



Doctoral Thesis

Identification and functional characterization of novel regulators of liver regeneration

Author(s):

Bachofner, Marc O.

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010813572> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS ETH NO. 23934

***Identification and functional characterization
of novel regulators of liver regeneration***

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MARC OLIVER BACHOFNER

Master of Science, ETH Zurich

born on 13.02.1987

citizen of Zurich

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sabine Werner, examiner

Prof. Dr. Ulrike Kutay, co-examiner

Prof. Dr. Christian Wolfrum, co-examiner

2016

Summary

The liver is the largest internal organ of mammals and fulfills many important tasks, such as biosynthesis and storage of glycogen, regulation of blood glucose levels and of lipid metabolism, filtration of the blood, detoxification of endogenous and exogenous compounds, production of important serum proteins like albumin and coagulation factors, as well as production of bile. Because of these essential functions, injury to the liver needs to be rapidly and efficiently repaired. Indeed, the liver evolved the capability to fully regenerate after acute injury without scar formation.

To identify novel key players in this regenerative response, we performed quantitative large-scale proteomics analysis of cytoplasmic and nuclear fractions from normal versus regenerating wild-type mouse liver, examining three time points after two-third partial hepatectomy (PH). Components of the protein ubiquitination pathway were rapidly upregulated, with the ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 being a top hit. To analyze Nedd4-1 function during liver regeneration, we used siRNA packaged into lipid nanoparticles to knock down Nedd4-1 in hepatocytes *in vivo*. Nedd4-1 deficiency in these cells caused severe liver damage and inhibition of cell proliferation after PH, ultimately resulting in liver failure four days after surgery. Mechanistically, we demonstrated that Nedd4-1 is required for efficient internalization of the epidermal growth factor receptor and the hepatocyte growth factor receptor – two important players in liver regeneration. Most importantly, the internalization deficiency was associated with impaired activation of Erk signaling and consequent hepatocyte proliferation. Therefore, the combined deficiency in the signaling by two major receptor tyrosine kinases provides an explanation for the impaired regeneration in Nedd4-1 knock-down mice.

One particular family of receptor tyrosine kinases, the fibroblast growth factor receptors (Fgfrs), are key players in embryonic development and have emerged as important regulators of tissue repair. Recent studies in our laboratory revealed a role of Fgfr1 and Fgfr2 in liver regeneration after PH. To gain additional insight into the molecular mechanisms of Fgfr1/2 action after PH, we performed a second proteomics analysis of liver regeneration, comparing subcellular fractions from control and hepatocyte-specific Fgfr1/2 knockout (Alb-R1/R2) mice. The protein ubiquitination pathway was strongly and rapidly regulated by Fgfr signaling, with the E3 ligase Ubr1 being among the top hits. Knock-down of Ubr1 in hepatocytes *in vivo* using siRNA caused a strong impairment of hepatocyte proliferation in these mice after PH. This deficiency correlated with a strongly reduced induction of the FoxM1 transcription factor and its cyclin targets after PH and largely phenocopied the proliferation deficiency seen in Alb-R1/R2 mice.

To further characterize Fgfr signaling during liver regeneration, we used siRNA-mediated knock-down of Fgfr4 in control and Alb-R1/R2 animals. Fgfr4 knock-down in control mice caused reduced hepatocyte proliferation, combined with liver necrosis after PH. Mechanistically, we showed that Fgfr4 activates Stat3, which in turn is necessary for the induction of FoxM1 and subsequent cell cycle progression. Finally, Alb-R1/2 mice with Fgfr4 knock-down showed liver failure after PH due to strongly reduced proliferation and severe liver necrosis, demonstrating an essential role of Fgfr signaling in liver regeneration.

All these results highlight the power of large-scale proteomics on its own or coupled with the analysis of genetically modified mice to identify key players in liver regeneration. They also demonstrate the suitability of siRNA-mediated knock-down *in vivo* to discover novel protein functions in this process. They reveal the importance of E3 ligases and the ubiquitination machinery during liver regeneration and emphasize the relevance of protein ubiquitination for growth factor receptor internalization and downstream signaling in hepatocytes. Finally, they also uncover an essential function of Fgfr signaling in liver regeneration.

Zusammenfassung

Die Leber ist das grösste innere Organ von Säugetieren und erfüllt viele wichtige Aufgaben, wie die Herstellung und Speicherung von Glykogen, die Regulierung des Blutzucker-gehalts und des Fettstoffwechsels, das Filtrieren des Blutes, die Entgiftung von endogenen und exogenen Substanzen, die Produktion von wichtigen Serum-Proteinen wie Albumin und Gerinnungsfaktoren, sowie die Herstellung von Galle. Aufgrund dieser lebenswichtigen Funktionen müssen Verletzungen der Leber schnell und effizient repariert werden. Dazu hat die Leber die Fähigkeit entwickelt, sich nach akuten Verletzungen vollständig und ohne Narbenbildung zu regenerieren.

Zur Identifizierung von neuen Schlüsselementen in diesem Regenerationsprozess haben wir eine grosse, quantitative Proteomics Analyse mit cytoplasmatischen und nukleären Fraktionen von unverletzter und regenerierender Maus-Leber durchgeführt. Dabei untersuchten wir drei Zeitpunkte nach partieller Hepatektomie (PH). Bestandteile des Proteinubiquitinierung Signalweges wurden dabei rasch hochreguliert. Zu den am stärksten regulierten Proteinen gehörte die Ubiquitin E3 Ligase Nedd4-1. Zur Analyse der Funktion von Nedd4-1 während der Leberregeneration verwendeten wir siRNA, verpackt in Lipid-Nanopartikeln, um *in vivo* einen Nedd4-1 Knock-down in Hepatozyten zu erzielen. Der Mangel an Nedd4-1 in diesen Zellen führte zu starkem Leberschaden und zur Reduktion der Zellproliferation nach PH, was vier Tage nach der Operation schliesslich zum Leberversagen führte. Mechanistisch konnten wir zeigen, dass Nedd4-1 für eine effiziente Internalisierung des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors und des Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptors benötigt wird; Diese beiden Rezeptoren sind wichtig für die Teilung und das Überleben von Hepatozyten während der Leberregeneration. Von grosser Bedeutung ist die Tatsache, dass die fehlende Internalisierung dieser Rezeptoren mit einer reduzierten und verkürzten Aktivierung des Erk Signalweges und der daraus folgenden Proliferation der Hepatozyten einher ging. Der Defekt in der Signaltransduktion durch diese beiden wichtigen Tyrosinkinase-Rezeptoren bietet eine gute Erklärung für die beeinträchtigte Leberregeneration in Nedd4-1 Knock-down Mäusen.

Eine spezielle Familie von Tyrosinkinase-Rezeptoren, die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Fgfrs), sind Schlüsselemente in der Embryonalentwicklung und treten auch als wichtige Regulatoren während der Reparatur von verschiedenen Geweben auf. Frühere Studien in unserem Labor haben eine Rolle von Fgfr1 und Fgfr2 in der Leberregeneration nach PH gezeigt. Um die Wirkungsmechanismen von Fgfr1/2 nach PH auf molekularer Ebene genauer zu entschlüsseln, führten wir eine zweite Proteomics Analyse der Leberregeneration durch. Dabei verglichen wir subzelluläre Fraktionen der Leber von Kontrollmäusen und Mäu-

sen mit Hepatozyten-spezifischem Fgfr1/2 Knockout (Alb-R1/R2). Der Proteinubiquitinierung Signalweg war stark und schnell in Abhängigkeit von Fgfr Signaltransduktion reguliert und die E3 Ligase Uhrf2 war unter den am stärksten regulierten Proteinen. Knock-down von Uhrf2 in Hepatozyten *in vivo* mittels siRNA führte zu einer starken Beeinträchtigung der Proliferation von Hepatozyten nach PH. Dies korrelierte mit einer stark reduzierten Induktion des FoxM1 Transkriptionsfaktors und den unter dessen Kontrolle stehenden Zyklinen nach PH. Dies entsprach weitgehend dem in Alb-R1/R2 Mäusen festgestellten Proliferationsdefekt.

Um die Fgfr Signalwege während der Leberregeneration noch weiter zu charakterisieren, verwendeten wir siRNA-induzierten Knock-down von Fgfr4 in Kontroll- und Alb-R1/R2 Tieren. Fgfr4 Knock-down in Kontrolltieren führte zu reduzierter Proliferation der Hepatozyten sowie zur Lebernekrose nach PH. Mechanistisch konnten wir zeigen, dass Fgfr4 Stat3 aktiviert, welches für die Induktion von FoxM1 und der daraus folgenden Zellteilung notwendig ist. Alb-R1/R2 Mäuse mit Fgfr4 Knock-down erlitten Lebersversagen nach PH aufgrund stark reduzierter Proliferation und schwerwiegender Lebernekrose. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Fgfr Signalweg bei der Leberregeneration eine essenzielle Rolle spielt.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Resultate, dass Proteomics Analysen allein oder in Kombination mit der Charakterisierung von genetisch veränderten Mäusen nützlich sind zur Identifizierung von Schlüsselementen in der Leberregeneration. Ausserdem zeigen sie die Eignung von *in vivo* Knock-down mittels siRNA zur Entdeckung von neuen Proteinfunktionen in diesem Prozess. Sie enthüllen die Wichtigkeit von E3 Ligasen und der Ubiquitin Maschinerie bei der Leberregeneration und heben die Relevanz von Ubiquitin-regulierten Prozessen für die Internalisierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und der daraus folgenden Signalprozesse in Hepatozyten hervor. Schliesslich zeigen sie eine essenzielle Funktion des Fgfr Signalweges in der Leberregeneration.