. mit den anderen Stadien der embryonalen Entwicklung und der adulten Leber.

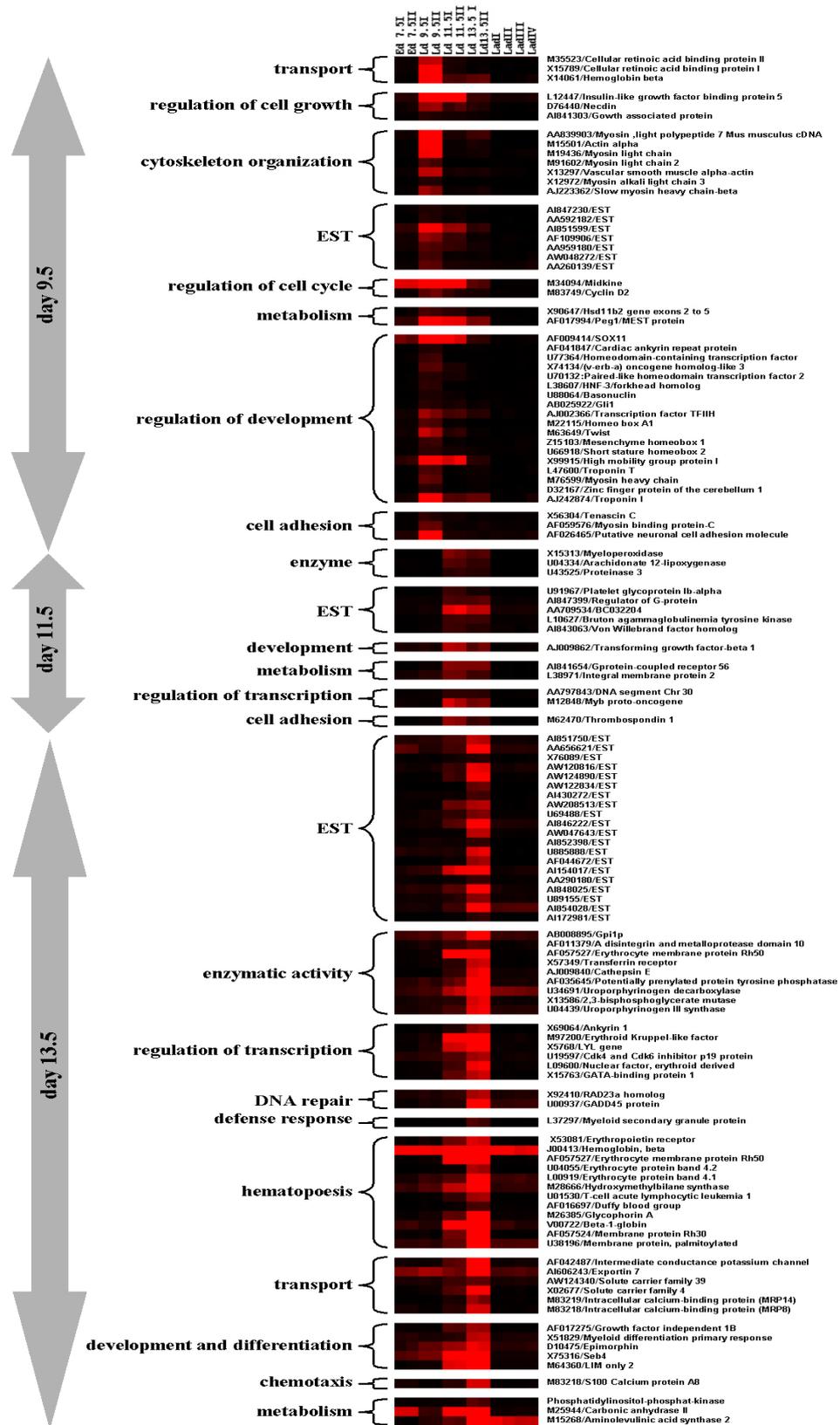


Abbildung 4.3 Auflistung der identifizierten Gene

4.1.2. VERLAUF DER REGENERATION NACH PARTIELLER HEPATEKTOMIE IN DER MAUS

Die mRNA Expressionsstudien der Gene vom Tag E 9.5 p.c. in der regenerierenden Leber erfolgte am Modell der partiellen (2/3) Hepatektomie (p.H.).

Nach einer Verletzung treten die Hepatozyten zunächst synchron von der G₀- in die G₁-Phase des Zellzyklus ein (121). In den ersten Stunden nach der p. H. ist die DNA-Synthese zunächst sehr gering und erreicht erst zwischen 36-40 Stunden ihr Maximum (159, 160). Der Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase hängt vom zirkadiären Rhythmus ab (175), wodurch es zu Unterschieden in der Genexpression der Proben kommen kann. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass die anderen Zelltypen der Leber ca. 12 Stunden nach den Hepatozyten ebenfalls beginnen, verstärkt zu proliferieren (116).

Für den Vergleich mit bereits aus der Literatur bekannten Daten über den Zellzyklus nach p.H. erfolgte die Analyse der mRNA Expression von zellzyklusspezifischen Genen wie *Cyclin d1*, *a2* und *wee1* und die Expression des leberspezifischen Wachstumsfaktors *Hgf*.

Für die Untersuchung der regenerierenden Leber entfernte Herr Q. Yuan operativ 2/3 der Leber in 6-8 Wochen alten Balb/C Mäusen. Nach 2, 4, 6, 12, 24 und 48 Stunden erfolgte die Entnahme des Lebergewebes, die Isolierung der Gesamt RNA und die Umschreibung dieser in cDNA. Mit der qPCR erfolgte die Quantifizierung der mRNA Expression der Gene. Die Normalisierung basiert auf dem Referenzgen *Gapdh*.

Die mRNA Expression von *Cyclin d1*, verantwortlich für die Progression der G₁-Phase, ist in der adulten Leber gering und bleibt innerhalb der ersten 24 Stunden, bis auf zwei kleine Erhöhungen nach vier und zwölf Stunden, auf ähnlichen Niveau. Zwischen 24 und 48 Stunden steigt der mRNA Gehalt jedoch stark an (Abb. 4.4., S. 64). Albrecht J.H. und Kollegen (213) zeigen, dass die Menge des Proteins Cyclin d1 zwischen 36 und 72 Stunden stark ansteigt.

Cyclin a₂, wichtig für den Verlauf der S-Phase, ist in der adulten Leber ebenfalls nur gering exprimiert und bleibt in den ersten Stunden zunächst auf einen geringen Niveau. 48 Stunden nach der p. H. zeigte sich ein erhöhter Gehalt der mRNA. Albrecht J.H. und Kollegen (213) zeigten einen starken Anstieg des Cyclin a Proteins 36 Stunden nach p. H..

Die mRNA von *Wee1*, ein möglicher Regulator des zirkadiären Rhythmus, ist in der adulten Leber nur in geringen Mengen nachweisbar. Zwei Stunden nach der p. H. kommt es zu einem Anstieg der mRNA Expression, um dann jedoch gleich wieder abzusinken. Nach 24 Stunden ist erneut ein deutlicher Anstieg des mRNA Gehaltes zu beobachten, der jedoch ebenfalls gleich wieder abfällt (Abb. 4.4., S.6 4).

Hgf ist ein wichtiger Faktor in der Regeneration der Leber. Sofort nach der p.H. beginnt der Abbau der extrazellulären Matrix und damit die Freisetzung von Hgf als aktive Form (150).

Der Anstieg der mRNA erfolgt nach Literaturangaben 24Std. nach p.H. (214). In unserem Experimentschema ist der Anstieg der mRNA, etwas früher als in der Literatur beschrieben, bereits nach zwölf Stunden zu beobachten, der mit leichten Schwankungen bis zu 48 Stunden dasselbe Niveau behält (Abb. 4.5., S. 64).

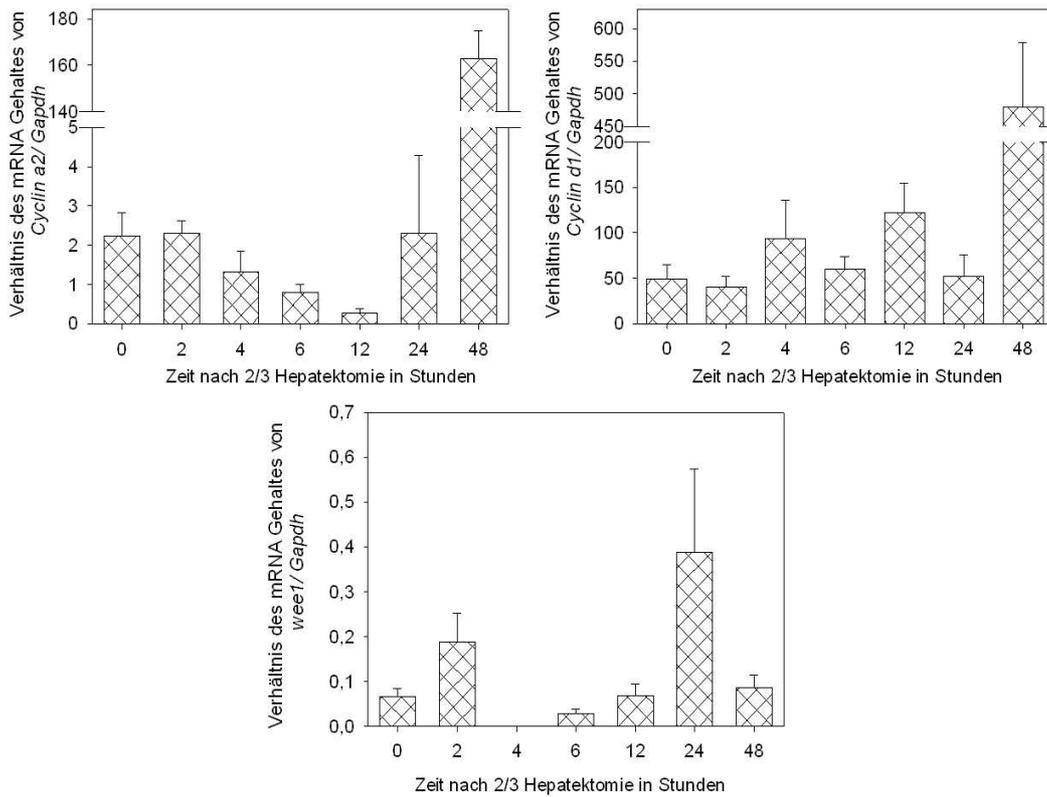


Abbildung 4.4 Cyclin a2, Cyclin d1, und wee1 mRNA Profil nach partieller Hepatektomie

Beschreibung für Abb. 4.4 (s.o.) und 4.5. (s.u.): Für die p.H. wurde den 6-8 Wochen alten Balb/C Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Die Werte der Gene Cyclin a2, Cyclin d1 und wee1 wurden auf Gapdh normalisiert. Die Expression von Cyclin a2 sinkt nach der p.H. und steigt nach 12 Stunden wieder an. Cyclin d1 weist zwei erhöhte Werte nach 4 und 12 Stunden auf, die jedoch weit unter dem Wert nach 48 Stunden bleiben. Wee1 weist zwei erhöhte Werte nach 2 und 24 Stunden auf (N=5).

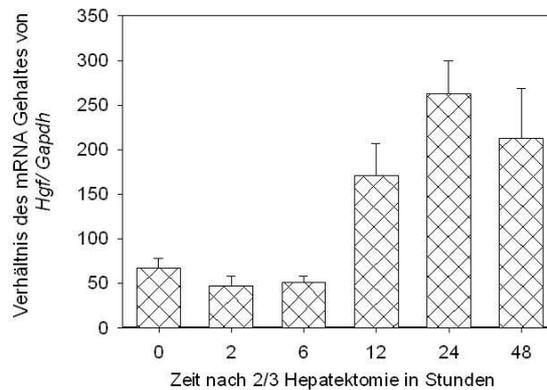


Abbildung 4.5 Hgf mRNA Profil nach partieller Hepatektomie

4.1.3. PROFILE DER IN DEN CDNA MICROARRAYS DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENE

4.1.3.1. Zellzyklus und RNA

4.1.3.1.1. *Basonuclin1* (Acc.Nr.: NM_007562.2)

Basonuclin1, ein Kernprotein, reguliert u.a. die Proliferation von Keratinozyten und unterdrückt deren Differenzierung. Es fungiert möglicherweise als Regulator der rRNA Transkription. Das Protein ist in der basalen Zellschicht der Epidermis und in Haarfollikeln zu finden, nicht aber in ausdifferenzierten Zellen (215, 216). Zellen, die *Basonuclin1* exprimieren, sind fähig, sich zu teilen, befinden sich aber nicht zwangsläufig im Teilungszyklus (215, 216).

Die Microarray Studien erfolgten wie oben (Abs. 4.1.1) beschrieben. Für das Profil der mRNA Expression von *Basonuclin1* während der Regeneration der Leber erfolgte dasselbe Experiment wie oben (Abs. 4.1.2) beschrieben.

In den durchgeführten Microarrays wurde ein starkes Signal für das Gen am Tag E 9.5 p.c. in der fötalen Leber detektiert. Danach kommt es zu einer stetigen Abnahme des mRNA Gehaltes von *Basonuclin1* in der sich entwickelnden Leber. Zum Tag E 11.5 p.c. hat sich die Menge der mRNA bereits um die Hälfte reduziert. Vom Tag E 13.5 p.c. bis hin zur adulten Leber ist nur noch rund ein Zehntel der mRNA Menge vom Tag E 9.5 p.c. vorhanden (Abb. 4.6., S. 67).

Die mRNA von *Basonuclin1*, welche in der adulten Leber nur schwach nachweisbar ist, steigt innerhalb der ersten zwei Stunden nach p.H. signifikant um das 10fache an. Zwei Stunden später ist der Gehalt bereits wieder um das 6fache gesunken und sinkt innerhalb der nächsten acht Stunden fast gegen Null (=12 Stunden nach p.H.). 24 Stunden nach der p.H. erreicht der Gehalt der mRNA erneut einen signifikant erhöhten Wert, der dem von zwei Stunden nach der p.H. ähnelt, um dann wieder auf den Gehalt der adulten Leber zu sinken (Abb. 4.6, S. 67).

4.1.3.1.2. *Cyclin d2* (Acc.Nr.: NM_009829.3)

Cyclin d2 bildet Komplexe mit Cdk4 und Cdk6 (Cdk – cyclin dependent Kinase; cyclin abhängige Kinase) und ist wichtig für die Progression der G1-Phase. Durch den Abbau von Cyclin d2 wird das Ende der G1-Phase eingeleitet (217).

In der embryonalen Entwicklung der Leber ist Cyclin d2 für die Progression des Zellzyklus verantwortlich und wird negativ über den Stat-Signalweg reguliert (218). Über eine mögliche Funktion von Cyclin d2 in der regenerierenden Leber ist wenig bekannt.

Die Microarray Studien erfolgten wie oben (Abs. 4.1.1) beschrieben. Für das Profil der mRNA Expression von *Cyclin d2* während der Regeneration der Leber erfolgte dasselbe Experiment wie oben (Abs. 4.1.2) beschrieben.

Cyclin d2 wurde am Tag E 9.5 p.c. stark in der fötalen Leber exprimiert. Danach nimmt die Expression im weiteren Verlauf der Leberentwicklung stetig ab (Abb. 4.6, S. 67). Da in den Microarray Studien eine stärkere Expression von *Cyclin d2* als von *Cyclin d1* zu beobachten war, erfolgte die Untersuchung der mRNA Expression von *Cyclin d2* in der regenerierenden Leber.

Die *Cyclin d2* mRNA wird in der adulten Leber exprimiert und ist ebenfalls in den ersten Stunden nach der partiellen Hepatektomie (p.H.) nach zu weisen. Zwischen 6 - 12 Stunden nach der p.H. kommt es zu einer Abnahme des mRNA Gehaltes. Dieser reduzierte mRNA Gehalt bleibt zunächst konstant und steigt erst zwischen 24 – 48 Stunden nach p.H. an. Nach 48 Stunden ist derselbe Gehalt wie in der adulten Leber erreicht (Abb. 4.6, S. 67).

4.1.3.1.3. Ankyrin D1 (Acc.Nr.: NM_013468.3)

Ankyrin D1 ist ein Mitglied der konservierten Muskel Ankyrin Repeat Proteinfamilie (MARF). Das im Kern lokalisierte Protein wird vorwiegend in Herzgewebe exprimiert gefunden, aber auch in Endothel- und Skelettmuskelzellen.

Die Aktivierung der Expression des Gens kann durch Zytokine, welche durch physiologischen Stress oder Verletzung ausgeschüttet werden, erfolgen (219). Die DNA Bindungsaktivität von Ankyrin D1 lässt auf eine mögliche Funktion als Transkriptionsfaktor schließen (220, 221). Eine durch TGF β 1 hervorgerufene Überexpression von Ankyrin D1 führt zu einer Inhibierung der DNA-Synthese, was für Ankyrin D1 auf eine Funktion als negativer Regulator in der Zellzyklusprogression hindeutet (220).

Die Microarray Studien erfolgten wie oben (Abs. 4.1.1) beschrieben. Für das Profil der mRNA Expression von *Ankyrin D1* während der Regeneration der Leber erfolgte dasselbe Experiment wie oben (Abs. 4.1.2) beschrieben.

Das Gen *Ankyrin D1* wurde am Tag E 9.5 p.c. in der fötalen Leber stark exprimiert. Es kommt vom Tag E 7.5 p.c. zum Tag 9.5 p.c. zu einem Anstieg der mRNA um das 30fache. Danach nimmt der Gehalt der mRNA um das 11fache ab und in der adulten Leber ist nur noch 1/20 der ursprünglichen Menge vom Tag E 9.5 p.c. vorhanden (Abb. 4.6, S. 67).

Nach der Verletzung der Leber durch die p. H. erfolgt eine Expression von Ankyrin D1, die im Verlauf der Regeneration reguliert ist. In der adulten Leber wurde *Ankyrin D1* nicht exprimiert, jedoch kommt es nach der p.H. zu einem Anstieg des mRNA Gehaltes von *Ankyrin D1*. Nach 12 Stunden zeigte sich in Bezug auf den Wert von sechs Stunden ein signifikant 6fach erhöhter Wert. In den folgenden Stunden sinkt der Gehalt der mRNA erneut ab und erreicht annähernd den Wert von sechs Stunden nach partieller Hepatektomie (Abb. 4.6, S. 67).

4.1.3.1.4. Mest (Acc.Nr.: NM_008590.1)

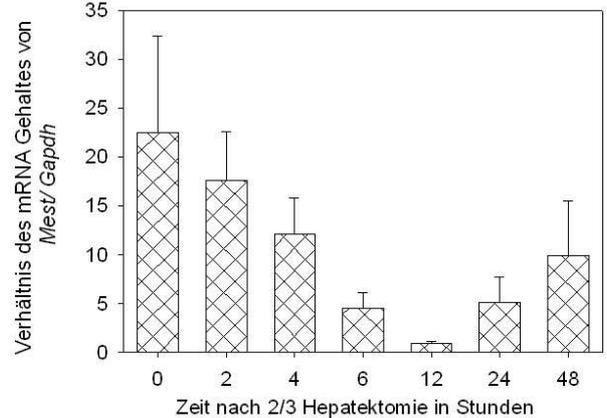
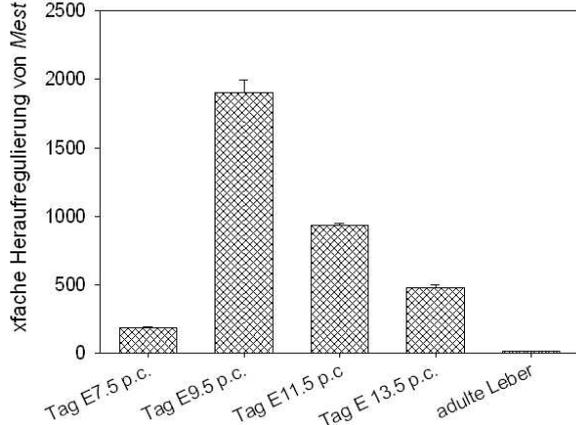
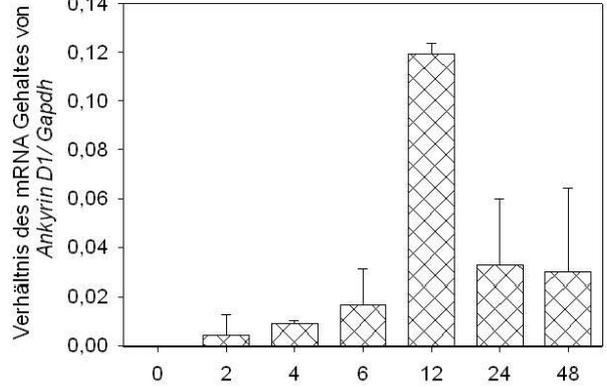
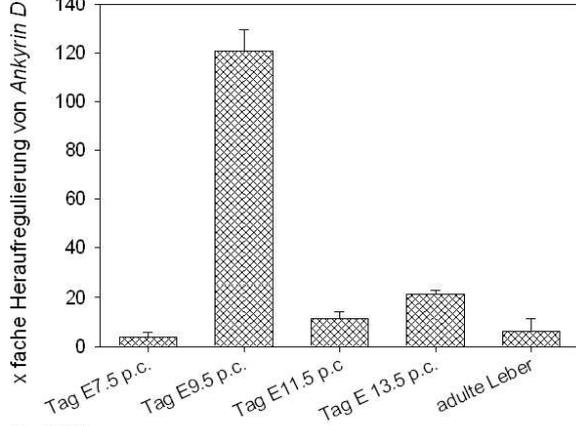
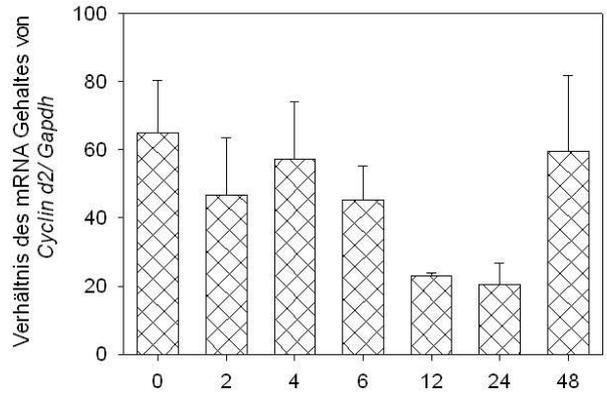
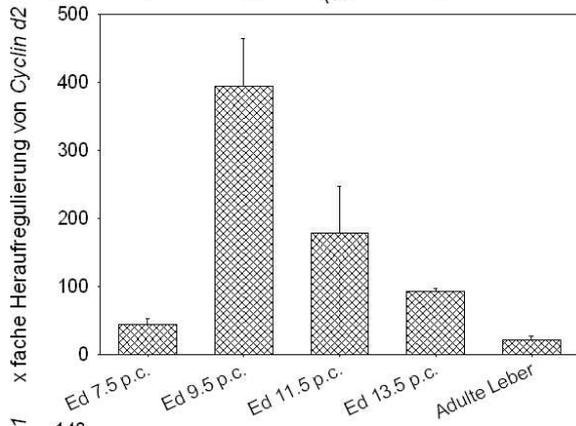
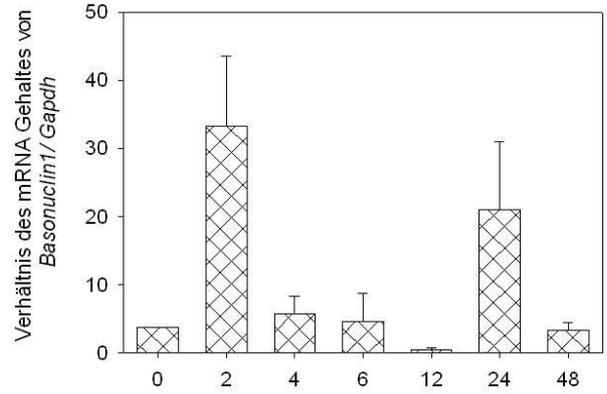
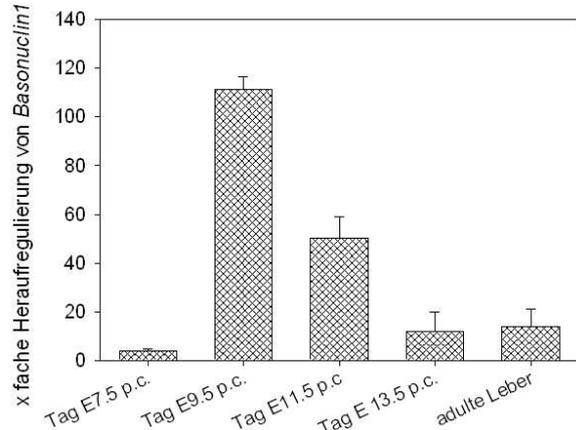
Mest, dessen Name auf die Expression im Mesoderm und seinen Derivaten zurückzuführen ist, wird maternal methyliert und über die paternale vererbte Version exprimiert (222, 223). Es ist im endoplasmatischen Retikulum und Golgi Apparat lokalisiert und, Sequenzvergleiche lassen auf eine enzymatische Aktivität schließen. Die stärkste Expression von Mest erfolgt während der frühen postnatalen Wachstumsphase mit dem Beginn der Fettmasseexpansion (224). In der adulten Maus sind bis auf das weiße Fettgewebe nur geringe Mengen von Mest nachzuweisen (225, 226).

Der Verlust der Methylierung von Mest korreliert mit der Zunahme des Körpergewichts und führt zu einem verzögerten Wachstum in der Maus (227). In transgenen Mäusen, die Mest in Fettgewebe überexprimieren, ist eine verstärkte Expression von adipösen Gene wie Ppar γ , C/ebp α und (aP)2 zu beobachten. Mest, durch seinen Einfluss auf Adipozyten, könnte als neuer Marker für die Größe von Adipozyten dienen (226).

Die Microarray und p.H Studien erfolgten wie oben (Abs. 4.1.1; Abs. 4.1.2).

Die Expression von *Mest* ist in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c. sehr stark und nimmt bis zum Stadium der adulten Leber kontinuierlich ab. Dabei ist eine annähernde Halbierung der Werte der anderen Stadien zu beobachten. (Abb. 4.6, S. 67).

Die Menge der *Mest* mRNA nimmt signifikant in den ersten 12 Stunden der Regeneration kontinuierlich ab. Nach 12 Stunden ist nur noch ca. 1/20 vom ursprünglichen mRNA Gehalt vorhanden. In dem Zeitraum von 12 zu 48 Stunden nimmt die Anzahl der Transkripte von *Mest* wieder zu (Abb. 4.6, S. 67).



Zeit nach 2/3 Hepatektomie in Stunden

Abbildung 4.6 Basonuclin1, Cyclin d2, Ankyrin D1 und Mest

mRNA Profil vom Microarray (Rechts) und nach partieller Hepatektomie (Links)

Für die Microarrays wurde in cRNA umgeschriebene Gesamt RNA aus Balb/C Mausembryonen Tag E 7.5 p.c., aus der fötalen Leber Tag E 9.5 p.c., 11.5 p.c., 13.5 p.c. und aus adulter Leber mit den Chips hybridisiert. Die detektierten Signale wurden in Clusteranalysen gegeneinander analysiert (Software Affymetrix) (N=2). Basonuclin1, Cyclin d2, Ankyrin D1 und Mest wurden am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert.

Für die p.H. wurden den 6-8 Wochen alten Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Die Werte der Gene wurden auf Gapdh normalisiert (N=5).

Basonuclin1 weist zwei erhöhte Werte (nach 2 und 24 Stunden) auf.

Cyclin d2 wurde während der Regeneration der Leber exprimiert. Von 12 bis 48 Stunden kommt es zu einer verringerten Expression von Cyclin d2.

Für das Gen Ankyrin D1 zeigte sich eine erhöhte Expression zwölf Stunden nach p.H..

Die Menge der Mest mRNA nimmt nach der Operation stetig ab und erreicht den kleinsten Wert 12 Stunden nach der Operation. Danach steigt die Expression wieder.

4.1.3.2. Transkriptionsfaktoren

4.1.3.2.1. *Pitx2* (Acc.Nr.: NM_001042502.1)

Von dem evolutionär hoch konservierten Transkriptionsfaktor *Pitx2* existieren durch alternatives Spleißen mehrere sich im N-Terminus unterscheidende Isoformen, die verschiedene Zielgene regulieren (228, 230). Zusammen mit *Pitx1* und 3 bilden sie eine neue Familie innerhalb der Homeodomäntranskriptionsfaktoren (230).

Pitx2 kontrolliert über den Wnt/Dvl/ β -Catenin Signalweg die Expression von zellzyklusspezifischen Genen der G1-Phase und dadurch die Proliferation in verschiedenen Geweben (231, 232). Die Wirkung der verschiedenen Isoformen ist jedoch in den Zellen unterschiedlich. Während *Pitx2a* in Hela Zellen durch die Akkumulation von p53 und p21 einen G0/G1 Zellzyklusarrest herbeiführen kann, bewirkt eine erhöhte *Pitx2c* Expression eine verstärkte Proliferation in Myoblasten und zeitgleich eine Inhibierung der Differenzierung (235, 236)

Neben der Kontrolle zellzyklusspezifischer Gene sind die Isoformen in weiteren Prozessen eingebunden. *Pitx2a* ist an der Regulierung der Aktin-Myosin Zytoskelettorganisation beteiligt und *Pitx2c* beeinflusst während der Embryogenese die links/rechts Asymmetrie in der Maus (235, 237, 238).

Während der Embryogenese der Maus führt das Fehlen von *Pitx2* zu Abnormalität in der Entwicklung des Herzens, der Augen und Zähne. Die fötale Leber ist in den *Pitx2*^{-/-} Mäusen verkleinert und weist eine verschlechterte Erythropoese auf (239).

Im Menschen bedingt *Pitx2* das Rieger Syndrom, einer autosomalen dominanten Krankheit (229). Der Phänotyp beim Fehlen von *Pitx2* zeichnet sich durch defekte Körperwandverschlüßungen und einer Hypoproliferation der Milz, Leber, Mandibeln und Linsen aus (240).

Die Microarray Studien erfolgten wie oben (Abs. 4.1.1) beschrieben. Für das Profil der mRNA Expression von *Pitx2* während der Regeneration der Leber erfolgte dasselbe Experiment wie oben (Abs. 4.1.2) beschrieben.

In den Microarrays zeigte sich eine starke Expression des Gens *Pitx2* am Tag E 9.5 p.c., die dann im weiteren Verlauf der Entwicklung stetig abnimmt. In der adulten Leber ist eine Expression von *Pitx2* kaum vorhanden (Abb. 4.7., S. 72).

In dem Regenerationsmodell der p. H. zeigte sich eine Expression von *Pitx2* 24 Stunden nach Entfernen von 2/3 der Leber (Abb. 4.7., S. 72).

4.1.3.2.2. *Zic1* (Acc.Nr.: NM_009573.3)

Die fünf hochkonservierten *Zic* Gene wurden erstmal während der Gastrulation identifiziert. Alle Gene haben ein räumlich stark beschränktes Expressionsmuster und sind auf das dorsale neuronale Ektoderm und das dorsale paraxiale Mesoderm begrenzt (241).

Zic1 kontrolliert die Expansion von neuronalen Vorläuferzellen durch die Inhibierung der neuronaler Differenzierung. Während der neuronalen und skelettären Entwicklung interagiert *Zic1* mit dem Protein Gli1 und zusammen regulieren sie sowohl ihre transkriptionelle Aktivität als auch über den Sonic Hedgehog Signalweg Gene wie *Cyclin d1*, *d2* und *Foxa2* (242). Weitere durch *Zic1* regulierte Gene sind Mitglieder der Sox Familie und Apolipoprotein E (243).

Klinisch sind die *Zic* Gene in das Joubert Syndrom und die Dandy-Walker Fehlbildung involviert. Das autosomal rezessive Joubert-Syndrom charakterisiert sich durch das Fehlen bzw. einer

Unterentwicklung des Vermis cerebelli. Die Erkrankten leiden unter anderen an Bewegungsstörungen und Problemen mit der Atmung. Die Dandy-Walker Fehlbildung, ebenfalls eine Erkrankung des zentralen Nervensystems, zeichnet sich durch eine Hypoplasie des Kleinhirnwurms aus. Das Krankheitsbild weist weiter eine verzögerte motorische Entwicklung und muskuläre Hypotonie auf. In Bezug auf die Leber ist bisher nichts bekannt (244).

Die Daten der Microarrays und partiellen Hepatektomie wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; Abs. 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Zic1* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht. In den anderen Stadien waren nur geringe Mengen *Zic1* mRNA nachweisbar (Abb. 4.7., S. 72).

In der adulten Leber ist die *Zic1* mRNA nicht zu nachweisbar. Sechs Stunden nach der partiellen Hepatektomie ist die mRNA von *Zic1* erstmals nachweisbar. Danach wurde die Expression jedoch wieder herunterreguliert und ist später nicht mehr nachzuweisen (Abb. 4.7., S. 72).

4.1.3.2.3. *Twist1* (Acc.Nr.: NM_011658.2)

Twist1 gehört in die Klasse der Helix loop Helix Transkriptionsfaktoren, welche in der DNA die E-Box erkennen (245). Das Gen ist wichtig für die Gastrulation und mesodermale Formierung, da es an Prozessen beteiligt ist, in denen die Wanderung von Zellen wichtig. Der Transkriptionsfaktor ist erforderlich für Fgf vermittelte epitheliale-mesenchymale Signalwege und wirkt positiv auf das Überleben von Zellen während der Morphogenese der Extremitäten (246, 247). Der Verlust von *Twist1* führt zu veränderten Expressionsmustern der Fgf und Bmps und Genen, die mit dem Shh Signalweg assoziierte sind (248).

Die Aktivität von *Twist1* erstreckt sich nur über einen kurzen Zeitraum während der embryonalen Entwicklung und ist im weiteren Verlauf des Lebens in gesunden Individuen stillgelegt. Jedoch ist die Metastierung von Tumoren häufig begleitet von einer erneuten Expression von *Twist1*, die klinisch meist mit einer schlechten Diagnose einhergeht. *Twist1* bewirkt einen epithelialen-mesenchymalen Übergang in den Zellen der betroffenen Gewebe, was zu einer verstärkten Zellmobilität führt. Eine Inhibierung von *Twist1* bedingt eine verschlechterte Metastierung von Tumoren (249, 250, 251). Die verstärkte Zellmobilität wird vermutlich durch eine verschlechterte Zell-Zelladhäsion und einer Aktivierung von mesenchymalen Markern hervorgerufen (251).

Klinisch spielt *Twist1* eine direkte Rolle in dem Saethre-Chotzen Syndrom, eines autosomalen-dominanten Kraniosynostose-Syndroms, welches durch eine prämatüre Koronarnaht-Synostose und Extremitätenanomalien gekennzeichnet ist. Der Phänotyp ist variabel und weist einige fakultative Fehlbildungen auf. In 60 bis 70% der Fälle geht das Syndrom mit einer Mutation im *Twist1* Gen einher.

Die Daten der Microarrays und partiellen Hepatektomie wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; Abs. 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Twist1* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht und sinkt danach gleich wieder ab (Abb. 4.7., S. 72).

In der adulten Leber ist die *Twist1* mRNA nur in geringen Mengen nachzuweisen. Vier Stunden nach der p. H. kommt es zu einer stark erhöhten Expression von *Twist1*, die in den folgenden Stunden allerdings wieder herabreguliert wurde. Bereits 12 Stunden nach der p.H. liegt der Gehalt der mRNA auf demselben Niveau wie in der adulten Leber (Abb. 4.7., S. 72).

4.1.3.2.4. Sox11 (Acc.Nr.: NM_009234.6)

Dies intronlose Gen kodiert ein Mitglied der Sox (SRY-verwandte HMG-box) Transkriptionsfaktorfamilie, die an verschiedenen Prozessen in der embryonalen Entwicklung und an der Bestimmung von Zellschicksalen beteiligt sind. Der Transkriptionsfaktor Sox11 wird während der embryonalen Entwicklung vorübergehend in Geweben exprimiert, die sich in einer induktiven Umgestaltung befinden.

Sox11(-/-) Mäuse sterben bei der Geburt an einer angeborenen Zyanose, die meist auf Missbildungen des Herzens zurückzuführen sind. Es zeigten sich starke Defekte wie kraniofaziale und skeletäre Fehlbildungen, Asplenie und Hypoplasie der Lunge und der Pankreas (252). Daneben führt das Fehlen von Sox11 zu einer verschlechterten Regeneration von myelinisierten und nicht myelinisierten Axonen und deutet auf eine wichtige Aufgabe bei dem Regenerationsprogramm der Nerven nach einer Verletzung hin (253). Sox11 unterstützt das Überleben von Neuronen, das Wachstum von Neuriten und verhindert durch die Aktivierung der neuronalen Differenzierung die Tumorgenese von Zellen (254).

Die Daten der Microarrays und partiellen Hepatektomie wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; Abs. 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Sox11* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht und nimmt bereits zum Tag E 11.5 p.c. ca. um 2/3 ab (Abb. 4.7., S. 72).

In der adulten Leber ist die mRNA von *Sox11* in geringen Mengen nachweisbar. In den ersten 2 Stunden nach der partiellen Hepatektomie kommt es zu einer verstärkten mRNA Expression von *Sox11*, die in den folgenden zwei Stunden kurz wieder herabreguliert wurde, um dann in den darauffolgenden 8 Stunden wieder anzusteigen. Anschließend nimmt die mRNA Expression von *Sox11* wieder ab (Abb. 4.7., S. 72).

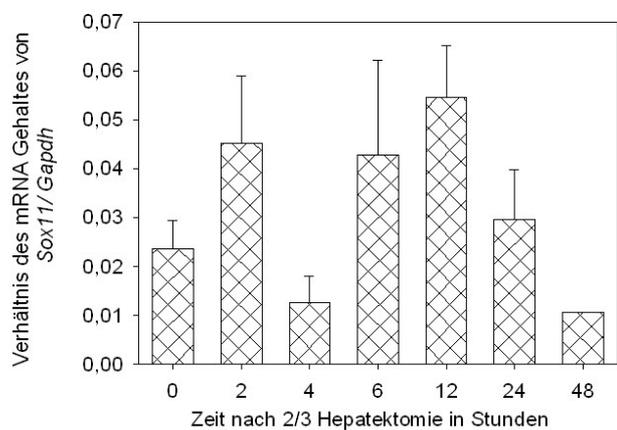
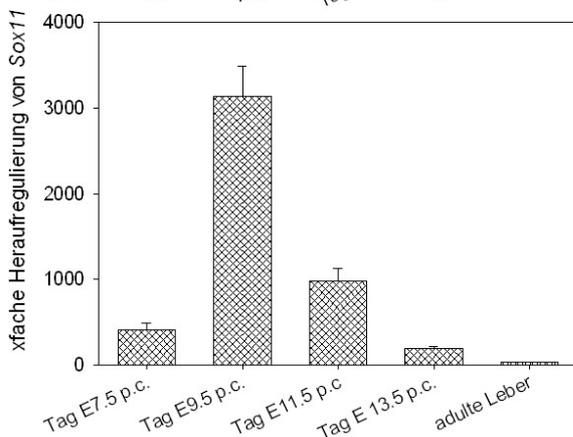
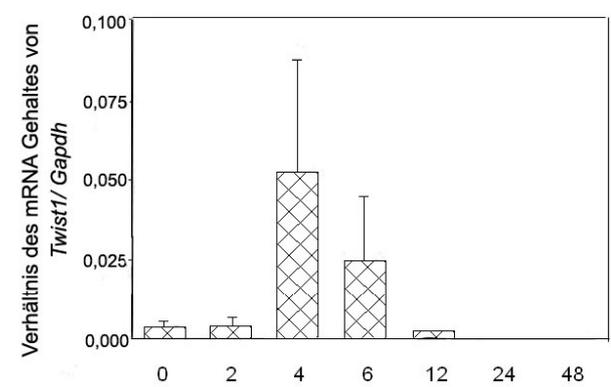
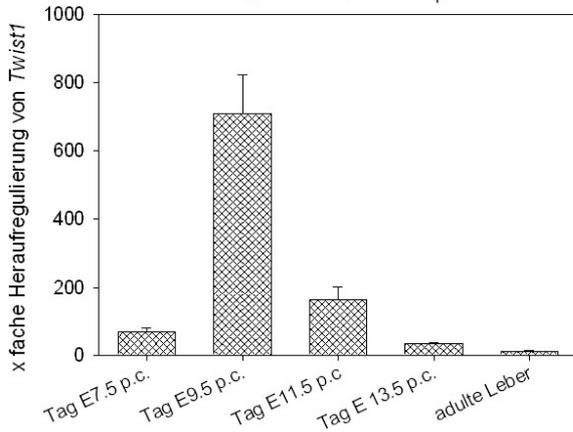
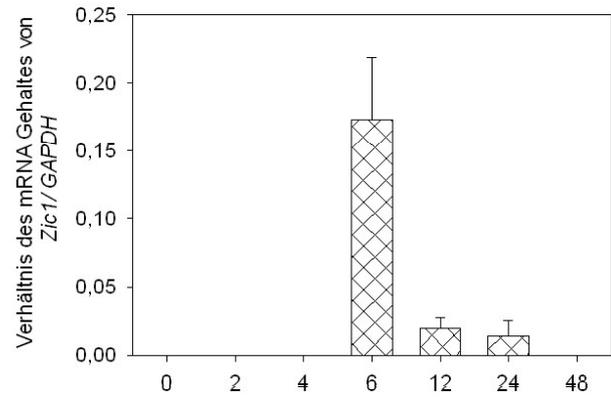
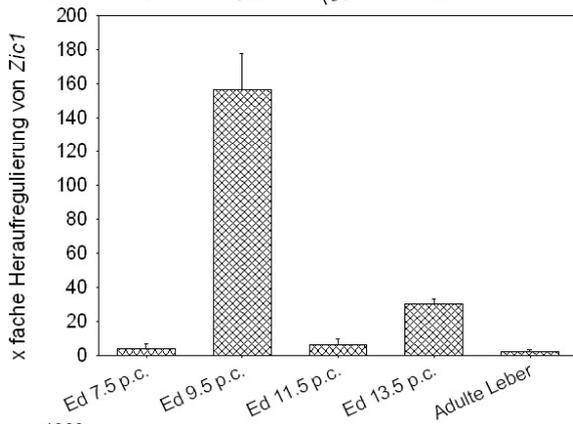
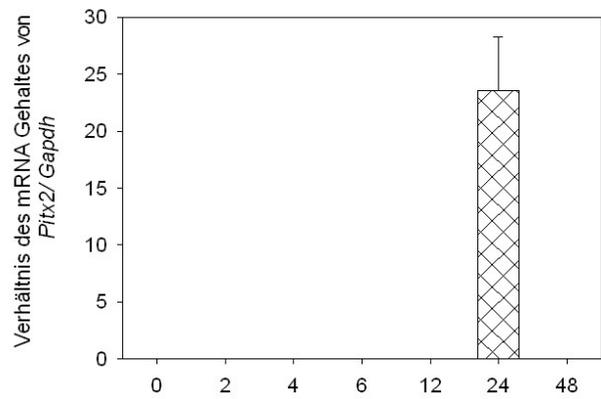
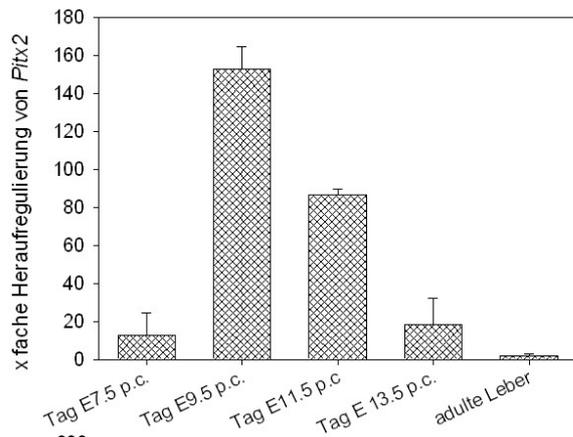


Abbildung 4.7 Pitx2, Zic1, Twist1 und Sox11

mRNA Profil vom Microarray (Rechts) und nach partieller Hepatektomie (Links)

Für die Microarray Daten der Gene: Es wurde Gesamt RNA aus Balb/C Mausembryonen Tag E 7.5 p.c. und aus der fötalen Leber Tag E 9.5 p.c., 11.5 p.c., 13.5 p.c. und aus adulter Leber isoliert und in cRNA umgeschrieben. Die Microarray Chips wurden mit dieser cRNA hybridisiert. Die detektierten Signale wurden in Clusteranalysen gegeneinander analysiert (Software Affymetrix) (N=2). Pitx2, Zic1, Twist1 und Sox11 wurden am Tag E 9.5p.c. stark exprimiert.

Für das mRNA Expressionsprofil der Gene nach partieller Hepatektomie wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf Gapdh (N=5).

Pitx2 wurde 24 Stunden nach p.H. exprimiert.

Sechs Stunden nach Beginn der Regeneration ist eine verstärkte Expression von Zic1 zu beobachten.

Für die Twist1 mRNA zeigte sich eine verstärkte Expression 4 Stunden nach Beginn der Regeneration.

Sox11 wurde 2 und 12 Stunden nach Beginn der Regeneration verstärkt exprimiert

4.1.3.2.5. Nr2f1 (Acc.Nr.: NM_010151.2)

Nr2f1 ist ein Mitglied der Ligand aktivierten Orphan - Kernrezeptorfamilie, deren Liganden jedoch nicht bekannt sind. Während der Entwicklung des Embryos unterstützt Nr2f1 die Differenzierung verschiedener Zelltypen. So hat Nr2f1 Einfluß auf die Entwicklung der Ohrbläschenvesikeln und auf die Differenzierung von Haarzellen und Oligodendrozyten (255, 256).

Nr2f1 reguliert direkt oder als Ko-Faktor verschiedene Gene, die häufig metabolische Enzyme kodieren (257). In verschiedenen Organismen zeigte sich eine entweder antagonistisch oder synergistisch Regulierung von Genen wie Hnf1, Angiotensinogen, Pepck oder Erythropoietin durch Nr2f1 und Hnf4a (258, 259, 260, 89).

Die Daten der Microarrays und partiellen Hepatektomie wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; Abs. 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Nr2f1* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht und nimmt danach schnell wieder ab (Abb. 4.8., S. 76).

In der adulten Leber ist die mRNA von *Nr2f1* in geringen Mengen nachweisbar. Während der Regeneration unterliegt die mRNA Expression des Gens Schwankungen. In den ersten 2 Stunden nach der partiellen Hepatektomie fällt der Gehalt der mRNA noch weiter ab und steigt erst 12 Stunden nach partiellen Hepatektomie wieder an (Abb. 4.8., S. 76).

4.1.3.2.6. Gtf2h1 (Acc.Nr.: NM_008186.4)

Gtf2h1 ist die größte Untereinheit des Transkriptionsfaktor Tf2h, der an dem Prä-Initiationskomplex der RNA Polymerase III beteiligt ist. Die RNA-Polymerase III ist wichtig für Transkription von kleineren RNA Molekülen wie tRNA, 5s und 7s RNA. Diese kleinen RNA Moleküle sind essentiell für die Translation der mRNAs und werden benötigt, umso nach einer Verletzung die Veränderung im Proteinprofil der Zelle zu gewährleisten (261, 262).

In Hepatozyten ist Gtf2h1 mitverantwortlich für die Bildung von Mallory Körpern (264). Mallory Körper sind Einschlusskörper in den Leberzellen, die besonders bei der alkoholtoxischen Hepatitis auftreten, aber auch bei anderen Erkrankungen der Leber wie zum Beispiel der primären biliären Zirrhose oder dem Morbus Wilson vorkommen.

Daneben reguliert Gtf2h1 durch die Phosphorylierung von E2f1 dessen Degradation während der S-Phase (265, 266).

Die Daten der Microarrays und partiellen Hepatektomie wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; Abs. 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Gtf2h1* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht und nimmt dann langsam wieder ab (Abb. 4.8., S. 76).

In der adulten Leber ist die mRNA von *Gtf2h1* nachweisbar. Nach der p.H. kommt es zu einer Regulierung der mRNA Expression von *Gtf2h1*. Nach zwei und sechs Stunden ist die mRNA Menge um ca. das Doppelte erhöht als im Vergleich zur gesunden Leber. Zwischen 6 und 48 Stunden ist eine Abnahme der mRNA Expression zu beobachten (Abb. 4.8., S. 76).

4.1.3.2.7. Hmga2 (Acc.Nr.: NM_010441.2)

Das Hmga2 Protein gehört zur Familie der HMG-Proteine (High Mobility Group-Proteine), und wurde erstmals 1973 beschrieben (267, 268). Sie sind chromatinassoziierte Proteine, die als architektonische Transkriptionsfaktoren an AT-reiche Regionen der DNA binden und nicht zu den

Histonen zählen (269). HMG-Proteine beeinflussen den strukturellen Zusammenbau verschiedener Kernproteine, welche an der Transkription, der Replikation, der Chromatin-Konformation sowie der Integration von Retroviren in das Chromosom beteiligt sind. Dies geschieht über diverse Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen (270, 271, 272).

Im Embryo ist Hmga2 an der Regulierung des Wachstums und der Differenzierung von Zellen beteiligt (273, 263). Vermutlich kann Hmga2 embryonale Stammzellen in einen undifferenzierten Zustand halten (274). Die Regulierung des Zellwachstums erfolgt vermutlich durch die Expression von Cyclin A (275). Ferner ist Hmga2 in das transkriptionelle Netzwerk involviert, welches zu einer EMT führt. Hmga2 reguliert über TGF β die Expression bekannter EMT Regulatoren wie Snail und Twist1 (1.3.2.3), was schlussendlich zu einer verschlechterten Zell-Zelladhäsion führt (276, 277).

Die Daten der Microarrays und partiellen Hepatektomie wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; Abs. 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Hmga2* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht, nimmt innerhalb der nächsten zwei Tage langsam ab und dann bis zur Geburt sehr stark (Abb. 4.8., S. 76).

In der adulten Leber ist die mRNA von *Hmga2* in geringen Mengen nachweisbar. Im Lightcycler 480 (LC 480) (Fa. Roche) mit dem gewählten Analyseprogramm (abs. Quantifizierung/ 2nd derivative Max.) zeigte sich für die adulte Leber und 2 Stunden nach partieller Hepatektomie ein Ct-Wert von 35. Zwischen 4 und 12 Stunden kommt es zu einem Anstieg der mRNA mit einem kleinen Ct-Wert (29) nach 6 Stunden nach partieller Hepatektomie. Danach sinkt der mRNA Gehalt wieder und die mRNA ist erst nach 35 Zyklen zu detektieren (Abb. 4.8., S. 76). Bei einer perfekten qPCR zeigte der Unterschied von 3,3 Zyklen zwischen zwei Proben einen Mengenunterschied der Matrize von einer Zehnerpotenz an. Die Veränderung des Ct-Wertes von 35 auf 29 bei *Hmga2* deutet somit auf eine ca. 100fache erhöhte Menge der mRNA zwischen der Probe von sechs Stunden und den anderen Proben hin.

4.1.3.2.8. Meox 1 (Acc.Nr.: NM_010791.3)

Das homeobox Gen *Meox1* wird in den Somiten und deren Derivaten während der Embryogenese exprimiert. Es reguliert die Formierung und Differenzierung der Somiten, die chondrozytische und myogenische Differenzierung und die Spezifizierung mesodermaler Zellen (278, 279). Das Fehlen des Proteins Meox1 stört die sklerotome Polarität und führt zu einer Umgestaltung der kraniozervikalen Gelenke des axialen Skeletts. Meox1 bindet an evolutionär konservierte Promoterregionen wie von Genen *Tbx18*, *Uncx* und *Bapx* und reguliert deren Transkription (280, 281).

Die Daten der Microarrays und partiellen Hepatektomie wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; Abs. 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Meox1* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht und nimmt danach sofort wieder ab (Abb. 4.8., S. 76).

In der adulten Leber ist die mRNA von *Meox1* nicht zu detektieren. Jedoch zeigen sich 4 und 12 Stunden nach der partiellen Hepatektomie Spuren der *Meox1* mRNA, die bei der Messung mit dem Lightcycler 480 und dem gewählten Analyseprogramm (abs. Quantifizierung/ 2nd derivative Max.) erst bei einem Zyklus von 35 (Gesamtzyklenzahl 40) zu detektieren waren. Die Proben wurden deshalb auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.8., S. 76).

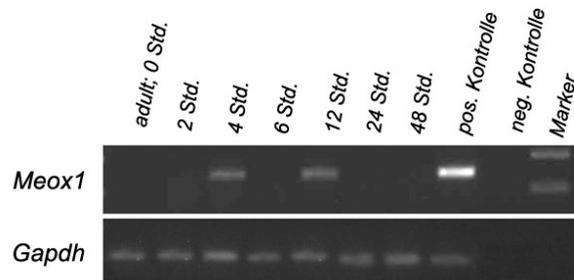
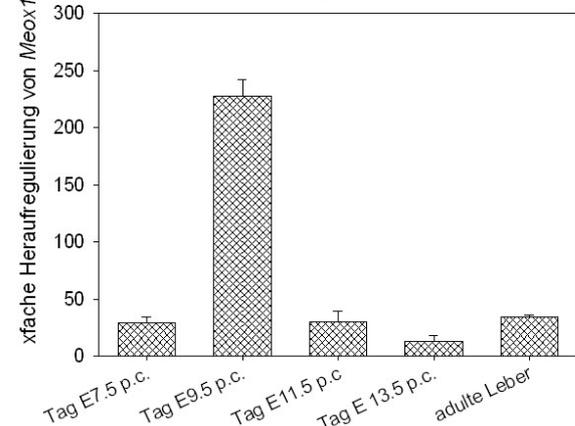
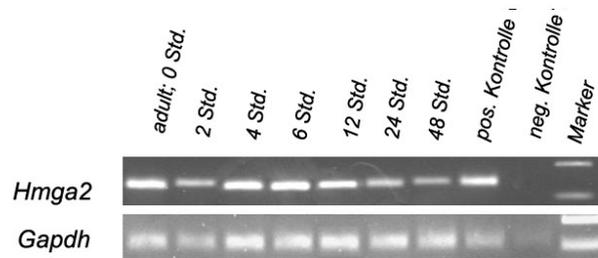
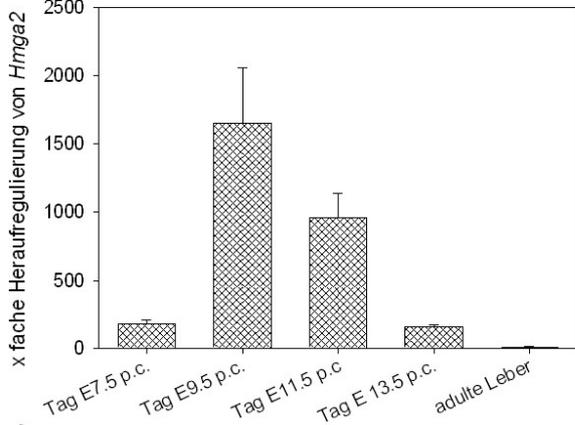
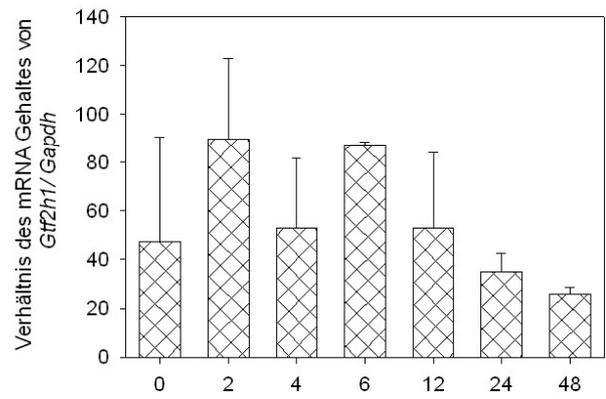
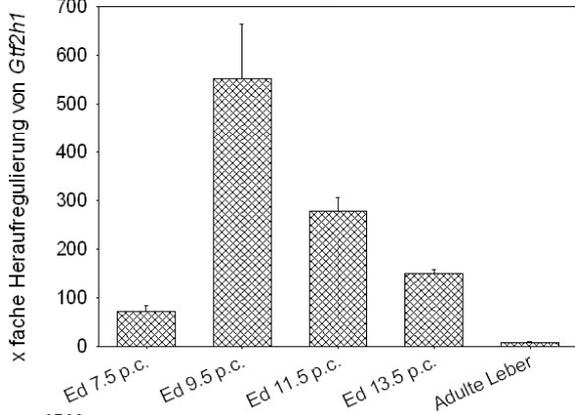
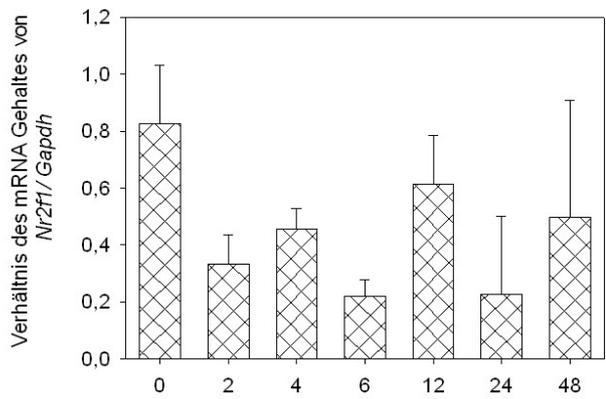
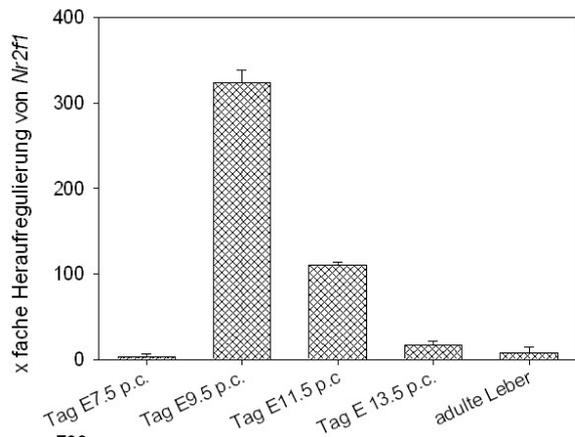


Abbildung 4.8 Nr2f1, Gtf2h1, Hmga2 und Meox1

mRNA Profil vom Microarray (Rechts) und nach partieller Hepatektomie (Links)

Für die Microarray Daten der Gene: Es wurde Gesamt RNA aus Balb/C Mausembryonen Tag E 7.5 p.c., aus der fötalen Leber Tag E 9.5 p.c., 11.5 p.c., 13.5 p.c. und aus adulter Leber isoliert und in cRNA umgeschrieben. Die Microarray Chips wurden mit dieser cRNA hybridisiert. Die detektierten Signale wurden in Clusteranalysen gegeneinander analysiert (Software Affymetrix) (N=2). Nr2f1, Gtf2h1, Hmga2 und Meox1 wurden am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert (N=2).

Für das mRNA Expressionsprofil der Gene nach partieller Hepatektomie wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf Gapdh (N=5).

Obwohl Nr2f1 in der adulte Leber schwach exprimiert, sinkt der Gehalt weiter ab und steigt erst nach 12 Stunden wieder an.

Für das Gen Gtf2h1/ TFIIH zeigte sich eine verstärkte Expression 2 und 12 Stunden und eine verringerte Expression 4 bzw. 48 Stunden nach Beginn der Regeneration.

Aufgrund der geringen Expression von Hmga2 und Meox1 wurden die Gene nicht quantifiziert und zur Darstellung auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde Gapdh aufgetragen (N=3). Es ist eine verstärkte Expression des Gens Hmga2 zwischen 4 und 12 Stunden. Für Meox1 zeigte sich eine schwache Expression nach 4 und 12 Stunden.

4.1.3.2.9. *Shox2* (Acc.Nr.: NM_013665.1)

Die Homeoboxgenfamilie, zu der *Shox2* gehört, ist in Vertebraten stark konserviert und scheint an der Regulierung der Größe des Organismus beteiligt zu sein (282, 283, 284). Mutationen in *Shox* führen zu verschiedenen klinischen Syndromen, die häufig von Kleinwüchsigkeit geprägt sind (Leri-Weill, Langer und Turner Syndrom) (283, 284). Der komplette Verlust von *mShox2* führt in Mäusen zur embryonalen Letalität (285). Expressionsdaten von hSHOX in Muskeln, vaskulären Gewebe und Gehirn weisen auf Funktionen in der Myo-, Angio-, Chondrogenese und neuronalen Entwicklung hin (286, 287, 289; <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/SHOX2.100141.0.html>).

Die *Shox* Gene wirken auf transkriptioneller und translationeller Ebene als Repressoren (288; <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/SHOX2.100141.0.html>).

Die Daten der Microarrays und partiellen Hepatektomie wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; Abs. 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Shox2* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht und sinkt dann bis zum ausgereiften Organ langsam ab (Abb. 4.9., S. 80).

In der adulten Leber und in den ersten vier Stunden ist die mRNA von *Shox2* in sehr geringen Mengen nachweisbar. Bei der quantitativen Analyse war die mRNA bei der Messung mit dem Lightcycler 480 und dem gewählten Analyseprogramm (abs. Quantifizierung/ 2nd derivative Max.) erst bei einem Zyklus von 35 (Gesamtzyklenzahl 40) zu detektieren. Die Proben wurden deshalb auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.9., S. 80).

4.1.3.2.10. *Gli1* (Acc.Nr.: NM_010296.2)

Der Sonic Hedgehog (Shh) Signalweg reguliert die Entwicklung und Homeostasis vieler verschiedener Organe und *Gli1* ist ein wichtiges Vermittlerprotein des Signalweges.

Obwohl Sonic Hedgehog in dem Teil des Entoderms exprimiert wird, aus dem die Leber entsteht, ist keine Expression nach Beginn der Leberknospenbildung nachzuweisen. Welche Rolle der Signalweg in der Entwicklung der Leber einnimmt und ob im Verlauf der Entwicklung Sonic Hedgehog erneut exprimiert wird ist bisher unklar. Ab Tag E 11.5 p.c. wird Shh und *Gli1* in Hepatoblasten exprimiert und unterstützt die Proliferation dieser Zellen. Für die folgende hepatische Differenzierung wird der Signalweg allerdings in Hepatoblasten ausgeschaltet (290).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Gli1* mRNA wurde am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert und nimmt im weiteren Verlauf der Entwicklung der Leber langsam ab (Abb. 4.9., S. 80).

In der adulten Leber und in den ersten sechs Stunden nach der partiellen Hepatektomie ist die mRNA von *Gli1* in geringen Mengen nachweisbar. Jedoch waren die Signale im Lightcycler 480 unter dem gewählten Analyseprogramm (abs. Quantifizierung/ 2nd derivative Max.) erst bei einem Zyklus von 35 (Gesamtzyklenzahl 40) zu detektieren, weshalb keine weitere Quantifizierung erfolgte und die Proben mittels einen Agarosegel dargestellt wurden (Abb. 4.9., S. 80).

4.1.3.2.11. *Foxd1* (Acc.Nr.: NM_008242.2)

Dieses intronlose Gen gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch verschiedene Forkhead Domänen charakterisiert sind (291).

Bei der Entwicklung der Niere ist *Foxd1* bei der Bestimmung der verschiedenen Zonen von Bedeutung, die für das spätere radiale Muster des Organs wichtig sind. Die genetische Deletion

von *Foxd1* resultiert in renalen Abnormalitäten, vor allem in einer nicht korrekten Ausbildung der renalen Kapsel (292).

Foxd1 reguliert die temporäre Expression von verschiedenen Genen, jedoch ist über die genauen Zielgene bisher nicht viel bekannt. *Foxd1* scheint als Repressor zu wirken und beeinflusst die Bmp Signalkaskade (292, 293).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Foxd1* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht und nimmt danach sofort wieder ab (Abb. 4.9., S. 80).

Die Expression der *Foxd1* mRNA nach p. H. wurde im LC 480 mit dem Analyseprogramm abs. Quantifizierung/ 2nd derivative Max. ausgewertet.

In der adulten Leber und den ersten sechs Stunden nach p.H. ist die mRNA von *Foxd1* nicht nachweisbar. Zwölf Stunden nach p. H. zeigte sich ein schwaches Signal, welches nach 24 Stunden erhöht ist. Danach ist keine Expression von *Foxd1* nachweisbar. Jedoch konnte dieses Signal nicht in jeder getesteten Probe beobachtet wurden (Abb. 4.9., S. 80).

4.1.3.2.12. *Hoxa1* (Acc.Nr.: NM_010449.4)

Die Expression der Homeoboxtranskriptionsfaktoren, welche in Clustern (A, B, C und D) auf 4 verschiedenen Chromosomen gruppiert sind, unterliegt während der embryonalen Entwicklung einer strengen räumlichen und zeitlichen Regulierung. Veränderungen der Genexpressionsmuster resultieren in homöotischen Veränderungen und Missbildungen im Embryo. In *Drosophila melanogaster* kontrolliert die Homeoboxtranskriptionsfaktoren die Segmentierung und die Identität der Segmente (294).

Hoxa1 ist das erste Gen des Homeobox A Cluster auf Chromosom 7 (295). Mutationen in dem Gen stehen im Zusammenhang mit dem Bosley-Salih-Alorainy Syndrom (296). Das Fehlen des *Hoxa1* Gens führt zu entwicklungsbedingten Abnormalitäten und führt schlussendlich zum neonatalen Tod.

Die Analyse von *Hoxa1*^{-/-} Zellen offenbarte eine Vielzahl von Zielgenen, die in den unterschiedlichsten Bereichen wirken (Entwicklung der Knochen (*Col1a1* und *Osf2*), Entwicklung des Gehirns (*Wnt3a* und *RhoB*) und in diversen anderen zellulären Prozessen (*Sox17*, *Cdkn2b*, *Col4a1* und *Foxa2*)) (297, 298). *Hoxa1* scheint die entodermale Differenzierung zu unterdrücken, während die Expression von ektodermalen und mesodermalen Markern gefördert wird (297, 298).

Eine verstärkte Expression von *Hoxa1* in Tumoren führt zu einer verbesserten Proliferation und Überleben der Karzinomzellen (299, 300).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *HoxA1* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht und sinkt danach schnell ab (Abb. 4.9., S. 80).

Die Expression der *Hoxa1* mRNA nach der p.H. wurde im LC 480 mit dem Analyseprogramm abs. Quantifizierung/ 2nd derivative Max. ausgewertet. Dabei zeigte sich für die adulte Leber und den Proben 4, 6 und 12 Stunden nach p. H. ein Signal nach 35 Zyklen. Aufgrund des schwachen Signals wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.9., S. 80).

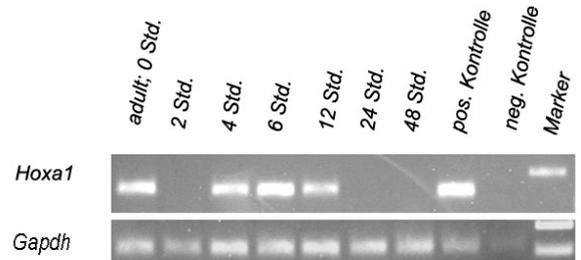
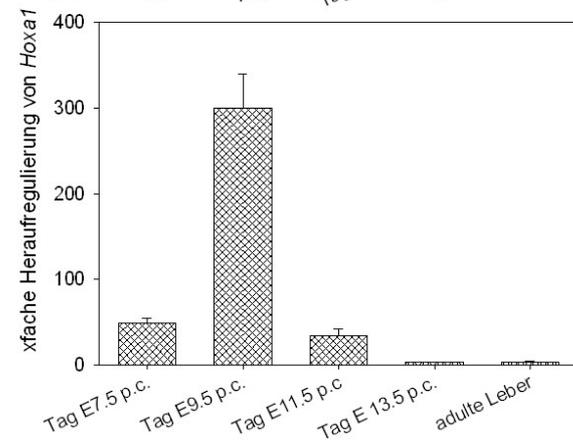
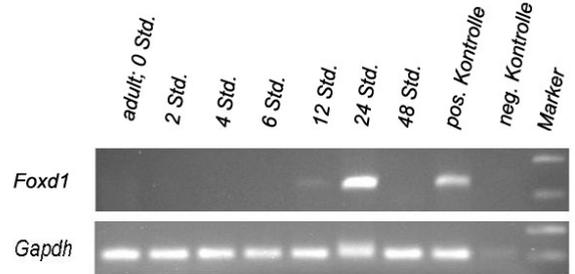
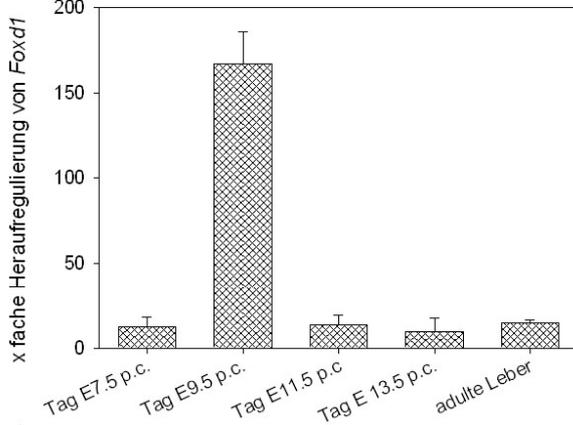
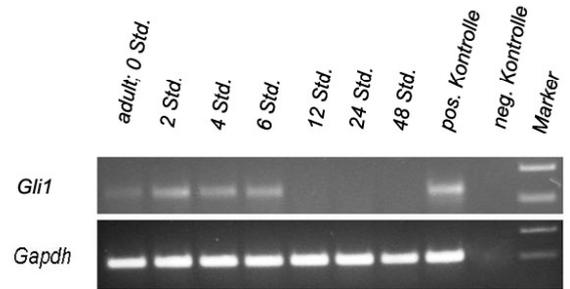
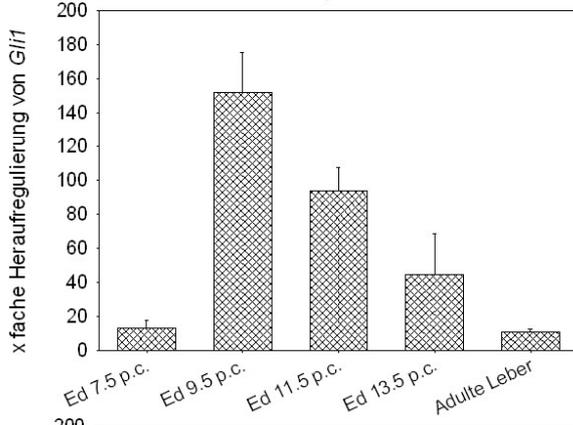
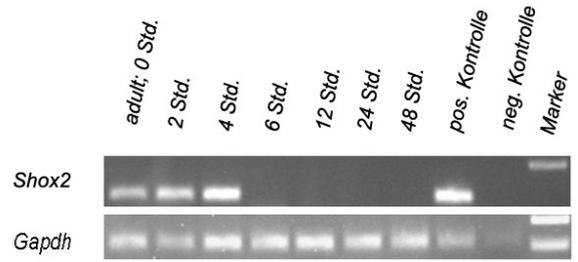
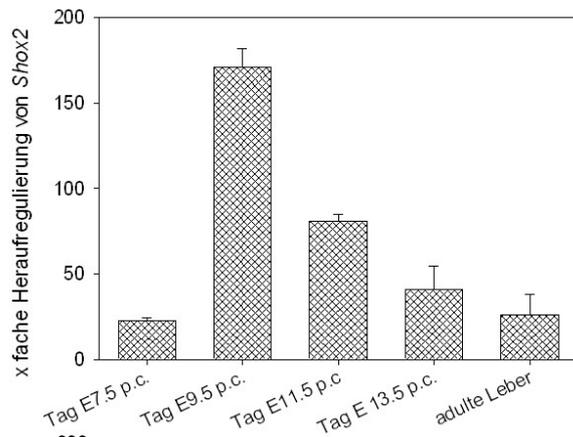


Abbildung 4.9 Shox2, Gli1, Foxd1 und Hoxa1

mRNA Profil vom Microarray (Rechts) und nach partieller Hepatektomie (Links)

Für die Microarray Daten der Gene: Es wurde Gesamt RNA aus Balb/C Mausembryonen Tag E 7.5 p.c., aus der fötalen Leber Tag E 9.5 p.c., 11.5 p.c., 13.5 p.c. und aus adulter Leber isoliert und in cRNA umgeschrieben. Die Microarray Chips wurden mit dieser cRNA hybridisiert. Die detektierten Signale wurden in Clusteranalysen gegeneinander analysiert (Software Affymetrix) (N=2). Shox2, Gli1, Foxd1 und Hoxa1 wurden am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert.

Für das mRNA Expressionsprofil der Gene nach p. H. wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Als Ladekontrolle wurde Gapdh mit aufgetragen (N=3).

Es zeigte sich eine schwache Expression des Gens Shox2 in der adulten Leber und in den ersten 4 Stunden nach partieller Hepatektomie.

Für Gli1 zeigte sich eine schwache Expression in den ersten sechs Stunden nach der partiellen Hepatektomie.

Foxd1 wurde nach 24 Stunden exprimiert, jedoch war das Signal nicht in allen Proben zu sehen.

Es ist eine schwache Expression des Gens Hoxa1 in der adulten Leber und in dem Zeitraum von 4 – 12 Stunden zu beobachten.

4.1.3.2.13. *Hoxd4* (Acc.Nr.: NM_010469.2)

Während der Embryogenese wird *Hoxd4* in dem Hintergehirn, der Wirbelsäule und anderen Geweben exprimiert. In dem adulten Organismus wird *Hoxd4* vor allem in den Hoden und den Niere exprimiert und zu einen geringen Anteil auch im Darm und im Herz.

Hoxd4 (-/-) und (+/-) Mäuse zeigen Missbildungen zwischen den Halswirbeln C1 bis C3. Dieser Phänotyp ist ebenfalls in dem Knorpelskelett der Embryonen von Tag 14.5 p.c. zu beobachten, wobei in den Somiten der Embryonen vom Tag E 9.5 p.c. kein Unterschied zu sehen ist. Vermutlich beginnen sich die Abnormalitäten ab Tag E 9.5 p.c. zu entwickeln oder nach der Resegmentierung der Somiten (301). Dagegen führt die Überexpression von *Hoxd4* zu schweren Knorpeldefekten aufgrund einer verzögerten Knorpelreifung (303).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Der Gehalt der *Hoxd4* mRNA am Tag E 9.5 p.c. ist im Vergleich zu den anderen Stadien stark erhöht, sinkt jedoch zum Tag E 11.5 p.c. und im weiteren Verlauf der Entwicklung weiter herab (Abb. 4.10).

Die Expression der *Hoxd4* mRNA nach der p. H. wurde im LC 480 mit dem Analyseprogramm abs. Quantifizierung/ 2nd derivative Max. ausgewertet. Nach 24 Stunden ist ein Signal zu beobachten, jedoch nicht in allen getesteten Proben. Aufgrund des schwachen Signals wurden die Proben mit *Gapdh* als Ladekontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.10).

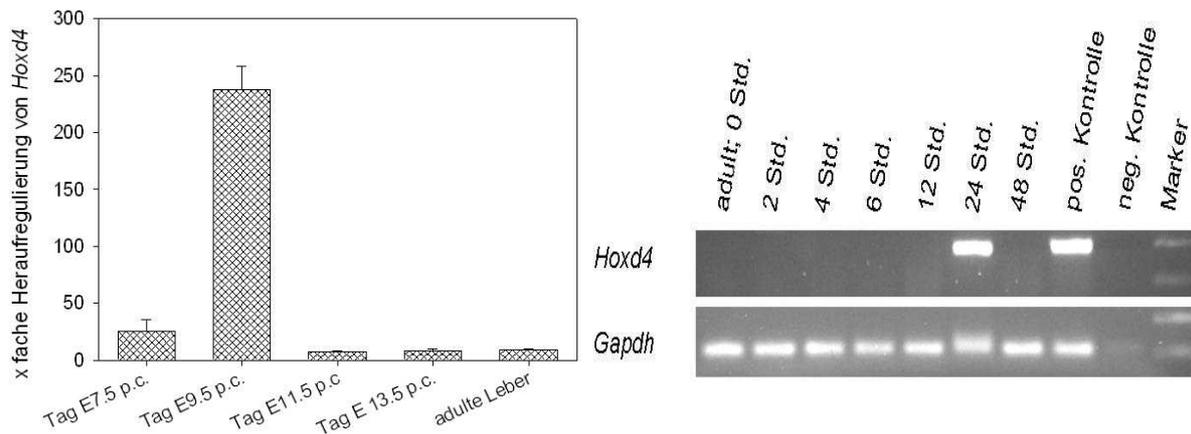


Abbildung 4.10 *Hoxd4*

mRNA Profil vom Microarray (Rechts) und nach partieller Hepatektomie (Links)

Für die Microarray Daten von *Hoxd4*: Es wurde Gesamt RNA aus Balb/C Mausembryonen Tag E 7.5 p.c., aus der fötalen Leber Tag E 9.5 p.c., 11.5 p.c., 13.5 p.c. und aus adulter Leber isoliert und in cRNA umgeschrieben. Die Microarray Chips wurden mit dieser cRNA hybridisiert. Die detektierten Signale wurden in Clusteranalysen gegeneinander analysiert (Software Affymetrix). *Hoxd4* wurde am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert (N=2).

Für das mRNA Expressions von *Hoxd4* nach p. H. wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Aufgrund der schwachen/ fehlenden Signale wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und als Ladekontrolle *Gapdh* (N=3). Es zeigte sich vereinzelt eine Expression des Gens *Hoxd4* nach 24 Stunden nach p. H..

4.1.3.3. Wachstumsfaktoren

4.1.3.3.1. *Gap43* (Acc.Nr.: NM008083)

Gap43 wurde entdeckt als ein membrangebundenes Phosphoprotein in optischen Neuronen von Fröschen. Während der Entwicklung ist die Expression von *Gap43* vorrangig auf Regionen des Nervensystems beschränkt. Eine akute Verletzung der peripheren Nerven oder des zentralen Nervensystems bedingt ebenfalls eine Expression des Gens (302). *Gap43* ist in verschiedenen Prozessen involviert. In der neuronalen zytoskeletären Architektur stabilisiert phosphoryliertes *Gap43* F-Actin und unterstützt so die F-Actin Polymerisation. Daneben scheint *Gap43* in der Mitose wichtig bei der Erschaffung der neuronalen Polarität zu sein. Das Protein ist an der normale Zentrosomenduplizierung und der Bestimmung der Spindelorientierung beteiligt (304).

Gap43 wird transkriptionell über p53 und posttranskriptionell durch verschiedene Modifikation wie Phosphorylierungen reguliert (305, 306).

Gap43^{-/-} Mäuse sterben kurz nach der Geburt und Analysen zeigen u. a. eine reduziertes Kleinhirn (307).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Gap43 ist in der embryonalen Entwicklung der Leber am Tag E 9.5 p.c in der fötalen Leber stark exprimiert. Im Verlauf der Entwicklung nimmt der mRNA Gehalt von *Gap43* langsam wieder ab.

In der adulten Leber ist das Gen nicht nachweisbar (Abb. 4.11., S. 86). Nach p.H. ist eine Expression von *Gap43* nach 24 Stunden zu beobachten (Abb. 4.11., S. 86).

4.1.3.3.2. *Midkine* (Acc.Nr.: M34094)

Das heparinbindende, wachstumsfördernde *Midkine* ist zu 50% homolog mit dem Protein Pleiotrophin und bildet mit diesem eine Proteinfamilie. Während der mittleren Gastrulation wird *Midkine* in vielen Geweben exprimiert, ist jedoch im adulten Organismus auf wenige Gewebe wie die Niere beschränkt. In Tumorgewebe oder in verletztem Gewebe kommt es zu einer verstärkten oder neu aktivierten Expression des Proteins (308, 310, 214). *Midkine* spielt eine Rolle beim Wachstum, dem Überleben und der Migration diverser Zelltypen. Die Phosphorylierung verschiedener Kinasen bedingt durch *Midkine* lässt auf eine Vielzahl von Prozessen schließen, in denen es als Signalmolekül dient (159309).

Midkine wird auch während der Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie exprimiert. Die Zellproliferation in *Midkine*^{-/-} Mäusen nach partieller Hepatektomie ist reduziert, vergleichbar mit den Beobachtungen an Interleukin 6 und TNF α defizienten Mäusen. Die reduzierte Zellproliferation in *Midkine*^{-/-} Mäusen könnte durch die verzögerte Expression der Hgf mRNA bedingt sein (214).

White P. und Kollegen (311) führten partielle Hepatektomien an C57BL6/SV129 Mäusen durch und verglichen die Genexpressionsprofile von 2, 6 und 40 Stunden mit der Expression in der adulten Leber. Während nach 2 und 6 Stunden keine Regulierung der Expression zu beobachten war, kam es nach 40 Stunden zu einer 2,2 fachen Erhöhung des *Midkine* mRNA Gehaltes.

Eine Herabregulierung von *Midkine* führt zu einer Inhibierung des Zellwachstums, was einhergeht mit Zelltod durch Depolarisation der Mitochondrienmembran und Aktivierung der Caspase 3. Parallel dazu erfolgt eine verstärkte Expression des pro-apoptotischen Bax und eine Abnahme des anti-apoptotischen Bcl-2 sowie die Ausschüttung von Zytocrom C (312, 313). Die Zugabe von *Midkine* bewirkt einen Apoptoseschutz in Zellen, hervorgerufen durch eine zunehmende Bcl-2 Expression und Inhibierung von Caspase 3 (312, 313, 314).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Das Gen *Midkine* wird in der embryonalen Entwicklung der Leber am Tag E 9.5 p.c in der fötalen Leber sehr stark exprimiert. Während der weiteren Entwicklung sinkt der Gehalt der mRNA um das 19fache und ist in der adulten Leber nur in geringen Mengen vorhanden (Abb. 4.11., S. 86)

Die Expression von *Midkine* wurde über den Zeitraum von 48 Stunden nach Beginn der Regeneration reguliert. In der adulten Leber ist *Midkine*, wie schon in den Microarrays zu beobachten, kaum vorhanden. Nach partieller Hepatektomie steigt der mRNA Gehalt von *Midkine* in den ersten zwei Stunden zunächst stark an, fällt dann wieder und erreicht sechs Stunden nach das Expressionsniveau der adulter Leber. Danach nimmt die Expression des Gens erneut zu und 24 Stunden nach partieller Hepatektomie erreicht der Gehalt der mRNA seinen höchsten Stand. 48 Stunden nach partieller Hepatektomie befindet sich die Expression wieder annähernd auf dem Level der gesunden Leber (Abb. 4.11., S. 86).

4.1.3.3.3. *Igfbp5* (Acc.nr.: L12447)

Das hoch konservierte *Igfbp5* wurde als ein essentieller Regulator von physiologischen Prozessen in Knochen, Niere und Brustdrüse identifiziert. Daneben scheint *Igfbp5* eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Proliferation von spezifischen Tumorzelltypen zu spielen. Seine aktivierende oder inhibierende Wirkung auf die Proliferation von Zellen ist stark abhängig von den Liganden, mit denen es interagiert (315, 318, 319).

Durch den Einfluss auf die Expression und die Interaktion mit Proteinen der extrazellulären Matrix einschließlich Vitronectin und Thrombospondin1 unterstützt *Igfbp5* die Zellmigration (315). Die Überexpression von *Igfbp5* in Endothelzellen verhindert die Migration durch die Inhibierung der Expression der phosphorylierten Proteinkinase B (AKT) und phosphorylierten NO Synthase. In diesen Zusammenhang stellt *Igfbp5* ein neues antiangiogenes Protein dar, da die Proliferation und Migration der Endothelzellen essentiell bei den initialen Prozessen der Angiogenese sind (315).

Daneben kann die Expression von *Igfbp5* zu einem G2/M Zellzyklusarrest und zur Apoptose führen, die mit einer zunehmenden Expression Bax und einer Abnahme von Bcl-2 (320).

Bereits 1999 zeigten Kleffens und Kollegen (321), dass *Igfbp5* im Mausembryo am Tag 13.5 p.c. in der Leber exprimiert wird.

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Igfbp5 wurde am stärksten in der embryonalen Entwicklung der Leber am Tag E 9.5 p.c. exprimiert. Vom Tag E 9.5 p.c zum Tag E 11.5 p.c nimmt der Gehalt der *Igfbp5* mRNA um ca. das 3fache und sinkt bis zu Tag E 13.5 p.c. weiter. In der adulten Leber ist das Gen kaum nachweisbar (Abb. 4.11., S. 86).

Innerhalb des Regenerationszeitraumes von 48 Stunden erfolgt eine Regulierung der Expression von *Igfbp5*. In der adulten Leber ist die Expression von *Igfbp5* nur sehr gering, steigt aber in der regenerierenden Leber innerhalb der ersten 4 Stunden um ca. das 6 fache an. Danach sinkt der Gehalt der mRNA auf das Niveau des mRNA Gehaltes der adulten Leber ab. Eine erneute verstärkte Expression ist 48 Stunden nach partieller Hepatektomie zu beobachten (Abb. 4.11., S. 86).

4.1.3.3.4. *Necdin* (Acc.Nr.: NM_010882.3)

Die Expression von *Necdin* ist beinahe in allen postmitotischen Neuronen vom Beginn der neuronalen Differenzierung und im adulten Organismus nach zu weisen. *Necdin* beeinflusst die Expression von synaptischen Markerproteinen wie Synaptotagmin und Synaptophysin und die morphologischen Differenzierung wie Neuritenauswuchs von Zellen (322).

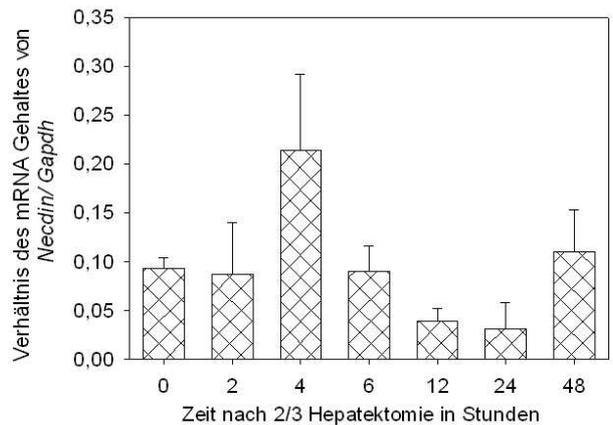
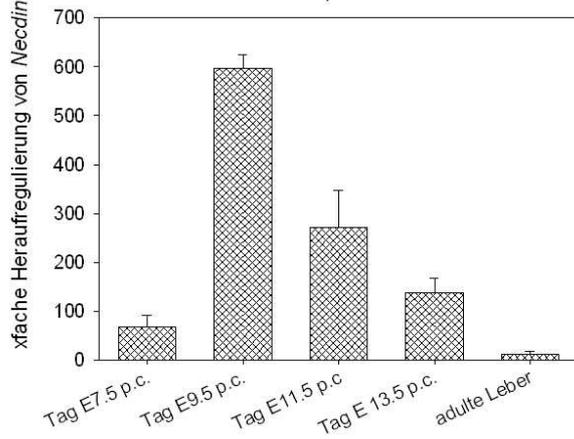
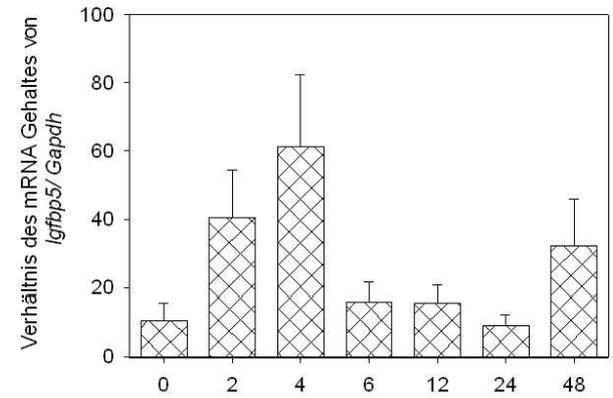
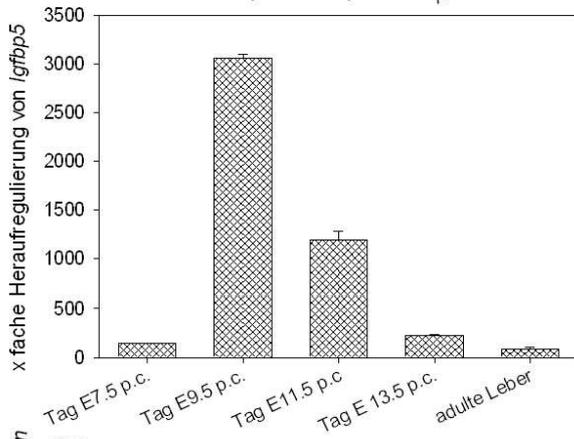
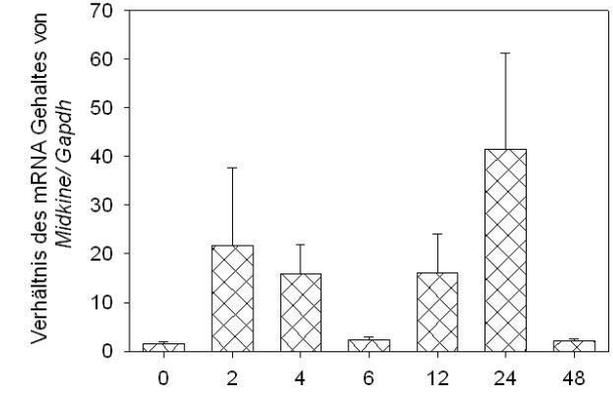
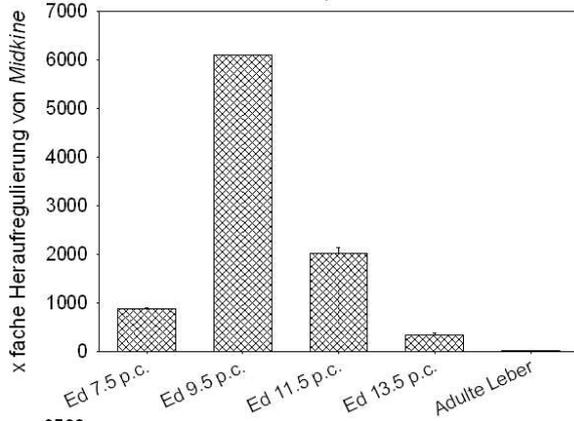
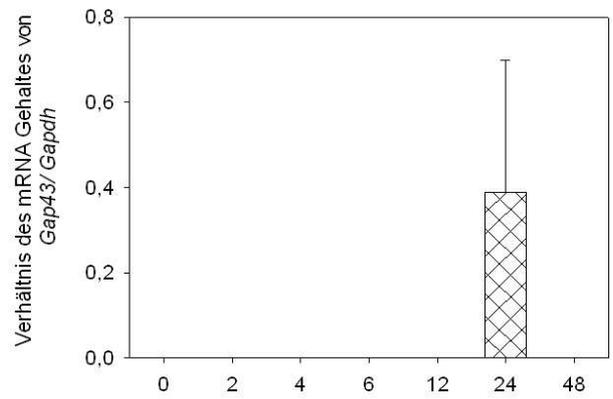
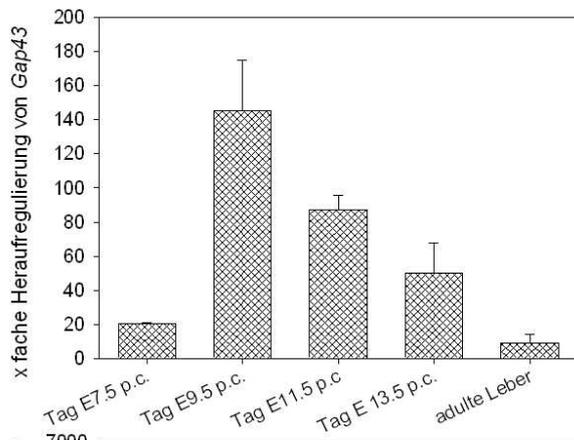
Necdin, ein wachstumshemmendes Protein, blockiert die Progression des Zellzyklus und bedingt eine Expression von Proteinen, die Marker für differenzierte sich in der G0-Phase befindlichen Zellen sind (322). Durch die Bindung an den Transkriptionsfaktoren E2F, welche die Expression von Cdc2 und Cyclin A beeinflussen, inhibiert *Necdin* den Eintritt in die S-Phase (322, 323, 324). Die Vitalität der Zellen bleibt bei dieser Blockierung jedoch erhalten. Vermutlich durch eine *Necdin* vermittelte Reduzierung der p53 Transkription, wobei die p53 bedingte Apoptose verhindert wird, aber die p53 vermittelte Wachstumssuppression unbeeinflusst bleibt (325, 326). Neben Nervenzellen beeinflusst *Necdin* die Differenzierung der Myoblasten durch die Regulierung von MyoD und die Proliferation von Fibroblasten (328, 329, 326, 327).

Im Menschen befindet sich das Gen *Necdin* in der chromosomalen Region 15q11-q13, wo Veränderungen zum Prader Willi Syndrom führen. Durch eine paternale Deletion oder maternale Disomie der Region kommt es zum Ausbruch der Krankheit. Das Syndrom geht einher mit körperlichen, stoffwechselbezogenen und kognitiven Symptomen wie massive Gewichtszunahme, Kleinwuchs und Verhaltensauffälligkeiten, welche durch eine Fehlfunktion des Zwischenhirns verursacht werden.

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Die Expression von *Necdin* ist in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c sehr stark, nimmt zum Tag E 11.5 p.c. jedoch wieder ab (Abb. 4.11., S. 86).

Necdin wurde in geringen Mengen in der adulten Leber exprimiert und steigt innerhalb der ersten vier Stunden nach der partiellen Hepatektomie an. Danach kommt es zu einer Abnahme der Expression, die sich bis zu 24 Stunden nach der Hepatektomie hinzieht. Erst 48 Stunden nach der partiellen Hepatektomie kommt es wieder zu einer Zunahme des mRNA Gehaltes, der ungefähr dem Gehalt der adulten Leber entspricht (Abb. 4.11., S. 86).



Zeit nach 2/3 Hepatektomie in Stunden

Abbildung 4.11 Gap43, Midkine Igfbp5 und Necdin

mRNA Profil vom Microarray (Rechts) und nach partieller Hepatektomie (Links)

Für die Microarray Daten wurde Gesamt RNA aus Balb/C Mausembryonen Tag E 7.5 p.c., aus der fötalen Leber Tag E 9.5 p.c., 11.5 p.c., 13.5 p.c. und aus adulter Leber isoliert und in cRNA umgeschrieben. Die Microarray Chips wurden mit dieser cRNA hybridisiert. Die detektierten Signale wurden in Clusteranalysen gegeneinander analysiert (software Affymetrix) (N=2). Gap43, Midkine, Igfbp5 und Necdin wurde besonders stark am Tag E 9.5p.c. exprimiert.

Für das mRNA Expressionsprofil der Gene nach partieller Hepatektomie wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf Gapdh (N=5).

Es zeigte sich eine Expression von Gap43 24 Stunden nach Beginn der Regeneration.

Es zeigen sich zwei erhöhte Werte in der Expression von Midkine nach dem Start der Regeneration, 2 und 24 Stunden nach der Operation.

Nach dem Start der Regeneration zeigen sich nach 4 und 48 Stunden erhöhte Werte in der Expression von Igfbp5.

Es zeigte sich ein Peak für Necdin nach 4 und 48 Stunden.

4.1.3.4. Transport

Crabpl (Acc.Nr.: NM_007759.2)/ *Crabpl* (Acc.Nr.: NM_013496.2)

Zelluläre retinolsäurebindende Proteine sind wichtig bei retinolsäurevermittelten Differenzierungs- und Proliferationsprozessen. Retinolsäure inhibiert die Zellproliferation und die Invasion von vielen Tumortypen, weswegen es als Chemotherapeutikum bzw. als Prävention bei verschiedenen humanen Krebszellen eingesetzt. Retinolsäure bindet an zytoplasmatische und nukleäre Proteine, über welche die Signale weiter in den Kern geleitet werden.

Die beiden Proteine *Crabpl* und *II* regulieren die Konzentration, den Transport und den Metabolismus der Retinolsäure im Zytoplasma (330). In den verschiedenen Spezien sind die beiden Gene evolutionäre stark konserviert (331).

In adulten Organismen ist *Crabpl* exprimiert in allen Geweben, während die Expression von *CrabplII* auf bestimmten Geweben bzw. Zelltypen beschränkt beschränkt, die durch Wachstum und Differenzierung charakterisiert sind (332, 333). Die Differenzierung von Zellen können jedoch beide beeinflussen. Die Zunahme von *Crabpl* und *CrabplII* in embryonalen Stammzellen, die beginnen sich zu differenzieren, deutet auf eine Regulierung der retinolsäurevermittelten Differenzierung in embryonalen Stammzellen hin (334). Weiter haben beide Proteine Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten, Proliferation von Tumorzellen und Fibroblasten (332, 335, 336).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Die Expression von *Crabpl* und *II* ist in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c sehr stark, nimmt zum Tag E 11.5 p.c. jedoch wieder ab und ist in der adulten Leber nicht vorhanden (Abb. 4.12., S. 89).

Crabpl und *II* wurde in der adulten Leber und nach partieller Hepatektomie nicht exprimiert (Abb. 4.12., S. 89).

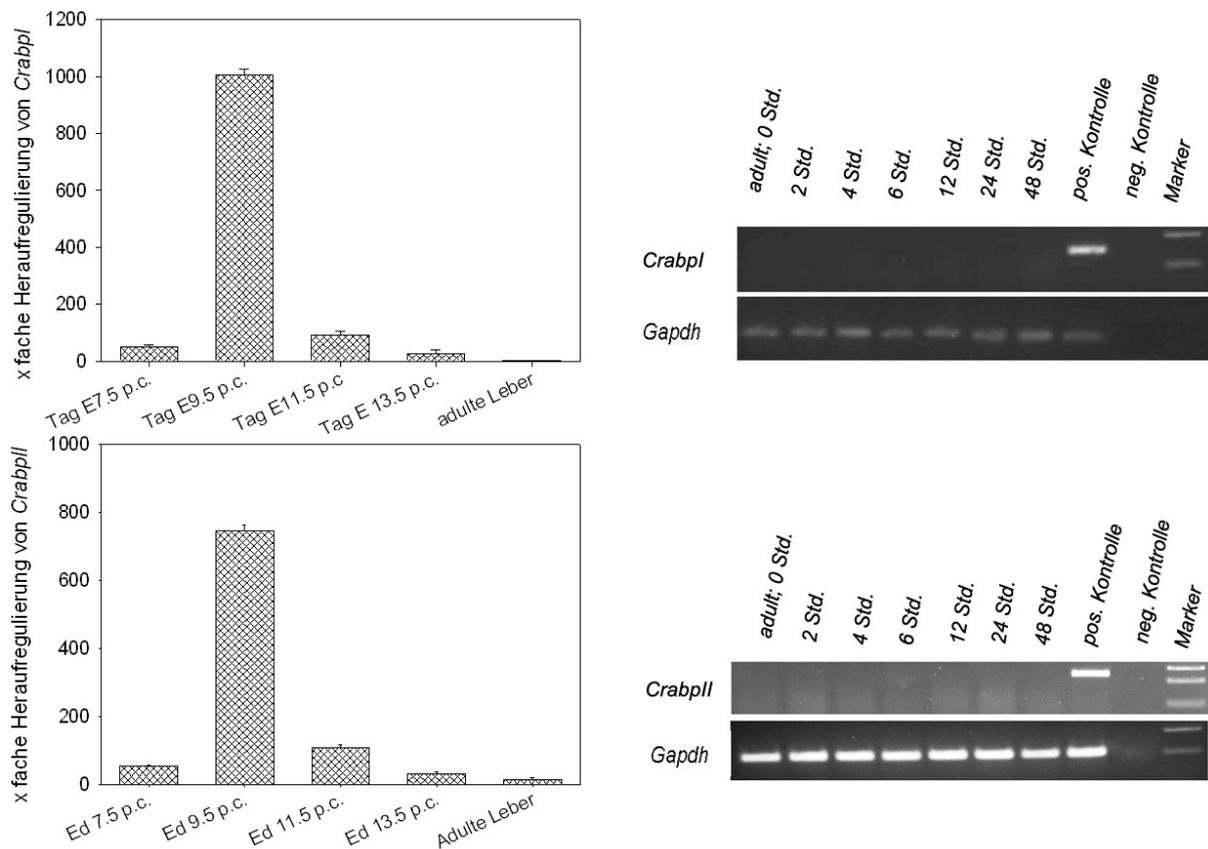


Abbildung 4.12 Crabpl und II

mRNA Profil vom Microarray (Rechts) und nach partieller Hepatektomie (Links)

Für die Microarray Daten wurde die Gesamt RNA aus dem Lebergewebe der verschiedenen Stadien sowie aus dem Gesamtembryo Tag E 7.5 p.c. isoliert, in cRNA umgeschrieben und mit den Microarray Chips hybridisiert. Die detektierten Signale der verschiedenen Proben wurden gegeneinander in Clusteranalysen untersucht (Software Affymetrix) (N=2). Crabpl und II wurde am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert.

Für das mRNA Expressionsprofil der Gene nach partieller Hepatektomie wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Aufgrund der fehlenden Signale erfolgte für Crabpl und II eine Darstellung mittel Hilfe des Agarosegels. Gapdh wurde als Ladekontrolle mit aufgetragen (N=3).

4.1.3.5. Zelladhäsion

4.1.3.5.1. *Emid2* (Acc.Nr.: NM_024474.2)

Sato und Kollegen (337) klonierten das murine *Emid2*, welches im N-Terminus eine Signalsequenz besitzt, gefolgt von drei Nichtkollagen - Domänen, die jeweils durch zwei Kollagen - Domänen getrennt sind. Es konnte gezeigt werden, dass murines *Emid2* kollagenähnliche Eigenschaften besitzt, einschließlich der Hydroxylierung und N-Glykosylierung (337).

Eine Expression des Gens ist in den neonatalen Hoden und Eierstöcke nachzuweisen, die in den adulten Geweben verringert ist. Das Gen wird vorwiegend in mesenchymalen Zellen exprimiert (338).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1; 4.1.2) erstellt.

Die Expression von *Emid2* ist in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c. sehr stark, nimmt zum Tag E 11.5 p.c. jedoch wieder ab (Abb. 4.13., S. 92).

Emid2 wurde in der adulten Leber und nach partieller Hepatektomie nicht exprimiert (Abb. 4.13). Die Messung der mRNA Expression von *Emid2* erfolgte mit dem LC480 und die Auswertung mit dem Programm Abs. Quantifizierung/ 2nd Derivative Max.. Aufgrund der fehlenden Signale wurden die Proben zur Kontrolle auf ein Gel aufgetragen (Abb. 4.13., S. 92).

4.1.3.5.2. *Punc* (Acc.Nr.: NM_008988.2)

Das transmembrane Protein *Punc* gehört zu der Familie der Immunoglobuline und repräsentiert aufgrund seiner Konfiguration eine neue Unterklasse innerhalb dieser Familie (339). Northern Blot Analysen zeigen eine starke Expression von *Punc* an den Tag E 9.5 p.c. und 11.5 p.c. im Nervensystem und den Extremitäten, die im weiteren Verlauf der Entwicklung abnimmt. In der adulten Maus ist *Punc* in den Gliazellen des Nervensystems und im inneren Ohr nachweisbar (339). Sequenzvergleiche zeigen, dass *Punc* mit Ig Familienmitglieder verwandt ist, die mit Axons assoziiert sind oder Funktionen in der Axonleitung haben. Es zählt deshalb zu den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen.

In *Punc*^{-/-} Mutanten Mäusen sind keine morphologischen Abnormalitäten sichtbar, was auf eine redundante oder weniger wichtige Funktion hindeutet. Lediglich eine verschlechterte Motorkoordination zeigte sich bei den Mäusen. Da *Punc* in den Gliazellen exprimiert wird, die Stütz-, Nähr- und Isolierfunktionen im Nervengewebe haben, deutet dies möglicherweise auf eine Rolle bei der neuronalen Migration hin (340).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1; 4.1.2) erstellt.

Punc wurde am stärksten in der embryonalen Entwicklung der Leber am Tag E 9.5 p.c. exprimiert. Zu den anderen Zeitpunkten ist nur eine geringe mRNA Menge von *Punc* nachweisbar (Abb. 4.13., S. 92).

In der regenerierenden Leber zeigen sich schwache Signale nach zwei und vier Stunden, die jedoch im LC480 bei der gewählten Form der Auswertung (Abs. Quantifizierung/ 2nd Derivative Max) erst ab den Zyklus 35 detektiert wurden. Aufgrund dessen wurden die Signale nicht quantifiziert, sondern zur bildlichen Darstellung die Proben auf ein Gel aufgetragen (Abb. 4.13., S. 92).

4.1.3.5.3. *TenascinC* (Acc.Nr.: NM_011607.2)

Tenascin C ist ein hexomerisches, mehrere Domänen tragendes, extrazelluläres Matrixprotein mit einer räumlichen und zeitlichen beschränkten Expression in verschiedenen Geweben. Im

Embryo wird es im Mesenchym und in den sich entwickelnden Knorpeln, Knochen und Sehnen exprimiert. Im adulten Organismus ist eine Expression von *TenascinC* in den Sehnen, Muskel-Sehnen Verbindungen und in den Astrozyten des zentralen Nervensystems zu beobachten (341). *TenascinC* scheint Einfluss auf die Zell Substrat Adhäsion zu haben und erlaubt durch die Auflösung dieser Adhäsion den Zellen zu migrieren (342). Das Fehlen von *TenascinC* in Mäusen hat keinen Effekt auf die Entwicklung, auf die Lebensspanne und Furchtbarkeit. Das Verheilen von Wunden und verletzten Nerven erfolgte normal (343).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Die Expression von *TenascinC* ist in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c sehr stark, nimmt zum Tag E 11.5 p.c. jedoch wieder ab und wurde zu späteren Zeitpunkten im Vergleich zu Tag E 9.5 p.c. in geringen Mengen exprimiert (Abb. 4.13., S. 92).

TenascinC wurde in der adulten Leber nur sehr schwach exprimiert und auch während der Regeneration der Leber bleibt die Expression gering. Jedoch kommt es zu einer leicht erhöhten Expression 6 Stunden nach der Entfernung von 70% der Leber (Abb. 4.13., S. 92).

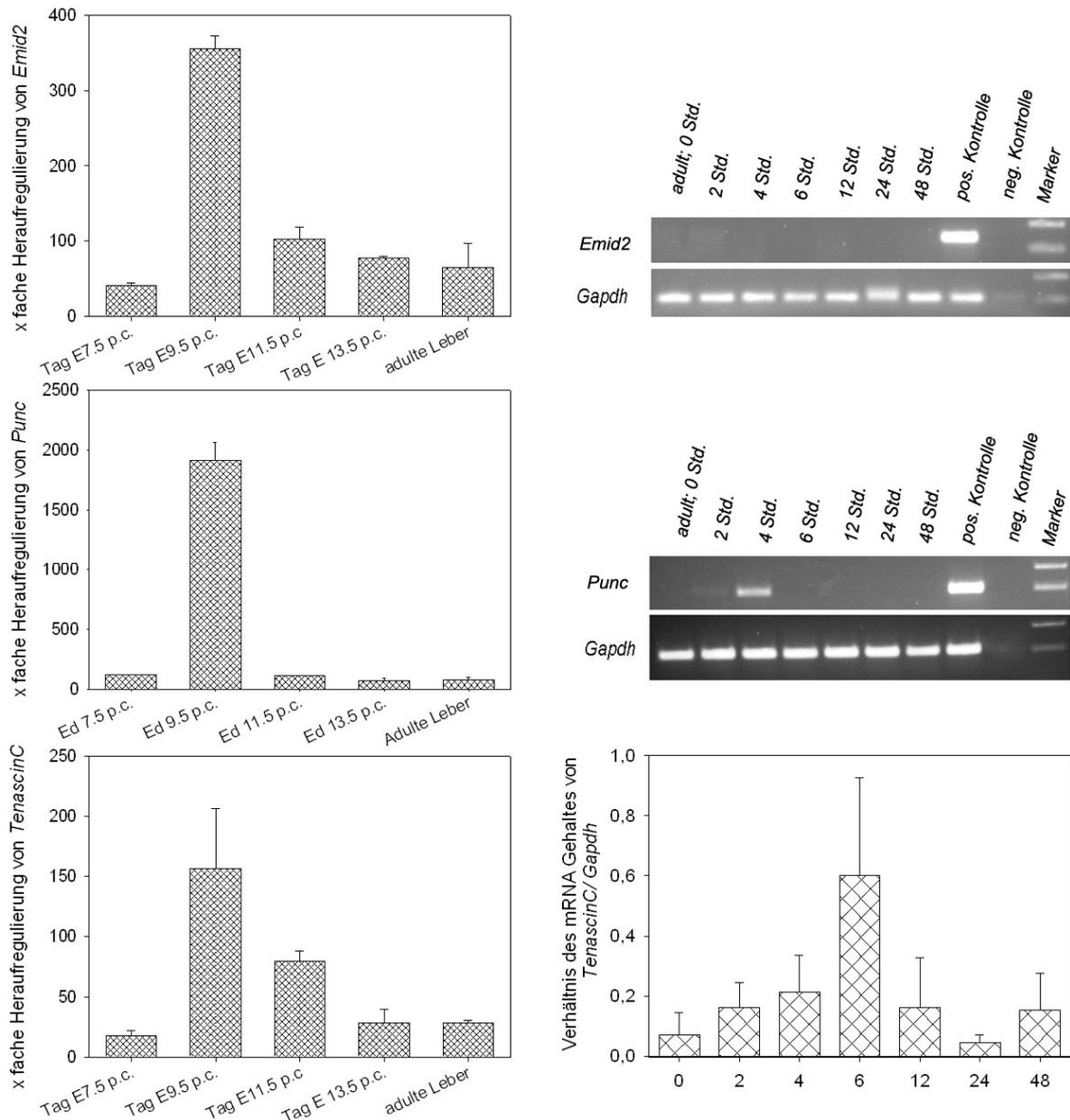


Abbildung 4.13 Emid2, Punc und TenascinC

Für die Microarray Daten wurde die Gesamt RNA aus dem Lebergewebe der verschiedenen Stadien sowie aus dem Gesamtembryo Tag E 7.5 p.c. isoliert, in cRNA umgeschrieben und mit den Microarray Chips hybridisiert. Die detektierten Signale der verschiedenen Proben wurden gegeneinander in Clusteranalysen untersucht (Software Affymetrix) (N=2). Emid2, Punc und TenascinC wurde am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert.

Für das mRNA Expressionsprofil der Gene nach p. H. wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf Gapdh (N=5). Aufgrund der schwachen Signale von Emid2 und Punc wurden die Proben zur bildlichen Darstellung auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde Gapdh mit aufgetragen (N=3). Für TenascinC zeigte sich nach dem Start der Regeneration nach 6 Stunden ein erhöhter Wert.

4.1.3.6. weitere Gene

4.1.3.6.1. *H1fx* (Acc.Nr.: NM_198622.1)

Histone sind Kernproteine, die für die Struktur der Nukleosomen, welches die Grundeinheit des Chromatins ist, verantwortlich sind. Nukleosome bestehen aus einem Histonoktamer um welches ca. 146 bp DNA gewunden sind. Das Histonoktamer setzt sich aus jeweils einem Paar der vier Histone H2A, H2B, H3, and H4 zusammen. Auf der Innenseite der Spirale der DNA ist pro Nukleosome ein Histon H1 Molekül gebunden. Eine Einheit aus einem Nukleosome und einem gebundenen Histone H1 wird als Chromatosom bezeichnet (344). H1fx ist ein neues Mitglied der Histon H1 Familie.

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Die Expression von *H1fx* ist in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c sehr stark, nimmt zum Tag E 11.5 p.c. jedoch wieder ab und ist in der adulten Leber nur sehr gering (Abb. 4.14., S. 94). Nach der p. H. wurde *H1fx* zunächst nicht exprimiert. Jedoch beginnt die Expression nach 24 Stunden langsam anzusteigen und wurde nach 48 Stunden sehr stark exprimiert (Abb. 4.14., S. 94).

4.1.3.6.2. *Sh3bgr* (Acc.Nr.: NM_015825.2)

Sh3bgr wird in verschiedenen Geweben exprimiert, vorwiegend allerdings im Herz und in Skelettmuskeln. *Sh3bgr*, ein 239 Aminosäure großes Protein, zeichnet sich durch zwei funktionelle Domänen aus, einer prolinreichen Region mit einer Konsensussequenz für eine SH3-Domäne und einer glutaminsäurereichen Domäne im C-Terminus. Die Anwesenheit dieser zwei funktionellen Domänen lässt auf eine Funktion des Proteins bei Protein-Protein Interaktionen schließen (345).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Die Expression von *Sh3bgr* ist in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c. sehr stark, nimmt zum Tag E 11.5 p.c. bis in zur adulten Leber ab (Abb. 4.14., S. 94).

Sh3bgr wurde in der adulten Leber und der nach p. H. nur sehr schwach exprimiert. Die mit dem Programm Abs. Quantifizierung/ 2nd Derivative Max des LC480 ermittelten Ct-Werte schwanken zwischen 32 und 35. Da eine Quantifizierung nicht sinnvoll ist wurden die Proben zur bildlichen Darstellung auf ein Gel aufgetragen (Abb. 4.14., S. 94).

4.1.3.6.3. *Hsd11b2* (Acc.Nr.: NM_008289.2)

Von *Hsd11b*, ein mikrosomaler Enzymkomplex, der verantwortlich für die Konversion von Kortisol zu Kortison ist, gibt es zwei Formen. Während Typ 1 Kortisol in Kortison und wieder zurück umwandeln kann, ist Typ2 nur für die Umwandlung von Kortisol in Kortison fähig. In Gewebe die keine Mineralokortikoid-Rezeptoren haben, schützt die Umwandlung die Zellen vor den wachstumsinhibierenden und/ oder pro-apoptotischen Effekten von Kortisol. *Hsd11b2* bestimmt die Spezifizierung dieser Rezeptoren in der Niere und schützt den Fötus vor hohen Mengen der maternalen Glukokortikoide in der Plazenta. *Hsd11b* ist möglicherweise physiologischen und pathologischen Prozessen wie Stress, Hypertonie oder Diabetes involviert (346).

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt. Die Expression von *Hsd11b2* ist in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c sehr stark und nimmt im Verlauf der weiteren Entwicklung ab. In der adulten Leber ist *Hsd11b2* nicht nachzuweisen. Ebenfalls ist keine Expression nach der p. H. vorhanden (Abb. 4.14., S. 94).

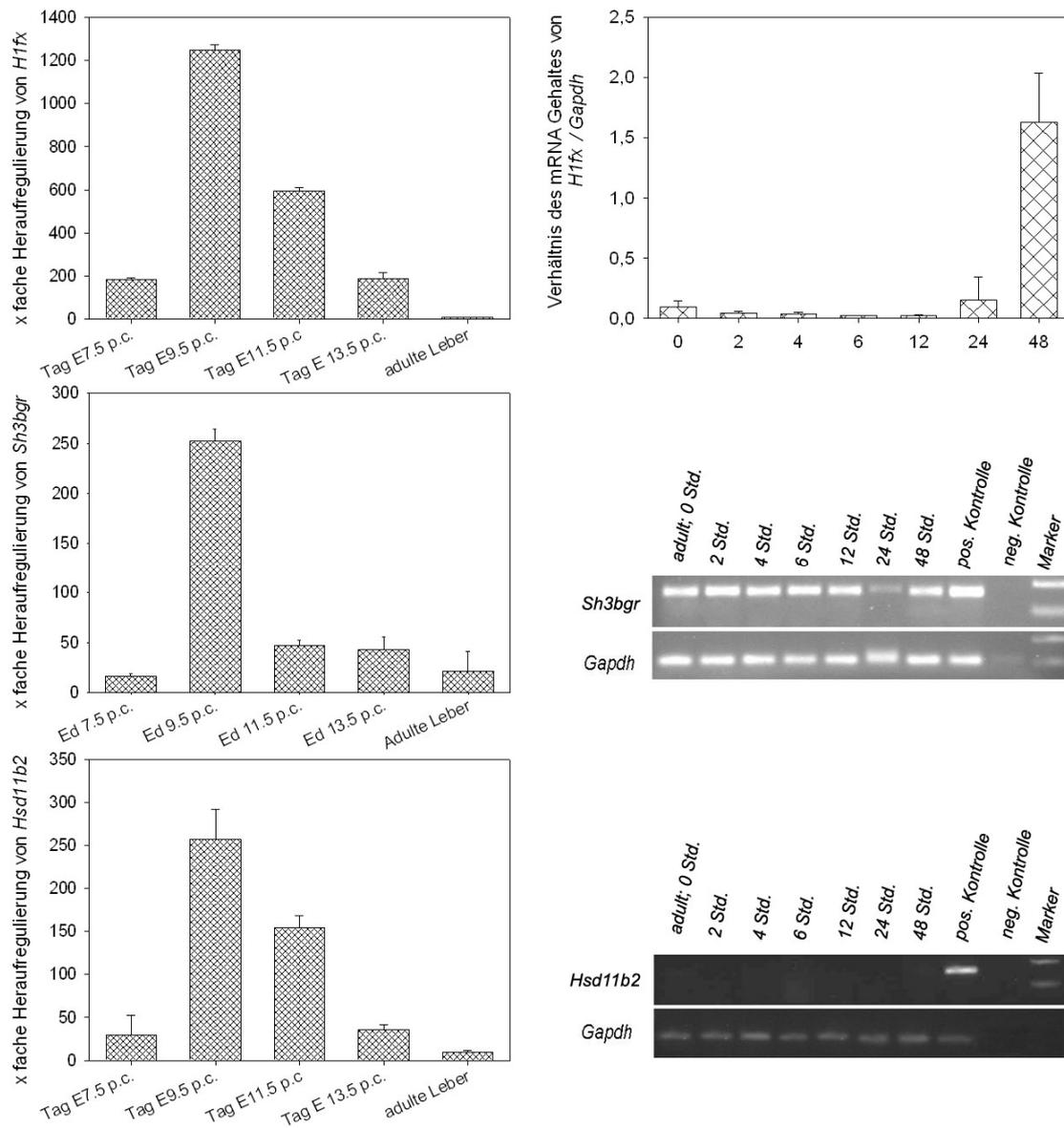


Abbildung 4.14 H1fx, Sh3bgr und Hsd11b2

Für die Microarray Daten wurde die Gesamt RNA aus dem Lebergewebe der verschiedenen Stadien sowie aus dem Gesamtembryo Tag E 7.5 p.c. isoliert, in cRNA umgeschrieben und mit den Microarray Chips hybridisiert. Die detektierten Signale der verschiedenen Proben wurden gegeneinander in Clusteranalysen untersucht (Software Affymetrix) (N=2). H1fx, Sh3bgr und Hsd11b2 wurde am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert.

Für das mRNA Expressionsprofil nach p. H. wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Nach dem Start der Regeneration zeigte sich nach 48 Stunden ein erhöht Werte in der Expression von H1fx (N=5). Die Normalisierung erfolgte auf Gapdh. Aufgrund der schwachen Signale von Sh3bgr und Hsd11b2 wurden die Proben auf ein Agarosegel mit Gapdh als Ladekontrolle aufgetragen. Nach dem Start der Regeneration zeigten sich schwache Werte in der Expression von Sh3bgr. Bei Hsd11b2 zeigte sich keine Expression nach der p. H.

4.1.3.7. Zytoskelett

Viele eukaryotische Zellen besitzen ein hohes Maß an Bewegungsfähigkeit, die hauptsächlich auf zwei Prozessen beruht: der gerichteten Aktinpolymerisierung und der Aktin-Myosin-Interaktion in Fibrillenbündeln. Am Tag E 9.5 p.c., wenn das Einwandern der Zellen in das Septum Transversum beginnt, zeigte sich eine verstärkte Expression verschiedener Zytoskelettprotein. Folgenden Gene wurden identifiziert:

Leichte Myosinkette	Acc.Nr.	Weitere Proteine	Acc.Nr.
Myl3	NM_010859.2	TroponinT2	NM_001130174.1
Myl4	NM_010858.4	Troponin I	NM_001112702.1
Myl7	NM_022879.2	Mybpc3	NM_008653.2
Myl2	NM_010861.3		
Schwere Myosinkette		Aktinfamilie	
Myh6	NM_001164171.1	Acta2	NM_007392.2
Myh7	NM_080728.2	Actc1	NM_009608.3

Tabelle 4.1 Auflistung der Zytoskelettproteine mit Accessionnummer (Acc.Nr.)

4.1.3.7.1. Gene der Myosin Proteinfamilie

Die Myosinproteine stellen eine Familie von Motorproteinen in eukaryotischen Zellen dar. Myosin, ein wesentlicher Bestandteil der Muskel, ist aber auch an weiteren Aufgaben wie dem intrazellulären Transport oder der Bewegung und Adhäsion von Zellen beteiligt. Funktionales Myosin setzt sich aus der schweren Kette (heavy chain) und aus einer unterschiedlichen Anzahl von leichten Ketten zusammen. Myosin ist eine Aktin-aktivierte ATPase und die Fähigkeit des Myosinmoleküls, unter ATP-Verbrauch zwischen zwei Konformationen hin- und herzuwechseln, stellt die Grundlage für fast alle Bewegungen im Tierreich dar.

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Alle Myosingene wurden in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c sehr stark exprimiert (Abb. 4.15., S. 96).

Nach der partiellen Hepatektomie ist eine Expression der Gene der Myosinfamilie zu beobachten.

Myl3 wurde während der ersten vier Stunden und Myl2 während der ersten zwei Stunden exprimiert. Beide Gene wurden zwischen 6 und 24 Stunden nicht exprimiert und zeigen erneut eine Expression nach 48 Stunden. Myl7 und Myl4 wurde über den ganzen Zeitraum exprimiert.

Myh7 wurde in den ersten zwölf Stunden exprimiert und anschließend herabreguliert. Für Myh6 ist nur eine Expression nach 2 Stunden zu beobachten. In der adulten Leber wurden bis auf Myh6 alle Myosingene exprimiert (Abb. 4.16., S. 97). Die Proben wurden mittels des LC480 analysiert, jedoch erfolgte im Weiteren keine Quantifizierung.

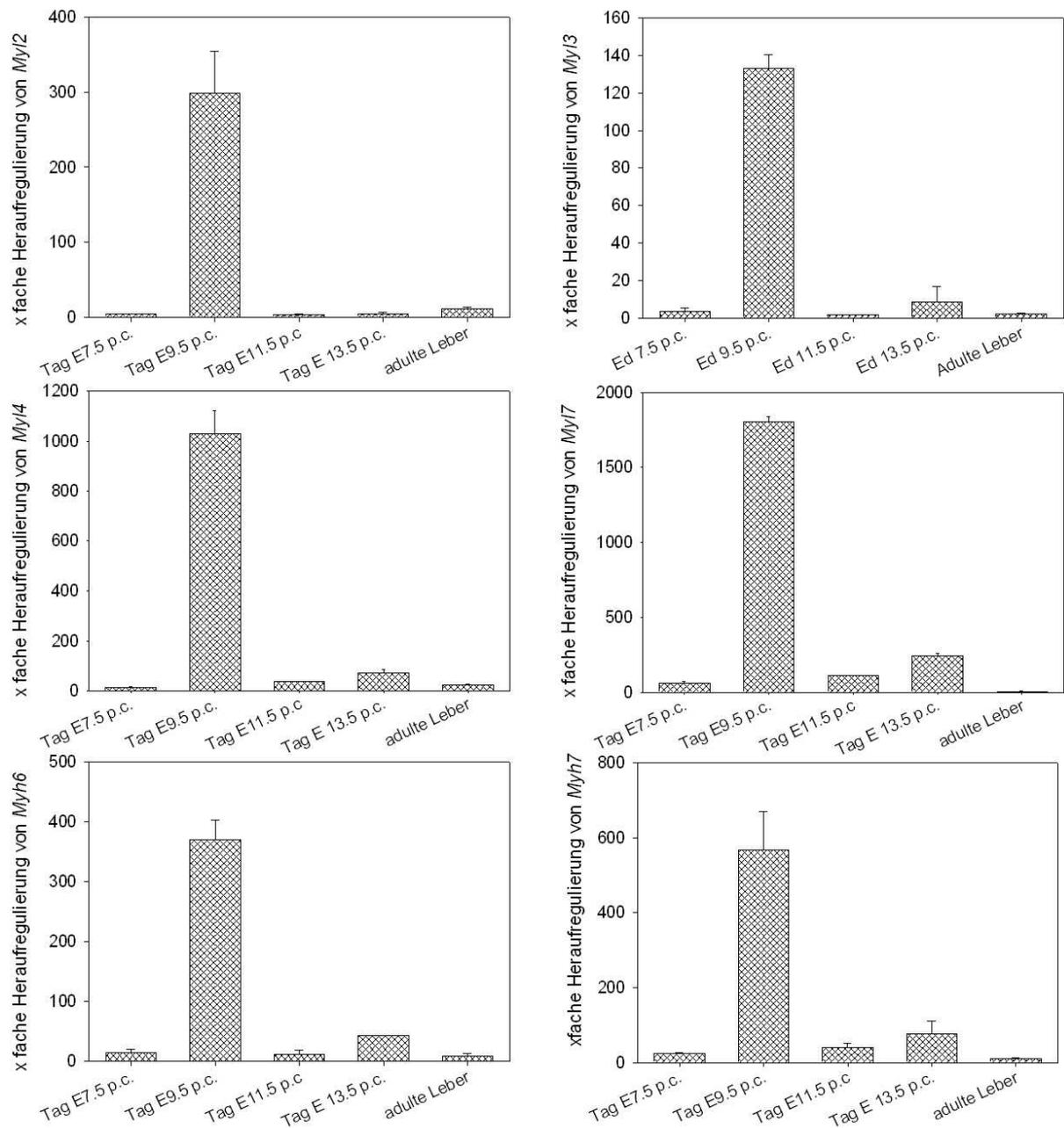


Abbildung 4.15 Gene der Myosinfamilie

Für die Microarray Daten wurde die Gesamt RNA aus dem Lebergewebe der verschiedenen Stadien sowie aus dem Gesamtembryo Tag E 7.5 p.c. isoliert, in cRNA umgeschrieben und mit den Microarray Chips hybridisiert. Die detektierten Signale der verschiedenen Proben wurden gegeneinander in Clusteranalysen untersucht (Software Affymetrix). Alle aufgelisteten Gen wurden am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert (N=2).

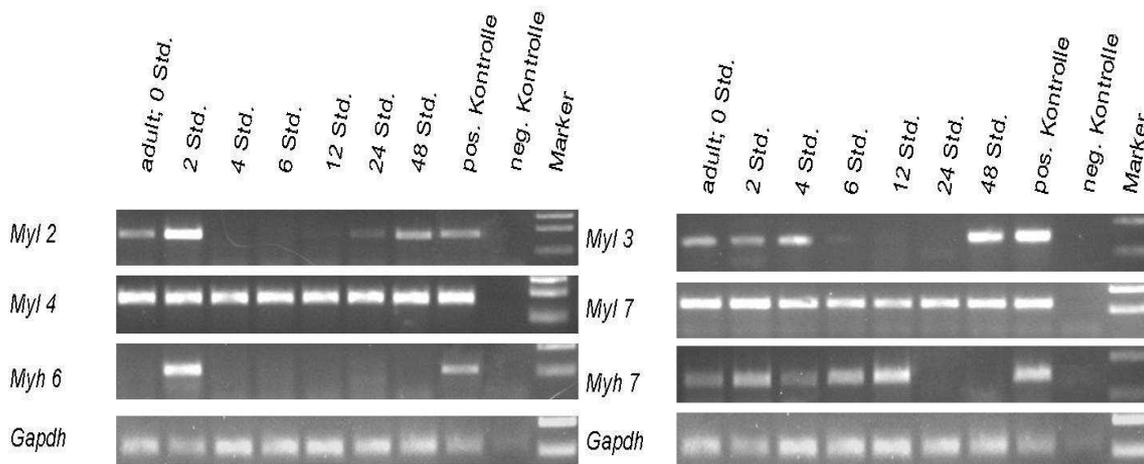


Abbildung 4.16 mRNA Expressionsprofile der Myosingene

Für das mRNA Expressionsprofil der Myosingene nach partieller Hepatektomie wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Die PCR-Amplifikate wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und Gapdh als Ladekontrolle mit aufgetragen (N=2).

4.1.3.7.2. Gene der Aktin Proteinfamilie

Aktin bildet als Bestandteil des Zytoskeletts ein dichtes, steifes, dreidimensionales kortikales Netz unterhalb der Plasmamembran, das durch die oben genannten Verbindungsproteine vernetzt ist. An bestimmten, spezifischen Punkten der Zelle tritt dieses Netzwerk verstärkt auf, z.B. in Membranausbuchtungen (Mikrovilli, Pseudopodien, Synapsen) und bei bestimmten Zellkontakten (z.Bsp.: Tight Junctions) und tragen so zur Form und Stabilität von Zellen und Geweben bei. Viele Transmembranproteine (Kanäle, Pumpen, Rezeptoren, Zelladhäsionsproteine) werden durch eine direkt oder indirekt Verbindungen an das kortikale Aktinnetzwerk an ihrem Platz gehalten. Das Netz hält funktionell zusammengehörnde Proteine in räumlicher Nähe und ermöglicht Kurzstreckentransporte von Vesikeln zur Membran.

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Die beiden Aktingene wurden in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c sehr stark exprimiert (Abb. 4.17., S. 98). In der adulten Leber wurden diese beiden Aktingene ebenfalls exprimiert und auch in der regenerierenden Leber. Die fehlende Expression von *Actc1* nach 6 und 12 Stunden während des untersuchten Zeitraums von 48 Stunden weist eine Regulierung der Expression des Gens hin (Abb. 4.17., S. 98).

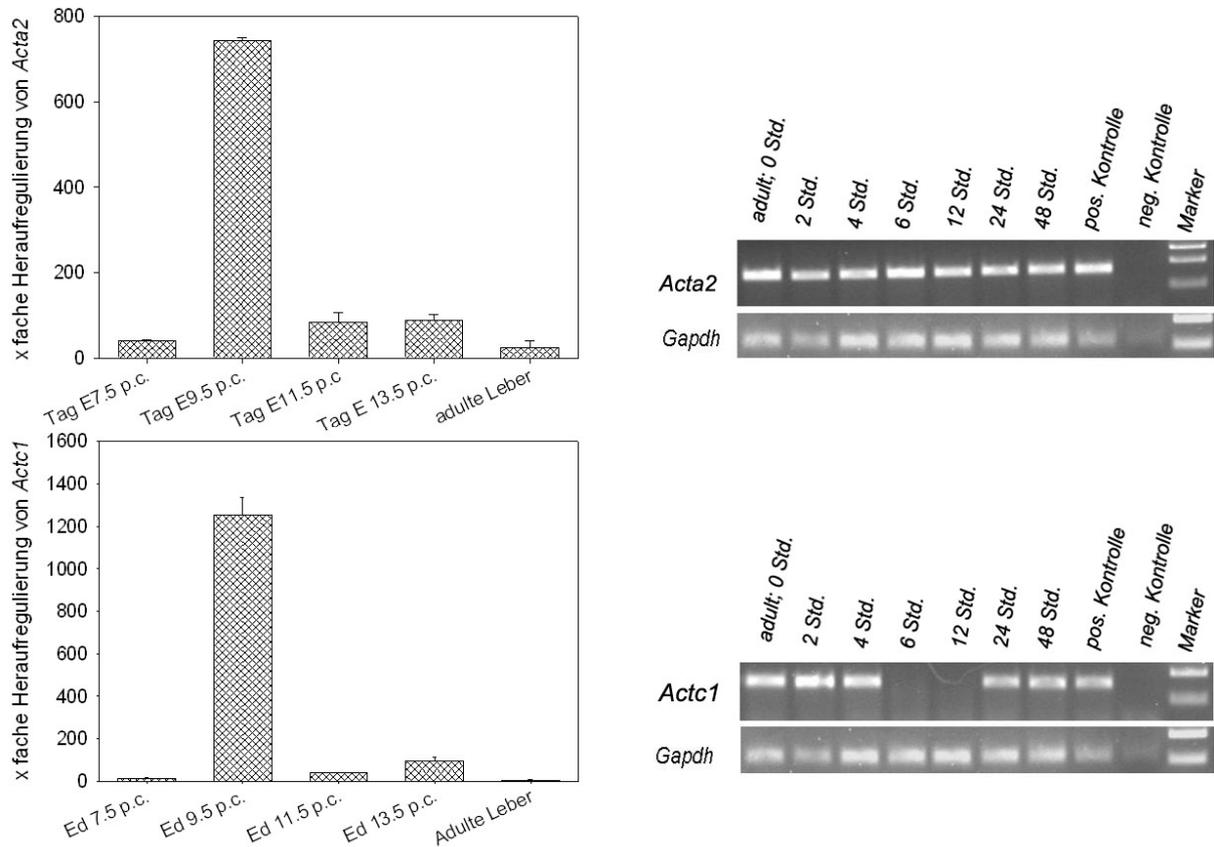


Abbildung 4.17 Gene der Aktinfamilie

Für die Microarray Daten wurde die Gesamt RNA aus dem Lebergewebe der verschiedenen Stadien sowie aus dem Gesamtembryo Tag E 7.5 p.c. isoliert, in cRNA umgeschrieben und mit den Microarray Chips hybridisiert. Die detektierten Signale der verschiedenen Proben wurden gegeneinander in Clusteranalysen untersucht (Software Affymetrix) (N=2). Die beiden Gene wurden am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert.

Für das mRNA Expressionsprofil der beiden Gene nach partieller Hepatektomie wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und PCR untersucht. Die PCR wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und als Ladekontrolle Gapdh mit aufgetragen (N=3). Beide Gene wurden nach der p.H. exprimiert und die Daten von Actc1 deuten auf Regulierung hin.

4.1.3.7.3. Weitere Zytoskelettproteine

4.1.3.7.3.1. Troponine

Troponine bilden Proteinkomplexe, die in Skelett- und Herzmuskeln vorkommen. Die Untereinheit „T“ ist für die Bindung von Tropomyosin und „I“ für die Bindung von Aktin verantwortlich. Gemeinsam mit Myosin und Aktin bildet dieser Proteinkomplex den beweglichen (kontraktile) Teil der Muskulatur. Durch Troponin wird die Muskelkontraktion reguliert. Bei einer Erregung bindet Calcium an Troponin und bewirkt eine Konformationsbewegung dieses Proteins. Dadurch werden die Tropomyosinfäden leicht verschoben und geben den Weg frei für die Aktin-Myosin-Bindung und damit für die Kontraktion des Sarkomers.

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Die beiden Troponine wurden in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c sehr stark exprimiert (Abb. 4.18., S. 100).

Troponin T2 wurde in der adulten Leber und auch in der regenerierenden Leber exprimiert. Troponin I wurde in der adulten Leber, zwischen 4 und 6 Stunden und erneut nach 24 und 48 Stunden nach p. H. schwach exprimiert (Abb. 4.18., S. 100). Die Analyse erfolgte mit dem LC 480 (Fa. Roche Applied Science) und dem Auswertungsprogramm Abs. Quantifizierung/ 2nd Derivative Max. Die detektierten Signale hatten einen Ct-Wert von 35 (Gesamtzyklusanzahl 40).

4.1.3.7.1.2. Mybpc3

Mybpc3 ist die im Herzen vertretene Isoform der myosinbindenden Proteine und wird nach bisherigem Datenstand ausschließlich im Herzen exprimiert.

Die Daten der Microarrays und p. H. wurden wie oben beschrieben (Abs. 4.1.1.; 4.1.2) erstellt.

Mybpc3 wurde in der fötalen Leber am Tag E 9.5 p.c sehr stark exprimiert (Abb. 4.18., S. 100).

In der adulten Leber wurde das Gen nicht exprimiert, allerdings zeigte sich eine schwache Expression nach 2 und 6 Stunden. Jedoch zeigte sich bei der Analyse der Expression mit dem LC480 (Fa. Roche Applied Science) und des gewählten Auswertungsprogramm (Abs. Quantifizierung/ 2nd Derivative Max) war das Signal erst bei einen Ct-Wert von 35 zu beobachten (Abb. 4.18., S. 100).

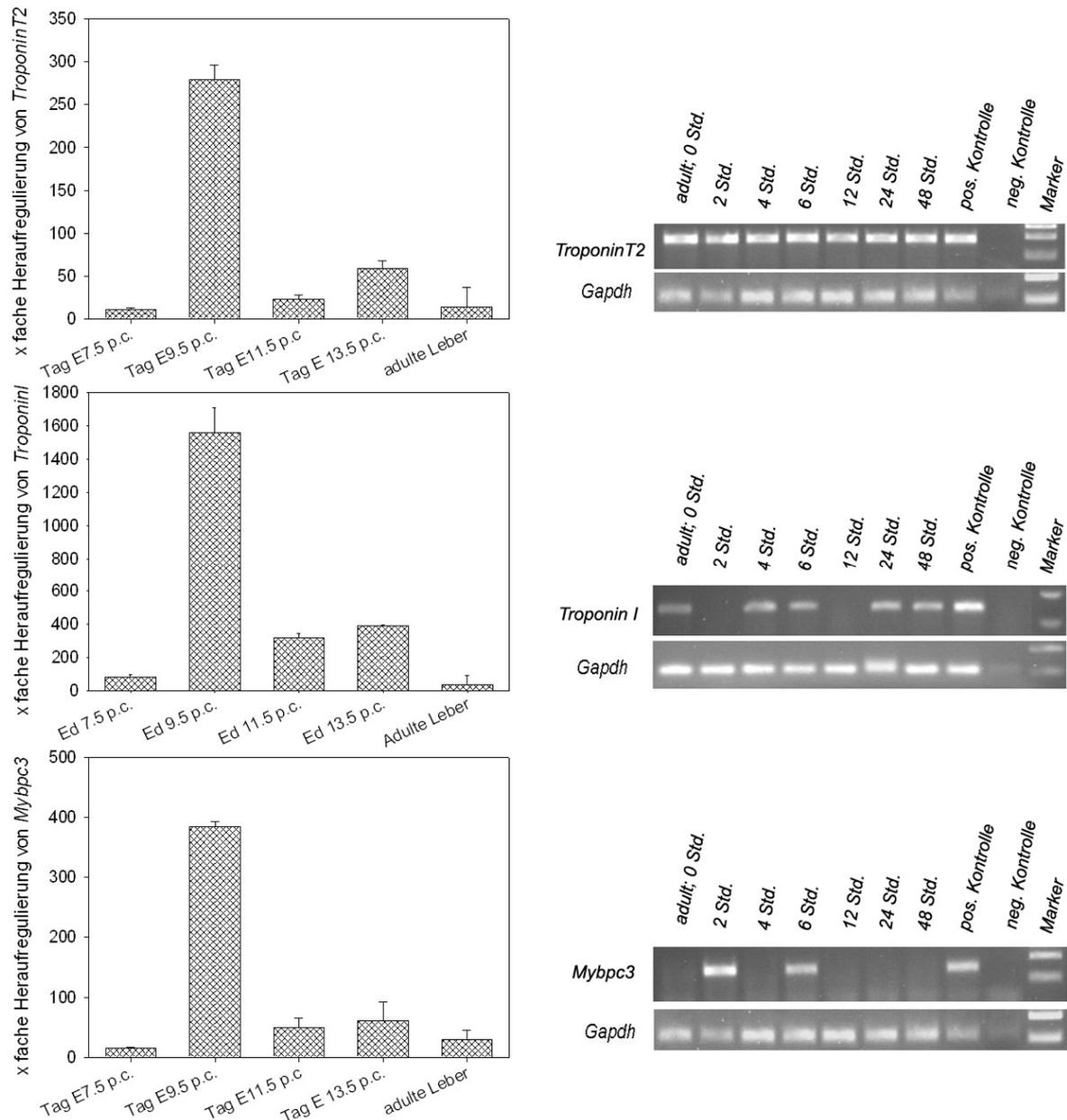


Abbildung 4.18 Troponine und Mybpc3

Für die Microarray Daten wurde die Gesamt RNA aus dem Lebergewebe der verschiedenen Stadien sowie aus dem Gesamtembryo Tag E 7.5 p.c. isoliert, in cRNA umgeschrieben und mit den Microarray Chips hybridisiert. Die detektierten Signale der verschiedenen Proben wurden gegeneinander in Clusteranalysen untersucht (Software Affymetrix) (N=2). Troponin T2, Troponin I und Mybpc3 wurden am Tag E 9.5 p.c. stark exprimiert.

Für das mRNA Expressionsprofil der Gene nach partieller Hepatektomie wurde den Mäusen 2/3 der Leber operativ entfernt. Nach der Regenerationszeit von 2 bis 48 Stunden wurde die verbliebene Leber entnommen, Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und PCR analysiert. Die Proben wurden, mit Gapdh als Ladekontrolle, auf ein Agarosegel aufgetragen (N=3). Während Troponin T2 und I wurden schwach in der adulten und regenerierenden Leber exprimiert.

Es zeigte sich eine schwache Expression nach 2 und 6 Stunden von Mybpc3.

4.2. ANALYSE AUSGEWÄHLTER GENE IN ZELLKULTURSYSTEMEN

Die Analyse der mRNA Expression der Gene vom Tag E 9.5 p.c. der fötalen Leber in der regenerierenden Leber unterstützen die Hypothese, dass es Parallelen zwischen der Entwicklung und Regeneration der Leber gibt. Jedoch geben diese Expressionsprofile keinen Aufschluß über die Funktion und den Ort der Wirkung dieser Gene.

Weitere Untersuchungen an frisch isolierten primären Hepatozyten wären vermutlich sehr aufschlussreich, da jedoch die Isolierung von Hepatozyten zeit- und kostenintensiv, ist wurde zunächst nach einer Alternative gesucht. Des Weiteren führt die Kultivierung der primären Hepatozyten innerhalb der ersten 24 Stunden zu Dedifferenzierung, die sich besonders stark in der Expression der hepatischen Gene deutlich macht (Abb. 4.19., S. 101).

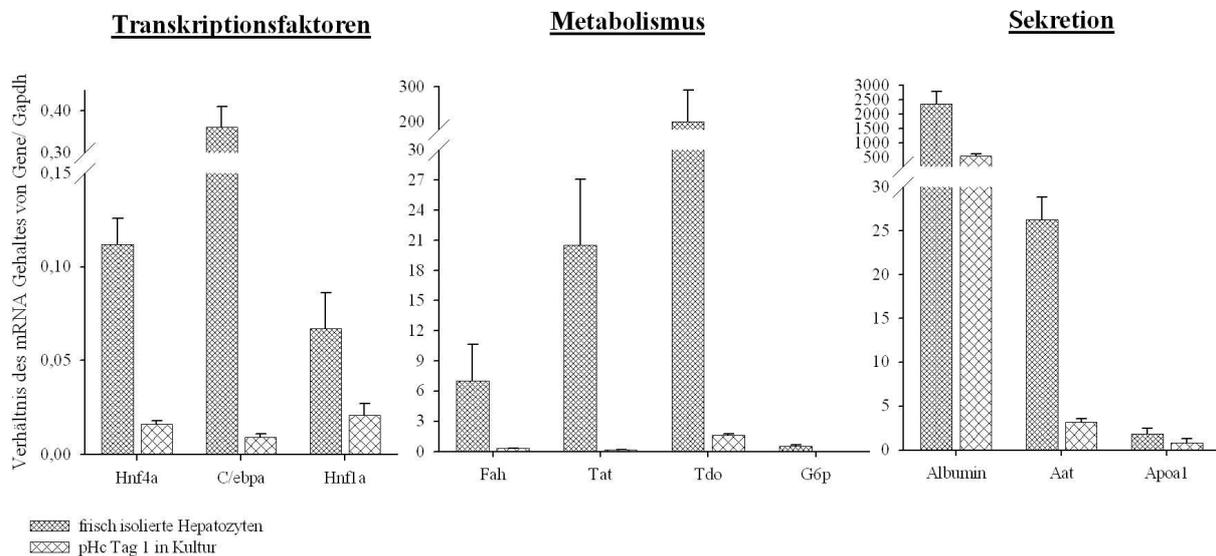


Abbildung 4.19 Vergleich des Genexpressionsprofils von frisch isolierten und 24Std. kultivierten Hepatozyten.

Die Leberzellen wurden durch Perfusion aus der Leber isoliert und in Primaria Platten in HCM (Fa. Lonza; HBM mit Zusätzen und 10% FCS) kultiviert. Nach zwei Stunden wurde das Medium gewechselt und die toten Zellen entfernt. Nach 24 Stunden wurde von diesen Zellen die Gesamt RNA isoliert in cDNA umgeschrieben und mit der qPCR die Expression ausgewählter Gene untersucht. Für die Expressionsdaten der frisch isolierten Hepatozyten wurde aus einer Probe nach der Leberperfusion die Gesamt RNA isoliert.

Für erste Untersuchungen wurden die ALDPC, welche als Hepatozytenvorläuferzellen betrachtet werden können, ausgewählt. Sie sind einfach zu handhaben und in Kultur expandierbar.

Aufgrund ihres bipotenten Phänotyps haben sie die Fähigkeit, in Abhängigkeit der Kulturbedingungen, in einen hepatozytenähnlichen als auch cholangiozytenähnlichen Zelltyp zu differenzieren. Durch ihre hepatische Vorprägung eignen sich die Zellen gut für die weitere Erforschung der Gene. So kann zum Beispiel untersucht werden, ob die Überexpression der Gene von Tag E 9.5 p.c. zu einer Differenzierung der Zellen führt.

Die ALDPC wurden durch die „Ausplattieren und Warten“ - Methode aus einer Hepatozytensuspension gewonnen, entsprechend bereits veröffentlichter Protokolle (347, 349). Die Herstellung dieser Zellen ist reproduzierbar und die Zellen selber können wie Tumorzellen über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten und durch Einfrieren konserviert werden.

Charakteristisch für die Zellen ist die Expression der hepatischen Zytokeratine 8 und 18 und der cholangiozytischen Zytokeratine 7 und 19 (349). ALDPC exprimieren auf sehr geringem Niveau leberspezifische Transkriptionsfaktoren (Hnf4a) und sekretierte Proteine wie Albumin und Aat. Metabolische Enzyme wie G6pase oder Tdo2 werden in den Zellen nicht exprimiert.

Die Zellen können als Untersuchungsobjekt für hepatoblasten-, hepatozyten- bzw. cholangiozyten-ähnlichen Zellen und für Studien zur Differenzierung von hepatoblasten ähnlichen Zellen zu Hepatozyten bzw. Cholangiozyten dienen.

Unter den gewählten Bedingungen weisen die Zellen einen hepatozyten ähnlichen Phänotyp, der jedoch noch nicht sehr stark ausgeprägt ist.

Um einen schnellen Eindruck über die durch Überexpression eines Gens bedingte Veränderung des Genexpressionsprofils zu gewinnen, wurde dieses mit der qPCR analysiert. Hierfür wurden zwei Sets an Genen untersucht: ER – Set: Gene des Tages E 9.5 p.c. der fötalen Leber; HP - Set: Gene, die dazu dienen, einen hepatischen Phänotyp beschreiben.

Sollte die Überexpression der Gene vom Tag E 9.5 p.c. unter den gewählten Bedingungen zu einer hepatischen Reifung führen, müsste eine Herunterregulierung der meisten Gene des ER - Set und eine Heraufregulierung der meisten Gene des HP - Set zu beobachten sein. Die Analyse des Genexpressionsprofil nach der Überexpression erfolgte drei Tage nach der Transduktion. Innerhalb dieses Zeitraumes sollte die Integration, Expression des eingebrachten Gens und die Veränderung in dem Expressionsprofil der Zellen messbar sein. Mit diesen Daten bekommt man einen Überblick und kann zielstrebige weiterführende Untersuchungen planen.

4.2.1. EXPRESSION DER GENE VOM TAG 9.5 P.C. IN ZELLKULTUREN

Zunächst erfolgte eine Analyse der Expression der Gene des Tages E 9.5 p.c. in den ALDPCs im Vergleich zu primären 24 Stunden kultivierten murinen Hepatozyten. Für den Vergleich wurden 24 Stunden kultivierten murinen Hepatozyten herangezogen, da innerhalb einer 24 stündigen Kultivierung eine genetische Modifizierung der Hepatozyten und anschließende Transplantation möglich ist. Viele Gene des Tages E 9.5 p.c. wurden weder in der adulten Leber noch in den primären murinen Hepatozyten exprimiert (Abb. 4.20., S. 103; Abs. 4.1). Überexpressions- und Knockdownstudien in verschiedenen Zelltypen, welche für die Leber repräsentativ sind, könnten so Aufschluss über die Funktion der Gene geben.

Für das Genexpressionsprofil der ALDPC's bezüglich der Gene des Tages E 9.5 p.c wurde die Gesamt RNA der Passage 10 der ALDPC isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Expression analysiert. Die Normalisierung der Genexpression erfolgte auf *Gapdh*. Zusätzlich zu der Quantifizierung (Abb. 4.21., S. 104) wurden die Amplifikate auf ein Agarosegel aufgetragen, umso ein Gesamtbild zu erhalten (Abb. 4.20., S. 103). Parallel dazu wurde das Expressionsprofil der Gene des Tages E 9.5 p.c. von primären Hepatozyten nach 24 Stunden in Kultur hinzugefügt.

Beim Vergleich der beiden Profile ist zu erkennen, dass die Hepatozyten nur sehr wenige der Gene von Tag E 9.5 p.c. exprimieren, was den differenzierten Zustand der Zellen unterstreicht. Im Gegensatz dazu wurden in den undifferenzierten ALDPC's viele Gene dieses Sets exprimiert.

Durch die beiden Profile und der Expressionsdaten in der regenerierenden Leber ist es leichter eine Auswahl der Gene bzw. die Methode für folgende Untersuchungen festzulegen. Gene wie *Punc*, die in keinem der untersuchten Kontexte nachweisbar waren, sind für weitere Analysen weniger von Bedeutung.

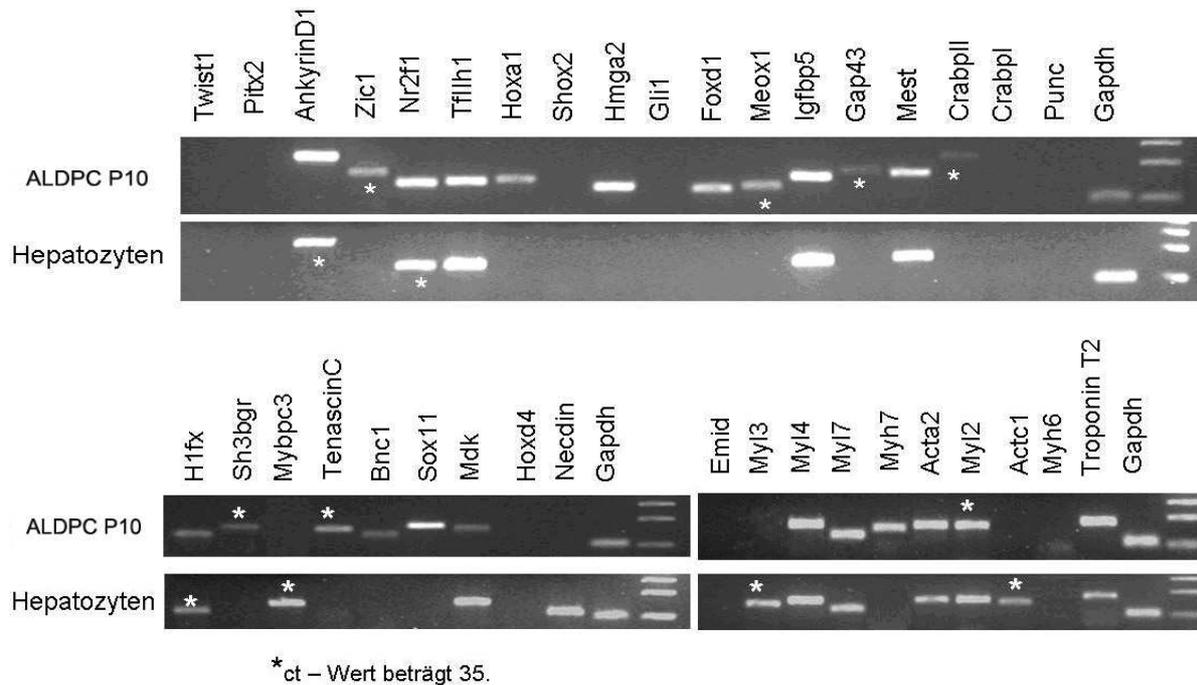


Abbildung 4.20 Agarosegel der qPCR der Expression der Gene von Tag 9.5 p.c.

Es wurde die Gesamt RNA von den ALDPC Passage 10 und von den Hepatozyten, 24 Std. in Kultur, isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der qPCR untersucht. Banden, welche mit einem Stern versehen sind, weisen in der qPCR einen Ct-Wert von 35 auf. In den Hepatozyten wurden im Vergleich zu den ALDPCs nur sehr wenige Gene vom Tag E 9.5 p.c. exprimiert.

In den ALDPC's konnten im Vergleich zu den Hepatozyten (24 Std. in Kultur) zahlreiche Gene des Tages E 9.5 p.c. der Leber nachgewiesen werden. In beiden Zelltypen wurden die Gene *Tfilh1*, *Igfbp5*, *Mest* und *Cyclin d2* exprimiert (Abb. 4.20. und 4.21.). Während bei der Expression von *Tfilh1* zwischen den beiden Zelltypen kein großer Unterschied zu beobachten ist, zeigte sich in den ALDPC's für die Gene *Cyclin d2*, *Igfbp5* und *Mest* eine geringere Expression als in den Hepatozyten (Abb. 4.21., S. 104).

Die Gene *Ankyrin D1*, *Hoxa1*, *Nr2f1*, *Hmga2*, *Sox11* und *Midkine* wurden unter den gewählten Bedingungen in den ALDPC's nicht jedoch in den 24 stündig kultivierten Hepatozyten exprimiert (Abb. 4.20., S. 103). Bei den Genen *Foxd1*, *Basonuclin1* und *H1fx* war ebenfalls eine Expression nachzuweisen, allerdings nur sehr gering (Ct-Wert: ~ 32-33), weswegen sie nicht in der Abbildung 4.21. (S. 104) dargestellt sind.

Die Gene *Twist1*, *Pitx2*, *Zic1*, *Shox2*, *Gli1*, *Meox1*, *Gap43*, *Crabpl1* und *Crabpl*, *Punc*, *Sh3bgr*, *Mybpc3*, *TenascinC* und *Hoxd4* wurden in beiden Zelltypen nicht oder nur auf sehr geringem Niveau exprimiert (Abb. 4.20., S. 103).

Die Expression der Gene des Zytoskeletts (Myl2, 3, 4, 7 Myh6, 7, Acta2, Actc1 und Troponin T2) wurden zwar in der PCR untersucht, aber nicht weiter analysiert. Die Expression dieser Gene unterscheidet sich in den beiden Zelltypen nicht sehr (Abb. 4.20., S. 103).

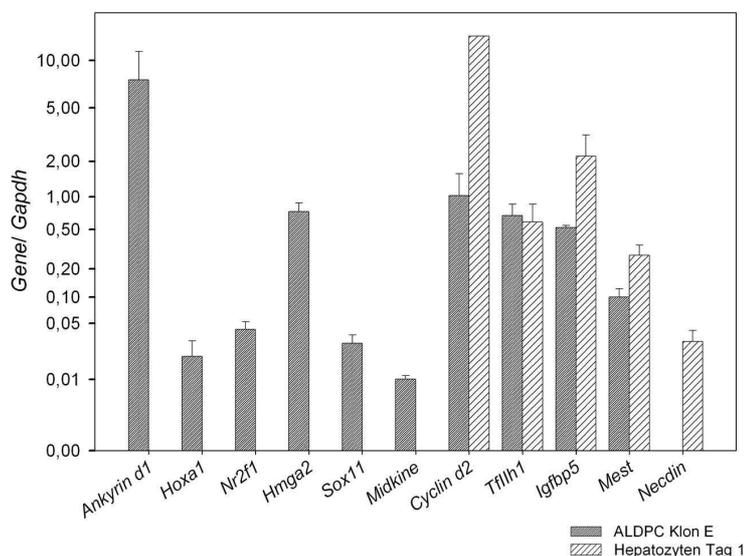


Abbildung 4.21 Expression der Gene von Tag 9.5p.c. in ALDPC und Hepatozyten (24 Std. in Kultur)

Es wurde die Gesamt RNA von den ALDPC Passage 10 und von den Hepatozyten, 24 Std. in Kultur, isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der qPCR untersucht. Dargestellt sind Gene, die in den ALDPC's bzw. in den Hepatozyten, 24 Std. in Kultur, exprimiert wurden. In beiden Zelltypen wurden die Gene *Cyclin d2*, *Tff1h1*, *Igfbp5* und *Mest* exprimiert. *Necdin* wurde nur in Hepatozyten exprimiert und *Ankyrin D1*, *Hoxa1*, *Nr2f1*, *Hmga2*, *Sox11*, und *Midkine* unter diesen Bedingungen nur in ALDPC.

4.2.2. ÜBEREXPRESSION VON AUSGEWÄHLTEN GENEN

Um mehr über die Funktion der Gene im hepatischen Kontext zu erfahren, wurde zunächst ein System etabliert, in dem die Gene des Tages E 9.5 p.c. untersucht werden können. Zur Etablierung und für erste Untersuchungen wurden drei Gene ausgewählt. Die Auswahl erfolgte aufgrund der eigenen gewonnenen und der aus der Literatur bekannten Daten. Für erste Untersuchungen wurde Gene ausgesucht die in beiden Prozessen exprimiert werden. Weiter wurden Gene ausgewählt, die weder in Hepatozyten noch in ALDPCs, nur in ALDPCs oder in beiden Zelltypen exprimiert werden. Die Auswahl fiel auf zwei Isoformen von *Pitx2*, *Midkine* und *Cyclin d2* ausgewählt.

Pitx2 wurde weder in ALDPCs noch in Hepatozyten exprimiert und zeigte aber während der Regeneration der Leber zu einem Zeitpunkt eine erhöhte Expression. Im Embryo hat *Pitx2* vielfältige Aufgaben (Abs. 4.1.3.2.1). Die Expression von *Pitx2* wird sowohl transkriptionell als auch translationell reguliert, wodurch es verschiedene Isoformen gibt. Die Isoformen a und b tragen die komplette Sequenz des C- Terminus und decken auch gemeinsam die N-Terminale Sequenz ab (350). Für erste Untersuchungen von *Pitx2* wurden die Isoformen a und b ausgewählt, um zunächst einen Eindruck einer möglichen Wirkung dieses Gens auf die Genexpression der ALDPC's zu bekommen und eventuelle Unterschiede zwischen den Isoformen zu beobachten.

Midkine wurde in ALDPCs exprimiert, aber nicht in Hepatozyten nach 24 Stunden in Kultur. Jedoch beginnt die Expression von *Midkine*, wenn Hepatozyten länger in Kultur gehalten wurden (Daten nicht gezeigt). In der regenerierenden Leber zeigte sich eine Expression während des gesamten Zeitraumes mit einer erhöhten Expression nach 2 und 24 Stunden. *Midkine* ist ein kleines Protein, welches im Organismus als Signalmolekül dient und viele Signalkaskaden aktiviert (Abs. 4.1.3.3.2).

Als drittes Gen wurde *Cyclin d2* ausgewählt, welches sowohl in ALDPCs als auch in Hepatozyten exprimiert wurde. In der regenerierenden Leber zeigte sich über den gesamten Zeitraum eine Expression, ohne wesentliche Regulierung. In der embryonalen Leber spielt *Cyclin d2* eine Rolle der Entwicklung, die es jedoch scheinbar in der adulten Leber nicht mehr hat (Abs. 4.1.3.1.2). Die Expression von *Cyclin d1* und *d2* nimmt im Verlauf der Entwicklung der Leber ab, während im Gegensatz dazu die Expression der metabolischen Enzyme ansteigt bzw. in der neonatalen Leber exprimiert werden. In der Entwicklung ist eine negativ regulierte Expression der *Cycline* in der Leber zu beobachten, die einhergeht mit einer abnehmenden Proliferation und beginnende Differenzierung der Zellen (218). Die Überexpression von *Cyclin d2* sollte somit ein Genexpressionsprofil zeigen, was durch eine verstärkte Proliferation hervorgerufen wird.

4.2.2.1. Klonierung konstitutiv exprimierender lentiviraler Vektoren

Für die Überexpression der Gene erfolgte der stabile Gentransfer mittels lentiviraler Vektoren. Lentivirale Vektoren vermitteln ein effizientes, dauerhaftes Einbringen von „genes of interest“ in die Zelle. Sie ermöglichen die Integration und stabile Expression des Transgens sowohl in teilenden als auch in nicht teilenden Zellen *in vitro* und *in vivo*. Lentivirale Partikel wurden durch die Ko-Expression von Verpackungselementen und dem Vektorgenom in einer Produzentenzelle, meist die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK) 293 oder 293T, generiert.

Für die Verpackungselemente wurde das Plasmid psPAX2 verwendet, welches zur zweiten Generation der Verpackungsplasmide gehört und die Sequenz des Rev-Proteins, der Pol-Proteine und der Gag-Proteine trägt (<http://tronolab.epfl.ch>; Abs.: 3.1.5). Das Rev-Protein unterstützt den Transport der RNA in das Zytoplasma. Die Pol-Proteine umfassen die reverse Transkriptase, RNaseH und Integrase. Die Gag-Proteine beinhalten Matrixproteine, Hüllproteine und Kernkapselprotein. Das zweite wichtige Plasmid pMD2G codiert das für die Bindung und den Eintritt in die Wirtszelle verantwortliche Virushüllprotein - wobei hier das häufig benutzte VSV-Glykoprotein verwendet wird, dessen Rezeptor auf jeder bisher untersuchten Säugetierzelle zu finden ist (<http://tronolab.epfl.ch>; Abs.: 3.1.5).

Der lentivirale Vektor trägt neben den für die Integration wichtigen Elementen den SFFV Promoter, eine interne ribosomale Bindungsstelle (IRES - internal ribosome entry site) und das Reportergen eGFP. Über den SFFV Promoter erfolgt die konstitutive Expression des Transgens und des Reportergens eGFP. Die Expression des Reportergens eGFP kann unter dem Mikroskop verfolgt werden und deutet auf eine erfolgreiche Expression des Zielgens in den Zellen hin. Mittels dem FACS kann die Anzahl der positiven grün fluoreszierenden Zellen bestimmt werden.

Die Gene wurden aus einer murinen Leber cDNA Bibliothek amplifiziert und zum Sequenzieren nach der PCR in den pCR[®]4-TOPO[®] Vektor kloniert. Nach der Sequenzierung erfolgte über die Schnittstelle BamHI das Herausschneiden des Gens aus dem pCR[®]4-TOPO[®] Vektor.

Das lentivirale Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI geöffnet und dephosphoryliert. Die beiden Fragmente, das aus den pCR[®]4-TOPO[®] herausgeschnittene Gen und

der geöffnete lentivirale Vektor, wurden miteinander ligiert (Abb. 4.22., S. 106). Mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung erfolgte die korrekte Richtung des Inserts.

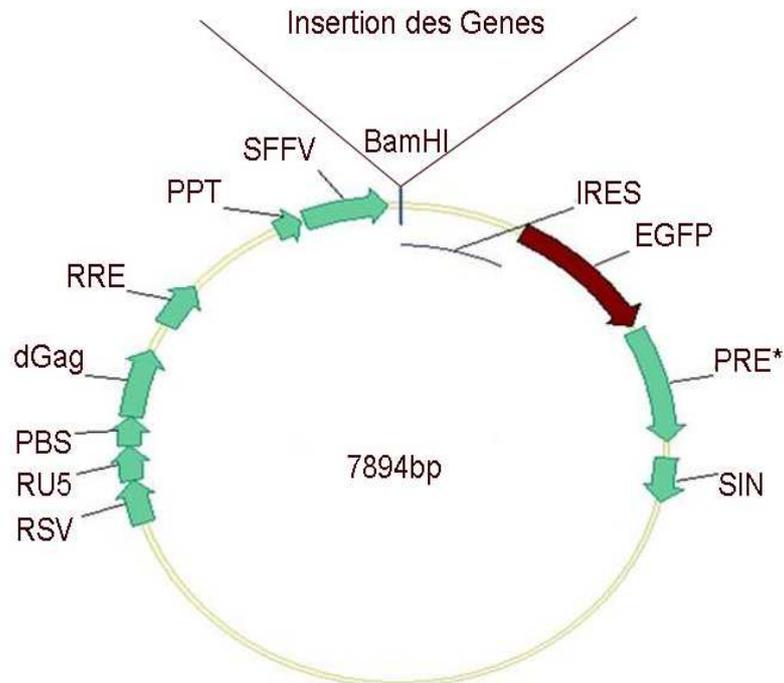


Abbildung 4.22 Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors pSFFV-IRES-eGFP für die Überexpression der Gene

RSV = Rous sarcoma virus enhancer/promoter; RU5 = 5' long terminale repeat; PBS = primer binding site; RRE = rev-responsive element; PPT = Polypurin Tract; SFFV = spleen focus forming virus; IRES = internal ribosomal binding site; EGFP = enhanced green fluorescent protein; PRE = Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; SIN = 3' self inactivating long terminal repeat (Sequenz des Vektors: Anhang)

4.2.2.2. Überexpression der Gene

Mit den in 293T HEK hergestellten lentiviralen Partikeln erfolgte die Transduktion der ALDPCs.

Für alle Gene im Allgemeinen wurde die erfolgreiche Transduktion zum einen durch den mikroskopischen Nachweis bzw. durch die FACS-Analyse von eGFP positive Zellen bestätigt (~60 – 80% eGFP positive Zellen). Der Expressionsnachweis der Zielgene erfolgte mittels qPCR (Tab. 4.2., S. 107).

	exogenes		endogenes	
<i>Pitx2a</i>	5,37	±2	0	
<i>Pitx2b</i>	4,64	±1,4	0	
<i>Midkine</i>	5,51	±0,6	0,01	±0
<i>Cyclin d2</i>	34,48	±25,4	3,04	±2,0

Tabelle 4.2 Nachweis der Überexpression der Gene in ALDPC's

Die Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln transduziert, nach 3 Tagen Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die (Über-) Expression nachgewiesen. *Pitx2* wurde in ALDPC's nicht exprimiert, *Midkine* nur auf geringem Niveau. *Cyclin d2* wurde exprimiert, jedoch konnte die Expression stark erhöht werden.

4.2.2.2.1. Genexpressionsprofil nach Überexpression von *Pitx2a*

Für die Untersuchung, um Hinweise auf eine Funktion von *Pitx2a* in einem hepatischen Kontext, wurden ALDPC mit lentiviralen Partikeln transduziert. Innerhalb der ersten drei Tagen sollte die erfolgreiche Integration und die Genexpression mit dem Erreichen eines steady-state-levels erfolgt sein und Veränderungen im Genexpressionsprofil der ALDPC messbar sein, weswegen die Analyse des Genexpressionsprofil am Tag 3 erfolgte.

Für diese Analyse wurde die Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit qPCR die Expression der Gene analysiert. Insgesamt wurden 68 Gene (Gene der Entwicklung und Regeneration: ER - Set: 26 Gene, Gene des hepatischen Panels: HP - Set: 42 Gene) untersucht.

Bei der Analyse des ER - Sets zeigte sich, dass die Expression von acht Genen, die in Kontrollen nicht exprimiert wurden, auch durch die Überexpression von *Pitx2a* nicht beeinflusst wurde. Drei Gene jedoch, deren Expression in den Kontrollen nicht nachweisbar ist, wurden infolge der Überexpression von *Pitx2a* exprimiert (*Crabp1l*, *Tenascinc* und *Twist1* (Abb. 4.23-1. D, B., S. 109)). Bei sieben Genen konnte keine wesentliche Veränderung in der Expression beobachtet werden. Eine veränderte Expression im Vergleich zu den Kontrollen war bei zehn Genen des ER - Set zu beobachten (Abb. 4.23-1., S. 109). Die Überexpression von *Pitx2a* bedingte eine erhöhte Expression der Gene *Sox11* (1. B), *Igfbp5* (1. C), *TroponinT2* und *Acta2* (1. D) und eine Herabregulierung der Expression der Gene *Mest* (1. A), *Midkine* (1. C), *Sh3bgr* (1. D), *Ankyrin D1* (1. A), *Nr2f1* (1. B) und *H1fx* (1. D) (Abb. 4.23-1. A-D., S. 109).

Bei der Analyse des HP - Sets zeigte sich ein ähnliches Bild wie beim ER - Set (Abb. 4.23-2. , S. 109). Für zwölf Gene, die in den Kontrollen nicht exprimiert wurden, zeigte sich ebenfalls keine Expression nach der Überexpression von *Pitx2a*. Bei 17 der 42 Gene ist eine Expression in den Kontrollen und in den *Pitx2a* überexprimierenden Zellen zu beobachten, wobei die Expression durch *Pitx2a* nur minimal beeinflusst wurde. Eine veränderte Expression zeigte sich bei 18 Gene, wobei es zu einer Herabregulierung von *Krt8*, *Krt18*, *Krt19*, *E-Cadherin* und *N-Cadherin* (2. B), *Albumin* (2. D) und *Ttr* und *Ugt1a* (2. E) eine heraufregulierte Expression von *Claudin1* und *Occludin* (2. B) zu beobachten war (Abb. 4.23-2. A-E., S. 109). Daneben zeigte sich eine schwache Heraufregulierung bei *Afp*, *Apoa1* und *Apoa4* (Abb. 4.23-2. C., S. 109)

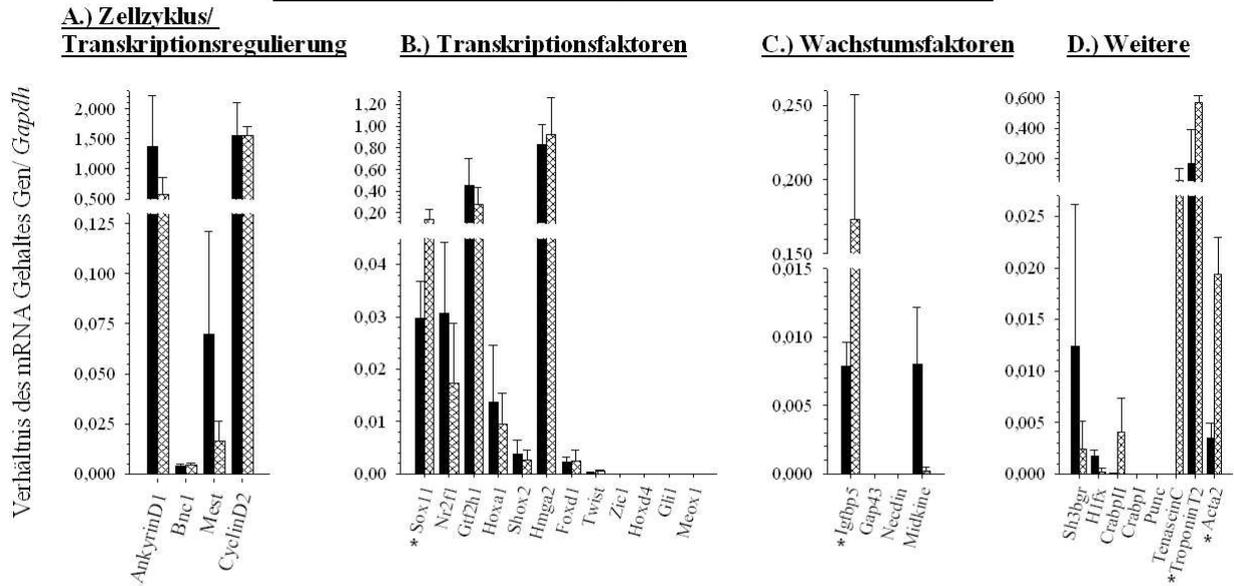
Bei der Überexpression von *Pitx2a* konnte ab Tag 5 zusätzlich eine Veränderung in der Morphologie der Zellen beobachtet werden. Die Daten sind hier für *Pitx2a* nicht gezeigt. Jedoch

zeigte sich dieselbe morphologische Veränderung ab Tag5 auch in den Zellen die Pitx2b überexprimierten (Abb. 4.25., S. 112).

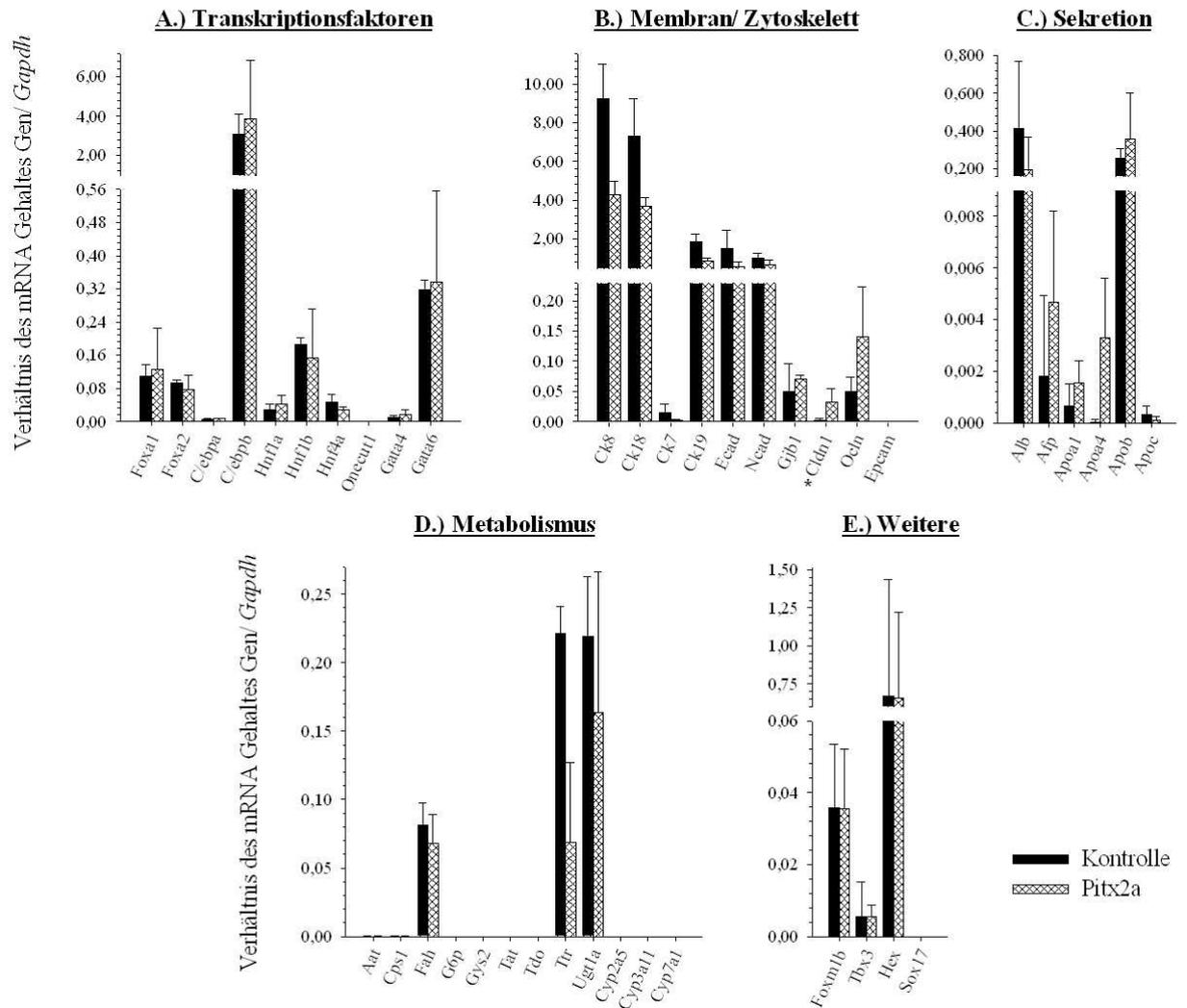
**Abbildung 4.23 Expressionsprofil des ER - und HP - Set in den ALDPC nach Überexpression von Pitx2a
(folgende Seite)**

In ALDPC wurde Pitx2a durch lentiviralen Gentransfer stabil in das Genom integriert und unter dem Sffv Promoter überexprimiert. Drei Tage nach der Transduktion erfolgte die Analyse des Genexpressionsprofil. Dafür wurde die Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der qPCR die Expression der Gene gemessen; ER - Set: Gene der Entwicklung und Regeneration; HP – Set Gene des hepatischen Panels. Die Expression der Gene wurde auf Gapdh normalisiert (N=3). Signifikante Werte (95% Koinfidenzintervall) wurden mit einem Stern markiert.

1. Pitx2a Transduktion: Expression der Gene des ER Sets



2. Pitx2a Transduktion: Expression der Gene des HP Sets



4.2.2.2. Genexpressionsprofil nach Überexpression von Pitx2b

Für den Beginn der Untersuchungen bezüglich einer Funktion von Pitx2b in einem hepatischen Kontext wurden die Experimente wie bei Pitx2a (Abs. 4.2.2.1.) durchgeführt.

Bei der Analyse des ER - Sets zeigte sich, dass die Expression von acht Genen, die nicht in den Kontrollen exprimiert wurden, auch durch die Überexpression von Pitx2b nicht beeinflusst wurde. Bei drei Genen konnte eine Expression beobachtet werden (*CrabpII*, *TenascinC* und *Twist1* (Abb. 4.24-1. D, B., S. 111)). Fünf der untersuchten Gene wiesen eine Expression auf, jedoch keine durch die Überexpression von Pitx2b beeinflusste Veränderung. Bei 12 Genen war eine veränderte Expression zu beobachten (Abb. 4.24., S. 111). Bei 8 Genen (*CyclinD2* (1. A), *Sox11*, *Gt2fh1*, *Hoxa1* und *Foxd1* (1. B), *Igfbp5* (1. C), *TroponinT2*, *Acta2* (1. D)) zeigte sich eine Heraufregulierung in der Expression, während bei vier Genen (*Mest* (1. A), *Nr2f1* (1. B), *Midkine* und *Sh3bgr* (1. D) eine Herabregulierung zu beobachten war (Abb. 4.24-1. A-E., S. 111).

Bei der Analyse des HP - Sets ist ein ähnliches Bild wie beim ER - Set zu beobachten (Abb. 4.24., S. 111). Bei zwölf Genen, die bereits in den Kontrollen nicht exprimiert wurden, zeigte sich auch nach der Überexpression von Pitx2b keine Expression. *Claudin1*, welches in ALDPC unter den gegebenen Bedingungen nicht nachweisbar ist, wurde infolge der Überexpression von Pitx2b exprimiert (Abb. 4.24-2. B., S. 111). 15 der 42 Gene wurden in den Kontrollzellen und in den Pitx2b überexprimierenden Zellen exprimiert, jedoch ist keine auffällige Veränderung in der Expression zu beobachten. Bei 14 Genen führte die Überexpression von Pitx2b zu einer veränderten Expression, wobei eine Heraufregulierung der Gene *C/ebpβ* (2. A), *Gbj1* und *Occludin* (2. B), *Afp*, *Apoa1*, *Apoa4* und *Apoc* (2. C), *Ugt1a* (2. D) und *Foxm1b* (2. E) und eine Herabregulierung der Gene *Krt8*, *E- und N-Cadherin* (2.B), *Albumin* (2. C) und *Ttr* (2. D) zu beobachten war (Abb. 4.24-2. A-E., S. 111).

Neben der Veränderung des Genexpressionsprofil konnte ab Tag 5 eine morphologische Veränderung der Pitx2 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Die Zellen vergrößerten ihr Zytoplasma/ Kern Verhältnis und bildeten einen epithelial ähnlichen Phänotyp aus (Abb. 4.25., S. 112).

Abbildung 4.24 Expressionsprofil des ER - und HP - Set in den ALDPC nach Überexpression von Pitx2b (folgende Seite)

In ALDPC wurde Pitx2a durch lenitviralen Gentransfer stabil in das Genom integriert und unter dem Sffv Promoter überexprimiert. Drei Tage nach der Transduktion erfolgte die Analyse des Genexpressionsprofil. Dafür wurde die Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der qPCR die Expression der Gene gemessen; ER - Set: Gene der Entwicklung und Regeneration; HP – Set Gene des hepatischen Panels. Die Expression der Gene wurde auf Gapdh normalisiert (N=3). Signifikante Werte (95% Koinfidenzintervall) wurden mit einem Stern markiert.

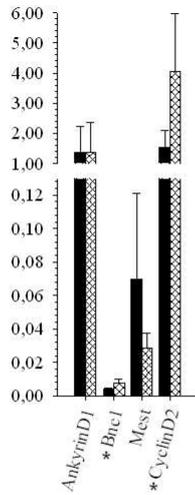
Abbildung 4.25 Expressionsnachweis von Pitx2b in ALDPC's (darauffolgende Seite)

In ALDPC wurde Pitx2b durch lenitviralen Gentransfer stabil in das Genom integriert und unter dem Sffv Promoter überexprimiert und sieben Tage lang mikroskopisch beobachtet. Die Bilder 1-4: Tag 7 der Überexpression von Pitx2b (1: 100fache Vergrößerung; 2: 100fache Vergrößerung unter UV-Licht; 3: 400fache Vergrößerung, Durchlicht; 4: 400fache Vergrößerung unter UV-Licht). Die Bilder 5-8: Tag 7 der Kontrollen (1: 100fache Vergrößerung; 2: 100fache Vergrößerung unter UV-Licht; 3: 400fache Vergrößerung, Durchlicht; 4: 400fache Vergrößerung unter UV-Licht).

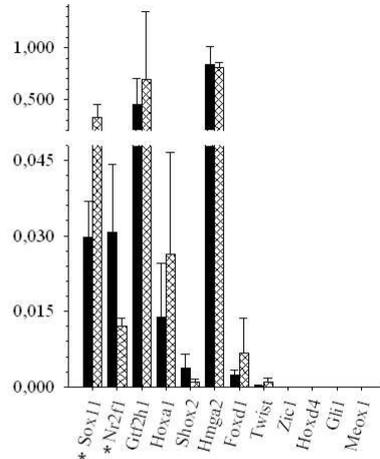
1. Pitx2b Transduktion: Expression der Gene des ER Sets

A.) Zellzyklus/
Transkriptionsregulierung

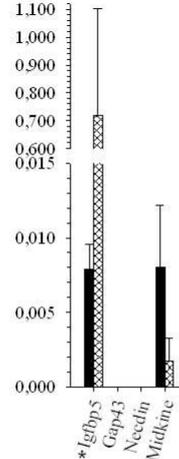
Verhältnis des mRNA Gehaltes Gen/ *Gapdh*



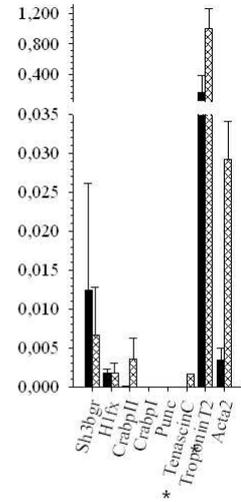
B.) Transkriptionsfaktoren



C.) Wachstumsfaktoren



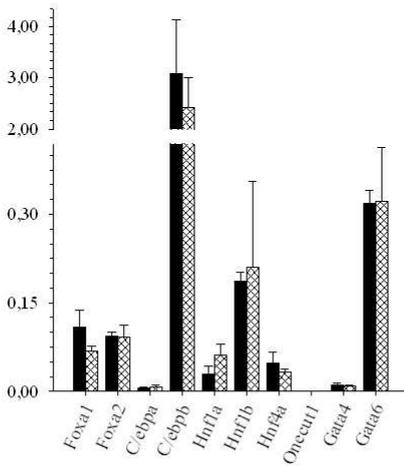
D.) Weitere



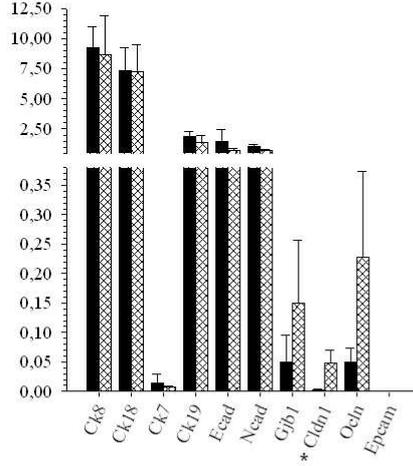
2. Pitx2b Transduktion: Expression der Gene des HP Sets

A.) Transkriptionsfaktoren

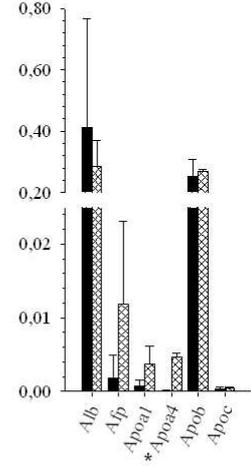
Verhältnis des mRNA Gehaltes Gen/ *Gapdh*



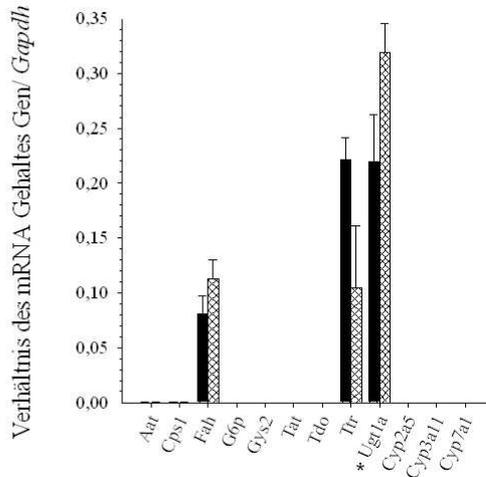
B.) Membran/ Zytoskelett



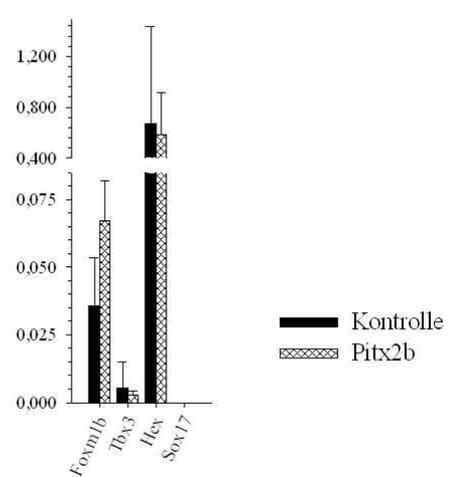
C.) Sekretion



D.) Metabolismus

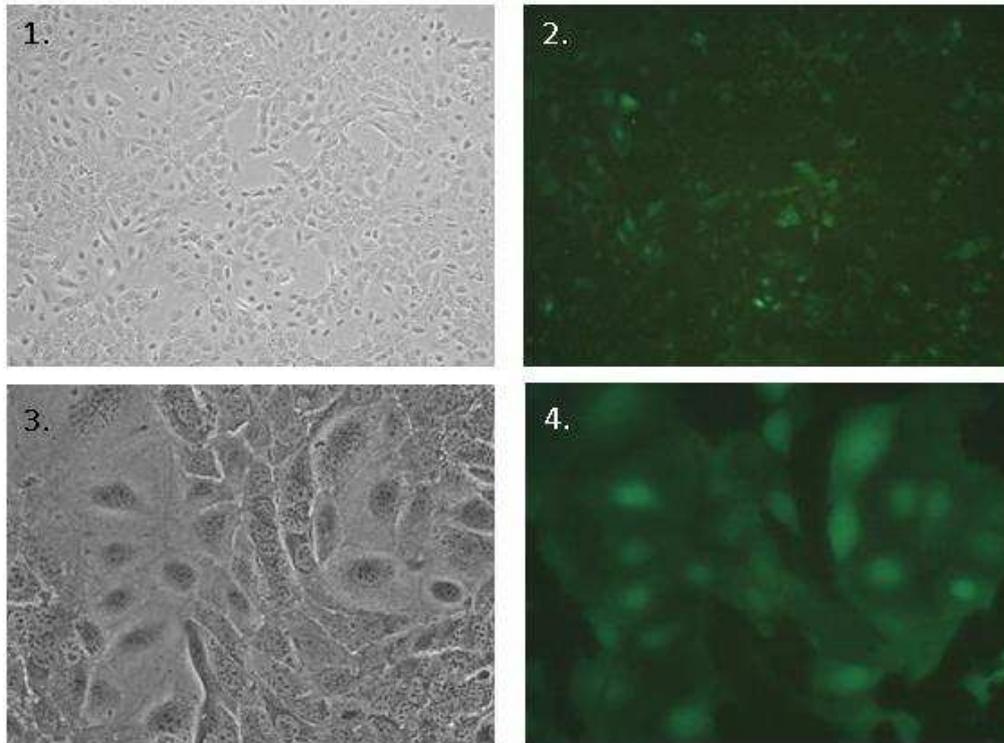


E.) Weitere

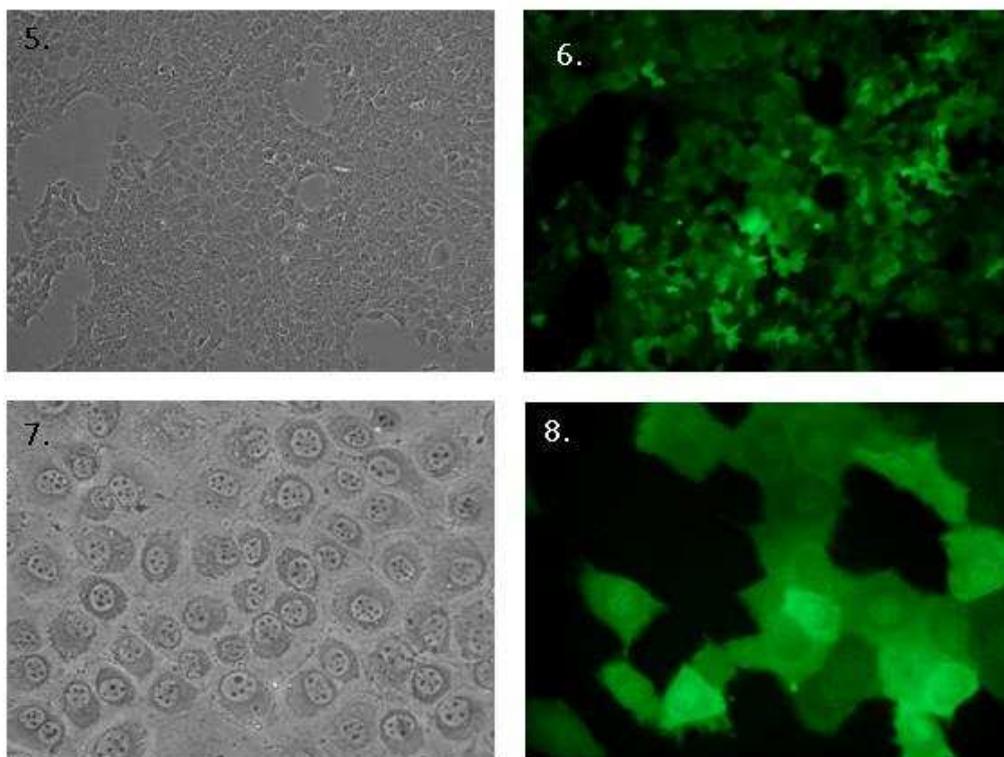


■ Kontrolle
▨ Pitx2b

A) Überexpression von Pitx2b nach 7 Tage



B) Kontrolle – Überexpression von eGFP nach 7 Tage



4.2.2.2.3. **Genexpressionsprofil nach Überexpression von Midkine**

Um Hinweise für eine mögliche Funktion von Midkine in einem hepatischen Hintergrund zu erlangen, wurden dieselben Untersuchungen wie bei Pitx2a (4.2.2.2.1) durchgeführt.

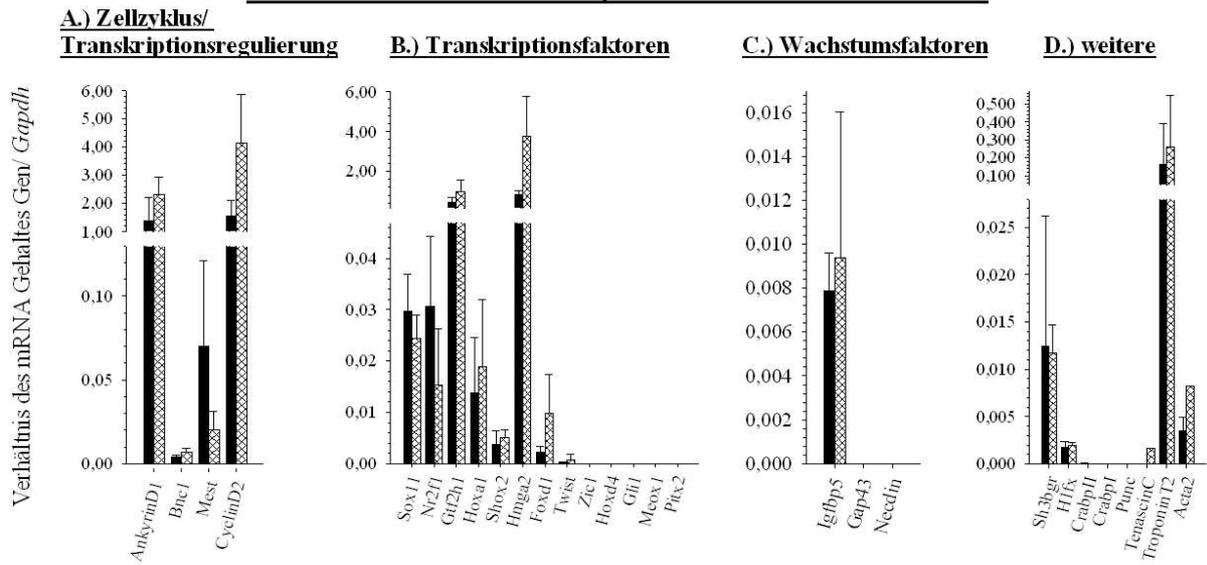
Für die meisten Gene des ER - Sets, die in den Kontrollen nicht exprimiert wurden, zeigte sich auch durch die Überexpression von Midkine keine Expression (Abb. 4.26., S. 114). Lediglich die mRNA von *TenascinC* und *Twist1*, welche nicht in den ALDPC exprimiert wurde, konnte nach der Überexpression von Midkine nachgewiesen werden (Abb. 4.26-1. D, B., S. 114). Acht Gene wurden sowohl in den Kontrollen als auch in den Midkine überexprimierenden Zellen exprimiert, jedoch zeigte sich keine starke Beeinflussung der Expression durch die veränderten Bedingungen. Für sieben Gene war eine veränderte Expression durch die Überexpression von Midkine zu beobachten (Abb. 4.26., S. 114). Vier dieser sechs Gene wurden verstärkt exprimiert (*Cyclind2* (1. A), *Hmga2* und *Foxd1* (1. B), *TroponinT2* und *Acta2* (1. D) (Abb. 4.26., S. 114)) während sich bei den Genen *Mest* (1. A) und *Nr2f1* (1. B) eine schwach erhöhte Expression zeigte (Abb. 4.26-1. A-D., S. 114)

Viele der Gene des HP - Sets wurden in ALDPC nicht exprimiert und auch die Überexpression von Midkine führt zu keiner Expression dieser Gene. Ein weiterer Teil der Gene wurde sowohl in den Kontrolle als auch in den Midkine überexprimierenden Zellen exprimiert, zeigen aber durch die Überexpression keine deutlich veränderte Expression. Die Expression von 11 Genen wurden durch die Überexpression von Midkine beeinflusst (Abb. 4.26-2., S. 114). Bei dem Vergleich der Midkine exprimierenden Zelle mit der Kontrolle zeigte sich eine Heraufregulierung von *C/ebpβ*, und *Gata6* (2. A), *Occludin* und *Gbj1* (2. B), *Apob* und *Albumin* (2. C), *Foxm1b* (2. E) *Ttr* und *Ugt1a* (2. D) und eine Herabregulierung von *Krt8* (Abb. 4.26-2. A-E., S. 114).

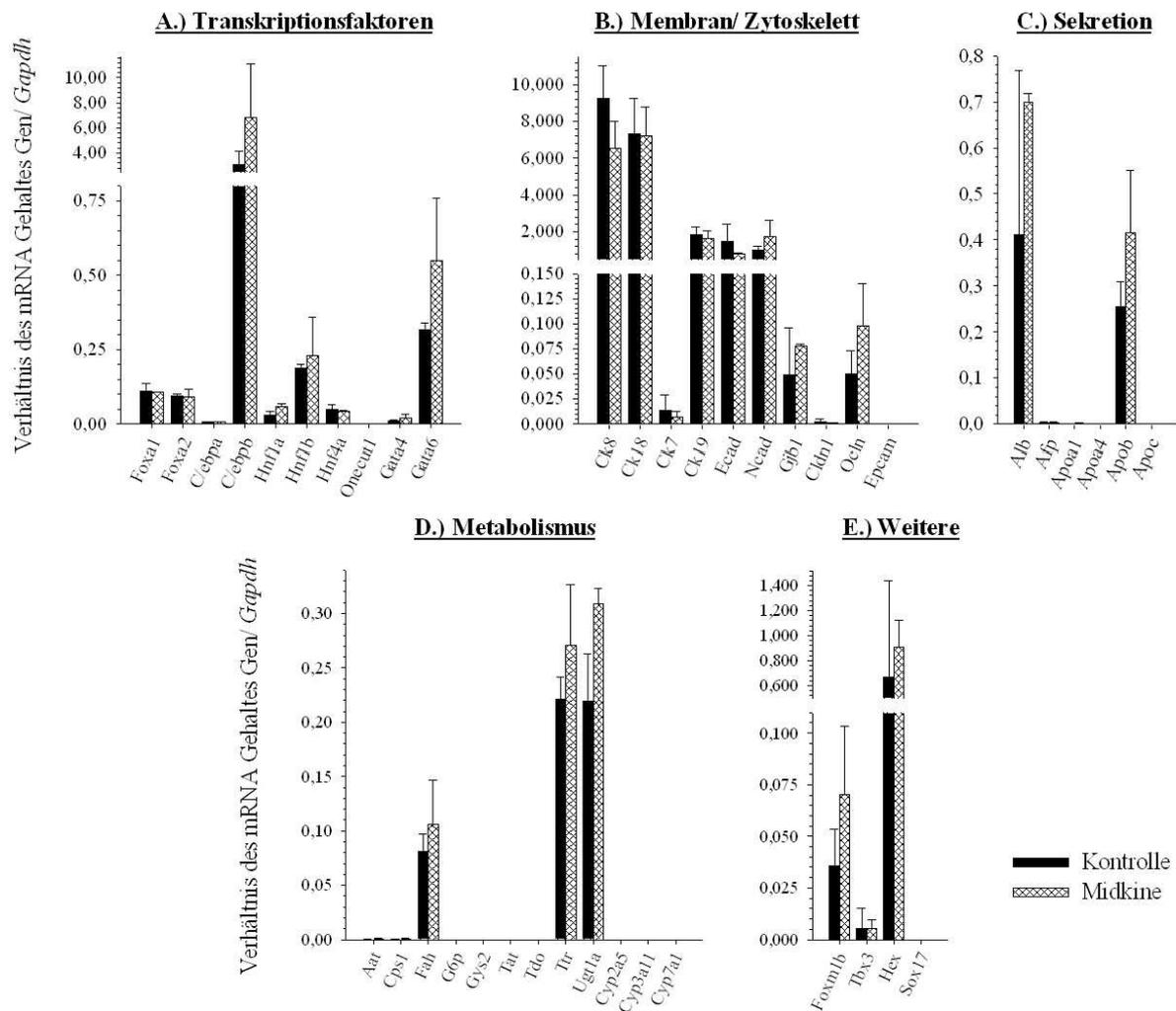
Abbildung 4.26 Expressionsprofil des ER - und HP - Set in den ALDPC nach Überexpression von Midkine (folgende Seite)

In ALDPC wurde Midkine durch lenitviralen Gentransfer stabil in das Genom integriert und unter dem Sffv Promoter überexprimiert. Drei Tage nach der Transduktion erfolgte die Analyse des Genexpressionsprofil. Dafür wurde die Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der qPCR die Expression der Gene gemessen; ER - Set: Gene der Entwicklung und Regeneration; HP – Set Gene des hepatischen Panels. Die Expression der Gene wurde auf Gapdh normalisiert (N=3). Signifikante Werte (95% Koinfidenzintervall) wurden mit einem Stern markiert

1. Midkine Transduktion: Expression der Gene des ER - Sets



2. Midkine Transduktion: Expression der Gene des HP Sets



4.2.2.2.4. Genexpressionsprofil nach Überexpression von Cyclin d2

Sowohl für Pitx2 als auch für Midkine ist bekannt, dass sie eine proliferierende Wirkung auf Zellen habe. Die Überexpression von Cyclin d2 bietet eine Möglichkeit Veränderung in der Genexpression die im Zusammenhang mit einer verstärkten Proliferation stehen könnten herauszufiltern. Für die Analyse von Cyclin d2 erfolgten dieselben Experimente wie bei Pitx2a (4.2.2.2.1).

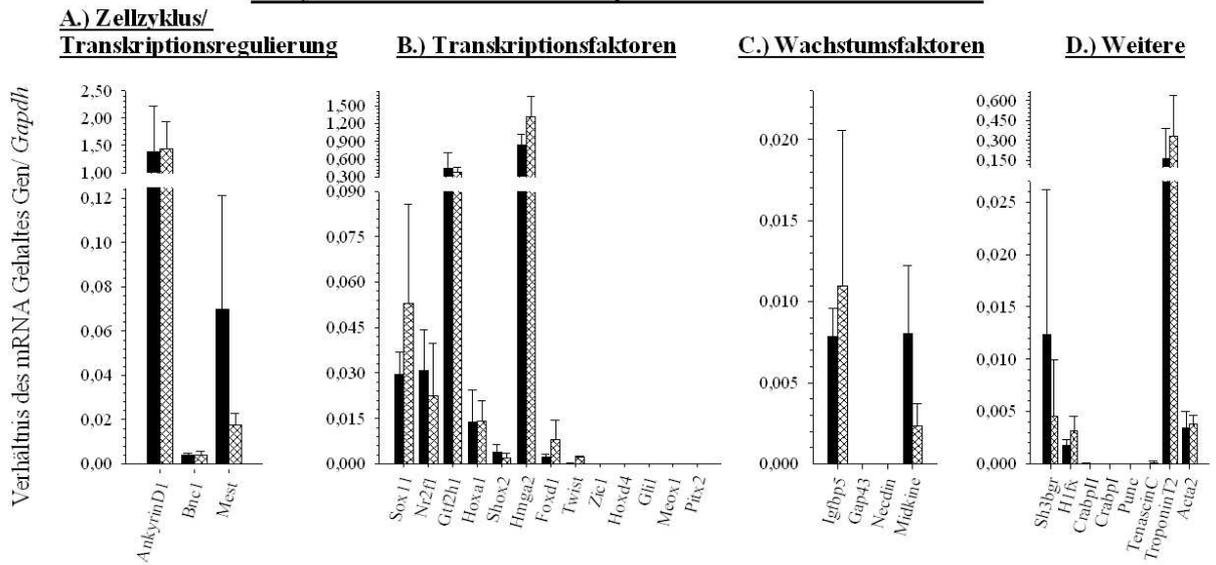
Bei der Analysen des ER - Sets konnte keine Expression bei Genen nachgewiesen, die auch in den Kontrollen nicht exprimiert wurden. Neun Gene des Sets zeigten eine Expression, jedoch keine durch die Cyclin d2 Überexpression veränderte Expression. Eine Veränderung in der Expression, hervorgerufen durch die Überexpression von Cyclin d2, konnte bei sieben Genen beobachtet werden (Abb. 4.27-1., S. 116). Hierbei zeigte sich eine Heraufregulierung in der Expression von *Hmga2* und *Foxd1*, *Sox11* (1. B) und *TroponinT2* (1. D) und eine Herabregulierung von *Mest* (1. A), *Midkine* (1. C) und *Sh3bgr* (1. D) (Abb. 4.27-1. A-D., S. 116)

Bei einigen Genen (12) des HP - Sets zeigten sich weder in den Kontrollen noch in den Cyclin d2 überexprimierenden Zellen eine Expression. Ein weitere Teil (19 Gene) wurde in der Kontrolle und den Cyclin d2 überexprimierenden Zellen auf ähnlichem Niveau exprimiert. 12 der 42 Gene wurden durch die Überexpression von Cyclin d2 beeinflusst (Abb. 4.27-2., S. 116). Bei dem Vergleich der Cyclin d2 exprimierenden Zelle mit den Kontrollen war eine Heraufregulierung von *C/ebpβ* und *Gata6* (2. A), *Occludin* (2. B), *Foxm1b* (2. E), *Afp*, *Apoa1* und *Apoa4* (2. C), *Ttr* und *Ugt1a* (2. D) und eine Herabregulierung von *Krt8* und *Krt7*, *E-* und *N-Cadherin* (2. B) zu beobachten (Abb. 4.27-2. A-E., S. 116).

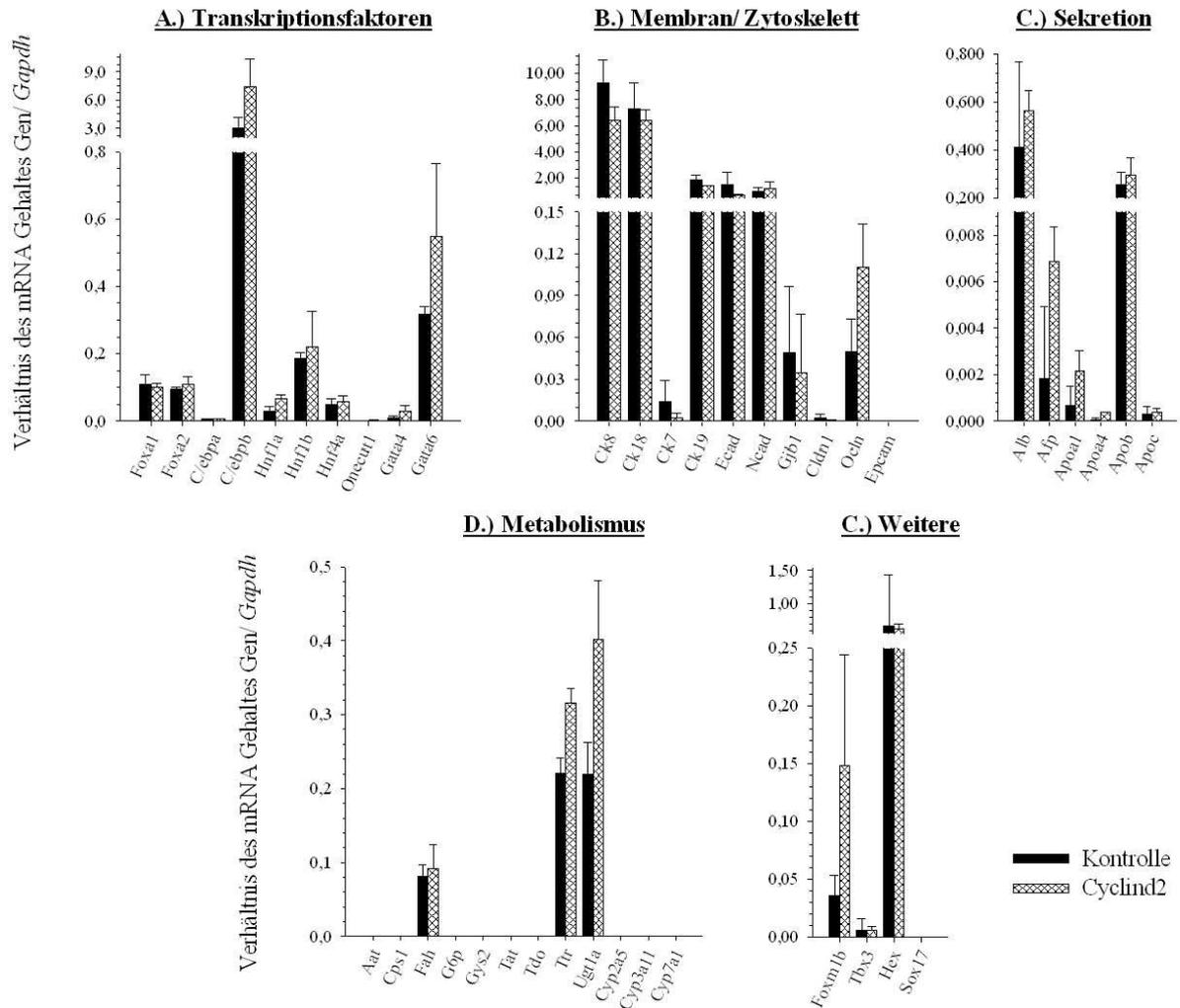
Abbildung 4.27 Expressionsprofil des ER - und HP - Set in den ALDPC nach Überexpression von Cyclind2

In ALDPC wurde Cyclind2 durch lenitviralen Gentransfer stabil in das Genom integriert und unter dem Sffv Promoter überexprimiert. Drei Tage nach der Transduktion erfolgte die Analyse des Genexpressionsprofil. Dafür wurde die Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der qPCR die Expression der Gene gemessen; ER - Set: Gene der Entwicklung und Regeneration; HP – Set Gene des hepatischen Panels. Die Expression der Gene wurde auf Gapdh normalisiert (N=3). Signifikante Werte (95% Koinfidenzintervall) wurden mit einem Stern markiert.

1. Cyclind2 Transduktion: Expression der Gene des ER Sets



2. Cyclind2 Transduktion: Expression der Gene des HP Sets



4.3. ZUSAMMENFASSUNG

Gen	Kurzbeschreibung	in der fötale Leber	Expression	
			in der Leber nach p.H	in ALDPC u/ o primären Hepatozyten (pHc)
Zellzyklus/ Regulierung Transkription				
<i>Basonuclin1</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_007562.2 reguliert die Proliferation und unterdrückt die Differenzierung, fungiert möglicherweise als Regulator der rRNA Transkription (215, 216) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 2 und 24 Std.	schwache Expression in ALDPC
<i>Cyclin d2</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_009829.3 bildet Komplexe mit Cdk4 und Cdk6, wichtig für die Progression der G1-Phase, Abbau führt zum Ende der G1-Phase (217) 	E 9.5 p.c.	nimmt in den ersten 24 Std. ab	Expression in ALDPC und pHc
<i>Ankyrin d1</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_013468.3 Expression bei Stress oder Verletzung (219) hat eine DNA Bindungsaktivität und ist ein negativer Regulator des Zellzyklusprogression (220, 221) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 12 Std.	in ALDPC und schwache Expression in pHc
<i>Mest</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_008590.1 kontrolliert das Körpergewicht (227) beeinflusst die Expression von adipösen Gene und dient als Marker für die Größe von Adipozyten (226) 	E 9.5 p.c.	nimmt in den ersten 12 Std ab und steigt dann wieder	in ALDPC und pHc

Gen	Kurzbeschreibung	in der fötale Leber	in der Leber nach p.H	Expression	
					in ALDPC u/ o primären Hepatozyten (pHc)
Transkriptionsfaktoren					
<i>Pitx2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_001042502.1 • kontrolliert die Proliferation in Geweben (231, 232, 233, 234) • beeinflusst die li/re Asymmetrie in der Maus (235, 236238, 237) • <i>Pitx2</i>(-/-) führt zu Abnormalität bei der Entwicklung (239) • bedingt das Rieger Syndrom (240, 229) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 24 Std.	keine Expression	
<i>Zic1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_009573.3 • Inhibierung der Entwicklung und neuronaler Differenzierung (243) • in das Joubert Syndrom und die Dandy-Walker Fehlbildung involviert (244) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 6 Std.	schwache Expression in ALDPC	
<i>Twist1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_011658.2 • an der Morphogenese der Extremitäten beteiligt (247; 248) • unterstützt die Metastierung von Tumoren und den epithelialen- mesenchymalen Übergang (249, 251, 250) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 4 Std.	keine Expression	
<i>Sox11</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_009234.6 • in der embryonalen Entwicklung an der Bestimmung von Zellschicksale beteiligt (252) • wichtige Komponente bei dem Regenerationsprogramm der Nerven nach einer Verletzung (253) • <i>Sox11</i>(-/-) Mäuse weisen starke entwicklungsbedingte Defekte in verschiedenen Geweben auf (252) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 2 und 12 Std.	in ALDPC	

Gen	Kurzbeschreibung	in der fötale Leber	Expression	
			in der Leber nach p.H	in ALDPC u/ o primären Hepatozyten (pHc)
Transkriptionsfaktoren				
<i>Nr2f1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_010151.2 • unterstützt die Differenzierung in verschiedenen Zelltypen (255, 256) • reguliert die Transkription verschiedener metabolischer Gene (257) • interagiert mit Hnf4a (258, 259, 260, 89) 	E 9.5 p.c.	nach p.H. ab und wird über den Zeitraum	in ALDPC und pHc
<i>Gtf2h1 (TFIIH)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_008186.4 • beteiligt an der Bildung der Mallory Körper in Hepatozyten (264) • phosphoryliert E2F-2 u. bedingt dadurch die Degradation von E2F-2 (266) • Rolle bei der DNA Reparatur und in der Transkription von Klasse II Genen (265) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 2 und 6 Stunden	in ALDPC und pHc
<i>Hmga2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_010441.2 • beeinflusst den Aufbau von Kernprotein-Strukturen, die an Prozessen wie der Transkription u. Replikation beteiligt sind (270, 271, 272) • Aufgaben im embryonalen Zellwachstum und Differenzierung (273, 263) • dirigiert das transkriptionelle Netzwerk, welches zu einer EMT führt (276, 277) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 6 Std	in ALDPC
<i>Meox 1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_010791.3 • Essentiell für die Formierung, Patterning und Differenzierung der Somiten (278) • Regulierung der chondrozytischen und myogenischen Differenzierung (278) • Rolle bei der Spezifizierung der mesodermalen Zellen (279) 	E 9.5 p.c.	schwache Expression nach 4 und 12 Std.	schwache Expression in ALDPC

Gen	Kurzbeschreibung	in der fötale Leber	in der Leber nach p.H	Expression in ALDPC u/ o primären Hepatozyten (pHc)
Transkriptionsfaktoren				
<i>Shox2</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_013665.1 Essentiell für die Differenzierung der Herzschrittmarkerzellen (289) Regulierung der Proliferation von mesenchymalen Stammzellen und Chondrozyten (392, 285) Verlust o. Mutation ist beim Menschen mit Minderwuchs assoziiert (373) 	E 9.5 p.c.	schwache Expression in den ersten 4 Stunden	keine Expression in pHc, teilweise schwache Expression in ALDPC
<i>Gli1</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_010296.2 Regulierung von Bcl-2 über Sonic Hedgehog (389) Balance zwischen Gli1 u. p53 bestimmt die Proliferation von neuronalen Stammzellen und Tumorzellen (395) Shh beeinflusst Proliferation und Differenzierung der fötalen Vorläuferzellen, Gli dient als Vermittlerprotein, Expression von Gli1 in der fötalen Leber, nicht exprimiert in der adulten (290) 	E 9.5 p.c.	Expression in den ersten 6 Std.	in ALDPC
<i>Foxd1</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_008242.2 Einfluss auf die Entwicklung der Niere und Netzhaut (393, 292, 293) Regulierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT and NF-κB (394) Reguliert durch Sonic Hedgehog in pluripotenten mesenchymalen Zellen (362) 	E 9.5 p.c.	Expression nach 24 Std. jedoch nicht in allen Proben	in ALDPC

Gen	Kurzbeschreibung	in der fötale Leber	Expression	
			in der Leber nach p.H	in ALDPC u/ o primären Hepatozyten (pHc)
Transkriptionsfaktoren				
<i>HoxA1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_010449.4 • Differenzierung von ES Zellen (297, 298) • Bedingt Zellwachstum und führt zu onkogenen Transformation (300) • Expression in der adulten Leber (388) 	E 9.5 p.c.	schwache Expression zwischen 4 und 12 Stunden	in ALDPC
<i>Hoxd4</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_010469.2 • Fehlen von Hoxd4 führt zu Missbildungen zwischen den Halswirbel C1 bis C3, Defekte im Knorpelskelett der Embryonen von Tag 14.5 p.c., (301, 303) 	E 9.5 p.c.	Expression nach 24 Std., jedoch nicht in allen Proben	keine Expression

Gen	Kurzbeschreibung	in der fötale Leber	Expression	
			in der Leber nach p.H	in ALDPC u/ o primären Hepatozyten (pHc)
Wachstumsfaktoren				
<i>Gap43</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_008083.2 Expression vorrangig in Regionen des NS, bei einer Verletzung der Nerven oder des ZNS an der neuronalen zytoskeletären Architektur beteiligt, Rolle in der Mitose u. der Erschaffung der neuronalen Polarität (304) GAP43(-/-) defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt (307) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 24 Std.	schwache Expression in ALDPC
<i>Midkine</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_001012335.1 Verstärkte Expression in Tumorgewebe und verletztem Gewebe, Rolle beim Wachstum, dem Überleben und der Migration diverser Zelltypen (308, 310, 214) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 2 und 24 Std.	Expression in ALDPC und pHc
<i>Igfbp5</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_010518.2 Kontrolle bei der Proliferation von spezifischen Tumorzelltypen, Einfluss auf die Zellmigration (315) antiangiogenes Protein (315) bedingt G2/M Zellzyklusarrest und Apoptose (320) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 2 und 48 Std.	Expression in ALDPC und pHc
<i>Necdin</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_010882.3 Expression in fast allen postmitotischen Neuronen, beeinflusst morphologische Differenzierung von Zellen (322) wachstumshemmendes Protein, welches die Progression des Zellzyklus an verschiedenen Punkten blockiert (322, 323, 324) Wachstumshemmung ohne Verlust der Vitalität der Zellen (325, 326, 387) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 4 und 48 Std.	in pHc

Gen	Kurzbeschreibung	in der fötale Leber	in der Leber nach p.H	Expression	
				in ALDPC u/ o primären Hepatozyten (pHc)	
Transport					
<i>Crabpl</i> und <i>CrabplI</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_013496.2 und NM_007759.2 beeinflussen durch die Bindung von Retinolsäure die intrazelluläre Konzentration (331) <i>CrabplI</i> transportiert die Retinolsäure in den Zellkern und beeinflusst die retinolsäure vermittelte Transkription (390, 391) <i>Crabpl</i> wird überall exprimiert - <i>CrabplI</i> nicht in ausgereiften Zellen (332, 333) beeinflussen die Differenzierung in verschiedenen Zellen (334, 332); <i>Crabpl</i> hat Einfluss auf die Cyp26 vermittelten Metabolismen (335) 	E 9.5 p.c.	keine Expression	<p><i>CrabplI</i>: schwache Expression in ALDPC, keine pHc</p> <p><i>Crabpl</i>: keine Expression in ALDPC und pHc</p>	
Zelladhäsion					
<i>Emid2</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_024474.2 Aufgabe bei der Entwicklung der Niere; Interaktionen mit extrazellulären Matrixkomponenten (338) 	E 9.5 p.c.	keine Expression	keine Expression	
<i>Punc</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_008988.2 Zelladhäsionsmolekül in <i>Punc</i>^{-/-} Mäusen - verschlechterte Motorkoordination, möglicherweise eine Rolle bei der neuronalen Migration (340) 	E 9.5 p.c.	schwache Expression in den ersten 4 Std.	keine Expression	
<i>TenasinC</i>	<ul style="list-style-type: none"> NM_011607.2 extrazelluläres Matrixprotein, in Knorpeln, Knochen und Sehnen exprimiert, Einfluss auf die Zell-Substrat Adhäsion und Migration von Zellen (342) 	E 9.5 p.c.	Peak nach 6 Std.	schwache Expression in ALDPC	

Gen	Kurzbeschreibung	in der fötale Leber	Expression	
			in der Leber nach p.H	in ALDPC u/ o primären Hepatozyten (pHc)
Weitere Gene				
<i>H1fx</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_198622.1 • Mitglied der Histone H1 Familie 	E 9.5 p.c.	Peak nach 48 Std.	Expression in ALDPC und schwache Expression in pHc
<i>Sh3bgr</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_015825.2 • Funktion bei Protein-Protein Interaktionen (345) 	E 9.5 p.c.	schwache Expression während der Regeneration	schwache Expression in ALDPC
<i>Hsd11b2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_008289.2 • Enzymkomplex, der für die Konversion von Kortisol zu Kortison verantwortlich ist (346) 	E 9.5 p.c.	keine Expression	nicht getestet

Gen	Kurzbeschreibung	in der fötale Leber	Expression	
			in der Leber nach p.H	in ALDPC u/ o primären Hepatozyten (pHc)
	Zytoskelett			
leichte Kette der Myosine	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MyI2</i> (NM_010861.3) • <i>MyI3</i> (NM_010859.2) • <i>MyI4</i> (NM_010858.4) • <i>MyI7</i> (NM_022879.2) 	E 9.5 p.c.	MyI2 und 3 in den ersten 4 Std. und nach 48 Stunden exprimiert; MyI4 und 7 2-48 Std.	MyI2, 4 und 7: in ALDPC und pHc exprimiert MyI3: schwach in pHc
schwere Kette der Myosine	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Myh6</i> (NM_001164171.1) • <i>Myh7</i> (NM_080728.2) 	E 9.5 p.c.	Myh6 nach 2 Std., Myh7 in den ersten 12 Std.	Myh6: keine Expression Myh7: in ALDPC
Aktine	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Actc1</i> (NM_009608.3) • <i>Acta2</i> (NM_007392.2) 	E 9.5 p.c.	werden exprimiert	Acta2: in ALDPC und pHc exprimiert Actc1: schwach in pHc
Troponine	<ul style="list-style-type: none"> • <i>TroponinT2</i> (NM_001130174.1) • <i>Troponin I</i> (NM_001112702.1) 	E 9.5 p.c.	Tnnt2 von 2 - 48 Std.; Tnni schwache Expression nach 4, 6, 24 und 48 Std.	in Aldpc und pHc, Tnni nicht getestet
<i>Mybpc3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • NM_008653.2 • Myosin bindendes Protein, Herzisoform 	E 9.5 p.c.	schwaches Signal nach 2 und 6 Std.	schwache Expression in pHc

V. DISKUSSION

Sowohl die Entwicklung als auch die Regeneration eines Organs unterliegt komplexen Mechanismen. Ich habe in meiner Arbeit untersucht, ob Genexpressionsmuster, die in der Organentwicklung aktiv sind, auch in der Regeneration der adulten Leber dedektierbar sind.

In beiden Prozessen wird eine Zelle durch verschiedene äußere und innere Faktoren, durch ihre räumliche Lage und durch die Wechselwirkung mit anderen Zellen mitbestimmt. Während die Entwicklung der Leber von undifferenzierte Zellen ausgeht, hängt die Regeneration der Leber von der Proliferation der ausdifferenzierten Zellen ab. Der Verlust von Lebergewebe durch eine partielle Hepatektomie oder eine akute Zellschädigung wird durch die Proliferation von Hepatozyten kompensiert, während bei der chronischen Schädigung bzw. bei einer eingeschränkten Proliferation von Hepatozyten undifferenzierten Stamm- bzw. Vorläuferzellen (Ovalzellen) aktiviert werden (351, 11).

Wie sehr Proliferation, Migration und Kommunikation ineinander greifen, zeigt sich besonders bei der Entwicklung von Leber und Pankreas. Die vom Herzgewebe ausgeschütteten Fgf's und die vom Septum Transversum kommenden Bmp – Signale initiieren die hepatische Entwicklung des nahe dem Herzen gelegenen Entoderms. Weiter entferntes außerhalb der Reichweite der Faktoren liegendes Entoderm entwickelt sich im Folgenden zur Pankreas (316, 65, 317). Die Bmp's und Fgf's bedingen die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren wie Gata4, Hex und Prox1, die in der weiteren Signalkaskade die Expression hepatischer Gene wie das Albumin aktivieren (316, 65, 317).

Nach der Spezifizierung des hepatischen Entoderms kommt es gegen Tag E 9.5 p.c zur Auflösung der Basalmembran, welche die Leberknospe umgibt, und zur Migration der darin befindlichen Zellen in das Septum Transversum. In der extrazellulären Matrix des Septum Transversum sind verschiedene Wachstumsfaktoren wie Hgf gebunden, die für die weitere Proliferation und Differenzierung der Zellen wichtig sind (316, 65, 317). Während der Entwicklung der Leber sind verschiedene Zelltypen vorhanden, die benötigt werden, um ein voll funktionstüchtiges Organ auszubilden (316, 65, 317). Die Kommunikation aller Zelltypen untereinander ist essentiell, um die Proliferation, Migration und Weiterdifferenzierung der Zellen zu organisieren.

In der regenerierenden Leber ist der Einfluss der im Organ bzw. sich im Umfeld befindlichen Zellen zunächst für den schnellen Start der Regeneration nach einer Verletzung wichtig. Durch die Verletzungen werden verschiedene Signalmoleküle im Umfeld der Hepatozyten ausgeschüttet, die Transkriptionsfaktoren wie C/ebp β , c-myc und Ap1 aktivieren. Dies führt zum Wiedereintritt der ruhenden Hepatozyten in den Zellzyklus und gewährleistet die Aufrechterhaltung der metabolischen Leistung gewährleisten (352).

Innerhalb der ersten Minuten kommt es zum Abbau der extrazellulären Matrix durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen. Dieser Abbau setzt Wachstumsfaktoren wie Hgf frei und macht Raum für die proliferierenden und migrierenden Zellen (127, 121, 352). Nachdem die Hepatozyten den ersten Zellzyklus durchlaufen haben, besteht der nächste Schritt darin, mit dem funktionellen Aufbau der Leber zu beginnen. Dies spiegelt sich wieder in der Ausbildung der Gallengänge und Sinusoide im Zusammenhang mit der Orientierung der Hepatozyten erforderlichlich.

Beide Prozesse, die Entwicklung und Regeneration der Leber, sind stark geprägt von der Proliferation und Migration von Zellen, dem (Neu-) Aufbau des Epithels und der extrazellulären Matrix, wobei die Zell-Zell Kommunikation essentiell ist.

Für viele Signalwege und Genregulierungen gibt es bereits Klarheit bzw. Wissen über die Wirkung und Funktion in beiden Prozessen (Abs. 1.4). Jedoch gibt es weitere Signalkaskaden, die bisher meist nur in sich entwickelnden Embryonen untersucht wurden. Lange Zeit gab es kaum Anhaltspunkte über dessen Wirken in der regenerierenden Leber. Zu solchen Prozessen/ Signalkaskaden gehören unter anderen der epitheliale mesenchymale Übergang (EMT) von Zellen, der Sonic Hedgehog und der Wnt Signalweg.

Auf der Suche nach neuen Genen, die in Entwicklungs- und Regenerationsprozesse der Leber involviert sind, stellen Microarrays eine gute Möglichkeit dar, um mit relativ geringem Zeitaufwand tausende Gene parallel zu analysieren. Unter Berücksichtigung verschiedenster Kriterien können die Daten bioinformatisch analysiert werden und Sets von Genen für weiter Untersuchungen herausgearbeitet werden.

2003 nutzten Jochheim und Kollegen (208) die Technik der mRNA-Microarrays, um so die Expression von Genen zu einem definierten Zeitpunkt der fötalen Leber zu analysieren. Dabei wurden 4242 Gene und ESTs identifiziert, die während der Entwicklung der Leber exprimiert werden. Beim Vergleich der Stadien untereinander als auch im Vergleich zu der adulten Leber kristallisierten sich in Cluster - Analysen 130 Gene heraus, die ausschließlich in einem der untersuchten Stadien eine hohe Expression aufwiesen (209).

Viele der 130 Gene, vor allem die Gene vom Tag E 9.5 p.c., stehen im Zusammenhang mit Wachstums-, Differenzierungs- und/oder Entwicklungsprozessen und werden wahrscheinlich in den unterschiedlichsten Zellen bzw. Geweben exprimiert. Die Expression dieser Gene spiegelt den starken Proliferations- und Differenzierungsdruck der Zellen während der Entwicklung der Leber wieder.

Nach dem Herausarbeiten des Sets der 130 Gene sollte im Folgenden die Expression dieser Gene in der regenerierenden Leber untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Untersuchung der 40 Gene des Tages E 9.5 p.c. begonnen. Am Tag E 9.5 p.c. ist die Leber zum ersten Mal makroskopisch sichtbar; die Basalmembran, welche die Leberknospe umgibt, beginnt porös zu werden und die Zellen wandern von der Knospe in das Septum Transversum und proliferieren verstärkt. Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen stehen zu diesem Zeitpunkt im Vordergrund. Zu den anderen späteren Zeitpunkten der fötalen Leber wurden viele Gene identifiziert, die in Zusammenhang mit Metabolismus, Transport oder Hämatopoese stehen und somit für unsere weiteren Untersuchungen zweitrangig waren.

Für die Analyse der Expression dieser Gene in der regenerierenden Leber wurde an Mäusen eine 2/3 Hepatektomie durchgeführt und nach verschiedenen Zeitpunkten das Gewebe entnommen. Mit Hilfe der qPCR wurde die mRNA Expression der differentiell exprimierten Gene des Tages E 9.5 p.c. zu diesen Zeitpunkten untersucht. Da nach der Entnahme des Gewebes keine Aufreinigung der Zellen erfolgte, wurden auch hier, wie bei den Microarrays, die Analysen an einem Gemisch von Zellen durchgeführt. Der Hauptanteil der Zellen liegt bei den Hepatozyten, aber auch andere in der Leber befindlichen Zellen wie Kupfferzellen und Cholangiozyten sind zu einem geringen Prozentsatz in der Probe enthalten (Abs. 1.1). Des Weiteren werden zu einem geringen Anteil auch Zellen vertreten sein, die über den Blutstrom herangetragen werden.

Bei der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse ist weiter zu beachten, dass die Experimente an lebenden Objekten erfolgten und die partiellen Hepatektomien von

verschiedenen Personen durchgeführt wurde, wodurch Schwankungen bei den Profilen auftreten können. Die Kombination aus natürlichen und experimentellen Schwankungen des Systems und den Schwankungen durch die Regulierung der Expression der Gene, vor allem bei Transkriptionsfaktoren, kann zu Unterschieden in der Expression in den einzelnen Proben eines Zeitpunktes führen und dadurch eine hohe Standardabweichung bedingen.

Für die meisten der am Tag E 9.5 p.c. als differentiell exprimiert identifizierten Gene konnte eine Expression während der Regeneration der Leber nachgewiesen werden. Diese Überlappungen unterstützen die Hypothese, dass in beiden Prozessen ähnliche Mechanismen ablaufen.

Ein in der Entwicklung für die Organisation von Organen sehr wichtiger Prozess ist der epitheliale-mesenchymale Übergang von Zellen (194). Auch in Bezug auf die Regeneration der Leber wird angenommen, dass dieser Prozess stattfindet (194). Für den Übergang der epithelialen Zellen zu einem mesenchymalen Phänotyp sind Aktivierungen verschiedener Signalkaskaden nötig. Zwei der Transkriptionsfaktoren, die diese Veränderung regulieren, sind die Gene *Twist1* und *Hmga2* (194, 277).

Beide sind an dem epithelialen-mesenchymalen Übergang in verschiedenen Zelltypen beteiligt und die hier nachgewiesene Expression in der regenerierenden Leber während der Initiationphase könnte ein Hinweis auf die EMT von Hepatozyten sein. Bisher gibt es nur wenige Daten bezüglich EMT in der Leber, jedoch geht man davon aus, dass Zellen während der Regeneration der Leber eine EMT und später dann wieder - nach Beendigung der Proliferations-/Migrationsphase - auch eine MET durchlaufen (194). Da beide Gene in ausdifferenzierten Hepatozyten nicht exprimiert werden, wäre es interessant zu prüfen, ob eine (transiente) Überexpression möglicherweise eine EMT bewirkt und folgend durch den veränderten Phänotyp die Zellen proliferieren, ohne maligne zu transformieren.

Ein weiterer Hinweis für die EMT ist die Reorganisation des Zytoskeletts. Eine Veränderung der Expressionsmuster von Zytoskelettgenen nach der Verletzung der Leber in den dargestellten Ergebnissen ist hier zu erkennen.

Des Weiteren zeigt sich eine Expression von *TenascinC* zwei Stunden nach der erhöhten Expression von *Twist1*. Eine Heraufregulierung von *TenascinC* wurde wiederholt im Zusammenhang mit chronischen fibrotischen Leberkrankheiten und der EMT (353, 354, 355) beschrieben. Aufgrund der schwachen Ausprägung der Expression des Zelladhäsionsmolekül sollte eine Expression in Hepatozyten kritisch betrachtet werden. Da eine Expression von *TenascinC* in 24 stündigen kultivierten murinen Hepatozyten nicht nachweisbar ist, besteht die Möglichkeit, dass die Expression nicht in den adulten Hepatozyten erfolgt. Recherchen zeigen verschiedene Studien, in denen eine Expression unter anderem in den Sternzellen der Leber nachgewiesen wurde (353, 355, 356). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass *TenascinC* in Hepatozyten exprimiert wird, die eine EMT durchlaufen haben.

Die veränderten Expressionsmuster dieser Gene unterstützen die Annahme, dass die EMT in der Regeneration der Leber eine Rolle spielt und ein Teil der Hepatozyten diesen Prozess durchlaufen. Über den Verlauf des Prozesses ist vieles bekannt, jedoch liegen bisher kaum Daten in Bezug auf Hepatozyten vor. Mögliche Auswirkungen des Prozesses auf die Morphologie, die Funktionalität und dem Genexpressionsprofil der Hepatozyten sind weitestgehend unklar.

Die hier vorgestellten ALDPCs könnten eventuell aus solch einen epithelialen mesenchymalen Übergang der Hepatozyten hervorgegangen ist. Während in frischen primären Hepatozyten keine Expression von *Twist* und *Hmga2* vorhanden ist, werden beide Gene in ALDPCs exprimiert.

Daneben ist eine leichte Expression von TenascinC in den ALDPC's zu beobachten, nicht jedoch in Hepatozyten. Weitere Untersuchungen und die Beobachtung der Entstehung der ALDPCs könnte möglicherweise neue Einblicke geben. Die Aufklärung des EMT in Hepatozyten bzw. weitere Untersuchungen der ALDPCs könnten interessant sein für die Kultivierung von Leberzellen. Eine Kultivierung von Leberzellen, die eine vergleichbare Funktionalität von primären frisch isolierten Hepatozyten aufweisen, könnte für pharmalogische Studien eine Verbesserung darstellen. Sollten die gewonnenen Daten auf humane Hepatozyten übertragbar sein und diese Zellen dann transplantierbar sein, könnten diese Zellen eine Alternative zu den begrenzt kultivierungsfähigen Hepatozyten darstellen. Diese Zellen könnten einen Einsatz in der Pharmazie finden aber auch in verschiedene klinischen Kontexten. Bei Regenerationsprozessen der Leber, in denen die Hepatozyten aufgrund der vorrangegangenen Schädigung nicht die verlorene Masse restaurieren können, könnten diese Zellen transplantiert werden. Des Weiteren könnten diese Zellen genetisch modifiziert werden und verschiedene Erkrankungen der Leber gemildert oder geheilt werden.

Der Sonic Hedgehog vermittelte Signalweg ist in der Entwicklung von Organen, der Rechts-links-Symmetrie und für die korrekte Bildung von Gliedmaßenanlagen verantwortlich. Daten über eine Funktion des Signalweges in der adulten Leber sind bisher gering, jedoch weisen einige Arbeiten auf eine Funktion des Signalweges in der regenerierenden Leber hin. Bei verschiedenen Leberkrankheiten zeigte sich eine Aktivierung des Signalweges, wobei der Signalweg dabei scheinbar eine EMT in epithelialen Zellen bewirkt (357, 358, 200). In der regenerierenden Leber zeigten Ochoa B. und Kollegen (359) dass durch die partielle Hepatektomie die Produktion der Liganden des Shh Signalweges aktiviert werden und darüber der Signalweg. Die in den Microarrays am Tag E 9.5 p.c. verstärkt exprimierten Genen *Zic1* und *Gli1* sind durch den Sonic Hedgehog Signalweg aktivierte Transkriptionsfaktoren (243, 360, 361). In der regenerierenden Leber zeigte sich eine schwache Expression dieser beiden im selben Zeitfenster, was die Hypothese verstärkt, dass der Sonic Hedgehog Signalweg eine Rolle in der regenerierenden Leber haben könnte.

Ein weiteres Puzzelstück ist der Transkriptionsfaktor *Foxd1*, der durch den Sonic Hedgehog Signalweg aktiviert wird (362). *Foxd1* und einige weitere Transkriptionsfaktoren (*Pitx2*, *Hoxd4*, *Hoxa1*, und *Sox11*) sind in der Entwicklung an der strukturellen Gestaltung des Embryos und der Organe beteiligt. Die strukturelle und funktionelle (Re-) Organisation der Leber nach der Verletzung spielt ebenso wie die Organisation der Leber während der Entwicklung eine Rolle, an die der Shh Weg beteiligt ist.

Über die vier Transkriptionsfaktoren ist in Bezug auf die Leber bisher nicht viel bekannt und lässt Raum zum Spekulieren. Auffällig ist das alle vier an der strukturellen Gestaltung von Organen beteiligt sind. Während *Foxd1* in der Ausbildung des radialen Nephronmusters der Niere (292) involviert ist, hat *Pitx2* Einfluss auf die Ausbildung der Links Rechts Asymetrie in der Maus (235, 237, 238). Von den Hox Genen, zu denen *Hoxd4* und *Hoxa1* gehören, ist beschrieben, daß diese an dem strukturellen Aufbau des Embryos beteiligt sind (363). *Sox11* ist ein Transkriptionsfaktor, der bisher meist in Zusammenhang mit Nerven und deren Entwicklung bzw. Regeneration beschrieben wurde (364), jedoch zeigten Sock und Kollegen (252) das eine veränderte Expression von *Sox11* zu Fehlbildungen von Organen in Embryos führen kann. *Sox11* könnte an der Gestaltung der Leber beteiligt sind, aber auch eine Funktion in der Ausbildung bzw. Regeneration des hepatischen Nervensystems haben. Daten deuten daraufhin das *Sox11* eine intrinsische Rolle bei Prozessen innehat, die einer erfolgreichen Regeneration nach einer peripheralen Nervenverletzung folgen (253).

Bei der Analyse von Gap43 deutet vieles daraufhin, dass dieses Gen in den Nervenzellen der Leber exprimiert wird. Zum einen ist die Expression nicht in primären kultivierten murinen Hepatozyten nachweisbar und zum anderen nach der partiellen Hepatektomie für ein Wachstumsprotein relativ schwach. Zum anderen gibt es bereits veröffentlichte Artikel bezüglich der Expression in Nerven und Leber. Nach einer Lebertransplantation in der Ratte konnte die Expression Gap43 in Bezug auf die hepatischen Reinnervierung nachgewiesen werden (365). Ebenfalls konnten Sun und Kollegen (366) eine verstärkte Expression von Gap43 nach partieller Hepatektomie zeigen. Eine sehr schwache Expression von Punc ist lediglich in den ersten 4 Stunden zu beobachten. Punc ist wie Gap43 ein Protein, das in Zusammenhang mit Nervenzellen beschrieben wird (340) und könnte demzufolge wie Gap43 in den Nervenzellen exprimiert.

Die hepatische Innervierung zwischen den verschiedenen Spezies variiert und es ist bisher nur wenig darüber bekannt. In adulten Ratten und Mäusen ist sie auf die Vaskularisierung im portalen Raum und dem angrenzenden Parenchym beschränkt, während in Primaten die Nerven in den Leberacinus bis in die Nähe der zentralen Vene eindringen (367).

Neben Prozessen wie dem EMT und des strukturellen Aufbaus der Leber ist die Regulierung elementarer Moleküle wie z.Bsp. der tRNA von Bedeutung für einen reibungslosen Ablauf der Proliferation und Regeneration. Gene (Gtf2h1 und Basonuclin1), die in diese Prozessen involviert sind, wurden ebenfalls am Tag E 9.5 p.c. identifiziert, und wiesen auch in der regenerierenden Leber eine regulierte Expression auf. Gt2fh1 ist an der Regulierung von kleineren RNA Molekülen beteiligt zu sein, während das Gen Basonuclin1 scheinbar vorrangig in der Regulierung der Transkription von rRNA involviert ist (215, 216, 265).

In Bezug auf die Proliferation von Zellen und den damit verbunden Zellzyklus wurde drei Gene identifiziert - CyclinD2, Ankyrin D1 und Necdin. Für CyclinD2 zeigt sich zwar in der Entwicklung der Leber in dem Microarrays eine verstärkte Expression, jedoch ist in der regenerierenden Leber keine eindeutige Regulierung der Expression im Vergleich zu CyclinD1, das Markerprotein für den Wiedereintritt der Hepatozyten in den Zellzyklus (Abs. 1.2.3.), zu erkennen.

Ein weiteres Gen ist Ankyrin D1, dem eine inhibierende Wirkung in Bezug auf den Eintritt in die S-Phase zugeschrieben wird. Da Ankyrin D1 nicht in Hepatozyten exprimiert wird und die Expression nach der partiellen Hepatektomie nur sehr schwach ist, liegt die Vermutung nahe, dass es in einen anderen Zelltyp exprimiert wird. Literaturrecherchen deuten auf eine Expression in Endothelzellen hin, die durch Interleukin 1 und TNF α herbeigeführt wird (RefSeq). Möglicherweise bewirkt Ankyrin D1 einen Stopp in der Progression des Zellzyklus in den Endothelzellen.

Necdin inhibiert das Wachstum von Zellen ebenfalls durch eine Blockierung des Eintritts in die S-Phase und verhindert parallel dazu die p53 bedingte Apoptose durch eine Reduzierung der p53 Transkription (326). Nach ca. vier Stunden treten die Hepatozyten während des Regenerationsprozesses in die G1-Phase ein und nach ca. 48 Stunden ist der erste Zellzyklus beendet (121). Zu beiden Zeitpunkten ist in den Expressionsprofil von Necdin ein Peak zu beobachten, was auf eine Funktion von Necdin im Zellzyklus der Hepatozyten hindeutet. Da Necdin auch in primären murinen Hepatozyten exprimiert wird, wirkt Necdin möglicherweise im hepatischen Kontext als ein Protein, welches die Aufrechterhaltung der G0-Phase in Hepatozyten unterstützt. Die Expression während der Regeneration scheint in den G1-Phasen zu erfolgen. Möglicherweise wird es als eine Art Kontrollprotein exprimiert, das benötigt wird, um die Zellen zunächst in dieser Phase zu halten, während die Bedingungen für die nächste Zellteilung geprüft werden. Weitere Untersuchungen von Necdin im hepatischen Kontext könnten vielleicht weitere Details über das Netzwerk, welches die Hepatozyten in der G0-Phase hält, liefern.

Neben den oben genannten Genen wurden auch zwei Gene (Igfbp5 und Midkine) identifiziert, die je ein sehr großes Wirkungsspektrum haben und in gewisser Weise multifunktionale Proteine sind.

Die Wirkungen von Igfbp5 sind sehr vielfältig und können intrazelluläre Abläufe positiv oder negativ beeinflussen (315, 372, 368, 319). Mit der Analyse der Expression von Igfbp5 nach der 2/3 Hepatektomie lässt sich nur wenig über eine Funktion aussagen. Bereits bekannt ist, dass C/ebp α an den Promoter von Igfbp5 bindet und die Expression beeinflusst (369). Die Herabregulierung von C/ebp α in den ersten Stunden der Regeneration erfolgt in etwa zeitgleich mit der von uns beobachteten Herunterregulierung von Igfbp5 (370). Die Wirkung von Igfbp5 auf die Migration von Zellen scheint eine der wichtigsten Funktionen zu (315, 319, 318). Im Igfbp5 Expressionsprofil nach der partiellen Hepatektomie ist innerhalb der ersten Stunden und erneut nach 48 Stunden ein erhöhter mRNA Gehalt zu beobachten. In den ersten Stunden der Regeneration kommt es zu einem Abbau der Matrix, um Wachstumsfaktoren freizusetzen und den Zellen Raum zur Proliferation zu geben. Die Expression von Igfbp5 in diesen Zeitraum könnte auf eine unterstützende Funktion beim Abbau der Matrix oder bei der Migration der Zellen hinweisen. Die erneute Expression nach 48 Stunden könnte ebenfalls damit in Zusammenhang stehen. Nach ca. 36 Stunden erfolgt die DNA-Synthese, gefolgt von der Mitose und Zytokinese. Nach diesem ersten Zellzyklus müssen die Zellen innerhalb der Leber organisiert werden, ein Prozess, an dem möglicherweise Igfbp5 beteiligt ist.

Midkine, ein antiapoptotisches Protein, wird erstmals zwei Stunden nach der 2/3 Hepatektomie verstärkt exprimiert. Nach einer Verletzung ist der Schutz der verbliebenen Zellen essentiell, um die metabolischen Aufgaben der Leber zu erfüllen und gleichzeitig das verlorene Gewebe zu kompensieren. Es könnte als unterstützender Faktor für das Überleben, Wachstum und Migration der in der Leber befindlichen Zelltypen dienen, wie es schon für eine Vielzahl von anderen Zellen beschrieben ist (371). Andere Studien zeigten, dass in *Midkine* $-/-$ Mäusen nach einer Verletzung eine verzögerte Regeneration in Folge einer verspäteten Expression von Hgf zu beobachten war (214). Zwischen 6 und 12 Stunden beginnt erneut eine Expression von Midkine, was mit Hgf zusammenhängen könnte, dessen höchstes Expressionsniveau in unseren Experimentschema nach 12 Stunden zu beobachten ist.

Die adulte Leber ist gekennzeichnet durch ihre vielfältigen metabolischen Aufgaben. In diesem Punkt gibt es einige Unterschiede zwischen der sich entwickelnden und regenerierenden Leber. Während die sich entwickelnde Leber der Ort der Hämatopoese ist und die metabolischen Funktionen der Leber noch nicht voll ausgeprägt sind, muss die regenerierende Leber die Aufgaben einer gesunden Leber übernehmen, umso unter anderem den Energiehaushalt des Organismus aufrechtzuerhalten.

In den Microarrays konnten zwei Gene (*Nr2f1* und *Mest*) am Tag E 9.5 p.c. identifiziert werden, die teilweise, wenn auch noch nicht ganz geklärt im Zusammenhang mit dem Metabolismus stehen.

Die Expression des Transkriptionsfaktor *Nr2f1* ist über den gesamten Zeitraum der regenerierenden Leber zu beobachten und es zeigt sich nur eine schwache Herabregulierung. Dieser Faktor reguliert die Genexpression verschiedener metabolischer Enzyme und interagiert mit *Hnf4* bei der Expression von Genen wie *Hnf1* oder *Pepck* (257, 258, 259, 260, 89).

Das zweite Gen, *Mest*, wird als ein Markerprotein für die Größe von Adipozyten beschrieben und kann die Expression adipöser Gene heraufregulieren (226). Die Abnahme des mRNA Gehaltes von *Mest* in den ersten Stunden und die spätere Zunahme könnten auf Aufgaben im

Metabolismus zurückzuführen sein. In wie weit dies in Zusammenhang mit der Leber und vor allem mit der Regeneration der Leber steht, lässt sich durch das Expressionsprofil nicht klären. Eventuell hat Mest Einfluss auf den Stoffwechsel der verbliebenen Hepatozyten, die nach der partiellen Hepatektomie den Metabolismus der gesunden Leber meistern müssen. Bisher sind keine Studien über Mest in Zusammenhang mit der Leber erfolgt. Weitergehende Untersuchungen könnten hier interessant sein, auch in Hinblick auf Studien der Fettleberentwicklung.

Die Expression von H1fx, Sh3bgr, Meox1 und Shox ist am Tag E 9.5 p.c. in der sich entwickelnden Leber zwar verstärkt, jedoch zeigt sich in der regenerierenden Leber nur eine sehr schwache Expression, möglicherweise, weil diese Gene in Zellen exprimiert werden, die prozentual nur sehr gering vorhanden sind. Über eine mögliche Funktion ist für diese Gene relativ wenig bekannt. Es bleibt daher viel Raum, um zu spekulieren. H1fx gehört zu der Histonefamilie 1 und hat vermutlich eine Funktion bei der Organisation der DNA. Mutationen oder der Verlust des Gens Shox scheint beim Menschen mit Minderwuchs assoziiert (373), was auf eine mögliche Rolle bei der Regulierung der Größe der Leber hindeuten könnte. Über Sh3bgr ist lediglich bekannt dass es über seine Sh3-Domäne mit anderen Proteinen vermutlich interagieren kann. Aber bisher sind noch keine weiteren Interaktionspartner bekannt.

Für einige Gene die am Tag E 9.5 p.c. in den Microarrays identifiziert wurden, zeigt sich keine Expression in der regenerierenden Leber. Dazu zählen das in metabolische Prozesse involvierte Protein Hsd11b2, die zwei Gene Crabpl und Crabpl, denen eine Funktion in retinolsäurevermittelten Transportprozessen zugeordnet wird (374, 375) und Emid2. Möglicherweise werden diese Gene in der fötalen Leber in Zellen exprimiert, die in der adulten bzw. regenerierenden Leber nicht vorhanden sind.

Die schwache Expression von einigen Genen deutet auf eine Expression in einen Zelltyp hin, der prozentual geringer vorliegt als der Hepatozyt. So könnte z. Bsp. die Expression von Ankyrin D1 in Endothelzellen zu erfolgen, die Expression von TenascinC dagegen eventuell in Sternzellen oder aber in Hepatozyten, die eine EMT durchlaufen. Da alle Gene aus einem entwicklungsbiologischen Kontext identifiziert wurden, könnte die Expression auch in den Vorläufer- und Ovalzellen der Leber erfolgen. Erste hier nicht dargestellte Experimente wurden durchgeführt. Es wurden Proben von Mäusen untersucht, in denen durch eine spezielle Nahrung die Proliferation der Ovalzellen hervorgerufen wird (376). Dort zeigte sich eine Expression der meisten Gene vom Tag E 9.5 p.c. (Daten nicht gezeigt). Weitere Analysen in diesem Kontext könnte Information über die Prozesse der Leberregeneration erbringen, die mit einer Inhibierung der adulten Hepatozyten und der Aktivierung von Vorläufer- und Ovalzellen einhergeht.

Nach der Expressionsanalyse der Gene des Tages E 9.5 p.c. in der regenerierenden Leber sind weiterführende Untersuchungen nötig, um Näheres über die Funktion/ Wirkung der Gene im hepatischen Kontext zu erfahren. Unter den 40 in den Microarrays am Tag E 9.5 p.c. identifizierten Gene sind viele, über die bisher im Allgemeinen nur sehr wenige Daten existieren und in Bezug auf die Leber kaum etwas bekannt ist. Für weitere Untersuchungen wurde deshalb zunächst ein einfaches, schnelles und kostengünstiges Zellkultursystem etabliert.

Da die Isolierung und Kultivierung der Hepatozyten zeit- und kostenintensiv und die Transduktion dieser Zellen deutlich schwieriger als bei Zelllinien ist, wurde für die Etablierung des Systems eine Alternative gesucht. Hierfür wurden die sog. ALDPCs gewählt, eine Population von bipotenten adulten murinen Leberzellen, die erstmals von Fougère-Deschatrette und Kollegen (349) beschrieben wurde. Diese Zellen haben einen bipotenten Phänotyp und können sich unter bestimmten Bedingungen in einen hepatozyten- oder cholangiozyten-ähnlichen Zelltyp

differenzieren. qPCR Analysen zeigen eine Expressionen von sowohl hepatischen als auch cholangiozytischen Markergenen (349).

Der bipotente undifferenzierte Phänotyp dieser Zellen könnte so als Modell zur Untersuchung der Signalkaskaden, die zur Differenzierung der Hepatoblasten in Hepatozyten bzw. Cholangiozyten führen, dienen. Weiterhin könnten diese Zellen nach deren Differenzierung als Untersuchungsobjekt für einen hepatozyten- bzw. cholangiozyten-ähnlichen Zelltyp genutzt werden.

Für die Etablierung des Systems wurde von vier Genen parallel Datensätze erstellt und geprüft, wie schnell und signifikant Veränderungen sichtbar werden. Zur Analyse wurden zwei Sets an Genen untersucht, die unterschiedlichste Prozessen abdecken, und dadurch eine Eingrenzung der möglichen Funktion/ Wirkung der zu testenden Gene in der Leber bzw. im hepatischen Kontext erlauben. Im ersten Set, dem ER – Set, wurden die Gene des Tages E 9.5 p.c. untersucht. Diese Gene stehen in einem embryonalen Kontext und, es ist bekannt, wie sich deren Expression in adulten murinen Hepatozyten gestalten. Das zweite Set, das HP – Set, setzt sich aus Genen zusammen, die größtenteils in Hepatozyten exprimiert werden bzw. in einem hepatischen Zusammenhang stehen. Die Auswahl erstreckt sich über Gene, die für die Differenzierung der Zellen nötig sind, bis hin zu Genen, die in ausgereiften Hepatozyten exprimiert werden. Mit Hilfe dieses Panels können Veränderungen in den Genexpressionsmustern von Zellen durch die Herauf- bzw. Herabregulierung von Genen schnell analysiert und gezielt weiter Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Auswahl der ersten untersuchten vier Gene erfolgte unter verschiedenen Gesichtspunkten - aufgrund der eigenen gewonnenen Daten und der in der Literatur bereits bekannten Daten.

Es erfolgte ein Vergleich von Genen, die weder in Hepatozyten noch in ALDPC exprimiert werden (*Pitx2*), nur in ALDPCs (*Midkine*) bzw. in beiden (*Cyclin d2*) exprimiert werden. Für *Pitx2*, welches weder in ALDPCs noch in Hepatozyten exprimiert wird, zeigte sich während der Regeneration der Leber 24 Stunden nach der Verletzung eine Expression; ein Zeitpunkt, zu dem sich die Hepatozyten in der G1-Phase befinden und sich auf die S-Phase vorbereiten. Während der Entwicklung des Embryos hat *Pitx2* vielfältige Aufgaben (4.1.3.2.1). Kurz zusammenfasst unterstützt es die Proliferation von Zellen und ist an der Ausbildung der Links-Rechts Asymmetrie im Embryo beteiligt (348). Obwohl es von *Pitx2* viele Isoformen gibt, wurden für erste Untersuchungen die beiden Isoformen a und b ausgewählt (350). Das Gen *Pitx2* besteht aus 6 Exons, wobei die Isoformen a aus den Exons 1,2,5 und 6 und die Isoform b aus den Exons 1,2,3,5 und 6 bestehen.

Midkine wird in ALDPCs aber nicht in für 24 Stunden kultivierten primären murinen Hepatozyten exprimiert. Jedoch ist eine Expression von *Midkine* zu beobachten wenn Hepatozyten länger in Kultur gehalten werden (Daten nicht gezeigt). In der regenerierenden Leber zeigt sich eine Expression während des gesamten Zeitraumes mit einer erhöhten Expression nach 2 und 24 Stunden. *Midkine* ist ein kleines Protein, welches im Organismus als Signalmolekül dient und vielfältige Signale übermittelt. Eine herausragende Funktion von *Midkine* ist die antiapoptotische Wirkung auf verschiedenste Zelltypen (4.1.3.3.2).

Als drittes Gen wurde *Cyclind2* ausgewählt, welches sowohl in ALDPCs als auch in Hepatozyten exprimiert wird. In der regenerierenden Leber zeigt sich über den gesamten Zeitraum eine Expression, ohne wesentliche Regulierung. In der Entwicklung der Leber zeigt sich deutlich, dass eine abnehmende Proliferation mit einer beginnenden Differenzierung einhergeht (218). Die

Überexpression von Cyclind2 sollte somit ein Genexpressionsprofil zeigen, was durch eine verstärkte Proliferation hervorgerufen wird.

Bei den Überexpressionsstudien der vier ausgewählten Gene zeigte sich zunächst, dass viele Gene, vor allem Gene des HP – Sets, sowohl in den Kontrollen als auch in den Proben nicht exprimiert werden bzw. die Überexpression keine deutliche Herauf-/ Herabregulierung der Expression der getesteten Gene bewirkt. Hierbei sind vorwiegend Gene des Metabolismus und der Sekretion betroffen, die sonst hauptsächlich in ausdifferenzierten, funktionell aktiven und in dem Gewebe eingebundenen Hepatozyten exprimiert werden. Des Weiteren zeigte sich bei den meisten untersuchten Transkriptionsfaktoren keine wesentliche Veränderung. Weitere Untersuchungen hinsichtlich dieser Gene von beiden Sets sind meines Erachtens bei der weiteren Analyse der ausgewählten überexprimierten Gene nicht nötig.

Die verstärkte Expression von Cyclind2 führt zu einer erhöhten Zellproliferation und wirkt einer Differenzierung entgegen. Eine verstärkte Proliferation spiegelt sich ebenfalls in einer Heraufregulierung von Foxm1b wieder (377), welche durch die Überexpression von Cyclind2 ebenfalls beobachtet wurde. Auch in Zellen, in den Pitx2b und Midkine überexprimiert wurden, ist eine erhöhte Expression von Cyclind2 und Foxm1b zu beobachten, was auf einen positiven Effekt auf die Proliferation hindeutet und im Einklang mit bereits veröffentlichten Studien steht (231, 232, 378, 379, 380).

Bei der Analyse der Cyclind2 und Midkine überexprimierenden Zellen zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen in den Genexpressionsprofilen. Bei einigen Genen ist eine leichte Herauf- bzw. Herabregulierung der Gene beider Sets zu beobachten, jedoch kaum eine Veränderung um mindestens das zweifache im Vergleich zu der Kontrolle. Wie vermutet hat weder die Überexpression von Cyclind2 noch die von Midkine Einfluss auf die Differenzierung der ALDPC in Richtung eines ausdifferenzierteren hepatischen Phänotyp. Weitere Untersuchung hinsichtlich der bekannten Funktionen von Cyclind2 (Zellzyklus) und Midkine (anti-apoptotisch Wirkung) wurden nicht weiter durchgeführt.

Bei der Überexpression von Pitx2 dagegen ist ein verändertes Expressionsprofil zu beobachten. Durch die Überexpression von Pitx2a bzw. b bewirkt eine Veränderung der Expression von Genen des Zytoskelett und der Zelladhäsion, was sich auch in der Morphologie widerspiegelt. Die Expression von Pitx2b bedingt eine erhöhte Expression von TroponinT2, Acta2, Claudin1, Occludin und TenascinC, wobei die erhöhte Expression von TenascinC bei Pitx2a stärker ausgeprägt ist. Die Expression von Krt8, Krt18, Krt19 und E-Cadherin blieb dagegen bei der Überexpression Pitx2b relativ stabil. Bei der Überexpression von Pitx2a war eine Herabregulierung dieser Gene zu beobachten.

Weitere Unterschiede zwischen den Isoformen zeichnen sich bei der Expression von Ankyrin d1, Mest und Midkine ab. Die drei Gene werden durch Pitx2a wesentlich stärker herabreguliert als durch Pitx2b. Im Gegensatz werden die zwei Transkriptionsfaktoren Foxd1 und Sox11 durch Pitx2b stärker heraufreguliert. Komplett gegensätzlich ist die Regulierung von Hoxa1, welches durch Pitx2a herab und durch Pitx2b heraufreguliert wird. Über die Funktion/ Wirkung der letztgenannten Gene ist nicht viel bekannt. Möglicherweise wird die Expression der Zytoskelett-, Zelladhäsion- und Membranproteine durch Foxd1 und Sox11 mit beeinflusst, da beide in der Organisation von Geweben eine Rolle spielen. Weitere Überexpressionsstudien mit Foxd1 und Sox11 könnten zeigen in wie weit diese Gene an der Expression von TroponinT2, Acta2, Claudin1 beteiligt sind.

Die Unterschiede in den Expressionsmuster lassen sich vermutlich durch die Isoformen erklären. Der Unterschied zwischen den beiden Isoform Pitx2a und b besteht in dem Exon 3. Deletionen des Exons 3 und/ oder die Überexpression von Pitx2c, welches aus den Exons 4-6 besteht, könnten weitere Information liefern.

Die durch Pitx2 hervorgerufene Expression der Zytoskelett-, Zelladhäsion- und Membranproteine könnte in Zusammenhang mit den Funktionen des Gens stehen. Pitx2 kontrolliert viele Aspekte der asymmetrischen Morphogenese im Embryo (348, 381, 382). Dadurch könnte man die Hypothese aufstellen, dass Pitx2 möglicherweise am Aufbau der apikalen-basalen Polarität bei parenchymalen Zellen beteiligt ist. Aufgrund ihrer Funktionalität haben Hepatozyten zwei verschiedene Seiten, eine basolaterale Seite, die dem Disse´- Raum zugewandt ist, und einer apikalen Seite, in der sich die Gallenkanälchen befinden. Claudin1 zum Beispiel ist ein Tight-junktion Protein, welches an der Ausbildung der Gallenkanälchen beteiligt ist (383). Die Heraufregulierung von Claudin1 könnte ein Hinweis für die Beteiligung von Pitx2 an der Ausbildung des epithelialen Phänotyps der Hepatozyten sein und weitere Studien dieser Thematik wären eventuell nützlich.

Die verstärkte Expression von Igfbp5 durch Pitx2 könnte ebenfalls um Zusammenhang mit der Organisation der apikalen basalen Polarität stehen. Igfbp5 interagiert mit verschiedenen extrazellulären Matrixproteine wie Vitronectin und Thrombospondin1 und nimmt darüber Einfluss auf die Migration von Zellen (315). Da Igfbp5 ebenfalls in kultivierten primären murinen Hepatozyten exprimiert wird, könnte ein Zusammenhang in Bezug auf die Ausbildung des epithelialen Zelltyps zu bestehen. Weiterführende Experimente könnten zu neuen Erkenntnissen in Bezug auf die Ausbildung des apikalen basalen Phänotyps von Hepatozyten bringen. Die Herabregulierung von Igfbp5 in primären murinen Hepatozyten und die Heraufregulierung von Twist1 oder Hmga2 könnte hier neue Einblicke in die Regulierung dieser Prozesse geben.

Über eine Regulierung des Zytoskelett durch Pitx2 ist bisher kaum etwas bekannt und Literaturrecherchen liefern nur wenige Hinweise. Sowohl in der Entwicklung als auch in der Regeneration der Leber ist eine verstärkte Expression von Pitx2 zu einem bestimmten, jedoch relativ frühen Zeitpunkt in Bezug auf den gesamten Prozess zu beobachten. Dies lässt sich möglicherweise durch eine Verzögerung bei der Wirkung von Pitx2 erklären. Die morphologische Veränderung, bedingt durch die Überexpression von Pitx2 waren erst nach ca.5-7 Tagen in der Zellkultur erkennbar. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob diese durch Pitx2 hervorgerufene Expression auch in Zellen mit nicht hepatischem Hintergrund in der selben Weise erfolgen.

Pitx2 ist ein Transkriptionsfaktor, der über den den Wnt/ wingless Signalweg reguliert wird, und beeinflusst darüber die Proliferation von Zellen. Die Aktivierung des Wnt Signalweges führt zu einer Veränderung der Funktion von Pitx2, von einem repressiven zu einem aktivierenden Transkriptionsfaktor durch den Austausch von transkriptionellen Ko-Repressoren wie der Histon deacetylase 1 (HDAC1) mit Ko-Aktivatoren. Mit Hilfe dieser Ko-Aktivatoren reguliert Pitx2 folgend die Transkription von Genen des Zellzyklus. (231). Ein weiteres Zielgen von Pitx2 ist der Transkriptionsfaktor Lef1, der ebenfalls über den Wnt Signalweg durch β -Catenin reguliert. Die Pitx2 Isoformen a und c regulieren die Aktivierung des *Lef-1* promoter und damit die endogene Expression von Lef1, was durch β -Catenin verstärkt werden kann. Weiter Daten zeigen, dass β -Catenin mit der Pitx2 homeodomäne und Lef-1 mit dem C-Terminus von Pitx2 interagiert. Beide interagieren gleichzeitig und unabhängig mit Pitx2 und regulieren darüber die Aktivität des Transkriptionsfaktors (384).

Claudin1, ebenfalls ein durch β -Catenin und damit über den Wnt/ wiggless Signalweg reguliertes Gen, besitzt in der 5'flankierende Region zwei Tcf4/Lef1 Bindungselemente, die möglicherweise für die Aktivierung der Transkription von Claudin1 wichtig sind (385). Die durch Pitx2 heraufregulierte Expression von Claudin1 in den ALDPC ist möglicherweise auf die Aktivierung von Lef1 durch Pitx2 zurückzuführen. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, in wie weit die Aktivierung des Wnt Signalweges bei der Differenzierung von hepatischen Vorläuferzellen wichtig ist. Eine Aktivierung von Lef1 und Pitx2 durch die Zugabe von Wnt Proteinen in das Kulturmedium könnte möglicherweise zu einer hepatischen Differenzierung bzw. der Ausbildung eines epithelialen Phänotyps der ALDPC dienen. Des Weiteren könnte die Zugabe von Wnt Proteinen in das Kulturmedium zu frisch isolierten primären Hepatozyten der Herabregulierung der hepatischen Gene entgegen wirken. Einige Studien zeigen, dass bei der Regulierung der Expression einiger hepatischer Gene eine positive oder auch negative Interaktion von Lef und Hnf4 α vorhanden ist (386)

VI. LITERATUR

1. Klinke, R., Pape, H-C., Silbernagl S.: Physiologie (ISBN 3-13-796005-3) Georg Thieme Verlag Stuttgart 2005 5. Aufl.
2. Löffler, Petrides und Heinrich Biochemie und Pathobiochemie (ISBN 978-3-540-32680-9)
3. Silbernagl S. und Despopoulos, A.: Taschenatlas der Physiologie (ISBN 3-13-567707-1) 2007 Georg Thieme Verlag Stuttgart 7.Aufl.
4. Marzioni, M.; Glaser, S. S.; Francis, H.; Phinizy, J. L.; LeSage, G. & Alpini, G. (2002), ‚Functional heterogeneity of cholangiocytes.‘, *Semin Liver Dis* **22**(3), 227--240.
5. Kolios, G.; Valatas, V. & Kouroumalis, E. (2006), ‚Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease.‘, *World J Gastroenterol* **12**(46), 7413--7420.
6. Geerts, A. (2001), ‚History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells.‘, *Semin Liver Dis* **21**(3), 311--335.
7. Geerts, A. (2004), ‚On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuroectodermal?‘, *J Hepatol* **40**(2), 331--334.
8. Carpino, G.; Franchitto, A.; Morini, S.; Corradini, S. G.; Merli, M. & Gaudio, E. (2004), ‚Activated hepatic stellate cells in liver cirrhosis. A morphologic and morphometrical study.‘, *Ital J Anat Embryol* **109**(4), 225--238.
9. Moreira, R. K. (2007), ‚Hepatic stellate cells and liver fibrosis.‘, *Arch Pathol Lab Med* **131**(11), 1728--1734.
10. Kaneda, K. & Wake, K. (1983), ‚Distribution and morphological characteristics of the pit cells in the liver of the rat.‘, *Cell Tissue Res* **233**(3), 485--505.
11. Fausto, N. & Campbell, J. S. (2003), ‚The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation.‘, *Mech Dev* **120**(1), 117--130.
12. LeDouarin N. M.; (1975) An experimental analysis of liver development. *Med Biol* **53**,427--455.
13. Dzierzak, E. & Speck, N. A. (2008), ‚Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells.‘, *Nat Immunol* **9**(2), 129--136.
14. Medlock, E. S. & Haar, J. L. (1983), ‚The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis.‘, *Anat Rec* **207**(1), 31--41.
15. Shiojiri, N. (1984), ‚The origin of intrahepatic bile duct cells in the mouse.‘, *J Embryol Exp Morphol* **79**, 25--39.

16. Shiojiri, N.; Inujima, S.; Ishikawa, K.; Terada, K. & Mori, M. (2001), 'Cell lineage analysis during liver development using the spf(ash)-heterozygous mouse.', *Lab Invest* **81**(1), 17--25.
17. Vassy, J.; Kraemer, M.; Chalumeau, M. T. & Foucrier, J. (1988), 'Development of the fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes.', *Cell Differ* **24**(1), 9--24.
18. Luzzatto, A. C. (1981), 'Hepatocyte differentiation during early fetal development in the rat.', *Cell Tissue Res* **215**(1), 133--142.
19. Feracci, H.; Connolly, T. P.; Margolis, R. N. & Hubbard, A. L. (1987), 'The establishment of hepatocyte cell surface polarity during fetal liver development.', *Dev Biol* **123**(1), 73--84.
20. WOOD, R. L. (1965), 'AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY OF DEVELOPING BILE CANALICULI IN THE RAT.', *Anat Rec* **151**, 507--529.
21. Wolf-Peeters, C. D.; Vos, R. D.; Desmet, V.; Bianchi, L. & Rohr, H. P. (1974), 'Electron microscopy and morphometry of canalicular differentiation in fetal and neonatal rat liver.', *Exp Mol Pathol* **21**(3), 339--350.
22. Godin, I.; Garcia-Porrero, J. A.; Dieterlen-Lièvre, F. & Cumano, A. (1999), 'Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites.', *J Exp Med* **190**(1), 43--52.
23. Sasaki, K. & Matsumura, G. (1988), 'Spleen lymphocytes and haemopoiesis in the mouse embryo.', *J Anat* **160**, 27--37.
24. Sasaki, K. & Matsumura, G. (1988), 'A semithin light microscopic study of peritoneal cells of the mouse embryo.', *Arch Histol Cytol* **51**(3), 277--283.
25. Ogawa, M.; Nishikawa, S.; Ikuta, K.; Yamamura, F.; Naito, M.; Takahashi, K. & Nishikawa, S. (1988), 'B cell ontogeny in murine embryo studied by a culture system with the monolayer of a stromal cell clone, ST2: B cell progenitor develops first in the embryonal body rather than in the yolk sac.', *EMBO J* **7**(5), 1337--1343.
26. Matsumoto, K.; Yoshitomi, H.; Rossant, J. & Zaret, K. S. (2001), 'Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function.', *Science* **294**(5542), 559--563.
27. Jung, J.; Zheng, M.; Goldfarb, M. & Zaret, K. S. (1999), 'Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors.', *Science* **284**(5422), 1998--2003.
28. Blouin, A.; Bolender, R. P. & Weibel, E. R. (1977), 'Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study.', *J Cell Biol* **72**(2), 441--455.
29. Kmiec, Z. (2001), 'Cooperation of liver cells in health and disease.', *Adv Anat Embryol Cell Biol* **161**, III--XIII, 1-151.
30. Serls, A. E.; Doherty, S.; Parvatiyar, P.; Wells, J. M. & Deutsch, G. H. (2005), 'Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung.', *Development* **132**(1), 35--47.

31. Sekhon, S. S.; Tan, X.; Micsenyi, A.; Bowen, W. C. & Monga, S. P. S. (2004), 'Fibroblast growth factor enriches the embryonic liver cultures for hepatic progenitors.', *Am J Pathol* **164**(6), 2229--2240.
32. Miller, D. L.; Ortega, S.; Bashayan, O.; Basch, R. & Basilico, C. (2000), 'Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice.', *Mol Cell Biol* **20**(6), 2260--2268.
33. Rossi, J. M.; Dunn, N. R.; Hogan, B. L. & Zaret, K. S. (2001), 'Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm.', *Genes Dev* **15**(15), 1998--2009.
34. Somi, S.; Buffing, A. A. M.; Moorman, A. F. M. & Hoff, M. J. B. V. D. (2004), 'Dynamic patterns of expression of BMP isoforms 2, 4, 5, 6, and 7 during chicken heart development.', *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **279**(1), 636--651.
35. Zhao, R. & Duncan, S. A. (2005), 'Embryonic development of the liver.', *Hepatology* **41**(5), 956--967.
36. Coultas, L.; Chawengsaksophak, K. & Rossant, J. (2005), 'Endothelial cells and VEGF in vascular development.', *Nature* **438**(7070), 937--945.
37. Cascio, S. & Zaret, K. S. (1991), 'Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation.', *Development* **113**(1), 217--225.
38. Bossard, P. & Zaret, K. S. (1998), 'GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation.', *Development* **125**(24), 4909--4917.
39. Chaya, D.; Hayamizu, T.; Bustin, M. & Zaret, K. S. (2001), 'Transcription factor FoxA (HNF3) on a nucleosome at an enhancer complex in liver chromatin.', *J Biol Chem* **276**(48), 44385--44389.
40. Cirillo, L. A.; McPherson, C. E.; Bossard, P.; Stevens, K.; Cherian, S.; Shim, E. Y.; Clark, K. L.; Burley, S. K. & Zaret, K. S. (1998), 'Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome.', *EMBO J* **17**(1), 244--254.
41. Cirillo, L. A.; Lin, F. R.; Cuesta, I.; Friedman, D.; Jarnik, M. & Zaret, K. S. (2002), 'Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4.', *Mol Cell* **9**(2), 279--289.
42. Liu, J. K.; DiPersio, C. M. & Zaret, K. S. (1991), 'Extracellular signals that regulate liver transcription factors during hepatic differentiation in vitro.', *Mol Cell Biol* **11**(2), 773--784.
43. Jackson, D. A.; Rowader, K. E.; Stevens, K.; Jiang, C.; Milos, P. & Zaret, K. S. (1993), 'Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition.', *Mol Cell Biol* **13**(4), 2401--2410.

44. Denson, L. A.; McClure, M. H.; Bogue, C. W.; Karpen, S. J. & Jacobs, H. C. (2000), 'HNF3beta and GATA-4 transactivate the liver-enriched homeobox gene, Hex.', *Gene* **246**(1-2), 311--320.
45. Lai, E.; Prezioso, V. R.; Smith, E.; Litvin, O.; Costa, R. H. & Darnell, J. E. (1990), 'HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally.', *Genes Dev* **4**(8), 1427--1436.
46. Lai, E.; Prezioso, V. R.; Tao, W. F.; Chen, W. S. & Darnell, J. E. (1991), 'Hepatocyte nuclear factor 3 alpha belongs to a gene family in mammals that is homologous to the Drosophila homeotic gene fork head.', *Genes Dev* **5**(3), 416--427.
47. Kaestner, K. H.; Katz, J.; Liu, Y.; Drucker, D. J. & Schütz, G. (1999), 'Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo.', *Genes Dev* **13**(4), 495--504.
48. Zaret, K. (1998), 'Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control.', *Curr Opin Genet Dev* **8**(5), 526--531.
49. Zhao, R.; Watt, A. J.; Li, J.; Luebke-Wheeler, J.; Morrissey, E. E. & Duncan, S. A. (2005), 'GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation.', *Mol Cell Biol* **25**(7), 2622--2631.
50. Fukuda-Taira, S. (1981), 'Hepatic induction in the avian embryo: specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm.', *J Embryol Exp Morphol* **63**, 111--125.
51. Houssaint, E. (1980), 'Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation.', *Cell Differ* **9**(5), 269--279.
52. Zhang, W.; Yatskievych, T. A.; Baker, R. K. & Antin, P. B. (2004), 'Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling.', *Dev Biol* **268**(2), 312--326.
53. Zhang, W.; Yatskievych, T. A.; Cao, X. & Antin, P. B. (2002), 'Regulation of Hex gene expression by a Smads-dependent signaling pathway.', *J Biol Chem* **277**(47), 45435--45441.
54. Keng, V. W.; Yagi, H.; Ikawa, M.; Nagano, T.; Myint, Z.; Yamada, K.; Tanaka, T.; Sato, A.; Muramatsu, I.; Okabe, M.; Sato, M. & Noguchi, T. (2000), 'Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage.', *Biochem Biophys Res Commun* **276**(3), 1155--1161.
55. Hunter, M. P.; Wilson, C. M.; Jiang, X.; Cong, R.; Vasavada, H.; Kaestner, K. H. & Bogue, C. W. (2007), 'The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis.', *Dev Biol* **308**(2), 355--367.
56. Sosa-Pineda, B.; Wigle, J. T. & Oliver, G. (2000), 'Hepatocyte migration during liver development requires Prox1.', *Nat Genet* **25**(3), 254--255.

-
57. Papoutsis, M.; Dudas, J.; Becker, J.; Tripodi, M.; Opitz, L.; Ramadori, G. & Wilting, J. (2007), 'Gene regulation by homeobox transcription factor Prox1 in murine hepatoblasts.', *Cell Tissue Res* **330**(2), 209--220.
58. Schwartz, M. A. (2001), 'Integrin signaling revisited.', *Trends Cell Biol* **11**(12), 466--470.
59. Song, K.-H.; Li, T. & Chiang, J. Y. L. (2006), 'A Prospero-related homeodomain protein is a novel co-regulator of hepatocyte nuclear factor 4alpha that regulates the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene.', *J Biol Chem* **281**(15), 10081--10088.
60. Bladt, F.; Riethmacher, D.; Isenmann, S.; Aguzzi, A. & Birchmeier, C. (1995), 'Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud.', *Nature* **376**(6543), 768--771.
61. Schmidt, C.; Bladt, F.; Goedecke, S.; Brinkmann, V.; Zschiesche, W.; Sharpe, M.; Gherardi, E. & Birchmeier, C. (1995), 'Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development.', *Nature* **373**(6516), 699--702.
62. Sonnenberg, E.; Meyer, D.; Weidner, K. M. & Birchmeier, C. (1993), 'Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development.', *J Cell Biol* **123**(1), 223--235.
63. Sonnenberg, E.; Weidner, K. M. & Birchmeier, C. (1993), 'Expression of the met-receptor and its ligand, HGF-SF during mouse embryogenesis.', *EXS* **65**, 381--394.
64. Field, H. A.; Ober, E. A.; Roeser, T. & Stainier, D. Y. R. (2003), 'Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis.', *Dev Biol* **253**(2), 279--290.
65. Zaret, K. S. (2002), 'Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis.', *Nat Rev Genet* **3**(7), 499--512.
66. Massagué, J. & Chen, Y. G. (2000), 'Controlling TGF-beta signaling.', *Genes Dev* **14**(6), 627--644.
67. Weinstein, M.; Monga, S. P.; Liu, Y.; Brodie, S. G.; Tang, Y.; Li, C.; Mishra, L. & Deng, C. X. (2001), 'Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development.', *Mol Cell Biol* **21**(15), 5122--5131.
68. Fässler, R. & Meyer, M. (1995), 'Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice.', *Genes Dev* **9**(15), 1896--1908.
69. Costa, R. H.; Kalinichenko, V. V.; Holterman, A.-X. L. & Wang, X. (2003), 'Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration.', *Hepatology* **38**(6), 1331--1347.
70. Duncan, S. A. (2003), 'Mechanisms controlling early development of the liver.', *Mech Dev* **120**(1), 19--33.

71. Duncan, S. A. (2000), 'Transcriptional regulation of liver development.', *Dev Dyn* **219**(2), 131--142.
72. Lemaigre, F. P. (2003), 'Development of the biliary tract.', *Mech Dev* **120**(1), 81--87.
73. Landry, C.; Clotman, F.; Hioki, T.; Oda, H.; Picard, J. J.; Lemaigre, F. P. & Rousseau, G. G. (1997), 'HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo and participates to the cross-regulatory network of liver-enriched transcription factors.', *Dev Biol* **192**(2), 247--257.
74. Rausa, F.; Samadani, U.; Ye, H.; Lim, L.; Fletcher, C. F.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G. & Costa, R. H. (1997), 'The cut-homeodomain transcriptional activator HNF-6 is coexpressed with its target gene HNF-3 beta in the developing murine liver and pancreas.', *Dev Biol* **192**(2), 228--246.
75. Clotman, F.; Lannoy, V. J.; Reber, M.; Cereghini, S.; Cassiman, D.; Jacquemin, P.; Roskams, T.; Rousseau, G. G. & Lemaigre, F. P. (2002), 'The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract.', *Development* **129**(8), 1819--1828.
76. Coffinier, C.; Gresh, L.; Fiette, L.; Tronche, F.; Schütz, G.; Babinet, C.; Pontoglio, M.; Yaniv, M. & Barra, J. (2002), 'Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta.', *Development* **129**(8), 1829--1838.
77. Shiojiri, N.; Lemire, J. M. & Fausto, N. (1991), 'Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development.', *Cancer Res* **51**(10), 2611--2620.
78. Moorman, A. F.; Boer, P. A. D.; Evans, D.; Charles, R. & Lamers, W. H. (1990), 'Expression patterns of mRNAs for alpha-fetoprotein and albumin in the developing rat: the ontogenesis of hepatocyte heterogeneity.', *Histochem J* **22**(12), 653--660.
79. Haber, B. A.; Chin, S.; Chuang, E.; Buikhuisen, W.; Naji, A. & Taub, R. (1995), 'High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes.', *J Clin Invest* **95**(2), 832--841.
80. Nagao, M.; Nakamura, T. & Ichihara, A. (1986), 'Developmental control of gene expression of tryptophan 2,3-dioxygenase in neonatal rat liver.', *Biochim Biophys Acta* **867**(4), 179--186.
81. Noda, C.; Fukushima, C.; Fujiwara, T.; Matsuda, K.; Kobune, Y. & Ichihara, A. (1994), 'Developmental regulation of rat serine dehydratase gene expression: evidence for the presence of a repressor in fetal hepatocytes.', *Biochim Biophys Acta* **1217**(2), 163--173.
82. Noda, C.; Ohguri, M. & Ichihara, A. (1990), 'Developmental and growth-related regulation of expression of serine dehydratase mRNA in rat liver.', *Biochem Biophys Res Commun* **168**(1), 335--342.
83. Watt, A. J.; Garrison, W. D. & Duncan, S. A. (2003), 'HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function.', *Hepatology* **37**(6), 1249--1253.

84. Hayhurst, G. P.; Lee, Y. H.; Lambert, G.; Ward, J. M. & Gonzalez, F. J. (2001), 'Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis.', *Mol Cell Biol* **21**(4), 1393--1403.
85. Li, J.; Ning, G. & Duncan, S. A. (2000), 'Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha.', *Genes Dev* **14**(4), 464--474.
86. Battle, M. A.; Konopka, G.; Parviz, F.; Gaggli, A. L.; Yang, C.; Sladek, F. M. & Duncan, S. A. (2006), 'Hepatocyte nuclear factor 4alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22), 8419--8424.
87. Parviz, F.; Matullo, C.; Garrison, W. D.; Savatski, L.; Adamson, J. W.; Ning, G.; Kaestner, K. H.; Rossi, J. M.; Zaret, K. S. & Duncan, S. A. (2003), 'Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis.', *Nat Genet* **34**(3), 292--296.
88. Hwang-Verslues, W. W. & Sladek, F. M. (2008), 'Nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1 competes with oncoprotein c-Myc for control of the p21/WAF1 promoter.', *Mol Endocrinol* **22**(1), 78--90.
89. Hall, R. K.; Sladek, F. M. & Granner, D. K. (1995), 'The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(2), 412--416.
90. Boustead, J. N.; Stadelmaier, B. T.; Eeds, A. M.; Wiebe, P. O.; Svitek, C. A.; Oeser, J. K. & O'Brien, R. M. (2003), 'Hepatocyte nuclear factor-4 alpha mediates the stimulatory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha (PGC-1 alpha) on glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription in H4IIE cells.', *Biochem J* **369**(Pt 1), 17--22.
91. Beaudry, J.-B.; Pierreux, C. E.; Hayhurst, G. P.; Plumb-Rudewiez, N.; Weiss, M. C.; Rousseau, G. G. & Lemaigre, F. P. (2006), 'Threshold levels of hepatocyte nuclear factor 6 (HNF-6) acting in synergy with HNF-4 and PGC-1alpha are required for time-specific gene expression during liver development.', *Mol Cell Biol* **26**(16), 6037--6046.
92. Duncan, S. A.; Nagy, A; Chan W. (1997), 'Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4^{-/-} embryos.', *Development* **124**, 279--287
93. Lannoy, V. J.; Decaux, J. F.; Pierreux, C. E.; Lemaigre, F. P. & Rousseau, G. G. (2002), 'Liver glucokinase gene expression is controlled by the oncut transcription factor hepatocyte nuclear factor-6.', *Diabetologia* **45**(8), 1136--1141.
94. Chen, W. S.; Manova, K.; Weinstein, D. C.; Duncan, S. A.; Plump, A. S.; Prezioso, V. R.; Bachvarova, R. F. & Darnell, J. E. (1994), 'Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos.', *Genes Dev* **8**(20), 2466--2477.

95. Taraviras, S.; Monaghan, A. P.; Schütz, G. & Kelsey, G. (1994), 'Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis.', *Mech Dev* **48**(2), 67--79.
96. Duncan, S. A.; Manova, K.; Chen, W. S.; Hoodless, P.; Weinstein, D. C.; Bachvarova, R. F. & Darnell, J. E. (1994), 'Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16), 7598--7602.
97. Nagaki, M. & Moriwaki, H. (2008), 'Transcription factor HNF and hepatocyte differentiation.', *Hepatol Res* **38**(10), 961--969.
98. Kamiya, A.; Kinoshita, T. & Miyajima, A. (2001), 'Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways.', *FEBS Lett* **492**(1-2), 90--94.
99. Kinoshita, T. & Miyajima, A. (2002), 'Cytokine regulation of liver development.', *Biochim Biophys Acta* **1592**(3), 303--312.
100. Ito, Y.; Matsui, T.; Kamiya, A.; Kinoshita, T. & Miyajima, A. (2000), 'Retroviral gene transfer of signaling molecules into murine fetal hepatocytes defines distinct roles for the STAT3 and ras pathways during hepatic development.', *Hepatology* **32**(6), 1370--1376.
101. Kamiya, A.; Kinoshita, T.; Ito, Y.; Matsui, T.; Morikawa, Y.; Senba, E.; Nakashima, K.; Taga, T.; Yoshida, K.; Kishimoto, T. & Miyajima, A. (1999), 'Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer.', *EMBO J* **18**(8), 2127--2136.
102. Kinoshita, T.; Sekiguchi, T.; Xu, M. J.; Ito, Y.; Kamiya, A.; Tsuji, K.; Nakahata, T. & Miyajima, A. (1999), 'Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13), 7265--7270.
103. Shiojiri, N. & Sugiyama, Y. (2004), 'Immunolocalization of extracellular matrix components and integrins during mouse liver development.', *Hepatology* **40**(2), 346--355.
104. Michalopoulos, G. K.; Bowen, W. C.; Mulè, K. & Stolz, D. B. (2001), 'Histological organization in hepatocyte organoid cultures.', *Am J Pathol* **159**(5), 1877--1887.
105. Sánchez, A.; Alvarez, A. M.; Pagan, R.; Roncero, C.; Vilaró, S.; Benito, M. & Fabregat, I. (2000), 'Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture.', *J Hepatol* **32**(2), 242--250.
106. Ben-Ze'ev, A.; Robinson, G. S.; Bucher, N. L. & Farmer, S. R. (1988), 'Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(7), 2161--2165.
107. Caron, J. M. (1990), 'Induction of albumin gene transcription in hepatocytes by extracellular matrix proteins.', *Mol Cell Biol* **10**(3), 1239--1243.

108. Kim, T. H.; Bowen, W. C.; Stolz, D. B.; Runge, D.; Mars, W. M. & Michalopoulos, G. K. (1998), 'Differential expression and distribution of focal adhesion and cell adhesion molecules in rat hepatocyte differentiation.', *Exp Cell Res* **244**(1), 93--104.
109. Higashiyama, H.; Yamaguchi, T.; Mori, K.; Nakano, Y.; Yokoyama, T.; Takeuchi, T.; Yamamoto, N.; Yamaoka, Y.; Tanaka, K. & Kumada, K. (1993), 'Graft size assessment by preoperative computed tomography in living related partial liver transplantation.', *Br J Surg* **80**(4), 489--492.
110. LaBrecque, D. (1994), 'Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle.', *Am J Gastroenterol* **89**(8 Suppl), S86--S96.
111. Higgins GM, Anderson RM. (1931) Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol*, **12**:186-202
112. SIMPSON, G. E. & FINCKH, E. S. (1963), 'THE PATTERN OF REGENERATION OF RAT LIVER AFTER REPEATED PARTIAL HEPATECTOMIES.', *J Pathol Bacteriol* **86**, 361--370
113. Martins, P. N. A.; Theruvath, T. P. & Neuhaus, P. (2008), 'Rodent models of partial hepatectomies.', *Liver Int* **28**(1), 3--11
114. Farber, J. L. & Gerson, R. J. (1984), 'Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals.', *Pharmacol Rev* **36**(2 Suppl), 71S--75S.
115. Brues, A. M. & Marble, B. B. (1937), 'AN ANALYSIS OF MITOSIS IN LIVER RESTORATION.', *J Exp Med* **65**(1), 15--27.
116. Michalopoulos, G. K. & DeFrances, M. C. (1997), 'Liver regeneration.', *Science* **276**(5309), 60--66.
117. Fausto, N.; Brandt, J. T. & Kesner, L. (1975), 'Possible interactions between the urea cycle and synthesis of pyrimidines and polyamines in regenerating liver.', *Cancer Res* **35**(2), 397--404.
118. WEINBREN, K. (1955), 'The portal blood supply and regeneration of the rat liver.', *Br J Exp Pathol* **36**(6), 583--591.
119. WEINBREN, K. (1959), 'Regeneration of the liver.', *Gastroenterology* **37**, 657--678.
120. Lee, S.; Broelsch, C. E.; Flamant, Y. M.; Chandler, J. G.; Charters, A. C. & Orloff, M. J. (1975), 'Liver regeneration after portacaval transportation in rats.', *Surgery* **77**(1), 144--149.
121. Mangnall, D.; Bird, N. C. & Majeed, A. W. (2003), 'The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy.', *Liver Int* **23**(2), 124--138.
122. Cornell, R. P. (1985), 'Endogenous gut-derived bacterial endotoxin tonically primes pancreatic secretion of insulin in normal rats.', *Diabetes* **34**(12), 1253--1259.

123. Cornell, R. P.; Liljequist, B. L. & Bartizal, K. F. (1990), 'Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice.', *Hepatology* **11**(6), 916--922.
124. Campbell, J. S.; Riehle, K. J.; Brooling, J. T.; Bauer, R. L.; Mitchell, C. & Fausto, N. (2006), 'Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4.', *J Immunol* **176**(4), 2522--2528.
125. Seki, E.; Tsutsui, H.; Jimuro, Y.; Naka, T.; Son, G.; Akira, S.; Kishimoto, T.; Nakanishi, K. & Fujimoto, J. (2005), 'Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration.', *Hepatology* **41**(3), 443--450.
126. Iwai, M.; Cui, T. X.; Kitamura, H.; Saito, M. & Shimazu, T. (2001), 'Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy.', *Cytokine* **13**(1), 60--64.
127. Fausto, N. (2000), 'Liver regeneration.', *J Hepatol* **32**(1 Suppl), 19--31.
128. Levy, D. E. & Lee, C. (2002), 'What does Stat3 do?', *J Clin Invest* **109**(9), 1143--1148.
129. Heinrich, P. C.; Behrmann, I.; Haan, S.; Hermanns, H. M.; Müller-Newen, G. & Schaper, F. (2003), 'Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.', *Biochem J* **374**(Pt 1), 1--20
130. Leclercq, I. A.; Field, J. & Farrell, G. C. (2003), 'Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury.', *Gastroenterology* **124**(5), 1451--1464.
131. Haber, B. A.; Mohn, K. L.; Diamond, R. H. & Taub, R. (1993), 'Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration.', *J Clin Invest* **91**(4), 1319--1326.
132. Su, A. I.; Guidotti, L. G.; Pezacki, J. P.; Chisari, F. V. & Schultz, P. G. (2002), 'Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17), 11181--11186.
133. Diehl, A. M. & Rai, R. (1996), 'Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines.', *J Gastroenterol Hepatol* **11**(5), 466--470.
134. Cressman, D. E.; Diamond, R. H. & Taub, R. (1995), 'Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration.', *Hepatology* **21**(5), 1443--1449.
135. FitzGerald, M. J.; Webber, E. M.; Donovan, J. R. & Fausto, N. (1995), 'Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration.', *Cell Growth Differ* **6**(4), 417--427.
136. Yamada, Y.; Kirillova, I.; Peschon, J. J. & Fausto, N. (1997), 'Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4), 1441--1446.

137. Hayashi, H.; Nagaki, M.; Imose, M.; Osawa, Y.; Kimura, K.; Takai, S.; Imao, M.; Naiki, T.; Kato, T. & Moriwaki, H. (2005), 'Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice.', *Liver Int* **25**(1), 162--170.
138. Fujita, J.; Marino, M. W.; Wada, H.; Jungbluth, A. A.; Mackrell, P. J.; Rivadeneira, D. E.; Stapleton, P. P. & Daly, J. M. (2001), 'Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice.', *Surgery* **129**(1), 48--54.
139. Knight, B. & Yeoh, G. C. (2005), 'TNF/LTalpha double knockout mice display abnormal inflammatory and regenerative responses to acute and chronic liver injury.', *Cell Tissue Res* **319**(1), 61--70.
140. Cressman, D. E.; Greenbaum, L. E.; DeAngelis, R. A.; Ciliberto, G.; Furth, E. E.; Poli, V. & Taub, R. (1996), 'Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice.', *Science* **274**(5291), 1379--1383.
141. Taub, R. (2003), 'Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway.', *J Clin Invest* **112**(7), 978--980.
142. Li, W.; Liang, X.; Kellendonk, C.; Poli, V. & Taub, R. (2002), 'STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration.', *J Biol Chem* **277**(32), 28411--28417.
143. Talarmin, H.; Rescan, C.; Cariou, S.; Glaise, D.; Zanninelli, G.; Bilodeau, M.; Loyer, P.; Guguen-Guillouzo, C. & Baffet, G. (1999), 'The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes.', *Mol Cell Biol* **19**(9), 6003--6011.
144. Behrens, A.; Sibilio, M.; David, J.-P.; Möhle-Steinlein, U.; Tronche, F.; Schütz, G. & Wagner, E. F. (2002), 'Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver.', *EMBO J* **21**(7), 1782--1790.
145. Schwabe, R. F.; Bradham, C. A.; Uehara, T.; Hatano, E.; Bennett, B. L.; Schoonhoven, R. & Brenner, D. A. (2003), 'c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration.', *Hepatology* **37**(4), 824--832.
146. Campbell, J. S.; Prichard, L.; Schaper, F.; Schmitz, J.; Stephenson-Famy, A.; Rosenfeld, M. E.; Argast, G. M.; Heinrich, P. C. & Fausto, N. (2001), 'Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration.', *J Clin Invest* **107**(10), 1285--1292.
147. Matsumoto, K. & Nakamura, T. (1992), 'Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions.', *Crit Rev Oncog* **3**(1-2), 27--54.
148. Michalopoulos, G. K. & Khan, Z. (2005), 'Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin.', *Gastroenterology* **128**(2), 503--506.
149. Bucher, N. L. (1991), 'Liver regeneration: an overview.', *J Gastroenterol Hepatol* **6**(6), 615--624.

150. Padiaditakis, P.; Lopez-Talavera, J. C.; Petersen, B.; Monga, S. P. & Michalopoulos, G. K. (2001), 'The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat.', *Hepatology* **34**(4 Pt 1), 688--693.
151. Borowiak, M.; Garratt, A. N.; Wüstefeld, T.; Strehle, M.; Trautwein, C. & Birchmeier, C. (2004), 'Met provides essential signals for liver regeneration.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29), 10608--10613.
152. Zarnegar, R.; DeFrances, M. C.; Kost, D. P.; Lindroos, P. & Michalopoulos, G. K. (1991), 'Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy.', *Biochem Biophys Res Commun* **177**(1), 559--565.
153. Diehl, A. M.; Yin, M.; Fleckenstein, J.; Yang, S. Q.; Lin, H. Z.; Brenner, D. A.; Westwick, J.; Bagby, G. & Nelson, S. (1994), 'Tumor necrosis factor- α induces c-jun during the regenerative response to liver injury.', *Am J Physiol* **267**(4 Pt 1), G552--G561.
154. Ozaki, M.; Haga, S.; Zhang, H. Q.; Irani, K. & Suzuki, S. (2003), 'Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1.', *Cell Death Differ* **10**(5), 508--515.
155. Sekine, S.; Gutiérrez, P. J. A.; Lan, B. Y.-A.; Feng, S. & Hebrok, M. (2007), 'Liver-specific loss of beta-catenin results in delayed hepatocyte proliferation after partial hepatectomy.', *Hepatology* **45**(2), 361--368.
156. Tomiya, T.; Ogata, I.; Yamaoka, M.; Yanase, M.; Inoue, Y. & Fujiwara, K. (2000), 'The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor- α .', *Am J Pathol* **157**(5), 1693--1701.
157. Fausto, N.; Mead, J. E.; Gruppuso, P. A.; Castilla, A. & Jakowlew, S. B. (1991), 'Effects of TGF- β s in the liver: cell proliferation and fibrogenesis.', *Ciba Found Symp* **157**, 165--74; discussion 174-7.
158. Scheving, L. A.; Stevenson, M. C.; Taylormoore, J. M.; Traxler, P. & Russell, W. E. (2002), 'Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation.', *Biochem Biophys Res Commun* **290**(1), 197--203.
159. Webber, E. M.; Godowski, P. J. & Fausto, N. (1994), 'In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus.', *Hepatology* **19**(2), 489--497.
160. Webber, E. M.; Wu, J. C.; Wang, L.; Merlino, G. & Fausto, N. (1994), 'Overexpression of transforming growth factor- α causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice.', *Am J Pathol* **145**(2), 398--408.
161. Higashiyama, S. (2004), 'Metalloproteinase-mediated shedding of heparin-binding EGF-like growth factor and its pathophysiological roles.', *Protein Pept Lett* **11**(5), 443--450.
162. Lee, D. C.; Sunnarborg, S. W.; Hinkle, C. L.; Myers, T. J.; Stevenson, M. Y.; Russell, W. E.; Castner, B. J.; Gerhart, M. J.; Paxton, R. J.; Black, R. A.; Chang, A. & Jackson, L. F. (2003),

- ,TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase.', *Ann N Y Acad Sci* **995**, 22--38.
163. Kim, T. H.; Mars, W. M.; Stolz, D. B.; Petersen, B. E. & Michalopoulos, G. K. (1997), 'Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat.', *Hepatology* **26**(4), 896--904.
164. Nagase, H. (1997), 'Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.', *Biol Chem* **378**(3-4), 151--160.
165. Baramova, E. N.; Bajou, K.; Remacle, A.; L'Hoir, C.; Krell, H. W.; Weidle, U. H.; Noel, A. & Foidart, J. M. (1997), 'Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation.', *FEBS Lett* **405**(2), 157--162.
166. Kim, T. H.; Mars, W. M.; Stolz, D. B. & Michalopoulos, G. K. (2000), 'Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration.', *Hepatology* **31**(1), 75--82.
167. Sérandour, A.-L.; Loyer, P.; Garnier, D.; Courselaud, B.; Théret, N.; Glaise, D.; Guguen-Guillouzo, C. & Corlu, A. (2005), 'TNFalpha-mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes.', *Hepatology* **41**(3), 478--486.
168. Shimizu, M.; Hara, A.; Okuno, M.; Matsuno, H.; Okada, K.; Ueshima, S.; Matsuo, O.; Niwa, M.; Akita, K.; Yamada, Y.; Yoshimi, N.; Uematsu, T.; Kojima, S.; Friedman, S. L.; Moriwaki, H. & Mori, H. (2001), 'Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis.', *Hepatology* **33**(3), 569--576.
169. Liu, M. L.; Mars, W. M.; Zarnegar, R. & Michalopoulos, G. K. (1994), 'Uptake and distribution of hepatocyte growth factor in normal and regenerating adult rat liver.', *Am J Pathol* **144**(1), 129--140.
170. GRISHAM, J. W. (1962), 'A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3.', *Cancer Res* **22**, 842--849.
171. Servillo, G.; Penna, L.; Foulkes, N. S.; Magni, M. V.; Fazia, M. A. D. & Sassone-Corsi, P. (1997), 'Cyclic AMP signalling pathway and cellular proliferation: induction of CREM during liver regeneration.', *Oncogene* **14**(13), 1601--1606.
172. DeGregori, J.; Kowalik, T. & Nevins, J. R. (1995), 'Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes.', *Mol Cell Biol* **15**(8), 4215--4224.
173. Fan, G.; Xu, R.; Wessendorf, M. W.; Ma, X.; Kren, B. T. & Steer, C. J. (1995), 'Modulation of retinoblastoma and retinoblastoma-related proteins in regenerating rat liver and primary hepatocytes.', *Cell Growth Differ* **6**(11), 1463--1476.

174. Rinaudo, J. A. S. & Thorgeirsson, S. S. (1997), 'Detection of a tyrosine-phosphorylated form of cyclin A during liver regeneration.', *Cell Growth Differ* **8**(3), 301--309.
175. Matsuo, T.; Yamaguchi, S.; Mitsui, S.; Emi, A.; Shimoda, F. & Okamura, H. (2003), 'Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo.', *Science* **302**(5643), 255--259.
176. Schibler, U. (2003), 'Circadian rhythms. Liver regeneration clocks on.', *Science* **302**(5643), 234--235.
177. GRISHAM, J. W.; LEONG, G. F. & HOLE, B. V. (1964), 'HETEROTOPIC PARTIAL AUTOTRANSPLANTATION OF RAT LIVER: TECHNIC AND DEMONSTRATION OF STRUCTURE AND FUNCTION OF THE GRAFT.', *Cancer Res* **24**, 1474--1495.
178. Derynck, R. & Zhang, Y. E. (2003), 'Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.', *Nature* **425**(6958), 577--584.
179. Attisano, L. & Lee-Hoeflich, S. T. (2001), 'The Smads.', *Genome Biol* **2**(8), REVIEWS3010.
180. Macias-Silva, M.; Li, W.; Leu, J. I.; Crissey, M. A. S. & Taub, R. (2002), 'Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration.', *J Biol Chem* **277**(32), 28483--28490.
181. Date, M.; Matsuzaki, K.; Matsushita, M.; Tahashi, Y.; Furukawa, F. & Inoue, K. (2000), 'Modulation of transforming growth factor beta function in hepatocytes and hepatic stellate cells in rat liver injury.', *Gut* **46**(5), 719--724.
182. Date, M.; Matsuzaki, K.; Matsushita, M.; Tahashi, Y.; Sakitani, K. & Inoue, K. (2000), 'Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury.', *J Hepatol* **32**(2), 251--260.
183. Kelley-Loughnane, N.; Sabla, G. E.; Ley-Ebert, C.; Aronow, B. J. & Bezerra, J. A. (2002), 'Independent and overlapping transcriptional activation during liver development and regeneration in mice.', *Hepatology* **35**(3), 525--534.
184. Arai, M.; Yokosuka, O.; Chiba, T.; Imazeki, F.; Kato, M.; Hashida, J.; Ueda, Y.; Sugano, S.; Hashimoto, K.; Saisho, H.; Takiguchi, M. & Seki, N. (2003), 'Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration.', *J Biol Chem* **278**(32), 29813--29818.
185. Rosa, J. L.; Tauler, A.; Lange, A. J.; Pilkis, S. J. & Bartrons, R. (1992), 'Transcriptional and posttranscriptional regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase during liver regeneration.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9), 3746--3750.
186. Bucher, M. L. & Swaffield, M. N. (1975), 'Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(3), 1157--1160
187. Bucher, N. L. & Swaffield, M. N. (1975), 'Synergistic action of glucagon and insulin in regulation of hepatic regeneration.', *Adv Enzyme Regul* **13**, 281--293.

188. Mohn, K. L.; Laz, T. M.; Hsu, J. C.; Melby, A. E.; Bravo, R. & Taub, R. (1991), 'The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes.', *Mol Cell Biol* **11**(1), 381--390.
189. Mohn, K. L.; Laz, T. M.; Melby, A. E. & Taub, R. (1990), 'Immediate-early gene expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated Balb/c 3T3 cells. Liver-specific induction patterns of gene 33, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the jun, fos, and egr families.', *J Biol Chem* **265**(35), 21914--21921.
190. Leu, J. I.; Crissey, M. A.; Leu, J. P.; Ciliberto, G. & Taub, R. (2001), 'Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury.', *Mol Cell Biol* **21**(2), 414--424.
191. Lazarevich, N. L. & Al'pern, D. V. (2008), '[Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) in epithelial development and carcinogenesis]', *Mol Biol (Mosk)* **42**(5), 786--797.
192. Tan, Y.; Yoshida, Y.; Hughes, D. E. & Costa, R. H. (2006), 'Increased expression of hepatocyte nuclear factor 6 stimulates hepatocyte proliferation during mouse liver regeneration.', *Gastroenterology* **130**(4), 1283--1300.
193. Xing, W.; Deng, M.; Zhang, J.; Huang, H.; Dirsch, O. & Dahmen, U. (2009), 'Quantitative evaluation and selection of reference genes in a rat model of extended liver resection.', *J Biomol Tech* **20**(2), 109--115.
194. Moreno-Bueno, G.; Peinado, H.; Molina, P.; Olmeda, D.; Cubillo, E.; Santos, V.; Palacios, J.; Portillo, F. & Cano, A. (2009), 'The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition.', *Nat Protoc* **4**(11), 1591--1613.
195. Choi, S. S. & Diehl, A. M. (2009), 'Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver.', *Hepatology* **50**(6), 2007--2013.
196. Levayer, R. & Lecuit, T. (2008), 'Breaking down EMT.', *Nat Cell Biol* **10**(7), 757--759.
197. Nishina, H.; Wada, T. & Katada, T. (2004), 'Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway.', *J Biochem* **136**(2), 123--126.
198. Wilson, C. W. & Chuang, P. (2010), 'Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction.', *Development* **137**(13), 2079--2094.
199. Varjosalo, M. & Taipale, J. (2007), 'Hedgehog signaling.', *J Cell Sci* **120**(Pt 1), 3--6.
200. Omenetti, A. & Diehl, A. M. (2008), 'The adventures of sonic hedgehog in development and repair. II. Sonic hedgehog and liver development, inflammation, and cancer.', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(3), G595--G598.
201. Katoh, M. & Katoh, M. (2007), 'WNT signaling pathway and stem cell signaling network.', *Clin Cancer Res* **13**(14), 4042--4045.

-
202. Apte, U.; Singh, S.; Zeng, G.; Cieply, B.; Virji, M. A.; Wu, T. & Monga, S. P. S. (2009), 'Beta-catenin activation promotes liver regeneration after acetaminophen-induced injury.', *Am J Pathol* **175**(3), 1056--1065.
203. Monga, S. P.; Padiaditakis, P.; Mule, K.; Stolz, D. B. & Michalopoulos, G. K. (2001), 'Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration.', *Hepatology* **33**(5), 1098--1109.
204. Nakaya, Y.; Sukowati, E. W.; Wu, Y. & Sheng, G. (2008), 'RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation.', *Nat Cell Biol* **10**(7), 765--775.
205. Grotegut, S.; von Schweinitz, D.; Christofori, G. & Lehembre, F. (2006), 'Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail.', *EMBO J* **25**(15), 3534--3545.
206. Moustakas, A. & Heldin, C.-H. (2007), 'Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression.', *Cancer Sci* **98**(10), 1512--1520.
207. Martin, P. & Parkhurst, S. M. (2004), 'Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis.', *Development* **131**(13), 3021--3034.
208. Jochheim, A.; Cieslak, A.; Hillemann, T.; Cantz, T.; Scharf, J.; Manns, M. P. & Ott, M. (2003), 'Multi-stage analysis of differential gene expression in BALB/C mouse liver development by high-density microarrays.', *Differentiation* **71**(1), 62--72.
209. Jochheim-Richter, A.; Rüdric, U.; Koczan, D.; Hillemann, T.; Tewes, S.; Petry, M.; Kispert, A.; Sharma, A. D.; Attaran, F.; Manns, M. P. & Ott, M. (2006), 'Gene expression analysis identifies novel genes participating in early murine liver development and adult liver regeneration.', *Differentiation* **74**(4), 167--173.
210. Berry, M. N. & Friend, D. S. (1969), 'High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study.', *J Cell Biol* **43**(3), 506--520.
211. Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979), 'Preparative and analytical purification of DNA from agarose.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(2), 615--619.
212. Brown, M. G. M., Weston, A., Saunders, J. R., Humphreys, G. O. (1975) Transformation of E.coli C600 by Plasmid DNA at different phases of growth *FEMS Microbiol. Lett.* **5**:216--222
213. Albrecht, J. H.; Poon, R. Y.; Ahonen, C. L.; Rieland, B. M.; Deng, C. & Crary, G. S. (1998), 'Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver.', *Oncogene* **16**(16), 2141--2150.
214. Ochiai, K.; Muramatsu, H.; Yamamoto, S.; Ando, H. & Muramatsu, T. (2004), 'The role of midkine and pleiotrophin in liver regeneration.', *Liver Int* **24**(5), 484--491.
215. Tseng, H. & Green, H. (1994), 'Association of basonuclin with ability of keratinocytes to multiply and with absence of terminal differentiation.', *J Cell Biol* **126**(2), 495--506.

216. Tseng, H. & Green, H. (1992), 'Basonuclin: a keratinocyte protein with multiple paired zinc fingers.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21), 10311--10315.
217. Merrick, W. C., Tschopp, J., Hammarskjold, M. L., Ozturk, S., Khanna, K., O'Donnell, M., Bosco, G., Walworth, N., Jassal, B., Bambara, R. A., Gebauer, F., Bedwell, D., Hentze, M. W., Joshi-Tope, G., Proudfoot, N. J., Wahle, E., Krainer, A. R., Gillespie, M. E., de Bono, B., Alnemri, E., Balar, B. A., Hoffmann, I., Marzluff, W. F., Davey, M. J., Tsujimoto, Y., Hengartner, M., Kornblihtt, A. R., Matthews, L., Ortiz, P. A., Schmidt, E. E., Bevan, A. P., Kinzy, T. G., Ulloque, R., Hardwick, J. M., Hoeijmakers, J. H., D'Eustachio, P., Birney, E., Thompson, L., Gopinathrao, G., Schultz, R., Farndale, R., Pace, N. P., Hastings, M., Tom, S., O'Connell, M., Catlett, M., Tye, B. K., Anand, M., Lees-Miller, S., Forsburg, S., Yen, T. J., Carmichael, G. G., Pittman, Y. R., Gross, S., Zhang, Z., Pegg, A., *The Reactome Book A textbook of biological pathways European Bioinformatics Institute & Cold Spring Harbor Laboratory*
218. Matsui, T.; Kinoshita, T.; Hirano, T.; Yokota, T. & Miyajima, A. (2002), 'STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development.', *J Biol Chem* **277**(39), 36167-36173.
219. Miller, M. K.; Bang, M.-L.; Witt, C. C.; Labeit, D.; Trombitas, C.; Watanabe, K.; Granzier, H.; McElhinny, A. S.; Gregorio, C. C. & Labeit, S. (2003), 'The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules.', *J Mol Biol* **333**(5), 951--964.
220. Kanai, H.; Tanaka, T.; Aihara, Y.; Takeda, S.; Kawabata, M.; Miyazono, K.; Nagai, R. & Kurabayashi, M. (2001), 'Transforming growth factor-beta/Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells.', *Circ Res* **88**(1), 30--36.
221. Chu, W.; Burns, D. K.; Swerlick, R. A. & Presky, D. H. (1995), 'Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells.', *J Biol Chem* **270**(17), 10236--10245.
222. Sado, T.; Nakajima, N.; Tada, M.; Takagi, N.; (1993) A novel mesoderm-specific cDNA isolated from a mouse embryonal carcinoma cell line. *Dev. Growth Differ.* **35**: 551--560
223. Mayer, W.; Hemberger, M.; Frank, H. G.; Grümmer, R.; Winterhager, E.; Kaufmann, P. & Fundele, R. (2000), 'Expression of the imprinted genes MEST/Mest in human and murine placenta suggests a role in angiogenesis.', *Dev Dyn* **217**(1), 1--10.
224. Nikonova, L.; Koza, R. A.; Mendoza, T.; Chao, P.-M.; Curley, J. P. & Kozak, L. P. (2008), 'Mesoderm-specific transcript is associated with fat mass expansion in response to a positive energy balance.', *FASEB J* **22**(11), 3925--3937.
225. Reule, M.; Krause, R.; Hemberger, M. & Fundele, R. (1998), 'Analysis of Peg1/Mest imprinting in the mouse.', *Dev Genes Evol* **208**(3), 161--163.
226. Takahashi, M.; Kamei, Y. & Ezaki, O. (2005), 'Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size.', *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**(1), E117--E124.

227. Lefebvre, L.; Viville, S.; Barton, S. C.; Ishino, F.; Keverne, E. B. & Surani, M. A. (1998), 'Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*.', *Nat Genet* **20**(2), 163--169.
228. Shiratori, H.; Sakuma, R.; Watanabe, M.; Hashiguchi, H.; Mochida, K.; Sakai, Y.; Nishino, J.; Saijoh, Y.; Whitman, M. & Hamada, H. (2001), 'Two-step regulation of left-right asymmetric expression of *Pitx2*: initiation by nodal signaling and maintenance by *Nkx2*.', *Mol Cell* **7**(1), 137--149.
229. Semina, E. V.; Reiter, R.; Leysens, N. J.; Alward, W. L.; Small, K. W.; Datsun, N. A.; Siegel-Bartelt, J.; Bierke-Nelson, D.; Bitoun, P.; Zabel, B. U.; Carey, J. C. & Murray, J. C. (1996), 'Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, *RIEG*, involved in Rieger syndrome.', *Nat Genet* **14**(4), 392--399.
230. Cox, C. J.; Espinoza, H. M.; McWilliams, B.; Chappell, K.; Morton, L.; Hjalt, T. A.; Semina, E. V. & Amendt, B. A. (2002), 'Differential regulation of gene expression by *PITX2* isoforms.', *J Biol Chem* **277**(28), 25001--25010.
231. Kioussi, C.; Briata, P.; Baek, S. H.; Rose, D. W.; Hamblet, N. S.; Herman, T.; Ohgi, K. A.; Lin, C.; Gleiberman, A.; Wang, J.; Brault, V.; Ruiz-Lozano, P.; Nguyen, H. D.; Kemler, R.; Glass, C. K.; Wynshaw-Boris, A. & Rosenfeld, M. G. (2002), 'Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin → *Pitx2* pathway mediating cell-type-specific proliferation during development.', *Cell* **111**(5), 673--685.
232. Briata, P.; Ilengo, C.; Corte, G.; Moroni, C.; Rosenfeld, M. G.; Chen, C.-Y. & Gherzi, R. (2003), 'The Wnt/beta-catenin→*Pitx2* pathway controls the turnover of *Pitx2* and other unstable mRNAs.', *Mol Cell* **12**(5), 1201--1211.
233. Baek, S. H.; Kioussi, C.; Briata, P.; Wang, D.; Nguyen, H. D.; Ohgi, K. A.; Glass, C. K.; Wynshaw-Boris, A.; Rose, D. W. & Rosenfeld, M. G. (2003), 'Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6), 3245--3250.
234. Langhe, S. P. D.; Carraro, G.; Tefft, D.; Li, C.; Xu, X.; Chai, Y.; Minoo, P.; Hajihosseini, M. K.; Drouin, J.; Kaartinen, V. & Bellusci, S. (2008), 'Formation and differentiation of multiple mesenchymal lineages during lung development is regulated by beta-catenin signaling.', *PLoS One* **3**(1), e1516.
235. Wei, Q. & Adelstein, R. S. (2002), '*Pitx2a* expression alters actin-myosin cytoskeleton and migration of HeLa cells through Rho GTPase signaling.', *Mol Biol Cell* **13**(2), 683--697.
236. Martínez-Fernandez, S.; Hernández-Torres, F.; Franco, D.; Lyons, G. E.; Navarro, F. & Aránega, A. E. (2006), '*Pitx2c* overexpression promotes cell proliferation and arrests differentiation in myoblasts.', *Dev Dyn* **235**(11), 2930--2939.
237. Yoshioka, H.; Meno, C.; Koshiba, K.; Sugihara, M.; Itoh, H.; Ishimaru, Y.; Inoue, T.; Ohuchi, H.; Semina, E. V.; Murray, J. C.; Hamada, H. & Noji, S. (1998), '*Pitx2*, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry.', *Cell* **94**(3), 299--305.

238. Zhang, H. Z.; Degar, B. A.; Rogoulina, S.; Resor, C.; Booth, C. J.; Sinning, J.; Gage, P. J. & Forget, B. G. (2006), 'Hematopoiesis following disruption of the Pitx2 homeodomain gene.', *Exp Hematol* **34**(2), 167--178.
239. Kieusseian, A.; Chagraoui, J.; Kerdudo, C.; Mangeot, P.-E.; Gage, P. J.; Navarro, N.; Izac, B.; Uzan, G.; Forget, B. G. & Dubart-Kupperschmitt, A. (2006), 'Expression of Pitx2 in stromal cells is required for normal hematopoiesis.', *Blood* **107**(2), 492--500.
240. Lin, C. R.; Kioussi, C.; O'Connell, S.; Briata, P.; Szeto, D.; Liu, F.; Izpisua-Belmonte, J. C. & Rosenfeld, M. G. (1999), 'Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis.', *Nature* **401**(6750), 279--282.
241. Nagai, T.; Aruga, J.; Takada, S.; Günther, T.; Spörle, R.; Schughart, K. & Mikoshiba, K. (1997), 'The expression of the mouse Zic1, Zic2, and Zic3 gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation.', *Dev Biol* **182**(2), 299--313.
242. Koyabu, Y.; Nakata, K.; Mizugishi, K.; Aruga, J. & Mikoshiba, K. (2001), 'Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins.', *J Biol Chem* **276**(10), 6889--6892.
243. Aruga, J.; Inoue, T.; Hoshino, J. & Mikoshiba, K. (2002), 'Zic2 controls cerebellar development in cooperation with Zic1.', *J Neurosci* **22**(1), 218--225.
244. Grinberg, I.; Northrup, H.; Ardinger, H.; Prasad, C.; Dobyns, W. B. & Millen, K. J. (2004), 'Heterozygous deletion of the linked genes ZIC1 and ZIC4 is involved in Dandy-Walker malformation.', *Nat Genet* **36**(10), 1053--1055.
245. Pan, D.; Fujimoto, M.; Lopes, A. & Wang, Y.-X. (2009), 'Twist-1 is a PPARdelta-inducible, negative-feedback regulator of PGC-1alpha in brown fat metabolism.', *Cell* **137**(1), 73--86.
246. Shishido, E.; Higashijima, S.; Emori, Y. & Saigo, K. (1993), 'Two FGF-receptor homologues of Drosophila: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos.', *Development* **117**(2), 751--761.
247. Zuniga, A.; Quillet, R.; Perrin-Schmitt, F. & Zeller, R. (2002), 'Mouse Twist is required for fibroblast growth factor-mediated epithelial-mesenchymal signalling and cell survival during limb morphogenesis.', *Mech Dev* **114**(1-2), 51--59.
248. O'Rourke, M. P.; Soo, K.; Behringer, R. R.; Hui, C.-C. & Tam, P. P. L. (2002), 'Twist plays an essential role in FGF and SHH signal transduction during mouse limb development.', *Dev Biol* **248**(1), 143--156.
249. Sun, T.; Zhao, N.; Zhao, X.-L.; Gu, Q.; Zhang, S.-W.; Che, N.; Wang, X.-H.; Du, J.; Liu, Y.-X. & Sun, B.-C. (2010), 'Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry.', *Hepatology* **51**(2), 545--556
250. Yang, J.; Mani, S. A.; Donaher, J. L.; Ramaswamy, S.; Itzykson, R. A.; Come, C.; Savagner, P.; Gitelman, I.; Richardson, A. & Weinberg, R. A. (2004), 'Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.', *Cell* **117**(7), 927--939.

-
251. Yang, M.-H.; Chen, C.-L.; Chau, G.-Y.; Chiou, S.-H.; Su, C.-W.; Chou, T.-Y.; Peng, W.-L. & Wu, J.-C. (2009), 'Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma.', *Hepatology* **50**(5), 1464--1474.
252. Sock, E.; Rettig, S. D.; Enderich, J.; Bösl, M. R.; Tamm, E. R. & Wegner, M. (2004), 'Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling.', *Mol Cell Biol* **24**(15), 6635--6644.
253. Jankowski, M. P.; McIlwrath, S. L.; Jing, X.; Cornuet, P. K.; Salerno, K. M.; Koerber, H. R. & Albers, K. M. (2009), 'Sox11 transcription factor modulates peripheral nerve regeneration in adult mice.', *Brain Res* **1256**, 43--54.
254. Hide, T.; Takezaki, T.; Nakatani, Y.; Nakamura, H.; Ichi Kuratsu, J. & Kondo, T. (2009), 'Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation.', *Cancer Res* **69**(20), 7953--7959.
255. Tang, L. S.; Alger, H. M.; Lin, F. & Pereira, F. A. (2005), 'Dynamic expression of COUP-TFI and COUP-TFII during development and functional maturation of the mouse inner ear.', *Gene Expr Patterns* **5**(5), 587--592.
256. Yamaguchi, H.; Zhou, C.; Lin, S.-C.; Durand, B.; Tsai, S. Y. & Tsai, M.-J. (2004), 'The nuclear orphan receptor COUP-TFI is important for differentiation of oligodendrocytes.', *Dev Biol* **266**(2), 238--251.
257. Sugiyama, T.; Wang, J. C.; Scott, D. K. & Granner, D. K. (2000), 'Transcription activation by the orphan nuclear receptor, chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI). Definition of the domain involved in the glucocorticoid response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene.', *J Biol Chem* **275**(5), 3446--3454.
258. McNair, A.; Cereghini, S.; Brand, H.; Smith, T.; Breillat, C. & Gannon, F. (2000), 'Synergistic activation of the Atlantic salmon hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 promoter by the orphan nuclear receptors HNF4 and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI).', *Biochem J* **352 Pt 2**, 557--564.
259. Yanai, K.; Hirota, K.; Taniguchi-Yanai, K.; Shigematsu, Y.; Shimamoto, Y.; Saito, T.; Chowdhury, S.; Takiguchi, M.; Arakawa, M.; Nibu, Y.; Sugiyama, F.; Yagami, K. & Fukamizu, A. (1999), 'Regulated expression of human angiotensinogen gene by hepatocyte nuclear factor 4 and chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor.', *J Biol Chem* **274**(49), 34605--34612.
260. Galson, D. L.; Tsuchiya, T.; Tendler, D. S.; Huang, L. E.; Ren, Y.; Ogura, T. & Bunn, H. F. (1995), 'The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1.', *Mol Cell Biol* **15**(4), 2135--2144.
261. Hoogstraten, D.; Nigg, A. L.; Heath, H.; Mullenders, L. H. F.; van Driel, R.; Hoeijmakers, J. H. J.; Vermeulen, W. & Houtsmuller, A. B. (2002), 'Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo.', *Mol Cell* **10**(5), 1163--1174.

262. Yamamoto, S.; Watanabe, Y.; van der Spek, P. J.; Watanabe, T.; Fujimoto, H.; Hanaoka, F. & Ohkuma, Y. (2001), 'Studies of nematode TFIIE function reveal a link between Ser-5 phosphorylation of RNA polymerase II and the transition from transcription initiation to elongation.', *Mol Cell Biol* **21**(1), 1--15.
263. Li, O.; Li, J. & Dröge, P. (2007), 'DNA architectural factor and proto-oncogene HMGA2 regulates key developmental genes in pluripotent human embryonic stem cells.', *FEBS Lett* **581**(18), 3533--3537.
264. Nan, L.; Wu, Y.; Bardag-Gorce, F.; Li, J.; French, B. A.; Fu, A. N.; Francis, T.; Vu, J. & French, S. W. (2004), 'p62 is involved in the mechanism of Mallory body formation.', *Exp Mol Pathol* **77**(3), 168--175.
265. Drapkin, R. & Reinberg, D. (1994), 'The multifunctional TFIID complex and transcriptional control.', *Trends Biochem Sci* **19**(11), 504--508.
266. Vandell, L. & Kouzarides, T. (1999), 'Residues phosphorylated by TFIID are required for E2F-1 degradation during S-phase.', *EMBO J* **18**(15), 4280--4291.
267. Tallini, G. & Cin, P. D. (1999), 'HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors.', *Adv Anat Pathol* **6**(5), 237--246.
268. Goodwin, G. H.; Sanders, C. & Johns, E. W. (1973), 'A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids.', *Eur J Biochem* **38**(1), 14--19.
269. Bustin, M. & Reeves, R. (1996), 'High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function.', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **54**, 35--100.
270. Ferguson, M.; Henry, P. A. & Currie, R. A. (2003), 'Histone deacetylase inhibition is associated with transcriptional repression of the Hmga2 gene.', *Nucleic Acids Res* **31**(12), 3123--3133.
271. Grosschedl, R.; Giese, K. & Pagel, J. (1994), 'HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures.', *Trends Genet* **10**(3), 94--100.
272. Reeves, R. & Beckerbauer, L. (2001), 'HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure.', *Biochim Biophys Acta* **1519**(1-2), 13--29.
273. Caron, L.; Bost, F.; Prot, M.; Hofman, P. & Binétruy, B. (2005), 'A new role for the oncogenic high-mobility group A2 transcription factor in myogenesis of embryonic stem cells.', *Oncogene* **24**(41), 6281--6291.
274. Pfannkuche, K.; Summer, H.; Li, O.; Hescheler, J. & Dröge, P. (2009), 'The high mobility group protein HMGA2: a co-regulator of chromatin structure and pluripotency in stem cells?', *Stem Cell Rev* **5**(3), 224--230.
275. Tessari, M. A.; Gostissa, M.; Altamura, S.; Sgarra, R.; Rustighi, A.; Salvagno, C.; Caretti, G.; Imbriano, C.; Mantovani, R.; Sal, G. D.; Giancotti, V. & Manfioletti, G. (2003), 'Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2.', *Mol Cell Biol* **23**(24), 9104--9116.

276. Thuault, S.; Tan, E.-J.; Peinado, H.; Cano, A.; Heldin, C.-H. & Moustakas, A. (2008), 'HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition.', *J Biol Chem* **283**(48), 33437--33446.
277. Thuault, S.; Valcourt, U.; Petersen, M.; Manfioletti, G.; Heldin, C.-H. & Moustakas, A. (2006), 'Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition.', *J Cell Biol* **174**(2), 175--183.
278. Mankoo, B. S.; Skuntz, S.; Harrigan, I.; Grigorieva, E.; Candia, A.; Wright, C. V. E.; Arnheiter, H. & Pachnis, V. (2003), 'The concerted action of Meox homeobox genes is required upstream of genetic pathways essential for the formation, patterning and differentiation of somites.', *Development* **130**(19), 4655--4664.
279. Petropoulos, H.; Gianakopoulos, P. J.; Ridgeway, A. G. & Skerjanc, I. S. (2004), 'Disruption of Meox or Gli activity ablates skeletal myogenesis in P19 cells.', *J Biol Chem* **279**(23), 23874--23881.
280. Skuntz, S.; Mankoo, B.; Nguyen, M.-T. T.; Hustert, E.; Nakayama, A.; Tournier-Lasserre, E.; Wright, C. V. E.; Pachnis, V.; Bharti, K. & Arnheiter, H. (2009), 'Lack of the mesodermal homeodomain protein MEOX1 disrupts sclerotome polarity and leads to a remodeling of the cranio-cervical joints of the axial skeleton.', *Dev Biol* **332**(2), 383--395.
281. Rodrigo, I.; Bovolenta, P.; Mankoo, B. S. & Imai, K. (2004), 'Meox homeodomain proteins are required for Bapx1 expression in the sclerotome and activate its transcription by direct binding to its promoter.', *Mol Cell Biol* **24**(7), 2757--2766.
282. Clement-Jones, M.; Schiller, S.; Rao, E.; Blaschke, R. J.; Zuniga, A.; Zeller, R.; Robson, S. C.; Binder, G.; Glass, I.; Strachan, T.; Lindsay, S. & Rappold, G. A. (2000), 'The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome.', *Hum Mol Genet* **9**(5), 695--702.
283. Rao, E.; Weiss, B.; Fukami, M.; Rump, A.; Niesler, B.; Mertz, A.; Muroya, K.; Binder, G.; Kirsch, S.; Winkelmann, M.; Nordsiek, G.; Heinrich, U.; Breuning, M. H.; Ranke, M. B.; Rosenthal, A.; Ogata, T. & Rappold, G. A. (1997), 'Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome.', *Nat Genet* **16**(1), 54--63.
284. Blaschke, R. J. & Rappold, G. (2006), 'The pseudoautosomal regions, SHOX and disease.', *Curr Opin Genet Dev* **16**(3), 233--239.
285. Yu, L.; Gu, S.; Alappat, S.; Song, Y.; Yan, M.; Zhang, X.; Zhang, G.; Jiang, Y.; Zhang, Z.; Zhang, Y. & Chen, Y. (2005), 'Shox2-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate.', *Development* **132**(19), 4397--4406.
286. Cobb, J.; Dierich, A.; Huss-Garcia, Y. & Duboule, D. (2006), 'A mouse model for human short-stature syndromes identifies Shox2 as an upstream regulator of Runx2 during long-bone development.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(12), 4511--4515.

287. Yu, L.; Liu, H.; Yan, M.; Yang, J.; Long, F.; Muneoka, K. & Chen, Y. (2007), 'Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton.', *Dev Biol* **306**(2), 549--559.
288. Blaschke, R. J.; Töpfer, C.; Marchini, A.; Steinbeisser, H.; Janssen, J. W. G. & Rappold, G. A. (2003), 'Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX.', *J Biol Chem* **278**(48), 47820--47826.
289. Espinoza-Lewis, R. A.; Yu, L.; He, F.; Liu, H.; Tang, R.; Shi, J.; Sun, X.; Martin, J. F.; Wang, D.; Yang, J. & Chen, Y. (2009), 'Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5.', *Dev Biol* **327**(2), 376--385.
290. Hirose, Y.; Itoh, T. & Miyajima, A. (2009), 'Hedgehog signal activation coordinates proliferation and differentiation of fetal liver progenitor cells.', *Exp Cell Res* **315**(15), 2648--2657.
291. Pierrou, S.; Hellqvist, M.; Samuelsson, L.; Enerbäck, S. & Carlsson, P. (1994), 'Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending.', *EMBO J* **13**(20), 5002--5012.
292. Levinson, R. S.; Batourina, E.; Choi, C.; Vorontchikhina, M.; Kitajewski, J. & Mendelsohn, C. L. (2005), 'Foxd1-dependent signals control cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development.', *Development* **132**(3), 529--539.
293. Takahashi, H.; Sakuta, H.; Shintani, T. & Noda, M. (2009), 'Functional mode of FoxD1/CBF2 for the establishment of temporal retinal specificity in the developing chick retina.', *Dev Biol* **331**(2), 300--310.
294. Mavilio, F.; Simeone, A.; Giampaolo, A.; Faiella, A.; Zappavigna, V.; Acampora, D.; Poiana, G.; Russo, G.; Peschle, C. & Boncinelli, E. (1986), 'Differential and stage-related expression in embryonic tissues of a new human homeobox gene.', *Nature* **324**(6098), 664--668.
295. Hong, Y. S.; Kim, S. Y.; Bhattacharya, A.; Pratt, D. R.; Hong, W. K. & Tainsky, M. A. (1995), 'Structure and function of the HOX A1 human homeobox gene cDNA.', *Gene* **159**(2), 209--214.
296. Tischfield, M. A.; Bosley, T. M.; Salih, M. A. M.; Alorainy, I. A.; Sener, E. C.; Nester, M. J.; Oystreck, D. T.; Chan, W.-M.; Andrews, C.; Erickson, R. P. & Engle, E. C. (2005), 'Homozygous HOXA1 mutations disrupt human brainstem, inner ear, cardiovascular and cognitive development.', *Nat Genet* **37**(10), 1035--1037.
297. Martinez-Ceballos, E.; Chambon, P. & Gudas, L. J. (2005), 'Differences in gene expression between wild type and Hoxa1 knockout embryonic stem cells after retinoic acid treatment or leukemia inhibitory factor (LIF) removal.', *J Biol Chem* **280**(16), 16484--16498.
298. Martinez-Ceballos, E. & Gudas, L. J. (2008), 'Hoxa1 is required for the retinoic acid-induced differentiation of embryonic stem cells into neurons.', *J Neurosci Res* **86**(13), 2809--2819.

299. Zhang, X.; Emerald, B. S.; Mukhina, S.; Mohankumar, K. M.; Kraemer, A.; Yap, A. S.; Gluckman, P. D.; Lee, K.-O. & Lobie, P. E. (2006), 'HOXA1 is required for E-cadherin-dependent anchorage-independent survival of human mammary carcinoma cells.', *J Biol Chem* **281**(10), 6471--6481.
300. Zhang, X.; Zhu, T.; Chen, Y.; Mertani, H. C.; Lee, K.-O. & Lobie, P. E. (2003), 'Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene.', *J Biol Chem* **278**(9), 7580--7590.
301. Horan, G. S.; Kovács, E. N.; Behringer, R. R. & Featherstone, M. S. (1995), 'Mutations in paralogous Hox genes result in overlapping homeotic transformations of the axial skeleton: evidence for unique and redundant function.', *Dev Biol* **169**(1), 359--372.
302. Benowitz, L. I. & Routtenberg, A. (1997), 'GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity.', *Trends Neurosci* **20**(2), 84--91.
303. Kruger, C. & Kappen, C. (2010), 'Expression of cartilage developmental genes in Hoxc8- and Hoxd4-transgenic mice.', *PLoS One* **5**(2), e8978.
304. Mishra, R.; Gupta, S. K.; Meiri, K. F.; Fong, M.; Thostrup, P.; Juncker, D. & Mani, S. (2008), 'GAP-43 is key to mitotic spindle control and centrosome-based polarization in neurons.', *Cell Cycle* **7**(3), 348--357.
305. Tedeschi, A.; Nguyen, T.; Puttagunta, R.; Gaub, P. & Giovanni, S. D. (2009), 'A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration.', *Cell Death Differ* **16**(4), 543--554.
306. Biewenga, J. E.; Schrama, L. H. & Gispen, W. H. (1996), 'Presynaptic phosphoprotein B-50/GAP-43 in neuronal and synaptic plasticity.', *Acta Biochim Pol* **43**(2), 327--338.
307. Strittmatter, S. M.; Fankhauser, C.; Huang, P. L.; Mashimo, H. & Fishman, M. C. (1995), 'Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43.', *Cell* **80**(3), 445--452.
308. Chen, Q.; Yuan, Y.; Lin, S.; Chang, Y.; Zhuo, X.; Wei, W.; Tao, P.; Ruan, L.; Li, Q. & Li, Z. (2005), 'Transiently truncated and differentially regulated expression of midkine during mouse embryogenesis.', *Biochem Biophys Res Commun* **330**(4), 1230--1236.
309. Muramatsu, T. (2010), 'Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases.', *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**(4), 410--425.
310. Kato, M.; Shinozawa, T.; Kato, S.; Awaya, A. & Terada, T. (2000), 'Increased midkine expression in hepatocellular carcinoma.', *Arch Pathol Lab Med* **124**(6), 848--852.
311. White, P.; Brestelli, J. E.; Kaestner, K. H. & Greenbaum, L. E. (2005), 'Identification of transcriptional networks during liver regeneration.', *J Biol Chem* **280**(5), 3715--3722.
312. Wang, Q.; Huang, Y.; Ni, Y.; Wang, H. & Hou, Y. (2007), 'siRNA targeting midkine inhibits gastric cancer cells growth and induces apoptosis involved caspase-3,8,9 activation and mitochondrial depolarization.', *J Biomed Sci* **14**(6), 783--795.

313. Ohuchida, T.; Okamoto, K.; Akahane, K.; Higure, A.; Todoroki, H.; Abe, Y.; Kikuchi, M.; Ikematsu, S.; Muramatsu, T. & Itoh, H. (2004), 'Midkine protects hepatocellular carcinoma cells against TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of caspase-3 activity.', *Cancer* **100**(11), 2430--2436.
314. Horiba, M.; Kadomatsu, K.; Yasui, K.; Lee, J.-K.; Takenaka, H.; Sumida, A.; Kamiya, K.; Chen, S.; Sakuma, S.; Muramatsu, T. & Kodama, I. (2006), 'Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction.', *Circulation* **114**(16), 1713--1720.
315. Rho, S. B.; Dong, S. M.; Kang, S.; Seo, S.-S.; Yoo, C. W.; Lee, D. O.; Woo, J. S. & Park, S.-Y. (2008), 'Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) acts as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis.', *Carcinogenesis* **29**(11), 2106--2111.
316. Zaret, K. S. (2000), 'Liver specification and early morphogenesis.', *Mech Dev* **92**(1), 83--88.
317. Zaret, K. S. (2008), 'Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation.', *Nat Rev Genet* **9**(5), 329--340.
318. Yasuoka, H.; Yamaguchi, Y. & Feghali-Bostwick, C. A. (2009), 'The pro-fibrotic factor IGFBP-5 induces lung fibroblast and mononuclear cell migration.', *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**(2), 179--188.
319. Hung, P.-S.; Kao, S.-Y.; Shih, Y.-H.; Chiou, S.-H.; Liu, C.-J.; Chang, K.-W. & Lin, S.-C. (2008), 'Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) suppresses the tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma.', *J Pathol* **214**(3), 368--376.
320. Butt, A. J.; Dickson, K. A.; McDougall, F. & Baxter, R. C. (2003), 'Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo.', *J Biol Chem* **278**(32), 29676--29685.
321. van Kleffens, M.; Groffen, C. A.; Dits, N. F.; Lindenbergh-Kortleve, D. J.; Schuller, A. G.; Bradshaw, S. L.; Pintar, J. E.; Zwarthoff, E. C.; Drop, S. L. & van Neck, J. W. (1999), 'Generation of antisera to mouse insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP)-1 to -6: comparison of IGFBP protein and messenger ribonucleic acid localization in the mouse embryo.', *Endocrinology* **140**(12), 5944--5952.
322. Kobayashi, M.; Taniura, H. & Yoshikawa, K. (2002), 'Ectopic expression of necdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells.', *J Biol Chem* **277**(44), 42128--42135.
323. Kurita, M.; Kuwajima, T.; Nishimura, I. & Yoshikawa, K. (2006), 'Necdin downregulates CDC2 expression to attenuate neuronal apoptosis.', *J Neurosci* **26**(46), 12003--12013.
324. Hayashi, Y.; Matsuyama, K.; Takagi, K.; Sugiura, H. & Yoshikawa, K. (1995), 'Arrest of cell growth by necdin, a nuclear protein expressed in postmitotic neurons.', *Biochem Biophys Res Commun* **213**(1), 317--324.
325. Barker, P. A. & Salehi, A. (2002), 'The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease.', *J Neurosci Res* **67**(6), 705--712.

326. Taniura, H.; Matsumoto, K. & Yoshikawa, K. (1999), 'Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53.', *J Biol Chem* **274**(23), 16242--16248.
327. Taniura, H.; Taniguchi, N.; Hara, M. & Yoshikawa, K. (1998), 'Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1.', *J Biol Chem* **273**(2), 720--728.
328. Deponti, D.; François, S.; Baesso, S.; Sciorati, C.; Innocenzi, A.; Broccoli, V.; Muscatelli, F.; Meneveri, R.; Clementi, E.; Cossu, G. & Brunelli, S. (2007), 'Necdin mediates skeletal muscle regeneration by promoting myoblast survival and differentiation.', *J Cell Biol* **179**(2), 305--319.
329. Yoshikawa, K. (2000), 'Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons.', *Neurosci Res* **37**(1), 1--14.
330. Vo, H. P. & Crowe, D. L. (1998), 'Transcriptional regulation of retinoic acid responsive genes by cellular retinoic acid binding protein-II modulates RA mediated tumor cell proliferation and invasion.', *Anticancer Res* **18**(1A), 217--224.
331. Vaessen, M. J.; Kootwijk, E.; Mummery, C.; Hilkens, J.; Bootsma, D. & van Kessel, A. G. (1989), 'Preferential expression of cellular retinoic acid binding protein in a subpopulation of neural cells in the developing mouse embryo.', *Differentiation* **40**(2), 99--105.
332. Kreutz, M.; Fritsche, J.; Andreesen, R. & Krause, S. W. (1998), 'Regulation of cellular retinoic acid binding protein (CRABP II) during human monocyte differentiation in vitro.', *Biochem Biophys Res Commun* **248**(3), 830--834.
333. Asson-Batres, M. A.; Ahmad, O. & Smith, W. B. (2003), 'Expression of the cellular retinoic acid binding proteins, type II and type I, in mature rat olfactory epithelium.', *Cell Tissue Res* **312**(1), 9--19.
334. Lane, M. A.; Xu, J.; Wilen, E. W.; Sylvester, R.; Derguini, F. & Gudas, L. J. (2008), 'LIF removal increases CRABPI and CRABPII transcripts in embryonic stem cells cultured in retinol or 4-oxoretinol.', *Mol Cell Endocrinol* **280**(1-2), 63--74.
335. Won, J. Y.; Nam, E.-C.; Yoo, S. J.; Kwon, H. J.; Um, S. J.; Han, H. S.; Kim, S. H.; Byun, Y. & Kim, S. Y. (2004), 'The effect of cellular retinoic acid binding protein-I expression on the CYP26-mediated catabolism of all-trans retinoic acid and cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma.', *Metabolism* **53**(8), 1007--1012.
336. den Bogaerdt, A. J. V.; Ghalbzouri, A. E.; Hensbergen, P. J.; Reijnen, L.; Verkerk, M.; Kroon-Smits, M.; Middelkoop, E. & Ulrich, M. M. W. (2004), 'Differential expression of CRABP-II in fibroblasts derived from dermis and subcutaneous fat.', *Biochem Biophys Res Commun* **315**(2), 428--433.
337. Sato, K.; Yomogida, K.; Wada, T.; Yoriuzzi, T.; Nishimune, Y.; Hosokawa, N. & Nagata, K. (2002), 'Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary.', *J Biol Chem* **277**(40), 37678--37684.

338. Leimeister, C.; Steidl, C.; Schumacher, N.; Erhard, S. & Gessler, M. (2002), 'Developmental expression and biochemical characterization of Emu family members.', *Dev Biol* **249**(2), 204--218.
339. Salbaum, J. M. (1998), 'Punc, a novel mouse gene of the immunoglobulin superfamily, is expressed predominantly in the developing nervous system.', *Mech Dev* **71**(1-2), 201--204.
340. Yang, W.; Li, C. & Mansour, S. L. (2001), 'Impaired motor coordination in mice that lack punc.', *Mol Cell Biol* **21**(17), 6031--6043.
341. Steindler, D. A.; Settles, D.; Erickson, H. P.; Laywell, E. D.; Yoshiki, A.; Faissner, A. & Kusakabe, M. (1995), 'Tenascin knockout mice: barrels, boundary molecules, and glial scars.', *J Neurosci* **15**(3 Pt 1), 1971--1983.
342. Olson, E. N. & Srivastava, D. (1996), 'Molecular pathways controlling heart development.', *Science* **272**(5262), 671--676.
343. Forsberg, E.; Hirsch, E.; Fröhlich, L.; Meyer, M.; Ekblom, P.; Aszodi, A.; Werner, S. & Fässler, R. (1996), 'Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13), 6594--6599.
344. Molecular Cell Biology Buch von Lodish, Harvey / Berk, Arnold / Kaiser, Chris A. / Krieger, Monty / Scott, Matthew P. / Bretscher, Anthony (Autor) 4. Aufl., ISBN-13: 978-3110144604
345. Scartezzini, P.; Egeo, A.; Colella, S.; Fumagalli, P.; Arrigo, P.; Nizetic, D.; Taramelli, R. & Rasore-Quartino, A. (1997), 'Cloning a new human gene from chromosome 21q22.3 encoding a glutamic acid-rich protein expressed in heart and skeletal muscle.', *Hum Genet* **99**(3), 387--392.
346. Ferrari, P.; Lovati, E. & Frey, F. J. (2000), 'The role of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension.', *J Hypertens* **18**(3), 241--248.
347. Strick-Marchand, H. & Weiss, M. C. (2002), 'Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos.', *Hepatology* **36**(4 Pt 1), 794--804.
348. Schlueter, J. & Brand, T. (2007), 'Left-right axis development: examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis in chick and mouse embryos.', *Cytogenet Genome Res* **117**(1-4), 256--267.
349. Fougère-Deschatrette, C.; Imaizumi-Scherrer, T.; Strick-Marchand, H.; Morosan, S.; Charneau, P.; Kremsdorf, D.; Faust, D. M. & 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**(9), 2098--2109.
350. Lamba, P.; Hjalt, T. A. & Bernard, D. J. (2008), 'Novel forms of Paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2): generation by alternative translation initiation and mRNA splicing.', *BMC Mol Biol* **9**, 31.
351. Oertel, M. & Shafritz, D. A. (2008), 'Stem cells, cell transplantation and liver repopulation.', *Biochim Biophys Acta* **1782**(2), 61--74.

352. Taub, R. (2004), 'Liver regeneration: from myth to mechanism.', *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10), 836--847.
353. El-Karef, A.; Kaito, M.; Tanaka, H.; Ikeda, K.; Nishioka, T.; Fujita, N.; Inada, H.; Adachi, Y.; Kawada, N.; Nakajima, Y.; Imanaka-Yoshida, K. & Yoshida, T. (2007), 'Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate cells/myofibroblasts in chronic hepatitis C.', *J Hepatol* **46**(4), 664--673
354. Ramadori, G.; Schwögler, S.; Veit, T.; Rieder, H.; Chiquet-Ehrismann, R.; Mackie, E. J. & zum Büschenfelde, K. H. M. (1991), 'Tenascin gene expression in rat liver and in rat liver cells. In vivo and in vitro studies.', *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **60**(3), 145--153.
355. Knittel, T.; Müller, L.; Saile, B. & Ramadori, G. (1997), 'Effect of tumour necrosis factor-alpha on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells.', *J Hepatol* **27**(6), 1067--1080.
356. Gulubova, M. (2002), 'Immunohistochemical localization of collagen type III and type IV, laminin, tenascin and alpha-smooth muscle actin (alphaSMA) in the human liver in peliosis.', *Pathol Res Pract* **198**(12), 803--812.
357. Syn, W.-K.; Jung, Y.; Omenetti, A.; Abdelmalek, M.; Guy, C. D.; Yang, L.; Wang, J.; Witek, R. P.; Fearing, C. M.; Pereira, T. A.; Teaberry, V.; Choi, S. S.; Conde-Vancells, J.; Karaca, G. F. & Diehl, A. M. (2009), 'Hedgehog-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenic repair in nonalcoholic fatty liver disease.', *Gastroenterology* **137**(4), 1478--1488.e8.
358. Omenetti, A.; Porrello, A.; Jung, Y.; Yang, L.; Popov, Y.; Choi, S. S.; Witek, R. P.; Alpini, G.; Venter, J.; Vandongen, H. M.; Syn, W.-K.; Baroni, G. S.; Benedetti, A.; Schuppan, D. & Diehl, A. M. (2008), 'Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans.', *J Clin Invest* **118**(10), 3331--3342.
359. Ochoa, B.; Syn, W.-K.; Delgado, I.; Karaca, G. F.; Jung, Y.; Wang, J.; Zubiaga, A. M.; Fresnedo, O.; Omenetti, A.; Zdanowicz, M.; Choi, S. S. & Diehl, A. M. (2010), 'Hedgehog signaling is critical for normal liver regeneration after partial hepatectomy in mice.', *Hepatology* **51**(5), 1712--1723.
360. Wang, K.; Pan, L.; Che, X.; Cui, D. & Li, C. (2010), 'Sonic Hedgehog/GLI1 signaling pathway inhibition restricts cell migration and invasion in human gliomas.', *Neurol Res.*
361. Stanton, B. Z. & Peng, L. F. (2010), 'Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway.', *Mol Biosyst* **6**(1), 44--54.
362. Ingram, W. J.; Wicking, C. A.; Grimmond, S. M.; Forrest, A. R. & Wainwright, B. J. (2002), 'Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells.', *Oncogene* **21**(53), 8196--8205.
363. Mallo, M.; Wellik, D. M. & Deschamps, J. (2010), 'Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan.', *Dev Biol* **344**(1), 7--15.

364. Kim, D. K.; Han, S. B.; Hong, S. T.; Choi, Y. J.; Sun, W.; Geum, D. & Kim, H. (2008), 'Expression of Sox11 and Brn transcription factors during development and following transient forebrain ischemia in the rat.', *Neurosci Lett* **433**(3), 259--264.
365. Takahashi, T.; Kakita, A.; Sakamoto, I.; Takahashi, Y.; Hayashi, K.; Tadokoro, F. & Yamashina, S. (2001), 'Immunohistochemical and electron microscopic study of extrinsic hepatic reinnervation following orthotopic liver transplantation in rats.', *Liver* **21**(5), 300--308.
366. Sun, Y.; Deng, X.; Li, W.; Yan, Y.; Wei, H.; Jiang, Y. & He, F. (2007), 'Liver proteome analysis of adaptive response in rat immediately after partial hepatectomy.', *Proteomics* **7**(23), 4398--4407.
367. Delalande, J.-M.; Milla, P. J. & Burns, A. J. (2004), 'Hepatic nervous system development.', *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **280**(1), 848--853.
368. Wang, H.; Arun, B. K.; Wang, H.; Fuller, G. N.; Zhang, W.; Middleton, L. P. & Sahin, A. A. (2008), 'IGFBP2 and IGFBP5 overexpression correlates with the lymph node metastasis in T1 breast carcinomas.', *Breast J* **14**(3), 261--267.
369. Samuel, W.; Kutty, R. K.; Vijayasarathy, C.; Pascual, I.; Duncan, T. & Redmond, T. M. (2010), 'Decreased expression of insulin-like growth factor binding protein-5 during N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced neuronal differentiation of ARPE-19 human retinal pigment epithelial cells: regulation by CCAAT/enhancer-binding protein.', *J Cell Physiol* **224**(3), 827--836.
370. Schrem, H.; Klempnauer, J. & Borlak, J. (2004), 'Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation.', *Pharmacol Rev* **56**(2), 291--330.
371. Muramatsu, T. (2002), 'Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis.', *J Biochem* **132**(3), 359--371.
372. Li, X.; Cao, X.; Li, X.; Zhang, W. & Feng, Y. (2007), 'Expression level of insulin-like growth factor binding protein 5 mRNA is a prognostic factor for breast cancer.', *Cancer Sci* **98**(10), 1592--1596.
373. Leka, S. K.; Kitsiou-Tzeli, S.; Kalpini-Mavrou, A. & Kanavakis, E. (2006), 'Short stature and dysmorphology associated with defects in the SHOX gene.', *Hormones (Athens)* **5**(2), 107--118.
374. Napoli, J. L. (1996), 'Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction.', *Clin Immunol Immunopathol* **80**(3 Pt 2), S52--S62.
375. Wolf, G. (2000), 'Cellular retinoic acid-binding protein II: a coactivator of the transactivation by the retinoic acid receptor complex RAR.RXR.', *Nutr Rev* **58**(5), 151--153.

376. Akhurst, B.; Croager, E. J.; Farley-Roche, C. A.; Ong, J. K.; Dumble, M. L.; Knight, B. & Yeoh, G. C. (2001), 'A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver.', *Hepatology* **34**(3), 519--522.
377. Wang, X.; Kiyokawa, H.; Dennewitz, M. B. & Costa, R. H. (2002), 'The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26), 16881--16886.
378. Wang, Y.; Xing, H.; Tian, Z.; Tang, K.; Wang, J.; Xu, Z.; Rao, Q.; Wang, M. & Wang, J. (2009), 'Overexpression of Midkine promotes the viability of BA/F3 cells.', *Biochem Biophys Res Commun* **384**(3), 341--346.
379. Xu, Y.; Qu, X.; Zhang, X.; Luo, Y.; Zhang, Y.; Luo, Y.; Hou, K. & Liu, Y. (2009), 'Midkine positively regulates the proliferation of human gastric cancer cells.', *Cancer Lett* **279**(2), 137--144.
380. Huang, Y.; Guigon, C. J.; Fan, J.; Cheng, S.-Y. & Zhu, G.-Z. (2010), 'Pituitary homeobox 2 (PITX2) promotes thyroid carcinogenesis by activation of cyclin D2.', *Cell Cycle* **9**(7).
381. Ai, D.; Liu, W.; Ma, L.; Dong, F.; Lu, M.-F.; Wang, D.; Verzi, M. P.; Cai, C.; Gage, P. J.; Evans, S.; Black, B. L.; Brown, N. A. & Martin, J. F. (2006), 'Pitx2 regulates cardiac left-right asymmetry by patterning second cardiac lineage-derived myocardium.', *Dev Biol* **296**(2), 437--449.
382. Simard, A.; Giorgio, L. D.; Amen, M.; Westwood, A.; Amendt, B. A. & Ryan, A. K. (2009), 'The Pitx2c N-terminal domain is a critical interaction domain required for asymmetric morphogenesis.', *Dev Dyn* **238**(10), 2459--2470.
383. Németh, Z.; Szász, A. M.; Tátrai, P.; Németh, J.; Gyorffy, H.; Somorácz, A.; Szijártó, A.; Kupcsulik, P.; Kiss, A. & Schaff, Z. (2009), 'Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers.', *J Histochem Cytochem* **57**(2), 113--121.
384. Amen, M.; Liu, X.; Vadlamudi, U.; Elizondo, G.; Diamond, E.; Engelhardt, J. F. & Amendt, B. A. (2007), 'PITX2 and beta-catenin interactions regulate Lef-1 isoform expression.', *Mol Cell Biol* **27**(21), 7560--7573.
385. Miwa, N.; Furuse, M.; Tsukita, S.; Niikawa, N.; Nakamura, Y. & Furukawa, Y. (2001), 'Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers.', *Oncol Res* **12**(11-12), 469--476.
386. Colletti, M.; Cicchini, C.; Conigliaro, A.; Santangelo, L.; Alonzi, T.; Pasquini, E.; Tripodi, M. & Amicone, L. (2009), 'Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation.', *Gastroenterology* **137**(2), 660--672.
387. Andrieu, D.; Meziane, H.; Marly, F.; Angelats, C.; Fernandez, P. & Muscatelli, F. (2006), 'Sensory defects in Necdin deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death.', *BMC Dev Biol* **6**, 56.

-
388. Baron, A.; Featherstone, M. S.; Hill, R. E.; Hall, A.; Galliot, B. & Duboule, D. (1987), 'Hox-1.6: a mouse homeo-box-containing gene member of the Hox-1 complex.', *EMBO J* **6**(10), 2977--2986.
389. Bigelow, R. L. H.; Chari, N. S.; Unden, A. B.; Spurgers, K. B.; Lee, S.; Roop, D. R.; Toftgard, R. & McDonnell, T. J. (2004), 'Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1.', *J Biol Chem* **279**(2), 1197--1205.
390. Delva, L.; Bastie, J. N.; Rochette-Egly, C.; Kraïba, R.; Balitrand, N.; Despouy, G.; Chambon, P. & Chomienne, C. (1999), 'Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex.', *Mol Cell Biol* **19**(10), 7158--7167.
391. Dong, D.; Ruuska, S. E.; Levinthal, D. J. & Noy, N. (1999), 'Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid.', *J Biol Chem* **274**(34), 23695--23698.
392. Gu, S.; Wei, N.; Yu, X.; Jiang, Y.; Fei, J. & Chen, Y. (2008), 'Mice with an anterior cleft of the palate survive neonatal lethality.', *Dev Dyn* **237**(5), 1509--1516.
393. Hatini, V.; Huh, S. O.; Herzlinger, D.; Soares, V. C. & Lai, E. (1996), 'Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2.', *Genes Dev* **10**(12), 1467--1478.
394. Lin, L. & Peng, S. L. (2006), 'Coordination of NF-kappaB and NFAT antagonism by the forkhead transcription factor Foxd1.', *J Immunol* **176**(8), 4793--4803.
395. Stecca, B. & Altaba, A. R. (2009), 'A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers.', *EMBO J* **28**(6), 663--676.
396. Wisse, E.; van't Noordende, J. M.; van der Meulen, J. & Daems, W. T. (1976), 'The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood.', *Cell Tissue Res* **173**(4), 423--435.

VII. ANHANG

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
293T HEK	Human embryonale Nierenzelllinie
A	Absorption
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
Acc.Nr.	Accession-Number
bp	basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa (zirka), lateinisch für: „ungefähr“, „annähernd“
cDNA	komplementäre DANN
cRNA	komplementäre RNA
Ct	cycle threshold ("Schwellenwert")
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Nukleotide
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
E	Embryo
E. coli	Escherichia coli
eGFP	enhanced green fluorescent Protein (Grün fluoreszierendes Protein)
EMT	epitheliale mesenchymale Transition (Übergang)
engl.	englisch
ESTs	Expressed sequence tag
Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FCS	fötales Kälberserum
For	Forward, 5'Primer
G0-Phase	Ruhephase; (engl.: gap Lücke, Abstand)
G1-Phase	postmitotische Phase oder Präsynthesephase; (engl.: gap Lücke, Abstand)
G2-Phase	prämitotische Phase oder Postsynthesephase; (engl.: gap Lücke, Abstand)
HBM	Hepatocyte Basal Medium
HCM	Hepatocyte Culture Medium
Konz.	Konzentration
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LC480	LightCycler 480

MET	mesenchymale epitheliale Transition (Übergang)
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MOI	Multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
M-Phase	Mitosephase
mRNA	messenger RNA; Boten RNA
N	Anzahl
p.c.	post coitum
PCR	Polymerasechainreaction, Polymerasekettenreaktion
Pfu Polymerase	DNA-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobakterium <i>Pyrococcus furiosus</i> .
pH	pondus Hydrogenii (lat. pondus „Gewicht“; Hydrogenium „Wasserstoff“); negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
ph.Eur.	Pharmacopoea Europaea, Europäisches Arzneibuch
qPCR	quantitative PCR
Rev	Reverse; 3´Primer
RNA	Ribonukleinsäure
s.o.	siehe oben
S.O.C. Medium	SOB-Medium (Super Optimal Broth) mit 20 mM Glucose
s.u.	siehe unten
Shh	Sonic Hedgehog
S-Phase	Synthesephase
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	5-carboxytetramethylrhodamine
Taq Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TE – Puffer	Tris-EDTA Puffer
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
z. Bsp.	zum Beispiel

9.2. Gene und deren Bezeichnung

Gen	Bezeichnung	Gen	Bezeichnung
Afp	alpha fetoprotein	Hmga2	high mobility group AT-hook 2
Aat	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1	Hnf1a,b, 4a	hepatic nuclear factor1a,b, 4a
Acta2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	Hoxa1	homeobox A1
Actc1	actin, alpha, cardiac muscle 1	Hoxd4	homeobox d4
Apoa1, 4, b, c3	Apolipoprotein 1, 4, B, C3	Hsd11b2	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2
C/ebpa, β	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)alpha und beta	Igfbp5	insulin-like growth factor binding protein 5

Cdh1	E- Cadherin	Krt18	Zytokeratin 7, 8, 18, 19
Cdh2	N-Cadherin	Mdk	Midkine
Cldn1	Claudin1	Meox1	mesenchyme homeobox 1
Cps1	carbamoyl-phosphate synthetase 1	Mest	mesoderm specific transcript
Crabp1, 2	cellular retinol acid binding protein 1, 2	Mybpc3	myosin binding protein C, cardiac
Cyp2a5	cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 5	Myh	myosin, heavy polypeptide
Cyp3a11	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11	Myl	myosin, light polypeptide 6
Cyp7a1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	Nr2f1	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1
Emid2	EMI domain containing 2	Ocln	occludin
Epcam	epithelial cell adhesion molecule	Onecut	Hnf6
Fah	fumarylacetoacetate hydrolase	Pitx2	paired-like homeodomain transcription factor 2
Foxa1, 2	forkhead box A1, 2	Punc	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3
Foxd1	forkhead box D1	Sh3bgr	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein
Foxm 1b	forkhead box M1	Shox2	short stature homeobox 2
G6pc	glucose-6-phosphatase, catalytic	Sox11, 17	SRY-box containing gene 11, 17
Gap43	growth associated protein 43	Tat	tyrosine aminotransferase
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Tbx3	T-box 3
Gata4, 6	GATA binding protein4, 6	Tdo	tryptophan 2,3-dioxygenase
Gjb1	gap junction protein, beta 1	Tnni1	troponin I, skeletal, slow 1
Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1	TroponinT2	troponin T2, cardiac
Gtf2h1	general transcription factor II H, polypeptide 1	Ttr	transthyretin
Gys2	glycogen synthase 2	Twist1	twist homolog 1
H1fx	H1 histone family, member X	Ugt1a	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1
Hex	hematopoietically expressed homeobox	Zic1	zinc finger protein of the cerebellum 1
hgf	Hepatozytenwachstumsfaktor		

9.3. Chemikalien

Chemikalien	Bezeichnung
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
KCl	Kaliumchlorid
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
DMSO	Dimethylsulfoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
CaCl ₂	Calciumdichlorid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HBS – Puffer	Hepes gepufferte Salzlösung
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat

9.4. Maßeinheiten

Maßeinheiten	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
g	Gramm
g	in Zusammenhang mit Zentrifugen: Erdbeschleunigung
G	Gauge Wert, Außendurchmesser
KG	Körpergewicht
l	Liter
m	Meter
min	Minute
M	Mol
Std.	Stunde

Symbol	Bezeichnung	Ursprung	Wert
c	Zenti	lat. centesimus = hundertster	10 ⁻²
m	Milli	lat. millesimus = tausendster	10 ⁻³
μ	Mikro	gr. mikrós = klein	10 ⁻⁶
n	Nano	gr. nános und ital. nano = Zwerg	10 ⁻⁹

X. DANKSAGUNG

Prof. Dr. med. Michael Ott danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die sehr gute Betreuung und die Organisation finanzieller Mittel, durch die die Anfertigung dieser Doktorarbeit überhaupt ermöglicht wurde.

Prof. Dr. med. Michael P. Manns danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Andrea Jochheim Richter, die mich in den ersten Jahren betreute und in das Thema einarbeitete; ich danke für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Dr. rer. nat. Michael Bock danke ich für die aufmunternde Zusammenarbeit. Seine Kritik, seinen immerwährenden Optimismus und seine Hilfe bei der Korrektur trugen wesentlich zur Vollendung bei.

Weiterhin danke ich bei Dr. oec. troph. Marcus Iken für die Bereitstellung der murinen primären Hepatozyten und Herrn Michael Rothe für die die Isolierung der ALDPCs. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Qingong Yuan und Phd. Amar Deep Sharma für die Durchführungen der partiellen Hepatektomie bedanken. Dr. med., Dr. rer. nat. Axel Schambach möchte ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die lentiviralen Techniken und der Bereitstellung der Plasmide danken. Ben Maasoumy möchte ich danke ich bei der Unterstützung bei der Klonierung der Plasmid.

Großer Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Michael Ott für die Hilfsbereitschaft bei jeglichen theoretischen und praktischen Problemen und für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Twincores, wobei ein großes Dankeschön an Vera Langer, Andreas Riechel und Uwe Herzig geht, die als „gute Geister des Hauses“ immer hilfsbereit zur Stelle waren.

Mein aufrichtiger Dank gilt ebenfalls meiner Familie und den Freunden, die mich ermunterten und den Fortschritt der Arbeit interessiert begleiteten, mir Rat und Hilfe gaben, wenn ich darum bat.

XI. ERKLÄRUNG

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Vergleichende Untersuchung zur relativen Genexpression in der Embryonalphase der murinen Leber und im postnatalen Regenerationsmodell der partiellen Hepatektomie

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

(Unterschrift)

Name:

XII. LEBENS LAUF

Zur Person:

Urda Rüdric
Geboren am 23.10.1980 in Berlin
Ledig

Beruflicher Werdegang:

Seit 01.03.2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin
in der Arbeitsgruppe Zell- und Gentherapie
Professor Dr. med. M. Ott

01.01.2005 – 28.02.2005 ohne Beschäftigung

05.07.2004 – 31.12.2004 Praktikum in der Arbeitsgruppe Zell- und Gentherapie
Professor Dr. med M. Ott

05.06.2004 – 05.07.2004 ohne Beschäftigung

Studium:

1.10.2001 – 04.06.2004 Hauptstudium der Biologie an der Technischen Universität Carolo –
Wilhelmina zu Braunschweig
Studienfächer:
- Genetik
- Zellbiologie
- Mikrobiologie

Feb. 2002 – Okt. 2003 studentische Hilfskraft
in der Arbeitsgruppe: Hefegenetik
Professor Dr. rer. nat. N.F. Käufer

Okt. 2003 – Juni 2004 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Hefegenetik
Professor Dr. rer. nat. N.F. Käufer
Titel: „Charakterisierung von Srp2p-ein SR-
Protein in *Schizosaccharomyces pombe*“

1.10.1999 – 30.09.2002 Grundstudium der Biologie an der Technischen Universität Carolo –
Wilhelmina zu Braunschweig

Schulische Ausbildung:

Sept. 1993 Werner Heisenberg Gymnasium in Chemnitz
Juli 1999 Abschluss: Abitur

Sept. 1990 Albert Schweitzer Mittelschule in Chemnitz
Juli 1993

Sept. 1987 Albert Schweitzer Oberschule in Karl Marx Stadt jetzt Chemnitz
Juli 1990