Met signaling in adult liver

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Malgorzata Borowiak

aus Konin

August 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Carmen Birchmeier
2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz Rathjen

Disputation am: 23. Nov. 2004

Acknowledgments

The work described in this thesis was performed between 2001 and 2004 at Max-Delbrück-Centrum in Berlin.

This work would not be possible without all the people that helped me in one way or other. Therefore, I would like to thank my mentor, Prof. Dr. Carmen Birchmeier, for all her support, advices and encouragement throughout these years. I was very fortunate to be a graduate student in her laboratory.

I would like also to thank Prof. Dr. Fritz Rathjen for granting his time and being my thesis advisor.

Here I would like to express my deepest gratitude to all my colleagues from Carmen laboratory for their valuable scientific discussion, generous assistance and all great time we had together. It was really a pleasure to work in such friendly environment. In particular, I would like to thank Alistair Garratt, Thomas Müller, Stefan Britsch, Hagen Wounde, Michael Strehle, Henning Brohmann, Cemil Özcelik, Simone Lier, Andrea Leschke and Petra Krause.

I would like also to thank Torsten Wüstefeld for help with partial hepatectomies and Christian Trautwein for valuable advices and discussion.

I am also very grateful to Ulrike Ziebold for her careful reading of the manuscript and her thoughtful suggestions and ideas.

I would like also to thank Ermanno Gherardi for providing HGF/SF antibodies.

TABLE OF CONTESTS

5 Summary

The Met tyrosine kinase receptor and its ligand, HGF/SF, play important roles in embryonic development of the liver, placenta and muscle. The placenta defects are responsible for lethality of *Met*-/- and *HGF/SF*-/- mutants in uterus. This embryonic lethality had precluded a genetic analysis of Met functions in the adult. I used here conditional gene targeting in mice to examine the function of Met receptor in the adult liver. The *Mx-cre* transgenic strain was used to introduce a Met mutation in the adult liver, after growth of the organ had ceased. The ablation of the Met receptor had little effect on the adult liver and only the long-term loss of the receptor caused a stress and led to abnormal lipid accumulation in the liver. In contrast, Met signaling played a crucial role in the liver that was challenged by partial hepatectomy. Liver regeneration was severely impaired in mice carrying the *Mx*-induced *Met* mutation, and was accompanied by a decrease in hepatocyte proliferation. Analysis of cell cycle progression in conditional *Met* mutant mice revealed an impaired exit from quiescence, i.e. a reduced cyclin D expression. In addition, the expression or the activity of several S-phase molecules was reduced, indicating impaired entry into S-phase. Moreover, conditional *Met* mutant mice showed an abnormal up-regulation of cdk-inhibitor p21Cip1/Waf1 in the regenerating liver. Impaired liver regeneration was accompanied by compensatory physiological responses, for instance a prolonged up-regulation of HGF/SF and IL-6 in the blood. A biochemical analysis enabled me to determine the contribution of HGF/SF/Met to the activation of various of signaling pathways in the regenerating liver. Activation of Erk/MAP kinases depended exclusively on HGF/SF/Met signaling. In contrast, Met cooperated to activate other signaling pathways, for instance the Akt kinase. Thus, interplay between different signaling systems plays an important role during liver regeneration. The mutation of Met receptors in the adult liver allowed me to demonstrate that the HGF/SF/Met signaling system is not only important for liver development, but also for regeneration and homeostasis of this organ.

Zusammenfassung

Der Tyrosinkinase Rezeptor Met und sein Ligand Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF) besitzen essentielle Funktionen in der Embryonalentwicklung der Leber, der Skelettmuskulatur, sowie der Plazentaentwicklung. Mäuse mit homozygoten Mutationen des Met- bzw. des HGF/SF-Gens sterben während der Embryogenese an den Folgen einer gestörten Plazentaentwicklung. Es war daher bisher nicht möglich, adulte Funktionen des HGF/SF/Met Signalsystems genetisch in Mäusen zu untersuchen. Ich habe *Konditionelles Gene Targeting* in Mäusen eingesetzt, um Funktionen des Met-Rezeptors in der adulten Leber zu untersuchen. Mit Hilfe eines induzierbaren Cre des transgenen Mausstamms *Mx-Cre*, wurde Met in der adulten Leber, d.h. nach Abschluß des Organwachstums mutiert. Nach Deletion von Met wurden keine unmittelbaren Organveränderungen in der adulten Leber beobachtet. Mutante Mäuse entwickelten jedoch während eines längeren Beobachtungszeitraums eine ausgeprägte Fetteinlagerung (Steatose) der Leber. Ich konnte außerdem zeigen, daß Met essentiell ist für die Leberregeneration. Nach partieller Hepatektomie war die Regeneration des Lebergewebes in Met mutanten Mäusen hochgradig gestört. Dies war begleitet von einer reduzierten Hepatozytenproliferation. Eine Zellzyklusanalyse ergab, daß die Cyclin D Expression reduziert, also der Wiedereintritt in den Zellzyklus in Met Mutanten gestört ist. Es konnte außerdem anhand der reduzierten Expression mehrerer S-Phase Marker eine gestörte Progression in die S-Phase beobachtet werden. Mäuse mit konditioneller Mutation von Met zeigten darüber hinaus eine abnorm gesteigerte Expression des Cdk-Inhibitors p21Cip1/Waf1 im regenerierenden Lebergewebe. Die gestörte Leberregeneration war ebenfalls begleitet von prolongiert erhöhten Blutkonzentrationen für HGF/SF und IL-6. Ich konnte biochemisch den relativen Beitrag des HGF/SF/Met Signalsystems zur Aktivierung unterschiedlicher, intrazellulärer Signalwege in der regenerierenden Leber bestimmen. So ist die Aktivierung von Erk/MAP Kinasen ausschließlich Met-abhängig. Demgegenüber kooperiert Met mit anderen Signalsystemen z. B. bei der Aktivierung von Akt Kinasen. Das Zusammenwirken mehrerer Signalwege spielt damit eine bedeutsame Rolle bei der Leberregeneration.

Durch die konditionelle Mutation des Tyrosinkinase Rezeptors Met in der adulten Leber konnte ich zeigen, daß das HGF/SF/Met Signalsystem neben der Embryogenese der Leber auch für die adulte Biologie und Regeneration dieses Organs essentiell ist.