

Hepatische Sternzellaktivierung im septischen Leberversagen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Matthias Gaipf

geboren am 26. Mai 1983 in Jena

Gutachter:

- | | |
|---|--------------------------------------|
| 1. Prof. Dr. med. Michael Bauer, | Universitätsklinikum Jena |
| 2. Prof. Dr. med. Raimund W. Kinne, | Universitätsklinikum Jena |
| 3. Univ.-Prof. Dr. med. Michael Trauner, | Medizinische Universität Wien |

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.11.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VI
1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen, Definition und Pathophysiologie der Sepsis	1
1.2 Das septische Leberversagen	3
1.2.1 Definition, Diagnostik und klinische Präsentation des septischen Leberversagens	3
1.2.2 Therapie des septischen Leberversagens.....	6
1.2.3 Pathophysiologie des septischen Leberversagens	8
1.3 Die Hepatische Sternzelle.....	13
1.4 Die Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen.....	14
1.4.1 Die Initiationsphase der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen.....	15
1.4.2 Die Aufrechterhaltungsphase der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen	16
2. Zielsetzung und Hypothese	20
3. Material und Methoden	21
3.1 Puffer, Medien, Chemikalien.....	21
3.1.1 Medien für die Zellkultur	21
3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien	21
3.2 Antikörper, Zytokine, Stimulantien und Primer.....	22
3.2.1 Antikörper.....	22
3.2.2 Zytokine.....	22
3.2.3 Stimulantien	22
3.2.4 Primer für die quantitative PCR.....	23
3.3 Kits, Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	24
3.3.1 Kits	24
3.3.2 Geräte und Software	25
3.3.3 Verbrauchsmaterialien	26
3.4. Datenbanken	26
3.5 Zellkultivierung der LX-2 Zelllinie.....	26

3.6 Stimulation, RNA-Isolation und Spektrophotometrie der HSC	28
3.6.1 Proinflammatorische Stimulation der HSC	28
3.6.2 RNA-Isolation der HSC	29
3.6.3 Spektrophotometrie.....	30
3.7 Gelelektrophorese.....	30
3.8 cDNA-Synthese, Mikroarray und Primeretablierung	32
3.8.1 cDNA-Synthese	32
3.8.2 Microarray	33
3.8.3 Primeretablierung	34
3.9 quantitative PCR	35
3.10 Wrinkle Assay	36
3.11 Calcium-Imaging von hepatischen Sternzellen.....	39
3.12 Immunhistochemie von LX-2-Zellen und von human Leberschnitten	40
3.12.1 Immunhistochemie von LX-2-Zellen	41
3.12.2 Immunhistochemie von humanen Leberschnitten	42
4. Ergebnisse	44
4.1 Genexpressionsanalysen hepatischer Sternzellen unter proinflammatorischer Stimulation mittels Microarray-Technologie.....	44
4.2 Genexpressionsanalysen humaner hepatischer Sternzellen in verschiedenen experimentellen Sepsismodellen mittels real-time PCR.....	46
4.2.1 Veränderungen der Genexpression des Endothelin-Converting- Enzyme 1 (ECE1)	48
4.2.2 Veränderungen der Genexpression von Endothelin-1 (ET-1).....	48
4.2.3 Veränderungen der Genexpression von Endothelin Typ B Rezeptor (ETBR).....	49
4.2.4 Veränderungen der Genexpression von Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3)	50
4.2.5 Veränderungen der Genexpression von Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP5)	51
4.2.6 Veränderungen der Genexpression von Transforming Growth Factor Alpha (TGFA).....	52
4.2.7 Veränderungen der Genexpression von Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFB1).....	53
4.2.8 Veränderungen der Genexpression von Transforming Growth Factor	

Beta Receptor 2 (TGFB2)	54
4.2.9 Veränderungen der Genexpression von Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 (TIMP2)	55
4.3 Untersuchungen der Sternzellkontraktilität unter proinflammatorischer Stimulation	57
4.3.1 Untersuchungen des Kontraktionsverhaltens von LX-2-Zellen unter Stimulation mit Endothelin-1	57
4.3.2 Untersuchungen des Kontraktionsverhaltens von LX-2-Zellen unter Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen.....	58
4.3.3 Untersuchungen des Kontraktionsverhaltens von LX-2-Zellen unter Stimulation mit Serum septischer Patienten	59
4.4 Ergänzende Untersuchungen zugrunde liegender Mechanismen der Sternzellkontraktilität	61
4.5 Untersuchung zur Expression von Endothelin-1-Rezeptoren auf LX-2-Zellen Leberschnitten	63
 5. Diskussion.....	 66
5.1 Die LX-2-Zelllinie als Modellsystem für hepatische Sternzellen.....	67
5.2 Beeinflusst eine proinflammatorische Stimulation hepatischer Sternzellen <i>in vitro</i> die Expression von Genen, die für eine Transdifferenzierung relevant sind?	69
5.3 Führt eine proinflammatorische Stimulation hepatischer Sternzellen <i>in vitro</i> zu einer gesteigerten Kontraktilität dieser Zellen?	74
5.4 Welchen Einfluss hat das Zytokin TGF- β 1 bei der sepsisinduzierten Kontraktion hepatischer Sternzellen?	78
 6. Schlussfolgerung	 82
 7. Literaturverzeichnis	 84
 8. Anhang.....	 95
8.1 Datenanhang	95
8.2 Curriculum vitae	100
8.3 Danksagung.....	101
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....	102

Abkürzungsverzeichnis

ADAM9	A Disintegrin and Metalloproteinase 9
aSMA	alpha-Smooth Muscle Actin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
COL1A1	Collagen Type 1 Alpha-1
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAPI	4',6'-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
E	PCR-Effizienz
ECE1	Endothelin Converting Enzyme 1
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ET-1	Endothelin-1
ETAR	Endothelin Rezeptor Typ A
ETBR	Endothelin Rezeptor Typ B
FKS	fetales Kälberserum
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
hS	humanes Serum gesunder Probanden
HSA	Humanes Serum-Albumin
HSC	Hepatische Sternzelle (=LX-2-Zelllinie)
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IGFBP	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein
KHB	Krebs-Henseleit-Buffer
LPS	Lipopolysaccharid
MMP	Matrix-Metalloproteinase

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
R	Ratio
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species (Sauerstoffradikale)
rpm	Umdrehungen pro Minute
sS	Serum septischer Patienten
ssRNA	einzelsträngige RNA
TGFA	Transforming Growth Factor Alpha
TGF- β 1	Transforming Growth Factor Beta-1
TGFBR	Transforming Growth Factor Beta-Rezeptor
TIMP2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2
ZM	Zytokinmix

Zusammenfassung

„Hepatische Sternzellaktivierung im septischen Leberversagen“

Hintergrund Hepatische Sternzellen sind entlang der Lebersinusoiden im Disse'schen Raum zwischen Gefäßendothel und Hepatozyten angeordnet. Unter physiologischen Bedingungen tragen sie vor allem zum Erhalt des Gefäßtonus bei und stellen den Hauptspeicherort von Vitamin A im Körper dar. Bei chronisch inflammatorischer Stimulation, zum Beispiel im Rahmen einer alkoholinduzierten Zirrhose oder einer Virushepatitis, kommt es zu einer Transdifferenzierung dieser Zellen in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp und konsekutiv gesteigerter Proliferation, Fibrogenese, Kontraktilität und Chemotaxis. Dies führt wiederum zu einer Verschlechterung der hepatischen Mikrozirkulation sowie zur Einschränkung der Leberfunktion. Die gesteigerte Kontraktilität wird dabei unter anderem durch die vermehrte Expression von alpha smooth muscle actin vermittelt, was einen etablierten Transdifferenzierungsmarker darstellt. Die Akkumulation extrazellulärer Matrix wird primär durch den Fibrosemediator TGF- β 1 vermittelt. Inwiefern es auch unter septischen Bedingungen zu einer Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen mit allen, sich daraus ergebenden Folgen kommt, ist bisher nicht hinreichend geklärt.

Zielstellung In einem *in vitro* Modell hepatischer Sternzellen sollte geklärt werden, ob eine akute proinflammatorische Stimulation wie bei einer Sepsis zu einer Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen führen kann. Hierbei fokussierten wir uns auf im Rahmen der Transdifferenzierung relevante Transkripte. Des Weiteren gingen wir der Frage nach, ob und durch welchen Mechanismus es unter septischen Bedingungen zu einer gesteigerten Kontraktilität hepatischer Sternzellen kommt.

Material und Methoden Alle Versuche wurden *in vitro* an LX-2-Zellen, einer spontan immortalisierten, humanen Sternzelllinie, durchgeführt. Auf Grundlage der Ingenuity® Pathway Analysis Software wurden zunächst die in der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen involvierten Transkripte identifiziert. Mittels Microarray-Technologie wurden schließlich die Transkripte herausgefiltert, die nach Stimulation mit zwei unterschiedlichen proinflammatorischen Regimen (proinflammatorische Zytokine und Serum septischer Patienten) sowie nach TGF- β 1-Stimulation (als etablierten Induktor für eine Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen) signifikant reguliert waren. Daraus wurden

im Rahmen der Fragestellung relevante Transkripte in der quantitativen PCR nach selbem Stimulationsschema auf eine biologisch relevante Regulation hin überprüft.

Mit einem funktionellen Test zur Überprüfung der Sternzellkontraktilität wurde der Einfluß proinflammatorischer Bedingungen überprüft. Ergänzend wurden mittels Calcium-Imaging Untersuchungen zum zugrunde liegenden Kontraktionsmechanismus durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion Bei der Auswertung der Microarray-Daten zeigte sich bei 38 von 62 Transkripten eine signifikante Regulation nach proinflammatorischer Stimulation. Dabei wiesen proinflammatorische Zytokine einen stärkeren Effekt auf als das Serum septischer Patienten, womöglich aufgrund der Beteiligung auch antiinflammatorischer Zytokine bei letzterem. Die PCR zeigte bei vier von neun untersuchten Transkripten eine biologisch relevante Regulation nach proinflammatorischer Stimulation, wobei auch hier das Serum septischer Patienten geringere Effekte zeigte. Dennoch konnte in beiden Fällen gezeigt werden, dass es durch akute proinflammatorische Stimulation zu Genexpressionsveränderungen transdifferenzierungsrelevanter Gene kommt.

In den funktionellen Untersuchungen zeigte sich eine signifikant gesteigerte Kontraktilität nach proinflammatorischer Stimulation mit Serum septischer Patienten. Das antiinflammatorische Zytokin Transforming Growth Factor Beta-1 (TGF- β 1) konnte als wesentlicher Mediator der Kontraktilität identifiziert werden. Die TGF- β 1-vermittelte Kontraktion wird durch calciumunabhängige Signalwege initiiert und war durch Einsatz eines spezifischen TGF- β -Antikörpers weitestgehend antagonisierbar. Endothelin-1, das in der Literatur als potenter Sternzell-Konstriktor beschrieben ist, übte überraschenderweise keinen relevanten Effekt aus. Ursächlich hierfür konnte in immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass die verwendete LX-2-Zelllinie weder ET_A- noch ET_B-Rezeptoren exprimieren.

Schlussfolgerung Eine akute inflammatorische Stimulation der verwendeten humanen hepatischen Sternzelllinie führt auf molekularbiologischer Ebene zu Veränderungen, die für eine Initialisierung der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen auch im Rahmen einer akuten Inflammation sprechen. Zudem bedingt bereits eine Stimulation mit dem Serum septischer Patienten eine Zunahme des Kontraktionsvermögens hepatischer Sternzellen, die TGF- β -vermittelt abläuft. Als möglicher Pathomechanismus für die im Rahmen einer Sepsis auftretende Mikrozirkulationsstörung sollten die gewonnenen Erkenntnisse jedoch noch in weiterführenden Untersuchungen verifiziert werden.

1. Einleitung

1.1 Grundlagen, Definition und Pathophysiologie der Sepsis

Der Begriff der Sepsis unterlag im Laufe der vergangenen Jahrzehnte und mit zunehmendem Verständnis für die Pathophysiologie einem stetigen Wandel. Heute wird die Sepsis definiert als „die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ (Schuster und Werdan 2005). Aus dieser aktuellen Definition der Sepsis wird deutlich, dass man aus pathophysiologischer Sicht zunächst auf die Grundlagen einer lokalen inflammatorischen Reaktion eingehen sollte. Dabei kommt es durch exogene oder endogene Noxen bzw. pathologische Reize zu einer Abwehrreaktion des umliegenden biologisch aktiven Gewebes. Sind pathogene Erreger wie bestimmte Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten Ursache der Entzündungsreaktion, so wirkt hierbei der Kontakt mit einem Fremdantigen als Auslöser der Inflammationskaskade (Cohen 2002). Dabei werden körpereigene immunkompetente Zellen, wie zum Beispiel Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Thrombozyten, mittels zytokinvermittelter Diapedese durch das aktivierte Gefäßendothel an den Herd der Entzündung rekrutiert. Diese Zellen werden durch die Bindung von sogenannten Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) an zelleigenen Toll-like-Rezeptoren (TLR) aktiviert. Dadurch werden sowohl proinflammatorische Zytokine (Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ , IL-1 β , IL-6 u.v.a.) als auch antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10, Transforming Growth Factor- β 1 u.v.a) freigesetzt, welche in komplexer Interaktion das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion wechselseitig beeinflussen (Dinarello 1997). Histologisch kommt es zu einer Dilatation von Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen kapillärem und onkotischem Druck zugunsten des kapillären Druckes sowie eine Steigerung der Permeabilität des Gefäßendothels durch die proinflammatorischen Mediatoren und die von Leukozyten freigesetzten Sauerstoffradikale führen zu einer vermehrten Extravasation von Flüssigkeit in das umliegende Gewebe. Dabei emigrieren auch, wie bereits erwähnt, Plasmaproteine

und Leukozyten und gelangen so an den Inflammationsherd. Die Pathophysiologie ist schematisch nochmals in Abbildung 1 dargestellt.

Klinisch spiegelt sich die lokale Entzündungsreaktion in Form der Entzündungszeichen Rubor (Rötung), Calor (Erwärmung), Dolor (Schmerz), Tumor (Schwellung) und Functio laesa (Funktionseinschränkung) wieder. Dabei werden Rubor und Calor durch die Vasodilatation mit gesteigerter Durchblutung hervorgerufen, Tumor durch die interstitielle Ödembildung aufgrund der Extravasation von Blutplasma und Dolor sowie Functio laesa wirken durch Ruhigstellung protektiv.

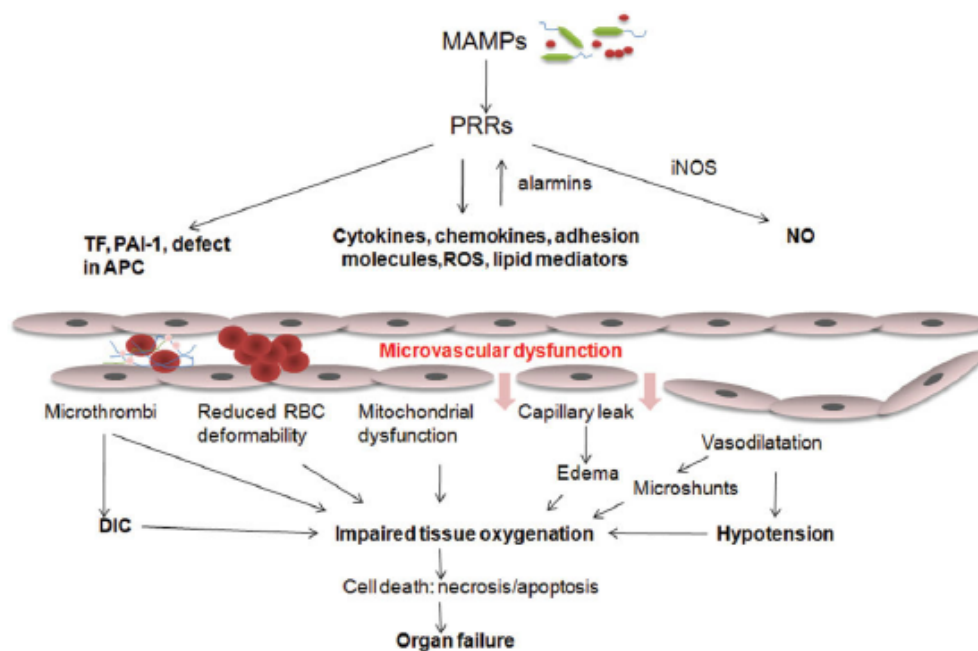


Abb. 1: Pathomechanismus des sepsisinduzierten Organversagens (Gustot et al. 2009)

Sogenannte Microorganism-Associated Molecular Patterns (MAMPs), pathogene Bestandteile von Erregern, werden von Pattern Recognition Receptors (PRRs) erkannt. Dies führt unter anderem zur Ausschüttung von Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und dem Vasodilatator NO. Konsekutiv hat das eine Endotheldysfunktion der Kapillaren mit daraus resultierender Extravasation von Blutplasma und Leukozyten, Ausbildung von Ödemem und Mikrothromben zur Folge. Die Gewebeerfüllung verschlechtert sich dadurch und führt letztendlich bei mangelnden Kompensationsmechanismen zum Untergang der Zellen und in dessen Folge zum Organversagen. APC, aktiviertes Protein C; DIC, disseminierte intravasale Gerinnung; iNOS, induzierbare NO-Synthase; PAI-1, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1; RBC, rote Blutzellen; TF, Tissue Factor.

Kommt es nun zu einer Dysbalance zwischen pathologischem Potential des auslösenden Reizes und Bewältigungsstrategien des biologischen Organismus, breitet sich die zunächst lokal begrenzte Entzündungsreaktion weiter aus und führt im weiteren Verlauf zu einer generalisierten systemischen Inflammationsreaktion, welche auch als Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bezeichnet wird. Immunopathologisch kommt es aufgrund der massiven Anflutung des Pathogens einerseits und der teilweise

überschießenden Reaktion des Organismus andererseits zu wechselnden Phasen von Hyperinflammation und Immunosuppression. Weigand et al. beschreiben dieses Wechselspiel als primäre Dominanz proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF- α , zusammen mit der vermehrten Bildung von schädigenden Sauerstoffradikalen in der Phase der hyperinflammatorischen Reaktion einerseits und einer Dominanz antiinflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10, TGF- β 1, lösliche Zytokinrezeptoren) in der immunsuppressiven Phase andererseits (Weigand et al. 2004).

Klinisch kann sich eine beginnende Generalisierung der Entzündung durch Fieber, Schüttelfrost, Verwirrtheit, Hypotension, Tachykardie, Oligurie oder durch ungeklärte Thrombozytopenie mit vermehrter hämorrhagischer Diathese einerseits und Mikrothromben durch eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) andererseits präsentieren (Pschyrembel 2007). Labordiagnostisch spielen unter anderem eine Erhöhung der Akut-Phase-Proteine, wie zum Beispiel des C-reaktiven Proteins (CRP) oder Fibrinogens, eine Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit sowie des Procalcitonins und eine Linksverschiebung im Differentialblutbild mit Leukozytose oder Leukopenie eine wichtige Rolle.

Je nach Ursache der systemischen Inflammation wird primär zwischen dem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und der Sepsis unterschieden, wobei der SIRS ein pathologischer Reiz, wie zum Beispiel ein Trauma oder eine Verbrennung zugrunde liegt und keine Infektion nachgewiesen werden kann. Die Diagnose der Sepsis bedingt jedoch im Gegensatz dazu den Nachweis eines Infektfokus bzw. den mikrobiologischen Nachweis von im Blut zirkulierenden pathologischen Mikroorganismen mittels Blutkulturen. In der im Anhang beigefügten Tabelle 10 sind die Definitionen von SIRS und der verschiedenen Stadien der Sepsis nochmals zusammengefasst.

1.2 Das septische Leberversagen

1.2.1 Definition, Diagnostik und klinische Präsentation des septischen Leberversagens

Im Rahmen einer schweren Sepsis entwickeln ca. 20-25% der Patienten eine akute Leberfunktionsstörung. Somit ist die Inzidenz im Vergleich zu anderen Organbeteiligungen, wie etwa dem septischen Nierenversagen (30-31%) oder der akuten

respiratorischen Insuffizienz (28-31%) etwas niedriger (Bakker et al. 2004). Dennoch wird die Leber als das zentrale Organ bei schwerer Sepsis mit Multiorganversagen bzw. septischen Schock angesehen. Auch bei schweren Entzündungsreaktionen anderer Ursache, wie zum Beispiel bei Traumata oder Verbrennungen, kann es zu einer akuten Leberfunktionsstörung kommen, die sich klinisch nicht von einem septischen Leberversagen unterscheidet. Andererseits kommt es im Falle eines akuten Leberversagens anderer Genese (virale Hepatitiden, Autoimmunhepatitiden, Paracetamol-Überdosierung) auch gehäuft zu dem Auftreten einer SIRS (Stravitz und Kramer 2009).

Die klassische Definition des Leberversagens im Allgemeinen bezieht sich auf die Trias aus Koagulopathie (INR>1,5), Ikterus und hepatischer Enzephalopathie. Bei vorbestehender chronischer Schädigung der Leber mit akuter Exazerbation spricht man von einem akut-auf-chronischem Leberversagen. Ohne vorbestehende Lebererkrankung wird, je nach Intervall zwischen Auftreten des Ikterus und der hepatischen Enzephalopathie, ein akutes von einem subakuten Leberversagen unterschieden. Dabei wird eine Zeitspanne von 4 Wochen als Grenze zwischen beiden Formen des Leberversagens definiert. Da sich des Weiteren eine Subpopulation von Patienten, bei denen das Intervall zwischen Ikterus und Enzephalopathie maximal 7 Tage betrug, durch eine bessere Prognose hinsichtlich des Überlebens ohne orthotope Lebertransplantation von den anderen Gruppen unterschied, favorisieren einige Autoren eine weitere Klassifikation jener Zeitspanne als hyperakutes Leberversagen (O'Grady et al. 1993). Dennoch zeichnet sich allerdings genau diese Gruppe von Patienten durch eine höhere Inzidenz von Hirnödemen und gehäuft höhergradige Enzephalopathien aus (O'Grady et al. 1993).

Zur klinischen Beurteilung des Leberversagens können verschiedene Scoring-Systeme herangezogen werden, welche in der folgenden Tabelle (Tab. 1) aufgeführt sind:

Tab. 1: Scoring-Systeme zur Evaluation des Leberversagens

Organ-System-Failure-Score	Bilirubinkonzentration >3mg/dl und/oder erhöhte GPT-Konzentration (2x der Norm) und/oder Vorhandensein einer hepatischen Enzephalopathie
Goris-Score	Leberdysfunktion, wenn Bilirubin > 2mg/dl mit begleitender GOT-Konzentrationserhöhung < 50U/l Leberversagen, wenn Bilirubin > 6mg/dl und GOT >50U/l

SOFA-Score (Sequential-Organ-Failure-Assesment-Score)	Grad I:	Bilirubinkonzentration 1,2 – 1,9mg/dl
	Grad II:	Bilirubinkonzentration 2,0 – 5,9mg/dl
	Grad III:	Bilirubinkonzentration 6,0 – 11,9mg/dl
	Grad IV:	Bilirubinkonzentration $\geq 12,0$ mg/dl

Da im Falle des septischen Leberversagens das Bilirubin als klinischer Parameter in der Regel erst ca. 1-3 Wochen nach den ersten Infektionszeichen ansteigt (Pirovino et al. 1989), eignet es sich erst im späteren Verlauf der bereits eingetretenen Leberschädigung zur Beurteilung der Leberfunktion. Mithilfe der funktionellen Testung der Leberfunktion durch die Indozyaningrün-Clearance (ICG-Clearance) konnte gezeigt werden, dass eine Leberfunktionseinschränkung bereits ein sehr frühes Ereignis im Rahmen einer systemischen Inflammation ist (Wang et al. 1991). Der Methode der ICG-Clearance-Bestimmung liegt die rasche selektive Exkretion von ICG zugrunde, wobei der Farbstoff Indozyanin intravenös appliziert und selektiv durch die Leber aus der Blutbahn entfernt wird. Somit stellt die Plasmaverschwinderate (%/min) von Indozyanin ein Maß für die Leberfunktion dar. In einer Studie aus dem Jahr 2002 (Sakka et al. 2002) konnte gezeigt werden, dass die Schwere der Leberfunktionsstörung durch Messung der ICG-Clearance für die Prognose von Patienten mit schwerer Sepsis und Multiorganversagen von äußerst relevanter Bedeutung ist. Bezüglich labordiagnostischer Parameter sollten zur Beurteilung der Leberfunktion und Ausschluss anderer Ursachen neben INR, GOT/GPT und dem Bilirubin außerdem noch ein Blutbild, arterielle Blutgasanalyse und Laktatbestimmung, die γ -Glutamyltransferase, Laktatdehydrogenase, alkalische Phosphatase, Albumin, Cholinesterase, Antithrombin III, Serumelektrolyte und -elektrophorese, Glukose, arterielle Ammoniakkonzentration, Kreatinin/Harnstoff sowie eine Toxikologie und Hepatitisserologie und bei Frauen ein Schwangerschaftstest durchgeführt werden.

Das septische Leberversagen präsentiert sich einerseits anhand der allgemeinen Symptome einer Sepsis, wie sie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt wurden. Aufgrund der Einschränkung der Leberfunktion kommt es zudem zur Cholestase und zum Ikterus. Des Weiteren kommt es zur Akkumulation von Ammoniak, was für die Entwicklung der hepatischen Enzephalopathie mitverantwortlich ist. Hierbei werden 4 Stadien unterschieden. Das Stadium I ist von einer leichten Somnolenz, Antriebsminderung und Feinmotorikstörungen mit sogenanntem „flapping tremor“ gekennzeichnet. Im Stadium II ist die Bewußtseinsminderung bereits erheblich und zusätzlich kommt es meist zu einer

Dysarthrie sowie gesteigertem Muskeltonus. Das dritte Stadium zeichnet sich durch Sopor, stark verminderte Reaktion auf Schmerzreize, Spastiken, Hypo- oder Hyperreflexie, Ataxie, Stuhl- und Harninkontinenz aus. Im schwersten Stadium IV wird auch vom Coma hepaticum gesprochen. Durch die verminderte Syntheseleistung der Leber mit Hypalbuminämie kommt es außerdem zu einer Verminderung des onkotischen Druckes innerhalb der Gefäße, was in Verbindung mit der Endothelzellschädigung im Rahmen der Sepsis zur Extravasation von Flüssigkeit mit Ödemen und Aszites führt. Die verminderte Synthese von Gerinnungsfaktoren kann zu Spontanblutungen, vor allem im Bereich des Gastrointestinaltraktes führen. Des Weiteren können die im Rahmen der Sepsis freigesetzten Zytokine durch die Leberfunktionseinschränkung nur in geringerem Maße abgebaut werden. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von NO, was eine systemische Vasodilatation und teilweise auch Vasoplegie mit vermindertem Ansprechen auf vasopressorische Substanzen zur Folge hat (Cobb und Danner 1996). Das akute Leberversagen kann sich im Sinne eines hepatorenenalen Syndroms auch auf die Nierenfunktion auswirken (Davenport 2010).

1.2.2 Therapie des septischen Leberversagens

Die Therapie des septischen Leberversagens im Speziellen bezieht selbstverständlich die allgemeinen Maßnahmen zur Behandlung einer Sepsis mit ein. Dabei stehen vor allem die Fokussuche des auslösenden inflammatorischen Herdes und die Herdsanierung als kausale Therapie im Vordergrund, um die auslösende Ursache zu beseitigen. Eine frühstmögliche zielgerichtete Einleitung einer adäquaten Volumentherapie führt hierbei zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose (Rivers et al. 2001).

Eine Reihe von vasoaktiven Substanzen stehen darüber hinaus zur Verfügung, um die Blutversorgung im Splanchnikusgebiet zu verbessern. Zwei davon sind Dopamin und Dobutamin. Im Falle von Dopamin wurde in einer Studie (Jakob et al. 2002) bei einer Dosierung von $4\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ eine Steigerung der Splanchnikusdurchblutung gezeigt. Allerdings kam es gleichzeitig auch zu einer Abnahme des lokalen Sauerstoffverbrauchs. Bei Dobutamin kam es bei einer Dosierung von $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ sowohl zur Perfusionssteigerung als auch zu einer Zunahme des Sauerstoffverbrauches im Splanchnikusgebiet (De Backer et al. 1998). Im Gegensatz dazu kommt es bei septischen Patienten unter der Gabe von Adrenalin zu einer Verschlechterung der hepatischen Perfusion verbunden mit einem Anstieg des Laktats, weshalb der Einsatz von Adrenalin nicht empfohlen werden kann (Meier-Hellmann et al. 1997). Noradrenalin führte wiederum

zu einer Zunahme der Splanchnikusperfusion und zu einer Steigerung der Sauerstoffaufnahme bei Patienten mit hyperdynamer Sepsis (Ruokonen et al. 1993) und wird als vasopressorische Substanz der ersten Wahl empfohlen.

Im Rahmen des zunehmenden Leberversagens bei einer Sepsis spielt die Überwachung der Gerinnung aufgrund der eingeschränkten Synthesefunktion der Leber ebenfalls eine wichtige Rolle. Vorrangig ist hierbei die Kontrolle der Gerinnungsparameter, wobei jedoch nicht allein ein Abfall der Gerinnungsparameter, sondern zusätzlich das Auftreten von Blutungskomplikationen eine Faktorensubstitution mit FFPs (fresh frozen plasma) oder anderen Gerinnungssubstanzen nötig machen kann. Grund für die Zurückhaltung hinsichtlich FFPs ist eine höhere Inzidenz eines transfusionsassoziierten Lungenversagens (TRALI) bei septischen Patienten (Gajic et al. 2007). Da die Leber unter anderem durch die Synthese von Komplementfaktoren auch immunmodulatorisch eine wichtige Rolle spielt, kann es bei septischen Leberversagen zu einer immunsuppressiven Funktionslage mit weiterer Verschlechterung hinsichtlich der körpereigenen Sepsisbekämpfung kommen. Daher sollte eine breite systemische Antibiotikagabe in Erwägung gezogen werden.

Wie später in Kapitel 1.2.3 nochmals erläutert, kommt es infolge des anfänglichen Hypermetabolismus der Leber zu einer Hyperglykämie. Durch Erreichen einer normoglykämischen Stoffwechsellage mittels intensivierter Insulintherapie konnte bei beatmeten intensivpflichtigen Patienten eine Mortalitätssenkung von 8% auf 4,6% erreicht werden (van den Berghe et al. 2001). Dennoch wird eine intensivierte Insulintherapie bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock laut den S2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft derzeit nicht empfohlen, da es in einer weiteren Studie (Brunkhorst et al. 2008) weder zu Morbiditäts- noch zu Letalitätssenkungen bei Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischen Schock bei gleichzeitiger Erhöhung der Rate schwerer Hypoglykämien um den Faktor 6 kam.

Ein vielversprechender Ansatz ist die Gabe von N-Acetylcystein. Dabei konnte eine Verbesserung der ICG-Clearance und somit der Leberfunktion gemessen werden (Devlin et al. 1997). Des Weiteren kam es aber auch zu einer Steigerung der Leberperfusion und ebenfalls der Leberfunktion, was mittels MEGX-Test gemessen wurde (Rank et al. 2000). Dennoch wird N-Acetylcystein derzeit nicht als Standardtherapie zur Behandlung der Sepsis empfohlen, da die Datenlage nicht eindeutig ist und widersprüchliche Ergebnisse existieren (Emet et al. 2004, Spapen 2004).

Eine spezielle Komplikation des septischen Leberversagens stellt das hepatorenale Syndrom dar, wobei auch hier die Therapie des zugrunde liegenden Leberversagens an

erster Stelle steht. Ursächlich ist eine verringerte renale Perfusion aufgrund eines ausgeprägten Blutpoolings im Splanchnikusgebiet wesentlich beteiligt. Mithilfe von Terlipressin kann die Vasodilatation im Splanchnikusgebiet aufgehoben werden, wodurch sich die systemische und somit auch die renale Perfusion verbessert. Des Weiteren kann durch eine Albuminsubstitution der kolloidosmotische Druck in den Gefäßen gesteigert werden, was ebenfalls durchblutungsfördernd wirkt. Als letzte Maßnahme stehen diverse Möglichkeiten der Nierenersatzverfahren zur Verfügung (Rajapakse et al. 2009).

Zur Prophylaxe der hepatischen Enzephalopathie als Komplikation des septischen Leberversagens spielt die Verringerung der Ammoniakkonzentration eine wesentliche Rolle. Hierbei kann durch Gabe von Prokinetika die Darmpassagezeit verkürzt, das Substratangebot durch proteinreduzierte Diät verringert oder die Zahl der für die Ammoniaksynthese verantwortlichen Darmbakterien mittels Einläufen und intestinaler Dekontamination durch Antibiotika verringert werden.

Als letzte Möglichkeit der Behandlung eines septischen Leberversagens ist die Leberersatztherapie zu sehen. Dabei richtet sich der Fokus auf die Überbrückung des Leberversagens mittels temporärer Leberersatztherapie und lediglich als letzter Ausweg dient die orthotope Lebertransplantation. Bei der Leberersatztherapie ist vor allem das MARS-Konzept (Molecular Adsorbent Recirculating System) im klinischen Einsatz am weitesten verbreitet. Es beruht, ähnlich wie bei Nierenersatzverfahren, auf dem Prinzip der semipermeablen Membran, wodurch das Blut von Toxinen befreit und somit ein temporäres Leberversagen kompensiert werden kann.

1.2.3 Pathophysiologie des septischen Leberversagens

Faktoren, welche die Leberfunktion im Rahmen einer Sepsis beeinträchtigen, sind multipler Natur. Dabei spielen Veränderungen der Makro- und Mikrozirkulation der Leber, extrahepatische Einflüsse und direkte Schädigungen des Lebergewebes eine wichtige Rolle. Die Leber moduliert aktiv proinflammatorische Kaskaden durch ihre Fähigkeit zur Filterung und Inaktivierung bakterieller Endotoxine und inflammatorischer Zytokine. Außerdem produziert die durch einen inflammatorischen Stimulus aktivierte Leber selbst große Mengen verschiedenster Zytokine, vasoaktiver Substanzen, bioaktiver Lipide und Akut-Phase-Proteine (Dhainaut et al. 2001).

Sowohl im Rahmen einer Hypovolämie, eines kardiogenen Schocks als auch bei den systemischen Auswirkungen einer Sepsis kommt es anfänglich zu einer hypodynamen Phase mit einer kritischen Einschränkung des Sauerstoffangebots. Dabei sind, wie in

tierexperimentellen Versuchen nach Endotoxinapplikation bestätigt wurde, vor allem die zentrolobulären Areale von der Ischämie betroffen (Lenz et al. 1982). In der Regel besteht bei einer Sepsis jedoch überwiegend eine systemische Hyperperfusion, welche sich auch in einer ca. 70%igen Steigerung der Leberdurchblutung und ca. 60%igen Steigerung des Sauerstoffverbrauches im Splanchnikusgebiet zeigt (Dahn et al. 1990). Dennoch kann es aufgrund eines gesteigerten Bedarfs auch in der Phase der Hyperperfusion zu einem Abfall der Sauerstoffkonzentration in einen kritischen Bereich kommen. Dahn et al. führen hierbei vor allem den hepatischen Hypermetabolismus bei einer Sepsis an, der durch eine gesteigerte Sauerstoffextraktion nur insuffizient kompensiert werden kann.

Des Weiteren verursacht eine Sepsis Störungen der Mikrozirkulation. Der Begriff der Mikrozirkulation bezeichnet hierbei die Perfusion in Gefäßen kleiner als 100µm und bezieht sich bei der Leber somit auf die Ebene der Sinusoide der Leberläppchen. Die Leberläppchenperfusion wird hierbei von den Pfortadervenen, Leberarterien, den Sinusoiden und den Zentralvenen gewährleistet und kann ebenso durch alle genannten Abschnitte reguliert werden (McCuskey 2000). Auf prä- und postsinusoidaler Ebene regulieren vor allem glatte Muskelzellen der Gefäße den vaskulären Widerstand, im sinusoidalen Kapillarbett spielen die Endothelzellen der Sinusoide und die hepatischen Sternzellen eine wichtige Rolle (Wunder et al. 2004). Dabei spielt die Transdifferenzierung der HSCs mit vermehrter α -SMA-Expression und gesteigerter Kontraktilität eine entscheidende Rolle (Wunder et al. 2004). Die Mikrozirkulationsstörungen bei einer Sepsis konnten in tierexperimentellen Studien mittels Intravitalmikroskopie als auch beim Menschen durch Untersuchungen der sublingualen Mikrozirkulation bei Patienten mit schwerer Sepsis (De Backer et al. 2002) gewonnen werden, wobei diese Mikrozirkulationsstörung auch indirekt für die Leber angenommen wurde. Außerdem kommt es infolge der proinflammatorischen Veränderungen zur Öffnung hepatischer arteriovenöser Shunts, wodurch die funktionelle Kapillardichte für den Sauerstoffaustausch reduziert wird. Permeabilitätssteigerungen der Endothelzellen, Apoptose selbiger, eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den sinusoidalen Endothelzellen mit konsekutiver Entstehung von Mikrothrombi, die zusätzlich durch eine Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Fibrinablagerungen verstärkt wird, und eine verminderte Deformationsfähigkeit der Erythrozyten tragen ebenfalls zur Verschlechterung der Mikrozirkulation bei (Spronk et al. 2004). Neue Studien haben weitere Erkenntnisse zu Langzeitfolgen schwerkranker Patienten mit Mikrozirkulationsstörungen hervorgebracht. So wurde beispielsweise die Entwicklung einer sekundären sklerosierenden Cholangitis

(SSC) ohne vorher bestehende biliäre oder hepatische Erkrankungen bei intensivpflichtigen Patienten beschrieben (Gelbmann et al. 2007). Diese Sonderform der sklerosierenden Cholangitis (sclerosing cholangitis in critically ill patients – SC-CIP) wurde vor allem bei septischen beatmungspflichtigen Patienten mit hohen endexpiratorischen Beatmungsdrücken und hochdosierten Vasopressoreinsatz beobachtet (Engler et al. 2003, Benninger et al. 2005). Beide zuletzt genannten Faktoren können zu einer Verschlechterung der hepato-planchnischen Hämodynamik führen (Putensen et al. 2006, Krejci et al. 2006). Dabei sind gerade die intrahepatischen Gallengänge aufgrund einer hohen Anzahl ATP-abhängiger Transporter und ihrer ausschließlichen Blutversorgung aus dem peribiliären vaskulären Plexus sehr vulnerabel für eine Ischämie (Ruemmele et al. 2009). Dadurch kommt es zu einer ischämiebedingten Schädigung des Gallengangepithels mit konsekutiver Bildung kollagenhaltiger biliärer Thromben einerseits und zu Strikturen der Gallengänge andererseits (Parry und Muiesan 2003). Die SC-CIP ist durch eine raschere Progression zu einer biliären Zirrhose im Vergleich zu anderen SSC-Formen gekennzeichnet. Ohne Lebertransplantation beträgt hierbei die mittlere Überlebensrate lediglich 13 Monate (Kulaksiz et al. 2008).

Die Pathogenese der infolge der Sepsis meist beobachteten Cholestase kann einerseits wie bereits erwähnt auf der Entwicklung einer SC-CIP beruhen. Andererseits kann sie aber auch mit der durch die proinflammatorischen Zytokine entstehenden Inflammation der Sinusoide und des Portaltraktes per se erklärt werden. Aufgrund einer sepsis-bedingten Störung der gastrointestinalen Schleimhautbarriere kommt es zu einer vermehrten Translokation von Endotoxin aus dem Gastrointestinaltrakt in die Portalvenen (Trauner et al. 1999). Dabei führen diese bakteriellen Endotoxine (LPS) aber auch Exotoxine und IL-1 β zur Stimulation hepatischer Kupffer-Zellen, die daraufhin vor allem LPS-induziert wiederum IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-8 freisetzen und die Inflammation somit aufrecht erhalten (Yang et al. 2000, Luster et al. 1994). Ebenso sind auch Hepatozyten zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine befähigt (Ohlinger et al. 1993). Durch die gesteigerte Expression von ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) auf sinusoidalen Endothelzellen und des komplementären Liganden Mac-1 auf neutrophilen Granulozyten werden ebenfalls vermehrt leberschädigende Zytokine freigesetzt. TNF- α induziert hierbei die Apoptose von Hepatozyten durch Inhibierung von NF κ B-abhängigen antiapoptotischen Signalwegen. Selbiger Mechanismus wird auch bei Endothelin-1 vermutet, welches im Rahmen der Sepsis ebenfalls vermehrt ausgeschüttet wird (Gustot et al. 2009). Des Weiteren hemmen TNF- α und IL-6 die hepatozelluläre Gallensäureaufnahme und deren

kanalikuläre Sekretion durch Downregulation des hepatozellulären Gallensäuretransportes, was die Cholestase weiter verstärkt (Bolder et al. 1997). Durch Hochregulation der sinusoidalen Effluxpumpe MRP3 (multidrug-resistance-associated protein 3) sowie des Heterodimeren OST α -OST β (organic salt transporter α - β) kommt es außerdem zu einem aktiven Umkehr des Gallensäuretransportes zurück in das Blutplasma (Trauner und Boyer 2003, Boyer et al. 2006). Ein weiterer cholestatischer Faktor bei Sepsis stellt NO dar. In hohen Konzentrationen, wie sie im Rahmen einer Sepsis vorherrschen, kommt es aufgrund der verminderten Kontraktionsfähigkeit der Gallengänge, der erhöhten Permeabilität der tight junctions sowie der gestörten kanalikulären Gallesekretion ebenso zu einer Verstärkung der Cholestase (Dufour et al. 1995, Burgstahler und Nathanson 1995, Spirli et al. 2003).

Auf zellphysiologischer Ebene spielen die mitochondriale Dysfunktion und die damit verbundene Störung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer septischen Leberdysfunktion (Kantrow et al. 1997). Dabei wurde eine Schwellung der Mitochondrien beobachtet. Ursächlich hierfür wird NO vermutet, indem es durch eine Aktivierung von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) zur Depletion von NAD⁺/NADH führt (Fink 2001). Ein weiterer wichtiger Aspekt, welcher die mitochondriale Funktion beeinträchtigt, ist die im Rahmen des Hypermetabolismus bei Sepsis auftretende Hyperglykämie (Vanhorebeek et al. 2005). Durch eine Normalisierung der Blutzuckerkonzentration mittels intensivierter Insulintherapie konnte die mitochondriale Funktion verbessert werden (Vanhorebeek et al. 2005).

Diverse im Rahmen einer Sepsis freigesetzte Substanzen beeinflussen die Leberfunktion über verschiedenste Mechanismen. Stickstoffmonoxid (NO), welches in der Leber durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS) produziert werden kann, wird bei Sepsis aufgrund einer Hochregulation der iNOS von Hepatozyten, Kupffer-Zellen und Endothelzellen vermehrt und unkontrolliert freigesetzt (Shieh et al. 2000). Daraus resultierend kommt es zur Hypotension, Vasoplegie mit vermindertem Ansprechen auf vasokonstriktive Substanzen und aufgrund der Vorlastsenkung zu einer Abnahme der Pumpleistung des Herzens (Cobb und Danner 1996).

Ein wichtiger Gegenspieler zu NO stellt das aus 21 Aminosäuren aufgebaute Polypeptid Endothelin-1 dar, welches vor allem in Endothelzellen und hepatischen Sternzellen synthetisiert wird. Über die Endothelin Typ A und B Rezeptoren (ETAR, ETBR) werden bei hepatischen Sternzellen diverse Effekte vermittelt (Abb. 2). So wird zum Beispiel die

Kontraktion aktivierter HSCs über ETAR vermittelt, was wiederum zur Kontraktion hepatischer Sinusoide und somit zu einer Störung des lokalen Blutflusses führt (Bauer et al. 1994, Moore 2004). Bei einer Sepsis kommt es zu einem zunehmenden Ungleichgewicht zwischen NO und Endothelin-1 zugunsten von ET-1, da es durch die proinflammatorische Stimulation zu einer Sensitivierung gegenüber dieses Vasokonstriktors kommt (Baveja et al. 2002). Dies führt wiederum zu einer Verschlechterung der hepatischen Mikrozirkulation. Anhand von Untersuchungen an hepatischen Sternzellen in Zellkultur wurden des Weiteren profibrogenetische Genexpressionsveränderungen durch Stimulation mit Endothelin-1 beschrieben (Koda et al. 2006).

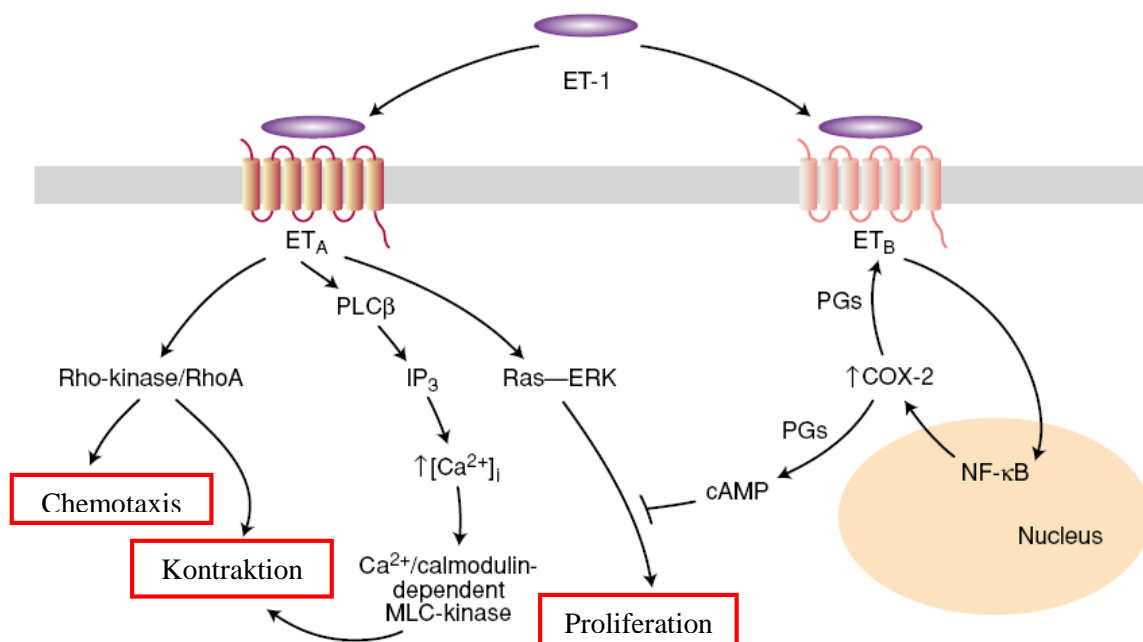


Abb. 2: Darstellung der Signalwege von Endothelin-1 über die Bindung an die Endothelin Typ A und B Rezeptoren (ETAR/ETBR) an hepatischen Sternzellen (modifiziert nach Cambridge University Press 2003, Vol. 5)

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass ET-1 seine kontraktile Effekte via ETAR sowohl über einen calciumabhängigen als auch über einen calciumunabhängigen Mechanismus ausübt. Über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) kommt es zur Ausschüttung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), was wiederum zur Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum führt. Dadurch wird die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Myosin-Leichtkettenkinase (MLC-Kinase) aktiviert und es kommt zur Kontraktion. Über die Aktivierung des G-Protein- gekoppelten Signalweges der Rho-kinase und RhoA durch Bindung von ET-1 an ETAR kommt es calciumunabhängig ebenfalls zur Kontraktion und des Weiteren zur Chemotaxis. Die proliferativen Effekte über ETAR werden mittels des Ras-ERK-Signalweges übertragen. Im Gegensatz dazu wird über die Bindung von ET-1 an ETBR und die Hochregulierung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) über NF-κB mit vermehrter Bildung von Prostaglandinen (PG) und konsekutiver cAMP-Konzentrationserhöhung der Ras-ERK-Signalweg gehemmt, was zu antiproliferativen Effekten führt. Außerdem steigern die Prostaglandine und das cAMP autokrin die Expression von ETBR, was zu einer positiven Rückkopplung führt. Des Weiteren synthetisieren und sekretieren aktivierte HSCs vermehrt ET-1 was ebenfalls eine positive Rückkopplung aller Signalwege darstellt.

1.3 Die Hepatische Sternzelle

Hepatische Sternzellen wurden erstmals im Jahre 1876 von Carl von Kupffer nach Goldchloridfärbung von Leberschnitten beschrieben. Hierbei handelt es sich um einen histochemischen Nachweis reduzierender Substanzen - im Falle der Sternzelle erfolgt dabei die Reduktion von Goldchlorid zu Goldpartikeln durch Vitamin A. Irrtümlich hielt von Kupffer diese Zellen für identisch mit den später ebenfalls von ihm beschriebenen Makrophagen des Sinusoids. Diese Mißinterpretation fand ihren Niederschlag im Begriff der „Kupffer’schen Sternzelle“. Nach heute gültiger Nomenklatur beschreibt der Begriff der „Kupfferzelle“ die ortsständigen Makrophagen der Leber, während die perisinusoidalen mesenchymalen Zellen als „hepatische Sternzellen“ bezeichnet werden. Im Laufe der Jahre waren diverse Bezeichnungen, wie zum Beispiel „Ito-Zellen“, „Lipozyten“ oder „perisinusoidale Zellen“ geläufig. Erst Ende des 20. Jahrhunderts wurde in einer einheitlichen Nomenklatur der Begriff „hepatic stellate cell“ verbindlich festgelegt (Hepatology 1996). Hepatische Sternzellen sind entlang der Lebersinusoiden im sogenannten Disse’schen Raum zwischen dem fenestriertem Endothel der Sinusoiden und den parenchymalen Hepatozyten angeordnet. Sie weisen als morphologisches Charakteristikum eine hohe Dichte perinukleärer Fetttropfen („droplets“) auf und liegen mit ihren bis zu 40 µm langen dendritischen Zellausläufern der abluminalen Oberfläche der Endothelzellen netzartig auf (Wake 1980). Der eigentliche Ursprung von HSCs ist weiterhin nicht eindeutig geklärt. Im ruhenden Zustand exprimieren diese Zellen unter anderem PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) und Leptin – zwei Marker, die für Adipozyten charakteristisch sind (Bataller und Brenner 2005). Andererseits sprechen Marker wie Nestin, GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) und NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) für ein Entstehen aus der Neuralleiste (Geerts 2001) und die Gemeinsamkeit der Desmin- und NCAM-Expression sowie histologische Untersuchungen wiederum für einen submesothelialen Ursprung aus dem Septum transversum (Loo und Wu 2008).

Ein wesentliches Merkmal im ruhenden Zustand beim gesunden Menschen ist ihre Fähigkeit, Retinoide aufzunehmen, in Form von perinukleären Lipidtröpfchen zu speichern und bei Bedarf wieder freizusetzen (Wake 1971). So sind bei Ratten zum Beispiel 90% des gesamten Vitamin A in der Leber gespeichert und dreiviertel davon in hepatischen Sternzellen (Hendriks et al. 1985). Des Weiteren spielen HSCs eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Synthese und Abbau von

extrazellulärer Matrix, die in gesundem Lebergewebe vor allem aus Kollagen Typ III, IV und VI besteht (Friedman et al. 1992). Die Erkenntnis, dass HSCs die Hauptproduzenten von Kollagen und somit von extrazellulärer Matrix sind, stammt aus dem Jahr 1985 (Friedman et al. 1985). In den folgenden Jahren wurde außerdem bekannt, dass HSCs zur Aufrechterhaltung ihres ruhenden Phänotyps eine spezifische Zusammensetzung und Bindung an spezielle Integrine der extrazellulären Matrix benötigen (Bissell und Choun 1988). Fortan gerieten hepatische Sternzellen in den Mittelpunkt experimenteller Studien, die unter anderem die Transdifferenzierung von HSCs von einer ruhenden, Vitamin A speichernden Zelle in einen aktivierten, Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp beschrieben (Gressner 1996) und somit auch die maßgebliche Beteiligung dieser Zellen bei dem chronischen Geschehen der Leberfibrose (Aruin et al. 1987, Casu et al. 1994). Eine weitere Rolle spielen HSCs bei der Sekretion verschiedenster Mediatoren, durch welche sie parakrin, juxtakrin, autokrin oder chemotaktisch diverse Wirkungen auf ihre Umgebung ausüben. So werden zum Beispiel proliferationsfördernde Faktoren, wie zum Beispiel HGF (Hepatocyte Growth Factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), ET-1 und EGF (epidermal growth factor), Neurotrophine, hämatopoetische Wachstumsfaktoren, wie Erythropoetin, und Substanzen der TGF- β -Superfamilie, wie TGF- β 1 und BMP-6 (Bone Morphogenetic Protein-6), von HSCs mit ruhendem Phänotyp exprimiert (Schirmacher et al. 1992, De Bleser et al. 1997, Shao et al. 1999, Maxwell et al. 1994).

1.4 Die Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen

Nach derzeitigem Wissensstand kommt es im Rahmen einer akuten Schädigung des Lebergewebes, wie es bei einer Sepsis der Fall ist, zu einer Entzündungsreaktion mit konsekutiver Nekrose und Apoptose beteiligter Zellen, die entweder durch die Regenerationsfähigkeit der Leber und die Abwehrmechanismen des Körpers folgenlos ausheilt oder im akuten Leberversagen enden kann. Im Gegensatz dazu kommt es bei chronischer Schädigung zu einem Versagen der Regenerationsfähigkeit des parenchymalen Gewebes und die Hepatozyten werden nach und nach durch vermehrte Ablagerungen von extrazellulärer Matrix ersetzt (Bataller und Brenner 2005). Bei diesen Prozessen spielt die Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen von einer ruhenden Zelle, mit der wesentlichen Aufgabe der Vitamin A-Homöostase und Regulation des Gefäßtonus, in

oxygen species) zur Proliferation, der vermehrten Synthese von ECM und zur Ausschüttung der gespeicherten Retinoide (Bilzer et al. 2006). Endothelzellen tragen zur Transdifferenzierung von HSCs bei, indem sie im Serum vorhandenes inaktives, latentes L-TGF-β durch Abspaltung des latency associated peptide (LAP) in seine aktive Form überführen und außerdem Fibronectin sezernieren, was ebenfalls die Transdifferenzierung mit einleitet (Jarnagin et al. 1994). Durch die Freisetzung von EGF, PDGF und ebenfalls TGF-β1 tragen auch Thrombozyten zur Initiationsphase der Transdifferenzierung mit bei (Bachem et al. 1989).

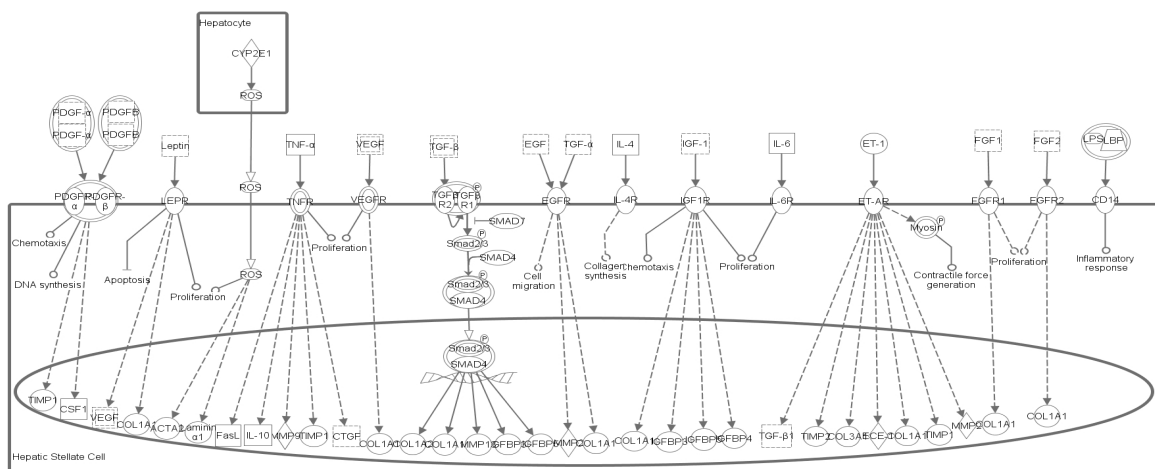


Abb. 4: Signaltransduktionswege in der Initiierungsphase der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen (nach Ingenuity® Pathway Analysis, Stand 04/2010)

1.4.2 Die Aufrechterhaltungsphase der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen

Unter dem Begriff der Aufrechterhaltungsphase der hepatischen Sternzellaktivierung werden diverse Veränderungen zusammengefasst: Proliferation, Kontraktion, Fibrogenese, Chemotaxis, Umbau extrazellulärer Matrix und der Verlust der gespeicherten Retinoide. Während die Initiierungsphase vorwiegend durch parakrine Stimuli eingeleitet wird, sorgen sowohl parakrine als auch autokrine Stimuli für die Aufrechterhaltung der Transdifferenzierung. Abbildung 5 stellt schematisch die Gene, die laut der Pathway-Analyse mittels Ingenuity®-Software bei der Aufrechterhaltungsphase der Transdifferenzierung von HSCs beteiligt sind, dar.

Platelat derived growth factor (PDGF) ist im Wesentlichen für die Proliferation hepatischer Sternzellen verantwortlich (Pinzani 2002). Dabei werden auch die PDGF-Rezeptoren auf

der Zellmembran der HSCs hochreguliert (Wong et al. 1994). Die Signalwege beinhalten hierbei die PI3-Kinase (Lechuga et al. 2006) und die ERK und MAP-Kinase (extracellular signaling-regulated kinase / mitogen-activated protein kinase) (Pinzani und Marra 2001). Neben PDGF üben auch andere Zytokine einen mitogenen Effekt aus. So zum Beispiel VEGF, EGF, Thrombin und TGF- α (Yoshiji et al. 2003, Marra et al. 1995).

Ein entscheidender Aspekt bei der Transdifferenzierung der HSCs stellt die Umwandlung in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp mit der Fähigkeit zur Kontraktion dar, was wiederum den vaskulären Widerstand der Sinusoide erhöht und im chronischen Geschehen der Fibrose entscheidend zur portalen Hypertension beiträgt (Rockey 2001). Dabei kommt es zur Expression des zytoskelettären Proteins α -smooth muscle actin (α -SMA), was diese Zellen zur Kontraktilität befähigt und einen wichtigen Marker für die Transdifferenzierung darstellt (Rockey et al. 1992). Endothelin-1 als potenter Vasokonstriktor und NO stellen hierbei die wichtigsten Gegenspieler mit Einfluss auf die Kontraktilität hepatischer Sternzellen dar. Während die meisten Studien die Meinung vertreten, dass die Kontraktion nach Endothelin-Stimulation calciumvermittelt abläuft (Pinzani et al. 1992, Bataller et al. 2001), zeigten Melton et al., dass eine Erhöhung der Calciumkonzentration weder nötig, noch suffizient zur Kontraktionssteigerung ist und über RhoA/ Rho-Kinase die Kontraktion unabhängig von der Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration abläuft (Melton et al. 2006). Neben Endothelin-1 wird zum Beispiel auch TGF- β 1 ein kontraktiler Effekt auf HSCs nachgesagt (Kharbanda et al. 2004).

Die profibrotischen Eigenschaften von HSCs sind einerseits durch die vermehrte Zellzahl, andererseits und vor allem jedoch auf die exzessiv gesteigerte Produktion extrazellulärer Matrix durch die hepatischen Sternzellen begründet. Dabei erhöht sich die Gesamtmenge der ECM um ein drei- bis fünffaches und qualitativ ändert sich die Zusammensetzung von einer membranartigen Basismatrix hin zu einem interstitiellen Matrixtyp mit fibrillenformenden Kollagen, vor allem Kollagen Typ I (Friedman 2000). Wesentliches profibrotisches Zytokin ist hierbei TGF- β 1, was sowohl autokrin von HSCs als auch parakrin, vor allem von Kupffer-Zellen, nach proinflammatorischen Stimulus vermehrt sekretiert wird und die Ausschüttung von Kollagenen Typ I, II und IV durch HSCs um ein vielfaches steigert (Inagaki und Okazaki 2007). TGF- β 1 bindet dabei an die membranständigen TGF- β -Rezeptoren Typ I und II, wodurch wiederum transmembrane Serin/Threonin-Kinasen aktiviert werden, diese durch Phosphorylierung die sogenannten Smad-Proteine, vor allem Smad 2 und 3, aktivieren und somit als Smad-Komplex nach nukleärer Translokation die Kollagen-Expression induzieren (Dooley et al. 2001). Des

Weiteren werden den durch Lipidperoxidation freigesetzten ROS eine profibrotische Wirkung zugesprochen (Svegliati Baroni et al. 1998) und ebenso dem Zytokin CTGF (Rachfal und Brigstock 2003).

Durch die Fähigkeit der Chemotaxis können HSCs einerseits an den lokalen Ort der Schädigung gelangen und andererseits auch immunmodulatorische Leukozyten an diesen Ort rekrutieren. Die Migration hepatischer Sternzellen wird über die Zytokine PDGF und MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) vermittelt (Marra et al. 1999, Kinnman et al. 2000). Ihre Fähigkeit, Leukozyten zu rekrutieren, ist ebenfalls MCP-1 vermittelt. In dem Phänomen der Chemotaxis liegt auch die Begründung, warum HSCs entlang inflammatorischer Septen akkumulieren.

Neben der Fibrogenese spielt auch der Um- und Abbau von ECM eine entscheidende Rolle, da ein gesteigerter Abbau der normalen hepatischen Basismatrix dazu führt, dass diese vermehrt durch fibrotische Matrix ersetzt wird (Benyon und Arthur 2001). Bei diesem Abbau von ECM spielen Matrix-Metalloproteinasen eine entscheidende Rolle. Dabei sind transdifferenzierte HSCs vor allem für die gesteigerte Synthese von MMP-2, MMP-9 und Stromelysin verantwortlich (Milani et al. 1994, Vyas et al. 1995, Han et al. 2007). Im Hinblick auf das chronische Geschehen der Leberfibrose ist die gesteigerte Expression von MMP-2 charakteristisch (Benyon et al. 1996). Jedoch ist vor allem MMP-1 zur Degradation von Kollagen Typ I als wesentlicher Bestandteil fibrotischer ECM fähig. Diese Proteinase wird jedoch nur geringfügig synthetisiert, obwohl HSCs mRNA von MMP-1 exprimieren (Milani et al. 1994). Neben der gesteigerten Expression von MMPs werden jedoch auch ihre Gegenspieler, die tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs), von HSCs vermehrt exprimiert. Dabei werden TIMP-1 und TIMP-2 von hepatischen Sternzellen synthetisiert (Arthur 2000). Eine gesteigerte Synthese dieser Kollagenaseinhibitoren führt zu einer weiteren Akkumulation extrazellulärer Matrix. Des Weiteren übt TIMP-1 auch einen antiapoptotischen Effekt aus (Murphy et al. 2002), wodurch sich die Anzahl der profibrotischen HSCs weiter erhöht.

Wie bereits auch schon während der Initiation der Transdifferenzierung verlieren HSCs auch in der Aufrechterhaltungsphase weiterhin ihre, für den ruhenden Zustand typischen, perinukleären Retinoidtröpfchen. Ob dieser Verlust der in Form von Retinylestern gespeicherten Retinoide jedoch für die Transdifferenzierung unabdingbar oder lediglich ein begleitendes Phänomen ist, ist noch nicht endgültig geklärt.

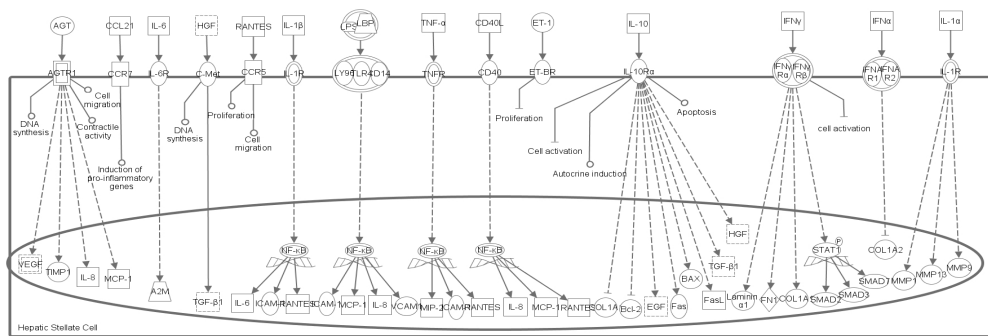


Abb. 5: Signaltransduktionswege in der Aufrechterhaltungsphase der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen (nach Ingenuity® Pathway Analysis, Stand 04/2010)

2. Zielsetzung und Hypothese

Im Rahmen einer chronisch inflammatorischen Stimulation der Leber, wie dies bei der Leberfibrose durch unterschiedlichste Noxen der Fall ist, ist hinlänglich bekannt, dass hierbei hepatische Sternzellen und deren Transdifferenzierung in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp eine entscheidende Rolle spielen. Ob dieser Prozess der Transdifferenzierung von HSCs jedoch auch bereits bei einer akuten inflammatorischen Reaktion im Rahmen einer Sepsis initialisiert wird und bei der Pathogenese des septischen Leberversagens von potentieller Bedeutung sein könnte, ist bis heute noch nicht hinreichend geklärt.

Hepatische Sternzellen gelten zudem als Effektor der hepatischen Mikrozirkulation, die bei einer Sepsis stark kompromittiert ist. Im Rahmen einer Sepsis kommt es zu einer Freisetzung einer Vielzahl an Mediatoren wie zum Beispiel Endothelin-1 oder TGF- β 1, die zum Teil einen konstriktorischen Effekt auf hepatische Sternzellen aufweisen. In der vorliegenden Dissertation wurde daher die folgende Arbeitshypothese generiert:

Eine akute Inflammation im Rahmen einer Sepsis führt zu einer Transdifferenzierung humaner hepatischer Sternzellen, die sich auf molekularbiologischer Ebene widerspiegelt. Zudem bedingt bereits die Inflammation eine Zunahme der Sternzellkontraktilität.

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese wurden die folgenden Fragestellungen mittels verschiedener Experimente erörtert:

- (1) Beeinflusst eine proinflammatorische Stimulation hepatischer Sternzellen *in vitro* die Expression von Genen, die für eine Transdifferenzierung relevant sind?
- (2) Führt darüber hinaus eine proinflammatorische Stimulation hepatischer Sternzellen *in vitro* zu einer gesteigerten Kontraktilität dieser Zellen?

Im Verlauf der Arbeit ergaben sich zudem zwei weitere Fragestellungen, die beantwortet werden sollten:

- (3) Warum zeigte Endothelin-1 bei der verwendeten Sternzelllinie keinen kontraktilen Effekt?
- (4) Welchen Einfluss hat das Zytokin TGF- β 1 bei der sepsisinduzierten Kontraktion hepatischer Sternzellen?

3. Material und Methoden

3.1 Puffer, Medien, Chemikalien

3.1.1 Medien für die Zellkultur

Material	Hersteller
DMEM + Glutamax-I	Gibco®
HBSS (ohne CaCl ₂ , MgCl ₂)	Gibco®
FKS, hitzeinaktiviert	PAA Laboratories
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories

3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

BSA	Sigma-Aldrich
DMSO 99,8%	Carl Roth GmbH
Essigsäure 96%	Carl Roth GmbH
Ethanol 96%	Serva Electrophoresis GmbH
Human-Albumin Kabi 20%	Octapharma GmbH
Methanol 99%	Carl Roth GmbH
Oregon Green 488 BAPTA-1, AM	Invitrogen™
PBS 10x	PAA Laboratories
Rat Tail Collagen Type 1	BD Biosciences
RLT Lysepuffer	Qiagen GmbH
Triton X-100	Sigma-Aldrich
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics GmbH

3.2 Antikörper, Zytokine, Stimulantien und Primer

3.2.1 Antikörper

Cy3 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
Cy3 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
Cy5 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
Cy5 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
DAPI	Roche Diagnostics
Monoclonal Mouse Anti-human α Smooth Muscle Actin Antibody, Clone 1A4	Dako
Normal Goat IgG	R&D Systems
Polyclonal Goat Anti-human LAP (TGF- β 1) Antibody	R&D Systems
Polyclonal Rabbit Anti-human Endothelin A Receptor Antibody	Abcam [®]
Polyclonal Rabbit Anti-human Endothelin B Receptor Antibody	Abcam [®]

3.2.2 Zytokine

Endothelin-1	Sigma-Aldrich
Interferon- γ , Human, rekombinant, E. Coli	Calbiochem [®]
Interleukin-1 β , Human, rekombinant, E. Coli	Calbiochem [®]
LPS (Endotoxin B4)	Calbiochem [®]
TGF- β 1	Calbiochem [®]
TNF- α , Human, rekombinant, E. Coli	Calbiochem [®]

3.2.3 Stimulantien

Stimulanz	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Endothelin-1	100nM	Sigma-Aldrich
FKS, hitzeinaktiviert	10%	PAA Laboratories
TGF- β 1	2ng/ml	Calbiochem [®]

TGF- β 1-Antikörper, human	200 μ g/ml	R&D Systems
Serum septischer Patienten	5%	
Kontrollserum, human	5%	

Sowohl das Serum septischer Patienten als auch das humane Kontrollserum gesunder Probanden besteht aus gepooltem Serum mehrerer Patienten bzw. Probanden. Im Fall des Serums septischer Patienten wurde das Serum von fünf Patienten, die alle die Kriterien einer schweren Sepsis mit Multiorganversagen erfüllten, binnen der ersten 24 Stunden nach Erstdiagnose gewonnen. Das humane Kontrollserum wurde ebenfalls aus fünf gesunden Probanden blutgruppenunabhängig entnommen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Die Vorgehensweise zur Stimulation der LX-2-Zellen wird in Kapitel 3.5 beschrieben. Der verwendete Zytokinmix wurde anhand von Literaturvorgaben (Ceppi et al. 1996) ausgewählt und die Konzentrationen in diversen Vorversuchen an die vorherrschenden Bedingungen einer Sepsis minimal modifiziert. Der Zytokinmix wurde aus den unter Kapitel 3.2.2 genannten Zytokinen auf folgende Konzentrationen eingestellt:

Interferon- γ	10ng/ml
Interleukin-1 β	10ng/ml
LPS (Endotoxin B4)	100ng/ml
TNF- α	50ng/ml

3.2.4 Primer für die quantitative PCR

Für die quantitative PCR wurden die in der folgenden Tabelle (Tab. 2) aufgelisteten Primer verwendet:

Tab. 2: Datentabelle der verwendeten Primer

Primer	Sequenz 5' – 3'	PCR-Produktgröße (bp)	Hersteller
ADAM9	fw: cttctggctcttcttctcta rv: agtgagggaactatataaagg	79	Biomers [®]
COL1A1	fw: tccgacctctctcctctgaa rv: agggggaaaaactgctttgt	133	Biomers [®]
ECE1	fw: gctccctctccaattccaag rv: gatgggggtctcgtcctc	152	Biomers [®]

EGFR	fw: tggaagattggaagattcagc rv: gataaattggatgggggtgga	143	Biomers [®]
ET-1	fw: tgtgctagccaaaagacaaga rv: tgataaatacacttttccaagc	143	Biomers [®]
ETAR	fw: tgctggttcctcttcattt rv: tgaattcatggttgccaagt	135	Biomers [®]
ETBR	fw: cctgcattaaccaattgct rv: tgcttttccccaaggactg	122	Biomers [®]
HPRT	fw: cctggcgtcgtcattagtgat rv: agacgttcagtctgtccataa	131	MWG Biotech [®]
IGF1	fw: cccaaccagcccttattat rv: ccccatctcacaaaaggaa	145	Biomers [®]
IGFBP3	fw: acaactgtggccatgactga rv: cctgactttgccagacctc	93	Biomers [®]
IGFBP5	fw: atccttttgatggggaaag rv: tgtgctatccatgtgggcta	157	Biomers [®]
TGFA	fw: cttcaagccaggttttcgag rv: ggcaggttgaagagatcaa	144	Biomers [®]
TGFB1	fw: aggactgcggatctctgtgt rv: gggcaaaggaatagtgcaga	124	Biomers [®]
TGFBR1	fw: agtctcctgggggtgaaaac rv: tcctaaatccagccttcaa	155	Biomers [®]
TGFBR2	fw: cagtgtggctgcagtagcat rv: tgctgataaccagaagtgaga	174	Biomers [®]
TIMP2	fw: tgatccacacagttgtct rv: aaacgatgccaatggagag	108	Biomers [®]

3.3 Kits, Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.3.1 Kits

RNA-Isolation	RNeasy [®] Mini Kit, Qiagen
Gelelektrophorese	Experion [™] StdSens Kit, Bio-Rad Laboratories

cDNA-Synthese	RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas
cRNA-Synthese	Illumina® Total Prep RNA Amplification Kit, Illumina®
Mikroarray	Illumina® Whole-Genome Gen Expression Direct Hybridization Kit
PCR-Aufreinigung	MinElute PCR Purification Kit, Qiagen
quantitative PCR	Brilliant® II SYBR® Green qPCR Master Mix, Stratagene®

3.3.2 Geräte und Software

Brutschrank Hera Cell, Heraeus Instruments

Carl Zeiss LSM Image Browser® Version 4,2,0,121

CCD Kamera (Herolab Systems)

Experion™ Automated Electrophoresis Station, Bio-Rad Laboratories

Experion™ Priming Station, Bio-Rad Laboratories

Experion™ Vortex Station II, Bio-Rad Laboratories

iScan Array Scanner, Illumina®

Kryostat Leica CM 3050S, Leica Microsystems

Laminarbox Herasafe, Heraeus Instruments

Microsoft Excel 2003, SPSS 13.0

MWG-Reader SOFTmax Pro Version 3.0

Nanodrop® ND1000 Spektrophotometer mit der Software Nanodrop 3.1.2

Präzisionswaage, Satorius AG

PTC-200 Peltrier Thermal Cycler, MJ Research Inc.

QIAcube, Qiagen GmbH

Rotor-Gene Q, Qiagen GmbH

ThermoMax Microplate Reader, MWG-BioTech GmbH

Thermomixer comfort, Eppendorf

Vortex Genie 2™, Scientific Industries

Wasserbad, GFL mbH

Zeiss Inversmikroskop Axiovert 25, Carl Zeiss GmbH

Zeiss Laser Scanning Mikroskop LSM 510 Meta®, Carl Zeiss GmbH

Zeiss Steriomikroskop Stemi SV6 mit der Software AxioVision 4.6.3, Carl Zeiss GmbH

Zentrifuge 5415D und 5810R, Eppendorf

3.3.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 18x18mm, 12mm rund	Menzel GmbH
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH
Objektträger	Menzel GmbH
Zellkulturflaschen 25cm ² , 75cm ²	BD Falcon™
Zellkulturplatten (6-Well, 24-Well, 96-Well)	Greiner Bio-One GmbH

3.4. Datenbanken

Genomdatenbanken	www.ensembl.org www.ncbi.nlm.nih.gov/./UniGene/
Literaturrecherche	www.pubmed.com
Pathwayanalyse	www.ingenuity.com
Primerblast	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
Primerdesign	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

3.5 Zellkultivierung der LX-2 Zelllinie

Die bei -180°C kryokonservierte LX-2-Zelllinie wurde im Rahmen einer Kooperation von Dr. Scott L. Friedman von der Mount Sinai School of Medicine (New York, USA) zur Verfügung gestellt. Auf die genaueren Spezifikationen dieser Zelllinie wird im Rahmen der Diskussion in Kapitel 5.1 nochmals explizit eingegangen. Das Medium zur Kryokonservierung bestand aus 40% FKS, 20% DMSO und 40% DMEM-Zellkulturmedium. Die LX-2-Aliquots wurden bei 37°C im Wasserbad rasch aufgetaut und in 5ml vorgewärmten DMEM-Ausgangsmedium aufgenommen. Danach wurde das Zell-Medium-Gemisch bei 4°C und 400G für 4 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Zell-Pellet in 6ml DMEM-Standardmedium (DMEM + Glutamax 1x + 1% Streptomycin/ Penicillin + 1% hitzeinaktiviertes FKS) resuspendiert und in eine 25cm²-Zellkulturflasche überführt. Um eventuelle DMSO-Rückstände zu entfernen wurde nach

24 Stunden das Medium abgesaugt, mit HBSS gewaschen und 6ml neues DMEM-Standardmedium zugeführt.

Die Langzeitinkubation der hepatischen Sternzellen erfolgte in 75cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre, wobei in Abhängigkeit von der Konfluenz, jedoch spätestens alle drei Tage mit HBSS gewaschen wurde und ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die Zellen wurden bei einer lichtmikroskopisch kontrollierten Konfluenz von ca. 70% durch Inkubation mit 3ml Trypsin (bei 25cm²-Zellkulturflaschen 1ml Trypsin) für drei Minuten bei 37°C vom Boden gelöst, mit DMEM-Standardmedium verdünnt und je nach Bedarf 1:2, 1:3, 1:4 oder 1:6 gesplittet bzw. nach Zellzählung durch eine Neubauer Zellzählkammer je nach Versuchsanordnung in gewünschter Konzentration auf 6- oder 24-Well-Platten verteilt.

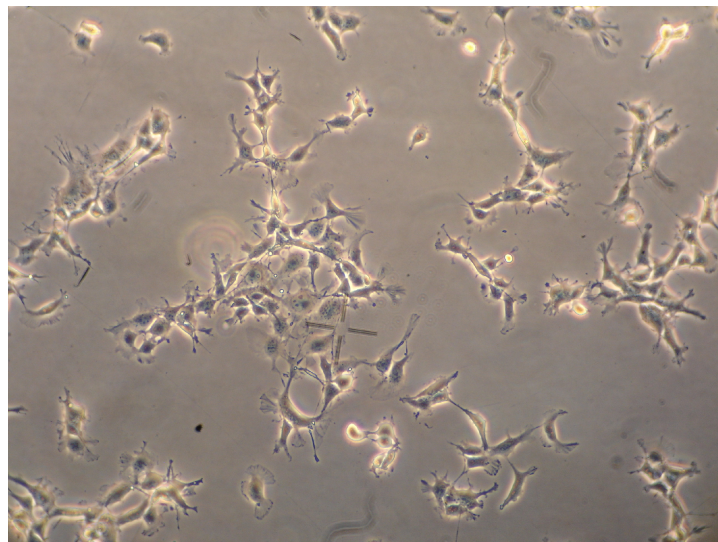


Abb. 6a: Hepatische Sternzellen (LX-2-Zelllinie) in Kultur im Phasenkontrastmikroskop bei 10facher Vergrößerung.

LX-2-Zellen gelten bereits als teilaktivierte Sternzellen (Xu et al. 2005). Um auszuschließen, dass eine *in vitro* Kultivierung wie bei primären Sternzellen zu einer weiteren Transdifferenzierung führt, wurden im Rahmen von Vorversuchen der Einfluß der Passagierung auf den alpha smooth muscle actin (aSMA) Gehalt, der als Korrelat einer Transdifferenzierung gilt, untersucht. Hierfür wurde aSMA in frühen (Passage 4) als auch späteren (Passage 15) Zellpassagen immunhistochemisch angefärbt. Wie in Abbildung 6b zu sehen, zeigten beide Zellpassagen eine aSMA-Expression, die jedoch in späteren Passagen deutlich stärker ausfällt. Entsprechend wurden für alle Versuche Zellen verwendet, die weniger als zwölf mal passagiert wurden.

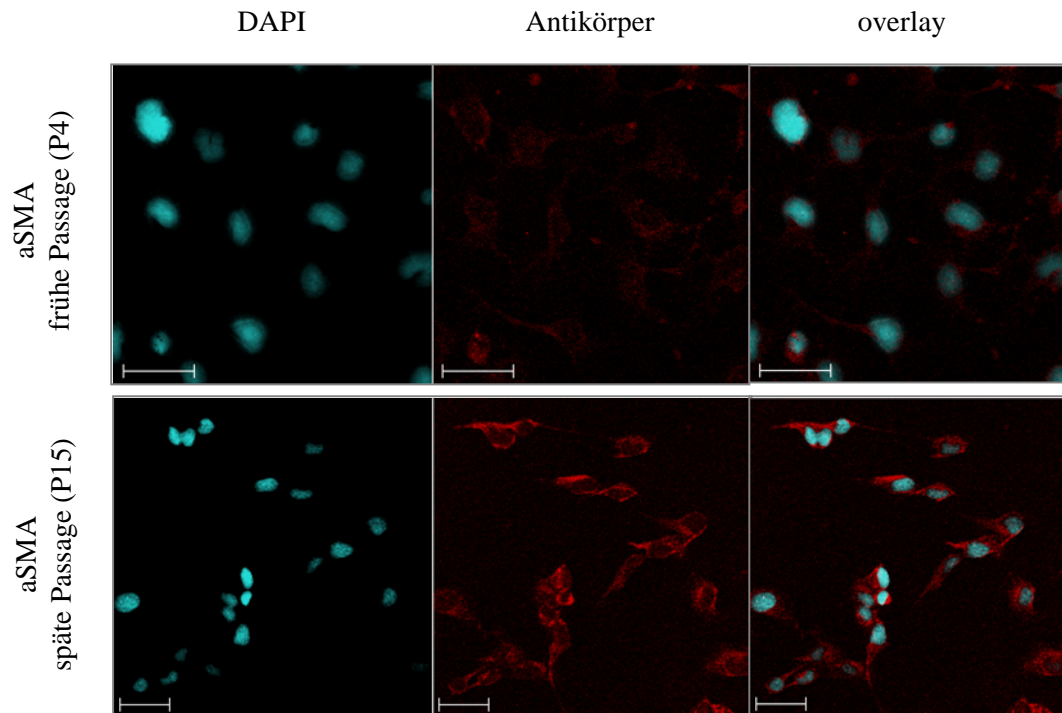


Abb. 6b: Immunhistochemische Darstellung der aSMA-Expression von LX-2-Zellen bei früher und fortgeschrittener Zellpassagierung.

3.6 Stimulation, RNA-Isolation und Spektrophotometrie der HSC

3.6.1 Proinflammatorische Stimulation der HSC

Die Stimulation der HSC erfolgte in 6-Well-Zellkulturplatten. Zur Standardisierung wurden die Zellzahl je Milliliter mittels Neubauer Zählkammer ermittelt und einheitlich 5×10^5 Zellen/ml je Well ausgesetzt. Es folgte eine Adhäsionsphase von 15 Stunden über Nacht.

Vor der eigentlichen Stimulation wurde das DMEM-Standardmedium abgesaugt, die Zellen mit HBSS gewaschen um Mediumrückstände und Zelldetritus zu entfernen und 1ml DMEM mit 0,1% Humanalbumin pro Well dazugegeben und für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C äquilibriert. Anschließend erfolgte die Stimulation nach folgendem Schema:

Substanz	Konzentration	Stimulationsdauer
Keine (unstimulierte Kontrolle)		6h und 24h
humanes Kontrollserum	5%	6h und 24h
Serum septischer Patienten	5%	6h und 24h
Zytokinmix	(siehe 3.2.3)	6h und 24h
TGF- β 1 (Positivkontrolle)	2ng/ml	24h

Es wurden zwei verschiedene proinflammatorische Stimulationsschemata verwendet. Mithilfe des Zytokinmixes konnte auf ein in der Literatur etabliertes Verfahren zur proinflammatorischen Stimulation zurückgegriffen werden (Ceppi et al. 1996) und gezielt jene Veränderungen aufgezeigt werden, die auf den Einfluss jener proinflammatorischen Zytokine zurückzuführen sind. Die zusätzliche proinflammatorische Stimulation mit dem Serum septischer Patienten bietet wiederum die Möglichkeit, alle Pathomechanismen im Rahmen einer Sepsis im *in vitro*-Modell nachzuvollziehen und somit einen umfassenderen und realitätsnäheren Einblick. Die verwendete Konzentration bezüglich des Serums septischer Patienten wurde hierbei in diversen Vorversuchen als die am besten geeignete ermittelt. Bei höheren Konzentrationen sank die Anzahl vitaler Zellen dramatisch. Somit stellte eine 5%ige Konzentration den besten Kompromiss aus Erzielung eines nachweisbaren Effektes und relativ geringer Apoptoserate dar. Als sogenannte Positivkontrolle wurde TGF- β 1 verwendet. TGF- β 1 hat eine Schlüsselfunktion bei der Initiierung der Transdifferenzierung inne und wurde in der verwendeten Konzentration bzw. Stimulationsdauer wiederholt in Experimenten verwendet, um Sternzellen *in vitro* zur Transdifferenzierung anzuregen (z.B. Czaja et al. 1989, Bachem et al. 1992, Desmouliere et al. 1993, Shi et al. 2006).

3.6.2 RNA-Isolation der HSC

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Medium abgesaugt, nochmals mit HBSS gewaschen und anschließend die Zellen durch Zugabe von 600 μ l RLT-Puffer pro Well für drei Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Das Zelllysate wurde in 2ml Eppendorf Safe-Lock-Tubes aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur RNA-Isolation bei -80°C aufbewahrt.

Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) verwendet. Dafür wurde der QIAcube nach Herstellerangaben mit den auf Eis gelegten Proben beladen und nach

folgender Protokollauswahl isoliert: RNA → RNeasy Mini → Animal tissues and cells → Large samples → Elution volume: 30µl.

3.6.3 Spektrophotometrie

Die RNA-Konzentrationen der Proben wurden spektrophotometrisch durch den Nanodrop 1000[®] gemessen. Dazu wurde je Probe ein Volumen von 1µl auf die Messeinheit pipettiert. Der Nanodrop misst das Absorptionsspektrum der Probe im Bereich von 220nm bis 350nm und berechnet anhand der optischen Dichte bei 260nm und dem Extinktionskoeffizienten für RNA ($40L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) die jeweilige RNA-Konzentration. Durch Berechnung des Quotienten aus optischer Dichte bei 260nm und 230nm (OD_{260}/OD_{230}) wurden die Proben auf niedermolekulare Verunreinigungen überprüft. Für die Weiterverarbeitung der Proben wurden nur jene mit einem Quotienten von 1,8 bis 2,5 verwendet. Da aromatische Aminosäuren Licht mit der Wellenlänge von 280nm absorbieren, konnte anhand des Quotienten OD_{260}/OD_{280} ein Maß für Proteinverunreinigungen ermittelt werden. Alle verwendeten Proben wiesen einen Wert $> 1,8$ auf.

3.7 Gelelektrophorese

Die isolierte RNA wurde anfangs durch eine denaturierende Gelelektrophorese, später durch eine automatisierte Elektrophorese mittels Experion[™] Automated Electrophoresis Station (Bio-Rad Laboratories) auf ihre Reinheit und Integrität überprüft. Bei der denaturierenden Gelelektrophorese wurden dazu 0,48g Agarose 1000 (Invitrogen[®]) in 36ml demineralisiertem Wasser durch Erwärmen gelöst. Anschließend wurden 4ml 10xFA-Gelpuffer, 1,8ml 37%iges Formaldehyd und 1µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es zur Äquilibrierung für 1h in 1xFA-Gelpuffer gelegt. Nun wurden von der isolierten RNA je 1µl mit 5µl RNA-Ladepuffer gemischt und für 5min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert und in die Gelkammern pipettiert. Die Gelelektrophorese lief bei 66V für 2h. Das Gel wurde danach durch eine CCD Kamera (Herolab Systems) fotografiert (Abb. 7).

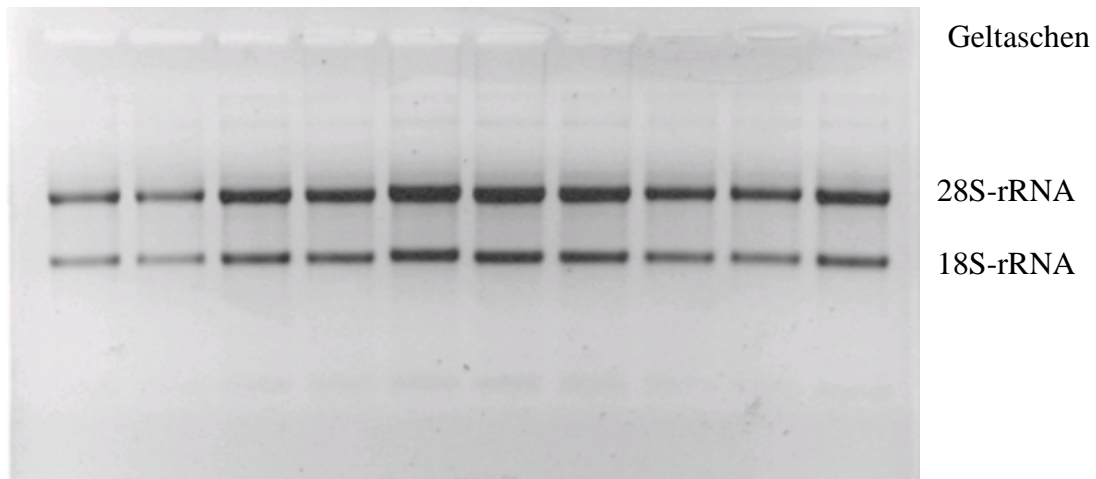


Abb. 7: Qualitätskontrolle der isolierten Gesamt-RNA mittels denaturierender Gelelektrophorese

Die zwei prominenten dunklen Banden stellen die 18S- (untere Bande) und 28S-rRNA (obere Bande) Untereinheiten dar. Aufgrund der geringen Nachweisgrenze der Gelelektrophorese ist die mRNA nicht darstellbar. Aus der Intaktheit der Banden der beiden rRNA-Untereinheiten ist jedoch zu schließen, dass die mRNA ebenfalls intakt ist. Des Weiteren kann anhand des Bildes eine Verunreinigung durch hochmolekulare genomische DNA ausgeschlossen werden.

Die automatisierte Elektrophorese mittels Experion™ wurde für die mit humanen Kontrollserum und Serum septischer Patienten stimulierten Proben durchgeführt. Zunächst wurden 65µl der Gellösung (G-Lösung) mit 1µl RNA Stain versetzt (GS-Lösung). Anschließend wurden 1,7µl jeder Proben-RNA mit 1,3µl RNA-Ladder versehen und bei 70°C für 2min denaturiert. Danach wurden 9µl GS-Lösung auf den Standard Sens Chip, welcher Kammern für jeweils zwölf Proben, die G- und GS-Lösung und die RNA-Ladder enthält, pipettiert und durch die Experion™ Priming Station geprimt. Dabei wird die GS-Lösung blasenfrei in die unter den Kammern befindlichen Mikrokanäle im Quarzglas gepresst. Nun werden jeweils 5µl Ladepuffer und 1µl der Proben und des RNA-Ladders in die jeweiligen Wells pipettiert. Nach einminütigem vortexen wurde der Chip in die Messstation gestellt. Die RNA-Ladder und die einzelnen Proben liefen nun sequenziell durch die Mikrokanäle im Quarzglas. Dabei wurde die Laufzeit der 18S- und 28S-rRNA und deren Fluoreszenz durch einen Laser gemessen und graphisch dargestellt (siehe Abb.8A). Des Weiteren wird anhand der Fluoreszenzwerte ein virtuelles Gelbild erzeugt, welches die 18S- und 28S-Untereinheiten in gewohnter Form darstellt (siehe Abb. 8B).

Durch die Berechnung des RNA Quality Indicator (RQI) wurde ein weiteres Maß zur Qualitätssicherung erhoben. Auf einer Skala von 1 bis 10 betragen die Werte aller Proben 10,0 und deuten somit auf äußerst intakte mRNA hin.

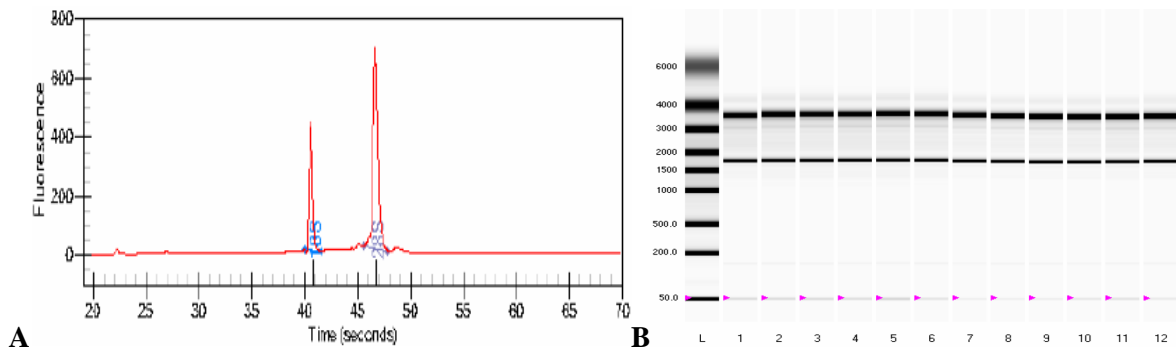


Abb. 8: Darstellung der Fluoreszenzintensität der 18S- und 28S-rRNA Untereinheiten im zeitlichen Verlauf (A) und virtuelles Gelbild der Experion™ Elektrophorese-Station (B).

3.8 cDNA-Synthese, Mikroarray und Primeretablierung

3.8.1 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) verwendet. Zur Standardisierung wurde die im Nanodrop gemessene RNA-Konzentration durch Verdünnung mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 10µl bei allen Proben auf 100ng/µl eingestellt. Tabelle 3 zeigt das Pipettierschema für die cDNA-Synthese bis zur Denaturierung der RNA.

Tab. 3: Substanzen für die cDNA-Synthese bis zur Denaturierung der RNA:

RNA (1µg)	10,00µl
Oligo 18 Primer Mix	1,00µl
dNTP Mix 10mM	1,00µl
Gesamtvolumen	12,00µl

Nach dem Zupipettieren aller Substanzen wurde die RNA bei 65°C denaturiert und anschließend direkt auf Eis gelagert. Bevor mit der reversen Transkription begonnen werden konnte, wurden die in der folgenden Tabelle (Tab.4) aufgelisteten Substanzen hinzugegeben.

Tab. 4: Substanzen für die cDNA-Synthese vor dem Starten der reversen Transkription:

5x Bioscript Puffer	4,00µl
RNase Inhibitor	1,00µl

Bioscript (200u/μl)	0,25μl
RNAse-freies Wasser	2,75μl
Gesamtvolumen	8,00μl

Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler in einem Gesamtvolumen von 20μl. Die Primeranlagerung und die Extension erfolgten bei 42°C für 50min. Anschließend wurde die Denaturierung bei 70°C für 15min durchgeführt, gefolgt vom Herunterkühlen der Proben auf 4°C. Zum Abschluss wurden die Proben mit RNAse freiem Wasser auf eine Konzentration von 5ng/μl verdünnt und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

3.8.2 Microarray

Um einen Überblick über regulierte Transkripte im Rahmen einer proinflammatorischen Stimulation mit Zytokinmix und Serum septischer Patienten über sechs und vierundzwanzig Stunden und einer profibrotischen Stimulation von HSCs mit TGF-β über 24h zu erhalten, wurden zwei Microarrays durchgeführt und ausgewertet.

Die Versuchsdurchführung wurde analog zu dem Illumina[®]-Protokoll „Whole-Genome Gen Expression Direct Hybridization“ (www.illumina.com) durchgeführt. Zusammenfassend wurde dabei die isolierte RNA zunächst mittels Gelelektrophorese auf ihre Integrität überprüft und in doppelsträngige cDNA umgewandelt. Daraufhin folgte die Vervielfältigung der cDNA und deren Markierung mit Biotin-markierten UTP. In einem weiteren Schritt wurde die cDNA in cRNA umgeschrieben, hybridisiert, gereinigt, mittels Streptavidin-Cy3 gefärbt und das erzeugte Signal im Illumina BeadArray Reader detektiert und quantifiziert.

Bei der Auswertung wurden die Proben der beiden Microarrays jeweils einzeln innerhalb der Arrays statistisch ausgewertet und außerdem in einem indirekten Vergleich beide Microarrays gemeinsam ausgewertet. Bei Letzterem wurden jeweils 2 Stimulationen gegeneinander unter dem Aspekt verglichen, welche Stimulationsart laut Ingenuity-Pathwayanalyse mehr Transkripte signifikant reguliert, die zu einer HSC-Aktivierung führen. Jene Stimulation, die dabei mehr Transkripte reguliert, wurde in einem weiteren Vergleich nochmals gegen die Stimulation mit TGF-β verglichen, da dieses Zytokin einen etablierten Fibrosemediator darstellt (Leask und Abraham 2004) und somit Aufschlüsse über profibrotische Regulationen auf Transkriptionsebene unter einer akuten Inflammation ermöglicht. Alle Microarray-Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die statistische

Auswertung der Microarrays erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Biometriker Dr. rer. nat. Matthias Kohl der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie des Uniklinikums Jena. Als Grundlage der Auswertung dienten die mittels Ingenuity[®] Pathway Analysis Software ermittelten Gene, die im Rahmen einer Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen relevant sind. Die Daten wurden hierbei auf Normalverteilung überprüft und die jeweiligen Stimulationen anhand der Medianwerte der Fluoreszenzsignale der Illumina[®] BeadChips statistisch ausgewertet.

3.8.3 Primeretablierung

Eine Primeretablierung stellt einen essentiellen Arbeitsschritt dar, bevor mit der real time PCR der anhand der Microarray-Daten ermittelten relevanten Gene begonnen werden konnte. Hierzu wurden anhand der Array-Daten über eine Genomdatenbank (siehe Kapitel 3.4) die Transkriptsequenz ermittelt und in einem Primerdesignprogramm (siehe Kapitel 3.4) die entsprechenden Primer generiert. Dabei wurden die Settings jeweils so gewählt, dass die Primer die Illumina[™]-Probensequenz einschließen. Um qualitativ gute Primer zu generieren, musste jeder einzelne Primer alle der im Folgenden aufgeführten Bedingungen erfüllen:

- Forward- und Reverseprimer schließen die Illumina[®]-Sequenz des Microarrays ein
- Primerlänge \geq 19bp
- Forward- und Reverseprimer unterscheiden sich in ihrer Länge um maximal 2bp
- keine homologen Sequenzen innerhalb der Primer zur Vermeidung von Dimeren
- resultierendes Transkript $<$ 180bp
- GC-Gehalt der Primer \geq 45%
- Ausschluss von Co-Amplifikaten in einer Genomdatenbank (Primerblast)

Anschließend wurden aus den Primermixen, bestehend aus jeweiligen Forward- und Reverseprimern in DEPC-Wasser, und cDNA aus unstimulierten Zellproben die entsprechenden Amplifikate gewonnen und als Template mithilfe des PCR Purification Kits aufgereinigt. Zur Qualitätskontrolle dienten eine anschließende DNA-Gelelektrophorese sowie eine Schmelztemperaturkurvenanalyse.

Das PCR-Produkt wurde auf eine einheitliche Konzentration von 10ng/ μ l eingestellt. In der anschließenden PCR erfolgte jeweils eine Vermessung der Proben als Triplikate.

3.9 quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde mithilfe des Rotor-Gene Q von Qiagen durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug insgesamt 20µl und setzte sich aus den in Tabelle 5 aufgelisteten Reagenzien zusammen.

Tab. 5: Auflistung der Reagenzien für die quantitative PCR

Primer Mix (Forward- und Reverseprimer)	5µl
SYBR [®] Green Supermix (Stratagene)	10µl
cDNA Probe (5ng/µl)	5µl
Gesamtvolumen	20µl

Die Durchführung erfolgte dabei analog zu den Angaben des Herstellers. Um eine Regressionsgerade und somit, anhand deren Steigung, die Effizienz `E` der einzelnen Primer ermitteln zu können, wurden die Proben in sieben Schritten jeweils um den Faktor 10 verdünnt und anschließend in der qPCR gemessen. Exemplarisch ist in Abbildung 9 eine Regressionsgerade dargestellt. Die Auswertung der PCR erfolgte nach den Richtlinien von Pfaffl (Pfaffl 2001).

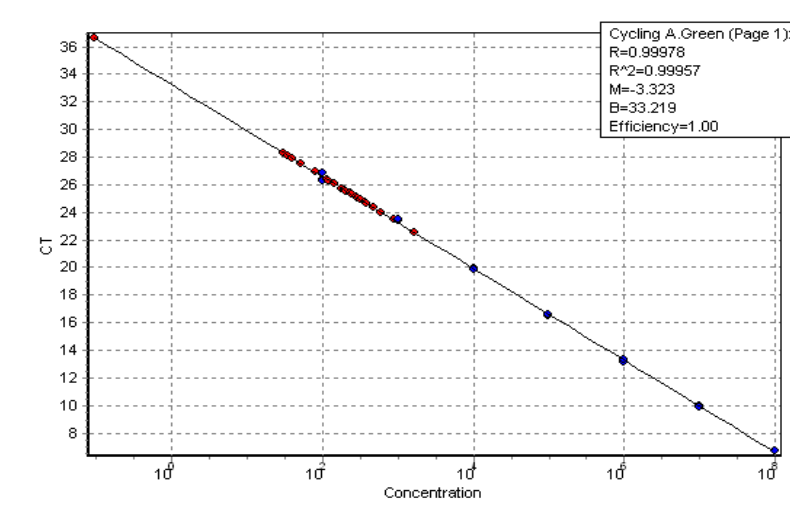


Abb. 9: Darstellung einer Regressionsgeraden am Beispiel von ETBR. Die Effizienzen der anderen Primer lagen alle über einem Wert von 0,90.

3.10 Wrinkle Assay

Der sogenannte Wrinkle Assay oder Collagen Lattice Assay genannt stellt ein Standardverfahren zur Durchführung von Kontraktionsuntersuchungen dar und kam in vielen renomierten Veröffentlichungen zum Einsatz (Melton et al. 2006, Laleman et al. 2007). Dieser Test beruht auf dem Prinzip, dass sich die mit hepatischen Sternzellen beladenen Kollagenkissen aufgrund der von diesen Zellen ausgeübten Retraktionskräfte kontrahieren. Eine Zunahme des Kontraktionsvermögens nach Zusatz entsprechender Agonisten kann so überprüft bzw. auch quantifiziert werden. Für das Experiment wurden LX-2-Zellen auf ein Kollagenkissen ausgesetzt und deren Fläche vor und drei Stunden nach Stimulation vermessen. Die optimale Kollagenkonzentration von 1,5mg/ml wurde ausgehend von Literaturangaben in diversen Vorversuchen ermittelt. Der Wrinkle Assay wurde in 24-Well Zellkulturplatten durchgeführt. Dafür wurden die Wells zunächst für eine Stunde bei 37°C mit jeweils 500µl 1x PBS und 5% HSA inkubiert und anschließend nochmals mit 500µl 1x PBS gewaschen. Danach wurde pro Well 300µl des Kollagenmixes mit einer Kollagenkonzentration von 1,5mg/ml nach folgendem Schema hergestellt:

Zielvolumen (ZV) = $n \cdot 300\mu\text{l} + 10\%$ (Sicherheitsmenge)

Volumen 10x PBS (PV) = $ZV \cdot 0,1$

Kollagenvolumen (KV) = $\frac{ZV \cdot 1,5\text{mg/ml (Zielkonzentration)}}{\text{Kollagenkonzentration des Rat Tail Collagen}}$

Volumen NaOH (NV) = $KV \cdot 0,023$

Volumen H₂O = $ZV - PV - KV - NV$

Der auf einen pH von 7,4 genormte Kollagenmix wurde zu je 300µl pro Well blasenfrei pipettiert und gelierte anschließend für eine Stunde bei 37°C aus. Anschließend wurden die HSCs durch Trypsinierung gelöst und mittels Neubauer Zählkammer auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und je 1ml pro Well vorsichtig auf die Kollagenkissen pipettiert. Die gewählte Zellkonzentration wurde dabei auf Basis von Literaturangaben und in diversen Vorversuchen als optimale Konzentration ermittelt. Nach einer Adhärenzphase von 15h bei 37°C wurde das DMEM-Standardmedium vorsichtig mit geringem Sog abgesaugt und durch jeweils 1ml FKS-freies DMEM +1% Streptomycin/Penicillin ersetzt. Zur Äquilibration wurde dieses Medium für 2h belassen, bevor die eigentliche Stimulation begann. Tabelle 6 zeigt das Stimulationsschema:

Tab. 6: Stimulationsschema für die LX-2 Wrinkle Assays:

Stimulanz	Konzentration	Stimulationsdauer
keine (unstim. Kontrolle)		3h, bzw. 6h und 24h
FKS (Positivkontrolle)	10%	3h
Endothelin-1 (ET-1)	100nM	3h
Zytokinmix (ZM)	(siehe 3.2.3)	6h und 24h
Serum septischer Patienten	5%	6h und 24h
sS + TGF- β -AB	5% (sS), 200 μ g/ml (TGF- β -AB)	6h und 24h

Das fetale Kälberserum (FKS) stellte hierbei die Positivkontrolle dar, da es als starker Konstriktor bei diesem Testverfahren bekannt ist (Kobayashi et al. 2005). Die verwendete Konzentration von ET-1 stellt hierbei eine im Vergleich zur Literatur zwar hohe, aber durchaus übliche Konzentration dar (Reinehr et al. 1998, Melton et al. 2006). Somit sollte gewährleistet werden, dass eine starke Konstriktion auch unstimulierter HSCs erzielt wird. Im Falle der kombinierten Stimulation von Serum septischer Patienten mit Anti-TGF- β -IgG erfolgte eine 30minütige Präinkubation des Serums septischer Patienten im Brutschrank bei 37°C mit dem TGF- β -Antikörper, um eine möglichst vollständige Bindung des Antikörpers an den TGF- β -Rezeptoren zu gewährleisten.

Direkt nach Ende der jeweiligen Stimulationsdauer wurden die Kollagenkissen vorsichtig vom Well gelöst, sofort unter dem Zeiss Steriomikroskop Stemi SV6 fotografiert und die Fläche mithilfe der AxioVision 4.6.3 Software bestimmt. Nach jeweils 3h wurden die Kissen erneut fotografiert und vermessen, um so die Flächenreduktion ermitteln zu können (Abb. 10). Die Kontraktionsuntersuchungen mit ET-1, Zytokinmix und Serum septischer Patienten wurden in neunfacher Wiederholung durchgeführt, jene mit Anti-TGF- β -Immunglobulin und Serum septischer Patienten in achtfacher Ausführung. Die gezeigten Ergebnisse stellen hierbei die jeweiligen Mittelwerte aus den Versuchen dar.

Zur Qualitätskontrolle diente der sogenannte WST-1-Zellproliferationsassay. Dabei wurde am Ende jeder Stimulationszeit entsprechend einer 1:10 Verdünnung pro Well 100 μ l des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2h bei 37°C und anschließendem Schütteln der Wellplatten für 1min bei 550rpm konnte ein dunkelroter Farbumschlag beobachtet werden. Dieser steht für eine enzymatische Umwandlung zu Formazan und setzt vitale Zellen mit intakter Atmungskette voraus

(Mosmann 1983). Der Farbumschlag wurde anschließend mithilfe des MWG Microplate Readers (BioTech[®]) bei 450nm gegen 650nm quantifiziert. Anhand der in Abbildung 11 gezeigten, in diversen Vorversuchen ermittelten, Standardgerade der Absorptionswerte für die jeweiligen Zellzahlen konnte über die Absorptionswerte die wahre Zellzahl ermittelt werden und somit die zuvor ermittelten Flächenreduktionen der Kollagenkissen auf eine einheitliche Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ Zellen/Well genormt werden.

Eine Einzelwerteübersicht findet sich in Tabellen 13-15 im Anhang. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 15.0. Nach Testung auf Normalverteilung wurden die entsprechenden statistischen Testverfahren gewählt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als signifikant festgelegt.

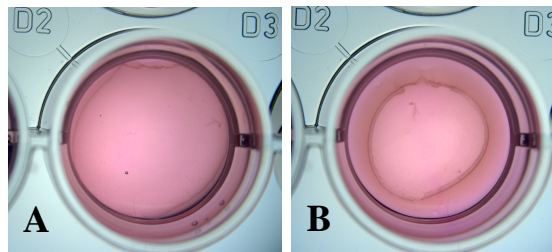


Abb. 10: Wrinkle Assay: beispielhafte Darstellung der Nullaufnahme direkt nach Stimulation und sofortigem Lösen der Kollagenkissen vom Rand der Wells (A) sowie drei Stunden nach FKS-Zugabe (B).

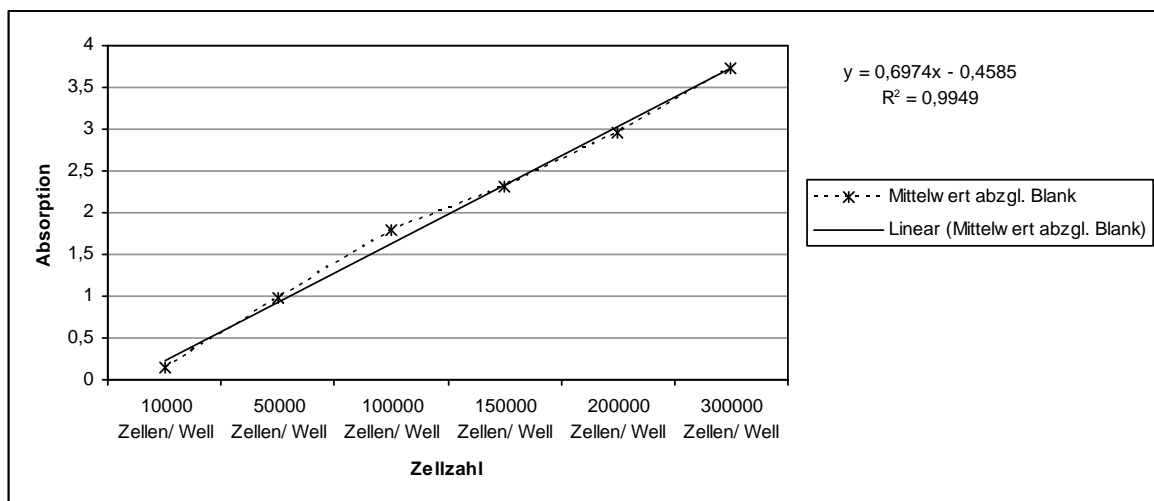


Abb. 11: Standardgerade der Absorptionswerte von HSC bei verschiedenen Zellzahlen im WST-1 Zellproliferationsassay

3.11 Calcium-Imaging von hepatischen Sternzellen

Um herauszufinden, ob die im Wrinkle Assay gezeigte Kontraktion calciumvermittelt ist oder nicht, wurden zusätzlich Calcium-Imaging-Versuche durchgeführt. Bei diesem Versuchsansatz wird davon ausgegangen, dass die Kontraktionen der HSCs calciumgetriggert sind. Obwohl auch calciumunabhängige Signalwege, wie z.B der RhoA- oder PKC-abhängige Signalweg (Kawada et al. 1999, Melton et al. 2006) beschrieben sind, stellt der calciumabhängige einen in der Literatur (Bataller et al. 1998, Laleman et al. 2006) häufig beschriebenen Signalweg dar. Da Veränderungen in den Calciumkonzentrationen der Zelle über Fluoreszenzmessungen gut darstellbar sind, stellt dieser Versuchsansatz eine wichtige Ergänzung zum Wrinkle Assay dar.

Dabei wurden die HSC zunächst wieder trypsiniert (siehe Zellkultivierung 3.5) und die Zellen anschließend in einer Konzentration von 75000 Zellen/ml auf in 24-Well-Zellkulturplatten befindliche Deckgläser ausgesetzt. Die Adhärenzphase betrug analog zum Wrinkle Assay wieder 15h. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und eine definierte Menge von 400µl FKS-freiem DMEM-Medium in die Wells pipettiert. Nun wurde in jedes Well 1µl des in DMSO gelösten Calcium-Fluoreszenzfarbstoffs Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (Invitrogen™) entsprechend einer Endkonzentration von 5µM hinzupipettiert und die Wells für 30min bei 37°C inkubiert (Reinehr et al. 1998). Anschließend wurde das Medium abgesaugt, mit HBSS gewaschen und Krebs-Henseleit-Puffer hinzugefügt. Die Wells wurden nun in warmpacks und Alufolie lichtgeschützt verpackt und zum Mikroskop transportiert. Hier wurde jedes Deckglas unter Vermeidung von Lichteinfluss auf einem konischen Objektträger in KHB-Medium unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) fotografiert. Dabei wurde die Axio Observer Z1 Software verwendet und folgender Filtersatz: EX BP 470/40 BS FT 495 EM BP 525/50. Die Nullaufnahme wurde jeweils vor Stimulation und direkt nach Zugabe der Stimulantien über einen Zeitraum von 2min alle fünf Sekunden ein Bild gemacht. Dadurch konnte der Verlauf der Calcium-Fluoreszenz unter Stimulation ermittelt werden. Die gewählten Zeitintervalle erwiesen sich hierbei in diversen Vorversuchen als am besten geeignet. In Tabelle 7 sind die verschiedenen Stimulantien aufgelistet. Alle Versuche wurden in mindestens dreifacher Ausführung durchgeführt. In der statistischen Auswertung wurden jeweils der Ausgangswert und Maximalwert miteinander verglichen. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde hierfür der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Tab. 7: Stimulantien für die Calcium-Imaging-Versuche:

Stimulanz	Konzentration
ET-1	100nM
FKS	10%
sS	5%
TGF- β	2ng/ml
ZM	siehe Kapitel 3.2.3.

3.12 Immunhistochemie von LX-2-Zellen und von human Leberschnitten

Die durchgeführten Untersuchungen im Wrinkle Assay mit Endothelin-1 zur Sternzellkontraktilität zeigten überraschenderweise keinen Effekt (siehe Kapitel 4.3.1). Aus diesem Grund sollte zusätzlich die Frage nach der Expression von Endothelin-Rezeptoren auf den LX-2-Zellen und im Vergleich hierzu ebenfalls an humanen Leberschnitten mittels immunhistochemischer Färbungen geklärt werden. Der Vasokonstriktor Endothelin-1 spielt hierbei in Verbindung mit dem Endothelin A- und B-Rezeptor (ETAR, ETBR) eine wichtige Rolle im Rahmen der sepsisinduzierten Mikrozirkulationsstörung sowie bei der Aktivierung hepatischer Sternzellen (Pinzani et al. 1996, Reinehr et al. 1998, Moore 2004). In der Literatur ist das Protein alpha Smooth Muscle Actin (aSMA) als Marker für die Aktivierung von hepatischen Sternzellen hinreichend etabliert (Rockey et al. 1992, Schmitt-Graff et al. 1991). Anhand der Färbung der LX-2-Zellen mit aSMA sollte der Grad der Teilaktivierung bei früher und später Zellpassagierung untersucht werden. Bei den humanen Leberschnitten diene aSMA zur Cofärbung mit ETAR bzw. ETBR, um so die hepatischen Sternzellen im Gewebe zu identifizieren. Dadurch sollte die Existenz dieser Rezeptoren auf den hepatischen Sternzellen im humanen Lebergewebe im Vergleich zur LX-2-Zelllinie nachgewiesen werden. Alle Färbungen wurden jeweils als Triplikate durchgeführt. Die verwendeten Zellpassagen lagen alle zwischen der vierten und fünfzehnten Passagierung.

3.12.1 Immunhistochemie von LX-2-Zellen

Zur immunhistochemischen Färbung der LX-2-Zellen wurden diese auf ein steriles 18x18mm Deckglas ausgesetzt. Es folgte eine Adhärenzphase von 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre im Zellbrutschrank, bis ein subkonfluentes Wachstum erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen nach mehrmaligem Waschen mit HBSS zur Fixation für 10min in -20°C kaltes Methanol getaucht. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die auf dem Deckglas adhärennten LX-2-Zellen nun für 5min mit einer 1%igen BSA-Lösung in HBSS inkubiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran für 5min in HBSS-Puffer und 0,1% TritonX. Nach erneutem Waschen wurden nun im nächsten Schritt die LX-2 für 1,5h mit 50µl des Primärantikörpers in der jeweils optimalen Konzentration unter Raumtemperatur bei weitestgehendem Lichtausschluss inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit HBSS-Puffer wurde analog zur Vorgehensweise beim Primärantikörper die Inkubation mit dem Sekundärantikörper durchgeführt, jedoch nur für einen Zeitraum von 1h. Daraufhin erfolgte ein weiterer Waschvorgang mit HBSS und abschließend mit Aqua dest. III und anschließend die Fixation der Deckgläser auf Objektträgern mittels Vecta-Shield. Nach mindestens zweistündiger Trocknungszeit konnten die Zellen nun mittels Carl Zeiss Konfokalmikroskop LSM 510 meta[®] ausgewertet werden.

Um zu zeigen, dass der sekundäre Antikörper nicht unspezifische Färbungen verursacht, wurden sowohl für aSMA, als auch für ETAR/ ETBR Negativkontrollen durchgeführt. Wie in Abbildung 12 zu sehen, zeigte sich bei Weglassen des primären Antikörpers und protokollgemäßer Anfärbung mit dem sekundären Antikörper keine Färbung, was die spezifische Bindung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper beweist.

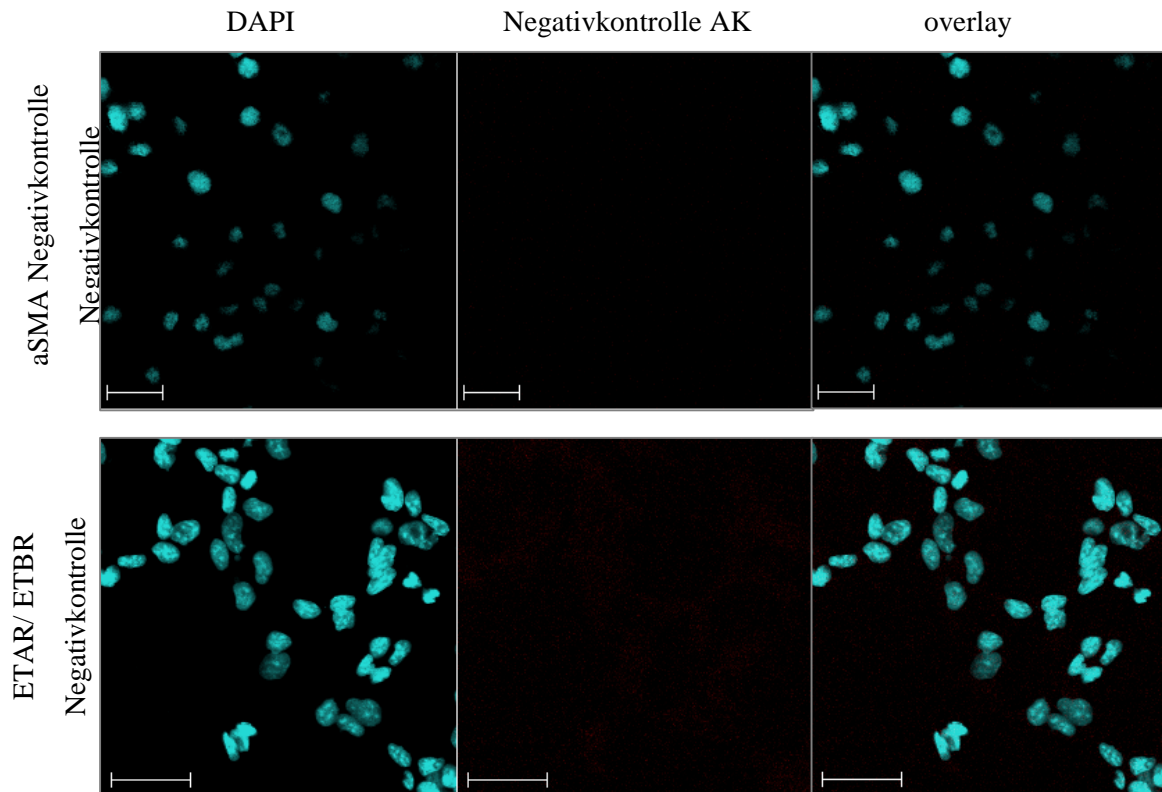


Abb. 12: Negativkontrolle der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen von LX-2-Zellen.

Dargestellt sind jeweils im linken Bild die Anfärbungen des Zellkerns mittels DAPI-Färbung, im mittleren Bild die Negativkontrolle der Antikörper und rechts sind die Überlagerungsbilder zu sehen. Bei den Negativkontrollen wurde der jeweilige primäre Antikörper weggelassen und analog zur Vorgehensweise mit Antikörper für 1,5h nur mit Antikörper-Diluent inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper entspricht dem Protokoll. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 μ m.

3.12.2 Immunhistochemie von humanen Leberschnitten

Zur Antikörpermarkierung von humanem Leberbiopsien wurden diese zunächst in Paraffin fixiert und anschließend am Kryostat Leica CM3050 geschnitten. Danach wurden die Leberschnitte auf Objektträger aufgebracht. Die Antikörpermarkierung mit dem primären und sekundären Antikörper erfolgte automatisiert mittels Leica Bond™ Max. Dabei wurde für die primären Antikörper in diversen Vorversuchen die optimale Konzentration ermittelt, sodass letztendlich aSMA mit einer Konzentration von 1:50, ETAR mit 1:200 und ETBR 1:100 verwendet wurden. Auch bei den Leberschnitten betrug die Konzentration der sekundären Antikörper jeweils 1:200. Für aSMA wurde dabei Cy3-fluoreszenzmarkiertes Donkey Anti-Mouse IgG (Jackson Immuno Research) verwendet und für die beiden Endothelin-Rezeptoren A und B Cy5-fluoreszenzmarkiertes Donkey Anti-Rabbit IgG (Jackson Immuno Research).

Analog zur Vorgehensweise bei den LX-2-Zellen wurden auch hier Negativkontrollen für aSMA und ETAR/ETBR durchgeführt (Abb. 13).

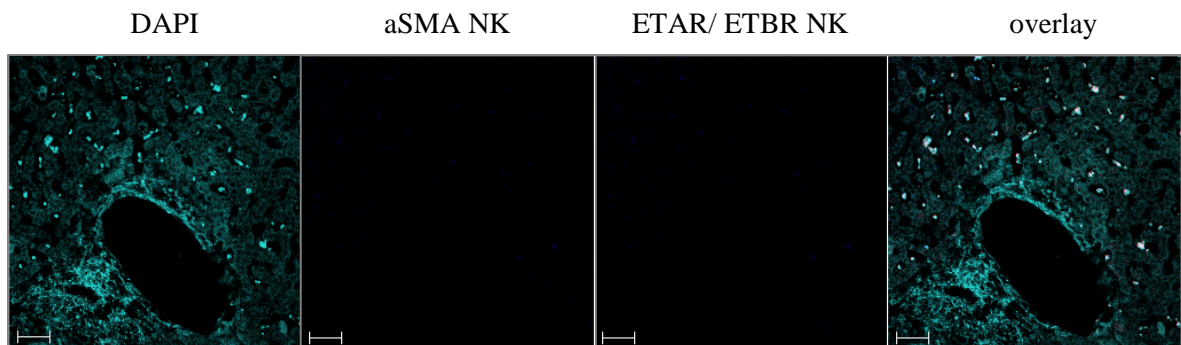


Abb. 13: Negativkontrolle der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen humaner Leberschnitte.

Im linken Bild ist die Zellkernfärbung mittels DAPI dargestellt. Im zweiten Bild von links ist die Negativkontrolle (NK) von aSMA und im dritten Bild jene von ETAR/ ETBR dargestellt. Da ETAR und ETBR beide von demselben Host (Rabbit) abstammen, reichte eine Negativkontrolle für beide Antikörper aus. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 μ m.

4. Ergebnisse

4.1 Genexpressionsanalysen hepatischer Sternzellen unter proinflammatorischer Stimulation mittels Microarray-Technologie

Um einen Überblick über jene Transkripte zu erhalten, die an einer Aktivierung hepatischer Sternzellen unter proinflammatorischer Stimulation beteiligt sind, wurde als Grundlage eine Pathwayanalyse des HSC-Aktivierungsweges mittels Ingenuity[®]-Software (Ingenuity[®]-Systems) durchgeführt. Der Signalweg der Sternzellaktivierung wurde bereits in Kapitel 1.4.1 und 1.4.2 gezeigt. Dabei ergaben sich in den zwei Untergruppen der HSC-Aktivierung („early signaling events in HSC“ und „signaling events in activated HSC“) jeweils 62 Gene, die an dieser Transdifferenzierung der Zellen laut Ingenuity[®] beteiligt sind. Diese Gene stellten die Grundlage für die statistische Auswertung der beiden Microarrays „Zytokinmix vs. TGF- β “ und „septisches Serum vs. Kontrolle“ dar.

Für die Genexpressionsanalysen des ersten Microarrays „Zytokinmix vs. TGF- β “ wurden die LX-2-Zellen für jeweils 6h und 24h mit Zytokinmix stimuliert und für 24h mit TGF- β . Des Weiteren diente eine unstimulierte Probe als Negativkontrolle. Im zweiten Microarray „septisches Serum vs. Kontrolle“ wurden LX-2-Zellen einerseits mit Serum septischer Patienten und andererseits mit Serum gesunder Probanden als Kontrolle für den Zeitraum von 6h und 24h behandelt verwendet. Im Hinblick auf jene Gene, die laut Ingenuity[®] für die HSC-Aktivierung relevant sind, ergab sich in der statistischen Auswertung anhand des Medians der Fluoreszenzwerte eine signifikante Regulation von 52 Beadsequenzen des Microarray-Chips entsprechend 38 HSC-aktivierungsrelevanter Gene. Aus diesen 38 verbliebenen, signifikant regulierten Genen wurden im weiteren Verlauf 14 Gene ausgewählt, die an Inflammation, profibrotischen Prozessen und Transdifferenzierung beteiligt sind und für weitere Untersuchungen auf Transkriptionsebene mittels real-time PCR quantifiziert (siehe Kapitel 4.2)

Im indirekten Vergleich der verschiedenen Stimulationsarten der LX-2-Zellen ergab sich der in der Tabelle 8 dargestellte Vergleich des Aktivierungsgrades. Dabei wurden die unter 1.) bis 4.) aufgeführten indirekten Vergleiche so vollzogen, dass jeweils 2 Stimulationen gegeneinander verglichen wurden und diejenige Stimulationsart, die ein stärkeres Aktivierungsmuster zeigte, nochmals gegen TGF- β 24h verglichen wurde. Dabei wurde

TGF- β als Endpunkt der Vergleiche ausgewählt, da TGF- β einen etablierten Fibrosemediator darstellt (Leask und Abraham 2004, Seki et al. 2007) und somit für die Aussage, dass auch eine akute Inflammation im Rahmen einer Sepsis zu einer hepatischen Sternzellaktivierung und somit zu profibrotischen Veränderungen führt, ein essentieller Faktor ist.

Tab. 8: Vergleich des Aktivierungsgrades von LX-2-Zellen bei verschiedenen Stimulationen

1.)	ZM 24h	>	ZM 6h	>	TGF- β 24h
2.)	TGF- β 24h	>	sS 6h	>	sS 24h
3.)	ZM 6h	>	TGF- β 24h	>	sS 6h
4.)	ZM 24h	>	TGF- β 24h	>	sS 24h

Aus diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass eine Stimulation mit dem artifiziell hergestellten Zytokinmix prinzipiell eine stärkere HSC-Aktivierung zur Folge hat, als es mit dem Serum septischer Patienten der Fall ist. Des Weiteren besteht bei Stimulation mit Zytokinmix eine Korrelation zwischen Stimulationsdauer und Grad der HSC-Aktivierung, wobei hingegen bei Stimulation im Serum-Sepsismodell der Aktivierungsgrad bei 24h-Stimulation geringer als jener bei 6h-Stimulation ist. Im Vergleich TGF- β versus Zytokinmix stellt Letzteres den stärkeren Stimulus zur HSC-Aktivierung auf Transkriptionsebene dar. Im Falle des Serums septischer Patienten erweist sich dieses jedoch als schwächerer Stimulus verglichen mit der TGF- β -Stimulation.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass es einen eindeutigen Unterschied hinsichtlich des Aktivierungsgrades hepatischer Sternzellen zwischen pro-inflammatorischer Stimulation basierend auf Zytokinmix-Stimulation und jener, basierend auf Stimulation im Serum-Sepsismodell gibt. Dabei nimmt die Stimulation mit TGF- β eine Zwischenstellung ein, da es einerseits im Vergleich zur Zytokinmix-Stimulation weniger Gene reguliert, die für die HSC-Aktivierung relevant sind, andererseits jedoch, verglichen mit Serum septischer Patienten, einen stärkeren Stimulus darstellt.

4.2 Genexpressionsanalysen humaner hepatischer Sternzellen in verschiedenen experimentellen Sepsismodellen mittels real-time PCR

Analog zur Vorgehensweise bei den Microarrays wurden die gleichen Stimulationsarten für die real-time PCR-Versuche gewählt. Wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt, wurden hierfür 14 Gene auf Grundlage der zuvor erlangten Ergebnisse der Microarrays ausgewählt und wie in Kapitel 3.9 beschrieben anhand der Referenzgene ADAM9 und HPRT nach Pfaffl (Pfaffl 2001) ausgewertet. Die Gene, die für die PCR-Untersuchungen ausgewählt wurden sind folgende:

Tab. 9: Verwendete Gene für die quantitative PCR

Gen	Funktion
Collagen Typ 1, Alpa 1 (COL1A1)	Hauptbestandteil bei der Akkumulation von ECM bei profibrotischen Prozessen
Endothelin Converting Enzyme 1 (ECE1)	proteolytische Spaltung von Proendothelin zu biologisch aktivem Endothelin-1
Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	Zellproliferation, -differenzierung
Endothelin-1 (ET-1)	Vasokonstriktion, Kontraktion von HSCs
Endothelin Typ A Rezeptor (ETAR)	Vasokonstriktion/Kontraktion von HSCs über Bindung von ET-1; ET-1-selektiv
Endothelin Typ B Rezeptor (ETBR)	unspezifischer Endothelinrezeptor (ET1-3) Vasokonstriktion/HSC-Kontraktion
Insulin-like Growth Factor-1 (IGF1)	Wachstums- und Differenzierungsfaktor, Regulation von Proliferation und Apoptose
Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3)	Regulation von Proliferation und Apoptose; wachstumshib./-potenzierende Effekt
Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP5)	Regulation von Proliferation und Apoptose v.a. wachstumsfördernde Effekte
Transforming Growth Factor Alpha (TGFA)	proliferations- und differenzierungsfördernd
Transforming Growth Factor Beta-1 (TGFB1)	Fibrogenese; antiinflammatorisch, Regulation von Proliferation und Transdifferenzierung
Transforming Growth Factor Beta	vermittelt Induktion verschiedener Gene für

Receptor-1 (TGFB1)	Zell-Matrix-Interaktion; Bindung von TGF- β
Transforming Growth Factor Beta	Bindung von TGF- β ; Vermittlung antiproliferativer Effekte von TGF- β
Receptor-2 (TGFB2)	
Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP2)	antiapoptotisch; verhindert Abbau von ECM durch MMPs

Bei der Auswertung der PCR-Daten für die 14 Transkripte stellte sich heraus, dass bei einigen der verwendeten Primer die Transkripte der stimulierten Proben trotz der Verwendung einer allgemein üblichen Menge cDNA von 25ng/Reaktion erst in sehr späten Zyklen amplifiziert wurden. Dabei zeigte sich teilweise kein oder lediglich ein geringer Unterschied zu der jeweils mitlaufenden Negativkontrolle. Dies zeigt, dass diese Primer betreffend eine sehr geringe Anzahl von Transkripten im ursprünglichen Ansatz vorhanden war und eine valide Quantifizierung demzufolge kaum möglich gewesen wäre. Eine Tabelle der Gene mit dazugehörigen C_t -Werten, Transkriptmenge je Probe und der im Text erwähnten prozentualen Werte ist im Anhang beigefügt (Tab. 11 und 12). Letztendlich verblieben die im weiteren Text vorgestellten 9 Transkripte für weiterführende Auswertungen.

In den jeweiligen Abbildungen sind die Veränderungen der Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe als logarithmierte Daten der jeweiligen Quotienten aus Ziel- und Referenzgen nach Pfaffl dargestellt (Pfaffl 2001). Dabei entspricht der Ordinatenwert 0 keiner Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe, der Wert 1 bzw. -1 auf der y-Achse einer Verdopplung bzw. Halbierung der Genexpression und ein Wert von 2 bzw. -2 stellt bereits eine Vervierfachung bzw. Reduzierung auf $\frac{1}{4}$ der Genexpression, bezogen auf die Kontrollgruppe, dar. Analog zu den MIQE-Kriterien (Bustin 2009) wurde als laborinterner Standard eine Verdopplung bzw. Halbierung der Genexpression als eindeutig biologisch relevant definiert. Auf eine weiterführende statistische Auswertung der Transkripte wurde aufgrund der mit Triplikaten geringen Probenanzahl bewusst verzichtet.

4.2.1 Veränderungen der Genexpression des Endothelin-Converting-Enzyme 1 (ECE1)

Die Auswertung der quantitativen PCR-Läufe hinsichtlich des ECE1-Gens ergab, dass dieses Gen nicht bzw. in nur sehr geringem Maße durch die Stimulation mit Zytokinmix, Serum septischer Patienten und TGF- β beeinflusst wird. Während es im Vergleich der Stimulationsdauer beim Zytokinmix zu einer Hochregulation des Gens um 24% auf 125% ($R=0,33$) bei längerer Stimulationszeit kommt, führt die 24h-Stimulation mit sS im Vergleich zur 6h-Stimulation zu einer Verminderung von 109% ($R=0,12$) auf 91% ($R=0,13$). Die TGF- β -Stimulation zeigte keinen Einfluss auf die Genexpression von ECE1.

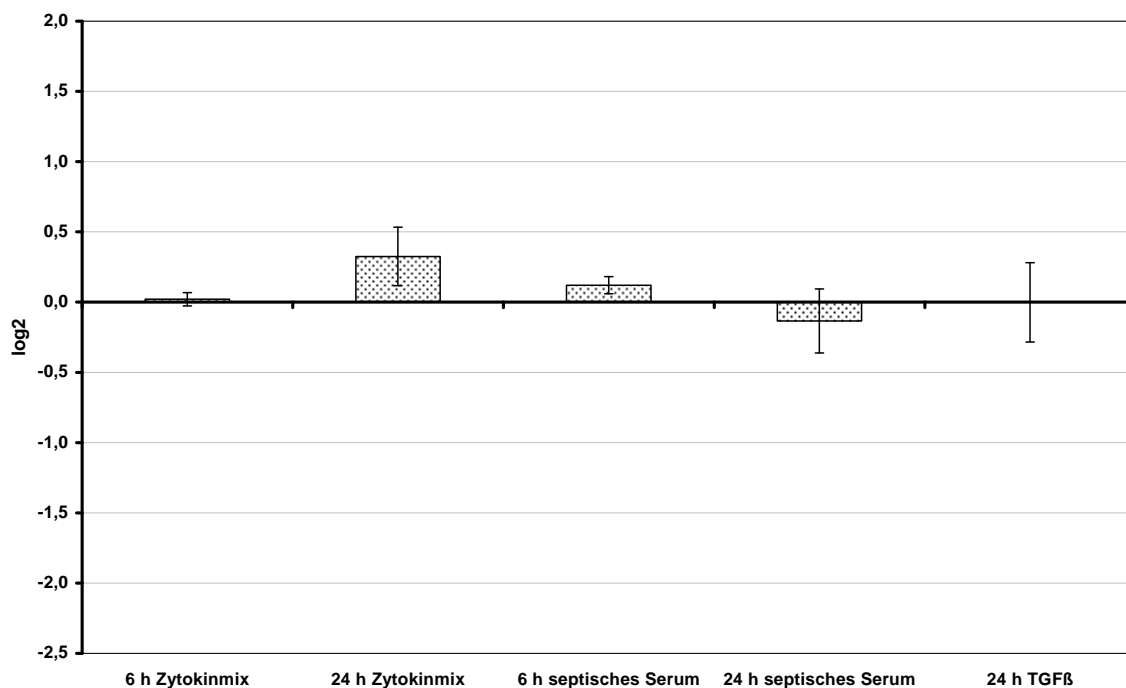


Abb. 14: Vergleich der ECE1-Expression nach 6h- und 24h-Stimulation mit Zytokinen und Septiker Serum in humanen hepatischen Sternzellen

Die Expression der ECE1 wurde auf den Mittelwert der beiden Referenzgene ADAM9 und HPRT bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet ($n=3$).

4.2.2 Veränderungen der Genexpression von Endothelin-1 (ET-1)

Aus Abbildung 15 ist ersichtlich, dass die Stimulation mit Zytokinmix sowohl nach 6h als auch nach 24h zu einer biologisch eindeutig relevanten Hochregulation des ET-1-Gens geführt hat. Dabei steigt die Genexpression nach 6h auf 254% ($R=1,34$) und nach 24h-Stimulation sogar auf 281% ($R=1,49$) verglichen mit der Kontrolle. Im Falle der Stimulation mit Serum septischer Patienten zeigt sich, wie auch bereits bei ECE1

beschrieben, ein gegenläufiger Trend. Nach 6h-Stimulation kommt es zu einer deutlichen Hochregulation auf 191% ($R=0,94$), während sich die Genexpression nach 24 Stunden wieder nahezu unverändert zeigt (99%; $R= -0,02$).

Bei der Stimulation mit TGF- β zeigte sich eine Veränderung der Expression auf 159% ($R=0,67$), wobei hier eine relativ starke Streuung der Einzelwerte zu beobachten war. Insgesamt zeigte sich auch im Falle von ET-1 die Heterogenität zwischen Stimulation mit Zytokinmix und jener mit Serum septischer Patienten.

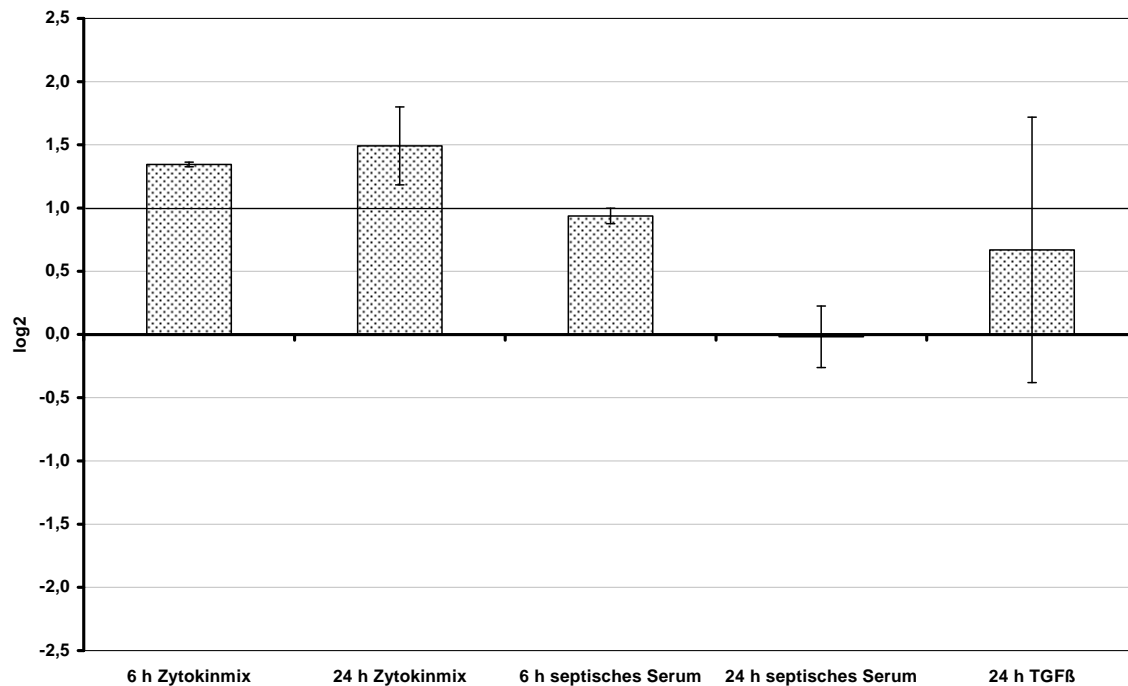


Abb. 15: Vergleich der Endothelin-1-Expression nach 6h- und 24h-Stimulation mit Zytokinen und Septikerserum in humanen hepatischen Sternzellen

Die Expression von ET-1 wurde auf den Mittelwert der beiden Referenzgene ADAM9 und HPRT bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet ($n=3$).

4.2.3 Veränderungen der Genexpression von Endothelin Typ B Rezeptor (ETBR)

Im Gegensatz zu der bei ECE1 und ET-1 beobachteten Hochregulation der Gene nach Zytokinmix-Stimulation kam es beim Endothelin Typ B Rezeptor (ETBR) zu einer biologisch eindeutig relevanten Verminderung der Expression (Abb. 16). Hierbei zeigte sich kein Unterschied bezogen auf die Stimulationsdauer. Mit 47% ($R= -1,08$) bzw. 48% ($R= -1,06$) bei 6h- und 24h-Stimulation sank in beiden Fällen die Genexpression um mehr als die Hälfte.

Auch hier ist wieder ein deutlicher Unterschied zwischen Zytokinmix- und septisches-Serum-Stimulation zu sehen, kommt es doch bei Letzterem zu einer, wenn auch geringen, Hochregulation. Dabei fällt auch wieder auf, dass das Serum septischer Patienten nach 6 Stunden einen größeren Effekt aufweist, als dies nach 24 Stunden der Fall ist (119%; $R=0,25$ vs. 104%; $R=0,05$). Die TGF- β -Stimulation zeigte einmal mehr eine sehr hohe Streubreite der Einzelwerte. Dennoch ist mit der Reduktion um 43% ($R= -0,81$) eine Tendenz abzulesen. Eine eindeutige biologische Relevanz der Genregulation ist aber auch bei ETBR nur bei der Stimulation mit dem artifiziell hergestellten Zytokinmix ersichtlich.

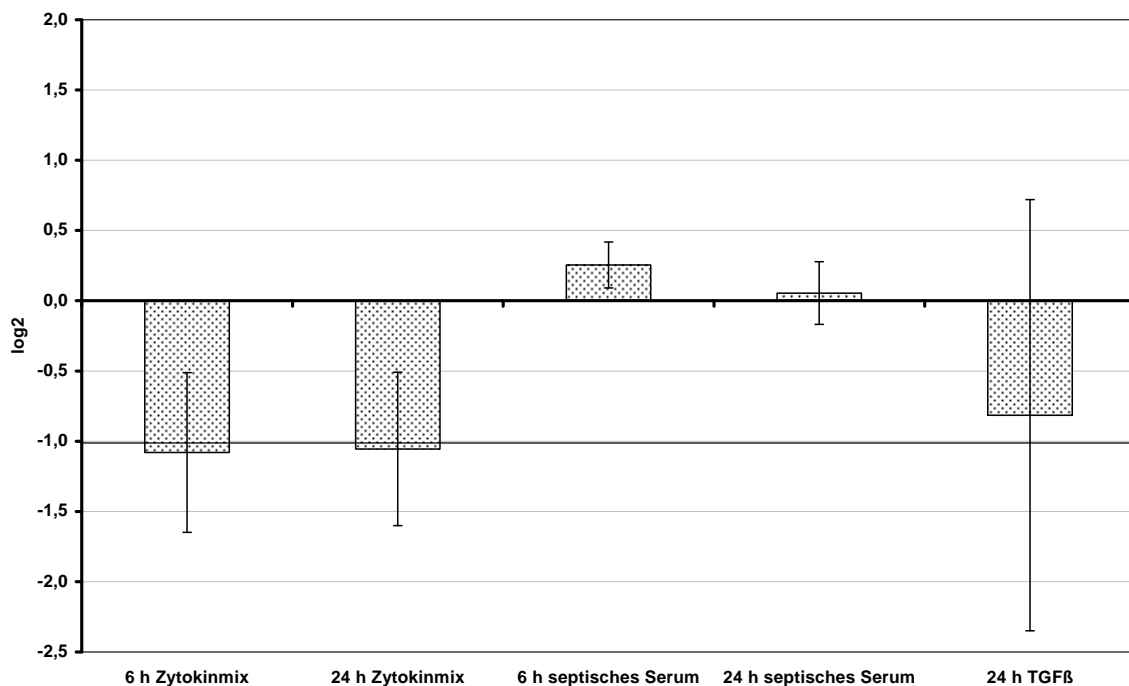


Abb. 16: Vergleich der Genexpression von Endothelin Typ B Rezeptor nach 6h- und 24h-Stimulation mit Zytokinen und SeptikerSerumin humanen hepatischen Sternzellen

Die Expression von ETBR wurde auf den Mittelwert der beiden Referenzgene ADAM9 und HPRT bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet ($n=3$).

4.2.4 Veränderungen der Genexpression von Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3)

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass lediglich Zytokinmix über sechs Stunden mit einer Steigerung um 110% ($R=1,07$) zu einer eindeutig biologisch relevanten Genregulation führt. Die Veränderungen bei gleicher Stimulation über 24 Stunden fallen mit einer Hochregulation um 62% ($R= 0,69$) im Gegensatz zu den vorangegangenen Daten bei IGFBP3 geringer aus, sind jedoch ebenfalls gleichgerichtet. Das Serum septischer Patienten betreffend zeigt sich auch bei diesem Transkript ein entgegengerichteter Effekt.

Nach 6h-Stimulation wurde eine deutliche Steigerung der Expression auf 196% ($R=0,97$) beobachtet, während es nach 24h zu einer Abnahme auf 85% ($R= -0,24$) verglichen mit der Kontrolle, kam. TGF- β zeigte nach 24 Stunden einmal mehr mit einer Reduktion auf 89% ($R= -0,16$) lediglich geringe Einflüsse.

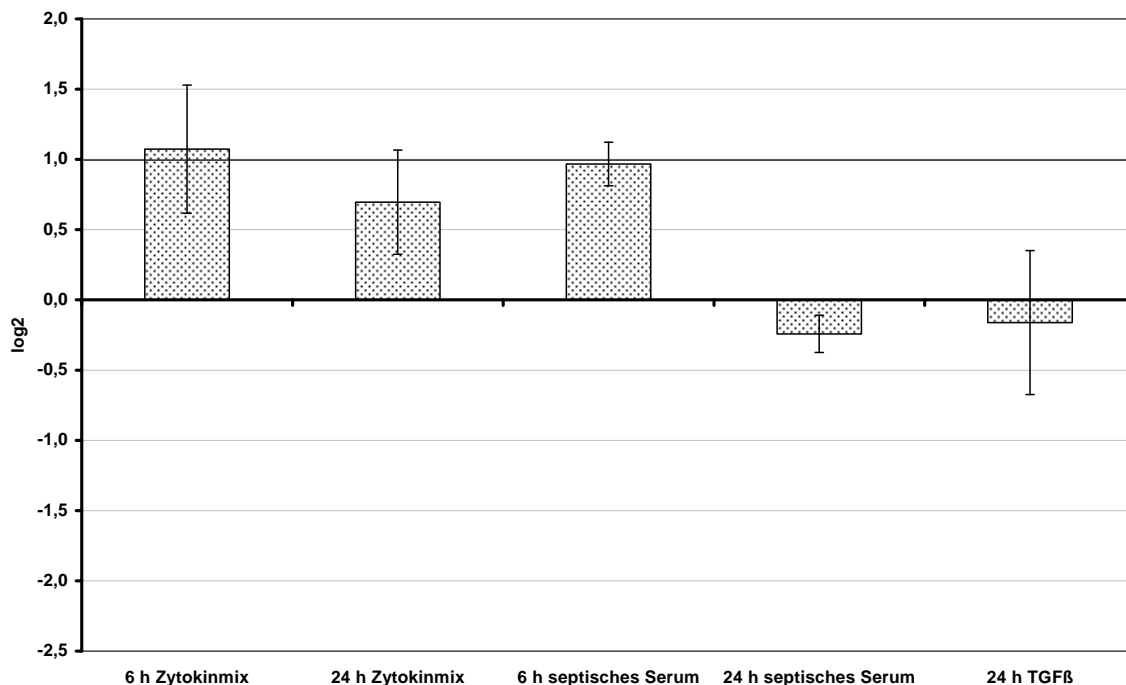


Abb. 17: Vergleich der Genexpression von IGFBP3 nach 6h- und 24h-Stimulation mit Zytokinen und Septikerserum in humanen hepatischen Sternzellen

Die Expression von IGFBP3 wurde auf den Mittelwert der beiden Referenzgene ADAM9 und HPRT bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet ($n=3$).

4.2.5 Veränderungen der Genexpression von Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP5)

Vergleicht man die beiden Abbildungen 17 und 18 fällt auf, dass, obwohl beide Transkripte zur gleichen Genfamilie zählen, IGFBP5 durch die Zytokinstimulationen komplett anders reguliert wird. Zytokinmix führte hier bei beiden Stimulationszeiten im Gegensatz zu IGFBP3 zu einer Downregulation, die nach 6h mit 73% ($R= -0,45$) moderat, nach 24h mit 53% ($R= -0,92$) jedoch deutlich ausfiel und ein Zusammenhang zwischen Stimulationszeit und Genregulationsstärke erkennbar macht. Im Falle des Serums septischer Patienten wies auch hier der Effekt in eine andere Richtung als bei Zytokinmixstimulation. Die Hochregulation sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden fiel mit 221% ($R=1,14$) respektive 232% ($R=1,22$) eindeutig biologisch relevant aus. Auch hier ist ein Zusammenhang zwischen Stimulationsdauer und deren Effekt auf die

Genexpression erkennbar. Im Falle des TGF- β zeigte sich die IGFBP5-Expression auf 175% ($R=0,81$) gesteigert.

Zusammenfassend fallen auch bei diesem Transkript die komplett gegenläufigen Auswirkungen von Zytokinmix und Serum septischer Patienten auf die Genexpression und im Gegensatz zu IGFBP3 auch ein deutlicherer Effekt von TGF- β auf.

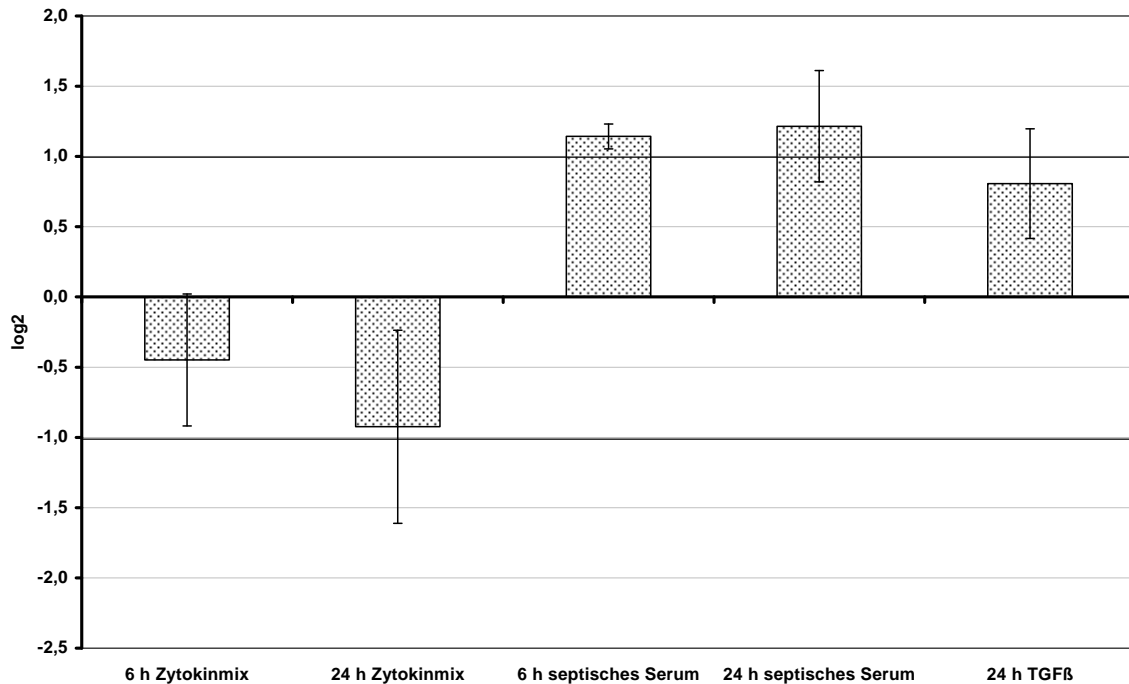


Abb. 18: Vergleich der Genexpression von IGFBP5 nach 6h- und 24h-Stimulation mit Zytokinen und Septikenserum in humanen hepatischen Sternzellen

Die Expression von IGFBP5 wurde auf den Mittelwert der beiden Referenzgene ADAM9 und HPRT bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet ($n=3$).

4.2.6 Veränderungen der Genexpression von Transforming Growth Factor Alpha (TGFA)

Ein weiteres Transkript, welches sowohl im Rahmen der Aktivierung hepatischer Sternzellen, als auch inflammatorisch relevant ist, ist Transforming Growth Factor Alpha. Geht man von einer proinflammatorischen Stimulation mit Zytokinmix aus, würde man eine Hochregulation dieses Transkripts erwarten. Dies bestätigte sich jedoch lediglich bei Stimulation über 24h (142%; $R=0,50$). Bei kürzerer Stimulationsdauer über sechs Stunden zeigte sich mit einer Reduktion um 12% ($R= -0,18$) sogar ein leichter Abfall der Genexpression und somit erstmalig ein gegenläufiger Trend innerhalb der Zytokinmix-Stimulation (Abb. 19). Das Serum septischer Patienten führte in beiden Fällen zu einer Hochregulation von TGFA, die jedoch über das 6h-Intervall mit einer Steigerung auf 142%

($R=0,50$) deutlicher ausfiel als jene über 24h (108%; $R=0,11$). Sowohl beim Zytokinmix als auch bei Stimulation mit Serum septischer Patienten ist das TGFA-Transkript betreffend kein Zusammenhang zwischen Stimulationsdauer und Genexpression einerseits, als auch zwischen den beiden proinflammatorischen Stimulationsarten andererseits zu finden. Die Stimulation mit TGF- β über 24 Stunden zeigte eine leichte Genexpressionssteigerung um 13% ($R=0,18$).

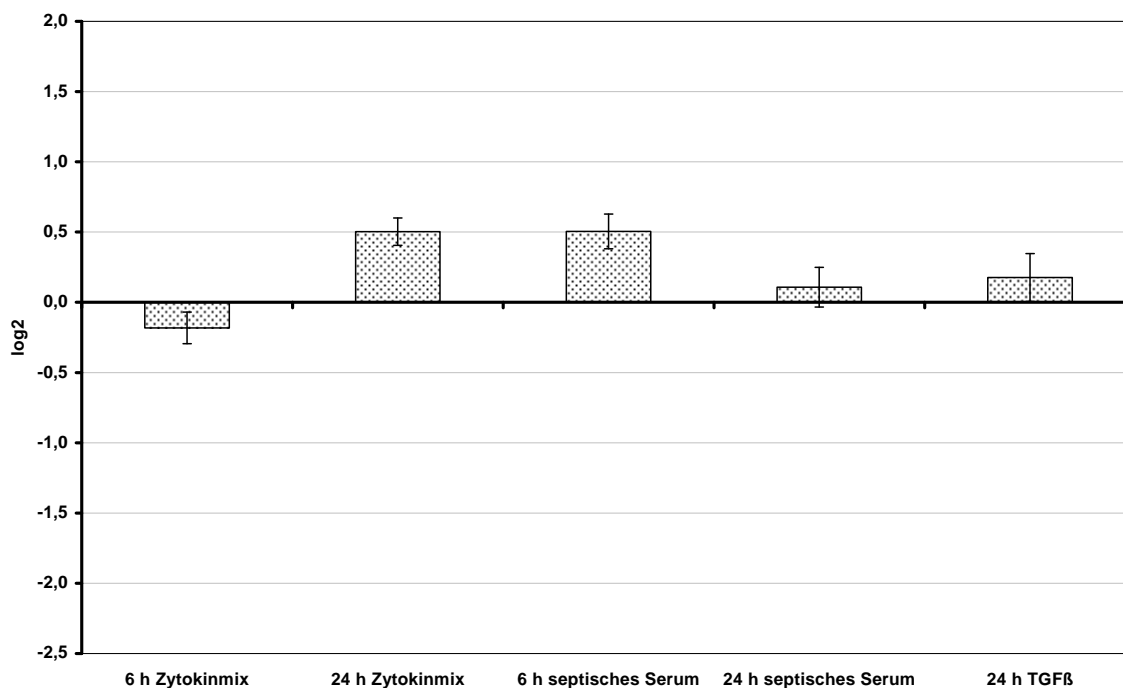


Abb. 19: Vergleich der Genexpression von TGFA nach 6h- und 24h-Stimulation mit Zytokinen und Septikerserum in humanen hepatischen Sternzellen

Die Expression von TGFA wurde auf den Mittelwert der beiden Referenzgene ADAM9 und HPRT bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet ($n=3$).

4.2.7 Veränderungen der Genexpression von Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFB1)

Bezüglich des TGF- β 1-Gens waren alle Veränderungen der Genexpression eher gering ausgeprägt (Abb. 20). Die Stimulation mit Zytokinmix über sechs Stunden führte zu einer marginalen Abnahme um 9% ($R= -0,13$). Im Gegensatz dazu wurde bei 24-stündiger Stimulation eine moderate Steigerung auf 159% ($R=0,67$) und somit, wie auch schon im Falle des TGFA-Transkripts, ein gegenläufiger Effekt zu kürzer Stimulationsdauer beobachtet. Betrachtet man die Effekte vom Serum septischer Patienten, so zeigt sich bei beiden Stimulationsintervallen eine Reduktion der Expression, die einmal mehr, mit 79% ($R= -0,34$) nach sechs Stunden im Vergleich zu 86% ($R= -0,22$) nach 24-stündiger

Stimulation, bei kürzerer Stimulationsdauer stärker ausgeprägt ist. Abermals zeigte sich kein kongruentes Verhalten der beiden proinflammatorischen Stimulationen Zytokinmix und Serum septischer Patienten. Die Stimulation mit TGF- β führte bei selbigem Gen zu einer moderaten Hochregulation auf 124% ($R=0,31$), die jedoch ebenfalls nicht eindeutig signifikant war.

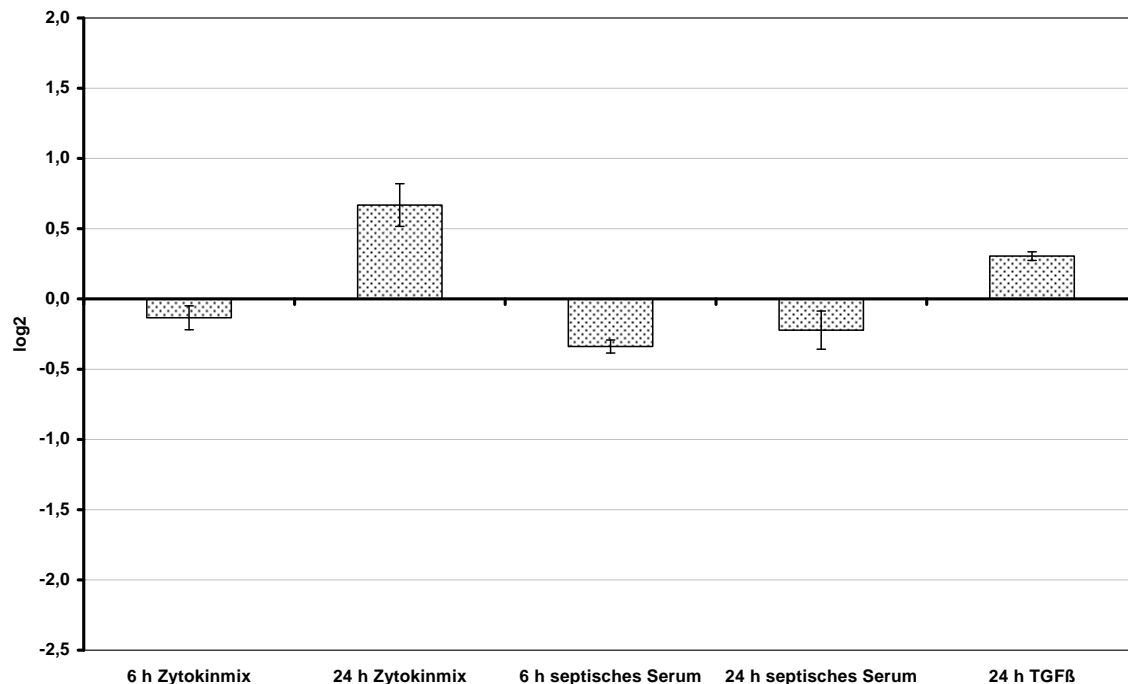


Abb. 20: Vergleich der Genexpression von TGFβ1 nach 6h- und 24h-Stimulation mit Zytokinen und Septikerserum in humanen hepatischen Sternzellen

Die Expression von TGFβ1 wurde auf den Mittelwert der beiden Referenzgene ADAM9 und HPRT bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet ($n=3$).

4.2.8 Veränderungen der Genexpression von Transforming Growth Factor Beta Receptor 2 (TGFBR2)

Bezüglich des TGFBR2-Transkripts zeigte sich nach Zytokinmixstimulation eine intervallabhängige Reduktion der Genexpression (Abb. 21). Nach sechs Stunden betrug diese 29% ($R= -0,49$) und nach 24 Stunden bereits 40% ($R= -0,73$), was jedoch wieder lediglich einen Trend, jedoch keine eindeutig biologische Relevanz widerspiegelt. Im Falle der Stimulation mit Serum septischer Patienten zeigte sich erneut ein entgegengesetztes Verhalten verglichen mit Zytokinmix. Hierbei zeigte sich sowohl bei 6h- als auch bei 24h-Stimulation eine lediglich leichte Steigerung der TGFBR2-Expression (109%; $R=0,12$ versus 108%; $R=0,11$). Nach TGF- β Stimulation kam es zu einer Downregulation des TGFBR2-Gens um 32% ($R= -0,55$).

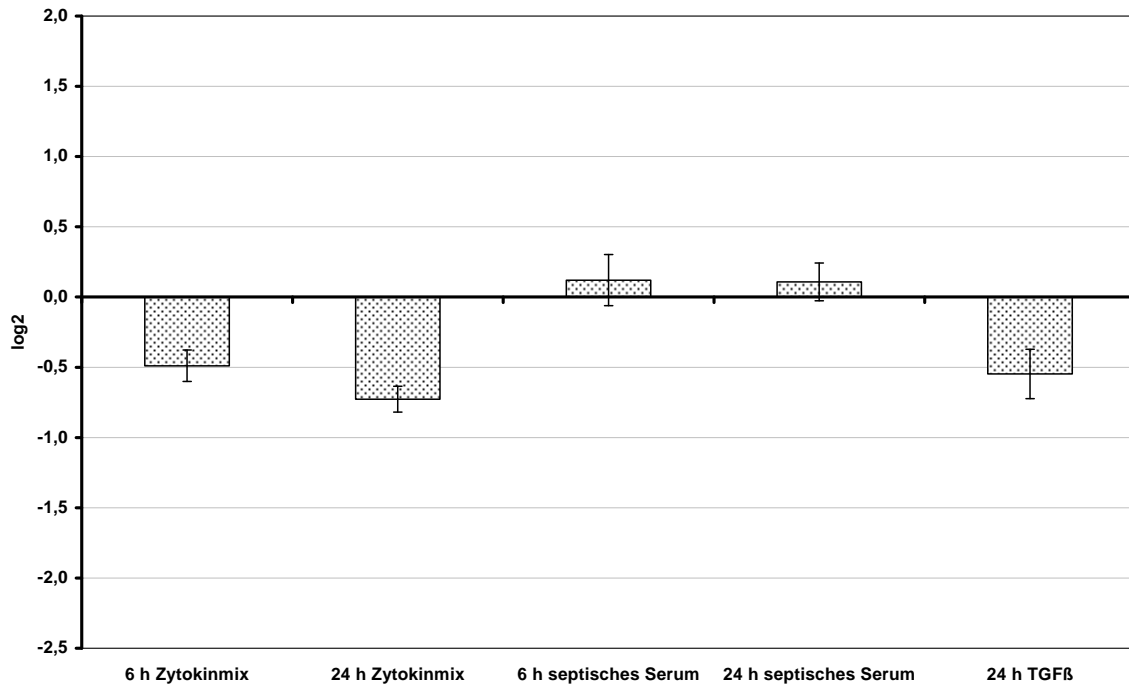


Abb. 21: Vergleich der Genexpression von TGFBR2 nach 6h- und 24h-Stimulation mit Zytokinen und Septikerserum in humanen hepatischen Sternzellen

Die Expression von TGFBR2 wurde auf den Mittelwert der beiden Referenzgene ADAM9 und HPRT bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet (n=3).

4.2.9 Veränderungen der Genexpression von Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 (TIMP2)

Betrachtet man Abbildung 22, so zeigt sich auch das TIMP2-Transkript betreffend lediglich eine Tendenz der Variationen in der Genexpression. Die Stimulation mit Zytokinmix stellt einmal mehr den stärkeren Stimulus zur Genregulation dar. Nach sechs Stunden ist bereits eine moderate Verminderung auf 76% ($R = -0,39$) zu sehen, welche sich mit verlängertem Intervall um weitere 14% auf 62% ($R = -0,70$) steigert. Das Serum septischer Patienten zeigte innerhalb beider Stimulationszeiten wieder einen gegenläufigen Effekt. Kam es nach 6h zu einer leichten Hochregulation auf 115% ($R = 0,20$), sank die Genexpression nach 24h jedoch auf 81% ($R = -0,31$) ab. Die Stimulation mit TGF- β führte zu keiner Veränderung der TIMP2-Expression ($R = 0,00$).

Zusammenfassend spiegelt sich auch bei diesem Transkript die Heterogenität der beiden proinflammatorischen Stimulationen wider. Des Weiteren zeigt sich in Übereinstimmung mit den PCR-Daten der anderen Gene lediglich ein marginaler Einfluss von TGF- β auf die Genexpression.

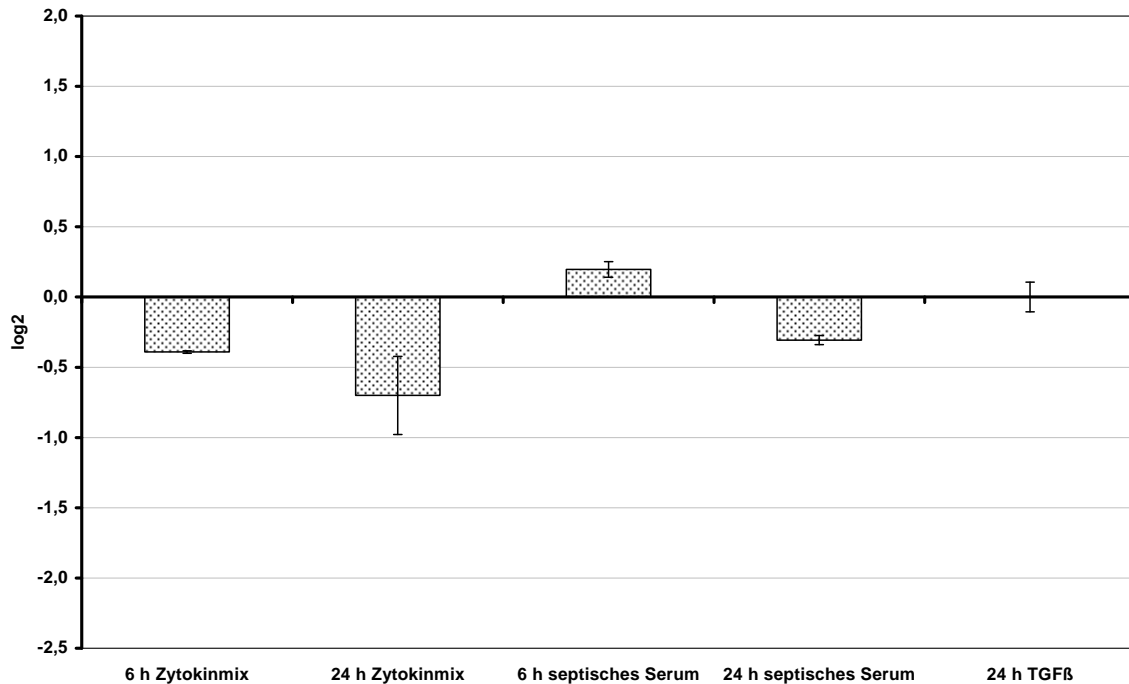


Abb. 22: Vergleich der Genexpression von TIMP2 nach 6h- und 24h-Stimulation mit Zytokinen und Septikerserum in humanen hepatischen Sternzellen

Die Expression von TIMP2 wurde auf den Mittelwert der beiden Referenzgene ADAM9 und HPRT bezogen und nach Pfaffl ausgewertet. Nach Logarithmieren der Ratios wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet (n=3).

Zusammenfassend wird nach Betrachtung aller neun Transkripte ersichtlich, dass es lediglich bei ET-1, ETBR, IGFBP3 und IGFBP5 zu einer eindeutig relevanten Regulation unter proinflammatorischer Stimulation gekommen ist. Ansonsten ist kein einheitlicher Trend bezüglich einer Hoch- bzw. Downregulation bei den verschiedenen Transkripten zu erkennen. Des Weiteren fällt auf, dass die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen und jene mit Serum septischer Patienten zu verschiedenartigen Veränderungen hinsichtlich der Genexpression zu führen scheinen. Außerdem stellt sich die Frage, warum TGF-β als etablierter Mediator der Fibrogenese und somit auch der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen bei keinem Transkript zu einer relevanten Regulation der Genexpression geführt hat.

4.3 Untersuchungen der Sternzellkontraktilität unter proinflammatorischer Stimulation

Nachdem der Einfluß einer proinflammatorischen Stimulation auf die Transdifferenzierung von Sternzellen mittels molekularbiologischer Techniken untersucht wurde, sollte nun das Kontraktionsverhalten der Sternzellen unter proinflammatorischen Bedingungen analysiert werden. Mit einem funktionellen Test, dem sog. Wrinkle Assay (siehe Kapitel 3.10), sollte ermittelt werden, inwiefern nach proinflammatorischer Stimulation - und somit nach einer eventuellen stattgehabten Transdifferenzierung mit Wandlung der Sternzellen in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp - das Kontraktionsvermögen nach Zugabe von Endothelin-1 als potenten Konstriktor hepatischer Sternzellen (Kawada et al. 1995) zunimmt. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob eine proinflammatorische Stimulation *per se* zu einer Zunahme der Kontraktion führt. Eine gesteigerte Kontraktilität hepatischer Sternzellen unter Proinflammation wäre von potentieller pathomechanistischer Bedeutung für die Entwicklung von Mikrozirkulationsstörungen.

4.3.1 Untersuchungen des Kontraktionsverhaltens von LX-2-Zellen unter Stimulation mit Endothelin-1

Im Rahmen von Vorversuchen wurde das Kontraktionsverhalten unter Endothelin-1 bei nativen LX-2-Zellen untersucht (Abbildung 23). Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mittels ANOVA-Analyse und dem Student-Newman-Keuls-Test. Ausgehend von den in der Literatur beschriebenen Effekten von ET-1 auf HSCs (Reinehr et al. 1998, Melton et al. 2006), führte ET-1 überraschend mit lediglich 3,1% Flächenreduktion im Vergleich zur Kontrolle (2,7%) nicht zu einem signifikanten Unterschied im Kontraktionsvermögen ($p=0,70$). Deutlich war jedoch die Zunahme der Kontraktion unter der Positivkontrolle mit FKS mit einer Flächenreduktion von 15,8% ($p<0,001$). Es lag somit die Vermutung nahe, dass die verwendete LX-2-Zelllinie keine Endothelinrezeptoren exprimiert, was letztlich auch gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 4.5).

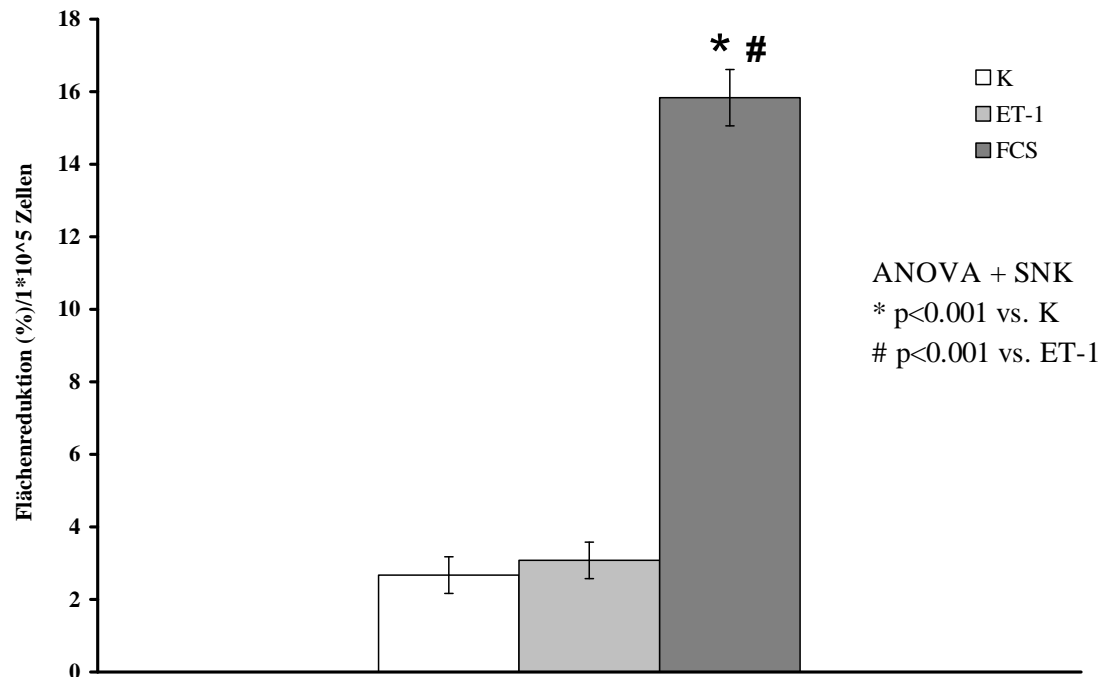


Abb. 23: Vergleich des Kontraktionsverhaltens von LX-2-Zellen nach Zugabe von Endothelin-1 im Wrinkle Assay

Dargestellt ist die relative Flächenreduktion der mit LX-2-Zellen kultivierten Kollagenkissen bezogen auf eine einheitliche Zellzahl von 100000 Zellen bei verschiedenen Stimulationen. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt (n=9). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und SNK-Test (Student-Newman-Keuls-Test).

4.3.2 Untersuchungen des Kontraktionsverhaltens von LX-2-Zellen unter Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der proinflammatorischen Stimulation mit Zytokinmix im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte hierbei mittels Mann-Whitney-U-Tests. Sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden Stimulationsdauer war keine signifikante Zunahme der Kontraktion zu verzeichnen. Nach sechsständiger Stimulation reduzierte sich die Kollagenkissenfläche nach Zytokinmix-Stimulation um 5,6%, während sich die Kontrolle um 2% kontrahierte (p=0,11). Trotz einer Steigerung der Kontraktilität auf eine Flächenreduktion von 9,7% bei der Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen über 24 Stunden fiel das Ergebnis knapp nicht signifikant aus (p=0,052), da auch die unbehandelte Kontrolle eine stärkere Kontraktion um 5,1% aufwies.

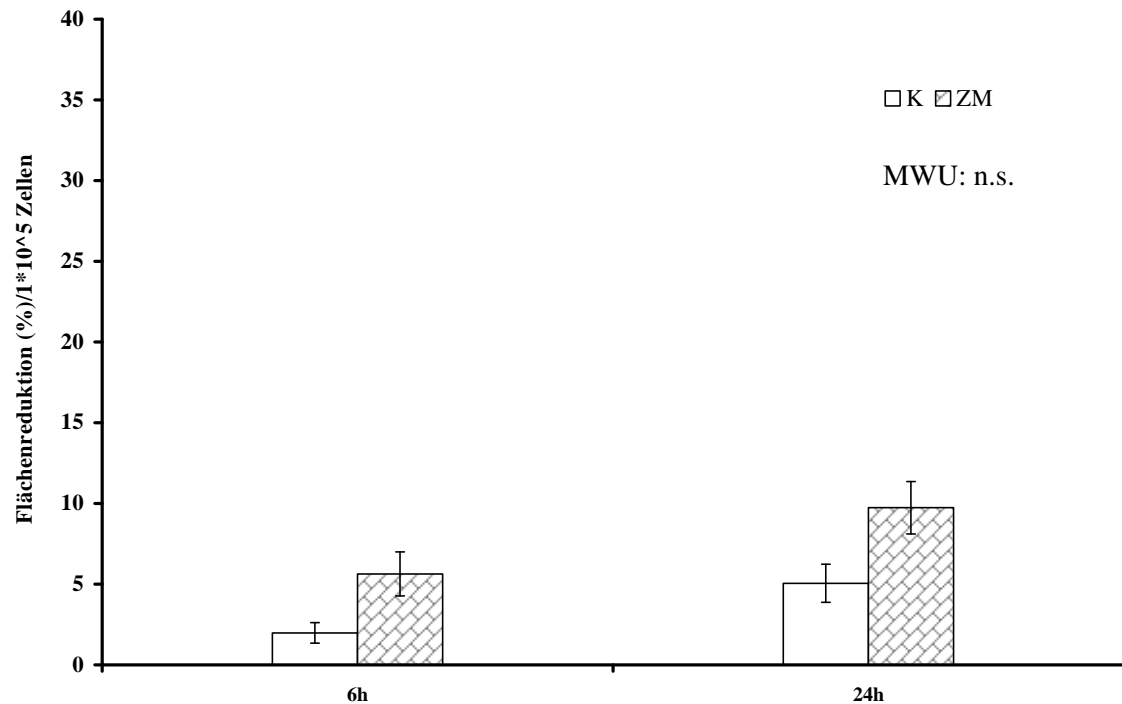


Abb. 24: Vergleich des Kontraktionsverhaltens von LX-2-Zellen nach Zugabe von Zytokinmix imWrinkle Assay

Dargestellt ist die relative Flächenreduktion der mit LX-2-Zellen kultivierten Kollagenkissen bezogen auf eine einheitliche Zellzahl von 100000 Zellen bei verschiedenen Stimulationen. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt (n=9). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (MWU).

4.3.3 Untersuchungen des Kontraktionsverhaltens von LX-2-Zellen unter Stimulation mit Serum septischer Patienten

Eine Stimulation mit dem Serum septischer Patienten führte zu einer deutlichen Zunahme der Kontraktilität. Da TGF- β als potenter Konstriktor hepatischer Sternzellen bekannt ist und auch im Serum septischer Patienten vorkommt, wurde die Hypothese generiert, dass die gezeigte Kontraktion TGF- β -vermittelt ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden LX-2-Zellen zusätzlich nach 30minütiger Präinkubation mit Anti-TGF- β -IgG (TGF- β -AB) mit dem Serum septischer Patienten stimuliert. Als Isotypkontrolle wurde Serum septischer Patienten analog zur Vorgehensweise mit Anti-TGF- β -IgG mit unspezifischem IgG stimuliert um nachzuweisen, dass die Effekte speziell auf die Inhibierung von TGF- β zurückzuführen sind (Daten siehe Tab. 15). Dadurch konnte der Einfluss von TGF- β auf das Kontraktionsverhalten von HSCs ermittelt werden. Die statistische Auswertung erfolgte hierbei wieder mittels ANOVA-Analyse und Student-Newman-Keuls-Test. Wie in Abbildung 25 ersichtlich ähneln sich die Werte nach 6h und 24h bei den jeweiligen

Stimulationen. Zunächst sollen die 6h-Ergebnisse vorgestellt werden. Dabei zeigte sich eine deutliche Kontraktionszunahme unter dem Serum septischer Patienten im Vergleich zur Kontrolle. Mit 31,6% Flächenreduktion unter proinflammatorischer Stimulation im Vergleich zu 4,5% bei den unbehandelten Zellen fiel der Unterschied signifikant aus ($p < 0,05$). Durch die Inhibierung von TGF- β im Septikerserum-Modell durch den Antikörper zeigte sich wiederum eine deutlich verminderte Kontraktionsstärke und somit auch Flächenreduktion um 18,77% auf noch 12,79% ($p < 0,05$). Im Vergleich zur Kontrolle fiel der Unterschied zu Serum septischer Patienten + Anti-TGF- β -IgG ebenfalls signifikant aus (12,79% vs. 4,53%; $p < 0,05$). Mit lediglich 5,33% geringerer Flächenreduktion im Vergleich zu Serum septischer Patienten zeigte die Isotypkontrolle mit IgG keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,53$). Mit einem p-Wert von 0,07 fiel jedoch der Vergleich zwischen TGF- β -Inhibierung und Isotypkontrolle knapp nicht signifikant aus, zeigte jedoch mit 12,79% versus 26,23% eine deutliche Tendenz.

Bei dem Vergleich der 24h-Werte zeigte sich ein ähnliches Bild. Im Vergleich zur Kontrolle (3,86%) verminderte sich die Kollagenkissenfläche unter Serum septischer Patienten um 27,41% ($p < 0,001$). Unter zusätzlicher Neutralisierung von TGF- β durch Anti-TGF- β -IgG sank die Kontraktionskraft wiederum auf 10,84% im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Septikerserum, was einen deutlich signifikanten Unterschied darstellte ($p < 0,001$). Der Unterschied zwischen zytokininhibierter Stimulation und Kontrolle betrug 6,98% ($p < 0,05$). Der Vergleich zur Isotypkontrolle mit IgG zeigte wiederum eine Zunahme der Flächenreduktion auf 26,55% ($p = 0,006$). Dies verdeutlicht, dass die beschriebenen Veränderungen allein auf die Inhibierung von TGF- β zurückzuführen sind. Ebenso bestätigte dies auch der marginale Unterschied von 0,86% zwischen Serum septischer Patienten und selbigem + Isotypkontrolle ($p = 0,92$).

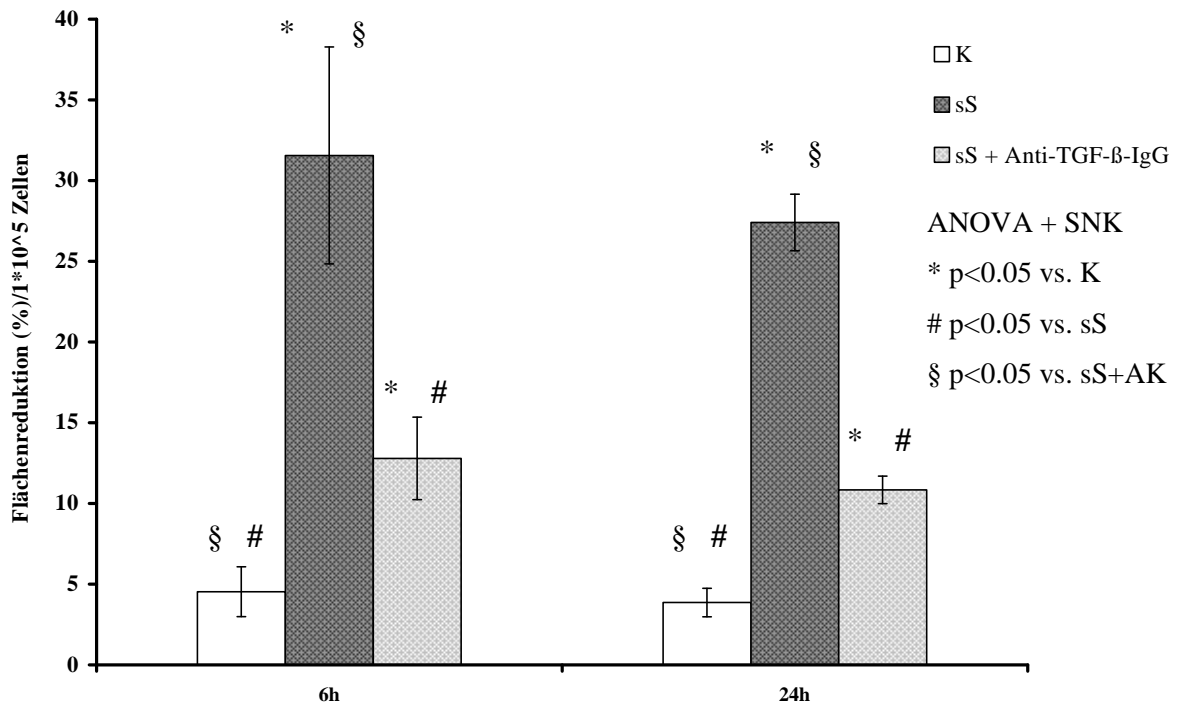


Abb. 25: Vergleich des Kontraktionsverhaltens von LX-2-Zellen unter Stimulation mit Serum septischer Patienten und kombinierter Stimulation von selbigem mit Anti-TGF-β-IgG
 Dargestellt ist die relative Flächenreduktion der mit LX-2-Zellen kultivierten Kollagenkissen bezogen auf eine einheitliche Zellzahl von 100000 Zellen bei verschiedenen Stimulationen. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt (n=8). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und SNK-Test (Student-Newman-Keuls-Test).

4.4 Ergänzende Untersuchungen zugrunde liegender Mechanismen der Sternzellkontraktilität

Da Kontraktionen im Wesentlichen mit einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration einhergehen, sollte in einem weiteren Versuchsansatz geklärt werden, inwiefern die Kontraktionen im Falle humaner hepatischer Sternzellen auf diesem Mechanismus beruhen. Die Vorgehensweise bei der Versuchsdurchführung wurde bereits in Kapitel 3.11 beschrieben.

Bei Betrachtung der Abbildung 26 wird deutlich, dass lediglich bei zwei Stimulantien ein Anstieg der Fluoreszenzwerte, welche einen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration repräsentieren, zu verzeichnen war. Dabei stellte das fetale Kälberserum (FKS) eine Positivkontrolle dar, da hierbei in mehreren Vorversuchen ein sehr starker Kontraktionseffekt im Wrinkle Assay festgestellt wurde, dieser in der Literatur

ebenso bereits beschrieben ist und calciumabhängig abläuft (Laleman et al. 2007). Bei FKS wurde ein deutlich signifikanter Anstieg der Fluoreszenz von einem Ausgangswert von 2576 Grauwertdichten auf ein Maximum von 3724 Grauwertdichten nach zehn Sekunden ($p=0,021$) mit darauffolgendem langsamen Absinken der Fluoreszenz auf Werte um 3200 nach zwei Minuten. Im Vergleich zur Positivkontrolle mit FKS verzeichnete das Serum septischer Patienten sogar einen weitaus deutlicheren Fluoreszenz- und somit Calciumanstieg. Ausgehend von 2590 Grauwertdichten wurde nach zehn Sekunden ein Maximum von 5402 Grauwertdichten gemessen ($p=0,009$). Auch hier fiel das intrazelluläre Calcium danach wieder zügig ab und pendelte sich nach 2min auf Werte um 3500 ein.

Im Falle von TGF- β , Endothelin-1 und Zytokinmix zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Calciumkonzentration im Vergleich zum Ausgangswert. Dies deutet darauf hin, dass die im Wrinkle Assay beobachtete Kontraktion bei TGF- β (indirekt durch Kontraktionsabnahme nach Inhibierung durch Anti-TGF- β -IgG) über einen calciumunabhängigen Pathway abläuft.

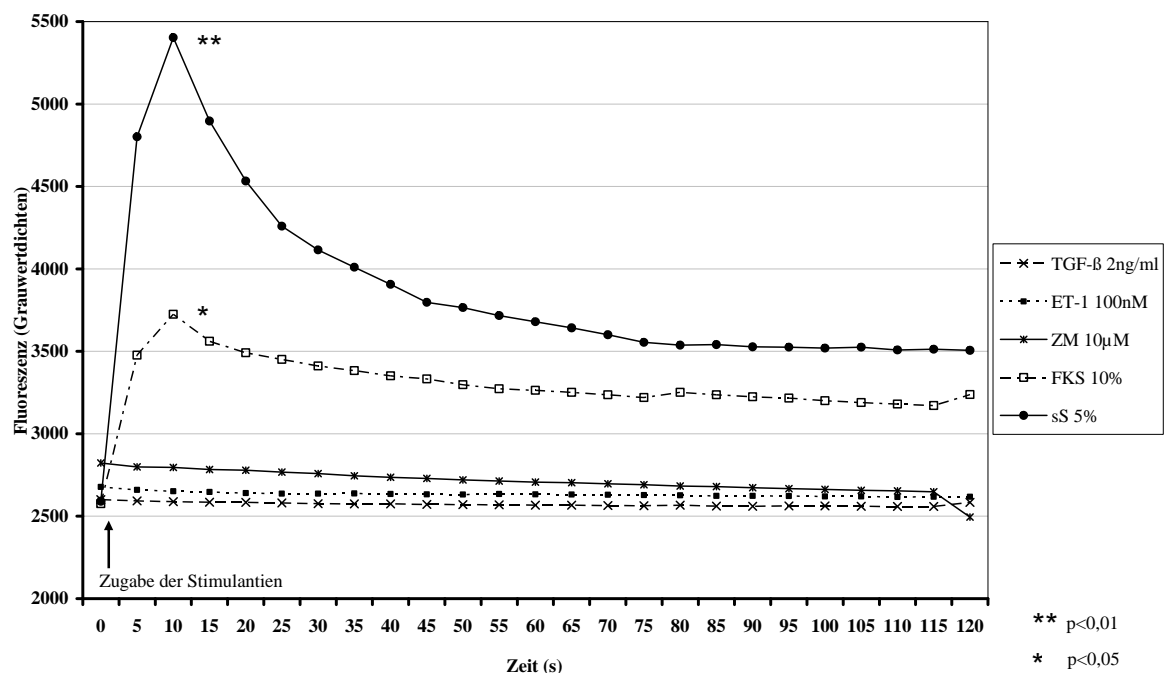


Abb. 26: Graphische Darstellung des dynamischen Verlaufs der Calciumkonzentration mittels Calcium-Imaging nach Stimulation von LX-2-Zellen

Dargestellt ist die Entwicklung der Calciumkonzentration nach Stimulation mit TGF- β , ET-1, Zytokinmix, FKS und Serum septischer Patienten über 2min. Das Calcium in den Zellen wurde durch 30minütige Inkubation mit dem Calcium-Farbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1, AM (Invitrogen™) angefärbt und die Fluoreszenz direkt nach Stimulation alle fünf Sekunden gemessen. Die einzelnen Graphen repräsentieren Mittelwerte aus unabhängigen Einzelstimulationen ($n=3-5$). Es wurden jeweils die Maximalwerte mit den Nullwerten der

Fluoreszenzen miteinander verglichen und mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests statistisch ausgewertet.

4.5 Untersuchung zur Expression von Endothelin-1-Rezeptoren auf LX-2-Zellen

In den in Kapitel 4.3.1 dargelegten Untersuchungen konnte überraschend kein Effekt von ET-1 auf das Kontraktionsvermögen von LX-2-Zellen gezeigt werden. Endothelin-1 ist in der Literatur als starker Konstriktor von hepatischen Sternzellen beschrieben ist (Kawada et al. 1995), im Rahmen der hier vorgestellten Ergebnisse an LX-2-Zellen blieb ein entsprechender Effekt jedoch aus. Da jedoch die in der Literatur beschriebenen Kontraktionsuntersuchungen nie an LX-2-Zellen, sondern stets an primär kultivierten HSCs stattfanden, stellte sich die Frage, ob die LX-2-Zellen überhaupt Endothelin Typ A und B Rezeptoren exprimieren und somit Endothelin-1 überhaupt wirken kann. Mittels Immunhistochemie sollte daher diese Hypothese überprüft werden, In Abbildung 27 ist repräsentativ gezeigt, dass sowohl ETAR als auch ETBR immunhistochemisch auf LX-2-Zellen wiederholt nicht anfärbbar waren, was die Hypothese, dass LX-2-Zellen diese Rezeptoren nicht besitzen, unterstützte.

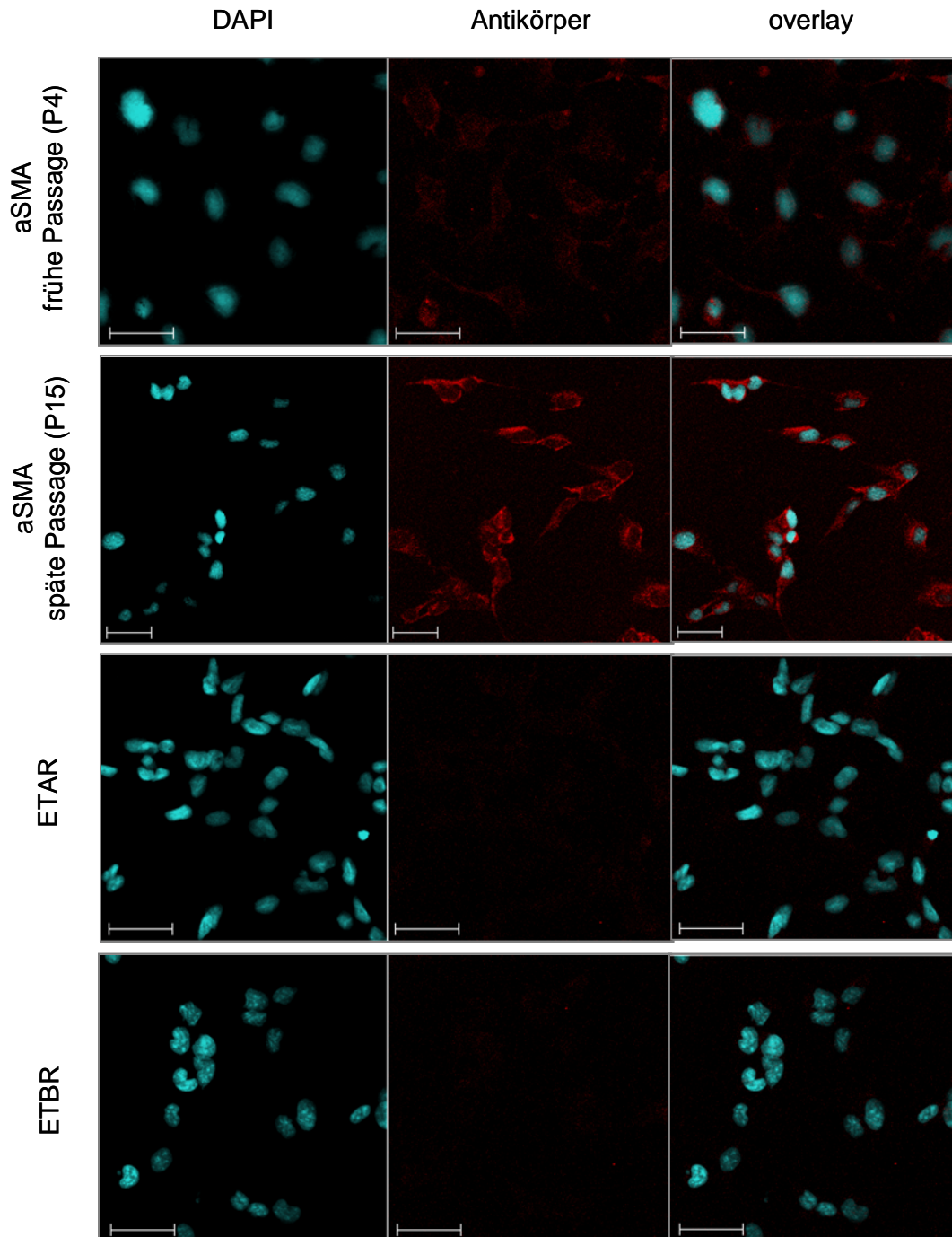


Abb. 27: Immunhistochemische Färbungen von alpha smooth muscle actin (aSMA) und Endothelin Typ A und B Rezeptor (ETAR, ETBR) an LX-2-Zellen

Dargestellt sind jeweils im linken Bild die immunhistochemische Färbung des Zellkerns mittels DAPI, im mittleren Bild die Färbung mit dem jeweiligen Antikörper (aSMA 1:50; ETAR 1:300; ETBR 1:100; sekundärer Antikörper jeweils 1:200) und im rechten Bild ein Überlagerungsbild aus beiden vorangegangenen Bildern. Die jeweiligen Bilder sind repräsentativ für jeweils 3 unabhängige immunhistochemische Färbungen. Die Negativkontrollen der jeweiligen Antikörper sind unter 3.12.1 aufgeführt.

Um des Weiteren zu zeigen, dass ETAR und ETBR zwar nicht in der LX-2-Zellreihe, sehr wohl jedoch an hepatischen Sternzellen auf humanen Leberschnitten exprimiert sind, wurden humane Leberschnitte immunhistochemisch angefärbt. Dabei diente aSMA als Marker aktivierter HSCs dazu, jene Zellen im Lebergewebe zu identifizieren. Die Cofärbung mit ETAR bzw. ETBR zeigte, dass diese hepatischen Sternzellen sowohl Endothelin Typ A als auch Endothelin Typ B Rezeptoren exprimieren, wie dies in Abbildung 28 ersichtlich ist. Die Übereinstimmung zwischen Lokalisation von aSMA und den Endothelin-Rezeptoren zeigt, dass es sich hierbei um hepatische Sternzellen handelt. Somit konnte ein eindeutiger Expressionsunterschied der Endothelinrezeptoren Typ A und B zwischen Leberschnitten und der LX-2-Zelllinie dargestellt werden, was in der Literatur noch nicht beschrieben wurde.

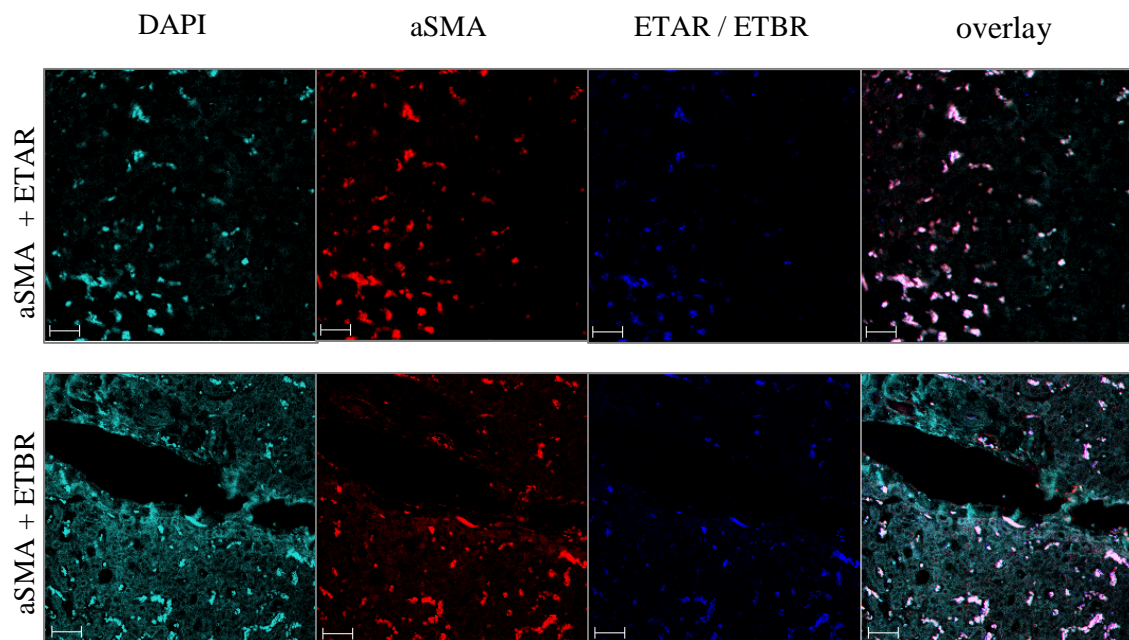


Abb. 28: Immunhistochemische Doppelfärbungen humaner Leberschnitte mit aSMA und ETAR/ ETBR

Im linken Bild wurden mit einer DAPI-Färbung nur die Zellkerne dargestellt. Die im zweiten Bild rot dargestellten Signale zeigen vorhandenes aSMA als Marker für Sternzellen an. Der aSMA-Antikörper wurde jeweils in gleicher Konzentration (1:50) hinzugefügt. Der sekundäre Antikörper war Cy3-fluoreszenzmarkiert und wurde im Verhältnis 1:200 inkubiert. Im dritten Bild von links wurden die Endothelin-Rezeptoren A bzw. B mittels Cy5-fluoreszenzmarkierten sekundärem Antikörper angefärbt (1:200). ETAR wurde jeweils 1:200 und ETBR 1:100 verdünnt inkubiert. Das vierten Bild von links zeigt das Überlagerungsbild aus allen 3 vorangegangenen und verdeutlicht somit nochmal die Kolokalisation von aSMA und Endothelin-Rezeptoren und damit deren Expression auf HSCs in humanen Leberschnitten. Die zwei Bilderserien repräsentieren jeweils drei unabhängige immunhistochemische Färbungen. Die Negativkontrollen sind unter 3.12.2 aufgeführt.

5. Diskussion

Hepatische Sternzellen spielen trotz ihres verhältnismäßig geringen Anteils von ca. 5-8% am Gesamtzellverband der Leber (Atzori et al. 2009) eine wichtige Rolle: dienen sie im gesunden Individuum vor allem der Speicherung und Homöostase von Vitamin A (Hendriks et al. 1985) sowie der Regulation des sinusoidalen Gefäßtonus und somit der Mikrozirkulation (Thimman und Yee 1999), so tragen sie im Rahmen einer chronischen Inflammation als Hauptproduzent extrazellulärer Matrix massiv zum Entstehen der Leberfibrose bei (Henderson und Forbes 2008, Moreira 2007). Wesentlich hierfür ist die Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen von einer ruhenden Zelle in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp mit proliferativen, fibrogenetischen, kontraktilen und chemotaktischen Fähigkeiten (Guyot et al. 2006, Friedman 2008).

Die Frage nach dem Stellenwert hepatischer Sternzellen im akuten Geschehen einer Sepsis ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. So ist zwar bekannt, dass HSCs an der unkontrollierten Zytokinausschüttung bei einer systemischen Inflammation beteiligt sind (Wang und Ma 2008, Moreno und Bataller 2008), jedoch ist bisher unklar, inwieweit es auch bei einer akuten systemischen Inflammation zu einer Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen mit den sich daraus ergebenden lokalen und systemischen Konsequenzen kommt. Dabei nimmt gerade die Leber als zentrales, metabolisch aktives Organ eine Schlüsselrolle bei den pathophysiologischen Veränderungen der Sepsis und der Entwicklung eines Multiorganversagens ein. Da HSCs durch ihre Transdifferenzierung an den Prozessen bei chronischer Inflammation, wie zum Beispiel der alkoholinduzierten Leberfibrose und der portalen Hypertension, maßgeblich beteiligt sind (Cichoż-Lach et al. 2008, Wallace et al. 2008), liegt die Vermutung nahe, dass diese Zellen auch im Rahmen eines akuten inflammatorischen Geschehens wie der Sepsis transdifferenzieren und sich in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp wandeln könnten. Des Weiteren ist bis dato völlig unklar, inwiefern sich akut inflammatorische Bedingungen auf die Kontraktilität von Sternzellen auswirken. Gerade im Kontext von Mikrozirkulationsstörungen im Rahmen einer Sepsis wäre dies zur Klärung der Pathogenese von Interesse. Somit stellt ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge an hepatischen Sternzellen bei einer Sepsis eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis des septischen Leberversagens und somit auch für eine zielgerichtete Therapie mit eventuellem Angriffspunkt an Mechanismen hepatischer Sternzellen in der Zukunft dar.

5.1 Die LX-2-Zelllinie als Modellsystem für hepatische Sternzellen

LX-2-Zellen stellen eine niedrig-passagierte humane Zelllinie dar, die sich aus normalen humanen, spontan immortalisierten Sternzellen ableitet (Xu et al. 2005). Dabei zeichnen sie sich unter anderem dadurch aus, dass sie auch unter niedrigen Serumkonzentrationen proliferieren (1% FKS). Des Weiteren besitzen diese Zellen die typischen Eigenschaften humaner HSCs aus primärer Kultur, wie zum Beispiel die Expression von Desmin und GFAP oder deren Ansprechbarkeit auf PDGF-BB und TGF- β 1 (Xu et al. 2005). Ein entscheidender Vorteil dieser Zelllinie ist, dass diese nicht wie primär kultivierte Sternzellen bereits nach wenigen Tagen in Kultur adhäsionsbedingt aktiviert werden und sich in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp wandeln (Rockey et al. 1992, Xu et al. 2005, Knittel et al. 1999, De Minicis et al. 2007). Gerade im Rahmen aufwändiger Experimente wäre es schwer, primäre Sternzellen in einem ähnlichen Transdifferenzierungszustand zu erhalten. Die Stabilität der LX-2-Zellen in dieser Hinsicht überwindet dieses Problem, so dass diese Zelllinie mittlerweile in zahlreichen Veröffentlichungen als Modellsystem verwendet wird. Auch sollte an dieser Stelle explizit darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der LX-2-Zelllinie um eine humane Zelllinie handelt.

Aufgrund der Tatsache, dass diese Zelllinie unter allen Kultivierungsbedingungen auch in früher Passage α -SMA, wenn auch in geringerer Menge als bei prolongierten Passagen, exprimiert, müssen LX-2-Zellen als zumindest teilaktivierte hepatische Sternzellen betrachtet werden, da dieses Protein einen etablierten Marker der Sternzellaktivierung darstellt (Rockey et al. 1992, Schmitt-Graff et al. 1991). Unter niedrigen Serumkonzentrationen (Taimr et al. 2003), wie dies auch in der vorliegenden Arbeit der Fall war, und bei Wachstum in Matrigel (Xu et al. 2005) ist allerdings eine phänotypisch geringere Ausprägung der Teilaktivierung beschrieben. Im Rahmen von Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass jedoch bei zahlreicher Passagierung der Transdifferenzierungszustand der LX-2-Zellen zunimmt (siehe Kapitel 3.5), woraufhin in den hier präsentierten Experimenten nur niedrig passagierte LX-2-Zellen verwendet wurden. Inwiefern die beschriebene Teilaktivierung der LX-2-Zellen die generierten Ergebnisse beeinflusste, würde nur durch eine identische Versuchsdurchführung mit Ratten-HSCs oder primären humanen HSCs endgültig geklärt werden. Da jedoch die Ergebnisse sehr stark für Veränderungen sprechen, die auf eine Aktivierung bzw. Transdifferenzierung der LX-2-Zellen hindeuten, kann im Umkehrschluss davon

ausgegangen werden, dass der Grad der Teilaktivierung vor Stimulationsbeginn lediglich gering gewesen sein kann. Des Weiteren gibt es prinzipiell keine nativen hepatischen Sternzellen in einer Zellkultur, da – wie bereits angeführt -eine Adhäsion jener Zellen auf dem Boden der Zellkulturflaschen immer bereits mit einer Teilaktivierung verbunden ist (Knittel et al. 1999, De Minicis et al. 2007).

Überraschend war die Feststellung, dass weder die funktionellen Untersuchungen noch die Immunhistochemie für eine Expression von Endothelinrezeptoren auf LX-2-Zellen sprachen (siehe hierzu auch Diskussion im Kap. 5.3). Ob dies auf die Immortalisierung, Kultivierung, Passagierung oder andere Ursachen zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nicht weiter geklärt werden. Die Fragestellung, inwiefern Agonisten einer Sternzellkontraktion wie Endothelin-1 nach einer proinflammatorischen Stimulation einen stärkeren Effekt ausüben konnte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden.

Ein weiterer Punkt ist die kritische Betrachtung des verwendeten Zellkulturmodells an sich. Ein reines Zellkulturmodell kann jeweils nur die Effekte auf diese eine verwendete Zelllinie untersuchen. Parakrine oder endokrine Interaktionen von und mit anderen Zellen bleiben hierbei aus. Des Weiteren fehlt die Einbettung der Zellen in deren natürlich vorhandene extrazelluläre Matrix und die Auswirkungen veränderter ECM. So stellt zum Beispiel die veränderte extrazelluläre Matrix bei der Leberfibrose ein Reservoir für diverse Wachstumsfaktoren und MMPs dar, die wiederum hepatische Sternzellen beeinflussen (Olaso et al. 2002). Andererseits bietet ein reines Zellkulturmodell wiederum die Möglichkeit, unabhängig von anderen Zellarten Ursache und Wirkung genau einer Zelllinie zu untersuchen. Somit ist es unerlässlich, dass die vorliegenden Ergebnisse in weiteren Versuchen beispielsweise im Tiermodell oder an humanen Leberresektaten überprüft werden.

5.2 Beeinflusst eine proinflammatorische Stimulation hepatischer Sternzellen *in vitro* die Expression von Genen, die für eine Transdifferenzierung relevant sind?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden mithilfe der Ingenuity[®] Pathway Analysis Software zunächst jene Gene identifiziert, die in den Signalwegen der hepatischen Sternzellaktivierung involviert sind. Daraufhin wurden in zwei Microarrays unter proinflammatorischer Stimulation und unter Stimulation mit TGF- β als etablierten Mediator der Fibrogenese (Leask und Abraham 2004, Li et al. 2009) diese, für die Transdifferenzierung der HSCs relevanten Transkripte auf eine signifikante Regulation untersucht. Dabei unterlagen 38 der insgesamt 62 relevanten Transkripte einer signifikanten Regulation. Die Transkriptauswahl erfolgte hierbei unter dem Aspekt des Zusammenhangs mit fibrotischen Veränderungen. Dabei ist jedoch anzumerken, dass die in der Literatur beschriebenen Genexpressionsveränderungen hierbei vorrangig auf einer alkoholinduzierten Fibrose basierten (Casini et al. 1993, Svegliati-Baroni et al. 2001). Inwiefern sich jedoch die Signalwege alkohol- und eventueller sepsisinduzierter Fibrose gleichen, wurde an dieser Stelle nicht untersucht. Dies könnte möglicherweise einerseits den Einschluss von Transkripten bedingen, die bei der sepsisinduzierten Fibrose nicht relevant sind, andererseits aber auch zum Fehlen von Transkripten bei der Sepsis als auslösenden Faktor führen.

Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen proinflammatorischer Stimulation mit Zytokinmix und jener mit dem Serum septischer Patienten, wobei der Effekt von Zytokinmix deutlich stärker ausgeprägt war. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Zytokinconstellation des gepoolten Serums von septischen Patienten der pathophysiologischen Konstellation *in vivo* am nächsten kommt. Hierin liegt auch eine wesentliche Stärke der methodischen Bearbeitung dieser Thematik begründet, da trotz Vorhandenseins von LPS im Zytokinmix, dies die gesamte Bandbreite der systemischen pathophysiologischen Veränderungen bei einer Sepsis nicht in seiner Vollkommenheit widerspiegeln kann. Im Falle der Stimulation mit Zytokinmix ist somit fraglich, inwiefern die Kombination von lediglich TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und LPS den bei einer Sepsis beobachteten sogenannten Zytokinsturm mit einer überschießenden Konzentration sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine (Aikawa 1996, Sriskandan und Altmann 2008) gerecht wird. Dabei könnte die Überschätzung des Effektes bei der Zytokinmix-Stimulation auch damit zusammenhängen, dass eben jener kompensatorische Anteil

antiinflammatorischer Zytokine fehlt bzw. die isolierte Betrachtung humaner hepatischer Sternzellen in der Zellkultur nur unzureichende Möglichkeiten zur Produktion antiinflammatorischer Zytokine bietet. So wird zum Beispiel TGF- β neben der Synthese in hepatischen Sternzellen auch in Kupffer-Zellen, Hepatozyten, Endothelzellen, Monozyten und Thrombozyten synthetisiert (Czaja et al. 1989, Bissell et al. 1995). Auch das antiinflammatorische IL-10 wird von Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen produziert (Grutz 2005). Somit wird deutlich, dass gerade im Falle der Stimulation einer reinen HSC-Zellkultur mit rein proinflammatorischem Zytokinmix es eher zu einer Überschätzung der Effekte *in vivo* kommt. Dennoch sollten bei der experimentellen Herangehensweise auch genau jene Effekte ausgelöst durch rein proinflammatorische Zytokine ohne Beeinflussung anderer Faktoren untersucht werden.

Gleiches gilt für die Tatsache, dass Zytokinmix bei den Microarray-Analysen auch im Vergleich zu TGF- β zu einer stärkeren Aktivierung führte. Auch wenn TGF- β als etablierter Fibrosemediator (Leask und Abraham 2004, Proell et al. 2007) für die im Rahmen der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen ablaufende Fibrogenese ein wichtiger Faktor ist, scheint dieses Zytokin zwar die Transdifferenzierung der HSCs zu beschleunigen, ist jedoch hierfür nicht essentiell (Hellerbrand et al. 1999). Reeves und Friedman sehen die Rolle des TGF- β weniger in der Initiierung der Sternzelltransdifferenzierung, sondern vielmehr in deren Aufrechterhaltung (Reeves und Friedman 2002). Dies würde eine Erklärung dafür bieten, dass TGF- β keine biologisch relevanten Effekte zeigte. Darüber hinaus wurde bei TGF- β mit 2ng/ml eine im Vergleich zu Literaturangaben relativ niedrige Dosierung gewählt und auch die Stimulationsdauer war in veröffentlichten Arbeiten mit bis zu 72h oftmals länger als die in dieser Arbeit angewendete (Kharbanda et al. 2004, Shi et al. 2006).

Der bei Stimulation mit Serum septischer Patienten beobachtete Effekt, dass eine kürzere Stimulationszeit zu einer stärkeren Aktivierung von Transkripten führt, scheint auf den ersten Blick verwunderlich. Jedoch könnte dieser Effekt mit einer gesteigerten Apoptoserate der HSCs unter 24-stündiger Stimulation im Vergleich zu sechsstündiger Stimulation erklärt werden. Methodisch ist hierbei kritisch anzumerken, dass im Rahmen der Genexpressionsanalysen keine Vitalitätstestung der Zellen vorgenommen wurde und somit Schwankungen schwerer verifiziert werden können.

Die Tatsache, dass das Serum septischer Patienten im Vergleich zu Zytokinmix und TGF- β die Transdifferenzierung von HSCs auf Genexpressionsebene am wenigsten beeinflusst, könnte einerseits, wie bereits oben beschrieben, durch gewisse Apoptoseeffekte erklärt

werden. Andererseits könnte die Zytokinkonstellation im Serum septischer Patienten mit sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen durch Letztere einen gewissen bremsenden Effekt auf die Transdifferenzierung darstellen. Darüber hinaus ist nochmals zu erwähnen, dass die verwendeten LX-2-Zellen, wie auch schon in Kapitel 5.1 diskutiert, als bereits teilaktiviert betrachtet werden müssen (Xu et al. 2005), was zu einer gewissen Unterschätzung der Veränderungen auf Genexpressionsebene führen könnte.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der quantitativen PCR fällt zunächst auf, dass hierbei von neun Transkripten lediglich ET-1, ETBR, IGFBP3 und IGFBP5 eine eindeutig biologisch relevante Transkriptregulation aufwiesen. Des Weiteren trifft dies, mit Ausnahme von IGFBP5, bei diesen Transkripten lediglich auf die Stimulation mit Zytokinmix zu. Dies bestätigt die Ergebnisse des Microarrays in der Hinsicht, dass die proinflammatorische Stimulation mit Zytokinmix eher zu einer Überschätzung der wahren Effekte führt, wie sie aufgrund der bereits angeführten Argumente im Falle der Stimulation mit Serum septischer Patienten am ehesten angenommen werden können. Lediglich bei IGFBP5 weist die Stimulation mit Serum septischer Patienten sowohl bei sechs, als auch bei vierundzwanzig Stunden eine eindeutige Hochregulation auf. Bei IGFBP3 zeigte sich jedoch ebenfalls eine deutliche Tendenz bei sechsständiger Septikerserum-Stimulation. Diese beiden Transkripte sind einerseits allein deswegen interessant, da sie auch in der Microarray-Analyse signifikant hochreguliert waren und andererseits aufgrund ihrer proliferativen Effekte (Scharf et al. 1998). So stellt die Familie der IGFBPs zusammen mit den IGFs potente Mitogene dar. Ihre Bedeutung wird im Zusammenhang mit der Funktion hepatischer Sternzellen auch dadurch deutlich, dass eine gewisse Akkumulation von IGFBPs in extrazellulärer Matrix stattfindet (LeRoith 1996). Dies könnte zu einer Steigerung ihrer proliferativen Effekte führen, sobald es zu einer gesteigerten ECM-Produktion im Rahmen der Transdifferenzierung von HSCs gekommen ist.

Im Zusammenhang mit der durch die immunistochemischen Färbungen erlangten Erkenntnis, dass LX-2-Zellen keine Endothelin-Rezeptoren exprimieren, stellt sich die Frage, wieso gerade ET-1 und ETBR ebenfalls einer biologisch relevanten Genregulation unterliegen. Im Falle von ET-1 deckt sich dieses Erkenntnis mit der Datenlage aus früheren Publikationen, die jedoch nie an LX-2-Zellen, sondern meist an HSCs isoliert aus Rattenlebern gewonnen wurde (Guo et al. 2004, Pinzani et al. 1996, Housset et al. 1993). Ist der Mechanismus der Wirkungsweise von Endothelin über deren Rezeptoren hinlänglich bekannt, so ist der Signalweg für die Synthese von ET-1 noch weitgehend unklar (Moore 2004). Die gesteigerte Expression von ET-1 auf LX-2-Zellen und die

Abwesenheit von ETAR und ETBR muß somit keinen Widerspruch darstellen, da die proinflammatorischen Zytokine ihre Wirkungen über eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen ausüben. Bezüglich der Expression von ETBR ist anzumerken, dass dieser Rezeptortyp in der vorliegenden Arbeit nur auf Genexpressionsebene und auf das tatsächliche Vorhandensein auf der Zellmembran hin untersucht wurde. Posttranskriptionelle Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass posttranskriptionelle bzw. translationale Modifikationen die fehlende Expression auf der Zellmembran bedingen und stellt somit keinen zwangsläufigen Widerspruch zu den Ergebnissen der Immunhistochemie dar. Für eine Verifizierung sind jedoch weiterführende Untersuchungen mit dieser Zelllinie unabdingbar.

Des Weiteren fällt bei den Ergebnissen der PCR auf, dass die Richtung der Genexpressionsveränderungen teilweise von der zu erwartenden abweicht. So zeigt das TGF- β 1-Transkript lediglich bei 24h-Stimulation mit Zytokinmix und weniger ausgeprägt auch bei TGF- β -Stimulation zumindest eine Tendenz zur Hochregulation. Bei Stimulation mit Serum septischer Patienten war jedoch eine leichte Tendenz zur Downregulation sichtbar. In der Literatur wird eine gesteigerte Expression von TGF- β 1 im Rahmen der Transdifferenzierung von HSCs beschrieben (Hellerbrand et al. 1999, Bissell et al. 1995, Bachem et al. 1992). Da die in dieser Arbeit beobachtete Downregulation aber nur marginal ausfiel, ist die biologische Relevanz sehr fraglich. In weiteren Versuchen an LX-2-Zellen mit größeren Fallzahlen sollte dieses Phänomen allerdings nochmals genauer untersucht werden.

Bezüglich des TGFBR2-Transkriptes wurde unter ZM- und TGF- β -Stimulation eine Tendenz zu einer verringerten Expression festgestellt. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit rezenten Daten aus der Literatur (Meurer et al. 2005, Roulot et al. 1999, Friedman et al. 1994). Roulot et al. beschreiben hierbei ein reziprokes Verhalten von TGF- β 1 und TGFBR2, wobei nach proinflammatorischer Stimulation die TGF- β 1-Expression zunimmt und jene von TGFBR2 abnimmt. Dabei nimmt er eine Liganden-induzierte Downregulation von TGFBR2 als Reaktion auf die gesteigerte TGF- β 1-Expression an, wodurch es zu einer Abmilderung der TGF- β ausgelösten Effekte trotz dessen gesteigerter Expression kommt (Roulot et al. 1999). Interessanterweise wurde dabei jedoch eine Dissoziation zwischen den Auswirkungen auf Proliferation und Fibrogenese beschrieben. Während die verringerte TGFBR2-Expression die antiproliferativen Effekte von TGF- β abmildert, zeigt sich dessen profibrotischer Effekt, gemessen an der mRNA von Kollagen

Typ I, weiterhin prominent. Diese Dissoziation würde somit zu einer Potenzierung der fibrotischen Veränderungen führen.

Ein widersprüchliches Ergebnis ergibt sich vor allem noch in der Betrachtung des Ergebnisses der TIMP2-Expression. Hepatische Sternzellen exprimieren sowohl TIMP1, als auch TIMP2 (Arthur 2000). Während der Sternzellaktivierung kommt es zu einer Hochregulation beider Enzyme mit der Konsequenz einer gesteigerten Inhibierung der ECM-degradierenden Matrixmetalloproteinasen (Iredale 2001). Lediglich im Falle der sechsständigen Stimulation mit dem Serum septischer Patienten kam es zu einer marginalen Hochregulation von TIMP2. Bei Zytokinmix-Stimulation wurde jedoch ein gegenteiliger Effekt beobachtet, der aber keine eindeutige biologische Relevanz aufzeigte. Somit stellt sich erstens die Frage, inwiefern dieser Effekt angesichts der geringen Fallzahl auch bei weitaus größeren Fallzahlen reproduzierbar wäre. Zweitens ist, wie bereits erwähnt, der Unterschied zwischen proinflammatorischer Stimulation mit Zytokinmix und jener mit Serum septischer Patienten einmal mehr zu erwähnen, der im Falle von ZM ebenfalls zu diesem eher unerwartenden Ergebnis geführt haben könnte.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die anfangs aufgeführte Fragestellung, ob eine proinflammatorische Stimulation die Expression von Genen die für die hepatische Sternzellaktivierung relevant sind beeinflusst, bejaht werden kann. Sowohl im Microarray als auch in der quantitativen PCR konnten signifikante und biologisch relevante Expressionsveränderungen von den im Zusammenhang mit der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen stehenden Transkripten aufgezeigt werden. Die unterschiedlichen Richtungen der Genregulation erklären sich hierbei hinreichend mit den verschiedenen Funktionen, welche die verschiedenen Transkripte physiologisch ausüben. Jedoch wird sowohl im Microarray, als auch in der PCR deutlich, dass erhebliche Unterschiede zwischen proinflammatorischer Stimulation mit Zytokinmix einerseits und jener mit dem Serum septischer Patienten andererseits bestehen. Kritisch anzumerken ist, wie bereits erwähnt, die mit Triplikaten relativ geringe Fallzahl der Proben und dass sich im Falle der PCR oftmals lediglich Tendenzen einer Genregulation zeigten, deren posttranskriptionelle Auswirkungen auf physiologischer Ebene nur unzureichend abgeschätzt werden können. Somit wären hier weiterführende Untersuchungen mit größeren Fallzahlen und auf posttranskriptioneller Ebene wünschenswert. Des Weiteren spiegelt die Stimulation hepatischer Sternzellen in einer reinen Zellkultur die physiologische Situation des Lebergewebes *in vivo* nur unzureichend wieder, weshalb Tierexperimente diesbezüglich einen Wissenszuwachs versprechen würden.

5.3 Führt eine proinflammatorische Stimulation hepatischer Sternzellen *in vitro* zu einer gesteigerten Kontraktilität dieser Zellen?

Im Rahmen einer chronisch inflammatorischen Reaktion, wie zum Beispiel der Leberfibrose aufgrund einer chronischen Virushepatitis, ist eine der Hauptkomplikationen die Entwicklung einer portalen Hypertension (Svegliati-Baroni et al. 2008). Hierbei spielt die gesteigerte Kontraktilität hepatischer Sternzellen im Rahmen ihrer Transdifferenzierung mit konsekutiver Vasokonstriktion vor allem der Lebersinusoide eine entscheidende Rolle (Rockey 2006, Reynaert et al. 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, inwiefern sich eine proinflammatorische Stimulation auf das Kontraktionsverhalten von HSCs auswirkt. Mittels Calcium-Imaging sollte zudem der zugrunde liegende Mechanismus der Kontraktilität näher geklärt werden.

Im Verlauf einer Sepsis kommt es neben der exzessiven Ausschüttung vasodilatatorischer Substanzen wie NO (Brovkovych et al. 2001, Vasilev et al. 1996) auch zu erhöhten Plasmakonzentrationen vasokonstriktorischer Substanzen. Dabei ist neben der Plasmakonzentration von Endothelin-1 (Battistini et al. 1996) auch jene von Angiotensin II (Tadros et al. 2000), Vasopressin (Batalhao et al. 2008), Thrombin (Psuja et al. 2002) und Substanz P (Beer et al. 2002) im Rahmen einer Sepsis erhöht. Bezüglich Endothelin-1 wurde der Zusammenhang von einer erhöhten Plasmakonzentration bei einer Sepsis und dem Wirkmechanismus an hepatischen Sternzellen via beider Endothelinrezeptortypen bereits in Kapitel 1.4.2 beschrieben. Die funktionellen Untersuchungen zeigten jedoch, dass bereits native LX-2-Zellen nach Endothelin-1-Zugabe nicht kontrahierten (Abb. 23).

In Anbetracht der Tatsache, dass die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse bezüglich des fehlenden Einflusses von Endothelin-1 auf das Kontraktionsverhalten hepatischer Sternzellen im Widerspruch zur allgemeinen Datenlage der Literatur stehen (Kawada et al. 1996, Rockey und Weisiger 1996), musste eine Erklärung hierfür gefunden werden. Dabei stellte sich die Frage, inwiefern die verwendete LX-2-Zelllinie hierbei eine Rolle gespielt haben könnte. Die meisten Versuche an hepatischen Sternzellen aus publizierten Arbeiten wurden entweder an isolierten Ratten-HSCs (Laleman et al. 2007, Melton et al. 2006, Bataller et al. 2000) oder isoliert aus humaner Leber vorgenommen (Bataller et al. 2003, Pinzani et al. 1996, Rockey et al. 1993). Vor allem jene Daten zu Endothelin-1 und dessen kontraktilen Effekt auf hepatische Sternzellen wurden an Ratten-HSCs generiert (Saab et al. 2002, Chi et al. 2003, Bauer et al. 1995), teilweise jedoch auch an primär kultivierten Sternzellen aus humaner Leber (Zhang et al. 2009). Keine dieser Arbeiten wurde jedoch

mit der LX-2-Zelllinie durchgeführt, was sicherlich auch daran liegt, dass diese Zelllinie erst seit einigen wenigen Jahren verwendet wird.

Anhand der immunhistochemischen Färbungen von α -SMA, Endothelinrezeptor Typ A und Typ B bei LX-2-Zellen einerseits und an humanen Leberschnitten andererseits wurde deutlich, dass beide Endothelinrezeptortypen auf der LX-2-Zelllinie nicht immunhistochemisch anfärbbar waren. Im Falle der humanen Leberschnitte waren jedoch sowohl ETAR als auch ETBR anfärbbar und mithilfe der Cofärbung von α -SMA als Marker für die Sternzellaktivierung (Rockey et al. 1992) auch der Gruppe der hepatischen Sternzellen zuordenbar. Diese Daten sprechen dafür, dass ETAR und ETBR nicht auf den LX-2-Zellen exprimiert sind. Widersprüchlich hierzu scheinen jedoch die generierten Ergebnisse der quantitativen PCR zu sein. Hierbei zeigte sich im Falle von ETBR eine biologisch relevante Downregulation bei Stimulation mit Zytokinmix im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Trotz dieser Downregulation zeigte die PCR, dass das ETBR-Transkript in LX-2-Zellen exprimiert war. Da diese Feststellung sich jedoch nur auf die Transkriptionsebene von ETBR bezieht, widerspricht sich dieses Ergebnis nicht unbedingt mit der fehlenden Expression der Rezeptoren auf der Zellmembran. Durch posttranskriptionelle Modifikationen kann es durchaus dazu kommen, dass die Expression auf der Zellmembran verhindert wird.

Pinzani et al. konnten an humanen HSCs zeigen, dass ET_A-Rezeptoren während der frühen Phase der Transdifferenzierung dominieren, im Laufe fortschreitender Transdifferenzierung jedoch ET_B-Rezeptoren überwogen (Pinzani et al. 1996). Reynaert et al. vermuteten daraufhin, dass dieser Rezeptorshift für verschiedene Funktionen während unterschiedlichen Transdifferenzierungsphasen der HSCs von entscheidender Bedeutung ist (Reynaert et al. 2002). Während eine Stimulation der ET_A-Rezeptoren zu gesteigerter Kontraktion und Proliferation führt, üben ET_B-Rezeptoren unter anderem auch antiproliferative und relaxierende Effekte aus (Mallat et al. 1996, Pinzani et al. 1996).

Unter Stimulation mit Zytokinmix konnte keine Zunahme des Kontraktionsvermögens beobachtet werden, wohl aber unter Stimulation mit dem Serum septischer Patienten. Wie bereits erwähnt, ist jedoch nicht nur das vasokonstriktorische Endothelin-1 bei einer Sepsis erhöht, sondern auch Angiotensin II, Vasopressin, Thrombin und Substanz P. Alle diese Substanzen sind in der Literatur als Mediatoren der Kontraktion hepatischer Sternzellen beschrieben. Bataller et al. beschrieben einen dosisabhängigen Anstieg der Calciumkonzentration mit konsekutiver Kontraktion aktivierter humaner HSCs unter Angiotensin II über deren AT1-Rezeptoren (Bataller et al. 2000). Bei ruhenden HSCs blieb

dieser Effekt jedoch aus, was angesichts der Hypothese, dass diese Zellen im Rahmen einer Sepsis transdifferenzieren jedoch von untergeordneter Bedeutung ist. Auch Vasopressin führt an humanen Sternzellen über V1-Rezeptoren zu einer Kontraktion (Bataller et al. 1997). Thrombin führt ebenso über eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration und somit zu einer Kontraktion aktivierter hepatischer Sternzellen (Tao et al. 1999). Und auch im Falle von Substanz P ist ein dosisabhängiger kontrahierender Effekt auf kultivierte HSCs beschrieben (Sakamoto et al. 1993). Die zusammenhängende Betrachtung von erhöhten Plasmaspiegeln vasokonstriktorischer Substanzen einerseits und der belegten kontraktilen Wirkung mit Serum septischer Patienten auf hepatische Sternzellen andererseits verdeutlicht, dass die alleinige Stimulation mit einem Zytokinmix als Summe einzelner proinflammatorischer Zytokine nicht den gleichen kontraktilen Effekt haben kann, wie gepoolte Serumproben von Patienten, die alle die Kriterien einer schweren Sepsis erfüllten. Des Weiteren konnten eventuelle Verfälschungen durch Ungenauigkeiten bei der Zellzahl bzw. durch Apoptose von Zellen mithilfe der Eichung anhand des WST-1-Zellproliferationsassays ausgeschlossen werden.

Im Calcium-Imaging wurde deutlich, dass der zugrunde liegende Mechanismus der Kontraktion unter Septikerserum über einen calciumunabhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt wird. In der Literatur ist die Annahme, dass transdifferenzierte HSCs die Kontraktion über einen calciumabhängigen Signaltransduktionsweg vermitteln, allgemein anerkannt (Bataller et al. 2001, Reynaert et al. 2002, Rockey 2003). Dabei führt eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, entweder durch Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum oder durch Influx aus dem Extrazellulärraum über Calciumkanäle, über die Bindung an Calmodulin zur Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK). Dadurch wird die Leichtkette des Myosins (MLC) phosphoryliert, die ATPase-Aktivität des Myosinköpfchens beginnt, wodurch die Myosin-Aktin-Bindung ermöglicht wird und der Querbrücken-Zyklus und somit die Kontraktion beginnen kann (Gao et al. 2001). In den letzten Jahren rückte jedoch ein weiterer, calciumunabhängiger Signalweg in den Mittelpunkt kontraktiler Untersuchungen an hepatischen Sternzellen. Dabei spielt zwar auch die vermehrte Phosphorylierung der MLC eine entscheidende Rolle, jedoch nicht aufgrund der calciumabhängigen gesteigerten Kinase-Aktivität von MLCK, sondern vielmehr aufgrund einer Inhibierung der Phosphatase-Aktivität der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP). In der Literatur ist sowohl der RhoA-Signalweg als auch der Proteinkinase C (PKC) Signalweg in den letzten

Jahren als calciumunabhängiger und kontraktionsauslösender MLCP-inhibierender Mechanismus beschrieben (Melton et al. 2006, Parizi et al. 2000, Kawada et al. 1999). Laleman et al. konnten zeigen, dass die Neutralisation der Rho-assoziierten Kinase mithilfe des Inhibitors Y-27632 einerseits und jene von PKC mithilfe von Staurosporin andererseits, die FKS-vermittelte Kontraktion hepatischer Sternzellen dosisabhängig reduzierte, jedoch nicht komplett aufhob (Laleman et al. 2007). Andererseits wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine Calcium/Calmodulin-abhängige Aktivierung der MLCK für die HSC-Kontraktion notwendig ist, jedoch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration insuffizient für eine weitere Kontraktionssteigerung ist. Laleman et al. beschrieben auch als erste die sogenannte „Calcium-Sensibilisierung“ bei HSCs: Durch die Inhibierung der MLCP mithilfe von Calyculin konnte die Kontraktionskraft sogar unter Calcium-depletierten Verhältnissen und somit unabhängig von den intrazellulären Calciumkonzentrationen gesteigert werden. Zusammenfassend wies er sowohl calciumabhängigen als auch –unabhängigen Signalwegen eine Bedeutung für die Kontraktionssteigerung hepatischer Sternzellen zu.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit den durchgeführten Versuchen eine Transdifferenzierung durch proinflammatorische Stimulation auf funktioneller Ebene nicht nachgewiesen werden konnte. Die geplanten Untersuchungen zur kontraktile Wirkung von Endothelin-1 nach proinflammatorischer Stimulation scheiterten, da LX-2-Zellen keine Endothelinrezeptoren exprimierten. Wohl aber konnte eindrücklich gezeigt werden, dass bereits eine akute proinflammatorische Stimulation mit dem Serum septischer Patienten *per se* zu einer gesteigerten Kontraktilität hepatischer Sternzellen führt, die über einen calciumunabhängigen Mechanismus vermittelt wird. Da das antiinflammatorische Zytokin TGF- β 1 einerseits im Rahmen einer Sepsis erhöht ist (Marie et al. 1996, Zanotti et al. 2002) und andererseits als potenter Konstriktor hepatischer Sternzellen bekannt ist (Kharbanda et al. 2004), wurde die Hypothese generiert, dass die beschriebene kontraktile Wirkung von septischem Serum primär TGF- β -vermittelt ist. Die Ergebnisse der hierzu durchgeführten Untersuchungen finden sich im folgenden Kapitel.

5.4 Welchen Einfluss hat das Zytokin TGF- β 1 bei der sepsisinduzierten Kontraktion hepatischer Sternzellen?

Das Zytokin TGF- β 1 spielt im Rahmen der Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen eine entscheidende Rolle. So ist dieses Zytokin maßgeblich an profibrotischen Veränderungen sowohl in der Initiationsphase als auch in der Aufrechterhaltungsphase der Transdifferenzierung beteiligt (siehe Kapitel 1.4.1 und 1.4.2). Die Beteiligung an der Transdifferenzierung wird dadurch deutlich, dass es unter TGF- β -Stimulation zu einer gesteigerten α -SMA-Expression als Marker der Sternzellaktivierung kommt (Desmouliere et al. 1993). Die profibrotische Wirkung ist dabei nicht nur auf die Leber beschränkt. TGF- β partizipiert ebenso an der gesteigerten Produktion extrazellulärer Matrix durch Myofibroblasten in Lunge und Niere im Rahmen chronisch inflammatorischer Veränderungen (Wells 2000, Kang et al. 2007, Lee et al. 2009). Neben diesem profibrotischen Effekt übt TGF- β aber auch noch andere Funktionen aus. So ist es ein wichtiger Regulator der Zellproliferation, wobei zwar auch proliferative Wirkungen beschrieben sind, in der Mehrzahl der Fälle jedoch eine antiproliferative Wirkung auf die Zellen, inklusive Hepatozyten und HSCs, überwiegt (Polyak 1996, Russell et al. 1988). Dabei stellten Roulot et al. eine Dissoziation antiproliferativer und profibrotischer Veränderungen an HSCs fest. Bei chronischer Hepatitis C zeigte er eine Erhöhung der mRNA von TGF- β 1 sowie eine Verminderung jener von TGFBR2 auf, wodurch die antiproliferative Wirkung vermindert, die profibrotische Wirkung jedoch unbeeinträchtigt blieb (Roulot et al. 1999). Ursächlich hierfür wurde angenommen, dass zur Generierung antiproliferativer Effekte beide Rezeptortypen in voller Aktivität benötigt werden, die Fibrogenese jedoch auch bei niedrigen TGFBR2-Expressionen erhalten bleibt. Des Weiteren spielt dieses Zytokin im Rahmen von Zellmigration, Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle (Shi und Massague 2003, Ten Dijke et al. 2002). Außerdem wurde unter TGF- β 1-Stimulation eine Downregulation vor allem von ET_B-, aber auch von ET_A-Rezeptoren sowie eine Steigerung der Endothelinsynthese in HSCs festgestellt (Gabriel et al. 1999). TGF- β 1 hat zudem eine antiinflammatorische Wirkung und ist bei Patienten mit Sepsis deutlich erhöht (Marie et al. 1996, Zanotti et al. 2002).

Hinsichtlich kontraktiler Effekte und des Zusammenhanges zu TGF- β wurde bereits in Fibroblasten der Lunge eine Kontraktionssteigerung unter TGF- β beschrieben (Mio et al. 1998). Dabei spielt sicherlich die TGF- β induzierte gesteigerte Expression von α -SMA als wichtiges kontraktiles Protein eine entscheidende Rolle (Desmouliere et al. 1993).

Kharbanda et al. kamen zu dem gleichen Schluss und stellten des Weiteren eine dosisabhängige Steigerung der PKC-Expression in diesem Zusammenhang fest. Außerdem führte eine Präinkubation mit einem PKC- ϵ -spezifischen Inhibitor zu einer kompletten Auflösung TGF- β induzierter kontraktile Effekte an Ratten-HSCs, was für dessen Beteiligung am Signaltransduktionsweg der TGF- β vermittelten Kontraktion spricht (Kharbanda et al. 2004).

Im Rahmen der beschriebenen Kontraktionszunahme unter Stimulation mit Serum septischer Patienten sollte nun untersucht werden, inwiefern dieser Effekt TGF- β 1-vermittelt ist. Wie die in Abbildung 25 gezeigten Ergebnisse belegen, konnte durch eine Neutralisation des Transforming Growth Factors Beta-1 mithilfe des Anti-TGF- β -Immunglobulins die kontraktile Wirkung des Serums septischer Patienten drastisch reduziert werden und erreichte fast das Niveau der unstimulierten Kontrolle. Anhand des vergleichbaren Kontraktionseffektes der Isotypkontrolle aus kombinierter Stimulation mit Serum septischer Patienten und unspezifischem IgG konnte bewiesen werden, dass allein die selektive Neutralisation von TGF- β für die Verminderung der Kontraktion verantwortlich ist. Dennoch ist anzumerken, dass auch unter Neutralisation von TGF- β das Niveau der unstimulierten Kontrolle nicht komplett erreicht wurde und sich der Unterschied sogar als statistisch signifikant erwies. Ursächlich hierfür könnte eine möglicherweise unvollständige Neutralisation von TGF- β unter der verwendeten Konzentration und Inkubationszeit sein, obwohl Anti-TGF- β -IgG bei Verwendung der vierfachen 50%-Neutralisationsdosis (ND₅₀) im Überfluss hinzugegeben wurde. Außerdem könnten weitere in dem Serum septischer Patienten vermehrt enthaltene Substanzen, wie zum Beispiel Endothelin-1 (Piechota et al. 2007), Vasopressin (Batalhao et al. 2008) oder Angiotensin II (Doerschug et al. 2010) für einen Teil der kontraktile Effekte, unabhängig von TGF- β , verantwortlich sein, was den geschilderten Sachverhalt ebenso hinreichend erklären würde.

Des Weiteren wurde anhand der generierten Ergebnisse des Calcium-Imagings deutlich, dass der kontraktile Effekt von TGF- β nicht mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration einherging und somit calciumunabhängig abläuft. Damit scheint sich allerdings eine Diskrepanz zwischen dem aufgezeigten calciumabhängigen Signaltransduktionsweg des Serums septischer Patienten einerseits und der gezeigten Beteiligung von TGF- β sowie dessen calciumunabhängiger Signaltransduktionsweg andererseits zu ergeben. Wie bereits erwähnt, konnte unter TGF- β -Neutralisation keine vollständige Relaxation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erreicht werden. Somit

ist es durchaus wahrscheinlich, dass TGF- β zwar zu einem erheblichen Teil, aber nicht allein für die gesteigerte Kontraktilität hepatischer Sternzellen unter septischen Bedingungen verantwortlich ist. Weitere im Serum septischer Patienten vorhandene und bereits erwähnte konstriktorische Substanzen könnten hierbei für die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration verantwortlich sein. Zur Bestätigung dieser Vermutung sind jedoch weiterführende Versuche mit beispielsweise Vasopressin, Angiotensin II, Thrombin und Substanz P erforderlich. Außerdem sollte in diesem Zusammenhang in Zukunft untersucht werden, ob, wie an Ratten-HSCs gezeigt (Kharbanda et al. 2004), bei diesem Versuchsaufbau unter Verwendung der LX-2-Zellen als humane Sternzelllinie und deren Stimulation mit TGF- β ebenso der PKC- ϵ -Signalweg von entscheidender Bedeutung ist, beziehungsweise, ob, wie im Falle von Endothelin-1 aufgezeigt (Laleman et al. 2007), andere, calciumunabhängige Signaltransduktionswege wie der RhoA/Rho-Kinase Signalweg ebenso eine Rolle spielen.

Zusammenfassend wurde durch die gewonnenen Ergebnisse deutlich, dass das Zytokin TGF- β 1 auch unter experimentellen Sepsisbedingungen im Rahmen einer akuten inflammatorischen Stimulation mit Serum septischer Patienten wesentlich zu der gesteigerten Kontraktilität humaner hepatischer Sternzellen beiträgt. Andere Studien ließen eine Beteiligung des PKC-Signalweges vermuten, was jedoch unter septischen Bedingungen in weiterführenden Versuchen und letztendlich auch in Tierexperimenten und perfundierten humanen Lebermodellen verifiziert werden sollte. Dennoch bieten die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eine Grundlage für die Entwicklung neuer spezifischer Therapiekonzepte im Rahmen des septischen Leberversagens. Denkbar wäre hierbei die Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation mit TGF- β -Antikörpern. Aufgrund der zentralen Bedeutung der Proteinkinase C bei der Signaltransduktion und diversen regulatorischen Funktionen ubiquitär im Körper, bietet eine Modulation auf dieser Ebene jedoch keinen erfolgsversprechenden Ansatz.

Transdifferenzierung unter septischen Bedingungen *in vitro*

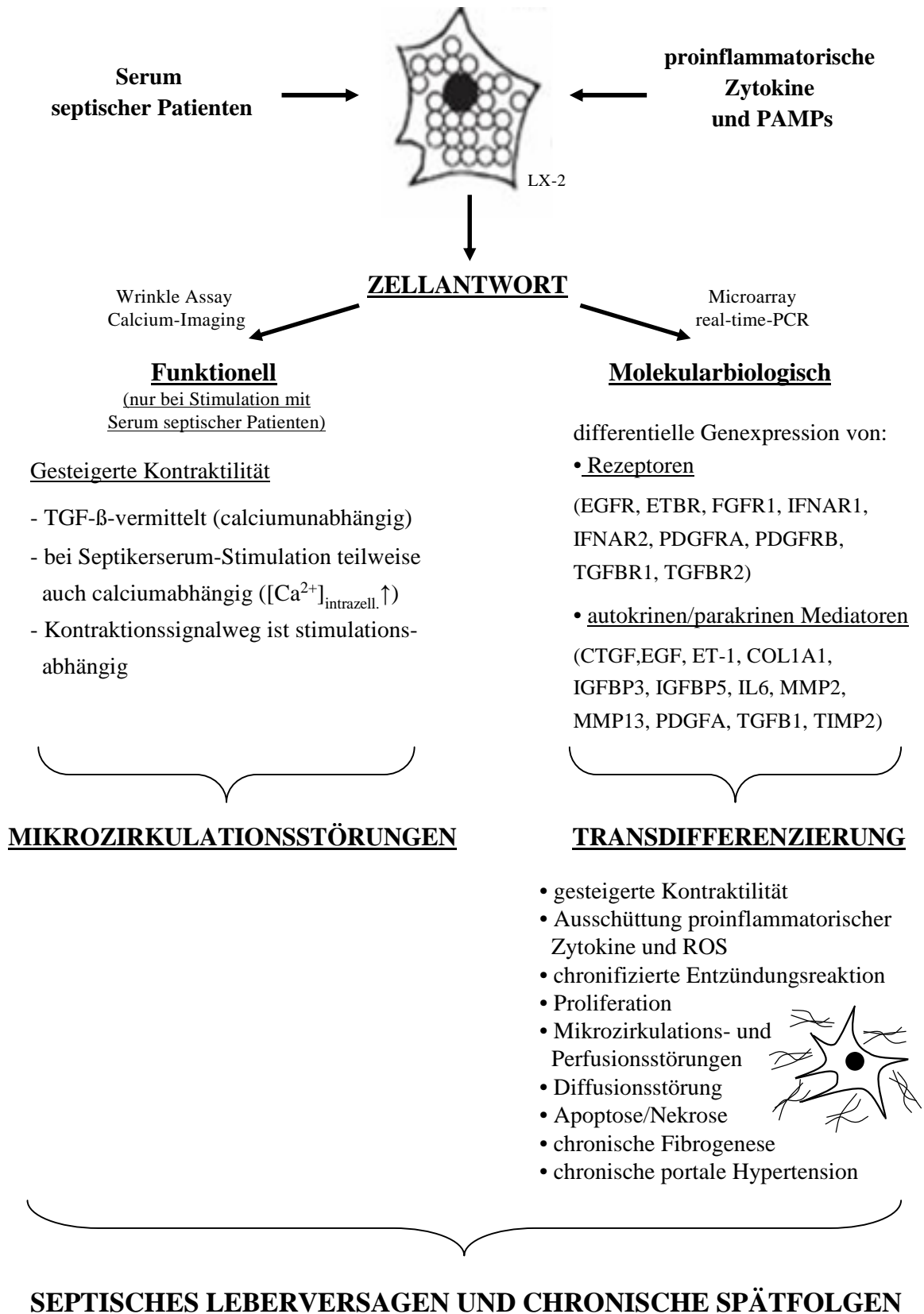


Abb. 29: Zusammenfassendes Schaubild der generierten Ergebnisse und deren Einsortierung in den klinischen Kontext des septischen Leberversagens.

6. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese bearbeitet, dass es im Rahmen einer akuten inflammatorischen Reaktion wie der Sepsis zu einer Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen kommt. Aufgrund der mit einer Transdifferenzierung einhergehenden funktionellen und morphologischen Veränderungen der Sternzellen, würde diese Erkenntnis zeigen, dass auch eine Sepsis zur Zellproliferation und Akkumulation extrazellulärer Matrix und somit zur Fibrogenese der Leber beiträgt.

Anhand der Genexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass eine proinflammatorische Stimulation hepatischer Sternzellen *in vitro* zu signifikanten und biologisch relevanten Veränderungen von, mit einer Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen assoziierten, Transkripten einhergeht. Dies spricht auf molekularbiologischer Ebene für die Bestätigung der Hypothese mit weitreichenden Konsequenzen. So ist hinlänglich bekannt, dass diese Transdifferenzierung unter anderem zu profibrotischen Veränderungen führt. Somit scheinen die systemischen Veränderungen einer Sepsis die Leberfunktion nicht nur akut im Rahmen einer Leberinsuffizienz oder eines drohenden Leberversagens einzuschränken, sondern stellen ebenso einen Erklärungsansatz für chronische Störungen der Mikrozirkulation aufgrund der gesteigerten Kontraktilität hepatischer Sternzellen, der Entstehung einer portalen Hypertension sowie für eine Leberfibrose aufgrund der exzessiven Produktion und qualitativen Veränderungen der extrazellulären Matrix dar. Inwiefern sich die gewonnenen Erkenntnisse in weiteren Versuchen *in vivo* bestätigen, muß jedoch abgewartet werden.

Eine Untersuchung der Sternzellkontraktilität unter Stimulation mit dem Serum von Patienten, die nach Definition einer schweren Sepsis unterlagen, zeigte in den durchgeführten funktionellen Untersuchungen eine deutliche Zunahme des Kontraktionsvermögens. Das antiinflammatorische Zytokin Transforming Growth Factor Beta-1 (TGF- β 1) konnte als wesentlicher Mediator der Kontraktilität identifiziert werden. Die TGF- β 1-vermittelte Kontraktion wird durch calciumunabhängige Signalwege initiiert und war durch Einsatz eines spezifischen TGF- β -Antikörpers weitestgehend antagonisierbar. TGF- β 1 stellt somit nicht nur einen, wie allgemein in der Literatur beschrieben, entscheidenden Faktor für die Fibrogenese dar, sondern spielt ebenso eine bedeutsame Rolle für die Modulation der Kontraktilität hepatischer Sternzellen. Dies zeigt, welche vielfältigen Einflüsse TGF- β 1 auf die hepatischen Sternzellen aufweist. Diese

Erkenntnis wird erst durch einige wenige Veröffentlichungen in jüngerer Vergangenheit unterstützt, ist jedoch in Anbetracht der möglichen therapeutischen Konsequenzen durch eine Inhibierung dieses Zytokins von größter Bedeutung. Einerseits könnte die Kontraktion von HSCs durch die Inhibierung von TGF- β 1 abgeschwächt und somit konsekutiv die hepatische Mikrozirkulation verbessert werden. Andererseits könnte der profibrotische Stimulus von TGF- β 1 durch dessen Inhibierung weitestgehend gemildert werden.

Die in der vorgelegten Arbeit generierten Erkenntnisse wurden so in der Literatur noch nicht beschrieben und zeigen, dass es auch unter akuter Inflammation zu einer Sternzelltransdifferenzierung kommen kann und, dass bereits proinflammatorische Bedingungen *per se* eine Zunahme der Sternzellkontraktilität zur Folge haben. Sicherlich müssen diese Erkenntnisse durch weitere Versuche *in vitro* und vor allem *in vivo* genauer untersucht werden. Dennoch wurde mit dieser Arbeit ein neuer Denkansatz eingebracht und bietet die Chance, durch eine weitere Aufklärung die Folgen einer akuten Inflammation auf die Sternzelle aufzuzeigen und somit unser pathomechanistisches Verständnis für das septische Leberversagen zu erweitern und gegebenenfalls in Zukunft neue Therapiestrategien zu entwickeln.

7. Literaturverzeichnis

- Aikawa N. 1996. Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 97 (9):771-777.
- Aikawa N. 1996. [Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 97 (9):771-777.
- Arthur MJ. 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279 (2):G245-249.
- Aruin LI, Loginov AS, Shatalova OL. 1987. [Stellate reticuloendotheliocytes in cirrhosis of the liver]. *Arkh Patol*, 49 (3):31-37.
- Atzori L, Poli G, Perra A. 2009. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 41 (8-9):1639-1642.
- Bachem MG, Melchior R, Gressner AM. 1989. The role of thrombocytes in liver fibrogenesis: effects of platelet lysate and thrombocyte-derived growth factors on the mitogenic activity and glycosaminoglycan synthesis of cultured rat liver fat storing cells. *J Clin Chem Clin Biochem*, 27 (9):555-565.
- Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. 1992. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest*, 89 (1):19-27.
- Bakker J, Grover R, McLuckie A, Holzapfel L, Andersson J, Lodato R, Watson D, Grossman S, Donaldson J, Takala J. 2004. Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med*, 32 (1):1-12.
- Batalhao ME, Moreto V, Stabile AM, Antunes-Rodrigues J, Carnio EC. 2008. Role of dexamethasone on vasopressin release during endotoxemic shock. *Regul Pept*, 147 (1-3):67-71.
- Bataller R, Brenner DA. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115 (2):209-218.
- Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. 2000. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 118 (6):1149-1156.
- Bataller R, Nicolas JM, Gines P, Esteve A, Nieves Gorbis M, Garcia-Ramallo E, Pinzani M, Ros J, Jimenez W, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. 1997. Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 113 (2):615-624.
- Bataller R, Gasull X, Gines P, Hellemans K, Gorbis MN, Nicolas JM, Sancho-Bru P, De Las Heras D, Gual A, Geerts A, Arroyo V, Rodes J. 2001. In vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology*, 33 (4):956-962.
- Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, Colmenero J, Nicolas JM, Jimenez W, Weich N, Gutierrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodes J. 2003. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology*, 125 (1):117-125.

- Battistini B, Forget MA, Laight D. 1996. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines. *Shock*, 5 (3):167-183.
- Bauer M, Zhang JX, Bauer I, Clemens MG. 1994. ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. *Am J Physiol*, 267 (1 Pt 1):G143-149.
- Bauer M, Paquette NC, Zhang JX, Bauer I, Pannen BH, Kleeberger SR, Clemens MG. 1995. Chronic ethanol consumption increases hepatic sinusoidal contractile response to endothelin-1 in the rat. *Hepatology*, 22 (5):1565-1576.
- Baveja R, Kresge N, Ashburn JH, Keller S, Yokoyama Y, Sonin N, Zhang JX, Huynh T, Clemens MG. 2002. Potentiated hepatic microcirculatory response to endothelin-1 during polymicrobial sepsis. *Shock*, 18 (5):415-422.
- Beer S, Weighardt H, Emmanuilidis K, Harzenetter MD, Matevossian E, Heidecke CD, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B. 2002. Systemic neuropeptide levels as predictive indicators for lethal outcome in patients with postoperative sepsis. *Crit Care Med*, 30 (8):1794-1798.
- Benninger J, Grobholz R, Oeztuerk Y, Antoni CH, Hahn EG, Singer MV, Strauss R. 2005. Sclerosing cholangitis following severe trauma: description of a remarkable disease entity with emphasis on possible pathophysiologic mechanisms. *World J Gastroenterol*, 11 (27):4199-4205.
- Benyon RC, Arthur MJ. 2001. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*, 21 (3):373-384.
- Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. 1996. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology*, 110 (3):821-831.
- Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*, 26 (10):1175-1186.
- Bissell DM, Choun MO. 1988. The role of extracellular matrix in normal liver. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 151:1-7.
- Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. 1995. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest*, 96 (1):447-455.
- Bolder U, Ton-Nu HT, Schteingart CD, Frick E, Hofmann AF. 1997. Hepatocyte transport of bile acids and organic anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion. *Gastroenterology*, 112 (1):214-225.
- Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Moustafa T, Zollner G, Lee JY, Ballatori N. 2006. Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OSTalpha-OSTbeta in cholestasis in humans and rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290 (6):G1124-1130.
- Brovkovych V, Dobrucki LW, Brovkovich S, Dobrucki I, Kalinowski L, Kiechle F, Malinski T. 2001. Nitric oxide measurements during endotoxemia. *Clin Chem*, 47 (6):1068-1074.
- Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K. 2008. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med*, 358 (2):125-139.
- Burgstahler AD, Nathanson MH. 1995. NO modulates the apicolateral cytoskeleton of isolated hepatocytes by a PKC-dependent, cGMP-independent mechanism. *Am J Physiol*, 269 (5 Pt 1):G789-799.

- Bustin SA. 2009. Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE. *Methods*, 50 (4):217-226.
- Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. 2003. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest*, 83 (5):655-663.
- Casini A, Galli G, Salzano R, Rotella CM, Surrenti C. 1993. Acetaldehyde-protein adducts, but not lactate and pyruvate, stimulate gene transcription of collagen and fibronectin in hepatic fat-storing cells. *J Hepatol*, 19 (3):385-392.
- Casu A, Canepa M, Nanni G. 1994. [Perisinusoidal stellate cells or Ito cells and their role in hepatic fibrosis]. *Pathologica*, 86 (5):467-499.
- Ceppi ED, Smith FS, Titheradge MA. 1996. Effect of multiple cytokines plus bacterial endotoxin on glucose and nitric oxide production by cultured hepatocytes. *Biochem J*, 317 (Pt 2):503-507.
- Chi X, Anselmi K, Watkins S, Gandhi CR. 2003. Prevention of cultured rat stellate cell transformation and endothelin-B receptor upregulation by retinoic acid. *Br J Pharmacol*, 139 (4):765-774.
- Cichoz-Lach H, Celinski K, Slomka M, Kasztelan-Szczerbinska B. 2008. Pathophysiology of portal hypertension. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 2:231-238.
- Cobb JP, Danner RL. 1996. Nitric oxide and septic shock. *Jama*, 275 (15):1192-1196.
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420 (6917):885-891.
- Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambone MA, Wind R, Biempica L, Zern MA. 1989. In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol*, 108 (6):2477-2482.
- Dahn MS, Wilson RF, Lange P, Stone A, Jacobs LA. 1990. Hepatic parenchymal oxygen tension following injury and sepsis. *Arch Surg*, 125 (4):441-443.
- Davenport A. 2010. Management of acute kidney injury in liver disease. *Contrib Nephrol*, 165:197-205.
- De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. 2002. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 166 (1):98-104.
- De Backer D, Creteur J, Noordally O, Smail N, Gulbis B, Vincent JL. 1998. Does hepatosplanchnic VO₂/DO₂ dependency exist in critically ill septic patients? *Am J Respir Crit Care Med*, 157 (4 Pt 1):1219-1225.
- De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. 1997. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol*, 26 (4):886-893.
- De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, Schwabe RF. 2007. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*, 132 (5):1937-1946.
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122 (1):103-111.
- Devlin J, Ellis AE, McPeake J, Heaton N, Wendon JA, Williams R. 1997. N-acetylcysteine improves indocyanine green extraction and oxygen transport during hepatic dysfunction. *Crit Care Med*, 25 (2):236-242.
- Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. 2001. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl):S42-47.
- Dinarello CA. 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*, 112 (6 Suppl):321S-329S.

- Doerschug KC, Delsing AS, Schmidt GA, Ashare A. 2010. Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis. *Crit Care*, 14 (1):R24.
- Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. 2001. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett*, 502 (1-2):4-10.
- Dufour JF, Turner TJ, Arias IM. 1995. Nitric oxide blocks bile canalicular contraction by inhibiting inositol trisphosphate-dependent calcium mobilization. *Gastroenterology*, 108 (3):841-849.
- Emet S, Memis D, Pamukcu Z. 2004. The influence of N-acetyl-L-cystein infusion on cytokine levels and gastric intramucosal pH during severe sepsis. *Crit Care*, 8 (4):R172-179.
- Engler S, Elsing C, Flechtenmacher C, Theilmann L, Stremmel W, Stiehl A. 2003. Progressive sclerosing cholangitis after septic shock: a new variant of vanishing bile duct disorders. *Gut*, 52 (5):688-693.
- Fink MP. 2001. Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin*, 17 (1):219-237.
- Friedman SL. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, 275 (4):2247-2250.
- Friedman SL. 2004. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 1 (2):98-105.
- Friedman SL. 2008. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology*, 254 (3):120-129.
- Friedman SL, Yamasaki G, Wong L. 1994. Modulation of transforming growth factor beta receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response. Enhanced binding and reduced gene expression accompany cellular activation in culture and in vivo. *J Biol Chem*, 269 (14):10551-10558.
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. 1985. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (24):8681-8685.
- Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, Yamasaki G. 1992. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology*, 15 (2):234-243.
- Gabriel A, Kuddus RH, Rao AS, Gandhi CR. 1999. Down-regulation of endothelin receptors by transforming growth factor beta1 in hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 30 (3):440-450.
- Gajic O, Rana R, Winters JL, Yilmaz M, Mendez JL, Rickman OB, O'Byrne MM, Evenson LK, Malinchoc M, DeGoey SR, Afessa B, Hubmayr RD, Moore SB. 2007. Transfusion-related acute lung injury in the critically ill: prospective nested case-control study. *Am J Respir Crit Care Med*, 176 (9):886-891.
- Gao Y, Ye LH, Kishi H, Okagaki T, Samizo K, Nakamura A, Kohama K. 2001. Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction. *IUBMB Life*, 51 (6):337-344.
- Geerts A. 2001. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*, 21 (3):311-335.
- Gelbmann CM, Rummele P, Wimmer M, Hofstadter F, Gohlmann B, Endlicher E, Kullmann F, Langgartner J, Scholmerich J. 2007. Ischemic-like cholangiopathy with secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients. *Am J Gastroenterol*, 102 (6):1221-1229.

- Gressner AM. 1996. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl*, 54:S39-45.
- Grutz G. 2005. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol*, 77 (1):3-15.
- Guo CY, Wu JY, Wu YB, Zhong MZ, Lu HM. 2004. Effects of endothelin-1 on hepatic stellate cell proliferation, collagen synthesis and secretion, intracellular free calcium concentration. *World J Gastroenterol*, 10 (18):2697-2700.
- Gustot T, Durand F, Lebrech D, Vincent JL, Moreau R. 2009. Severe sepsis in cirrhosis. *Hepatology*, 50 (6):2022-2033.
- Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A. 2006. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol*, 38 (2):135-151.
- Han YP, Yan C, Zhou L, Qin L, Tsukamoto H. 2007. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem*, 282 (17):12928-12939.
- Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. 1999. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol*, 30 (1):77-87.
- Henderson NC, Forbes SJ. 2008. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. *Toxicology*, 254 (3):130-135.
- Hendriks HF, Verhoofstad WA, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL. 1985. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp Cell Res*, 160 (1):138-149.
- Hepatology. 1996. Hepatic stellate cell nomenclature. *Hepatology*, 23 (1):193.
- Housset C, Rockey DC, Bissell DM. 1993. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (20):9266-9270.
- Inagaki Y, Okazaki I. 2007. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*, 56 (2):284-292.
- Iredale JP. 2001. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis*, 21 (3):427-436.
- Jakob SM, Ruokonen E, Takala J. 2002. Effects of dopamine on systemic and regional blood flow and metabolism in septic and cardiac surgery patients. *Shock*, 18 (1):8-13.
- Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliensky VE, Wang SS, Bissell DM. 1994. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol*, 127 (6 Pt 2):2037-2048.
- Kang HR, Cho SJ, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. 2007. Transforming growth factor (TGF)-beta1 stimulates pulmonary fibrosis and inflammation via a Bax-dependent, bid-activated pathway that involves matrix metalloproteinase-12. *J Biol Chem*, 282 (10):7723-7732.
- Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. 1997. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys*, 345 (2):278-288.
- Kawada N, Harada K, Ikeda K, Kaneda K. 1996. Morphological study of endothelin-1-induced contraction of cultured hepatic stellate cells on hydrated collagen gels. *Cell Tissue Res*, 286 (3):477-486.
- Kawada N, Seki S, Kuroki T, Kaneda K. 1999. ROCK inhibitor Y-27632 attenuates stellate cell contraction and portal pressure increase induced by endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 266 (2):296-300.
- Kawada N, Kuroki T, Kobayashi K, Inoue M, Kaneda K, Decker K. 1995. Action of endothelins on hepatic stellate cells. *J Gastroenterol*, 30 (6):731-738.

- Kharbanda KK, Rogers DD, 2nd, Wyatt TA, Sorrell MF, Tuma DJ. 2004. Transforming growth factor-beta induces contraction of activated hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 41 (1):60-66.
- Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C. 2000. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest*, 80 (5):697-707.
- Knittel T, Kobold D, Dudas J, Saile B, Ramadori G. 1999. Role of the Ets-1 transcription factor during activation of rat hepatic stellate cells in culture. *Am J Pathol*, 155 (6):1841-1848.
- Kobayashi T, Liu X, Kim HJ, Kohyama T, Wen FQ, Abe S, Fang Q, Zhu YK, Spurzem JR, Bitterman P, Rennard SI. 2005. TGF-beta1 and serum both stimulate contraction but differentially affect apoptosis in 3D collagen gels. *Respir Res*, 6:141.
- Koda M, Bauer M, Krebs A, Hahn EG, Schuppan D, Murawaki Y. 2006. Endothelin-1 enhances fibrogenic gene expression, but does not promote DNA synthesis or apoptosis in hepatic stellate cells. *Comp Hepatol*, 5:5.
- Krejci V, Hildebrand LB, Sigurdsson GH. 2006. Effects of epinephrine, norepinephrine, and phenylephrine on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract in sepsis. *Crit Care Med*, 34 (5):1456-1463.
- Kulaksiz H, Heuberger D, Engler S, Stiehl A. 2008. Poor outcome in progressive sclerosing cholangitis after septic shock. *Endoscopy*, 40 (3):214-218.
- Laleman W, Van Landeghem L, Severi T, Vander Elst I, Zeegers M, Bisschops R, Van Pelt J, Roskams T, Cassiman D, Fevery J, Nevens F. 2007. Both Ca²⁺-dependent and -independent pathways are involved in rat hepatic stellate cell contraction and intrahepatic hyperresponsiveness to methoxamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292 (2):G556-564.
- Leask A, Abraham DJ. 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J*, 18 (7):816-827.
- Lechuga CG, Hernandez-Nazara ZH, Hernandez E, Bustamante M, Desierto G, Cotty A, Dharker N, Choe M, Rojkind M. 2006. PI3K is involved in PDGF-beta receptor upregulation post-PDGF-BB treatment in mouse HSC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291 (6):G1051-1061.
- Lee SB, Kanasaki K, Kalluri R. 2009. Circulating TGF-beta1 as a reliable biomarker for chronic kidney disease progression in the African-American population. *Kidney Int*, 76 (1):10-12.
- Lenz K, Kleinberger G, Druml W, Laggner A. 1982. [Shock liver]. *Leber Magen Darm*, 12 (5):198-202.
- LeRoith D. 1996. Insulin-like growth factor receptors and binding proteins. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 10 (1):49-73.
- Li D, Friedman SL. 1999. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol*, 14 (7):618-633.
- Li J, Zhang Z, Wang D, Wang Y, Li Y, Wu G. 2009. TGF-beta 1/Smads signaling stimulates renal interstitial fibrosis in experimental AAN. *J Recept Signal Transduct Res*, 29 (5):280-285.
- Loo CK, Wu XJ. 2008. Origin of stellate cells from submesothelial cells in a developing human liver. *Liver Int*, 28 (10):1437-1445.
- Luster MI, Germolec DR, Yoshida T, Kayama F, Thompson M. 1994. Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. *Hepatology*, 19 (2):480-488.
- Mallat A, Preaux AM, Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Gallois C, Brenner DA, Bradham C, Maclouf J, Iourgenko V, Fouassier L, Dhumeaux D, Mavier P, Lotersztajn S. 1996. Growth inhibitory properties of endothelin-1 in activated human hepatic

- stellate cells: a cyclic adenosine monophosphate-mediated pathway. Inhibition of both extracellular signal-regulated kinase and c-Jun kinase and upregulation of endothelin B receptors. *J Clin Invest*, 98 (12):2771-2778.
- Marie C, Cavaillon JM, Losser MR. 1996. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*, 125 (6):520-521.
- Marra F, Grandaliano G, Valente AJ, Abboud HE. 1995. Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: potential role in liver injury. *Hepatology*, 22 (3):780-787.
- Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P. 1999. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 29 (1):140-148.
- Maxwell PH, Ferguson DJ, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Doe BG, Johnson MH, Ratcliffe PJ. 1994. Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood*, 84 (6):1823-1830.
- McCuskey RS. 2000. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver*, 20 (1):3-7.
- Meier-Hellmann A, Reinhart K, Bredle DL, Specht M, Spies CD, Hannemann L. 1997. Epinephrine impairs splanchnic perfusion in septic shock. *Crit Care Med*, 25 (3):399-404.
- Melton AC, Datta A, Yee HF, Jr. 2006. [Ca²⁺]_i-independent contractile force generation by rat hepatic stellate cells in response to endothelin-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290 (1):G7-13.
- Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R. 2005. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem*, 280 (4):3078-3087.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabro A, Ciancio G, Stefanini F, et al. 1994. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol*, 144 (3):528-537.
- Mio T, Liu XD, Adachi Y, Striz I, Skold CM, Romberger DJ, Spurzem JR, Illig MG, Ertl R, Rennard SI. 1998. Human bronchial epithelial cells modulate collagen gel contraction by fibroblasts. *Am J Physiol*, 274 (1 Pt 1):L119-126.
- Moore K. 2004. Endothelin and vascular function in liver disease. *Gut*, 53 (2):159-161.
- Moreira RK. 2007. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med*, 131 (11):1728-1734.
- Moreno M, Bataller R. 2008. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*, 12 (4):825-852, ix.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65 (1-2):55-63.
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. 2002. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem*, 277 (13):11069-11076.
- Novo E, Marra F, Zamara E, Valfre di Bonzo L, Caligiuri A, Cannito S, Antonaci C, Colombatto S, Pinzani M, Parola M. 2006. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut*, 55 (1):90-97.
- O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. 1993. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet*, 342 (8866):273-275.

- Ohlinger W, Dinges HP, Zatloukal K, Mair S, Gollowitsch F, Denk H. 1993. Immunohistochemical detection of tumor necrosis factor-alpha, other cytokines and adhesion molecules in human livers with alcoholic hepatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 423 (3):169-176.
- Olaso E, Labrador JP, Wang L, Ikeda K, Eng FJ, Klein R, Lovett DH, Lin HC, Friedman SL. 2002. Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem*, 277 (5):3606-3613.
- Parizi M, Howard EW, Tomasek JJ. 2000. Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase. *Exp Cell Res*, 254 (2):210-220.
- Parry SD, Muiesan P. 2003. Cholangiopathy and the biliary cast syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15 (4):341-343.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Piechota M, Banach M, Irzmanski R, Barylski M, Piechota-Urbanska M, Kowalski J, Pawlicki L. 2007. Plasma endothelin-1 levels in septic patients. *J Intensive Care Med*, 22 (4):232-239.
- Pinzani M. 2002. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci*, 7:d1720-1726.
- Pinzani M, Marra F. 2001. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*, 21 (3):397-416.
- Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, Giotti A, Gentilini P. 1992. Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest*, 90 (2):642-646.
- Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. 1996. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 110 (2):534-548.
- Pirovino M, Meister F, Rubli E, Karlaganis G. 1989. Preserved cytosolic and synthetic liver function in jaundice of severe extrahepatic infection. *Gastroenterology*, 96 (6):1589-1595.
- Polyak K. 1996. Negative regulation of cell growth by TGF beta. *Biochim Biophys Acta*, 1242 (3):185-199.
- Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. 2007. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol*, 6:1.
- Psuja P, Zozulinska M, Turowiecka Z, Cieslikowski W, Vinazzer H, Zawilska K. 2002. Plasma markers of hypercoagulability in patients with serious infections and risk of septic shock. *Clin Appl Thromb Hemost*, 8 (3):225-230.
- Putensen C, Wrigge H, Hering R. 2006. The effects of mechanical ventilation on the gut and abdomen. *Curr Opin Crit Care*, 12 (2):160-165.
- Rachfal AW, Brigstock DR. 2003. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res*, 26 (1):1-9.
- Rajapakse S, Rodrigo C, Rajapakse A, Kirthinanda D, Wijeratne S. 2009. Renal replacement therapy in sepsis-induced acute renal failure. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 20 (4):553-559.
- Rank N, Michel C, Haertel C, Lenhart A, Welte M, Meier-Hellmann A, Spies C. 2000. N-acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Crit Care Med*, 28 (12):3799-3807.

- Reeves HL, Friedman SL. 2002. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci*, 7:d808-826.
- Reinehr RM, Kubitz R, Peters-Regehr T, Bode JG, Haussinger D. 1998. Activation of rat hepatic stellate cells in culture is associated with increased sensitivity to endothelin 1. *Hepatology*, 28 (6):1566-1577.
- Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. 2002. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut*, 50 (4):571-581.
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 345 (19):1368-1377.
- Rockey DC. 2001. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis*, 21 (3):337-349.
- Rockey DC. 2003. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology*, 37 (1):4-12.
- Rockey DC. 2006. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis*, 10 (3):459-479, vii-viii.
- Rockey DC, Weisiger RA. 1996. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology*, 24 (1):233-240.
- Rockey DC, Housset CN, Friedman SL. 1993. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest*, 92 (4):1795-1804.
- Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedman SL. 1992. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 24 (2):193-203.
- Roulot D, Sevcsik AM, Coste T, Strosberg AD, Marullo S. 1999. Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology*, 29 (6):1730-1738.
- Ruemmele P, Hofstaedter F, Gelbmann CM. 2009. Secondary sclerosing cholangitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6 (5):287-295.
- Ruokonen E, Takala J, Kari A, Saxen H, Mertsola J, Hansen EJ. 1993. Regional blood flow and oxygen transport in septic shock. *Crit Care Med*, 21 (9):1296-1303.
- Russell WE, Coffey RJ, Jr., Ouellette AJ, Moses HL. 1988. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (14):5126-5130.
- Saab S, Tam SP, Tran BN, Melton AC, Tangkijvanich P, Wong H, Yee HF, Jr. 2002. Myosin mediates contractile force generation by hepatic stellate cells in response to endothelin-1. *J Biomed Sci*, 9 (6 Pt 2):607-612.
- Sakamoto M, Ueno T, Kin M, Ohira H, Torimura T, Inuzuka S, Sata M, Tanikawa K. 1993. Ito cell contraction in response to endothelin-1 and substance P. *Hepatology*, 18 (4):978-983.
- Sakka SG, Reinhart K, Meier-Hellmann A. 2002. Prognostic value of the indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients. *Chest*, 122 (5):1715-1720.
- Scharf JG, Knittel T, Dombrowski F, Muller L, Saile B, Bräulke T, Hartmann H, Ramadori G. 1998. Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 27 (5):1275-1284.
- Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE. 1992. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology*, 15 (1):5-11.
- Schmitt-Graff A, Kruger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. 1991. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol*, 138 (5):1233-1242.

- Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. 2007. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*, 13 (11):1324-1332.
- Shao R, Yan W, Rockey DC. 1999. Regulation of endothelin-1 synthesis by endothelin-converting enzyme-1 during wound healing. *J Biol Chem*, 274 (5):3228-3234.
- Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113 (6):685-700.
- Shi YF, Zhang Q, Cheung PY, Shi L, Fong CC, Zhang Y, Tzang CH, Chan BP, Fong WF, Chun J, Kung HF, Yang M. 2006. Effects of rhDecorin on TGF-beta1 induced human hepatic stellate cells LX-2 activation. *Biochim Biophys Acta*, 1760 (11):1587-1595.
- Shieh P, Zhou M, Ornan DA, Chaudry IH, Wang P. 2000. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide occurs later than the onset of the hyperdynamic response during sepsis. *Shock*, 13 (4):325-329.
- Spapen H. 2004. N-acetylcysteine in clinical sepsis: a difficult marriage. *Crit Care*, 8 (4):229-230.
- Spirli C, Fabris L, Duner E, Fiorotto R, Ballardini G, Roskams T, Larusso NF, Sonzogni A, Okolicsanyi L, Strazzabosco M. 2003. Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits adenylyl cyclase and cAMP-dependent secretion in cholangiocytes. *Gastroenterology*, 124 (3):737-753.
- Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. 2004. Bench-to bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care*, 8 (6):462-468.
- Skandhan S, Altmann DM. 2008. The immunology of sepsis. *J Pathol*, 214 (2):211-223.
- Stravitz RT, Kramer DJ. 2009. Management of acute liver failure. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6 (9):542-553.
- Svegliati-Baroni G, De Minicis S, Marziani M. 2008. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition. *Liver Int*, 28 (8):1052-1064.
- Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Benedetti A, Greenwel P. 2001. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 33 (5):1130-1140.
- Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A. 1998. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 27 (3):720-726.
- Tadros T, Traber DL, Herndon DN. 2000. Trauma- and sepsis-induced hepatic ischemia and reperfusion injury: role of angiotensin II. *Arch Surg*, 135 (7):766-772.
- Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. 2003. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology*, 37 (1):87-95.
- Tao J, Mallat A, Gallois C, Belmadani S, Mery PF, Nhieu JT, Pavoine C, Lotersztajn S. 1999. Biological effects of C-type natriuretic peptide in human myofibroblastic hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 274 (34):23761-23769.
- Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. 2002. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol*, 191 (1):1-16.
- Thimigan MS, Yee HF, Jr. 1999. Quantitation of rat hepatic stellate cell contraction: stellate cells' contribution to sinusoidal resistance. *Am J Physiol*, 277 (1 Pt 1):G137-143.
- Trauner M, Boyer JL. 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev*, 83 (2):633-671.
- Trauner M, Fickert P, Stauber RE. 1999. Inflammation-induced cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol*, 14 (10):946-959.

- van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. 2001. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med*, 345 (19):1359-1367.
- Vanhorebeek I, De Vos R, Mesotten D, Wouters PJ, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe G. 2005. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *Lancet*, 365 (9453):53-59.
- Vasilev D, Karadimov D, Vogt J, Santak B. 1996. [Nitric oxide--a basic mediator of vasodilation and septic shock]. *Khirurgiia (Sofiia)*, 49 (4):14-16.
- Vyas SK, Leyland H, Gentry J, Arthur MJ. 1995. Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology*, 109 (3):889-898.
- Wake K. 1971. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat*, 132 (4):429-462.
- Wake K. 1980. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol*, 66:303-353.
- Wallace K, Burt AD, Wright MC. 2008. Liver fibrosis. *Biochem J*, 411 (1):1-18.
- Wang H, Ma S. 2008. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med*, 26 (6):711-715.
- Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. 1991. Hepatic extraction of indocyanine green is depressed early in sepsis despite increased hepatic blood flow and cardiac output. *Arch Surg*, 126 (2):219-224.
- Weigand MA, Horner C, Bardenheuer HJ, Bouchon A. 2004. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18 (3):455-475.
- Wells RG. 2000. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279 (5):G845-850.
- Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. 1994. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest*, 94 (4):1563-1569.
- Wunder C, Roewer N, Eichelbronner O. 2004. Main determinants of liver microcirculation during systemic inflammation. *Anaesthesist*, 53 (11):1073-1085.
- Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ. 2005. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, 54 (1):142-151.
- Yang S, Koo DJ, Zhou M, Chaudry IH, Wang P. 2000. Gut-derived norepinephrine plays a critical role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279 (6):G1274-1281.
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. 2003. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut*, 52 (9):1347-1354.
- Zanotti S, Kumar A, Kumar A. 2002. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs*, 11 (8):1061-1075.
- Zhang J, Zhang WW, Xu LM. 2009. [Effect and mechanism of salvianolic-acid B on inhibiting endothelin-1-induced contraction of human hepatic stellate cells]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 29 (1):60-64.

8. Anhang

8.1 Datenanhang

Tab. 10: Diagnosekriterien von SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock nach den Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)

I. Nachweis der Infektion

- Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien

II. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) (mind. 2 Kriterien)

- Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$) bestätigt durch eine rektale, intravasale oder intravesikale Messung
- Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90 /min
- Tachypnoe (Frequenz ≥ 20 /min) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4.3$ kPa/ ≤ 33 mmHg)
- Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

III: Akute Organdysfunktion (mind. 1 Kriterium)

- Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium
 - Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein.
 - Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa (≤ 75 mmHg) unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von ≤ 33 kPa (≤ 250 mmHg) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
 - Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0,5$ ml/kg/h für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder mindestens eine Verdopplung des Serumkreatinins oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
 - Metabolische Azidose: Base Excess ≤ -5 mmol/l oder eine Laktatkonzentration $> 1,5\times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches
-

Sepsis: Kriterien I und II

schwere Sepsis: Kriterien I, II und III

septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck ≤ 65 mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck ≥ 90 mmHg oder den arteriellen Mitteldruck ≥ 65 mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

		ADAM9	HPRT	COL1A1	ECE1	EGFR	ET-1	ETAR	ETBR
MW Ct-Werte	6h unstim.	18,41	18,71	35,78	28,69	25,65	26,347	32,12	24,37
	6h hKS	17,88	18,18	34,26	28,48	25,62	25,037	31,40	26,35
	24h unstim.	18,03	18,40	34,66	28,96	25,47	25,933	32,64	25,86
	24h hKS	17,81	18,03	34,13	28,37	25,66	26,707	31,61	25,14
	6h ZM	18,09	18,46	35,70	28,38	24,50	24,653	33,66	25,16
	24h ZM	18,29	18,02	37,48	28,54	24,72	24,287	33,36	26,82
	6h sS	18,01	18,12	33,96	28,39	25,38	24,100	32,22	26,13
	24h sS	18,14	17,93	35,58	28,60	25,90	26,827	33,75	25,18
	24h TGF- β	17,81	17,89	35,16	28,59	24,77	24,857	31,96	26,31
MW Transkriptanzahl	6h unstim.	35270	89205	2	366	85	241	3	513
	6h hKS	50600	127973	2	436	88	613	5	121
	24h unstim.	45582	115024	2	301	108	310	3	234
	24h hKS	53649	143318	3	452	89	200	5	272
	6h ZM	43884	105795	1	448	209	725	1	331
	24h ZM	39085	147432	0	413	185	986	2	104
	6h sS	46415	133898	3	445	106	1053	3	139
	24h sS	42530	153247	1	400	71	177	1	272
	24h TGF- β	54617	169889	1	412	200	1096	4	565
MW log ₂ -Ratios	6h ZM			-1,088	0,021	1,009	1,344	-1,603	-1,080
	24h ZM			-2,653	0,325	0,711	1,492	-0,746	-1,055
	6h sS			0,544	0,121	0,303	0,937	-0,778	0,255
	24h sS			-1,618	-0,134	-0,207	-0,018	-2,203	0,055
	24h TGF- β			-1,412	-0,001	0,477	0,669	0,173	-0,815
SEM	6h ZM			0,14	0,06	1,01	0,02	0,22	0,70
	24h ZM			0,04	0,26	0,29	0,38	0,96	0,67
	6h sS			0,09	0,07	0,62	0,07	0,27	0,20
	24h sS			0,37	0,28	0,15	0,30	0,64	0,27
	24h TGF- β			0,21	0,35	0,49	1,29	0,12	1,88
Vergleich zur Kontrolle(%)	6h ZM			47,0	101,4	201,3	253,9	32,9	47,3
	24h ZM			15,9	125,3	163,7	281,2	59,6	48,1
	6h sS			145,8	108,7	123,3	191,5	58,3	119,3
	24h sS			32,6	91,1	86,6	98,8	21,7	103,9
	24h TGF- β			37,6	99,9	139,2	159,0	112,8	56,8

Tab.11: Datenübersicht 1 der quantitativen PCR

Dargestellt sind für jedes Transkript die Mittelwerte (MW) der C_t-Werte, der jeweiligen Transkriptanzahl, des log₂-Ratios aus der Berechnung nach Pfaffl (Pfaffl 2001), sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und die prozentuale Genexpressionsveränderung im Vergleich zur Kontrollprobe (Kontrollprobe entspricht jeweils 100%). ADAM9 und HPRT dienen als Referenzgene, weshalb auch keine log₂-Ratios nach Pfaffl ermittelt werden konnten. Alle Versuche liefen als Triplikate (n=3).

Abkürzungen: unstim. (unstimuliert); hKS (humanes Kontrollserum: entspricht dem gepoolten Serum gesunder Probanden und wurde als Kontrolle für die Stimulation mit Serum septischer Patienten verwendet); ZM (Zytokinmix); sS (Serum septischer Patienten).

		IGF1	IGFBP3	IGFBP5	TGFA	TGFB1	TGFBR1	TGFBR2	TIMP2
MW Ct-Werte	6h unstim.	30,47	16,51	27,15	21,30	20,34	30,44	17,33	16,29
	6h hKS	29,93	15,31	25,71	21,19	20,42	29,27	18,05	16,93
	24h unstim.	30,72	15,64	25,94	21,44	21,17	29,89	17,86	16,27
	24h hKS	29,80	16,02	26,92	21,07	20,42	29,35	18,17	16,29
	6h ZM	29,87	15,15	27,33	21,20	20,19	29,62	17,54	16,40
	24h ZM	30,68	14,85	26,85	20,85	20,41	29,76	18,49	16,89
	6h sS	29,81	14,37	24,49	20,73	20,79	29,24	17,96	16,76
	24h sS	29,98	16,36	25,69	21,06	20,74	29,74	18,16	16,71
	24h TGF- β	30,09	15,44	24,65	20,90	20,50	28,72	18,04	15,89
MW Transkriptanzahl	6h unstim.	4	136965	3420	2409	7852	345	82902	162692
	6h hKS	6	340934	9716	2614	7612	768	50833	106251
	24h unstim.	3	252286	8635	2205	4395	555	58512	166536
	24h hKS	6	196845	4609	2893	7517	718	46508	168202
	6h ZM	7	405892	3518	2611	8728	638	72722	150917
	24h ZM	4	473617	5393	3335	7565	584	37635	114562
	6h sS	6	605882	18329	3652	5731	815	55050	118522
	24h sS	6	152472	9607	2902	6002	566	47453	122926
	24h TGF- β	5	334834	18446	3260	7002	1117	52085	214485
MW log ₂ -Ratios	6h ZM	0,652	1,073	-0,448	-0,182	-0,134	0,606	-0,489	-0,391
	24h ZM	0,221	0,695	-0,924	0,503	0,668	0,006	-0,727	-0,700
	6h sS	0,112	0,968	1,143	0,505	-0,339	0,115	0,121	0,196
	24h sS	0,037	-0,242	1,215	0,108	-0,222	-0,224	0,108	-0,307
	24h TGF- β	0,325	-0,161	0,807	0,176	0,305	0,598	-0,547	0,001
SEM	6h ZM	0,52	0,56	0,57	0,14	0,10	0,05	0,14	0,01
	24h ZM	0,19	0,45	0,84	0,12	0,19	0,18	0,11	0,34
	6h sS	0,08	0,19	0,11	0,15	0,06	0,09	0,22	0,07
	24h sS	0,43	0,16	0,48	0,17	0,17	0,44	0,16	0,04
	24h TGF- β	0,14	0,63	0,48	0,21	0,04	0,29	0,22	0,13
Vergleich zur Kontrolle(%)	6h ZM	157,2	210,4	73,3	88,1	91,1	152,2	71,3	76,3
	24h ZM	116,6	161,9	52,7	141,8	158,9	100,4	60,4	61,5
	6h sS	108,1	195,6	220,8	141,9	79,1	108,3	108,7	114,6
	24h sS	102,6	84,6	232,2	107,8	85,7	85,6	107,8	80,9
	24h TGF- β	125,3	89,4	174,9	113,0	123,6	151,4	68,5	100,1

Tab. 12: Datenübersicht 2 der quantitativen PCR

Dargestellt sind für jedes Transkript die Mittelwerte (MW) der C_t-Werte, der jeweiligen Transkriptanzahl, des log₂-Ratios aus der Berechnung nach Pfaffl (Pfaffl 2001), sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und die prozentuale Genexpressionsveränderung im Vergleich zur Kontrollprobe (Kontrollprobe entspricht jeweils 100%). ADAM9 und HPRT dienen als Referenzgene. Alle Versuche liefen als Triplikate (n=3).

Abkürzungen: unstim. (unstimuliert); hKS (humanes Kontrollserum: entspricht dem gepoolten Serum gesunder Probanden und wurde als Kontrolle für die Stimulation mit Serum septischer Patienten verwendet); ZM (Zytokinmix); sS (Serum septischer Patienten).

Versuch	K	ET-1	FKS
1	-1,96	2,74	13,7
2	3,69	5,49	13,2
3	3,43	1,77	14,5
4	0,21	4,80	15,3
5	1,62	2,76	20,6
6	3,20	2,49	16,3
7	2,60	0,49	16,0
8	3,49	3,39	14,7
9	7,77	3,76	18,2
MW	2,67	3,08	15,84
SEM	0,89	0,50	0,78

Tab. 13: Darstellung der prozentualen Flächenreduktionen der mit hepatischen Sternzellen bewachsenen Kollagenkissen im Wrinkle Assay nach ET-1- und FKS-Stimulation.

Die Kollagenkissen wurden mit jeweils 100000 Zellen/Kollagenkissen bestückt. Dabei diente ein unstimuliertes Kissen als Kontrolle (K). Stimuliert wurde mit 100nM Endothelin-1 und FKS (10%) als Positivkontrolle. Alle Werte sind prozentuale Angaben der Flächenreduktion 3 Stunden nach Stimulation im Vergleich zur Nullaufnahme direkt nach Stimulation. Es wurden neun unabhängige Versuche durchgeführt. Danach wurde von allen Stimulationen der Mittelwert (MW) gebildet und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet.

Versuch	6h		24h	
	K	ZM	K	ZM
1	-1,96	8,49	2,23	4,75
2	3,69	2,29	5,08	10,48
3	3,43	2,81	0,90	10,18
4	0,21	0,82	11,56	2,45
5	1,62	0,63	8,66	14,36
6	2,10	7,21	3,20	16,01
7	1,66	6,95	2,60	13,91
8	3,04	9,84	3,49	4,20
9	4,01	11,67	7,77	11,31
MW	1,98	5,64	5,05	9,74
SEM	0,64	1,36	1,18	1,62

Tab. 14: Darstellung der prozentualen Flächenreduktionen der mit hepatischen Sternzellen bewachsenen Kollagenkissen im Wrinkle Assay nach Zytokinmix-Stimulation.

Die Kollagenkissen wurden mit jeweils 100000 Zellen/Kollagenkissen bestückt und für 6h und 24h mit Zytokinmix stimuliert. Dabei diente jeweils ein unstimuliertes Kissen als Kontrolle (K). Alle Werte sind prozentuale Angaben der Flächenreduktion 3 Stunden nach Stimulation im Vergleich zur Nullaufnahme direkt nach Stimulation. Es wurden neun unabhängige Versuche durchgeführt. Danach wurde von allen Stimulationen der Mittelwert (MW) gebildet und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet.

Versuch	6h				24h			
	K	sS	sS + TGFβ- AB	sS + IgG	K	sS	sS + TGFβ- AB	sS + IgG
1	0,4	14,1	5,2	15,8	-1,5	19,0	8,7	17,6
2	3,4	13,9	6,9	13,9	2,7	30,7	10,2	21,3
3	7,0	13,9	6,8	10,8	2,3	23,2	3,6	17,9
4	3,5	12,7	3,5	9,3	2,4	18,1	11,6	18,2
5	17,8	53,4	25,4	25,2	5,0	32,5	16,1	33,1
6	4,7	63,5	13,3	52,0	6,3	34,3	10,5	36,5
7	-13,6	41,5	23,8	43,9	6,5	30,1	15,0	31,0
8	13,0	39,5	17,5	38,8	7,1	31,3	11,0	36,8
MW	4,5	31,6	12,8	26,2	3,9	27,4	10,8	26,5
SEM	3,1	6,8	2,8	5,5	1,0	2,1	1,3	2,9

Tab. 15: Darstellung der prozentualen Flächenreduktionen der mit hepatischen Sternzellen bewachsenen Kollagenkissen im Wrinkle Assay.

Die Kollagenkissen wurden mit jeweils 100000 Zellen/Kollagenkissen bestückt und für 6h und 24h stimuliert. Dabei diente jeweils ein unstimuliertes Kissen als Kontrolle (K). Stimuliert wurde mit Serum septischer Patienten (sS), selbigem unter TGF-β-Neutralisation mit Anti-TGF-β-IgG (TGFβ-AB) und Serum septischer Patienten mit unspezifischem IgG als Isotypkontrolle. Alle Werte sind prozentuale Angaben der Flächenreduktion 3 Stunden nach Stimulation im Vergleich zur Nullaufnahme direkt nach Stimulation. Es wurden acht unabhängige Versuche durchgeführt. Danach wurde von allen Stimulationen der Mittelwert (MW) gebildet und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet.

8.2 Curriculum vitae

Matthias Gaipl

geboren am 26. Mai 1983 in Jena

Ausbildung:

12/2009	Approbation als Arzt
10/2009 – 11/2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2005 - 08/2008	Klinisches Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2003 - 09/2005	Vorklinisches Studium an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg
10/2002 - 06/2003	Grundwehrdienst der Bundeswehr in Hohenmölsen
06/2002	Allgemeine Hochschulreife
08/2000 - 06/2002	11.-12. Klasse am Gymnasium „Leuchtenburg“ in Kahla
08/1999 - 07/2000	11. Klasse Hallsville High School in Texas, USA
08/1993 - 07/1999	5.-10. Klasse Gymnasium „Leuchtenburg“ in Kahla
09/1989 – 06/1993	1.-4. Klasse Grundschule in Kahla

praktische Ausbildung:

08/2008 – 07/2009	praktisches Jahr in der Chirurgie des Universitätsklinikums Maastricht/Niederlande (Abteilung für Gefäß- und Viszeralchirurgie und chirurgische Intensivstation), in der Klinik für Innere Medizin des Kantonsspitals Luzern/Schweiz (Abteilung für Nephrologie und internistische Notfallambulanz) und in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Jena
03/2008	Famulatur Allgemeine Innere Medizin, Northern Mindanao Medical Center Cagayan de Oro/Philippinen
09/2007	Famulatur Kardiologie am Royal Prince Alfred Hospital in Sydney/ Australien
03/2007	Famulatur „kardiovaskuläres Praktikum“ des Rhön-Klinikums Bad Neustadt
09/2006	Famulatur Neurochirurgie, Universitätsklinikum Greifswald
03/2006	Famulatur Anästhesie am Klinikum Berchtesgaden

8.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zu Beginn bei Herrn Prof. Dr. med. M. Bauer für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. med. habil. R.A. Claus für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung des praktischen Teils meiner Arbeit. Die vielen wertvollen Anregungen und Ratschläge, die sich von der Vorbereitung über die Durchführung bis hin zur Auswertung erstreckten, erleichterten mir das Erstellen dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die stets sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Zudem gilt auch Dr. med. F.A. Gonnert für die viele investierte Zeit und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche ein besonderer Dank. Die Zusammenarbeit war stets von Konstruktivität, Kollegialität und Vertrauen geprägt und hat nicht zuletzt auch viel Freude bereitet.

Ebenso möchte ich an dieser Stelle Dr. rer. nat. P. Recknagel hervorheben, der mir von Beginn an mit Rat und Tat zur Seite stand, stets ein äußerst kompetenter Ansprechpartner war und mir die Arbeit im Forschungszentrum sehr angenehm gestaltete.

Des Weiteren geht ein großer Dank an Brigitte Specht, Edith Walther und Dipl.-Ing. Jacqueline Fischer für die hilfreiche und sehr angenehme Zusammenarbeit.

Für die stets sehr kompetente Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen möchte ich Herrn Markus Blaess danken.

Außerdem danke ich allen Doktoranden, Diplomanden, Praktikanten und Mitarbeitern, die in dieser Zeit im Fachbereich der experimentellen Anästhesie tätig waren. Jeder einzelne hat seinen Teil für das angenehme und produktive Arbeitsklima beigetragen.

Nicht zuletzt danke ich den Kollegen des Fachbereichs der experimentellen Neurologie für die Möglichkeit, einige Geräte mitbenutzen zu dürfen und die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

Auch bei meinem Freundeskreis möchte ich mich für die teilweise nötigen aufmunternden Worte, die offenen Ohren, das Halbieren des Leides und die Verdoppelung der Freude ganz herzlich bedanken.

Am Ende geht ein ganz besonderer Dank an meine gesamte Familie und insbesondere meine Eltern; ohne eure Unterstützung in jeglicher Hinsicht wäre weder mein Studium, noch diese Promotion möglich gewesen. Vielen Dank!!!

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. med. M. Bauer
- PD Dr. rer. nat. med. habil. R.A. Claus
- Dr. med. F.A. Gonnert
- Dr. rer. nat. P. Recknagel

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers