

Aus der
Universitätsklinik für Innere Medizin 1
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Patrick Michl)

Untersuchung der Wirkung von Sorafenib auf die hepatische Sternzelle
bei Leberzirrhose.

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Franziska Kriesche geb. Richter
geboren am: 29.09.1989 in Wippra
Betreuer: apl. Prof. A. Zipprich

Gutachter/innen:
apl. Prof. A. Zipprich
Prof. F. Dehghani
Prof. T. Bruns, Aachen
26.06.2018
28.10.2019

Referat

Hepatische Sternzellen (HSC) sind die entscheidenden Zellen für die Fibroseentstehung in der Leber. Durch ihre Aktivierung sind sie neben der vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix auch in der Lage zu kontrahieren und so die Lebersinusoiden zu verengen. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte demonstriert werden, dass der Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib der hepatisch-arteriellen Vasodilatation, die während der Zirrhoseentstehung auftritt, entgegenwirkt. Dies war auch der Fall, wenn die Zirrhose zum Applikationszeitpunkt schon ausgeprägt war. In der vorliegenden Studie sollte nun die Wirkung von Sorafenib auf die zellulären Effekte in HSC in verschiedenen Zirrhosestadien untersucht werden. Dazu wurden HSC aus Wistar-Ratten, denen durch eine inhalative Behandlung mit Tetrachlormethan (CCl₄) eine Zirrhose induziert wurde, isoliert und anschließend mit Sorafenib inkubiert. Untersucht wurden ein frühes (8 Wochen CCl₄) und ein fortgeschrittenes Zirrhosestadium (12-15 Wochen CCl₄). Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression verschiedener Angiogenesevermittler in den HSC bestimmt. Dazu zählten der VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2) und sein Ligand VEGF. Im aktivierten Zustand setzt der Rezeptor eine Phosphorylierungskaskade in Gang, zu der auch das ebenfalls untersuchte ERK zählt. Außerdem wurde die NO-Synthase eNOS bestimmt, da sie den NO-Gehalt in den Sinusoiden reguliert. In zirrhotischen HSC konnte eine Steigerung der VEGF-R2-Expression gegenüber nicht-zirrhotischen Zellen nachgewiesen werden. Es konnten keine Unterschiede zwischen der VEGF-R2-Expression in der frühen und der fortgeschrittenen Zirrhose festgestellt werden. Die Behandlung mit Sorafenib führte bei HSC der 8 Wochen-Gruppe zu einer erhöhten eNOS-Expression, wobei der Phosphorylierungsstatus der eNOS unverändert blieb. Außerdem zeigte sich eine reduzierte VEGF-R2-Expression in den HSC dieser Gruppe. In HSC der fortgeschrittenen Zirrhose steigerte Sorafenib die VEGF-R2-Expression und reduzierte die Expression von VEGF. Die Steigerung der VEGF-R2-Expression in zirrhotischen HSC bestätigt die Aktivierung des VEGF-Pathways in der Zirrhose. Ein bisher unbekanntes Ergebnis stellt die erhöhte eNOS-Expression durch Sorafenib in der frühen Zirrhose dar und könnte einen Hinweis auf die Beeinflussung des Gefäßwiderstandes durch Sorafenib geben. In der fortgeschrittenen Zirrhose war dieser Effekt nicht nachweisbar. Ebenso konnte die Reduktion des VEGF-R2 durch Sorafenib nur in der frühen Zirrhose beobachtet werden. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die positiven Effekte von Sorafenib auf die Fibrosierung der Leber nur in einem frühen Zirrhosestadium auslösbar sind.

Kriesche, Franziska: Untersuchung der Wirkung von Sorafenib auf die hepatische Sternzelle bei Leberzirrhose, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 78 Seiten, 2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Formelverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Leberzirrhose - Definition, Epidemiologie, Klinik	1
1.1.1 Molekulare Veränderungen in der Zirrhoseentstehung	1
1.2 Die Funktion der HSC	5
1.2.1 Fibroseentstehung	5
1.2.2 Portalvenöser Hochdruck - HSC verengen aktiv die Gefäßstrombahn der Leber	7
1.3 Das Medikament Sorafenib	8
2 Zielstellung	11
3 Material und Methodik	12
3.1 Methodik	12
3.1.1 Zelllinien	12
3.1.2 Vitalitätsbestimmung in den Zelllinien	12
3.1.3 Zirrhoseinduktion	13
3.1.4 Zellisolation	13
3.1.5 Zellbehandlung und -ernte	15
3.1.6 Probenaufarbeitung und Proteinbestimmung	15
3.1.7 SDS-Page	16
3.1.8 Western Blot	16
3.1.9 Immundetektion	18
3.1.10 Statistische Auswertung	19
3.2 Material	20
3.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	20
3.2.2 Verwendete Medien und Zusätze	25
3.2.3 Verwendete Antikörper	25
3.2.4 Biologisches Material	26
3.2.5 Verwendete Kits und Hilfsstoffe	27
3.2.6 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	27

4	Ergebnisse	28
4.1	Vorversuche in der humanen Sternzelllinie HSZ-B-S1 zur Findung der geeigneten Sorafenibdosis	28
4.2	Auswirkungen der Zirrhoseentwicklung auf die pHSC	29
4.3	Die Wirkung von Sorafenib auf pHSC aus der nicht-zirrhatischen Leber	31
4.4	Die Wirkung von Sorafenib auf pHSC der beginnend zirrhatischen Leber	35
4.5	Die Wirkung von Sorafenib auf pHSC der fortgeschritten zirrhatischen Leber	37
4.6	Zirrhosebedingte Unterschiede in der Sorafenibwirkung	40
4.7	Sorafenibwirkungen in der humanen Sternzelllinie HSZ-B-S1	41
4.8	Sorafenibwirkungen in der murinen sinusoidalen Endothelzelllinie TSEC	44
5	Diskussion	49
5.1	Auswirkungen der Zirrhoseentwicklung auf die HSC	49
5.1.1	VEGF-Stoffwechselweg	49
5.1.2	ERK-Stoffwechselweg	50
5.1.3	eNOS und VEGF	51
5.2	Sorafenibwirkung auf nicht-zirrhatische pHSC	52
5.3	Sorafenibwirkung auf zirrhatische pHSC	52
5.4	Sorafenib im Vorversuch	56
5.5	Sorafenib und Sinusoidale Endothelzellen der Leber	57
5.6	Vorversuch zur Ermittlung der praktikablen Sorafenibdosis	57
5.7	Hinweise auf die Dosisabhängigkeit der Sorafenibwirkung	58
5.8	Methodik der Experimente	59
5.9	Limitationen der Arbeit	60
6	Zusammenfassung	61
	Literaturverzeichnis	62
	Thesen	73
	Anlage	74
	Selbstständigkeitserklärung	IX
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	X
	Lebenslauf	XI
	Danksagung	XII

Abbildungsverzeichnis

1	Mikroskopischer Aufbau der Leber	2
2	VEGF-Pathway in einer Endothelzelle	4
3	Ablauf der Aktivierung der HSC	6
4	Sinusoidaufbau in normaler und fibrotischer Leber	7
5	Wistar-Ratte während Leberperfusion	14
6	Skizze zur Bestückung der Blotkammer	17
7	Funktionsweise der Immundetektion	19
8	Humane hepatische Sternzelllinie nach Behandlung mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen	28
9	Zirrhosebedingte Veränderungen der Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von ERK 1/2 in pHSC	29
10	Zirrhosebedingte Veränderungen der Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC	30
11	Zirrhosebedingte Veränderungen der Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC	30
12	pHSC der Ratte aus verschiedenen Zirrhosestadien unter Sorafenibbehandlung	31
13	Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von ERK 1 und 2 in pHSC aus Normallebern unter Sorafenibbehandlung	32
14	Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC aus Normallebern unter Sorafenibbehandlung	33
15	Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC aus Normallebern unter Sorafenibbehandlung	34
16	Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von ERK 1 und 2 in pHSC aus beginnend zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung	35
17	Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC aus beginnend zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung	36
18	Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC aus beginnend zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung	37
19	Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von ERK 1 und 2 in pHSC aus fortgeschritten zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung	38
20	Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC aus fortgeschritten zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung	39

21	Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC aus fortgeschrittenen zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung	40
22	Proteinexpression bzw. Phosphorylierung der ERK 1 und 2 in pHSC unter Sorafenibbehandlung in verschiedenen Zirrhosestadien	41
23	Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC unter Sorafenibbehandlung in verschiedenen Zirrhosestadien	42
24	Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC unter Sorafenibbehandlung in verschiedenen Zirrhosestadien	42
25	Proteinexpression bzw. Phosphorylierungsstatus von ERK 1 und 2 in HSZ-B-S1 unter Sorafenibbehandlung	43
26	Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in HSZ-B-S1 unter Sorafenibbehandlung	44
27	Murine sinusoidale Endothelzelllinie TSEC nach Behandlung mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen	45
28	Proteinexpression bzw. Phosphorylierungsstatus von ERK 1 und 2 in TSEC unter Sorafenibbehandlung	46
29	Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in TSEC unter Sorafenibbehandlung	47
30	Proteinexpression bzw. Phosphorylierungsstatus von eNOS in TSEC unter Sorafenibbehandlung	48
31	Auswirkung der Rho/Rho-Kinase-Aktivität auf die Expression und Aktivität von eNOS	54

Tabellenverzeichnis

1	DNase I-Lösepuffer 500 ml	20
2	IPP 2x 100 ml	20
3	Waschpufferstocklösung für primäre Sternzellen 1000 ml	20
4	Verwendungsbereiter Waschpuffer 50 ml	20
5	Lysepuffer für primäre Sternzellen 1 ml	21
6	Ponceau S Rot 100 ml	21
7	Coomassie Blue Silver 100 ml	21
8	Coomassie Blue Silver Fixierlösung 50 ml	22
9	Coomassie Blue Silver Entfärber-Lösung 50 ml	22
10	GBSS pH 7,4 1000 ml	22
11	Laufpuffer (10x) 1000 ml	23
12	Transferpuffer (5x) 1000 ml	23
13	TBST (10x) 1000 ml	23
14	SDS-Probenpuffer 50 ml	23
15	PBS-Puffer (10x) 1000 ml	24
16	ECL-Lösung	24
17	Puffer zur Sternzellisolation	24
18	Protokoll Trenngel und Sammelgel	25
19	Medien und Medienzusätze	25
20	Antikörper	25
21	Antikörper-Konzentrationen	26
22	Zelllinien	26
23	Versuchstiere	26
24	BCA-Kit	27
25	Hilfsstoffe	27
26	Geräte	74
28	Chemikalien	75
30	Verbrauchsmaterialien	78

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -Smooth Muscle Actin
Akt/PKB	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
BDL	Bile duct ligated, gallengangsligiert
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine Serum Albumin
c-KIT	Tyrosinkinase KIT, Stammzellfaktor-Rezeptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis (aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF-R1	Fibroblast Growth Factor-Receptor 1
FKS	Fetales Kälberserum
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	Hepatische Sternzelle(n)
HSZ-B-S1	Hepatische Sternzelllinie B-S1
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPP	Immunpräzipitationspuffer
LX2	Humane Hepatische Sternzelllinie LX2
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK	Mitogen/Extracellular signal-Regulated Kinase
mRNA	messenger RNA

MTS	Tetrazolin-Salz
NPZ	Nichtparenchymale Zellen
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
peNOS	phospho-endothelial Nitric Oxide Synthase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PenStrep	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PES	Phenazin Ethosulfat
pHSC	primäre hepatische Sternzellen
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma-Protein
Ras	Rat sarcoma-Protein
RCC	Klarzelliges Nierenkarzinom
Rho	Ras homologue-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEC	Sinusoidale Endothelzelle(n)
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF β	Tumor Growth Factor β
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TP	Thromboxan-A ₂ /Prostaglandin-Endoperoxid
TSEC	Transformed Sinusoidal Endothelial Cells
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R1/ft-1	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 1/fms-like tyrosine kinase-1
VEGF-R2/Flk-1	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 2/fetal liver kinase-1
VEGF-R3	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 3

Formelverzeichnis

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Calciumchlorid-Dihydrat
CCl_4	Tetrachlormethan
HCl	Chlorwasserstoff
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
MgCl_2	Magnesiumchlorid
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
MgSO_4	Magnesiumsulfat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
Na_3VO_4	Natriumorthovanadat
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	Tetranatriumdiphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoffmonoxid

1 Einleitung

1.1 Die Leberzirrhose - Definition, Epidemiologie, Klinik

Bei der Leberzirrhose handelt es sich um das Endstadium aller chronischer Lebererkrankungen. Sie ist charakterisiert durch Gewebeuntergang, Zerstörung der Architektur der Leber inklusive des Gefäßbettaufbaus, Bildung von Regeneratknoten, Bildung von Shunts und Gefäßobliterationen und führt letztendlich zu einer Erhöhung des portalvenösen Widerstandes [1, 2]. In der Europäischen Union versterben jährlich ca. 170.000 Menschen an den Folgen der Leberzirrhose [3]. Epidemiologische Studien aus den USA ergaben, dass pro Jahr 27 von 100.000 Personen an einer leberassoziierten Erkrankung versterben [4]. Klinisch unterscheidet man ein kompensiertes von einem dekompenzierten Stadium. Bei der kompensierten Form der Leberzirrhose haben die Patienten unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit und Leistungsminderung. In diesem Stadium kann bereits eine portale Hypertension mit Entstehung von Ösophagusvarizen vorhanden sein. Die Dekompensation ist gekennzeichnet durch Auftreten von Komplikationen wie Ikterus, Ösophagusvarizenblutung, Aszites und hepatischer Enzephalopathie [5, 6].

Die Prognose des kompensierten und dekompenzierten Stadiums unterscheidet sich signifikant. Das mediane Überleben bei Patienten mit kompensierter Zirrhose unterscheidet sich nicht von dem der Normalbevölkerung. Demgegenüber steht ein mittleres Überleben von ca. 30 Monaten im Stadium der dekompenzierten Zirrhose [5, 6].

1.1.1 Molekulare Veränderungen in der Zirrhoseentstehung

Der anatomische Aufbau der Leber weist einige Besonderheiten auf, die im Folgenden erklärt werden. Das Lebergewebe wird mikroskopisch in Untereinheiten, die sogenannten Leberläppchen, eingeteilt. Im Zentrum jedes Leberläppchens findet sich eine Zentralvene, die sauerstoffarmes Blut in die Vena hepatica leitet. An den seitlichen Begrenzungen der Leberläppchen liegen die Portalfelder, die intrahepatische Äste der Pfortader, der Leberarterie und des Gallengangs enthalten. Zwischen den Portalfeldern (Portale Trias) und der Zentralvene erstrecken sich speichenförmig angeordnete Sinusoide. Dabei handelt es sich um Kapillaren, in denen das Blut aus Richtung der Portalfelder zur Zentralvene gelangt (Abb. 1). Sie ermöglichen die Versorgung der Hepatozyten, die sich in Platten angeordnet radiär entlang der Sinusoide erstrecken, mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Hepatozyten übernehmen zahlreiche Stoffwechselfunktionen der Leber und machen ca. 60 % aller Zellen in der Leber aus. Neben den Stoffwechselabläufen in der Leber tragen sie auch zur Regeneration der Leber selbst bei. In den Sinusoiden finden sich sogenannte Nichtparenchymale-Zellen (NPZ), die

etwa 35 % aller Zellen in der Leber ausmachen. Zu den NPZ zählen unter anderem die Sinusoidalen Endothelzellen (SEC), welche die Sinusoide auskleiden und ein fenestriertes Endothel bilden, das den Stoffaustausch zwischen Sinusoid und Hepatozyten ermöglicht. Dieses fenestrierte Endothel besitzt keine Basalmembran, so dass auch größere Moleküle das Endothel frei passieren können. Die hepatischen Sternzellen (HSC) befinden sich zwischen Hepatozyten und SEC im sogenannten Disse'schen-Raum. Die Kupffer-Zellen übernehmen im Sinusoid die Funktion der Makrophagen und können mögliche Pathogene phagozytieren. Einen eher geringen Anteil der NPZ machen die sogenannten Pit-Zellen aus, bei denen es sich um große granuläre Lymphozyten handelt, die als natürliche Killerzellen agieren.

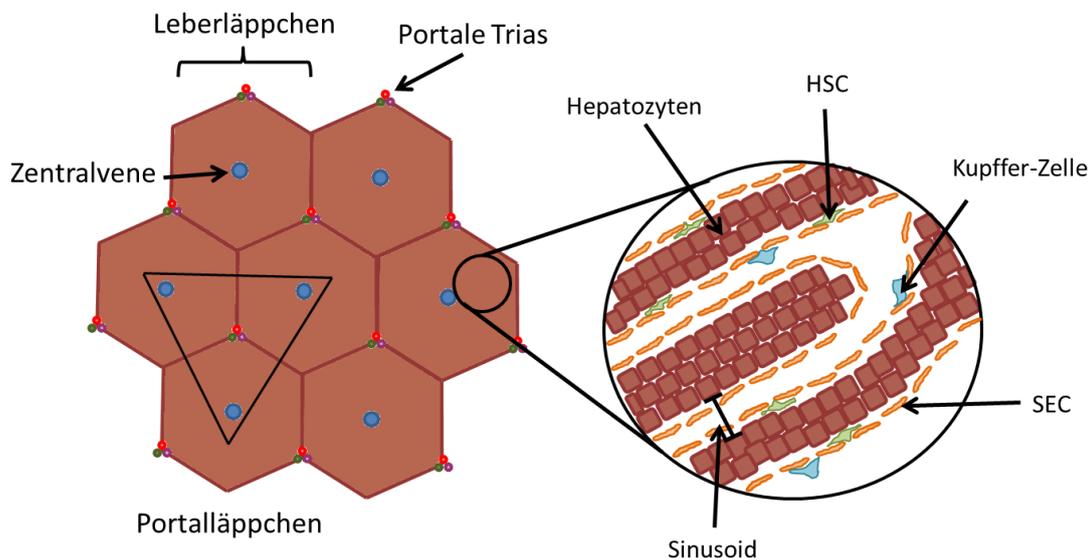


Abbildung 1:

Mikroskopischer Aufbau der Leber. Dargestellt ist die Einteilung der Leber in Leberläppchen und Portalläppchen. Der vergrößerte Bereich (rechts) zeigt die Untergliederung in Sinusoide. Die Sinusoide werden ausgekleidet von Endothelzellen, denen Kupffer-Zellen aufsitzen. Zwischen Endothelzellen und Hepatozyten kann man die hepatischen Sternzellen erkennen.

Die Leberfibrose ist gekennzeichnet durch eine deutliche Zunahme der extrazellulären Matrix (EZM) in der Leber [7, 8]. Die EZM bezeichnet den Anteil eines Gewebes, der nicht aus Zellen besteht. Sie fungiert als Stützgerüst für die Zellen, als Wasserspeicher und interagiert über Rezeptoren auch mit den einzelnen Zellen, die sie umgeben. Auf diesem Weg werden Zellproliferation, -differenzierung und -migration angeregt [9]. Den Hauptanteil der EZM macht Kollagen aus. Andere wichtige Bestandteile sind Laminine, Elastin, Fibrilline, Proteoglykane und Fibronectin [10]. Im Rahmen der Fibrosierung kommt es zu zwei entscheidenden Veränderungen der EZM. Zum einen kommt es zur quantitativen Zunahme und zum anderen

zu einer deutlich veränderten Zusammensetzung der Matrix [11]. Folge sind die zunehmende Vernarbung und Funktionseinschränkung der Leber. Neben dem Ersatz von funktionellem Lebergewebe durch fibrotisches Gewebe, ist für die Leberzirrhose weiterhin die Bildung von Kurzschlussgefäßen zwischen Portal- und Zentralvenen typisch. Hierbei entstehen Gefäße, die das Blut direkt von der Portal- in die Zentralvenen leiten, ohne dass es die Sinusoide passiert [12, 13, 14]. Die Gefäßneubildung in der zirrhotischen Leber beschränkt sich jedoch nicht auf die Entstehung jener Kurzschlussgefäße. Die Untersuchung von Lebergewebe aus verschiedenen Stadien der Zirrhoseentwicklung hat ergeben, dass die Menge der intrahepatischen Gefäße mit zunehmender Fibrosierung ansteigt, so dass in zirrhotischen Lebern mehr Gefäße nachweisbar waren als in fibrotischen Lebern [15]. Für die sogenannte Neo-Angiogenese sind verschiedene Wachstumsfaktoren notwendig, die Endothelzellen zur Vermehrung anregen. Zu diesen Faktoren zählen der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [13, 15, 16] und dessen Rezeptoren fms-like tyrosine kinase-1 (flt-1, VEGF-R1) [15] und fetal liver kinase-1 (Flk-1, VEGF-R2) [17]. VEGF ist ein stark angiogenetisch wirkender Wachstumsfaktor [18], der in der Leber die Neubildung von Gefäßen fördert. Außerdem ist es in die vermehrte Bildung der EZM während der Fibrosierung involviert, da die Blockade des VEGF zu einer signifikanten Reduktion des Kollagen- und Hydroxyprolinegehalts in der fibrotischen Leber führt [19]. Es wurde beschrieben, dass die VEGF-Konzentration in der Leber mit zunehmender Fibrosierung zunimmt [15]. Bei gallengangsligierten Ratten zeigte sich immunhistologisch, dass Hepatozyten sowohl im Stadium der Fibrose als auch der Zirrhose reichlich VEGF exprimieren und dass diese VEGF-Zunahme schon in der frühen Fibrosierungsphase beginnt [20]. Die Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 finden sich in der Leber auf SEC und HSC [21]. Die Bindung des Wachstumsfaktors an diese Rezeptoren aktiviert innerhalb der Zellen verschiedene Signalkaskaden, beispielsweise die Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) über Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K) oder die Kaskade der Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK), die letztendlich zur Angiogenese führen (Abb. 2). Eine Hemmung sowohl der Fibrose als auch der Neo-Angiogenese konnte durch eine Blockade des VEGF-R1 und -R2 erreicht werden, wobei die Hemmung des VEGF-R2 effektiver war [22].

Ein weiterer entscheidender Prozess in der Zirrhoseentwicklung ist die Zellproliferation, die sich in der Bildung von sogenannten Regeneratknotten äußert [1]. Einen wichtigen Übermittler der proliferativen Signale stellt die ERK 1/2 dar (Abb. 2). Es handelt sich dabei um eine Serin/Threonin-Kinase, die sich im Zytoplasma befindet und Teil einer Phosphorylierungskaskade ist, welche z.B. durch die Bindung von VEGF oder Platelet derived Growth Factor (PDGF) an deren spezifische Rezeptoren ausgelöst werden kann [23]. Durch die Phosphorylierung wird die ERK aktiviert. Wichtige Substrate der ERK sind Transkriptionsfaktoren, wodurch Prozesse der Zellvermehrung und des Zellüberlebens induziert werden [24]. Die Expression der ERK ist in zirrhotischen Lebern ausgeprägter als in gesunden Lebern [25, 26]. Nach dem Eintritt des toxischen Schadens kommt es rasch zu einer vermehrten Aktivität der ERK, wohingegen die verstärkte Expression erst zu einem späteren Zeitpunkt auftritt [25].

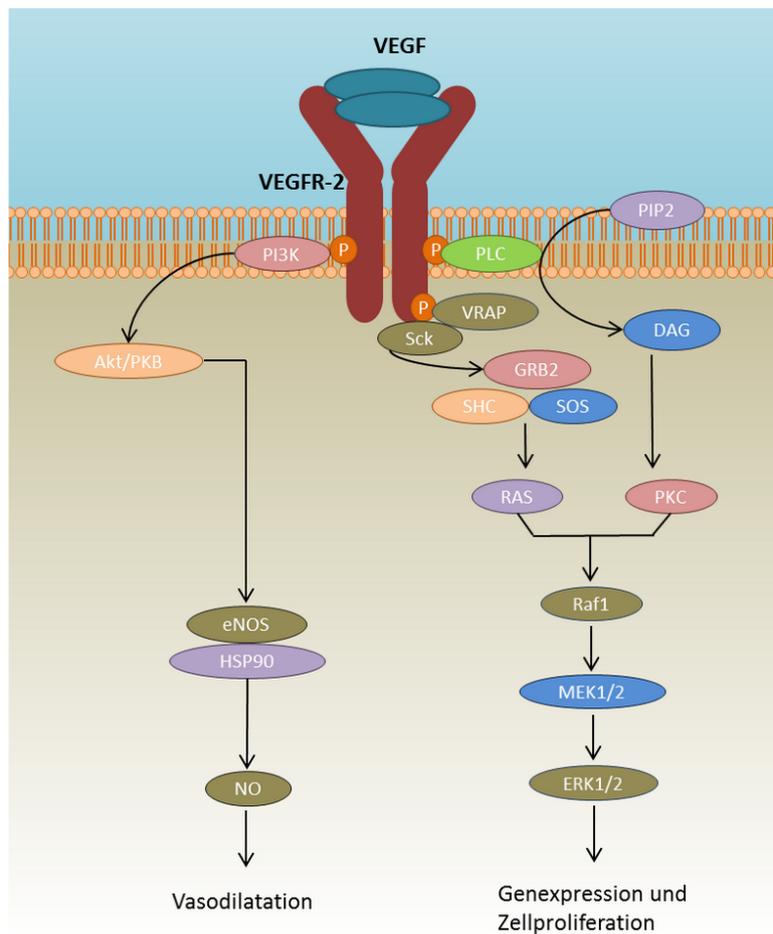


Abbildung 2:

VEGF-Pathway in einer Endothelzelle. Schematische Darstellung der involvierten Proteine. PLC= Phospholipase C, PIP2= Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, VRAP= VEGF Receptor Associated Protein, GRB2= Growth factor Receptor-Bound protein-2, SOS= Son-of-sevenless-Protein, DAG= Diacylglycerol, PKC= Proteinkinase C, MEK1/2= Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase 1/2, ERK1/2= Extracellular signal-Regulated Kinase, PI3K= Phosphatidylinositol 3'-Kinase, Akt/PKB=Protein Kinase B, HSP90= Heat Shock Protein 90, eNOS= endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase , NO= Stickstoffmonoxid

Bei gallengangsligierten Ratten zeigten Zhang et al.[26], dass die Konzentration der ERK 1 linear mit der fortschreitenden Fibrose zunimmt.

Die Zunahme des intrahepatischen Widerstandes führt zur Entstehung der portalen Hypertension, die Auslöser der meisten Komplikationen der Leberzirrhose ist. Die Steigerung des intrahepatischen Gefäßwiderstandes ist auf zwei Mechanismen zurückzuführen: Die zunehmende Anhäufung von fibrotischem Material mit Verengung der Sinusoide und die dynamische Beeinflussung der Gefäßweite der Sinusoide und intrahepatischen Gefäße [27, 28]. Die Vasokonstriktion lässt sich zum einen auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Vasokon-

striktoren [29], zum anderen auf die verringerte Aktivität der eNOS, deren Folge ein relativer Stickstoffmonoxid (NO)-Mangel in der fibrotischen Leber ist [17, 30, 31], zurückführen. Die Aktivität der eNOS ist abhängig von deren Phosphorylierung [32]. Im Zuge der Fibrosierung der Leber nimmt diese Phosphorylierung ab [28, 33, 34]. Die Expression der eNOS hingegen bleibt im Rahmen der Fibroseentwicklung annähernd unverändert [34].

1.2 Die Funktion der HSC

1.2.1 Fibroseentstehung

Eine der wichtigsten Zellpopulationen, die in die Fibroseentwicklung involviert sind, stellen die HSC dar [35, 36, 37]. Sie befinden sich im perisinusoidalen oder Disse'schen-Raum, haben lange Zellausläufer, mit deren Hilfe sie mit anderen Zellen in Kontakt treten, und machen ca. 15 % aller ortsständigen Zellen in der Leber aus. In der gesunden Leber dienen die HSC unter anderem der Speicherung von Vitamin A, da sie bis zu 80 % des gesamten Vitamin A-Gehaltes im menschlichen Körper in Form von Retinoidestern speichern können [38]. Des Weiteren kontrollieren die HSC den Umsatz der EZM im Disse'schen-Raum, produzieren Wachstumsfaktoren und Apolipoproteine, kontrollieren Regenerationsprozesse in der Leber und beeinflussen die Durchblutung der Sinusoide [39]. Aufgrund ihrer durchblutungsregulierenden Eigenschaften und der Kommunikation mit den benachbarten SEC werden sie auch als „Perizyten“ der Lebersinusoide bezeichnet [40]. Während der Fibrogenese in der Leber kommt der Transdifferenzierung der HSC zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen eine Schlüsselrolle zu [36]. Kommt es durch die Einwirkung von Noxen (Hepatitis-Viren, Alkohol, etc.) zur Apoptose oder Nekrose von Hepatozyten, werden Mediatoren freigesetzt, die Entzündungszellen wie T-Lymphozyten anlocken. Diese Zellen initiieren dann durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie dem Tumor Growth Factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) oder PDGF, die Aktivierung der Sternzellen [35, 41]. Außerdem werden die HSC durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), sowie durch Veränderungen der umgebenden EZM, aktiviert [7]. Trotz verschiedener Aktivierungsmodalitäten ist die Reaktion der HSC relativ uniform [36]. Zunächst kommt es zur Initiationsphase, während der die ruhende Sternzelle durch Einwirkung von verschiedenen Zytokinen in Genexpression und Phänotyp verändert wird. Die Phase tritt bereits kurz nach dem Zellschaden ein und ist noch vollständig reversibel. Nach Abschluss dieser Phase ist die Zelle in der Lage auf para- und autokrine Stimuli zu reagieren, wodurch deren Aktivierung bestehen bleibt. Im Anschluss folgt eine Phase der Aufrechterhaltung, welche durch die Proliferation der Sternzellen, Verlust der Vitamin A-Speicher, Chemotaxis, Fibrogenese und Kontraktilität gekennzeichnet ist [36] (Abb. 3). Außerdem kommt es zu einer veränderten Zusammensetzung der EZM zu Gunsten von Kollagen Typ 1 und 3, Laminin, Fibronectin und Elastin, wodurch die Elektronendichte des Disse'schen-Raums deutlich zunimmt [7, 42]. Neben den zahlreichen Veränderung der Morphologie der Sternzellen sind auch die SEC in die Fibrosierung der Leber involviert [43]. Durch parakrine Signale verändert sich der Phänotyp

der SEC, was zum Verlust des fenestrierten Endothels und somit zum eingeschränkten Stoffaustausch zwischen Sinusoid und Hepatozyten führt. Der Verlust des fenestrierten Endothels und die Bildung einer Basalmembran wird als „Kapillarisation“ der Sinusoide bezeichnet (Abb. 4).

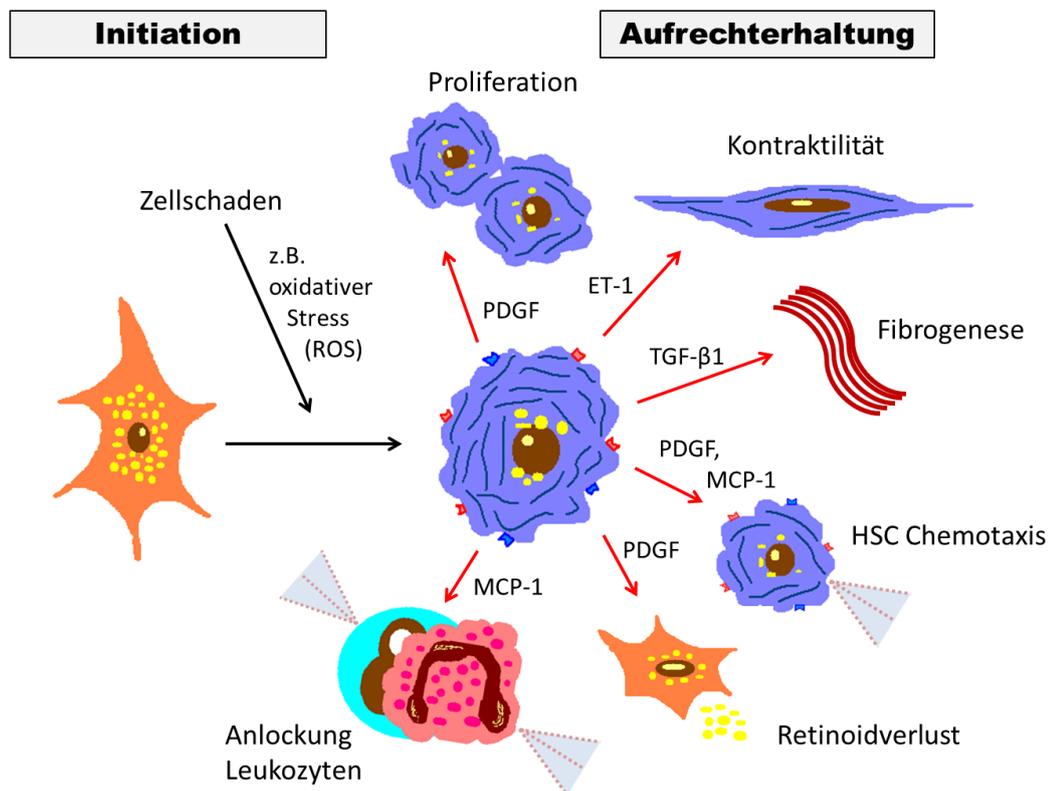


Abbildung 3:

Ablauf der Aktivierung der HSC. Hier sind die Signalwege dargestellt, die vom Zellschaden zur Aktivierung der HSC führen. In der Initiationsphase verändert sich zunächst der Phänotyp der HSC, gefolgt von der Aufrechterhaltungsphase, die unter anderem durch Proliferation, Kontraktilität, Fibrogenese, Chemotaxis, Retinoidverlust und nicht zuletzt die Anlockung von Leukozyten gekennzeichnet ist. Dabei sind eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Mediatoren involviert. MCP-1 = Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1, ET-1 = Endothelin 1. Abbildung frei nach Pereira 2010, Rockey 2013 [44, 45]

Nach ihrer Aktivierung exprimieren die Sternzellen vermehrt PDGF und VEGF-Rezeptoren [21, 36], so dass sie verstärkt auf Proliferationsreize reagieren. In Folge der Rezeptoraktivierung kommt es zur Konformitätsänderung des Rezeptors und Initiierung mehrerer Phosphorylierungskaskaden, wie der Kaskade aus Ras-Raf-Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase (MEK)-ERK, weshalb aktivierte HSC vermehrt phosphoryliertes ERK enthalten [25]. Unter Hypoxie exprimieren HSC vermehrt VEGF-messenger Ribonukleinsäure (mRNA) [46]

und die Phosphorylierung der ERK 1/2 nimmt zu [47], was darauf hinweist, dass Hypoxie zur Proliferation und Differenzierung der HSC führt. In vitro Studien an isolierten HSC haben gezeigt, dass die Stimulation mit exogenem VEGF zu einer verstärkten Phosphorylierung der ERK 1/2 führt und die Migration der HSC fördert [47]. Außerdem steigert VEGF die Zellproliferation von aktivierten HSC in Kultur deutlich [21, 22]. Somit ist VEGF ein wichtiger Mediator in der Fibrogenese, der sowohl para- als auch autokrin auf aktivierte HSC wirkt. In Zusammenschau der bekannten Fakten über die Funktion der HSC in der Fibrogenese lässt sich postulieren, dass der Wachstumsfaktor VEGF, dessen Rezeptor VEGF-R2 sowie die Serin/Threonin-Kinase ERK 1/2 entscheidende Mediatoren darstellen.

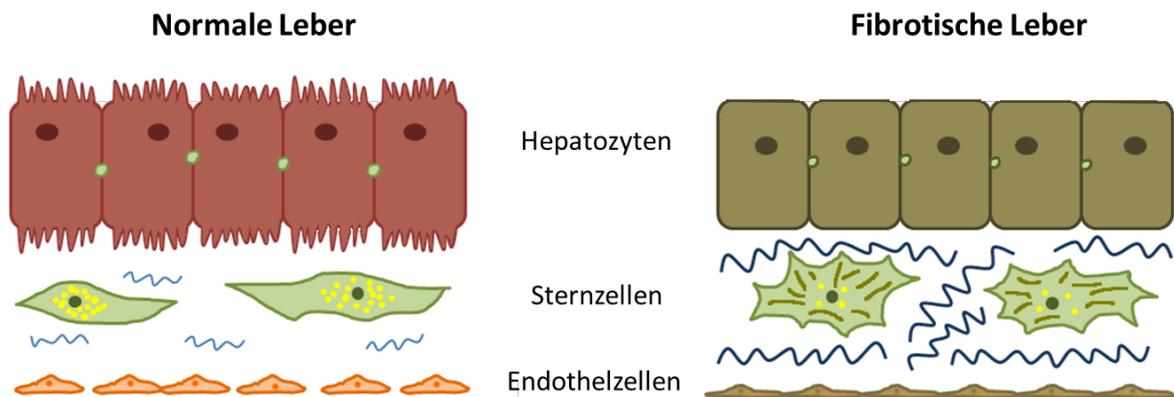


Abbildung 4:

Sinusoidaufbau in normaler und fibrotischer Leber. Vergleichende Darstellung des perisinusoidalen Raums. Im normalen Zustand sind Hepatozyten mit zahlreichen Mikrovilli, Sternzellen mit ausgeprägten Retinoidspeichern und wenig Ausläufern sowie fenestriertes Endothel zu erkennen. Kommt es durch Einwirkung von Noxen zur „Kapillarisierung“ des Sinusoids gehen die Mikrovilli der Hepatozyten verloren, die Sternzellen werden aktiviert, verlieren den Großteil ihrer Retinoidspeicher und bilden α -SMA. Die EZM wird wesentlich dichter und enthält vermehrt Kollagen 1 und 3, Fibronectin sowie Elastin und das Endothel verliert die Fenestrierung.

1.2.2 Portalvenöser Hochdruck - HSC verengen aktiv die Gefäßstrombahn der Leber

In den letzten Jahren haben zahlreiche Untersuchungen gezeigt, dass die HSC nicht nur durch die vermehrte Bildung von EZM im Disse'schen-Raum Einfluss auf die Mikrozirkulation in der Leber nehmen, sondern auch durch aktive Kontraktion den Widerstand der Gefäße erhöhen und somit den portalvenösen Druck steigern [48, 49, 50]. Diese Fähigkeit besteht nur beim aktivierten Phänotyp, der durch die Expression von α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) in der Lage ist auf vasokonstriktische bzw. vasodilatierende Stoffe zu reagieren und somit den Tonus der Sinusoide aktiv zu verändern. Bei α -SMA handelt es sich um die typische Aktin-Isoform glatter Muskelzellen, die ausschließlich in aktivierten HSC exprimiert wird [51]. Unter anderem regulieren die HSC die Sinusoidweite und somit auch den intrahepati-

schen Widerstand, indem sie durch die Einwirkung von Endothelin-1 (ET-1) kontrahieren [52, 53, 54]. Ein wichtiger intrazellulärer Vermittler der Kontraktion der HSC ist die Rho-Kinase [53, 55, 56, 57]. Die Rho-Kinase findet man auch in glatten Muskelzellen. Dort inhibiert sie die Dephosphorylierung der Myosinleichtketten und erhöht die Calciumempfindlichkeit. Diese Mechanismen führen zur Kontraktion der glatten Muskelzellen [58]. Ein Nebeneffekt der Rho-Kinase ist die Hemmung der Aktivität der Protein Kinase B (Akt/PKB), einer intrazellulären Serin/Threonin-Kinase, was zur Verminderung der eNOS-Phosphorylierung führt, die wiederum mit einer Abnahme der NO-Bildung assoziiert ist [59, 60, 61]. Versuche mit gezielter Hemmung der Rho-Kinase in HSC hatten eine signifikante Reduktion des portalen Drucks zur Folge [62], so dass von einem deutlichen Einfluss der HSC auf den portalen Druck ausgegangen werden muss. Das hauptsächlich von SEC ausgeschüttete NO [63] verhindert zum einen die ET-1-abhängige Kontraktion der HSC und führt zu deren Relaxation, zum anderen hemmt es die Expression von α -SMA [40, 53]. In der zirrhotischen Leber ist der NO-Gehalt im Vergleich zur gesunden Leber reduziert, was die Kontraktion der aktivierten HSC begünstigt. Die Verabreichung eines NO-Donors mindert die Kontraktilität der HSC und kann somit den portalen Hochdruck reduzieren [64]. Zwischen der Fibrogenese und der NO-Synthese besteht demnach ein enges Zusammenspiel, welches durch verschiedene exogene Mediatoren beeinflusst wird und in welchem intensive Interaktionen bestehen.

1.3 Das Medikament Sorafenib

Sorafenib ist ein Bis-Aryl-Harnstoff der als Multi-Kinase-Inhibitor fungiert. Untersuchungen in Zellmodellen des klarzelligen Nierenkarzinoms (RCC) und des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) ergaben, dass die Behandlung mit Sorafenib zu einer deutlichen Verminderung des Tumorwachstums führt [65, 66]. Da sich das Medikament auch für die Anwendung am Menschen als sicher erwiesen hat, wird es seit einigen Jahren zur Therapie des fortgeschrittenen RCC [67] und des fortgeschrittenen HCC [68] eingesetzt. Das Medikament wirkt als Inhibitor der Raf-Kinase und verschiedener Rezeptortyrosinkinasen wie VEGF-R2, VEGF-R3, PDGF-R, fibroblast growth factor receptor 1 (FGF-R1), fms-like tyrosine kinase 3 (flt3) und Tyrosinkinase KIT (c-kit) [69]. Zunächst wurde die Wirksamkeit von Sorafenib in verschiedenen Tumoren, die Mutationen im Bereich der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade trugen, wie z.B. eine K-Ras oder B-Raf-Mutation, untersucht. Es zeigte sich, dass Sorafenib, unabhängig davon welche Mutation im Tumor vorlag, die Aktivierung des ERK-Weges, gemessen am Vorhandensein phosphorylierter ERK, hemmte [69, 70]. In verschiedenen Tumor-Xenograft-Modellen mit einer K-Ras-Mutation konnte durch die Sorafenibbehandlung das Tumorwachstum und die Zellproliferation inhibiert werden [71]. In Melanomzellen nahmen durch Sorafenibtherapie die hypoxischen Gebiete zu, während die Gefäßversorgung abnahm [72]. Eine deutlich erhöhte Apoptoserate erzeugte Sorafenib in der Leukämiezelllinie U937 [73] und der HCC-Zelllinie HepG2, jedoch war dieser Effekt nicht auf die Hemmung der MEK-ERK-Kaskade

zurückzuführen, sondern auf eine Überlastung des endoplasmatischen Reticulums sowie eine erhöhte Calciumkonzentration im Zytosol. Zusammen gefasst zeigen die Studien in Tumorzellen, dass Sorafenib antiproliferative, antiangiogenetische und proapoptotische Wirkungen besitzt, wobei aber noch längst nicht alle molekularen Zusammenhänge verstanden sind. Da auch bei der Entwicklung der Leberzirrhose Zellproliferation und Angiogenese eine entscheidende Rolle spielen [12, 13, 14, 35] stellte sich die Frage, ob Sorafenib die Entwicklung der Zirrhose hemmen kann. Zunächst wurden Versuche im Tiermodell durchgeführt, bei denen entweder durch Toxine oder durch Gallengangsligatur eine Fibrose induziert wurde. Es zeigte sich, dass Sorafenib den Grad der Fibrosierung, gemessen mittels der Sirius Red Färbung [17, 74], den portalvenösen Druck [75] und die Anzahl an aktivierten Sternzellen im perisinusoidalen Bereich [17, 74] deutlich reduzierte. Am Tiermodell der sekundär biliären (Bile duct ligated, BDL)-Zirrhose konnte die antiangiogenetische Wirkung von Sorafenib demonstriert werden. Bei Tieren die Sorafenib erhielten, konnte deutlich weniger von-Willebrand-Faktor, ein Marker für vaskuläres Endothel, in den Lebern nachgewiesen werden [28]. Zudem konnte in BDL-Ratten veranschaulicht werden, dass sich die antifibrotische Wirkung von Sorafenib auf den perisinusoidalen Bereich konzentriert und im peribiliären und periportalen Bereich weniger ausgeprägt war [74]. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei immunhistochemischen Untersuchungen der α -SMA positiven Zellen, was darauf hindeutet, dass Sorafenib besonders auf aktivierte Sternzellen wirkt. Um die Effekte auf die aktivierten HSC genauer zu erforschen, folgten Versuche mit Zellkulturen und primären Zellen. Durch die Behandlung mit 1 μ M Sorafenib konnte eine deutliche Reduktion der α -SMA- und Procollagen 1-mRNA-Expression ohne Veränderung der Zellmorphologie in primären HSC (pHSC) gezeigt werden [74]. Die Verminderung von α -SMA konnte auch in der humanen hepatischen Sternzelllinie LX2 (LX2) gezeigt werden [76]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Sorafenib die Aktivierung der Sternzellen effektiv hemmen kann. Jedoch wurde ebenfalls gezeigt, dass durch die Sorafenib-Behandlung aktivierte HSC vermehrt in die Apoptose übergehen, wodurch die Fibrose auch vermindert werden konnte [77].

Die bekannte medikamentöse Therapie der Leberzirrhose zielt auf die Behandlung der Komplikationen ab. Zur Reduktion des portalvenösen Drucks setzt man unselektive β -Rezeptor-Blocker wie Propranolol ein [78, 79, 80]. Jedoch reduzieren β -Rezeptor-Blocker bei 40 % der Patienten den portalen Druck nicht effektiv [81] und haben eine Reihe von Nebenwirkungen wie z.B. die Verminderung der körperlichen Leistungsfähigkeit, die die Patienten in 30 % der Fälle zum Therapieabbruch zwingen [82]. Die Senkung des portalvenösen Drucks durch Sorafenib [17, 75, 83] wird vermutlich durch eine Verringerung des intrahepatischen Widerstandes und eine Reduktion der portosystemischen Kollateralen vermittelt. Der intrahepatische Widerstand konnte durch eine Hemmung der Kontraktilität und Reduktion der Überempfindlichkeit der HSC gegenüber Vasokonstriktoren vermindert werden. Diese Effekte sind durch die vermehrte Expression der Rho A und Rho-Kinase in aktivierten HSC vermittelt, deren Expression durch Sorafenib reduziert werden konnte [75]. Anhand von Patienten,

die Sorafenib aufgrund eines fortgeschrittenen HCC erhielten, konnte bereits gezeigt werden, dass es den portalvenösen Fluss [84] bzw. den hepato-venösen Druckgradienten [85] auch in der menschlichen Leberzirrhose reduzieren kann. In unserem Labor wurde bereits anhand von zirrhotischen Wistar-Ratten die in vivo Wirkung von Sorafenib auf den Gefäßwiderstand der Leberarterie und die Proteinexpression in der Leber untersucht. Bei vorliegender Zirrhose wurde ein reduzierter Gefäßwiderstand der Leberarterie festgestellt [86]. Der Gefäßwiderstand unter Sorafenibtherapie war höher als bei vergleichbaren Zirrhosetieren. Dieser Effekt konnte gezeigt werden, wenn Sorafenib bis zur 8. Woche der Zirrhoseentwicklung gegeben wurde [87]. Wurde es bis zur 12. Woche verabreicht, war der Effekt nicht feststellbar. Wurde das Medikament zwischen der 8. und 12. Woche der Zirrhoseentwicklung gegeben, konnte der Gefäßwiderstand der Leberarterie wiederum gesteigert werden. Es stellt sich also die Frage, weshalb die Sorafenibwirkung in verschiedenen Zirrhosestadien variiert und worin sich die einzelnen Zirrhosestadien auf molekularer Ebene, insbesondere in der Expression der Angiogenese-Vermittler, unterscheiden.

2 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welche Effekte Sorafenib in der Zellpopulation der pHSC hervorruft, ob diese Effekte vom Stadium der Zirrhose beeinflusst werden und in welcher Form diese Effekte zwischen den einzelnen Stadien variieren. Dabei werden folgende Schwerpunkte gesetzt:

1. Ermittlung einer für den in vitro Versuch geeigneten Dosis von Sorafenib anhand von Zelllinien-Versuchen.
2. Darstellung der Effekte der Sorafenibbehandlung auf die Proteinexpression in der Zelllinie und in den pHSC.
3. Untersuchung nachweisbarer Unterschiede in der Proteinexpression von pHSC, die aus Lebern in unterschiedlichen Zirrhosestadien isoliert wurden.
4. Darstellung der Auswirkung der Behandlung mit Sorafenib auf die Proteinexpression der pHSC abhängig davon ob die Zellen aus,
 - normalen,
 - früh zirrhotischen oder
 - fortgeschritten zirrhotischen Lebern isoliert wurden.
5. Untersuchung der Dosisabhängigkeit der durch Sorafenib ausgelösten Effekte.

3 Material und Methodik

3.1 Methodik

3.1.1 Zelllinien

Für die Untersuchungen in der Zelllinien-Kultur wurden die humane hepatische Sternzelllinie HSZ-B-S1 und die murine sinusoidale Endothelzelllinie der Transformed Sinusoidal Endothelial Cells (TSEC) [88] verwendet. Beide Zelllinien (Tab. 22) wurden in „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM) (High Glucose 4,5 g/l, with L-Glutamin) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (PenStrep) kultiviert. In der TSEC-Kultur enthielt das Medium außerdem 1 % Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS). Die HSZ-B-S1 wurden bei 37 °C , 10 % CO₂ und 21 % O₂ kultiviert, wohin gegen die TSEC bei 5 % CO₂ kultiviert wurden. Nachdem die Zellen 4 Stunden im serumfreien Milieu gehalten wurden, folgte die Inkubation mit Sorafenib in verschiedenen Konzentrationen. Sorafenib wurde dazu in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Zellen wurden in vier Gruppen aufgeteilt und mit 2,5, 5 bzw. 10 µg/ml Sorafenib oder reinem DMSO (4 µl/ml) als Kontrolle behandelt. Nach der Beimpfung wurden die Zellen weitere 24 Stunden kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Zellernte bei 4 °C . Zunächst wurden die Zellen mit unsteriler Phosphat Buffered Saline (PBS)-Lösung (siehe Tab. 15) gewaschen und dann in Immunpräzipitationspuffer (IPP) (siehe Tab. 2) lysiert. Die Zellsuspension wurde sofort nach der Ernte bei -80 °C eingefroren.

3.1.2 Vitalitätsbestimmung in den Zelllinien

Zur Überprüfung der Auswirkungen der Sorafenib- und DMSO-Behandlung auf die Vitalität der Sternzell- und Endothelzelllinie wurde ein Teil der Zellen nach obigem Schema behandelt und im Anschluss eine Prüfung der Zellproliferation mittels eines Zellproliferationsassays durchgeführt. Das CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay enthält ein Tetrazolin-Salz (MTS) und das elektronenbindende Reagenz Phenazin Ethosulfat (PES). Die Verbindung beider Stoffe (Owen’s Reagenz) wird von lebenden, proliferierenden Zellen in den farbigen Stoff Formazan umgesetzt, dessen Menge photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden kann. Im Anschluss an die Behandlung der Zellen mit Sorafenib oder DMSO wurden 200 µl MTS-Reagenz pro ml Medium auf die Zellen gegeben und die Zellen für weitere 2 Stunden unter den angegebenen Konditionen inkubiert. Die Detektion der Formazan-Bildung erfolgte mit dem iMARK Microplate Reader bei 490 nm. Zum Abgleich wurde auch eine Lebendkontrolle, die Medium ohne Zusatzstoffe enthielt, und eine Todkontrolle mit gemessen.

3.1.3 Zirrhoseinduktion

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten aus der universitätseigenen Zucht verwendet. Die Behandlung der Tiere mit Tetrachlormethan (CCl_4) zur Induktion einer Leberzirrhose [89] und die Entnahme der hepatischen Sternzellen [90] wurde vom Tierschutz-Komitee der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt (TV-Nr.: ist 203.h-42502-2-1096 MLU). Die Tiere wurden ab einem Alter von 4 Wochen und mit einem Gewicht von 90-100 g für die Versuche herangezogen. Es erfolgte die Aufteilung in drei Gruppen: eine Gruppe blieb unbehandelt, eine Gruppe wurde für 8 Wochen und eine Gruppe für 12 bis 15 Wochen mit CCl_4 behandelt. Dazu inhalierten die Tiere dreimal wöchentlich CCl_4 . Die Begasungsdauer wurde langsam gesteigert, so dass sie nach 6 Wochen 3-4 Minuten betrug. Die letzte Begasung wurde 5-10 Tage vor dem Experiment vorgenommen. Zusätzlich zur CCl_4 -Inhalation erhielten die Tiere mit 0,35 g/l Phenobarbital versetztes Trinkwasser. Nach der letzten Behandlung wurde bis zum Experiment phenobarbitalfreies Trinkwasser angeboten. Die Behandlung der Versuchsgruppe, die 12 bis 15 Wochen CCl_4 erhielten, wurde beendet wenn die Ratten Aszites ausgebildet hatten.

3.1.4 Zellisolation

Für die Experimente wurden pHSC aus Rattenlebern isoliert. Hierzu wurde die Leber mit Pronase, Kollagenase und Desoxyribonuklease (DNase), die in „Gey’s Balanced Salt Solution“ (GBSS) gelöst waren, perfundiert [90]. Zunächst wurden die notwendigen Lösungen (Tab. 17) vorbereitet, wozu die Kollagenase direkt im GBSS gelöst wurde und alle Lösungen bei 37 °C temperiert wurden. Die im Voraus bereits aliquotierte DNase (Tab. 1), sowie die in sterilem Aqua bidest gelöste Pronase, wurden zuletzt in die GBSS-Lösung gegeben. Anschließend wurde das Tier mit Isofluran und Narcoren narkotisiert, gewogen und mit Heparin gewichtsadaptiert behandelt. Nach der Fixation erfolgte die Eröffnung der Bauchdecke bis zum Sternum. Nun wurden Ligaturen um die untere Hohlvene und die Pfortader gelegt. Unter Verwendung einer 22G Venenverweilkanüle erfolgte die Punktion der Pfortader distal der vorgelegten Ligatur mit Fixierung. Unter einem Fluss von 20 ml/min wurde das Schlauchsystem mit der Venenverweilkanüle konnektiert. Unmittelbar nach dem Anschluss des Schlauchsystems fand die Eröffnung der unteren Hohlvene distal der Ligatur statt. So konnte die Leber blutleer gespült werden. Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet und die obere Hohlvene legiert, um ungerichteten Pufferabfluss zu vermeiden. Nachdem die Ausspülung des Blutes mit dem heparinversetzten GBSS beendet war, begann die Verdauungsphase mit Pronase, Kollagenase und DNase. Zunächst wurde die Leber für 5 Minuten mit einem Fluss von 10 ml/min perfundiert, dann wurde die Ligatur der unteren Hohlvene verschlossen und bis zum Aufbrauchen der Lösung mit 5 ml/min weiter perfundiert (Abb. 5). Anschließend wurde die Leber entnommen, von Fett und Portalvene freipräpariert und dann zerkleinert. Die Gewebesuspension wurde in die niedriger konzentrierte Pronase-Kollagenase-DNase-Lösung

überführt und für 10 Minuten im Wasserbad zur weiteren Verdauung erwärmt, wobei sie alle 2 Minuten vorsichtig geschwenkt wurde. Im Anschluss wurde die Gewebesuspension durch eine sterile Mullkompressen und einen Falcon Cell Strainer (100 μm) filtriert. Die entstehende Lösung wurde auf zwei 50 ml Falcon Tubes aufgeteilt und für 4 Minuten mit 50 xg bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei frische Falcon Tubes überführt und erneut für 5 Minuten mit 800 xg bei 4 °C zentrifugiert. Das zurückgebliebene Pellet wurde verworfen. Auf den zweiten Zentrifugationsschritt folgten das Verwerfen der entstandenen Flüssigkeit und die Resuspension des Zellpellets in „Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium“ (IMDM) (versetzt mit 10 % FKS und 1 % PenStrep). Die Menge des eingesetzten Mediums hing von der Ausbeute des Versuchs ab. Pro 10 cm Zellkulturschale wurden 10 ml Medium verwendet. Da die Zellausbeute bei den nicht zirrhotischen Lebern sehr gering ausfiel, entschied man sich jeweils die pHSC von 2 zeitgleich perfundierten Rattenlebern zu poolen und gemeinsam zu kultivieren.

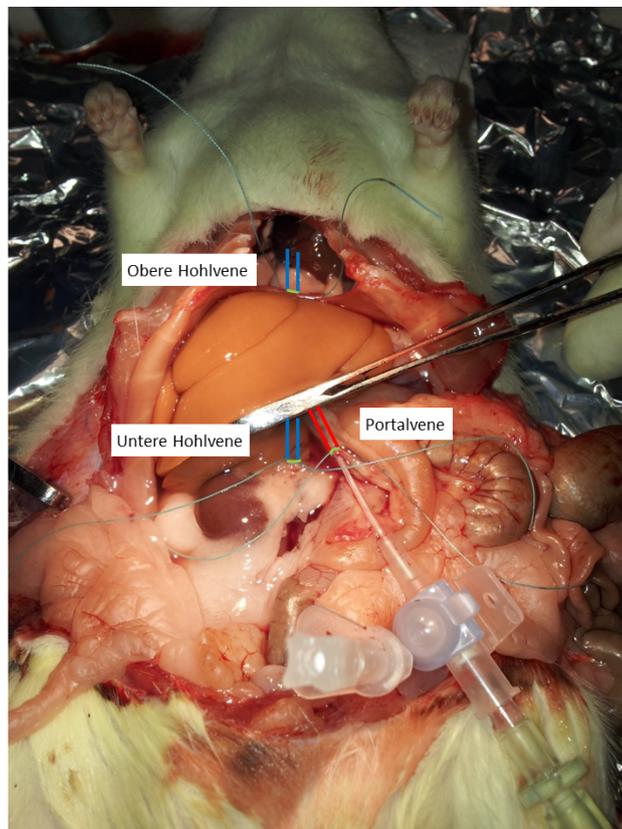


Abbildung 5:

Wistar-Ratte während Leberperfusion. Abgebildet ist das Versuchstier mit eröffnetem Abdomen und Thorax. Zustand während der Perfusion der Leber mit Puffer 2 (Fluss 5 ml/min). Blaue und rote Markierung = Gefäße, grüne Markierung = Gefäßligatur

3.1.5 Zellbehandlung und -ernte

Nach dem Ausbringen der Zellen auf die Zellkulturschalen wurden diese 18-20 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert bis sich die Zellen an den Untergrund angeheftet hatten. Im Anschluss wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei 9 ml serumfreies Medium (IMDM) auf die Zellen gegeben wurde. Die Zellen verblieben 4 Stunden im serumfreien Medium, bevor sie mit der Sorafenib-Lösung für 24 Stunden behandelt wurden. Sorafenib wurde dazu in DMSO gelöst. Die Zellen wurden in 3 Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe wurde mit 1,25 µg/ml Sorafenib, die zweite Gruppe mit 2,5 µg/ml Sorafenib und die letzte Gruppe nur mit 1 µl/ml DMSO behandelt. Am Folgetag wurden die Zellen fotografiert und anschließend geerntet. Zunächst erfolgte ein Waschschrift mit dem vorbereiteten Waschpuffer (Tab. 4), um die Zellen anschließend mit Lysepuffer (Tab. 5) zu lysieren. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellsuspension wurde umgehend bei -80 °C tiefgefroren.

3.1.6 Probenaufarbeitung und Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der BCA (Bicinchoninic acid)-Methode durchgeführt [91, 92]. Diese Methode gründet sich auf die Bindung von Cu-Ionen an das Reagenz, was zur Bildung eines stabilen farbigen Komplexes führt. Die Menge des Komplexes kann photometrisch bestimmt werden und so auf die Proteinmenge zurück geschlossen werden. Die Zellsuspensionen wurden zunächst langsam aufgetaut und dann bei 16089 xg und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet verworfen. Die einzelnen Proben wurden noch einmal aufgeschüttelt, um dann jeweils 10 µl auf die Testplatte aufzutragen. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Bovine Serum Albumin (BSA)-Lösung in den Verdünnungen 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 mg/ml verwendet. Dann wurde die Reagenzlösung aus 49 Teilen BCA und einem Teil Kupfer-2-Sulfat-Lösung hergestellt, von der jeweils 200 µl auf die Standardreihe bzw. die Proben gegeben wurden. Danach wurde die Testplatte bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem iMARK Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 655 nm bzw. 560 nm. Daraufhin wurde zunächst die Eichkurve erstellt, die verwendet wurde wenn der Korrelationskoeffizient mindestens 0,99 betrug. So konnte anhand der Eichkurve die Proteinmenge ermittelt werden. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung der Proteinmengen in dem ein Testpolyacrylamid-Gel angefertigt wurde, auf das die Proben wie unten beschrieben zu je 2,5 µl gemeinsam mit einer Kontrolle, deren Proteinkonzentration bekannt war, aufgetragen wurden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zunächst 60 Minuten in Fixierlösung (Tab. 8) fixiert, danach 2 x 10 Minuten mit Aqua bidest gewaschen und im Anschluss über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in Coomassie Blue Silver angefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Entfärberlösung über 2 x 30 Minuten. Danach erfolgte die Ausmessung der Bandenintensität durch Einscannen des Gels und Anwendung des Programms Image J. Durch Vergleich mit der 42 kD Bande der bekannten Kontrolle

konnten die Proteinkonzentrationen abgeleitet werden. Die Überprüfung war notwendig, da sich im verwendeten Lysepuffer Dithiothreitol (DTT) als stark reduzierender Stoff befand, der die Proteinbestimmung mit Hilfe von BCA störte. Nachdem die Proteinkonzentrationen bestimmt waren, wurden die Proben zu je 40 bzw. 30 µg Protein aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

3.1.7 SDS-Page

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Der hierbei verwendete Puffer [93] und das Gel enthielten Natrium Dodecyl Sulfate (SDS). Dieser Stoff führt durch seine Anlagerung zur negativen Ladung der denaturierten Proteine, so dass diese sich gerichtet im elektrischen Feld bewegen. Die eigentliche Auftrennung nach der Größe geschieht durch die Maschengröße des Polyacrylamid-Gels. In den beschriebenen Experimenten wurden ein 7 %iges Sammelgel und ein 10 %iges Trenngel verwendet (Tab. 18). Zum Abgleich der Proteingröße wurden verschiedene Marker (Tab. 25) verwendet.

Zunächst wurde das Polyacrylamid-Gel hergestellt. Dazu wurde zuerst das Gelgießsystem aufgebaut und mit flüssiger 1 %iger Agarose abgedichtet. Es folgte das Gießen des 10 %igen Trenngels. Dieses wurde mit 70 %igem Ethanol überschichtet und die Polymerisierung abgewartet. Nach der Entfernung des Ethanols folgte das Überschichten mit 7 %igem Sammelgel und die Platzierung der Kämme. Nach der vollständigen Polymerisierung wurde das Gel entweder direkt verwendet oder bis zu Verwendung bei 4 °C gelagert.

Um die Proben für die Elektrophorese vorzubereiten, wurden die aufgetauten Proteinaliquotes mit je 15 µl SDS-Probenpuffer (Tab. 14) versetzt und im Thermoschüttler bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Das Polyacrylamid-Gel wurde in die Laufkammer eingehängt, diese mit Laufpuffer (Tab. 11) gefüllt und die Kämme entfernt. Nach kurzem Anzentrifugieren folgte das Auftragen der Proteinproben sowie von 5 µl Proteinmarker pro Gel. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V für 30 Minuten angelegt, die dann auf 100 V erhöht wurde. Wenn die Bromphenolblaufront das Gel passiert hatte, wurde die Gelelektrophorese beendet.

3.1.8 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren dient der Immobilisation von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf einer Membran [94]. Dazu kann z.B. eine Nitrocellulose-Membran oder wie im vorliegend Experiment eine Polyvinylidenfluorid (PVDF-Membran) verwendet werden [95]. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgt entlang eines elektrischen Feldes (Abb. 6). Dabei wandern die Proteine im Transferpuffer Richtung Anode. Während des Transfers bleiben die Proteine aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an der PVDF-Membran haften.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Polyacrylamid-Gele 10 Minuten in Transferpuffer (Tab. 12) gewaschen. Die PVDF-Membranen wurden für 30 Sekunden mit Methanol aktiviert, mit Aqua bidest gespült und für 2-3 Minuten, ebenso wie zwei 9x9 cm große Stücke 3MM-Papier und die Schwämme, in Transferpuffer getaucht. Es folgte die Bestückung der Blotkassette laut Abb. 6. Unter Beachtung der richtigen Polung wurde die Blotkassette in die Blotkammer gesteckt und diese mit Transferpuffer gefüllt. Die Proteinübertragung wurde mit 400 mA für 3 Stunden bei 4 °C durchgeführt. Am Ende des Blotvorgangs wurden die Markerbanden vorsichtig mit einem Kugelschreiber auf der PVDF-Membran nachgezeichnet. Zur Kontrolle der Proteinbeladung erfolgte die Anfärbung mit Ponceau-S-Lösung für 2 Minuten (Tab. 6) mit anschließender Entfärbung mit Aqua bidest. Danach wurde die Membran mit „Tris-buffered saline with Tween 20“ (TBST) (Tab. 13), das mit 5 % Milchpulver versetzt war, für 2 Stunden bei RT geblockt.

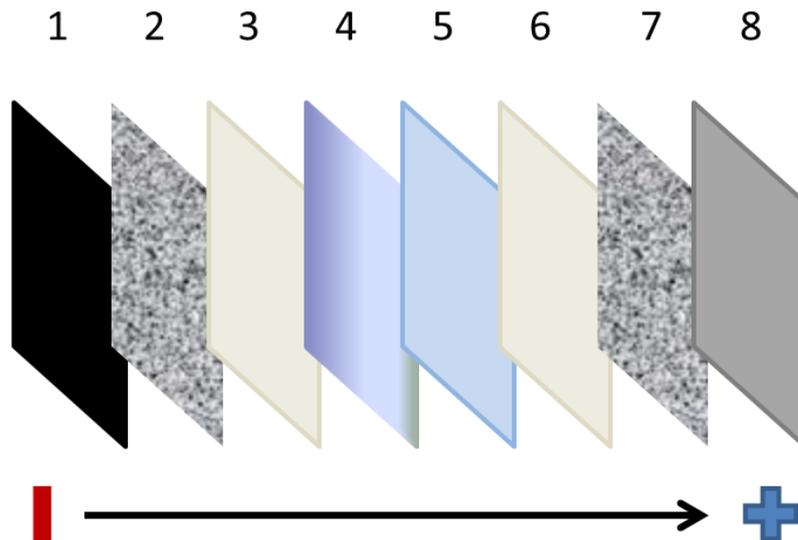


Abbildung 6:

Skizze zur Bestückung der Blotkammer. 1 = schwarze Kassettenhälfte, 2 = Schwamm, 3 = 3MM-Papier, 4 = SDS-Gel, 5 = PVDF-Membran, 6 = 3MM-Papier, 7 = Schwamm, 8 = graue Kassettenhälfte, Pfeil = Transferrichtung

3.1.9 Immundetektion

Die Immundetektion mit Hilfe eines primären und eines sekundären Antikörpers ist ein etabliertes Verfahren bei der Auswertung von Western Blots [94, 96]. Zunächst bindet ein spezifischer primärer Antikörper an das zu untersuchende Antigen. Danach erfolgt ein Waschschriff um unspezifische Bindungen zu verringern. Der sekundäre Antikörper ist spezifisch gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet und bindet dort. An diesen Antikörper ist ein Enzym gebunden, die sogenannte Horseradish peroxidase (HRP) [94, 96]. Diese Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophthalat. Als weiteres Reagenz wird H_2O_2 benötigt. Diese chemische Reaktion führt zur Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm (Abb. 7). Die Stärke der Lichtblitze lässt sich durch Zugabe von p-Hydroxycumarinsäure, die als Enhancer wirkt, noch verstärken. Das ausgesendete Licht kann dann mit einem Film oder einem automatischen Chemilumineszenz-System detektiert werden. Bei den durchgeführten Versuchen wurde auf zwei unterschiedliche Detektionsverfahren zurückgegriffen. Zur Relativierung der Proteinmengen wurde auf jeder Membran auch β -Actin bzw. Vinculin nachgewiesen.

Die blockierten PVDF-Membranen wurden mit den entsprechenden primären Antikörpern (Konzentration siehe Tab. 21), die in TBST mit 5 % Milchpulver gelöst waren, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgte ein 3x10 minütiger Waschschriff mit TBST, bevor sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der in TBST gelöst war, für eine 1 Stunde bei RT anschloss. Danach wurde ein erneuter 3x10 minütiger Waschschriff mit TBST durchgeführt. Bei der Sternzelllinie wurde die Lichtreaktion mit fertiger „Enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Lösung (Tab. 25) ausgelöst und mit ECL-Hyperfilm in der Dunkelkammer detektiert. Die ECL-Lösung wurde zu gleichen Teilen gemischt und der Membran für 2 Minuten angeboten. Danach wurde die Membran in Folie eingeschlagen und mit dem Film in die Röntgenkassette gelegt. Die Belichtung erfolgte für 30 Sekunden bis 30 Minuten, je nach Antikörper. Die Filme wurden im Entwicklerautomaten entwickelt und im Abschluss die Marker per Hand übertragen. Zur Auswertung wurden die Filme eingescannt und die relative Bandenstärke mit dem Programm Image J gemessen. Die Detektion der Lichtreaktion bei den TSEC und pHSC erfolgte mit dem automatischen Chemilumineszenz-Detektor Fusion X. Die Membranen wurden in dem kalibrierten Gerät platziert, nachdem sie 2 Minuten in 2 ml vorbereiteter ECL-Lösung (Tab. 16) inkubiert wurde. Die Detektion der Lumineszenz dauerte 1 bis 10 Minuten je nach Antikörper. Der Höhenabgleich wurde mit Hilfe der Overlay-Technik erstellt. Die Messung der Bandenintensität erfolgte ebenfalls mit dem Programm Image J. Zur Darstellung der relativen Proteinmenge, wurden die ermittelten Werte durch den entsprechenden β -Actin- bzw. Vinculin-Wert dividiert.

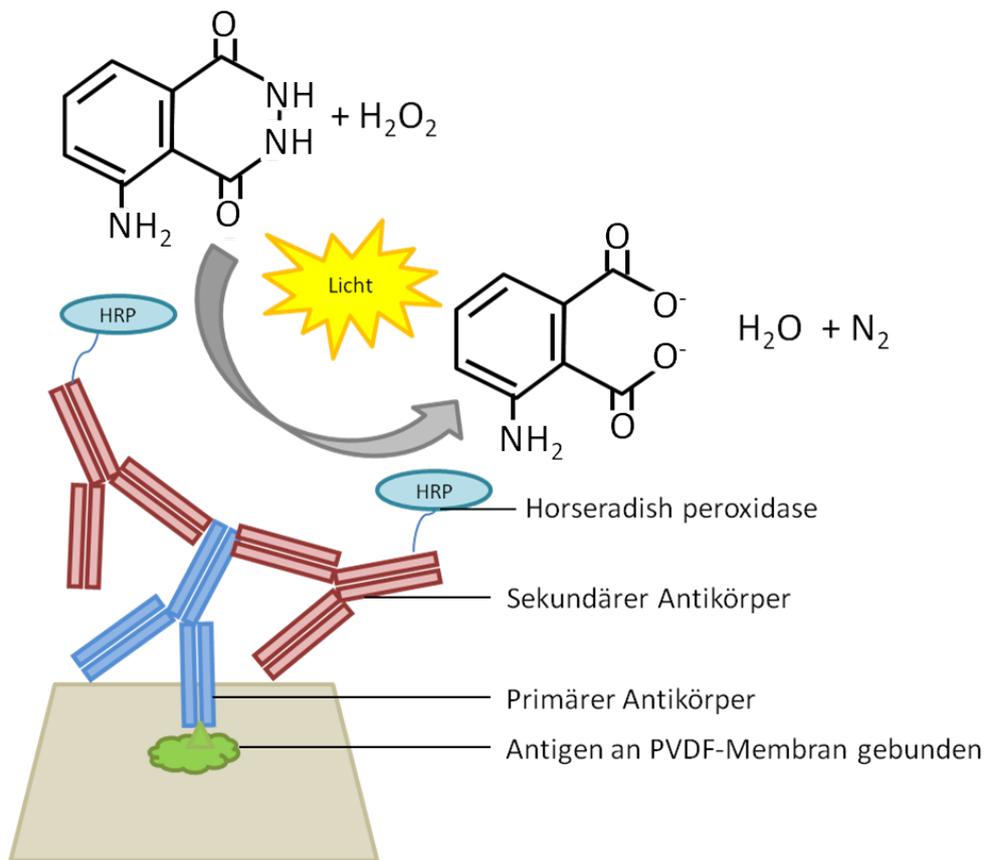


Abbildung 7:

Funktionsweise der Immundetektion: Nachdem der primäre Antikörper gebunden hat, wird dieser vom sekundären Antikörper gebunden. Dieser wiederum trägt die HRP mit deren Hilfe eine chemische Reaktion katalysiert wird, die mit einer Lichtemission einhergeht.

3.1.10 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme Windows Excel 2007 und SPSS 15.0 für Windows verwendet. Für jedes Experiment wurde der Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Zur Prüfung der Signifikanz wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bei signifikanten Unterschieden schloss sich der Mann-Whitney-U-Test an. Als signifikant wurden Ergebnisse mit einem $p \leq 0,05$ angesehen.

3.2 Material

3.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 1: DNase I-Lösepuffer 500 ml

Chemikalie	Menge
MgCl ₂	0,048 g
TRIS/HCl	1,576 g
Aqua bidest	auf 500 ml auffüllen

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und die Lösung steril filtriert. 100 mg DNase I wurden in 10 ml Puffer gelöst und zu 1 ml aliquotiert (Lagerung bei -80 °C).

Tabelle 2: IPP 2x 100 ml

Chemikalie	Menge
EDTA	0,744 g
EGTA	0,076 g
NaCl	1,753 g
Triton X-100	2 ml
Aqua bidest	auf 100 ml auffüllen

Der pH-Wert wurde mit 5M NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde dann im Verhältnis 1:2 mit Aqua bidest verdünnt und man gab pro 10 ml Lösung je eine Tablette Protease-Inhibitor von Roche dazu. Bis zur Verwendung aliquotierte man die Lösung zu je 1 ml und lagerte sie bei -20 °C.

Tabelle 3: Waschpufferstocklösung für primäre Sternzellen 1000 ml

Chemikalie	Menge
TRIS	6,05 g
EDTA	744,4 mg
EGTA	380,4 mg
NaF	2,1 g
Aqua bidest	auf 1000 ml auffüllen

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und die Stocklösung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4: Verwendungsbereiter Waschpuffer 50 ml

Chemikalie	Menge
Waschpufferstocklösung	50 ml
DTT	7,7 mg
Na ₃ VO ₄	9,2 mg
Na ₄ P ₂ O ₇	133 mg

Tabelle 5: Lysepuffer für primäre Sternzellen 1 ml

Chemikalie	Menge
Verwendungsbereiter Waschpuffer	1 ml
Triton X-100	10 µg
10 % SDS	10 µl
0,2 M PMFS	5 µl
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (1 Tablette in 500 µl Aqua bidest gelöst)	20 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	10 µl

Tabelle 6: Ponceau S Rot 100 ml

Chemikalie	Menge
Ponceau S	0,1 g
conc. Eisessig	5 ml
Aqua bidest	auf 100 ml auffüllen

Tabelle 7: Coomassie Blue Silver 100 ml

Chemikalie	Menge
ortho-Phosphorsäure	11,5 ml
Ammoniumsulfat	10 g
Coomassie G 250	120 mg
Aqua bidest	68,5 ml
Methanol	20 ml

Zunächst Vermischung der ortho-Phosphorsäure mit 8,5 ml Aqua bidest. Darin wurde das Ammoniumsulfat gelöst, bevor man das Coomassie zugab. Abschließend wurde mit Aqua bidest und Methanol aufgefüllt.

Tabelle 8: Coomassie Blue Silver Fixierlösung 50 ml

Chemikalie	Menge
Aqua bidest	25 ml
Essigsäure	5 ml
Ethanol	20 ml

Tabelle 9: Coomassie Blue Silver Entfärber-Lösung 50 ml

Chemikalie	Menge
Aqua bidest	35 ml
Methanol	15 ml

Tabelle 10: GBSS pH 7,4 1000 ml

Lösung A	800 ml
CaCl ₂ x2H ₂ O	298 mg
MgCl ₂ x6H ₂ O	210 mg
MgSO ₄	34,2 mg
KCl	370 mg
NaHCO ₃	2,27 g
NaCl	7 g
Na ₂ HPO ₄	119,6 mg
D-Glucose	1 g
Aqua bidest	800 ml
Lösung B	100 ml
KH ₂ PO ₄	30 mg
Aqua bidest	100 ml

Der pH-Wert wurde mit 5M NaOH auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurden Lösung A und B vereinigt und erneut der pH-Wert auf 7,4 adjustiert, um dann die Gesamtmenge mit Aqua dest auf 1000 ml aufzufüllen.

Tabelle 11: Laufpuffer (10x) 1000 ml

Chemikalie	Menge
TRIS	31,0 g
Glycin	144,0 g
10 % SDS	100 ml
Aqua bidest	auf 1000 ml auffüllen

Zur Verwendung wurde der Laufpuffer (10x) im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest verdünnt.

Tabelle 12: Transferpuffer (5x) 1000 ml

Chemikalie	Menge
TRIS	30,29 g
Glycin	35,66 g
10 % SDS	2,5 ml
Aqua bidest	auf 1000 ml auffüllen

Zur Verwendung wurde der Transferpuffer (5x) im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest verdünnt.

Tabelle 13: TBST (10x) 1000 ml

Chemikalie	Menge
TRIS	24,24 g
NaCl	88,13 g
Tween 20	10 ml
Aqua bidest	auf 1000 ml auffüllen

Der pH-Wert wurde mit 5M HCl auf 7,5 eingestellt. Zur Verwendung wurde die TBST-Lösung (10x) im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest verdünnt.

Tabelle 14: SDS-Probenpuffer 50 ml

Chemikalie	Menge
Tris/HCl pH 6,8	0,379 g
SDS	1,00 g
Glycerol	5,00 g
Bromphenolblau-Na-Salz	5 mg

Aqua bidest auf 50 ml auffüllen

Puffer wurde zu je 950 μ l aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Zur Verwendung wurde nach dem Auftauen im folgenden Verhältnis 2-Mercaptoethanol dazugegeben: 50 μ l pro 950 μ l SDS-Puffer

Tabelle 15: PBS-Puffer (10x) 1000 ml

Chemikalie	Menge
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Aqua bidest	auf 1000 ml auffüllen

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Zur Verwendung wurde die Lösung im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest verdünnt und der pH-Wert erneut kalibriert.

Tabelle 16: ECL-Lösung

Lösung A	201 ml
0,1 M TRIS (in Aqua bidest)	200 ml
50 mg/ml Luminol (in Aqua bidest)	1 ml
Lösung B	10 ml
para-Hydroxycumarinsäure	11 mg
DMSO	10 ml

Zur Verwendung wurden Lösung A und B im Verhältnis 10:1 gemischt und pro 1 ml Lösung A gab man 0,3 μ l H₂O₂ zu.

Tabelle 17: Puffer zur Sternzellisolation

Puffer	GBSS-Volumen	Zusätze (erst kurz vor Perfusion zugeben)
1	100 ml	2000 U Heparin
2	200 ml	300 mg Pronase 10 mg DNase I 30 mg Kollagenase (39 mg bei Zirrhosetieren)
3	100 ml	40 mg Pronase

10 mg DNase I
10 mg Kollagenase (15 mg bei Zirrhosetieren)

Tabelle 18: Protokoll Trenngel und Sammelgel

SDS-Trenngel	30ml 10%iges Gel	SDS-Sammelgel	10ml 7%iges Gel
Polyacrylamid	10,00 ml	Polyacrylamid	2,33 ml
1,5 M Tris pH 8,8	7,50 ml	0,5 M Tris pH 8,8	2,50 ml
Aqua bidest	12,04 ml	Aqua bidest	5,02 ml
10 % SDS	300 µl	10 % SDS	100 µl
TEMED	15 µl	TEMED	5 µl
10 % APS	150 µl	10 % APS	50 µl

3.2.2 Verwendete Medien und Zusätze

Tabelle 19: Medien und Medienzusätze

Medium	Firma, Ort, Land
DMEM (4,5 g/l Glukose, +Glutamin)	PAA, Cölbe, Deutschland
IMDM	Gibco, Darmstadt, Deutschland
FKS	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland

3.2.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 20: Antikörper

Primärer Antikörper	Ziel-spezies	Ursprungs-spezies	Hersteller, Ort, Land
Anti-eNOS/NOS Typ III	Ratte	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, D
Anti-p44/42-MAP-Kinase	Ratte	Hase	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-peNOS-IgG	Ratte	Human	abcam, Cambridge, GB
Anti-P-p44/42-MAP-Kinase	Ratte	Hase	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti- β -Actin	Ratte	Maus	Millipore, Darmstadt, D
Anti-VEGF	Ratte	Maus	Santa Cruz, Heidelberg, D

Anti-VEGF-Receptor 2	Ratte	Hase	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Vinculin	Ratte	Maus	Chemicon, Darmstadt, D
Sekundärer Antikörper	Ziel- spezies	Ursprungs- spezies	Hersteller, Ort, Land
Anti-Mouse-IgG-HRP	Maus	Pferd	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Rabbit-IgG-HRP	Hase	Ziege	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

Tabelle 21: Antikörper-Konzentrationen

primäre Antikörper	eingesetzte Konzentration
Anti-eNOS/NOS-IgG Typ 3	1:500
Anti-p-44/42-MAP-Kinase-IgG	1:1000
Anti-peNOS-IgG	1:500
Anti-P-p-44/42-MAP-Kinase-IgG	1:1000
Anti-VEGF-IgG	1:1000
Anti-VEGF-Receptor-2-IgG	1:1000
Anti-Vinculin-IgG	1:6000
Anti- β -Actin	1:5000
sekundäre Antikörper	eingesetzte Konzentration
Anti-Mouse-IgG-HRP	1:1000
Anti-Rabbit-IgG-HRP	1:1000

3.2.4 Biologisches Material

Tabelle 22: Zelllinien

Zelliniename	Ursprung, Ort, Land
TSEC	MD Robert C. Huebert, Mayo Clinic, Rochester, USA
HSZ-B-S1	AG Prof. Dr. Hellerbrand, Uniklinikum Regensburg, Deutschland

Tabelle 23: Versuchstiere

Tierstamm	Ursprung, Ort, Land
Wistar-Ratten	ZMG, Halle, Deutschland

3.2.5 Verwendete Kits und Hilfsstoffe

Tabelle 24: BCA-Kit

Bicinchoninic Acid solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Copper(II)sulfate solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 25: Hilfsstoffe

Stoff	Hersteller, Ort, Land
Albumin Standard	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope	BioRad, München, Deutschland
SpectraMulticolorBroad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
ECL Western Blotting Detecting Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

3.2.6 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Eine Aufzählung der verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien findet sich in der Anlage.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche in der humanen Sternzelllinie HSZ-B-S1 zur Findung der geeigneten Sorafenibdosis

Zunächst wurde die Zelllinie mit 2,5, 5, 10 µg/ml Sorafenib bzw. mit DMSO über 24 Stunden behandelt. Im Anschluss wurde eine Vitalitätsbestimmung mittels MTS-Test durchgeführt, um die Zelltoxizität von Sorafenib zu bestimmen. Nach der Behandlung mit 2,5 µg/ml Sorafenib lag die Vitalität bei ca. 57 % der Kontrolle. Wurden 5 bzw. 10 µg/ml Sorafenib verwendet, waren nur noch ca. 29 % der Zellen, verglichen mit der Kontrolle, vital. Im Anschluss an die Behandlung der Zellen wurden diese noch einmal mikroskopisch inspiziert und ihre morphologischen Veränderungen fotodokumentiert (Abb. 8). Aufgrund der gewonnen Erkenntnisse über die Toxizität von Sorafenib wurden zur Behandlung der pHSC geringere Sorafenibdosen von 1,25 und 2,5 µg/ml angewendet.

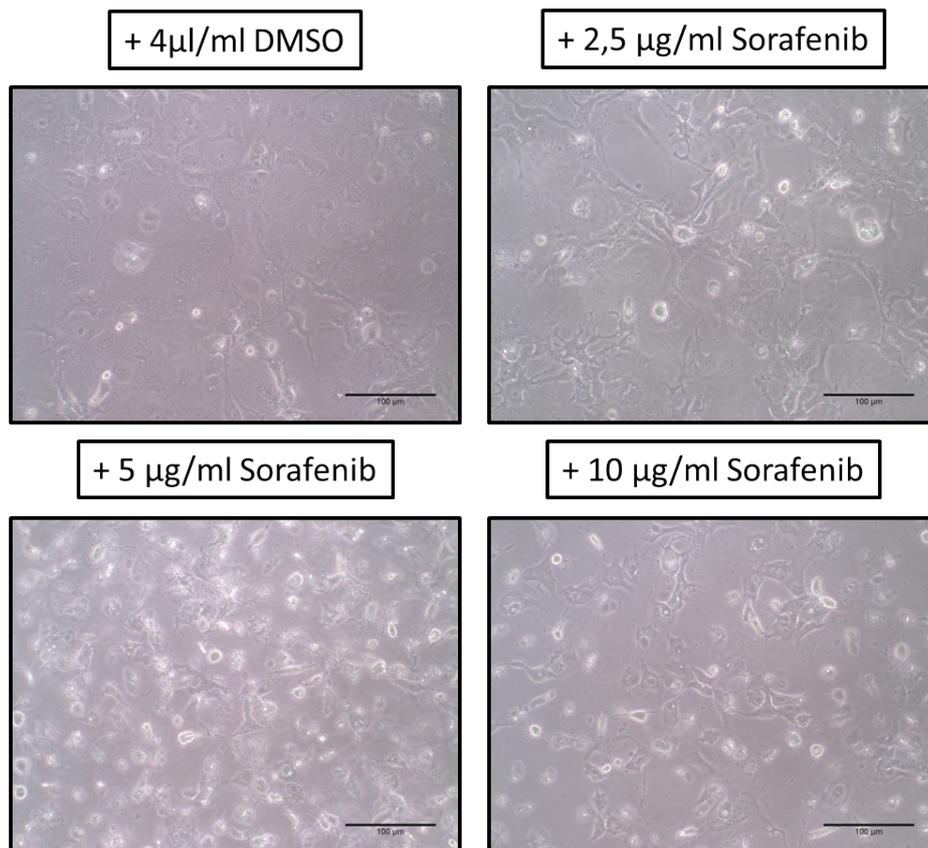


Abbildung 8:

Humane hepatische Sternzelllinie nach Behandlung mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen. Hier sind Zellen der HSZ-B-S1-Zelllinie gezeigt, die entweder mit DMSO, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml Sorafenib über 24 Stunden behandelt wurden. Darstellung in 20facher Vergrößerung. Alle Konzentrationsangaben pro ml Medium. Balken entspricht 100 µm.

4.2 Auswirkungen der Zirrhoseentwicklung auf die pHSC

Um die Effekte der Zirrhoseentwicklung auf die Expression der untersuchten Proteine zu ermitteln, wurden die Expressionsmuster der pHSC aus den einzelnen Zirrhosestadien mit denen aus normalen Lebern verglichen. Dazu wurden die ausschließlich mit DMSO behandelten Zellen verwendet.

Die Entwicklung einer Zirrhose veränderte die Expression der ERK 1 und 2 nicht. Die Proteinexpression in den pHSC aus beginnender und fortgeschrittener Zirrhose war annähernd identisch mit der in normalen Lebern (Abb. 9A). Ebenso konnte kein signifikanter Effekt der Zirrhoseentwicklung auf die Phosphorylierung der ERK 1 bzw. 2 nachgewiesen werden (Abb. 9B).

Die Proteinexpression von VEGF in pHSC wurde durch die Entwicklung einer Zirrhose nicht beeinflusst, so dass keine Expressionsunterschiede zwischen den pHSC aus der zirrhotischen Leber und der Kontrollgruppe festgestellt werden konnten (Abb. 10A).

Die Zirrhoseentwicklung hatte einen Anstieg der VEGF-R2-Proteinexpression sowohl nach 8 Wochen ($p \leq 0,05$) als auch nach 12 Wochen ($p \leq 0,05$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe zur Folge. Zwischen der beginnenden und fortgeschrittenen Zirrhose konnten keine Expressionsunterschiede festgestellt werden ($p \leq 0,51$) (Abb. 10B).

Durch die Entwicklung einer Zirrhose wurde die Expression der eNOS und deren Phosphorylierungsgrad in den pHSC, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, nicht signifikant verändert (Abb. 11A, B).

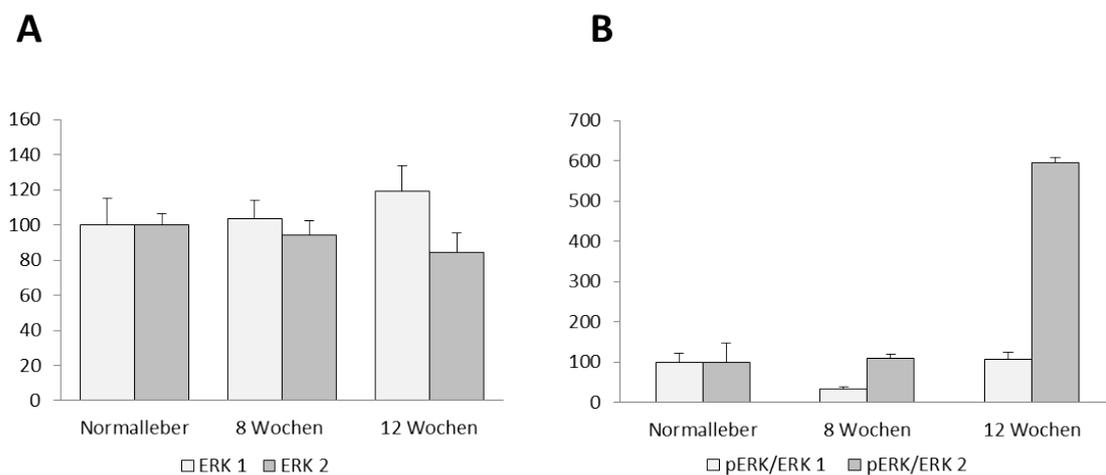


Abbildung 9:

Zirrhosebedingte Veränderungen der Proteinexpression bzw. Phosphorylierung der ERK 1/2 in pHSC der Ratte. A) Darstellung der relativen Proteinexpression von ERK 1 im Vergleich mit ERK 2 in pHSC nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. B) Relativer Grad der Phosphorylierung der ERK 1 und 2 in pHSC nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die Proteinexpression in der Normalleber entspricht 100 %.

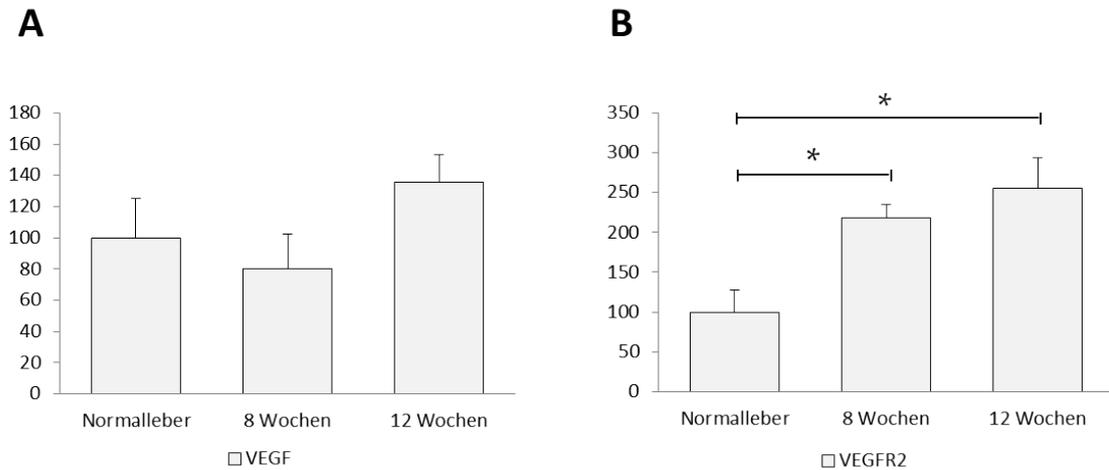


Abbildung 10:

Zirrhosebedingte Veränderungen der Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC. A) Darstellung der relativen Proteinexpression von VEGF in pHSC nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. B) Relative Proteinexpression von VEGF-R2 in pHSC nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die Proteinexpression in der Normalleber entspricht 100 %. $*$ = $p \leq 0,05$

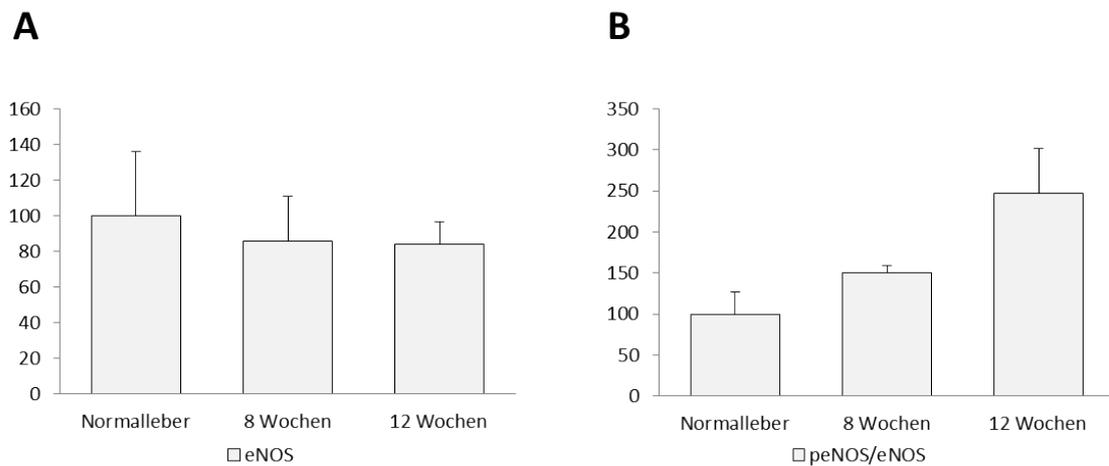


Abbildung 11:

Zirrhosebedingte Veränderungen der Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC. A) Darstellung der relativen Proteinexpression von eNOS in pHSC nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. B) Relative Phosphorylierungsstärke der eNOS in pHSC nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die Proteinexpression in der Normalleber entspricht 100 %.

4.3 Die Wirkung von Sorafenib auf pHSC aus der nicht-zirrhatischen Leber

In dieser Versuchsgruppe wurden pHSC, die aus jeweils 2 nicht mit CCl_4 behandelten Ratten isoliert wurden, mit 1,25 und 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sorafenib, sowie DMSO als Kontrolle, behandelt. Vor der Ernte der Zellen erfolgte eine Fotodokumentation (Abb. 12).

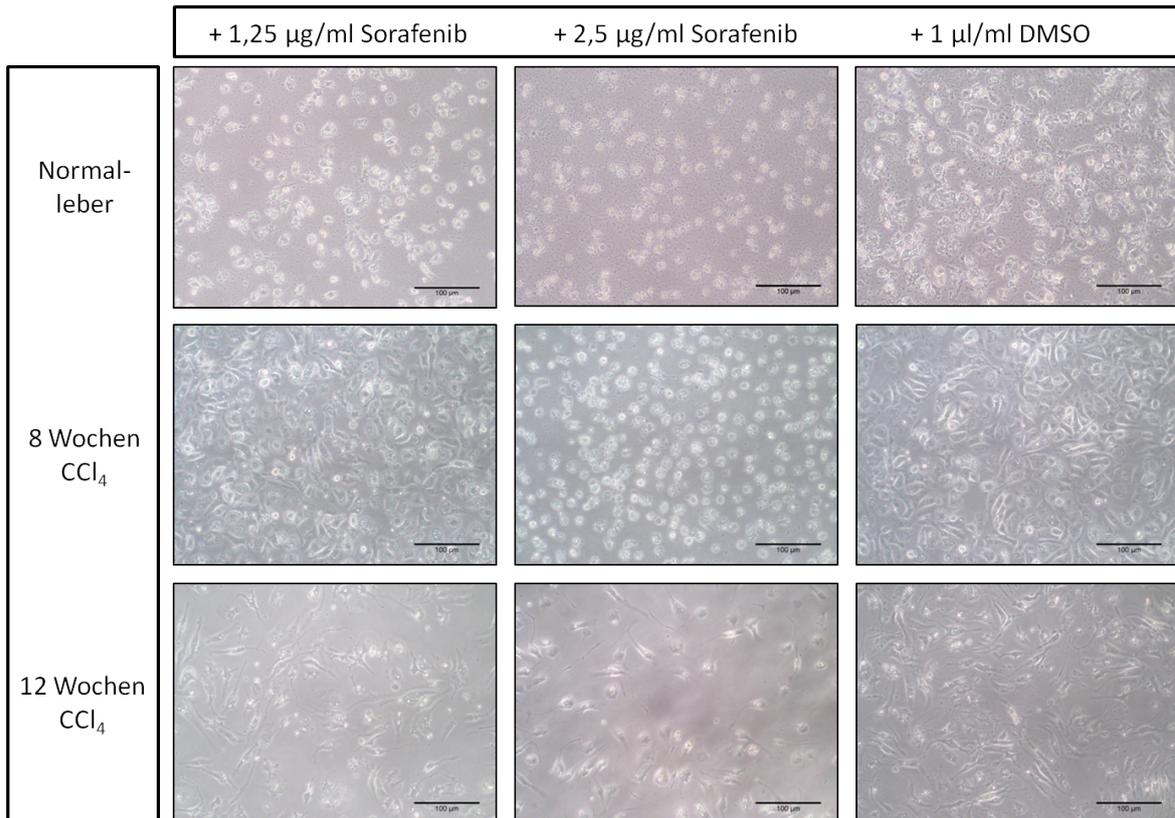


Abbildung 12:

Primäre Sternzellen aus verschiedenen Zirrhosestadien unter Sorafenibbehandlung. Hier sind pHSC der Wistar-Ratte aus Normallebern, sowie beginnend bzw. fortgeschritten zirrhatischen Lebern zu sehen, die entweder mit DMSO, 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sorafenib über 24 Stunden behandelt wurden. Darstellung in 20facher Vergrößerung. Alle Konzentrationsangaben pro ml Medium. Balken entspricht 100 μm .

4.3. DIE WIRKUNG VON SORAFENIB AUF PHSC AUS DER NICHT-ZIRRHOTISCHEN LEBER

Zunächst wurde die Proteinexpression beider ERK-Isoformen in den pHSC aus gesunden Lebern untersucht. Die Behandlung der pHSC aus normalen Lebern mit Sorafenib zeigte einen dosisabhängigen Effekt auf die relative Proteinexpression der ERK 2. Durch 2,5 µg/ml Sorafenib stieg die Expression verglichen mit der Kontrollgruppe an ($p \leq 0,05$). Durch 1,25 µg/ml Sorafenib veränderte sich die ERK 2-Expression verglichen mit der Kontrolle nicht. Sorafenib hatte keinen Effekt auf die Expression der ERK 1 (Abb. 13A). Außerdem wurde die Phosphorylierung der ERK 1/2 untersucht, die mit dem Grad der Aktivität korreliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Sorafenib unabhängig von der eingesetzten Konzentration die Phosphorylierung der ERK 1 bzw. 2 nicht signifikant beeinflusste (Abb. 13B).

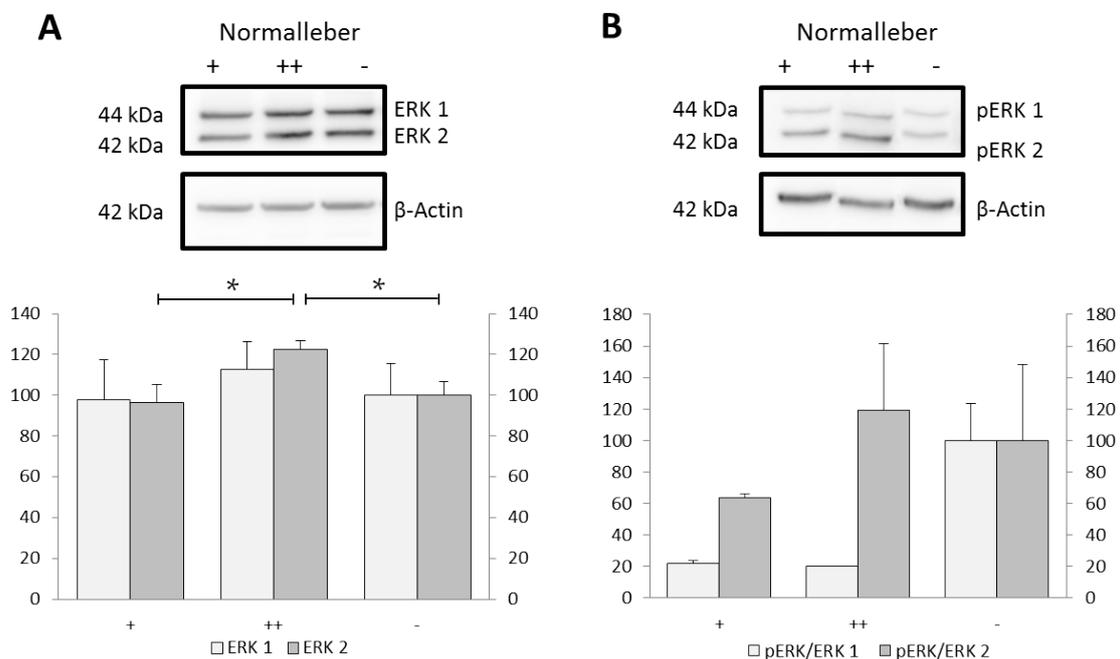


Abbildung 13:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von ERK 1 und 2 in pHSC aus Normallebern unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC aus Normallebern (Antikörper: Anti-ERK 1/2 und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Proteinexpression aus allen Versuchen mit Vergleich von ERK 1 und 2 als Diagramm. B) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC aus Normallebern (Antikörper: Anti-pERK 1/2 und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Phosphorylierungsstärke der ERK 1 und 2 in primären HSC als Diagramm (ergibt sich aus relativer Expression pERK geteilt durch relative Expression ERK). A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. - : Behandlung mit 1µl/ml DMSO, + : Behandlung mit 1,25 µg/ml Sorafenib, ++ : 2,5 µg/ml Sorafenib, * = $p \leq 0,05$

4.3. DIE WIRKUNG VON SORAFENIB AUF PHSC AUS DER NICHT-ZIRRHOTISCHEN LEBER

Die Untersuchung der relativen Proteinexpression des VEGF in den pHSC aus der normalen Leber ergab keine Unterschiede in der Expression zwischen den nur mit DMSO und den mit Sorafenib behandelten Zellen (Abb. 14A).

Des Weiteren wurde der Einfluss des Sorafenibs auf die relative Proteinexpression des VEGF-R2 untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Steigerung der Expression unter Sorafenib verglichen mit der Kontrolle. Dieser Effekt war bei einer Sorafenibdosis von 2,5 µg/ml signifikant ($p \leq 0,05$), jedoch nicht bei der geringeren Dosis (Abb. 14B).

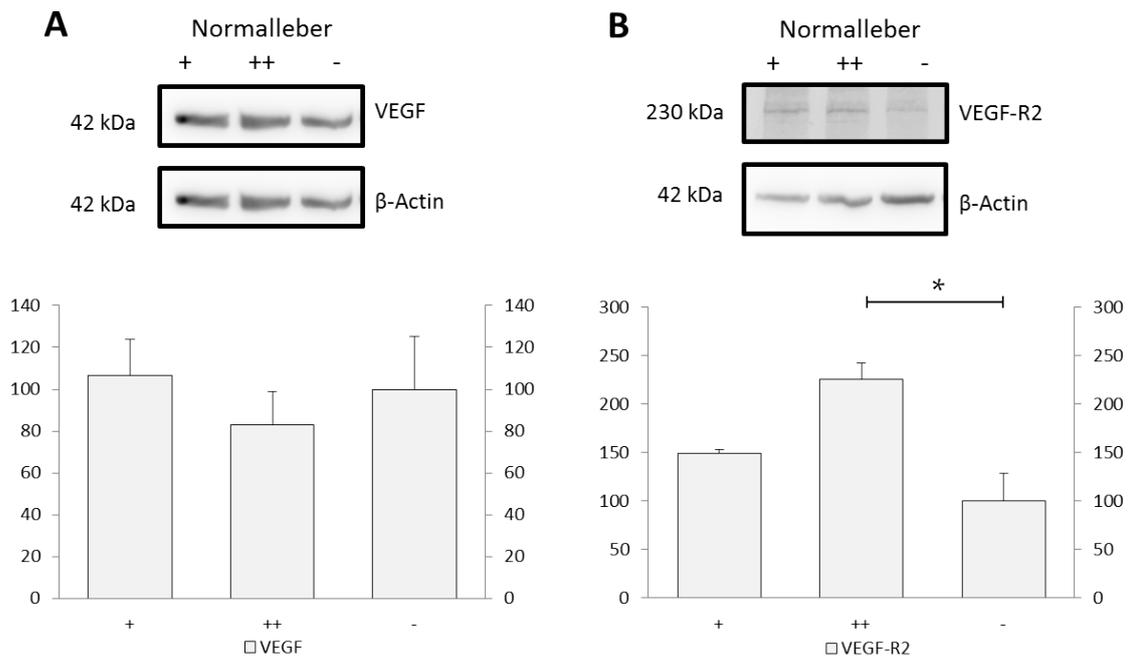


Abbildung 14:

Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC aus Normallebern unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC aus Normallebern (Antikörper: Anti-VEGF und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Proteinexpression aus allen Versuchen als Diagramm. B) Analoge Darstellung zu A, wobei hier Anti-VEGF-R2 und Anti-β-Actin-Antikörper verwendet wurden. A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. - : Behandlung mit 1 µl/ml DMSO, + : Behandlung mit 1,25 µg/ml Sorafenib, ++ : 2,5 µg/ml Sorafenib, *= $p \leq 0,05$

Durch Sorafenib wurde in den pHSC aus Normallebern die relative eNOS-Proteinexpression verglichen mit der Kontrolle nicht verändert, wobei es keinen Unterschied machte, ob 2,5 oder 1,25 µg/ml Sorafenib eingesetzt wurden (Abb. 15A). Der Grad der Phosphorylierung der eNOS wurde in dieser Versuchsgruppe durch Sorafenib ebenfalls nicht signifikant verändert (Abb. 15B).

4.3. DIE WIRKUNG VON SORAFENIB AUF PHSC AUS DER NICHT-ZIRRHOTISCHEN LEBER

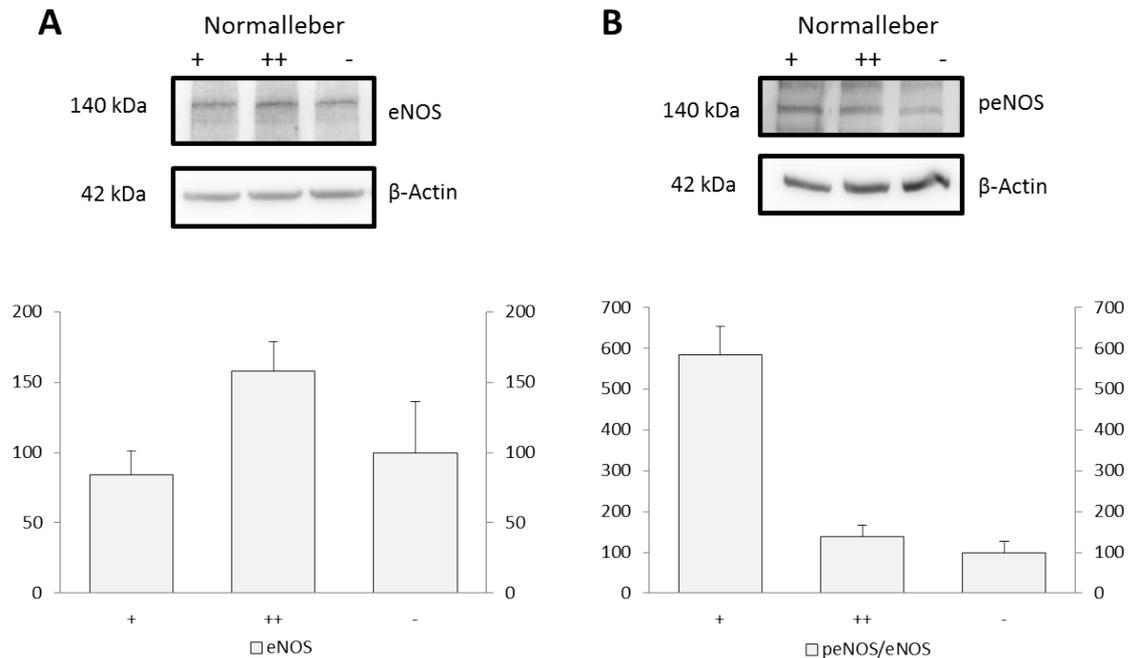


Abbildung 15:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC aus Normallebern unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 μ g Protein der pHSC aus Normallebern (Antikörper: Anti-eNOS und Anti- β -Actin). Darunter Darstellung der relativen Proteinexpression der eNOS aus allen Versuchen als Diagramm. B) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 μ g Protein der pHSC aus Normallebern (Antikörper: Anti-peNOS und Anti- β -Actin). Darunter Darstellung der relativen Phosphorylierungsstärke der eNOS in pHSC als Diagramm (ergibt sich aus relativer Expression peNOS geteilt durch relative Expression eNOS). A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. - : Behandlung mit 1 μ l/ml DMSO, + : Behandlung mit 1,25 μ g/ml Sorafenib, ++ : 2,5 μ g/ml Sorafenib

4.4 Die Wirkung von Sorafenib auf pHSC der beginnend zirrhotischen Leber

In dieser Versuchsgruppe wurden pHSC, die aus 8 Wochen mit CCl₄ behandelten Ratten isoliert wurden, mit 1,25 und 2,5 µg/ml Sorafenib, sowie mit DMSO als Kontrolle, behandelt. Die Behandlung der pHSC aus der frühen Zirrhose mit Sorafenib ergab bei einer Dosis von 1,25 µg/ml keine signifikante Veränderung der ERK 1 und 2-Expression, ebenso wie bei Anwendung der doppelten Dosis (Abb. 16A). Auch der Grad der Phosphorylierung der ERK 1/2 wurde in dieser Versuchsgruppe durch Sorafenib im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert (Abb. 16B).

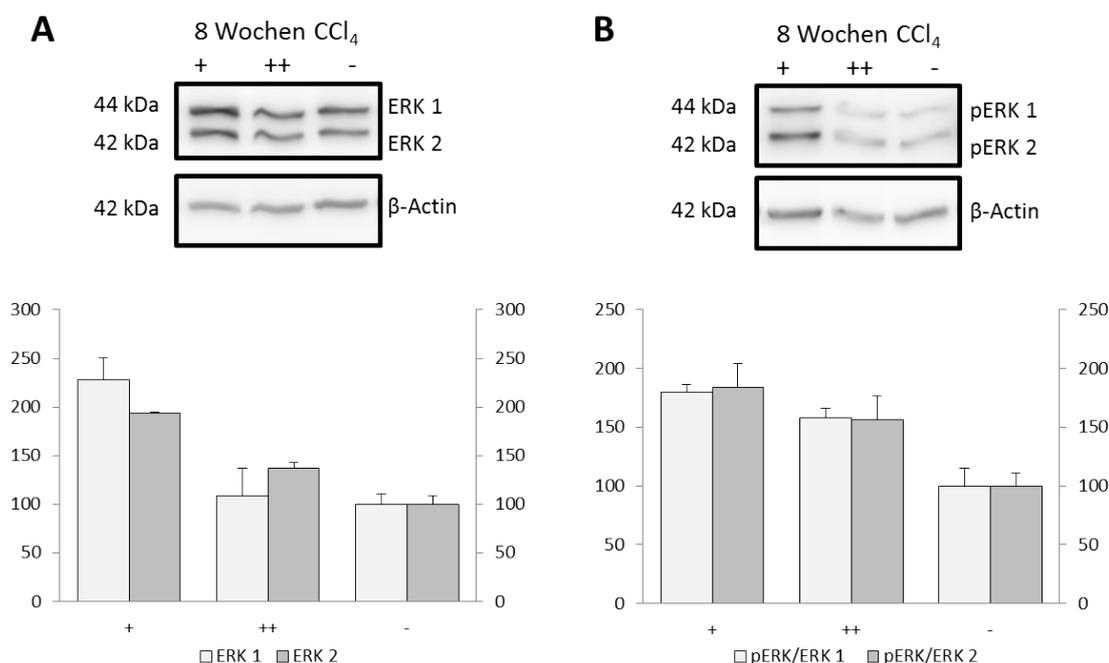


Abbildung 16:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von ERK 1 und 2 in pHSC aus beginnend zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (8 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-ERK 1/2 und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Proteinexpression aus allen Versuchen mit Vergleich von ERK 1 und 2 als Diagramm. B) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (8 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-pERK 1/2 und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Phosphorylierungsstärke der ERK 1 und 2 in pHSC als Diagramm (relative Expression pERK geteilt durch relative Expression ERK). A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. - : Behandlung mit 1 µl/ml DMSO, + : Behandlung mit 1,25 µg/ml Sorafenib, ++ : 2,5 µg/ml Sorafenib

4.4. DIE WIRKUNG VON SORAFENIB AUF PHSC DER BEGINNEND ZIRRHOTISCHEN LEBER

In den pHSC aus Lebern mit beginnender Zirrhose führte die Behandlung mit Sorafenib zu einer signifikanten Reduktion der VEGF-R2-Expression gegenüber der mit DMSO behandelten Kontrolle, wenn die höhere Sorafenibdosis verwendet wurde. Bei der VEGF-Expression zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (Abb. 17).

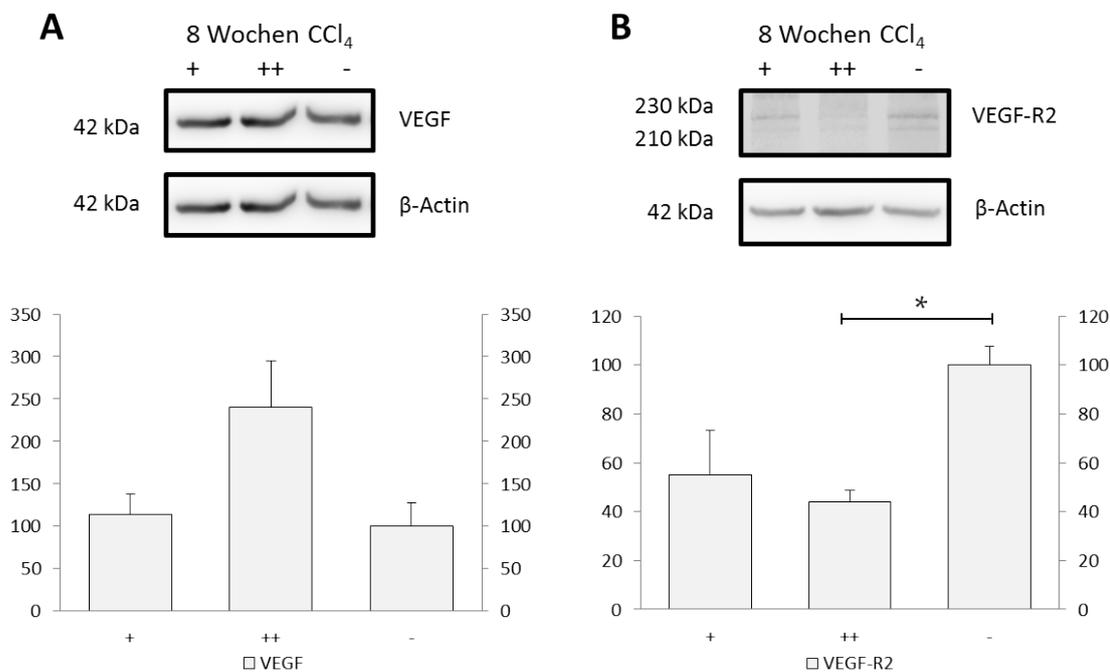


Abbildung 17:

Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC aus beginnend zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (8 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-VEGF und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Proteinexpression aus allen Versuchen als Diagramm. B) Analoge Darstellung zu A, wobei hier Anti-VEGF-R2 und Anti-β-Actin-Antikörper verwendet wurden. A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. - : Behandlung mit 1 µl/ml DMSO, + : Behandlung mit 1,25 µg/ml Sorafenib, ++ : 2,5 µg/ml Sorafenib, * = p ≤ 0,05

Insbesondere in den HSC aus der frühen Zirrhose führte die höhere Sorafenibdosis zu einer signifikanten Zunahme der eNOS-Expression, verglichen mit der Kontrollgruppe (p ≤ 0,05) (Abb. 18A). Die Phosphorylierung der eNOS wurde durch die Sorafenibbehandlung nicht signifikant verändert (Abb. 18B).

4.5. DIE WIRKUNG VON SORAFENIB AUF pHSC DER FORTGESCHRITTEN ZIRRHOTISCHEN LEBER

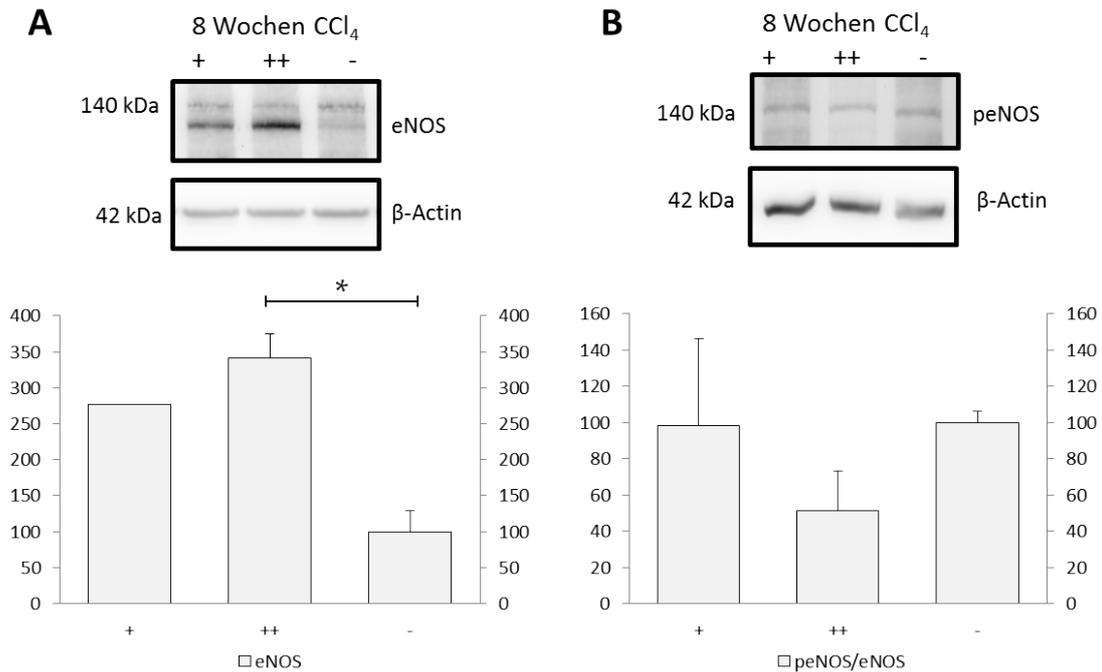


Abbildung 18:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC aus beginnend zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (8 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-eNOS und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Proteinexpression der eNOS aus allen Versuchen als Diagramm. B) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (8 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-peNOS und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Phosphorylierungsstärke der eNOS in pHSC als Diagramm (relative Expression peNOS geteilt durch relative Expression eNOS). A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. - : Behandlung mit 1 µl/ml DMSO, + : Behandlung mit 1,25 µg/ml Sorafenib, ++ : 2,5 µg/ml Sorafenib, *= p ≤ 0,05

4.5 Die Wirkung von Sorafenib auf pHSC der fortgeschritten zirrhotischen Leber

In dieser Versuchsgruppe wurden pHSC, die aus 12 bis 15 Wochen mit CCl₄ behandelten Ratten isoliert wurden, mit 1,25 und 2,5 µg/ml Sorafenib, sowie DMSO als Kontrolle, behandelt.

Es zeigte sich, dass Sorafenib die Expression beider ERK-Isoformen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, nicht veränderte (Abb. 19A). Die Phosphorylierung der ERK 2 wurde durch Sorafenib, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, signifikant gesteigert (Abb. 19B). Für die Steigerung der ERK 1-Phosphorylierung wurde keine Signifikanz festgestellt.

4.5. DIE WIRKUNG VON SORAFENIB AUF PHSC DER FORTGESCHRITTEN ZIRRHOTISCHEN LEBER

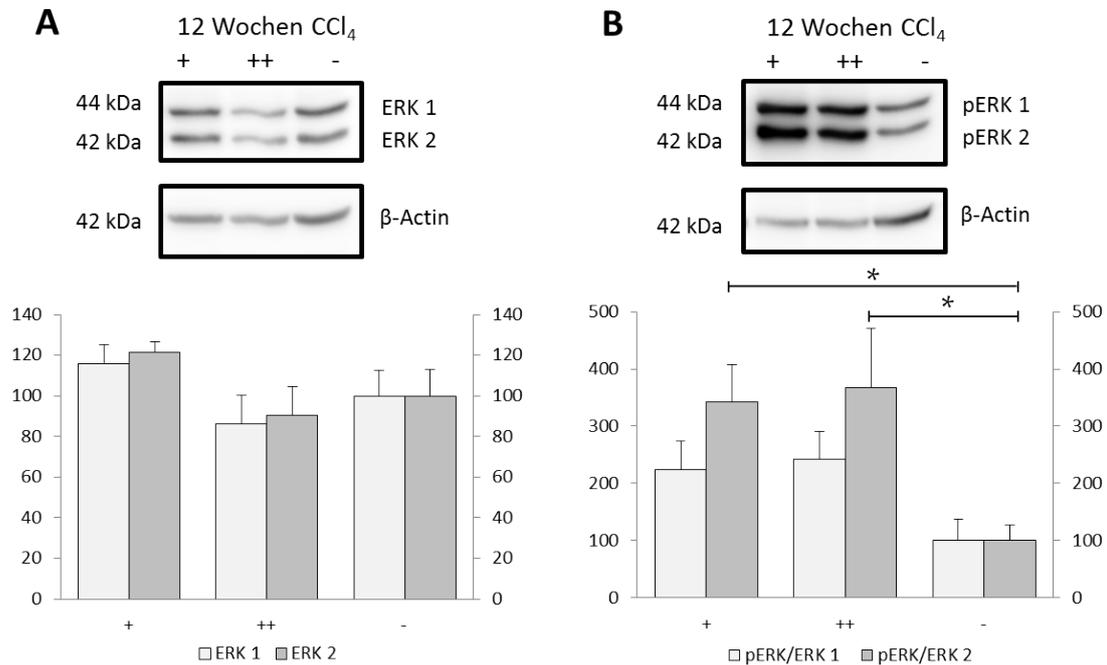


Abbildung 19:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von ERK 1 und 2 in pHSC aus fortgeschritten zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (12 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-ERK 1/2 und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Proteinexpression aus allen Versuchen mit Vergleich von ERK 1 und 2 als Diagramm. B) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (12 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-pERK und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Phosphorylierungsstärke der ERK 1 und 2 in pHSC als Diagramm (relative Expression pERK geteilt durch relative Expression ERK). A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. - : Behandlung mit 1 µl/ml DMSO, + : Behandlung mit 1,25 µg/ml Sorafenib, ++ : 2,5 µg/ml Sorafenib, *= p ≤ 0,05

In den pHSC aus der fortgeschrittenen Zirrhose reduzierte Sorafenib, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, die Proteinexpression von VEGF verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant (p ≤ 0,05 für beide Konzentrationen) (Abb. 20A). Außerdem steigerte die Behandlung mit der höheren Sorafenibdosierung die Expression des Rezeptors VEGF-R2 signifikant (p ≤ 0,05) (Abb. 20B).

4.5. DIE WIRKUNG VON SORAFENIB AUF PHSC DER FORTGESCHRITTEN ZIRRHOTISCHEN LEBER

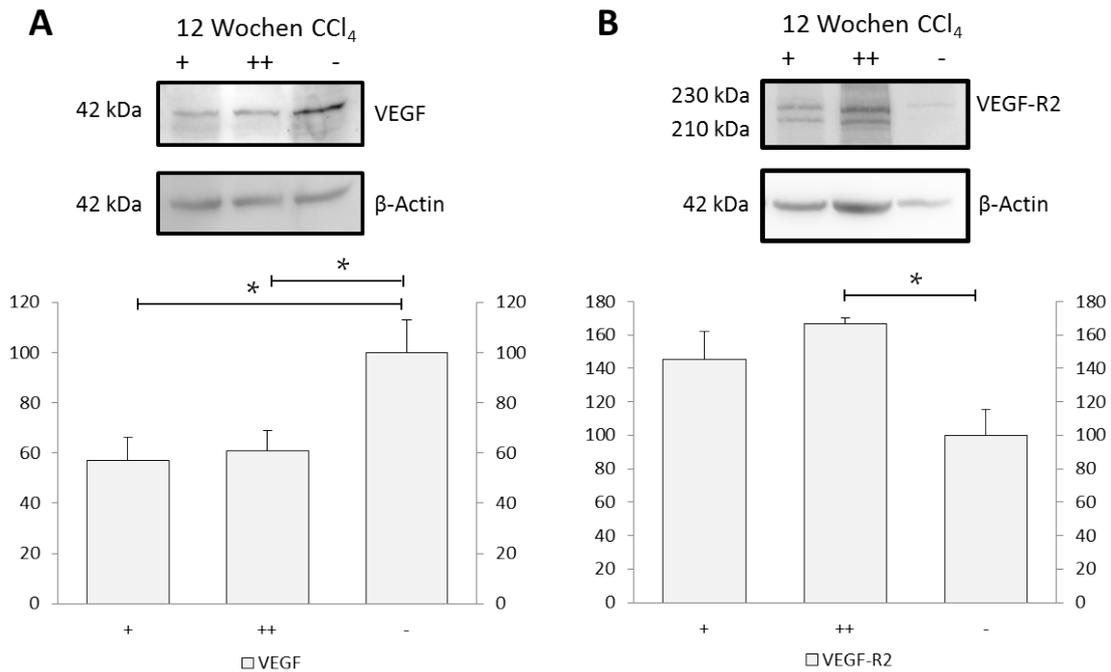


Abbildung 20:

Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC aus fortgeschritten zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (12 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-VEGF und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Proteinexpression aus allen Versuchen als Diagramm. B) Analoge Darstellung zu A, wobei hier Anti-VEGF-R2 und Anti-β-Actin-Antikörper verwendet wurden. A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. - : Behandlung mit 1 µl/ml DMSO, + : Behandlung mit 1,25 µg/ml Sorafenib, ++ : 2,5 µg/ml Sorafenib, * = $p \leq 0,05$

Die Behandlung mit Sorafenib hatte, unabhängig von der angewendeten Konzentration, keine Veränderung der eNOS-Expression und des Phosphorylierungsgrads gegenüber der Kontrollgruppe zur Folge (Abb. 21).

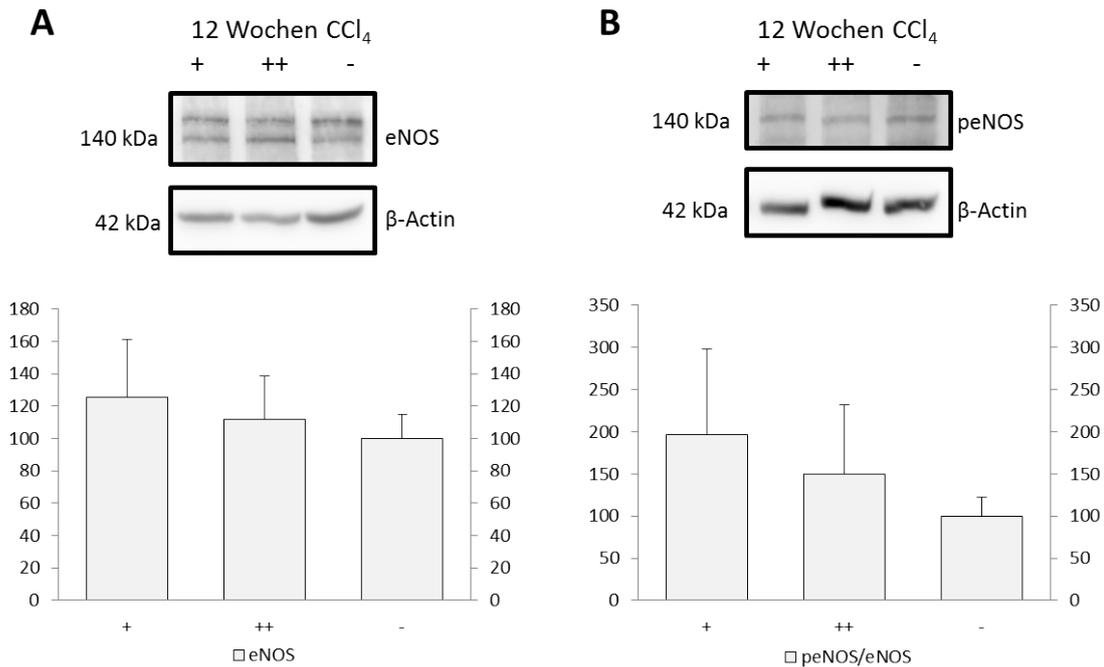


Abbildung 21:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC aus fortgeschrittenen zirrhotischen Lebern unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (12 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-eNOS und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Proteinexpression der eNOS aus allen Versuchen als Diagramm. B) Repräsentativer Western Blot mit jeweils 40 µg Protein der pHSC (12 Wochen Gruppe) (Antikörper: Anti-peNOS und Anti-β-Actin). Darunter Darstellung der relativen Phosphorylierungsstärke der eNOS in pHSC als Diagramm (relative Expression peNOS geteilt durch relative Expression eNOS). A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. - : Behandlung mit 1 µl/ml DMSO, + : Behandlung mit 1,25 µg/ml Sorafenib, ++ : 2,5 µg/ml Sorafenib

4.6 Zirrhosebedingte Unterschiede in der Sorafenibwirkung

Um zu untersuchen, wie sich die Auswirkungen der Sorafenibbehandlung in den HSC während der Zirrhoseentwicklung unterscheiden, wurde die Expression der untersuchten Proteine nach Behandlung mit Sorafenib zwischen den verschieden stark ausgeprägten Zirrhosen und der Normalleber verglichen. Dabei wurde nur die 2,5 µg/ml-Sorafenib-Gruppe betrachtet, da hier deutlichere Effekte gezeigt werden konnten.

Die Expression der ERK 2 in pHSC, die mit 2,5 µg/ml Sorafenib behandelt wurden, zeigte eine signifikante Reduktion nach 12 Wochen ($p \leq 0,05$), jedoch keine signifikante Veränderung nach 8 Wochen, verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Sorafenibwirkung auf die ERK 1-Expression wurde nicht durch den Grad der Zirrhose beeinflusst (Abb. 22A). Sowohl die Phosphorylierung der ERK 1, als auch der ERK 2, war unter Sorafenibbehandlung in der 12 Wochen-Gruppe signifikant höher als in der Normalleber bzw. der 8 Wochen-Gruppe (Abb.

22B).

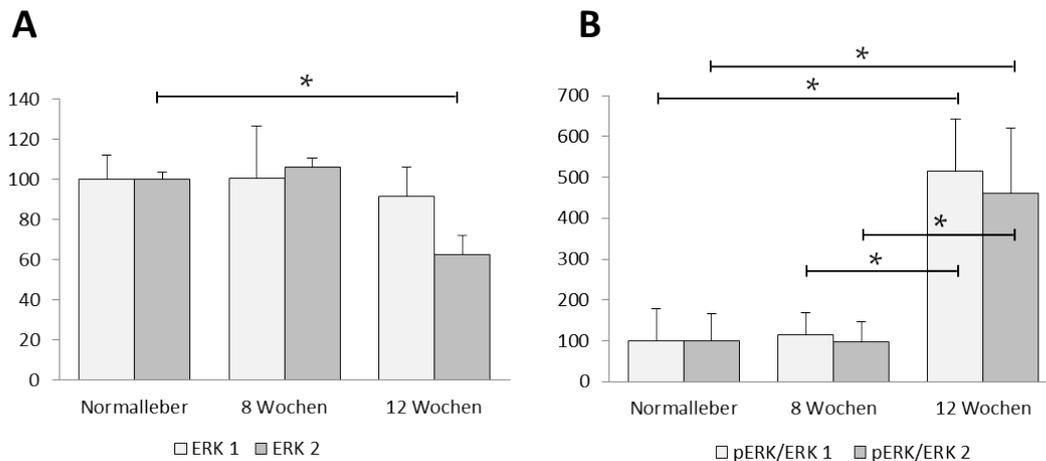


Abbildung 22:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierung der ERK 1 und 2 in pHSC unter Sorafenibbehandlung in verschiedenen Zirrhosestadien. A) Darstellung der relativen Proteinexpression von ERK 1 im Vergleich mit ERK 2 in pHSC nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. Alle Zellen wurden mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Sorafenib behandelt. B) Relativer Grad der Phosphorylierung der ERK 1 und 2 in pHSC (relative Proteinexpression der pERK geteilt durch die relative Expression der ERK) nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. Alle Zellen wurden mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Sorafenib behandelt. A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die Proteinexpression in der Normalleber entspricht 100 %. * = $p \leq 0,05$

Der Einfluss von Sorafenib auf die VEGF-Expression in den pHSC zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zirrhosestadien (Abb. 23A). Die Expression von VEGF-R2 war in pHSC aus der fortgeschrittenen Zirrhose signifikant ausgeprägter ($p \leq 0,05$) als in pHSC aus Normallebern, die ebenfalls mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Sorafenib behandelt wurden. (Abb. 23B). In den Zellen aus der beginnenden Leberzirrhose war die VEGF-R2-Expression in diesem Fall signifikant geringer als in den Zellen der Normalleber bzw. der fortgeschrittenen Zirrhose.

Die Wirkung von Sorafenib auf die Expression der eNOS ist vom Stadium der Zirrhose abhängig. Bei der Behandlung mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Sorafenib wurde eine signifikant stärkere Expression nach 8 Wochen ($p \leq 0,05$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe und der 12 Wochen-Gruppe festgestellt (Abb. 24 A). Zwischen der Normalleber und der 12 Wochen-Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede. Für den Grad der Phosphorylierung der eNOS zeigten sich keine zirrroseabhängigen Effekte im Bezug auf die Sorafenibbehandlung (Abb. 24 B).

4.7 Sorafenibwirkungen in der humanen Sternzelllinie HSZ-B-S1

In der Sternzelllinie wurden die Effekte des hochdosierten Sorafenibs auf die Expression von ERK 1 und 2, VEGF, VEGF-R2 sowie auf die Phosphorylierung der ERK 1 und 2 untersucht.

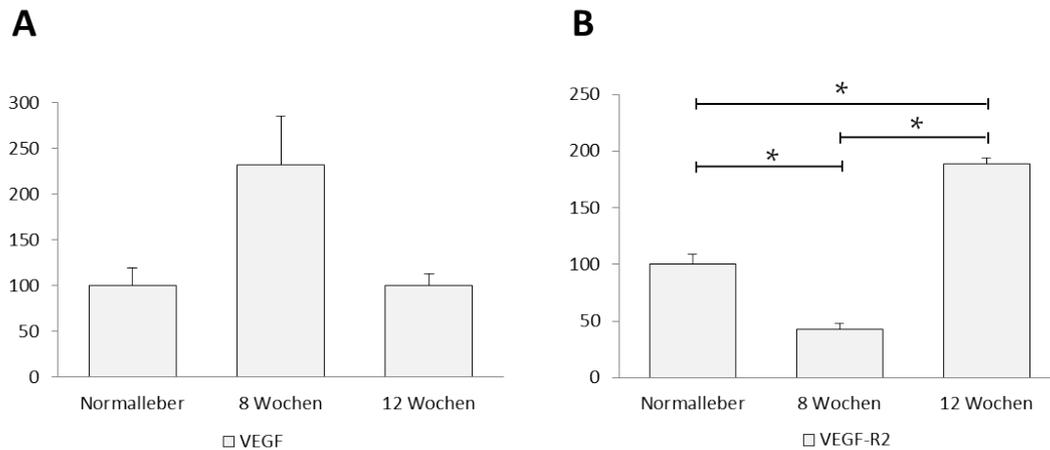


Abbildung 23:

Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in pHSC unter Sorafenibbehandlung in verschiedenen Zirrhosestadien. A) Darstellung der relativen Proteinexpression von VEGF in pHSC nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. Alle Zellen wurden mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Sorafenib behandelt. B) Relative Proteinexpression von VEGF-R2 in pHSC nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. Alle Zellen wurden mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Sorafenib behandelt. A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die Proteinexpression in der Normalleber entspricht 100 %. $*$ = $p \leq 0,05$

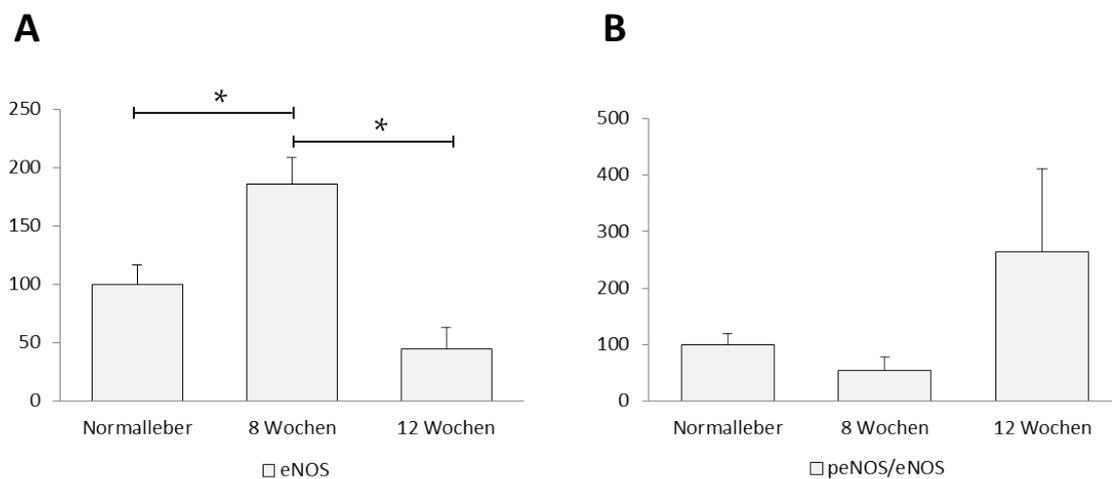


Abbildung 24:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierung von eNOS in pHSC unter Sorafenibbehandlung in verschiedenen Zirrhosestadien. A) Darstellung der relativen Proteinexpression von eNOS nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. Alle Zellen wurden mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Sorafenib behandelt. B) Relative Phosphorylierungsstärke der eNOS in pHSC (ergibt sich aus der relativen Proteinexpression der peNOS geteilt durch die relative Expression der eNOS) nach entsprechender CCl_4 -Behandlung. Alle Zellen wurden mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Sorafenib behandelt. A)+B) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die Proteinexpression in der Normalleber entspricht 100 %. $*$ = $p \leq 0,05$

4.7. SORAFENIBWIRKUNGEN IN DER HUMANEN STERNZELLINIE HSZ-B-S1

Die Zellen wurden mit 2,5, 5 und 10 µg/ml Sorafenib oder mit 4 µl/ml DMSO behandelt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei der 2,5 µg/ml-Gruppe eine signifikante Zunahme der Expression beider ERK-Isoformen ($p \leq 0,05$), welche mit zunehmender Dosissteigerung nicht mehr nachweisbar war. Die Behandlung mit 10 µg/ml Sorafenib hatte eine signifikante Reduktion der ERK 1-Expression gegenüber der 2,5 µg/ml-Gruppe zur Folge ($p \leq 0,05$) (Abb. 25A+B). Die Behandlung mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen zeigte keine signifikanten Veränderungen in der Phosphorylierung der ERK 1 und 2 (Abb. 25B).

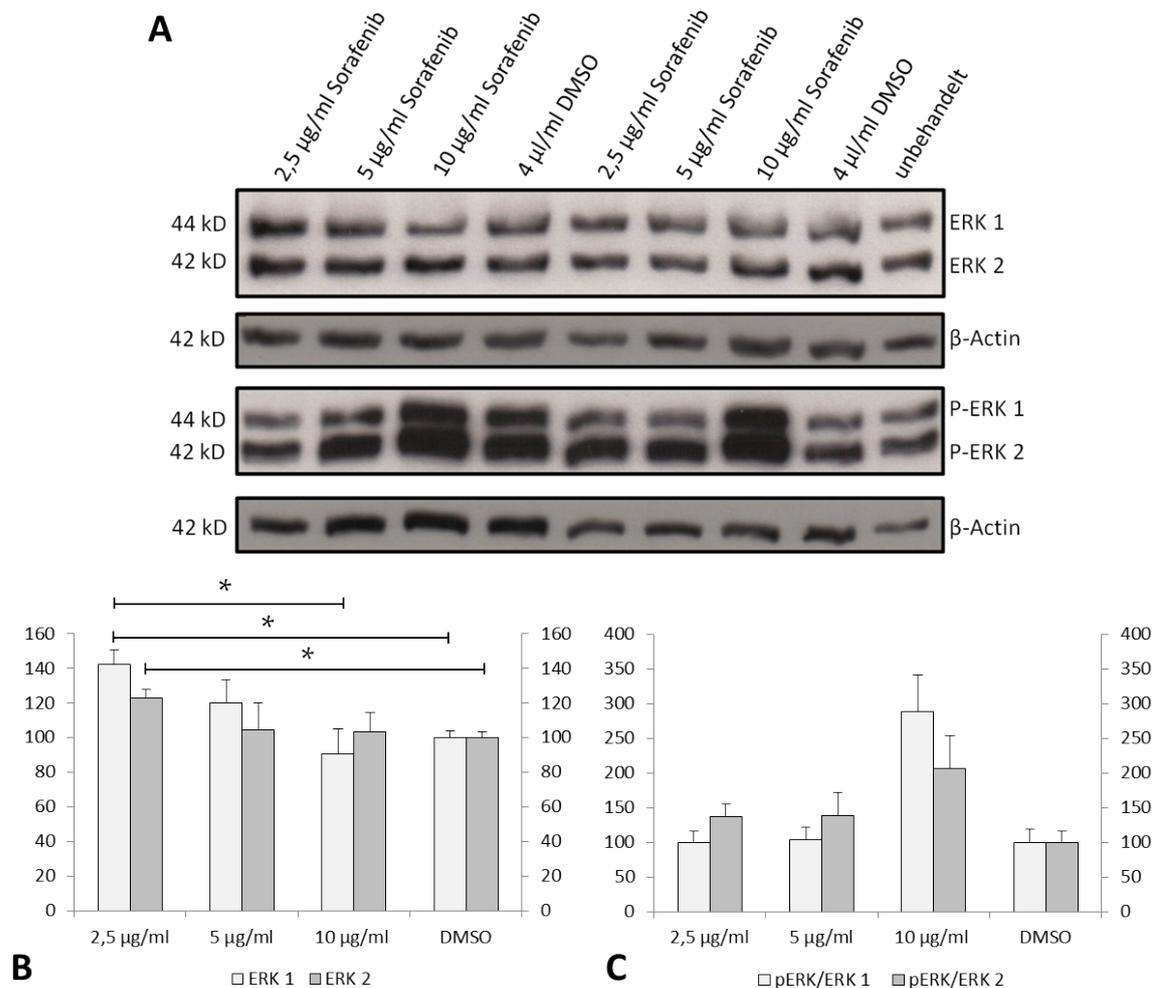


Abbildung 25:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierungsstatus von ERK 1 und 2 in HSZ-B-S1 unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot aus jeweils 30 µg Protein der Zelllinie nach Behandlung mit 2,5, 5, 10 µg/ml Sorafenib bzw. DMSO über 24 h (Antikörper: Anti-ERK1/2, -pERK1/2 und -β-Actin). B) Darstellung der relativen Proteinexpression von ERK 1 und 2 nach oben genannter Behandlung im Vergleich als Diagramm. C) Darstellung der relativen Phosphorylierungsstärke der ERK 1 und 2 im Vergleich als Diagramm (relative Expression von pERK geteilt durch die relative Expression von ERK). B)+C) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. * = $p \leq 0,05$

4.8. SORAFENIBWIRKUNGEN IN DER MURINEN SINUSOIDALEN ENDOTHELZELLINIE TSEC

Die Behandlung der HSZ-B-S1 mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen zeigte keine Veränderungen der VEGF- bzw. der VEGF-R2-Expression (Abb. 26).

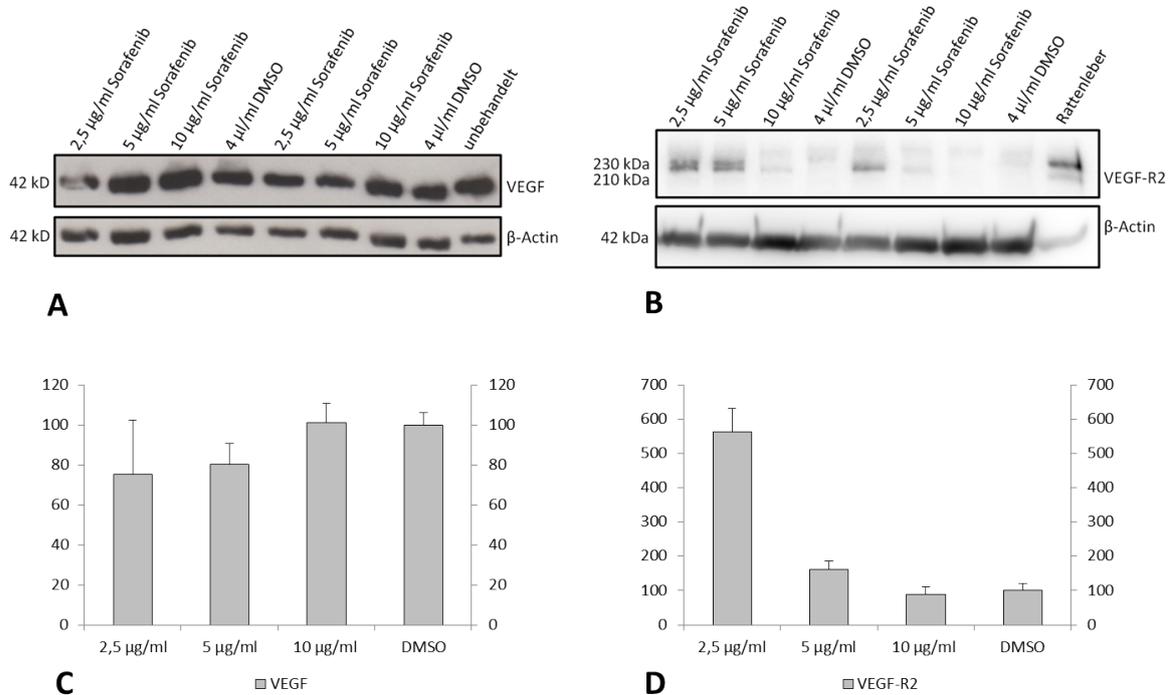


Abbildung 26:

Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in HSZ-B-S1 unter Sorafenibbehandlung. A)+B) Repräsentativer Western Blot aus jeweils 30 µg Protein der Zelllinie nach Behandlung mit 2,5, 5, 10 µg/ml Sorafenib bzw. DMSO über 24 h (Antikörper: Anti-VEGF, -VEGF-R2 und - β -Actin). C)+D) Darstellung der relativen Proteinexpression von VEGF bzw. VEGF-R2 nach oben genannter Behandlung als Diagramm, Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %

4.8 Sorafenibwirkungen in der murinen sinusoidalen Endothelzelllinie TSEC

Die Behandlung der TSEC erfolgte nach den gleichen Modalitäten wie bei der Sternzelllinie. Neben den bereits in der Sternzelllinie untersuchten Proteinen wurde in den TSEC auch die Expression und Phosphorylierung der eNOS untersucht. Außerdem erfolgte eine Vitalitätsprüfung mittels MTS-Test.

Unter der Behandlung mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen zeigte sich in den TSEC eine Abnahme der Vitalität, die mit der verwendeten Sorafenibdosis korrelierte. Nach der Behandlung mit 2,5 µg/ml waren noch 93 % der Zellen vital, was in etwa der Vitalität unter alleiniger DMSO-Behandlung entsprach. Wurden 5 µg/ml Sorafenib eingesetzt waren noch

4.8. SORAFENIBWIRKUNGEN IN DER MURINEN SINUSOIDALEN ENDOTHELZELLINIE TSEC

57 % der Zellen vital und bei der maximalen Sorafenibdosis nur noch 18 % aller Zellen. Nach der Behandlung wurden die Zellen fotodokumentiert (Abb. 27).

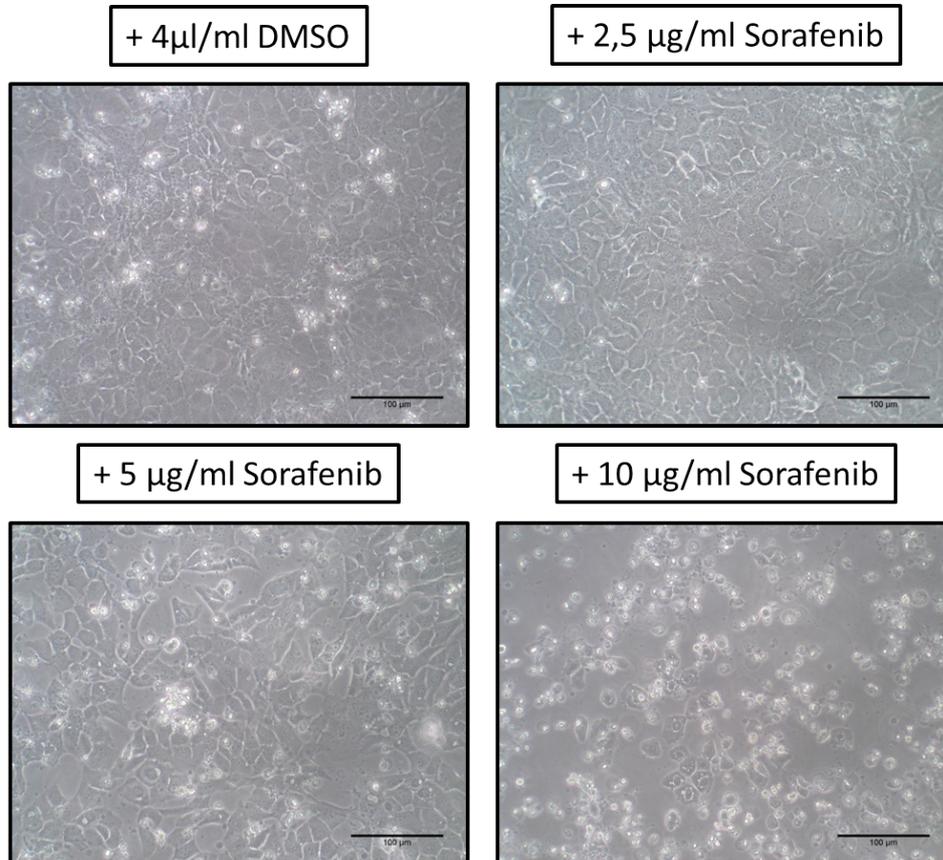


Abbildung 27:

Murine sinusoidale Endothelzelllinie TSEC nach Behandlung mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen. Die TSEC wurden entweder mit DMSO, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml Sorafenib über 24 Stunden behandelt. Darstellung in 20facher Vergrößerung. Alle Konzentrationsangaben pro ml Medium. Balken entspricht 100 µm.

Die Behandlung mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen zeigte in den TSEC eine nicht signifikante Reduktion der Expression der ERK 1 und 2 im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb. 28B). Die Phosphorylierung der ERK 1 wurde durch 10 µg/ml Sorafenib, gegenüber der Kontrolle, signifikant gesteigert. Die Phosphorylierung der ERK 2 war in diesem Fall nicht signifikant verschieden zur Kontrollgruppe (Abb. 28C).

Durch die Behandlung mit Sorafenib in ansteigenden Konzentrationen zeigte sich keine Veränderung in der Expression von VEGF verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 29C). Die VEGF-R2-Expression wurde durch die geringe Sorafenibkonzentration zunächst nicht verändert, jedoch kam es bei 10 µg/ml Sorafenib zu einer signifikanten Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe und den Zellen, die mit 2,5 µg/ml Sorafenib behandelt wurden ($p \leq 0,05$).

4.8. SORAFENIBWIRKUNGEN IN DER MURINEN SINUSOIDALEN ENDOTHELZELLINIE TSEC

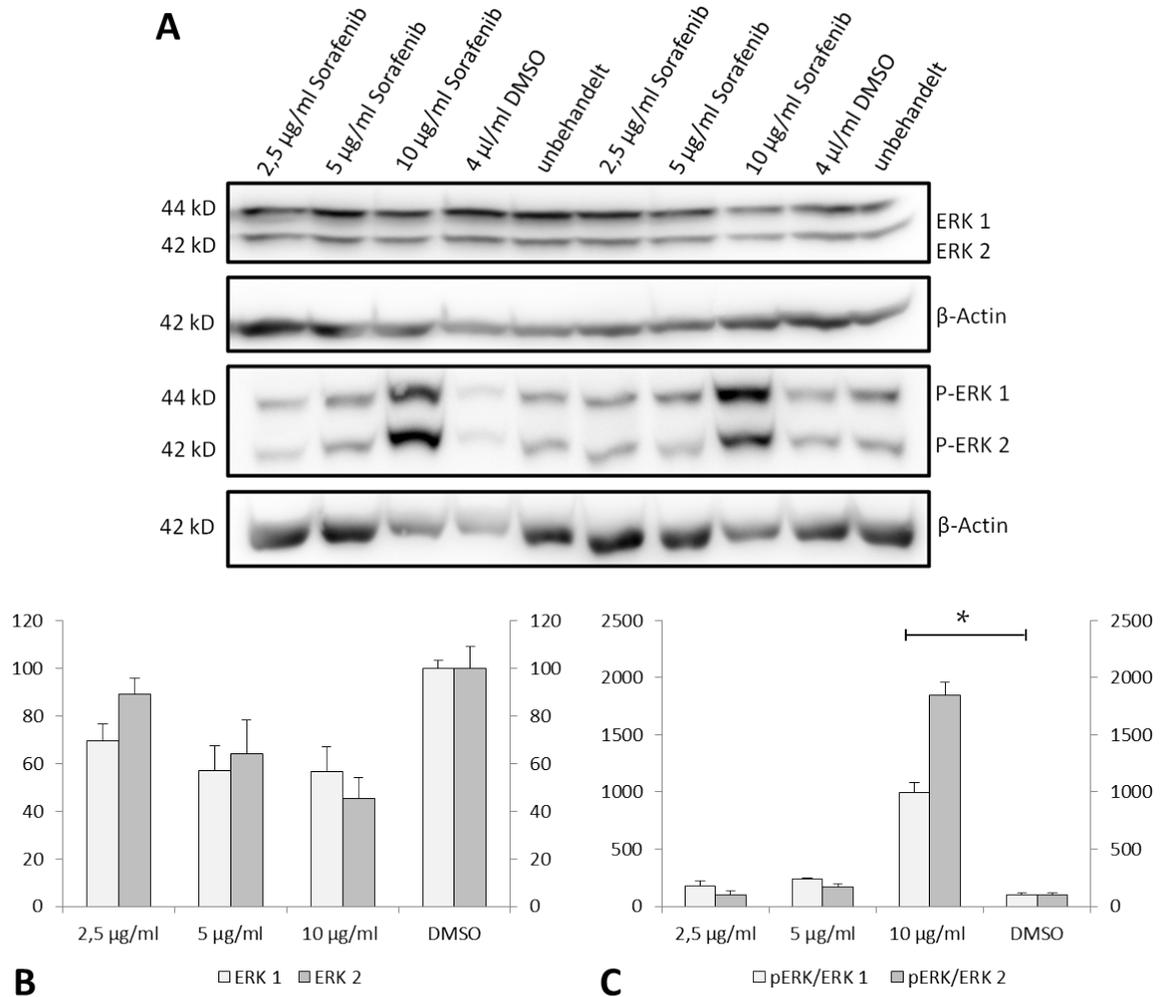


Abbildung 28:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierungsstatus von ERK 1 und 2 in TSEC unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot aus jeweils 30 µg Protein der TSEC nach Behandlung mit 2,5, 5, 10 µg/ml Sorafenib bzw. DMSO über 24 h (Antikörper: Anti-ERK1/2, -pERK1/2 und -β-Actin). B) Darstellung der relativen Proteinexpression von ERK 1 und 2 nach oben genannter Behandlung im Vergleich als Diagramm. C) Darstellung der relativen Phosphorylierungsstärke der ERK 1 und 2 im Vergleich als Diagramm (relative Expression von pERK geteilt durch die relative Expression von ERK). B)+C) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. * = $p \leq 0,05$

(Abb. 29D).

Die eNOS-Expression zeigte unter der Behandlung mit Sorafenib keine signifikante Veränderung im Vergleich mit den Kontrollzellen, unabhängig von der eingesetzten Konzentration (Abb. 30 B). Ebenso zeigte die Phosphorylierung der eNOS keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abb. 30B).

4.8. SORAFENIBWIRKUNGEN IN DER MURINEN SINUSOIDALEN ENDOTHELZELLINIE TSEC

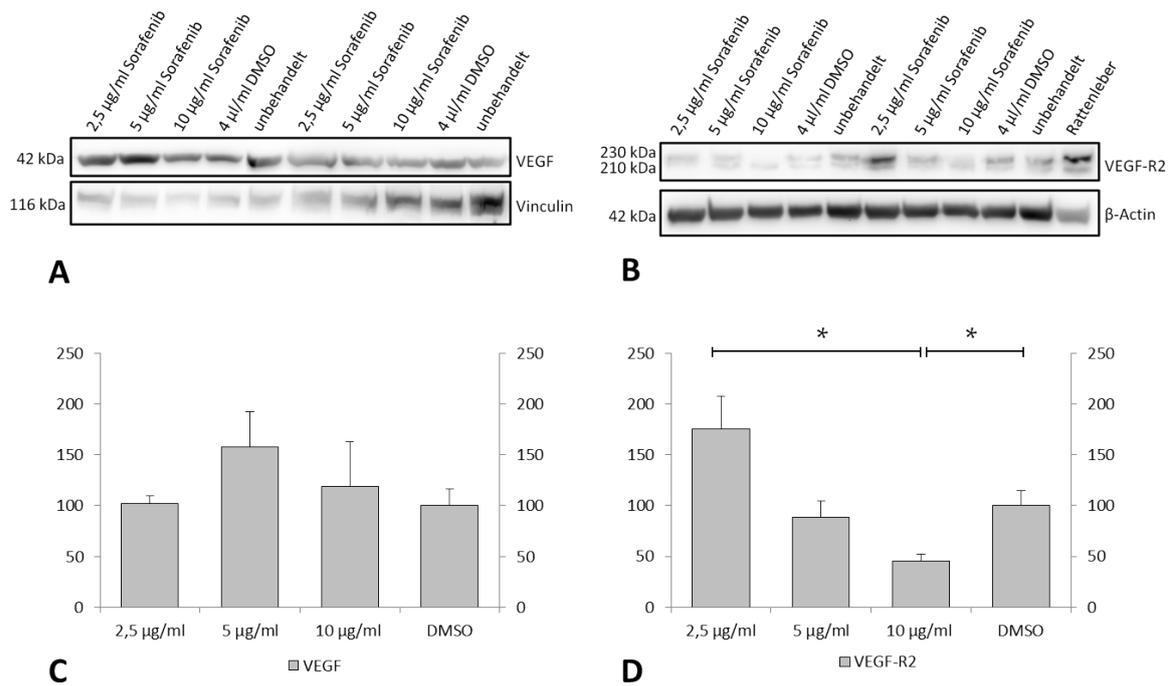


Abbildung 29:

Proteinexpression von VEGF und VEGF-R2 in TSEC unter Sorafenibbehandlung. A)+B) Repräsentativer Western Blot aus jeweils 30 µg Protein der TSEC nach Behandlung mit 2,5, 5, 10 µg/ml Sorafenib bzw. DMSO über 24 h (Antikörper: Anti-VEGF, -VEGF-R2, -Vinculin und -β-Actin). C)+D) Darstellung der relativen Proteinexpression von VEGF bzw. VEGF-R2 nach o.g. Behandlung als Diagramme, Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %. * = $p \leq 0,05$

4.8. SORAFENIBWIRKUNGEN IN DER MURINEN SINUSOIDALEN ENDOTHELZELLINIE TSEC

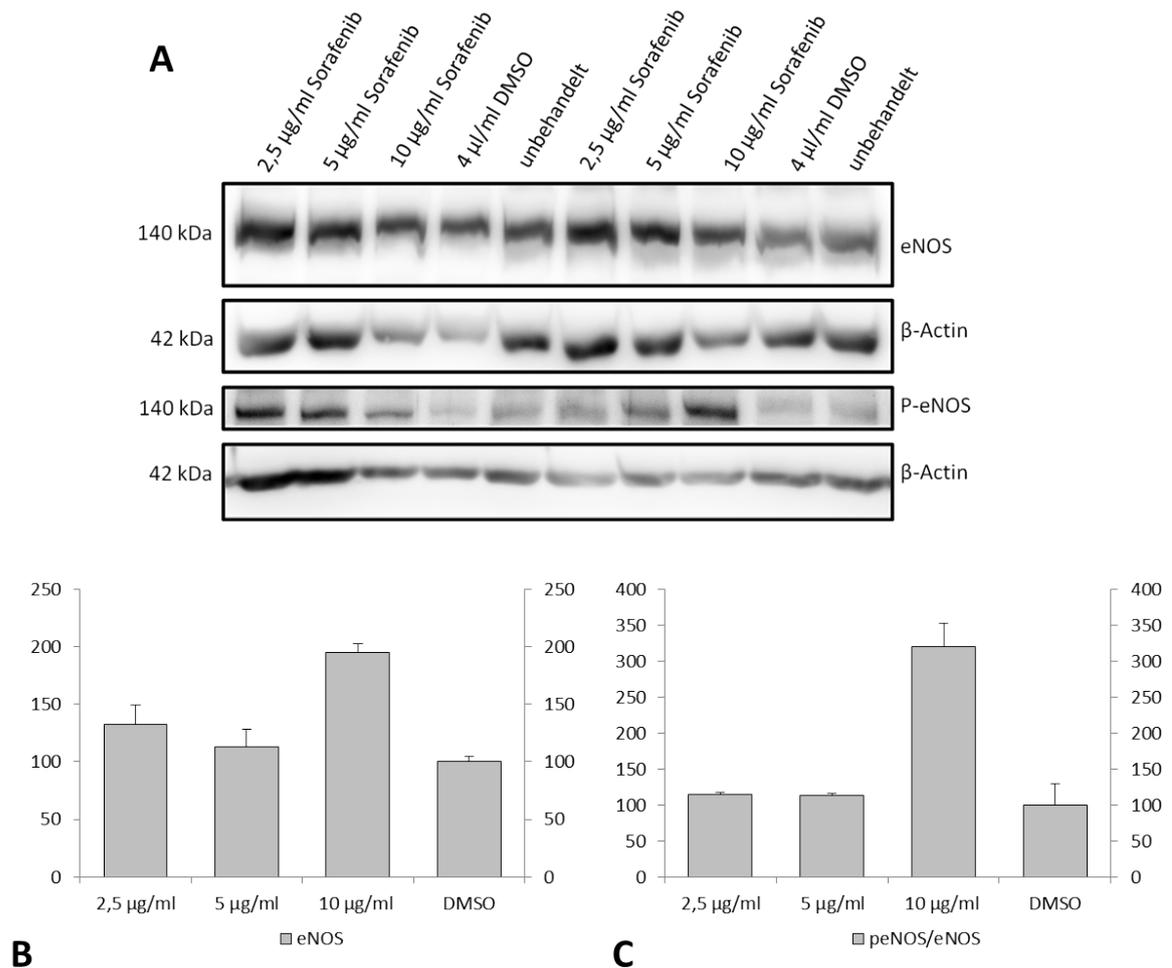


Abbildung 30:

Proteinexpression bzw. Phosphorylierungsstatus von eNOS in TSEC unter Sorafenibbehandlung. A) Repräsentativer Western Blot aus jeweils 30 µg Protein der TSEC nach Behandlung mit 2,5, 5, 10 µg/ml Sorafenib bzw. DMSO über 24 h (Antikörper: Anti-eNOS, -peNOS und - β -Actin. B) Darstellung der relativen Proteinexpression von eNOS in TSEC nach o.g. Behandlung als Diagramm. C) Darstellung der relativen Phosphorylierungsstärke der eNOS in TSEC nach o.g. Behandlung als Diagramm (relative Expression von peNOS geteilt durch die relative Expression von eNOS). B)+C) In den Diagrammen Angaben in Prozent mit Standardfehler. Die mit DMSO behandelten Zellen entsprechen 100 %.

5 Diskussion

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass in der Leberzirrhose mit portaler Hypertension der Gefäßwiderstand der Leberarterien abnimmt [86]. Diese Abnahme des Gefäßwiderstandes konnte in zwei unterschiedlichen Tiermodellen gezeigt werden [86]. Ursache dieser Gefäßdilataion der Leberarterie war einerseits eine vermehrte Expression von NO und andererseits die Abnahme der glatten Gefäßmuskulatur (Remodelling) [86]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Gefäßdilataion der Leberarterie bereits in einem frühen Stadium der Leberzirrhose auch ohne Vorhandensein einer portalen Hypertension vorliegt [97]. Die Gefäßdilataion der Leberarterien scheint also unabhängig vom portalvenösen Widerstand zu sein. Aufgrund der Hypoxie, die während der Fibrosierung auftritt, scheint es zur vermehrten eNOS und peNOS-Expression zu kommen und somit zur gesteigerten Ausschüttung von NO im Bereich der hepatischen Arterien [97]. Durch die medikamentöse Hemmung der NO-Ausschüttung konnte das Ansprechen der Leberarterien auf Vasokonstriktoren wieder deutlich erhöht werden. Im nächsten Schritt wurden die zirrhotischen Ratten mit Sorafenib behandelt. Wurde Sorafenib in den ersten 8 Wochen der Zirrhoseentstehung (also ohne Vorliegen der portalen Hypertension) verabreicht, konnte die Dilataion der Leberarterien verringert werden. Ähnliche Effekte löste Sorafenib aus, wenn es von der 8. bis zur 12. Woche verabreicht wurde. Interessanterweise hatte die Sorafenibbehandlung über den gesamten Zeitraum von 12 Wochen, also bis zur Ausprägung des portalen Hochdrucks, keinen Effekt auf die Vasodilataion der Leberarterien. Auf molekularer Ebene ergaben die Untersuchungen eine Zunahme von ERK 1/2, pERK 1/2 und eNOS in den Leberarterien der frühen Zirrhose. Unter Sorafenibbehandlung blieb die Proteinexpression in den hepatischen Arterien unverändert. In der fortgeschrittenen Zirrhose zeigten sich ähnliche Veränderungen der Proteinexpression. In der Gesamtleber konnte die VEGF-R2-Expression in der frühen Zirrhose durch Sorafenibtherapie deutlich reduziert werden. Die kurzfristige Behandlung (8.-12. Woche) mit Sorafenib führte, bei bereits bestehender Zirrhose, zu einer Normalisierung des Gefäßwiderstands der Leberarterie und zusätzlich zu einem positiven Einfluss auf den Widerstand der Portalvene und des sinusoidalen Gefäßbetts [87].

In der vorliegenden Arbeit wurden nun zur weiteren Differenzierung der Effekte pHSC aus zirrhotischen Lebern entnommen und in Zellkulturexperimenten mit Sorafenib behandelt. So wurden Erkenntnisse über die molekularen Veränderungen in zirrhotischen pHSC, sowie über die Effekte der Sorafenibtherapie in isolierten pHSC gesammelt.

5.1 Auswirkungen der Zirrhoseentwicklung auf die HSC

5.1.1 VEGF-Stoffwechselweg

Im Rahmen der Zirrhoseentwicklung kommt es zu einer Aktivierung der HSC [98, 99]. Bei der Aktivierung der Sternzellen sind verschiedene Pathways involviert. Dazu zählen der PDGF- und der durch TGF- β aktivierte-Pathway [100, 101]. Unter anderem nimmt auch die Aktivität

des VEGF-Pathways zu [47]. Dabei bindet VEGF an den VEGF-Rezeptor, von dem es verschiedene Subtypen gibt. Die Expression von VEGF nimmt im Rahmen der HSC-Aktivierung zu [102]. Die treibende Kraft bei der verstärkten VEGF-Expression stellt die Hypoxie dar [103]. Ankoma-Sey et al. [46] wiesen in pHSC, aus einmalig mit CCl_4 behandelten Ratten, eine Steigerung der VEGF mRNA nach. Auch die Expression der VEGF-Rezeptoren nimmt im Rahmen der Zirrhoseentwicklung zu. In der Literatur konnte eine Vermehrung der VEGF-R2-Expression in zirrhatischen Lebern von Ratten und Mäusen [17, 101, 104] nachgewiesen werden. Unter hypoxischen Bedingungen bilden sowohl pHSC in Kultur als auch die Sternzelllinie HSC-T6 vermehrt VEGF-R1, jedoch nicht VEGF-R2 [15, 46]. Im Gegensatz dazu konnte in menschlichen HSC unter hypoxischen Bedingungen eine Steigerung der VEGF-R2-Expression festgestellt werden [47].

In der vorliegenden Untersuchung an zirrhatischen pHSC, sowohl aus frühen, als auch aus fortgeschrittenen Zirrhosestadien, konnte eine Steigerung der VEGF-R2-Expression nachgewiesen werden. Die vermehrte Expression kann durch die zunehmende Hypoxie innerhalb der zirrhatischen Leber ausgelöst werden. Diese führt zur vermehrten Freisetzung von VEGF und somit auch zu einer gesteigerten Expression von VEGF-R2 [47]. In der Studie von Ankoma-Sey et al., in der eine Expressionssteigerung von VEGF-R1 ohne Steigerung von VEGF-R2 festgestellt wurde, wurde ausschließlich die mRNA bestimmt [46]. Eine reine Messung der mRNA-Menge korreliert jedoch nicht zwangsläufig mit der vorliegenden Proteinkonzentration, da im Rahmen der Translation Proteine zum Teil wieder abgebaut werden oder es gar nicht zur Translation kommt. Die vorliegende Studie konzentriert sich ausschließlich auf die Proteinexpression von VEGF-R2 in pHSC. Die nachgewiesene Steigerung der Proteinexpression ist übereinstimmend mit der von Novo et al. ermittelten Steigerung von VEGF-R2 in menschlichen HSC unter Hypoxie [47].

5.1.2 ERK-Stoffwechselweg

Zur Expression der ERK in zirrhatischen Lebern gibt es eine Vielzahl von Studien. Svegliati-Baroni et al. [25] zeigten, dass die ERK 1/2-Expression in den Lebern gallengangsligierter Ratten zunahm. In verschiedenen Studien an Volllysaten der Leber [77, 101] zeigte sich durch die Zirrhoseinduktion eine unveränderte Proteinexpression der ERK. In HSC aus Ratten, denen mittels Dimethylnitrosamin (DMN) ein Leberzellschaden induziert wurde, war der ERK 1/2-Gehalt unverändert. Die Phosphorylierung der ERK in der zirrhatischen Leber nahm demgegenüber in beiden Arbeiten zu. Svegliati-Baroni et al. [25] und Wang et al. [77] wiesen eine Zunahme der phosphorylierten ERK in der Gesamtleber nach, welche durch die vermehrte Aktivierung der PDGF- und VEGF-Rezeptoren ausgelöst wurde [23, 105]. Anhand von Ratten und Mäusen, die mit CCl_4 behandelt wurden, zeigte sich ein Anstieg der relativen pERK-Expression in deren Lebern [101, 106]. Svegliati-Baroni et al. zeigten zudem, dass 7 Tage nach einer Gallengangsligatur die pERK-Expression in HSC ansteigt.

In der vorliegenden Arbeit blieb die Expression der ERK 1/2 in zirrhatischen pHSC gegen-

über der Kontrollgruppe unverändert. Die Phosphorylierung der ERK 1/2 in der 12 Wochen-Gruppe nahm zu, jedoch war dieses Ergebnis nicht signifikant. Die in der vorliegenden Studie untersuchten pHSC wurden aus hochgradig zirrhotisch veränderten Lebern entnommen. Daher könnte der Leberschaden in dieser Arbeit wesentlich weiter fortgeschritten sein als in anderen Studien. Die akute Aktivierung des ERK-Pathways war möglicherweise wieder rückläufig. Marra et al. [23] zeigten, dass nach einem akuten Leberzellschaden die ERK-Aktivität anstieg und im Verlauf wieder abnahm.

5.1.3 eNOS und VEGF

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur hepatischen eNOS-Expression unter zirrhotischen Bedingungen. Bei Mejias et al. blieb die Protein-Expression der eNOS unverändert [17], Wei et al. zeigten mittels Immunhistochemie einen Anstieg der Expression [107] und bei Schwabl et al. stieg die mRNA-Expression leicht an, wohin gegen die Protein-Expression von eNOS abnahm [108]. In diesen Studien wurden Rattenlebern untersucht. Möglicherweise besteht die Diskrepanz der Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Nachweismethoden. Wang et al. untersuchten die eNOS-Expression in der HSC-Zelllinie LX-2, nachdem diese mit TGF- β 1 aktiviert wurde, und zeigten eine Reduktion der eNOS-Expression [109].

Untersuchungen in der Gesamtleber ergaben, dass die Phosphorylierung hepatischer eNOS unter zirrhotischen Bedingungen erniedrigt ist [32, 108, 110, 111]. In SEC aus zirrhotischen Lebern zeigte sich eine Abnahme der eNOS-Aktivität und -Phosphorylierung [33]. In der Literatur wurde bisher die Expression in der gesamten Leber [17, 107, 108] oder in bestimmten Zellpopulationen wie SEC [112] oder in Zelllinien untersucht [109]. Die eNOS-Expression und -Phosphorylierung in zirrhotischen HSC ist bisher nicht untersucht wurden.

In der vorliegenden Arbeit blieb die eNOS-Expression in zirrhotischen pHSC gegenüber normalen HSC unverändert. Sie blieb außerdem während der Zirrhoseentwicklung konstant. Vermutlich ist die eNOS-Expression in HSC nur sehr gering und es kommt durch die Zirrhoseinduktion nur zu geringen Schwankungen, im Gegensatz zu den SEC, die reichlich eNOS exprimieren. Aber auch die unterschiedlichen Arten der Zirrhoseinduktion könnten eine Ursache für die uneinheitlichen Veränderungen sein, da die einzelnen Tiermodelle verschiedenartige Entstehungsmechanismen der Zirrhose darstellen und CCl₄ eine andersartige Leberschädigung als eine Gallengangsligatur [113] hervorruft. Wang et al. konnten in der HSC-Zelllinie LX-2 eNOS nachweisen, wobei die Expression durch die Aktivierung mit TGF- β 1 induziert wurde [109]. In der vorliegenden Arbeit konnte eNOS in den pHSC nachgewiesen werden, jedoch nicht in der Zelllinie HSZ-S1-B, was möglicherweise in den verschiedenen Aktivierungswege begründet liegt.

Auch der Phosphorylierungsgrad der eNOS in den pHSC wurde in der vorliegenden Untersuchung durch die Zirrhoseentwicklung nicht beeinflusst. In der Literatur wurde hingegen eine Reduktion in der Gesamtleber festgestellt [17, 32, 110]. Da die SEC einen größeren Anteil der hepatischen eNOS exprimieren als die HSC [112], könnte bei einer Bestimmung in der

Gesamtleber die Expression in den SEC die Veränderung in den HSC überlagern. In den SEC wurde eine Reduktion der eNOS-Aktivität durch eine Reduktion der Phosphorylierung gezeigt [114, 115, 116].

Ein Unterschied in der VEGF-Expression zwischen zirrhotischen pHSC und der Kontrollgruppe konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht festgestellt werden. Das wäre zu vereinbaren mit dem Zwei-Phasen-Modell [13, 47], nach dem im Rahmen der Zirrhoseentwicklung zunächst die HSC reichlich VEGF ausschütten und später die Endothelzellen. In den zirrhotischen HSC könnte daher die VEGF-Expression bereits reduziert sein. In der frühen Phase der Schädigung, oder bei akuter Hypoxie, scheint die VEGF-Ausschüttung durch HSC noch deutlich höher zu sein [15, 46, 117, 118].

5.2 Sorafenibwirkung auf nicht-zirrhotische pHSC

Anhand der vorliegenden Daten ergab sich bei nicht-zirrhotischen pHSC eine Steigerung der ERK 2-Expression durch die Sorafenibbehandlung, ohne eine Veränderung der Expression von ERK 1 oder der ERK 1/2-Phosphorylierung. Auch die Expression des VEGF-R2 wurde unter der Sorafenibbehandlung gesteigert. Die Expression von VEGF, eNOS und die Phosphorylierung der eNOS wurden durch Sorafenib nicht beeinflusst. Die Steigerung der ERK 2 und VEGF-R2-Expression in Folge der Sorafenibbehandlung bei nicht-zirrhotischen pHSC ist am ehesten als reaktive Erhöhung der Expression zu werten. Diese könnte durch die Blockade des VEGF-Pathways ausgelöst werden. Von einer Erhöhung der ERK-Expression unter Sorafenib berichteten auch Zhang et al. [119]. Bei den Zellen der vorliegenden Versuchsgruppe handelte es sich um normale pHSC, die noch nicht durch die Einwirkung von Noxen oder oxidativen Stress aktiviert wurden [99]. In dieser Zellpopulation besteht keine Aktivierung des VEGF-Pathways, das heißt der VEGF-R2 liegt hauptsächlich in seiner unphosphorylierten Form vor. Sorafenib als Tyrosinkinase-Inhibitor wirkt über die Blockade des VEGF-R2, jedoch vor allem in der aktivierten Form. Durch die Blockade des vorhandenen VEGF-R2 könnte es aber zu einer reaktiv vermehrten Expression von VEGF-R2 und ERK im Sinne einer Kompensation der Blockade kommen. Auch der Phosphorylierungsstatus der ERK blieb unverändert. Hier wäre eine mögliche Erklärung, dass Sorafenib die nicht aktivierte ERK auch nicht hemmen kann. Eine Steigerung der ERK 2- und VEGF-R2-Expression trat ausschließlich bei der höheren Sorafenibdosis von 2,5 µg/ml auf. Es ist also denkbar, dass die Expressionssteigerung auch durch eine vermehrte Apoptose der HSC hervorgerufen wurde.

5.3 Sorafenibwirkung auf zirrhotische pHSC

Bei der Behandlung der zirrhotischen pHSC wurden die Gruppe der frühen und der fortgeschrittenen Zirrhose unterschieden. In beiden Gruppen ergaben sich unterschiedliche Auswirkungen der Sorafenibbehandlung. In der frühen Zirrhose konnten keine Änderungen der Ex-

pression von ERK 1/2, pERK 1/2 und VEGF festgestellt werden. Für den VEGF-R2 konnte eine signifikante Reduktion der Expression durch die Sorafenibdosis 2,5 µg/ml gezeigt werden. Eine reduzierte VEGF-R2-Expression in der Gesamtleber durch Sorafenib zeigten bereits Zhou et al. in in vivo Studien bei Mäusen [120] und Mejias et al. in Lebergewebe von BDL-Ratten [17]. In Tumorzelllinien zeigte sich keine Änderung der VEGF-R2-Expression, jedoch eine Reduktion der Phosphorylierung [69]. Die hier nachgewiesene Reduktion der VEGF-R2-Expression spricht für eine starke Rezeptorhemmung durch Sorafenib in der beginnenden Zirrhose. Ein ebenfalls signifikanter Unterschied zu den unbehandelten pHSC zeigte sich bei der Expression der eNOS, denn in den pHSC der beginnenden Zirrhose steigerte Sorafenib die eNOS-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Der Grad der Phosphorylierung wurde durch die Sorafenibbehandlung nicht signifikant beeinflusst. Die Steigerung der eNOS-Expression durch Sorafenib in der frühen Zirrhose könnte über eine Hemmung der Rho-Kinase vermittelt sein. Trebicka et al. [121] zeigten, dass Atorvastatin bei Ratten, denen durch Gallengangsli-gatur eine Zirrhose induziert wurde, die eNOS-Expression in der Leber verstärkte. Wang et al. [109] konnten eine vermehrte eNOS-Expression in der Sternzelllinie LX-2 zeigen, nachdem diese mit TGF- β 1 und Simvastatin behandelt wurde. Man vermutet, dass Statine eine Hem-mung der aktivierten RhoA und Rho-Kinase in aktivierten HSC vermitteln, da der aktivierte Rho-Signalweg die eNOS-Expression supprimiert [121, 122, 123]. Sorafenib wiederum ver-ringert die Proteinexpression der Rho-Kinase in der Gesamtleber, was Hennenberg et al. in BDL-Ratten [75] zeigen konnten. Somit könnte Sorafenib die eNOS-Expression in aktivierten Sternzellen durch die Hemmung der dort vermehrt vorliegenden Rho-Kinase [121] steigern (Abb. 31). In der Untersuchung von Klein et al. [62] führte die gezielte Rho-Kinase-Hemmung aktivierter HSC in zirrhatischen Rattenlebern zur isolierten Reduktion des portalen Hoch-drucks, ohne dass der Gefäßwiderstand der Leberarterien beeinflusst wurde. Auch Wei et al. [107] wiesen in BDL-Ratten durch Hemmung der Rho-Kinase mittels Natrium Ferulat, einem Medikament aus der traditionellen chinesischen Medizin, das die Umwandlung der RhoA-GDP zu Rho-GTP verringert, eine Reduktion des portalen Drucks nach. Außerdem zeigten sie eine gesteigerte eNOS-Expression durch Natrium Ferulat. Auch in HSC aus BDL-Ratten konnte eine Inhibierung der Rho-Kinase durch Natrium Ferulat nachgewiesen werden [124]. Auf einem ähnlichen Weg könnte auch Sorafenib auf die Rho-Kinase-Aktivität wirken.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die eNOS-Phosphorylierung der frühen Zirrhose durch die Behandlung mit Sorafenib unverändert blieb. Ähnliches zeigten Mejias et al. bei der in vivo Behandlung zirrhatischer Ratten mit Sorafenib im Volllysate der Leber [17]. So-mit scheint die eNOS-Expression, jedoch nicht dessen Phosphorylierung, durch Sorafenib beeinflussbar zu sein. Eine Hemmung der Rho-Kinase-Aktivität steigert die Stabilität der eNOS-mRNA und somit die Expression der eNOS selbst [122]. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit Sorafenib keinen Einfluss auf die Expression und Phosphorylierung der eNOS in den pHSC der fortgeschrittenen Leberzirrhose. In vivo haben Rosado et al. [123] ge-zeigt, dass die Hemmung der Rho-Kinase-Aktivität mittels Terutroban, einem Thromboxan-

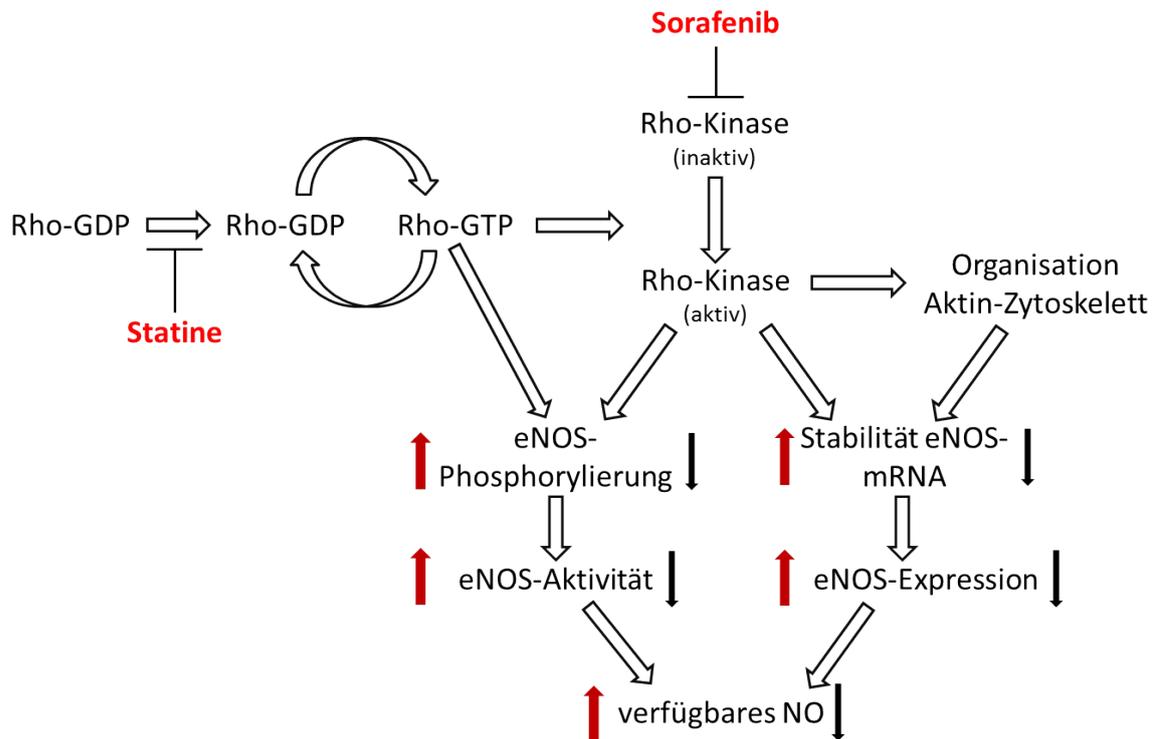


Abbildung 31:

Hier ist die Aktivierung der Rho-Kinase durch Rho-GTP dargestellt. Statine greifen in diesen Zyklus bereits während der Translokation von Rho ein, wohin gegen Sorafenib direkt die Expression der Rho-Kinase hemmt. Dadurch sind eNOS-Aktivität und -Expression nicht mehr eingeschränkt. (Abbildung frei nach Rikitake Y et al 2005).

A2/Prostaglandin-Endoperoxid (TP)-Rezeptor-Antagonisten, keinen Einfluss auf die Expression der eNOS hatte, wenn die Ratten zuvor 12 Wochen CCl_4 inhaliert hatten. Wurden jedoch gallengangsligierte Ratten behandelt, zeigte sich ein deutlicher Anstieg der eNOS-Expression und Phosphorylierung. Die Autoren sehen eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied darin, dass im Fall der gallengangsligierten Ratten eine Zirrhose bestand, die sich während der Behandlung noch in der Entwicklung befand. In der CCl_4 -Gruppe lag eine fortgeschrittene Zirrhose mit Aszites vor. Hier war die Zirrhoseentwicklung vollständig abgeschlossen, so dass durch die in vivo Behandlung keine Steigerung der eNOS-Expression und Aktivität mehr erreicht werden konnte. In ähnlicher Weise scheint die Wirkung des Sorafenibs auf den Rho-Kinase-Pathway vom vorliegenden Zirrhosestadium abhängig zu sein. Anhand der vorliegenden Daten bestätigt sich, dass in der frühen Zirrhose eine Behandlung mit Sorafenib zu einer signifikanten Steigerung der eNOS-Expression führt, wohin gegen die Behandlung in der späten Zirrhose keinen Einfluss auf die Expression und Aktivität hat. Langer und DeLeve berichteten von einer Hemmung der HSC-Aktivierung durch NO [125, 126], welches benachbarte SEC freisetzen. Eine Steigerung der NO-Produktion durch die HSC selbst könnte auf benachbarte Zellen aktivierungshemmend wirken und so das Fortschreiten der Fibrosierung

inhibieren.

Die Wirkung von Sorafenib ist möglicherweise in der frühen Zirrhose am stärksten und wird neben der hemmenden Wirkung auf ERK und VEGF-R2 auch über eine Steigerung der NO-Expression vermittelt. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben, dass durch die Behandlung mit Sorafenib während der Zirrhosebildung eine Reduktion von NO in den Leberarterien ausgelöst wurde [87]. In Zusammenschau aller Ergebnisse zeigen sich Unterschiede zwischen den Veränderungen innerhalb der Leberarterie und den zirrhotischen HSC auf. Die Leberarterie dilatiert im Rahmen der Zirrhoseentwicklung, so dass dem hypoxischen Gewebe der geschädigten Leber mehr Sauerstoff zugeführt wird. Diese Veränderung geht der Ausprägung des portalen Hochdrucks voraus. Eine Untersuchung der Gefäße ergab ein Remodelling der Gefäßwände und eine Überexpression von Adenosin und NO [86, 127]. Auslöser dieser Prozesse scheint die Hypoxie in der geschädigten Leber zu sein, welche anhand einer erhöhten Konzentration des Hypoxie-induzierten Faktors 1α (HIF- 1α) nachgewiesen werden konnte [97]. Adenosin und NO führen vermutlich als Folge der Hypoxie zur Dilatation der Leberarterie.

In den HSC löst Hypoxie die VEGF-Ausschüttung aus, die dann zur Aktivierung der Zellen und der damit verbundenen Veränderung des Phänotyps führt [15, 47, 128]. Die HSC sind nachfolgend in der Lage zu kontrahieren und somit die Sinusoide zu verengen, wodurch der sinusoidale Blutfluss abnimmt [99]. Die Kontraktion der HSC in den Sinusoiden wird, neben anderen Mechanismen [64], durch eine Überaktivierung der Rho-Kinase bedingt. Durch eine Reduktion des verfügbaren NO könnte es zu einer verringerten Apoptose der aktivierten HSC kommen, da NO eine apoptosefördernde Wirkung auf HSC haben soll [125]. Eine Steigerung der NO-Expression könnte hier zur Reduktion des sinusoidalen Drucks führen.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Sorafenibbehandlung in der fortgeschrittenen Zirrhose konnten im Gegensatz zur frühen Zirrhose keine Veränderungen der eNOS-Expression oder Phosphorylierung festgestellt werden. Andererseits zeigen sich in der späten Zirrhose eine verringerte VEGF-Expression und erhöhte VEGF-R2-Expression. Die Phosphorylierung der ERK 2 zeigte sich, sowohl durch Behandlung mit 1,25, als auch durch 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Sorafenib signifikant gesteigert. Ebenfalls wurde eine verstärkte ERK 1-Phosphorylierung beobachtet, die jedoch nicht signifikant war. Da Sorafenib als Tyrosinkinase-Hemmer wirkt, war eine Steigerung der ERK-Aktivität nicht zu erwarten. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte darin liegen, dass es durch Sorafenib auch zu stimulatorischen Wirkungen auf die ERK-Aktivität kommt, wie es Zhang et al. anhand der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 zeigten [119].

Die Reduktion von VEGF durch Sorafenib in der fortgeschrittenen Zirrhose weist auf Unterschiede in der VEGF-Expression zwischen den einzelnen Zirrhosestadien hin. In den in vivo Experimenten von Zhou et al. [104] wurde eine Reduktion der VEGF-Expression durch Sorafenib nachgewiesen, wobei hier Mäuse mit einer durch CCl_4 -induzierten Zirrhose behandelt wurden und die Bestimmung des VEGF-Gehalts in der Gesamtleber erfolgte. Andere

Studien, bei denen eine systemische Sorafenibtherapie erfolgte, zeigten ebenfalls eine Reduktion der VEGF-Expression in der zirrhotischen Leber [17]. In einer Gruppe von Patienten mit fortgeschrittenem HCC, die mit Sorafenib therapiert wurden, konnte eine Reduktion der hepatischen VEGF mRNA von Pinter et al. [85] festgestellt werden. Die Reduktion der VEGF mRNA korrelierte mit der Reduktion des portalen Hochdrucks. In den erwähnten Studien erfolgte die Sorafenibanwendung stets bei einer bereits bestehenden Zirrhose. Dies könnte dafür sprechen, dass eine VEGF-Hemmung durch die Anwendung von Sorafenib in der etablierten Zirrhose möglich ist. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die VEGF-Reduktion durch Sorafenib in den HSC vor allem in der späten Zirrhose eine Rolle spielt. Möglicherweise besteht in den HSC eine insgesamt stärkere VEGF-Expression gegenüber den HSC aus der frühen Zirrhose, auch wenn dies nicht signifikant in den vorliegenden Ergebnissen gezeigt werden konnte.

Die Expression von VEGF-R2 wurde durch die Behandlung mit 2,5 µg/ml Sorafenib signifikant gesteigert. Damit ist die Sorafenibwirkung auf den VEGF-R2 in pHSC der fortgeschrittenen Zirrhose gegensätzlich zur Wirkung in der beginnenden Zirrhose. Sorafenib hemmt die Aktivität des VEGF-R2, in dem es die Phosphorylierung verhindert. Durch eine Hemmung der Aktivität könnte es in der fortgeschrittenen Zirrhose zu einer kompensatorischen Steigerung der Expression in den HSC kommen, wie es bereits bei den normalen HSC erläutert wurde. Ähnliche Effekte wurden bereits von Mao und Shao et al. [129] beschrieben, die zeigten, dass Sorafenib in einer HCC-Tumorzelllinie eine Steigerung der VEGF-R2-Expression auslöste. Zusammengefasst ergeben sich bei der Untersuchung der HSC aus den unterschiedlichen Zirrhosestadien neue Erkenntnisse. In der frühen Zirrhose zeigt sich eine eNOS-Steigerung durch Sorafenib, die bis dato noch nicht nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte in der frühen Zirrhose eine Reduktion des VEGF-R2 gezeigt werden. Zum anderen kam es nur nach der Behandlung der pHSC aus der späten Zirrhose zu einer Reduktion der VEGF-Expression und einer Steigerung der VEGF-R2-Expression, wobei es sich um entscheidende Unterschiede zwischen beiden Zirrhosestadien handelt.

5.4 Sorafenib im Vorversuch

In der untersuchten Zelllinie HSZ-B-S1 wurde eine Steigerung der ERK-Expression durch Sorafenib festgestellt. Die VEGF-R2-Expression wurde durch Sorafenib tendenziell erhöht, jedoch nicht signifikant. Diese Ergebnisse ähneln den Ergebnissen der pHSC aus der Normalleber. Durch die hohen Dosen könnte es zu einer Stimulierung des ERK-Pathways kommen [119]. In anderen Versuchen an Zelllinien mit ähnlichen Dosierungen war die ERK-Expression unverändert [77]. Wang et al. verwendeten die humane LX-2-Zelllinie und die von der Ratte stammende T6-Zelllinie. Die humane Zelllinie LX-2 ähnelt in ihrem Phänotyp aktivierten pHSC sehr. HSC-T6 ähneln Fibroblasten und exprimieren typische Zytoskelettbestandteile wie Desmin und Vimentin. Sie haben eine starke Proliferationsaktivität [130]. In der Un-

tersuchung von Wang et al. zeigten sich zum Teil unterschiedliche Ergebnisse zwischen den beiden Zelllinien, z.B. wurde der Zellzyklus bei den HSC-T6 durch Sorafenib wesentlich mehr beeinflusst als bei den LX-2. Dies verdeutlicht, dass Zelllinien unterschiedlich auf eine Sorafenibbehandlung reagieren. In der vorliegenden Studie wurden die HSZ-B-S1-Zellen nicht mit PDGF vorbehandelt, denn die Zellen dieser Zelllinie sind bereits aktiviert. Es könnte daher sein, dass die Sorafenibbehandlung einen stimulatorischen Reiz auf die ERK-Expression hatte, da zuvor keine Verstärkung der ERK-Aktivität durch PDGF-Gabe initiiert wurde. Die Aktivität der ERK blieb in der vorliegenden Studie unter Sorafenib unverändert. Da Sorafenib als VEGF-Rezeptor-Blocker fungiert, lässt sich postulieren, dass die Reduktion der ERK-Aktivität nur dann zustande kommt, wenn tatsächlich eine Aktivierung durch VEGF oder PDGF vorliegt.

5.5 Sorafenib und Sinusoidale Endothelzellen der Leber

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurde auch eine Behandlung von TSEC, einer murinen sinusoidalen Endothelzelllinie, durchgeführt. Auch in dieser Zelllinie wurde die Expression von ERK, pERK, VEGF und VEGF-R2 unter Sorafenibbehandlung untersucht. Es konnte eine verstärkte Phosphorylierung der ERK 1 unter 10 µg/ml Sorafenib festgestellt werden. Eine signifikante Steigerung der ERK 2-Phosphorylierung konnte nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die bereits erwähnte reaktive Aktivierung durch sehr hohe Dosen Sorafenib darstellen [119]. Für den VEGF-R2 konnte eine signifikant reduzierte Expression durch hohe Dosen Sorafenib festgestellt werden. Sorafenib hemmt die Aktivität des Rezeptors. Im Fall der TSEC wurde auch die Expression reduziert, was für eine starke Hemmung spricht. Auch wurde die Expression der eNOS und deren Phosphorylierung in den TSEC untersucht. Die eNOS stellt ein sehr wichtiges Enzym in der SEC dar, da sie die Generierung des vasoaktiven Stoffes NO katalysiert [43, 131]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe bezüglich eNOS-Expression und -Phosphorylierung. In der Zirrhose nimmt die Aktivität der eNOS und somit die NO-Produktion in den SEC ab [41, 115, 116]. Dies beeinflusst auch andere Zellpopulationen, z.B. die HSC, die dann schneller aktiviert werden [126]. Durch Sorafenib konnte die eNOS-Expression erhöht werden, wie es in der vorliegenden Arbeit anhand von beginnend zirrhotischen pHSC gezeigt wurde. In der TSEC-Zelllinie konnte keine Veränderung der Expression nachgewiesen werden.

5.6 Vorversuch zur Ermittlung der praktikablen Sorafenibdosis

Die durchgeführten Vorversuche ergaben, dass für die Behandlung von hepatischen Sternzellen in der Zellkultur eine Sorafenibdosis von 2,5 µg/ml, was 5,39 µM entspricht, geeignet ist. In einer vergleichbaren Studie an HSC-Zelllinien, bei der Dosierungen von 2,5, 5 und 10 µM

eingesetzt wurden, zeigte sich ein annähernd proportionaler Abfall der Vitalität nach 24 h. In dieser Studie wurden auch pHSC aus der Ratte behandelt, deren Vitalität durch 10 μM Sorafenib um 40 % reduziert wurde [77]. Hong et al. [132] zeigten anhand der LX-2-Zelllinie, die sie mit 7,5 und 15 μM Sorafenib für 24 Stunden behandelten, eine Reduktion der Zellvitalität um 70 % bei beiden Konzentrationen. In Zusammenschau dieser Erkenntnisse wurde mit den Dosierungen 2,5, 5 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sorafenib, was einer Konzentration von 5,39, 10,78 und 21,55 μM entspricht, begonnen. In der Studie von Geng et al. [76] erfolgte die Behandlung von LX-2-Zellen mit 5, 10 und 20 μM über 12, 24, 36 und 48 Stunden. Darunter zeigte sich ebenso eine abnehmende Zellvitalität mit zunehmender Sorafenibdosis und Einwirkdauer. Die Ergebnisse in der humanen HSZ-B-S1-Zelllinie sind also durchaus mit denen in der ebenfalls humanen LX-2-Zelllinie vergleichbar. In der HSZ-B-S1-Zelllinie wurde die Vitalität der Zellen durch die geringste Dosis um einen tolerablen Wert reduziert (43%), so dass für den Hauptversuch an primären HSC diese Dosierung, sowie zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit auch die halbe Dosis von 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, gewählt wurde. Diese Dosierung ist deutlich höher, als die von Hennenberg et al. auf pHSC angewendete Dosis von max. 1 μM , wobei diese keine Veränderungen an der Morphologie und der Menge der Zellen auslöste [74]. Bei Wang et al. konnte nach 24 stündiger Behandlung mit 2,5 μM Sorafenib eine Vitalität von 75 % und bei 5 μM von 60 % in pHSC nachgewiesen werden [77]. Die in der vorliegenden Studie auf primären HSC angewendete Dosis von 1,25 und 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kommt diesen sehr nah. Signifikante Ergebnisse wurden hauptsächlich mit der höheren Dosis festgestellt, was auf eine mögliche Cut-off-Dosis hinweisen könnte. Die von Hennenberg et al. verwendete Dosis war möglicherweise zu niedrig, um morphologische Veränderungen auszulösen, daher wurde in der vorliegenden Studie eine höhere Dosis verwendet. Insgesamt scheint es schwierig den schmalen Dosisbereich zwischen signifikanten Veränderungen der Proteinexpression und Toxizität zu finden. Bei den pHSC konnte in der vorliegenden Arbeit keine Vitalitätsbestimmung durchgeführt werden, da die Zellausbeute pro Versuchstier zu gering war.

5.7 Hinweise auf die Dosisabhängigkeit der Sorafenibwirkung

In dieser Arbeit wurden erstmalig pHSC aus der frühen und fortgeschrittenen Zirrhose in vitro mit Sorafenib behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass zirrhotische HSC Sorafenibdosen von ca. 2,5 bis 5 μM tolerieren. Dies wurde bisher nur bei primären unbehandelten HSC untersucht [133, 134]. In Abhängigkeit der Dosis zeigten sich zum Teil unterschiedliche Effekte auf die Proteinexpression. So wurden signifikante Effekte auf die VEGF-R2-Expression in der frühen und fortgeschrittenen Zirrhose und auf die eNOS-Expression in der frühen Zirrhose mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ beobachtet. Wurde die halbe Dosis Sorafenib eingesetzt, kam es zu keinem signifikanten Unterschied. Da hier nur eine höhere Dosis die gewünschten Effekte erzielen konnte, ist Sorafenib aufgrund seiner hohen Toxizität möglicherweise nicht als alleinige antifibrotische Therapie geeignet. Für Patienten die aufgrund eines HCC bereits mit Sorafe-

nib behandelt werden [84, 85], ist die antifibrotische Wirkung jedoch von Vorteil. Patienten mit einem therapieresistenten portalen Hochdruck könnten möglicherweise von Sorafenib in niedrigen Dosen in Kombination mit Propranolol profitieren [135].

5.8 Methodik der Experimente

In der vorliegenden Studie wurde die Leberzirrhose der Ratten mittels mehrwöchiger Inhalation des hepatotoxischen Stoffes CCl_4 induziert. Diese Methode ist seit vielen Jahren etabliert [30, 86, 136, 137, 138] und zeichnet sich durch die besonders rasche Entwicklung einer Leberzirrhose aus [136]. Sie führt zu einer mikronodulären Zirrhose [137], die einer menschlichen ethyltoxischen Leberzirrhose in einigen Eigenschaften ähnlich ist [139]. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe erwies sich diese Methode als effektiv. Eine Behandlungsdauer von 8 Wochen führte zu einer Zirrhose ohne portalen Hochdruck und eine Behandlung über 12-15 Wochen zu einer Zirrhose mit ausgeprägter portaler Hypertension und Aszites [97]. Um die Effekte von Sorafenib auf die aktivierten pHSC zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit zirrhotische pHSC verwendet, mit der Intention die Verhältnisse *in vivo* möglichst genau zu simulieren. Minicis et al. zeigten [140], dass es deutliche Unterschiede in der Genexpression von *in vivo* und *in vitro* aktivierten HSC gibt, weshalb eine *in vitro* Aktivierung die Veränderungen in der fibrotischen bzw. zirrhotischen Leber vermutlich nicht ausreichend wiedergeben kann. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine der wenigen Studien, in denen zirrhotische pHSC verwendet wurden [141]. Die Isolation der pHSC erfolgte nach der durch Graupera et al. [90] etablierten Methode, die eine hohe Reinheit und Vitalität der Zellen ermöglicht. Nach der Isolation erfolgte eine Kultivierung über 24 Stunden. Dieses Zeitintervall wurde ausgewählt, um ein Anheften der Zellen an den Untergrund zu ermöglichen und andererseits eine durch die Kultur bedingte Veränderung der Zellmorphologie möglichst gering zu halten. In anderen vergleichbaren Studien an pHSC wurden die Zellen in der Regel über mindestens 5-7 Tage in Kultur gehalten [46, 142, 143] um eine *in vitro* Aktivierung zu erreichen. Da in der vorliegenden Studie bereits aktivierte und morphologisch veränderte HSC isoliert wurden, war eine weitere Veränderung durch die Kulturbedingung nicht gewünscht. Eine noch kürzere Kulturdauer vor der Behandlung mit Sorafenib war aufgrund der methodischen Gegebenheiten nicht möglich, da zur Trennung der HSC und Kupffer-Zellen eine Anheftedauer von 24 Stunden eingehalten werden musste. Die Behandlung mit Sorafenib erfolgte im Anschluss über 24 Stunden um einen Effekt auf die Proteinexpression der Zellen auszulösen. Bei einer längeren Behandlung hätten kulturabhängige Veränderungen der HSC einen zu großen Einfluss gehabt [144].

5.9 Limitationen der Arbeit

Die Kultivierung der primären Sternzellen über 24 Stunden könnte möglicherweise zu Veränderungen im vorhandenen Aktivierungszustand geführt haben, so dass auch hier keine vollständige Abbildung des *in vivo* Zustandes möglich war, da sich die Zellen durch den Kontakt zur Plastikunterlage weiter differenzierten. Jedoch sollten diese kulturabhängigen Veränderungen durch die Verkürzung auf die minimale Dauer von 24 Stunden möglichst gering gehalten werden. Es ist bekannt, dass die Umwandlung der Zellen in einen anderen Phänotyp erst nach einigen Tagen abgeschlossen ist [144, 145].

Außerdem liegt eine mögliche Limitation der Arbeit darin, dass die Ermittlung der anzuwendenden Dosis nur in der Zelllinie erfolgt ist. Daher könnte es bei den primären Zellen zur Anwendung von zu hohen Dosen gekommen sein, was die Verzerrung der Ergebnisse durch vermehrte Apoptose der Zellen zur Folge gehabt haben könnte. Jedoch erscheint eine starke Beeinflussung hier unwahrscheinlich, da die Ergebnisse größtenteils simultan zu denen in der Zelllinie sind. Wenn sich hier eine Diskrepanz zeigte, dann am ehesten durch eine Überdosierung von Sorafenib im Vorversuch.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der Zirrhoseentstehung kommt es im Bereich der Lebersinusoiden zu entscheidenden Veränderungen in der Morphologie hepatischer Sternzellen (HSC). Diese fungieren in ihrem aktivierten Zustand als zentrale Zellpopulation in der Zirrhoseentwicklung. In dieser Arbeit wurden die HSC aus Ratten, denen mittels Tetrachlormethan (CCl_4) eine Leberzirrhose induziert wurde, isoliert und im Anschluss mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib behandelt. Dabei wurden ein frühes und ein fortgeschrittenes Zirrhosestadium unterschieden. Durch die Zirrhoseinduktion wurde die Expression des VEGF-Rezeptors 2 (VEGF-R2) gesteigert, was für eine höhere Aktivität des VEGF-Pathways in den HSC spricht. Die Effekte der Sorafenibbehandlung zeigten sich abhängig vom vorliegenden Zirrhosestadium. In der frühen Zirrhose löste die Behandlung mit Sorafenib eine Steigerung der eNOS-Expression ohne Steigerung der eNOS-Phosphorylierung aus. Die Steigerung der Expression könnte zu einem vermehrten Angebot an Stickstoffmonoxid (NO) führen und somit eine Reduktion des intrahepatischen Gefäßwiderstandes nach sich ziehen. Zudem konnte in der frühen Zirrhose die Expression von VEGF-R2 signifikant reduziert werden. Eine signifikante Wirkung von Sorafenib auf die Expression von ERK 1/2, pERK 1/2 und VEGF zeigte sich in der beginnenden Zirrhose nicht. In der fortgeschrittenen Zirrhose bewirkte Sorafenib eine Reduktion der VEGF-Expression bei simultaner Steigerung der VEGF-R2-Expression. Durch die Verringerung der Expression des VEGF kommt es zur Hemmung der Angiogenese, wodurch die Bildung von irregulären Gefäßen in der Zirrhose gehemmt wird. Die Steigerung der Rezeptorexpression könnte eine kompensatorische Reaktion auf die Hemmung durch Sorafenib sein. Die Phosphorylierung der ERK 2 wurde durch die Sorafenibbehandlung signifikant gesteigert, wobei es sich um eine reaktive Aktivierung handeln könnte. Im fortgeschrittenen Zirrhosestadium hatte Sorafenib keinen Einfluss auf die Expression von ERK 1/2, eNOS und pERK. Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die hepatische Sternzelllinie HSZ-B-S1 und die sinusoidale Endothelzelllinie TSEC mit Sorafenib behandelt. Dabei zeigte sich unter der Behandlung der Sternzelllinie eine signifikante Steigerung der ERK-Expression. Die Expression des VEGF-Rezeptors zeigte sich nicht signifikant erhöht. Diese Expressionssteigerung könnte durch einen inversen Effekt von Sorafenib ausgelöst worden sein. In der Endothelzelllinie wurde die Phosphorylierung der ERK unter der maximalen Sorafenibdosis gesteigert, was möglicherweise durch eine erhöhte Apoptose ausgelöst wurde. Der VEGF-R2 wurde unter der maximalen Sorafenibdosis gegenüber der Kontrolle reduziert. Dies könnte dafür sprechen, dass die antifibrotische Wirkung von Sorafenib auch über eine Hemmung der sinusoidalen Endothelzellen vermittelt wird. Zusammengefasst hat Sorafenib das Potential in verschiedenen Stadien der Leberzirrhose einen Einfluss auf die Proteinexpression der HSC zu nehmen. Dabei scheint der frühzeitige Einsatz besonders effektiv, da hier ein Effekt auf den intrahepatischen Gefäßwiderstand und die portale Hypertension wahrscheinlich ist. In Kombinationstherapie mit etablierten Medikamenten, wie unselektiven Beta-Blockern, könnte dies eine sinnvolle Therapieoption der Leberzirrhose darstellen.

Literaturverzeichnis

- [1] Nitta T, Kim JS, Mohuczy D, Behrns KE (2008) Murine cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and alterations in survival signaling pathways. *Hepatology* 48(3):909–919.
- [2] Sauerbruch T, Appenrodt B, Schmitz V, Spengler U (2013) Konservative und interventionelle Therapie der Komplikationen bei Leberzirrhose -Teil 2 der Serie zur Leberzirrhose. *Dtsch Arztebl Int* 110(8):126–32, I.
- [3] Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F (2013) The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 58(3):593–608.
- [4] Asrani SK, Larson JJ, Yawn B, Therneau TM, Kim WR (2013) Underestimation of liver-related mortality in the United States. *Gastroenterology* 145(2):375–82.e1–2.
- [5] D’Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L (2006) Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 44(1):217–231.
- [6] Zipprich A, Garcia-Tsao G, Rogowski S, Fleig WE, Seufferlein T, Dollinger MM (2012) Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis. *Liver Int* 32(9):1407–1414.
- [7] Friedman SL (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134(6):1655–1669.
- [8] Marsillach J, Ferre N, Camps J, Rull A, Beltran R, Joven J (2008) Changes in the expression of genes related to apoptosis and fibrosis pathways in CCl4-treated rats. *Mol Cell Biochem* 308(1-2):101–109.
- [9] Arriazu E, Ruiz de Galarreta M, Cubero FJ, Varela-Rey M, Perez de Obanos, M P, Leung TM, Lopategi A, Benedicto A, Abraham-Enachescu I, Nieto N (2014) Extracellular matrix and liver disease. *Antioxid Redox Signal* 21(7):1078–1097.
- [10] Pankov R (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115(20):3861–3863.
- [11] Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115(2):209–218.
- [12] Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R (2004) Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 39(5):1185–1195.
- [13] Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J (2009) Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 50(3):604–620.
- [14] Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, van Steenkiste C, Colle I, van Vlierberghe H (2011) Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int* 31(2):146–162.
- [15] Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O (2002) Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 35(5):1010–1021.
- [16] Vanheule E, Geerts AM, van Huysse J, Schelfhout D, Praet M, van Vlierberghe H, Vos Md, Colle I (2008) An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 89(6):419–432.

-
- [17] Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, Fernandez M (2009) Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 49(4):1245–1256.
- [18] Klagsbrun M, D'Amore PA (1991) Regulators of Angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 53:217–239.
- [19] Huang Y, Feng H, Kan T, Huang B, Zhang M, Li Y, Shi C, Wu M, Luo Y, Yang J, Xu F (2013) Bevacizumab attenuates hepatic fibrosis in rats by inhibiting activation of hepatic stellate cells. *PloS one* 8(8):e73492.
- [20] Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, Galy B, Sebbagh N, Raleigh J, Housset C, Poupon R (1999) Hepatocellular Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Angiogenesis in Experimental Biliary Cirrhosis. *Am J Pathol* 155(4):1065–1073.
- [21] Ankoma-Sey V, Matli M, Chang KB, Lalazar A, Donner DB, Wong L, Warren RS, Friedman SL (1998) Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 17(1):115–121.
- [22] Yoshiji H (2003) Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 52(9):1347–1354.
- [23] Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P (1999) Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology* 30(4):951–958.
- [24] Cobb MH (1999) MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71(3-4):479–500.
- [25] Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Caradonna Z, Alvaro D, Marzioni M, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, Macarri G, Benedetti A, Folli F (2003) Regulation of ERK/JNK/p70S6K in two rat models of liver injury and fibrosis. *J Hepatol* 39(4):528–537.
- [26] Zhang XL, Liu JM, Yang CC, Zheng YL, Liu L, Wang ZK, Jiang HQ (2006) Dynamic expression of extracellular signal-regulated kinase in rat liver tissue during hepatic fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 12(39):6376.
- [27] Bosch J, García-Pagán JC (2000) Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 32 (suppl. 1):141–156.
- [28] Thabut D, Routray C, Lomberk G, Shergill U, Glaser K, Huebert R, Patel L, Masyuk T, Blechacz B, Vercnocke A, Ritman E, Ehman R, Urrutia R, Shah V (2011) Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatology* 54(2):573–585.
- [29] Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani AZ, Heller J, Sauerbruch T (2009) Vascular hyporesponsiveness to angiotensin II in rats with CCl₄-induced liver cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 39(10):906–913.

-
- [30] Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Groszmann RJ (2003) Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(4):G567–74.
- [31] Hu LS, George J, Wang JH (2013) Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension. *World J Gastroenterol* 19(11):1707–1717.
- [32] Liu S, Premont RT, Kontos CD, Zhu S, Rockey DC (2005) A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat Med* 11(9):952–958.
- [33] Langer DA, Shah VH (2006) Nitric oxide and portal hypertension: interface of vasoreactivity and angiogenesis. *J Hepatol* 44(1):209–216.
- [34] Pesarin M, La Mura V, Gracia-Sancho J, Garcia-Caldero H, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Abraldes JG (2012) Sinusoidal endothelial dysfunction precedes inflammation and fibrosis in a model of NAFLD. *PloS one* 7(4):e32785.
- [35] Friedman SL (1993) The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis – Mechanisms and Treatment Strategies. *N Engl J Med* 328(25):1828–1835.
- [36] Friedman SL (2000) Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *J Biol Chem* 275(4):2247–2250.
- [37] Hellerbrand C (2013) Hepatic stellate cells—the pericytes in the liver. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 465(6):775–778.
- [38] Blomhoff R, Blomhoff HK (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66(7):606–630.
- [39] Tacke F, Weiskirchen R (2010) Pathophysiologie der Leberfibrose. *Internist* 51(1):21–29.
- [40] Pinzani M, Gentilini MD (1999) Biology of Hepatic Stellate Cells and Their Possible Relevance in the Pathogenesis of Portal Hypertension in Cirrhosis. *Semin Liver Dis* 19(4):397–410.
- [41] Marrone G, Shah VH, Gracia-Sancho J (2016) Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J Hepatol* 65(3):608–617.
- [42] Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky 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.
- [43] DeLeve LD (2015) Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology* 61(5):1740–1746.
- [44] Pereira TN, Walsh MJ, Lewindon PJ, Ramm GA (2010) Paediatric cholestatic liver disease: Diagnosis, assessment of disease progression and mechanisms of fibrogenesis. *World J Gastrointest Pathophysiol* 1(2):69–84.
- [45] Rockey DC (2013) Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11(3):224–231.e1–5.

-
- [46] Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z (2000) Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 31(1):141–148.
- [47] Novo E, Cannito S, Zamara E, Di Bonzo LV, Caligiuri A, Cravanzola C, Compagnone A, Colombatto S, Marra F, Pinzani M, Parola M (2007) Proangiogenic Cytokines as Hypoxia-Dependent Factors Stimulating Migration of Human Hepatic Stellate Cells. *Am J Pathol* 170(6):1942–1953.
- [48] 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.
- [49] Reynaert H, Urbain D, Geerts A (2008) Regulation of sinusoidal perfusion in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken)* 291(6):693–698.
- [50] Thabut D, Shah V (2010) Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 53(5):976–980.
- [51] Rockey DC, Weymouth N, Shi Z (2013) Smooth muscle alpha actin (Acta2) and myofibroblast function during hepatic wound healing. *PLoS one* 8(10):e77166.
- [52] Housset C, Rockey DC, Bissell DM (1993) Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(20):9266–9270.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] Rockey DC (1997) New concepts in the pathogenesis of portal hypertension: hepatic wounding and stellate cell contractility. *Clin Liver Dis* 1(1):13–29.
- [56] Zhou Q, Hennenberg M, Trebicka J, Jochem K, Leifeld L, Biecker E, Sauerbruch T, Heller J (2006) Intrahepatic upregulation of RhoA and Rho-kinase signalling contributes to increased hepatic vascular resistance in rats with secondary biliary cirrhosis. *Gut* 55(9):1296–1305.
- [57] Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J, Jochem K, Zhou Q, Schmidt M, Jakobs KH, Sauerbruch T, Heller J (2006) Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 130(3):838–854.
- [58] Hennenberg M, Trebicka J, Biecker E, Schepke M, Sauerbruch T, Heller J (2007) Vascular dysfunction in human and rat cirrhosis: role of receptor-desensitizing and calcium-sensitizing proteins. *Hepatology* 45(2):495–506.
- [59] Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z (2002) Rho GTPase/Rho Kinase Negatively Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation through the Inhibition of Protein Kinase B/Akt in Human Endothelial Cells. *Mol Cell Biol* 22(24):8467–8477.

- [60] Takemoto M (2002) Rho-Kinase Mediates Hypoxia-Induced Downregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 106(1):57–62.
- [61] Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y, Stalker TJ, Gong Y, Scalia R, Dominiak P, Liao JK (2004) Inhibition of Rho-Kinase Leads to Rapid Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase Akt and Cardiovascular Protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(10):1842–1847.
- [62] Klein S, van Beuge MM, Granzow M, Beljaars L, Schierwagen R, Kilic S, Heidari I, Huss S, Sauerbruch T, Poelstra K, Trebicka J (2012) HSC-specific inhibition of Rho-kinase reduces portal pressure in cirrhotic rats without major systemic effects. *J Hepatol* 57(6):1220–1227.
- [63] Iwakiri Y, Groszmann RJ (2007) Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol* 46(5):927–934.
- [64] 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–G564.
- [65] Chang YS, Adnane J, Trail PA, Levy J, Henderson A, Xue D, Bortolon E, Ichetovkin M, Chen C, McNabola A, Wilkie D, Carter CA, Taylor ICA, Lynch M, Wilhelm S (2007) Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 59(5):561–574.
- [66] Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C (2006) Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 66(24):11851–11858.
- [67] Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM (2007) Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 356(2):125–134.
- [68] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2008) Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 359(4):378–390.
- [69] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA (2004) BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Res* 64(19):7099–7109.

- [70] Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 7(10):3129–3140.
- [71] Lyons J (2001) Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr Relat Cancer* 8(3):219–225.
- [72] Murphy DA, Makonnen S, Lassoued W, Feldman MD, Carter C, Lee WMF (2006) Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006). *Am J Pathol* 169(5):1875–1885.
- [73] Rahmani M, Davis EM, Crabtree TR, Habibi JR, Nguyen TK, Dent P, Grant S (2007) The kinase inhibitor sorafenib induces cell death through a process involving induction of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 27(15):5499–5513.
- [74] Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, Stark C, Nischalke HD, Kramer B, Korner C, Klein S, Granzow M, Fischer HP, Heller J, Sauerbruch T (2011) Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 91(2):241–251.
- [75] Hennenberg M, Trebicka J, Stark C, Kohistani AZ, Heller J, Sauerbruch T (2009) Sorafenib targets dysregulated Rho kinase expression and portal hypertension in rats with secondary biliary cirrhosis. *Br J Pharmacol* 157(2):258–270.
- [76] Geng Z, Jha RK, Li B, Chen C, Li W, Zheng J, Wang L, Huanchen S (2014) Sorafenib inhibition of hepatic stellate cell proliferation in tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma: a study of the sorafenib mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 69(3):717–724.
- [77] Wang Y, Gao J, Di Z, Zhang J, Ma J, Jiang H (2010) New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Hepatol* 53(1):132–144.
- [78] Bosch J, Masti R, Kravetz D, Bruix J, Gaya J, Rigau J, Rodes J (1984) Effects of propranolol on azygos venous blood flow and hepatic and systemic hemodynamics in cirrhosis. *Hepatology* 4(6):1200–1205.
- [79] Groszmann RJ, Bosch J, Grace ND, Conn HO, Garcia-Tsao G, Navasa M, Alberts J, Rodes J, Fischer R, Bermann M (1990) Hemodynamic events in a prospective randomized trial of propranolol versus placebo in the prevention of a first variceal hemorrhage. *Gastroenterology* 99(5):1401–1407.
- [80] D’Amico G, Pasta L, Morabito A, D’Amico M, Caltagirone M, Malizia G, Tinè F, Giannuoli G, Traina M, Vizzini G, Politi F, Luca A, Virdone R, Licata A, Pagliaro L (2014) Competing risks and prognostic stages of cirrhosis: a 25-year inception cohort study of 494 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 39(10):1180–1193.
- [81] Garcia-Tsao G, Grace ND, Groszmann RJ, Conn HO, Bermann MM, Patrick MJ, Morse SS, Alberts JL (1986) Short-term effects of propranolol on portal venous pressure. *Hepatology* 6(1):101–106.

- [82] Lui HF, Stanley AJ, Forrest EH, Jalan R, Hislop WS, Mills PR, Finlayson NDC, Macgilchrist AJ, Hayes PC (2002) Primary prophylaxis of variceal hemorrhage: a randomized controlled trial comparing band ligation, propranolol, and isosorbide mononitrate. *Gastroenterology* 123(3):735–744.
- [83] Reiberger T, Angermayr B, Schwabl P, Rohr-Udilova N, Mitterhauser M, Gangl A, Peck-Radosavljevic M (2009) Sorafenib attenuates the portal hypertensive syndrome in partial portal vein ligated rats. *J Hepatol* 51(5):865–873.
- [84] Coriat R, Gouya H, Mir O, Ropert S, Vignaux O, Chaussade S, Sogni P, Pol S, Blanchet B, Legmann P, Goldwasser F (2011) Reversible decrease of portal venous flow in cirrhotic patients: a positive side effect of sorafenib. *PloS one* 6(2):e16978.
- [85] Pinter M, Sieghart W, Reiberger T, Rohr-Udilova N, Ferlitsch A, Peck-Radosavljevic M (2012) The effects of sorafenib on the portal hypertensive syndrome in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma—a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 35(1):83–91.
- [86] Zipprich A, Loureiro-Silva MR, D’Silva I, Groszmann RJ (2008) The role of hepatic arterial flow on portal venous and hepatic venous wedged pressure in the isolated perfused CCl₄-cirrhotic liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295(1):G197–G202.
- [87] Moeller M (2015) Bedeutung und Mediatoren von Neoangiogenese und Remodeling in der Leberarterie während Entstehung und bei etablierter Zirrhose im Tiermodell. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- [88] Huebert RC, Jagavelu K, Liebl AF, Huang BQ, Splinter PL, LaRusso NF, Urrutia RA, Shah VH (2010) Immortalized liver endothelial cells: a cell culture model for studies of motility and angiogenesis. *Lab Invest* 90(12):1770–1781.
- [89] Zipprich A, Loureiro-Silva MR, Jain D, D’Silva I, Groszmann RJ (2008) Nitric oxide and vascular remodeling modulate hepatic arterial vascular resistance in the isolated perfused cirrhotic rat liver. *J Hepatol* 49(5):739–745.
- [90] Graupera M, March S, Engel P, Rodes J, Bosch J, Garcia-Pagan JC (2005) Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(4):G763–G770.
- [91] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1):76–85.
- [92] Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ (1989) Protein Measurement Using Bicinchoninic Acid: Elimination of Interfering Substances. *Anal Biochem* 180:136–139.
- [93] Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* (227):680–685.
- [94] Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9):4350–4354.

-
- [95] Gületkin H, Heermann KH (1988) The Use of Polyvinylidenedifluoride Membranes as a General Blotting Matrix. *Anal Biochem* 172:320–329.
- [96] Rybicki EP, von Wechmar MB (1982) Enzyme-assisted Immune Detection of Plant Virus Proteins electroblotted onto Nitrocellulose Paper. *J Virol Methods* 5(5-6):267–278.
- [97] Moeller M, Thonig A, Pohl S, Ripoll C, Zipprich A (2015) Hepatic arterial vasodilation is independent of portal hypertension in early stages of cirrhosis. *PloS one* 10(3):e0121229.
- [98] Sato M, Suzuki S, Senoo H (2003) Hepatic Stellate Cells: Unique Characteristics in Cell Biology and Phenotype. *Cell Struct Funct* 28(2):105–112.
- [99] Friedman SL (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88(1):125–172.
- [100] Liu C, Gaca MDA, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG (2003) Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 278(13):11721–11728.
- [101] Liu Y, Wang Z, Kwong SQ, Lui ELH, Friedman SL, Li FR, Lam RWC, Zhang GC, Zhang H, Ye T (2011) Inhibition of PDGF, TGF-beta, and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib. *J Hepatol* 55(3):612–625.
- [102] Zhao Y, Wang Y, Wang Q, Liu Z, Liu Q, Deng X (2012) Hepatic stellate cells produce vascular endothelial growth factor via phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase/cyclooxygenase-2 pathway. *Mol Cell Biochem* 359(1-2):217–223.
- [103] Novo E, Povero D, Busletta C, Paternostro C, Di Bonzo LV, Cannito S, Compagnone A, Bandino A, Marra F, Colombatto S, David E, Pinzani M, Parola M (2012) The biphasic nature of hypoxia-induced directional migration of activated human hepatic stellate cells. *J Pathol* 226(4):588–597.
- [104] Zhou YN, Sun MY, Mu YP, Yang T, Ning BB, Ren S, Chen JM, Liu P (2014) Xuefuzhuyu decoction inhibition of angiogenesis attenuates liver fibrosis induced by CCl(4) in mice. *J Ethnopharmacol* 153(3):659–666.
- [105] Lee UE, Friedman SL (2011) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25(2):195–206.
- [106] Peng Y, Yang H, Wang N, Ouyang Y, Yi Y, Liao L, Shen H, Hu G, Wang Z, Tao L (2014) Fluorofenidone attenuates hepatic fibrosis by suppressing the proliferation and activation of hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306(3):G253–G263.
- [107] Wei L, Yang J, Wang M, Xu SN, Liang HM, Zhou Q (2014) Sodium ferulate lowers portal pressure in rats with secondary biliary cirrhosis through the RhoA/Rho-kinase signaling pathway: a preliminary study. *Int J Mol Med* 34(5):1257–1267.

-
- [108] Schwabl P, Hambruch E, Seeland BA, Hayden H, Wagner M, Garnys L, Strobel B, Schubert T, Riedl F, Mitteregger D, Burnet M, Starlinger P, Oberhuber G, Deuschle U, Rohr-Udilova N, Podesser BK, Peck-Radosavljevic M, Reiberger T, Kremoser C, Trauner M (2017) The FXR agonist PX20606 ameliorates portal hypertension by targeting vascular remodelling and sinusoidal dysfunction. *J Hepatol* 66(4):724–733.
- [109] Wang W, Zhao C, Zhou J, Zhen Z, Wang Y, Shen C (2013) Simvastatin ameliorates liver fibrosis via mediating nitric oxide synthase in rats with non-alcoholic steatohepatitis-related liver fibrosis. *PloS one* 8(10):e76538.
- [110] Anegawa G, Kawanaka H, Yoshida D, Konishi K, Yamaguchi S, Kinjo N, Taketomi A, Hashizume M, Shimokawa H, Maehara Y (2008) Defective endothelial nitric oxide synthase signaling is mediated by rho-kinase activation in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology* 47(3):966–977.
- [111] Mohammadi MS, Thabut D, Cazals-Hatem D, Galbois A, Rudler M, Bonnefont-Rousselot D, Moreau R, Lebre C, Tazi KA (2009) Possible mechanisms involved in the discrepancy of hepatic and aortic endothelial nitric oxide synthases during the development of cirrhosis in rats. *Liver Int* 29(5):692–700.
- [112] Rockey DC, Chung JJ (1998) Reduced Nitric Oxide Production by Endothelial Cells in Cirrhotic Rat Liver: Endothelial Dysfunction in Portal Hypertension. *Gastroenterology* 114(2):344–351.
- [113] Bocca C, Novo E, Miglietta A, Parola M (2015) Angiogenesis and Fibrogenesis in Chronic Liver Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1(5):477–488.
- [114] Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399(6736):597–601.
- [115] Iwakiri Y, Grisham M, Shah V (2008) Vascular biology and pathobiology of the liver: Report of a single-topic symposium. *Hepatology* 47(5):1754–1763.
- [116] Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC (2014) Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - current status and future directions. *J Hepatol* 61(4):912–924.
- [117] Wang YQ, Luk JM, Ikeda K, Man K, Chu AC, Kaneda K, Fan ST (2004) Regulatory role of vHL/HIF-1alpha in hypoxia-induced VEGF production in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 317(2):358–362.
- [118] Aleffi S, Navari N, Delogu W, Galastri S, Novo E, Rombouts K, Pinzani M, Parola M, Marra F (2011) Mammalian target of rapamycin mediates the angiogenic effects of leptin in human hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301(2):G210–G219.
- [119] Zhang YN, Wu XY, Zhong N, Deng J, Zhang L, Chen W, Li X, Zhong CJ (2014) Stimulatory effects of sorafenib on human nonsmall cell lung cancer cells in vitro by regulating MAPK/ERK activation. *Mol Med Rep* 9(1):365–369.

-
- [120] Zhou YN, Mu YP, Fu WW, Ning BB, Du GL, Chen JM, Sun MY, Zhang H, Hu YY, Liu CH, Xu LM, Liu P (2015) Yiguanjian decoction and its ingredients inhibit angiogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis mice. *BMC complementary and alternative medicine* 15:342.
- [121] Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J (2007) Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 46(1):242–253.
- [122] Rikitake Y, Liao JK (2005) Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 97(12):1232–1235.
- [123] Rosado E, Rodriguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Tripathi D, Garcia-Caldero H, Bosch J, Garcia-Pagan JC (2013) Terutroban, a TP-receptor antagonist, reduces portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 58(4):1424–1435.
- [124] Liu J, Peng L, Yang J, Wang M, Xu S, Liu J, Han P, He J, Tian D, Zhou Q (2015) Sodium Ferulate Reduces Portal Pressure Through Inhibition of RhoA/Rho-Kinase and Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cirrhotic Rats. *Dig Dis Sci* 60(7):2019–2029.
- [125] Langer DA, Das A, Semela D, Kang-Decker N, Hendrickson H, Bronk SF, Katusic ZS, Gores GJ, Shah VH (2008) Nitric oxide promotes caspase-independent hepatic stellate cell apoptosis through the generation of reactive oxygen species. *Hepatology* 47(6):1983–1993.
- [126] DeLeve LD, Wang X, Guo Y (2008) Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* 48(3):920–930.
- [127] Zipprich A, Mehal WZ, Ripoll C, Groszmann RJ (2010) A distinct nitric oxide and adenosine A1 receptor dependent hepatic artery vasodilatory response in the CCl₄-cirrhotic liver. *Liver Int* 30(7):988–994.
- [128] Reeves HL, Friedman SL (2002) Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 7(1-3):d808–d826.
- [129] Mao WF, Shao MH, Gao PT, Ma J, Li HJ, Li GL, Han BH, Yuan CG (2012) The important roles of RET, VEGFR2 and the RAF/MEK/ERK pathway in cancer treatment with sorafenib. *Acta Pharmacol Sin* 33(10):1311–1318.
- [130] Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R (2007) Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cell Mol Med* 11(4):704–722.
- [131] DeLeve LD, Wang X, Hu L, McCuskey MK, McCuskey RS (2004) Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287(4):G757–G763.
- [132] Hong F, Chou H, Fiel MI, Friedman SL (2013) Antifibrotic activity of sorafenib in experimental hepatic fibrosis: refinement of inhibitory targets, dosing, and window of efficacy in vivo. *Dig Dis Sci* 58(1):257–264.

-
- [133] Su TH, Shiau CW, Jao P, Liu CH, Liu CJ, Tai WT, Jeng YM, Yang HC, Tseng TC, Huang HP, Cheng HR, Chen PJ, Chen KF, Kao JH, Chen DS (2015) Sorafenib and its derivative SC-1 exhibit antifibrotic effects through signal transducer and activator of transcription 3 inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(23):7243–7248.
- [134] Hao H, Di Z, Shi J, Wang Y, Chen L, Guo Y, Ma J, Jiang X, Jiang H (2016) Sorafenib induces autophagic cell death and apoptosis in hepatic stellate cell through the JNK and Akt signaling pathways. *Anticancer Drugs* 27(3):192–203.
- [135] D’Amico M, Mejias M, Garcia-Pras E, Abraldes JG, Garcia-Pagan JC, Fernandez M, Bosch J (2012) Effects of the combined administration of propranolol plus sorafenib on portal hypertension in cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(10):G1191–G1198.
- [136] McLean EK, McLean AEM, Sutton PM (1969) Instant Cirrhosis: An improved Method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J exp Path* 50(5):502–506.
- [137] Lopez-Novoa JM, Rengel MA, Rodicio JL, Hernando L (1977) A micropuncture study of salt and water retention in experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 232(4):F315–F318.
- [138] Montosi G, Garuti C, Iannone A, Pietrangelo A (1998) Spatial and Temporal Dynamics of hepatic Stellate Cell Activation during Oxidant-Stress-Induced Fibrogenesis. *Am J Pathol* 152(5):1319–1326.
- [139] Perez Tamayo R (1983) Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 3(1):112–120.
- [140] Minicis Sd, 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.
- [141] Cai SP, Cheng XY, Chen PJ, Pan XY, Xu T, Huang C, Meng XM, Li J (2016) Transmembrane protein 88 attenuates liver fibrosis by promoting apoptosis and reversion of activated hepatic stellate cells. *Mol Immunol* 80:58–67.
- [142] Aprigliano I, Dudas J, Ramadori G, Saile B (2008) Atorvastatin induces apoptosis by a caspase-9-dependent pathway: an in vitro study on activated rat hepatic stellate cells. *Liver Int* 28(4):546–557.
- [143] Harvey SAK, Dangi A, Tandon A, Gandhi CR (2013) The transcriptomic response of rat hepatic stellate cells to endotoxin: implications for hepatic inflammation and immune regulation. *PloS one* 8(12):e82159.
- [144] Jiroutová A, Majdiaková L, Cermáková M, Köhlerová R, Kanta J (2005) Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic rat liver. *Acta medica* 48(3-4):137–144.
- [145] Leeuw AMD, Mccarthy SP, Geerts A, Knook DL (1984) Purified Rat Liver Fat-Storing Cells in Culture Divide and Contain Collagen. *Hepatology* 4(3):392–403.

Thesen

1. Die Entwicklung der Leberzirrhose geht mit einer Aktivierung der hepatischen Sternzellen (HSC) einher, die morphologische Veränderungen nach sich zieht und die Zelle in eine Myofibroblasten-ähnliche Zelle umwandelt.
2. Die Proteinexpression nicht-zirrhotischer und die aktivierter, zirrhotischer HSC unterscheidet sich, was z.B. an der VEGF-Pathway-Aktivierung im Rahmen der Zirrhoseentwicklung ersichtlich wird.
3. Die Expression von ERK, pERK, VEGF, VEGF-R2, sowie von eNOS der nicht behandelten HSC aus der früher und der fortgeschrittenen Zirrhose unterscheidet sich nicht.
4. Die 24-stündige in vitro Behandlung isolierter HSC (der nicht-zirrhotischen, der frühen und der fortgeschritten zirrhotischen Leber) mit Sorafenib, führt zu messbaren Veränderungen der Proteinexpression von VEGF, VEGF-R2 und eNOS.
5. Die Wirkung von Sorafenib auf die HSC ist vom bestehenden Zirrhosestadium abhängig.
6. Im Stadium der frühen Leberzirrhose wird durch Sorafenib die Expression der eNOS in den HSC gesteigert und die VEGF-R2-Expression reduziert.
7. Im Stadium der fortgeschrittenen Leberzirrhose hat die Sorafenibbehandlung der HSC keinen Einfluss auf die Expression der eNOS, jedoch kommt es zu einer reduzierten VEGF-Expression, die auf eine Hemmung der Angiogenese hindeuten könnte.
8. Die Behandlung mit Sorafenib zur Reduktion des intrahepatischen Gefäßwiderstandes im frühen Stadium der Leberzirrhose stellt eine mögliche Therapieoption dar.

Anlage

Tabellen

Tabelle 26: Geräte

Gerät	Fabrikat	Firma, Ort, Land
Brutschrank	Hera Cell 150	Thermo, Bonn, Deutschland
Mikroskopkamera	CAMEDIA C4040-ZOOM	OLYMPUS, Hamburg, Deutschland
Chemilumineszenzsystem	Fusion FX	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
Kältethermostat	ecoline RE 104	LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einschweißgeräte	Folio Art. FS 3602	SEVERIN GmbH, Sundern, Deutschland
Feinwaage	CPA 224S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Entwicklerautomat	Hyperprocessor	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Mikroplattenleser	iMARK Microplate Reader	BioRad, München, Deutschland
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge	Rotina 380 R	Hettich, Bech, Schweiz
Magnetrührgerät	MR 3001 K	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	OLYMPUS CK40-F200	OLYMPUS, Hamburg, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini Protean Tetra Cell	BioRad, München, Deutschland
Mini-Zentrifuge	MC6-Centrifuge	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Peristaltikpumpe	MCP	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
pH-Meter	inoLab pH Level 2	WTW, Weilheim, Deutschland

Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	INTEGRA GmbH, Fernwald, Deutschland
Spannungsgeber	Powerpac HC	BioRad, München, Deutschland
Sterilwerkbank	Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Spannungsgeber	EPS 2A200	Hofer, Holliston, MA, USA
Blot-Kammer	TE22 Mighty Small Transphor	Hofer, Holliston, MA, USA
Thermoschüttler	ThermoCell Mixing Block	BIOER Technology, Hangzhou, China
Waage	CPA 2202S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	WB 7	memmert, Schwabach, Deutschland

Tabelle 28: Chemikalien

Chemikalie	Firma, Ort, Land
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	peqlab, Erlangen, Deutschland
Amoniumperoxidisulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau-Na-Salz	MERCK, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂ xH ₂ O	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Carbon Tetrachlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D-Glucose	MERCK, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNase I	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
DTT	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (Eisessig)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
H ₂ O ₂	Universitätsapotheker, Halle, Deutschland
Heparin	Rotex Medica, Trittau, Deutschland
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
KCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase A	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MgCl ₂	MERCK, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MgSO ₄	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Milchpulver	TSI, Zeven, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaHCO ₂	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Narcoren	MERIAL GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Na ₃ VO ₄	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Parahydroxycumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phenobarbital	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail tablets	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
PMFS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutsch- land
Polyacrylamid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidel- berg, Deutschland
Ponceau S	MERCK, Darmstadt, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutsch- land
Sorafenib	BAYER AG, Leverkusen, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutsch- land
TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutsch- land
Triton X-100	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutsch- land

Tabelle 30: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma, Ort, Land
3MM-Papier	Whatman, Dassel, Deutschland
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fäden 3/0 Polyester-S grün	Catgut GmbH, Markneukirchen, Deutschland
Falcon Cell Strainer 100 µl Nylon	BD, Heidelberg, Deutschland
Falcon Tubes (15 und 50 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
Venenverweilkanüle Optiva 2 22G	Smith Medical International, Rosendale, GB
Frischhaltefolie	Sarogold, Rorschacherberg, Schweiz
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Mullkompressen steril	Fuhrmann, Much, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PVDF-Membran Immobilion P	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
serologische Pipetten steril (5 und 10ml)	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
serologische Pipetten unsteril (5 und 10ml)	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturtestplatten (6 und 96-Wells)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen (10cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Deutschland

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 10.07.2018

Franziska Kriesche

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Halle (Saale), den 10.07.2018

Franziska Kriesche

Lebenslauf

Schulbildung

09/1996 - 07/2000	Grundschule Friedeburg
08/2000 - 07/2002	Sekundarschule Gerbstedt
08/2002 - 06/2008	Markt-Gymnasium Hettstedt

Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

10/2008 - 11/2014	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Studium der Humanmedizin Abschluss: Staatsexamen
11/2014 - 04/2015	Immatrikulation als Promotionsstudentin

Berufstätigkeit

05/2015 - aktuell	AMEOS Klinikum Halberstadt Assistenzärztin für HNO-Heilkunde
-------------------	--

Danksagung

Herrn apl. Prof. Dr. med. Alexander Zipprich, als meinem Betreuer und Doktorvater, möchte ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes ganz herzlich danken. Darüber hinaus möchte ich mich für jegliche sachkundige und wertvolle Unterstützung bedanken. Seine wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen.

Bei den Mitarbeitern des Labors für molekulare Hepatologie der Inneren Klinik I, insbesondere bei Frau Pohl und bei Frau Thonig, möchte ich mich rechtherzlich für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Durch ihr Engagement haben sie den experimentellen Teil der Arbeit entscheidend mitgestaltet.

Meinem Ehemann André Kriesche danke ich von ganzem Herzen für die anregenden Diskussionen, sowie für die intensive moralische Unterstützung und die aufmunternden Gespräche, die letztendlich die Fertigstellung der Arbeit ermöglicht haben. Danke für deine Geduld auch während der anstrengenden Phasen.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich während der gesamten Zeit mit allen erdenklichen Mitteln unterstützt haben. Danke für euren Zuspruch und die hilfreichen Ratschläge.