CD95 Ligand-induzierte Proliferation und Apoptose in hepatischen Sternzellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Annika Sommerfeld aus Herne

Düsseldorf 2008

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. D. Häussinger

Koreferent: Prof. Prof. h.c. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung				
	1.1.	Leberfibrose	1		
	1.2.	Cholestase	2		
	1.3.	Die hepatische Sternzelle	3		
	1.4.	Transformation hepatischer Sternzellen	5		
	1.5.	Physiologie der Apoptose	6		
	1.6.	Charakterisierung des CD95-Rezeptors (CD95)	7		
	1.7.	Der CD95/CD95L-Signalweg	8		
	1.8.	Epidermal growth factor receptor (EGFR)	9		
	1.9.	Gallensäuren	11		
	1.10.	Apoptose von hepatischen Sternzellen	12		
	1.11.	Fragestellung und Zielsetzung	15		
2.	Mater	ial und Methoden	16		
	2.1.	Zellpräparationen	16		
	2.	1.1. Isolierung und Kultivierung hepatischer Sternzellen der Leber	16		
	2.1.2. Isolierung und Kultivierung von Leberparenchymzellen				
	2.1.3. Medien und Lösungen in der Zellkultur				
	2.2.	Proteinanalytische Methoden	18		
	2.	2.1. Aufarbeitung der Zellen	18		
	2.	2.2. Proteinmengenbestimmung	18		
	2.	2.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18		
	2.	2.4. Protein-Transfer	18		
	2.	2.5. Western Blot-Hybridisierung und Detektion	19		
	2.	2.6. Immunpräzipitation	19		
2.2.7. Antikörper und Lösungen 2.3. Molekularbiologische Metho		2.7. Antikörper und Lösungen zur Proteinanalytik	20		
		Molekularbiologische Methoden	23		
	2.	3.1. Nachweis der mRNA-Expression mittels RT-PCR	23		
	2.5	3.2. Primer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	23		
	2.4.	Immunzytochemische Methoden	24		
	2.	4.1. Färbeprotokoll	24		
	2.	4.2. Antikörper und Lösungen für die Immunzytochemie	25		

	2.5.	.5. Proliferationstest mittels BrdU-ELISA		
	2.6.	Apoptosequantifizierung mittels TUNEL-Markierung		
	2.7.	EGF-ELISA	26	
	2.8.	Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels CM-H ₂ DCFDA	27	
	2.9.	Statistische Methoden	27	
	2.10.	Inhibitoren	28	
	2.11.	Reagenzien	28	
3.	Ergeb	nisse	30	
	3.1.	CD95 Ligand-abhängige Signaltransduktion	30	
	3.	1.1. Charakterisierung hepatischer Sternzellen (HSZ)	30	
	3.	1.2. CD95L-induzierte Aktivierung des EGFR in ruhenden HSZ	31	
	3.	1.3. Mechanismus der EGFR-Aktivierung durch CD95L in		
		ruhenden HSZ	34	
	3.	1.4. CD95L stimuliert die Proliferation von ruhenden HSZ	38	
	3.	1.5. Todesrezeptor-Ligand-induzierte CD95-Tyrosinnitrierung		
		in ruhenden HSZ	41	
	3.	1.6. Mechanismus der CD95-induzierten CD95-Tyrosinnitrierung	44	
	3.	1.7. Cycloheximid sensibilisiert aktivierte, nicht jedoch ruhende		
		HSZ, gegenüber der CD95L-induzierten Apoptose	48	
	3.2.	CD95 Ligand-unabhängige Signaltransduktion	51	
	3.	2.1. Gallensalz-induzierte Phosphorylierung des EGFR in		
		ruhenden HSZ	51	
	3.	2.2. Die Gallensalz-induzierte Bildung von reaktiven		
		Sauerstoffspezies (ROS) führt zu einer		
		Yes-vermittelten Phosphorylierung des EGFR in ruhenden HSZ	54	
	3.	2.3. Gallensalze stimulieren die Proliferation von HSZ	57	
	3.	2.4. Cycloheximid sensibilisiert ruhende HSZ gegenüber der		
		Gallensalz-induzierten Apoptose	60	
4.	Disku	ssion	64	
	4.1.	CD95L-induzierte EGFR-Aktivierung in hepatischen Sternzellen	64	
	4.2.	CD95L als mitogenes, anti-apoptotisches Signal ist in ruhenden HSZ	65	

4.3. Mechanismen der CD95L-induzierten CD95-Tyrosinnitrierung 68

	4.4. Gallensalz-induzierte EGFR-Phosphorylierung in ruhenden HSZ					
	4.5. Gallensalze als proliferatives Signal in ruhenden HSZ					
	4.6. Cycloheximid sensibilisiert ruhende HSZ gegenüber der					
		Gallensalz-induzierten CD95-Aktivierung und Apoptose	71			
	4.7.	JNK-Aktivierung als entscheidender Auslöser für die Apoptose	71			
_	_	_				
5.	Zusa	mmenfassung	74			
6.	Abstract					
	Literaturverzeichnis					
7.	Litera	aturverzeichnis	78			
7. 8.	Litera Abkü	aturverzeichnis Irzungsverzeichnis	78 90			
7. 8.	Litera Abkü Publi	aturverzeichnis Irzungsverzeichnis Kationen/Posterbeiträge	78 90			
7. 8.	Litera Abkü Publi	aturverzeichnis Irzungsverzeichnis kationen/Posterbeiträge	78 90 93			
7. 8.	Litera Abkü Publii Lebe	aturverzeichnis Irzungsverzeichnis kationen/Posterbeiträge nslauf	78 90 93 94			
7. 8.	Litera Abkü Publii Lebe Dank	aturverzeichnis I rzungsverzeichnis kationen/Posterbeiträge nslauf sagung	78 90 93 94 95			

1. Einleitung

Die Leber ist aufgrund ihrer zentralen Rolle im Metabolismus, des gerichteten Transports vom Blut in die Galle und ihrer komplexen Struktur, zu einem Musterbeispiel für zellbiologische-, metabolische- und Transportstudien geworden. Sie ist ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems, besitzt eine zweifache Blutzufuhr und spielt eine entscheidende Rolle bei der Homöostase.

Die regenerative Kapazität der Leber erlaubt funktionell eine vollständige Wiederherstellung nach akuten Läsionen. Chronische Schäden dagegen heilen nicht so effektiv und die Fibrose ist die am häufigsten auftretende Komplikation vieler Lebererkrankungen. Das Endstadium ist die Leberzirrhose, an der jährlich etwa 800.000 Menschen sterben (WHO, 2007). Daher fällt der Erforschung der Ursachen und Pathogenese von Lebererkrankungen eine wichtige Rolle zu.

1.1. Leberfibrose

Die hepatische Fibrose tritt als pathophysiologische Konsequenz einer chronischen Leberschädigung auf. Bekanntermaßen ist die Fibrose Teil eines dynamischen Prozesses bei dem die extrazelluläre Matrix kontinuierlich umverteilt wird. Dies führt zu einer überhöhten Akkumulation verschiedener extrazellulärer Proteine, Proteoglycane und Kohlenhydrate (Bataller & Brenner, 2005). Obwohl der Prozess bisher nicht vollständig aufgeklärt wurde, konnte gezeigt werden, dass hepatische Sternzellen, ungeachtet der zugrundeliegenden Ätiologie, eine bedeutende Rolle bei der hepatischen Fibrogenese spielen (Friedman et al., 1985 und 1989; Gressner & Bachem, 1990).

Die Identifikation der unterschiedlichen fibrogenen Zellpopulationen und die Charakterisierung der Regulationsmechanismen des Matrixmetabolismus sind Voraussetzung für gezielte therapeutische Ansätze. Diese zielen darauf ab, Inflammation und Synthese der extrazellulären Matrix zu hemmen, indem die Aktivierung zu einem myofibroblastischen Phänotyp inhibiert bzw. Apoptose induziert und die Degradation der extrazellulären Matrix erhöht wird.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass es im Laufe der Fibrose zu einer Zunahme der Expression von TIMP (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*) kommt, wohingegen die Expression der Matrixmetalloproteinasen (MMP) nur sehr langsam ansteigt bzw. stagniert (Iredale et al., 1996). Eine Ausnahme ist die MMP2, deren Expression während der Fibrogenese stark ansteigt und beim Abbau von

extrazellulärer Matrix eine Rolle spielt (Benyon & Arthur, 2001). TIMP-1 inhibiert die Entwicklung einer Fibrose im Tiermodell, wobei wahrscheinlich eine gehemmte Transformation von hepatischen Sternzellen und die Aktivität der MMP2 eine bedeutende Rolle spielt (Parsons et al., 2004).

Auch die selektive Induktion von Apoptose mit Hilfe des Todesliganden TRAIL (*Tumor-necrosis factor related apoptosis inducing ligand*), wurde als anti-fibrotische Behandlung diskutiert (Taimr et al., 2003).

Wright et al. konnten zeigen, dass die pharmakologische Induktion von Apoptose hepatischer Sternzellen *in vivo*, eine verkürzte Regeneration der Leberfibrose zur Folge hatte (Wright et al., 2001).

Diese und weitere Befunde führten in den letzten Jahren, hinsichtlich der Behandlung der Leberfibrose, zu einem verstärkten Interesse an der Regulation der Apoptose hepatischer Sternzellen.

1.2. Cholestase

Viele Störungen des hepatobiliären Transports resultieren in der Cholestase, einer Beeinträchtigung des Gallenflusses und Exkretion von Gallenbestandteilen. Persistiert die Cholestase über einige Monate, so kommt es zur portalen Hypertonie, Abnahme der Leberfunktion und zur biliären Fibrose, die in einer sekundären biliären Zirrhose münden kann.

Die Cholestase kann extra- oder intrahepatisch ausgelöst werden. Die extrahepatische Cholestase wird durch Blockade des Gallengangsystems hervorgerufen, wohingegen die intrahepatische Cholestase durch eine gestörte Gallensalzsekretion der Hepatozyten verursacht wird.

Ein Kennzeichen der chronisch cholestatischen Lebererkrankung ist die Aktivierung und Proliferation hepatischer Sternzellen. Einige Gallensäuren, wie die Glycochenodesoxycholsäure (GCDC) können Apoptose von Hepatozyten und Cholangiozyten auslösen (Jones et al., 1997). Dagegen deuten mehrere Studien an, dass hepatische Sternzellen resistent gegenüber Gallensalz-induzierter Apoptose sind (Yoon et al., 2002; Svegliati-Baroni et al., 2005; Kim et al., 2006).

2

1.3. Die hepatische Sternzelle

Hepatische Sternzellen (HSZ), auch bekannt als Ito-Zellen, Fett-speichernde Zellen oder perisinusoidale Lipozyten, bilden 5-8% aller Leberzellen und 1,4% des Lebergewichts. Umgeben von den Endothelzellen der Leber, liegen die HSZ im perisinusoidalen Disse`schen Raum (Geerts et al., 2001).



Abbildung 1.1.: Organisation von Leberzellen

Die hepatischen Sternzellen der Leber liegen im Disse`schen Raum, zwischen den Endothel- und Parenchymzellen. Die Kupfferzellen gehören zum retikuloendothelialen System und adhärieren an die Wand der Sinusoide. Modifiziert nach Keitel.

Die Sternzellen der Leber wurden erstmals im Jahr 1876 von Carl Kupffer beschrieben (Kupffer, 1876). Während seiner Studien des hepatischen Nervensystems, entdeckte Kupffer intralobuläre sternförmige Zellen, die er mit einer Gold-Chlorid-Methode anfärben konnte. Da Kupffer diese perisinusoidalen sternförmigen Zellen als bestimmte Form einer phagozytotischen Endothelzelle beschrieb, wurden sie erneut im Jahr 1952 von Ito und Menoto als unabhängige nicht-phagozytierende Zellpopulation mit einzigartigen zytomorphologischen Charakteristika entdeckt (Ito & Nemoto, 1952). Erst 1971 folgerte Kenjiro Wake, dass es sich bei diesen beiden Zelltypen um ein und dieselbe Zellart handelte (Wake, 1971).

Das auffallendste strukturelle Merkmal der HSZ sind die Lipidtröpfchen im Zytoplasma, die Retinoide, Triglyzeride, Cholesterin, und freie Fettsäuren enthalten (Voget et al., 1999). Über 85% des gesamten Vitamin A-Gehalts im Körper lagert in der Leber und 90% der Retinoide der Leber werden in den Lipidtröpfchen der HSZ gespeichert (Hendriks et al., 1985). Unter physiologischen Bedingungen haben die Lipidtröpfchen einen Durchmesser von 8 µm und tragen so zu fast 21% des

gesamten HSZ-Volumen bei (Sztark et al., 1986). Struktur, Durchmesser und Anzahl der Lipidtröpfchen sind abhängig von der Spezies und der Vitamin A-Aufnahme.

Durch die starke Expression verschiedener Mikrofilamentbündeln, einschließlich Aktin und Intermediärfilamenten. können HSZ mittels spezifischer Zytoskelettmarker identifiziert werden (Geerts et al., 1990). Hauptsächlich wird die Expression von *alpha smooth muscle actin* (αSMA)-Fasern (Ramadori et al., 1990) und intermediären Filamenten wie Desmin (Yokoi et al., 1984) und Vimentin (De Leeuw et al., 1984) zur immunzytochemischen Analyse genutzt. Interessanterweise exprimieren HSZ eine Reihe von Proteinen neuronaler Herkunft, wie z.B. glial fibrillary acidic protein (GFAP, Gard et al., 1985), nerve growth factor (NGF, Cassiman 2001) Synaptophysin (Cassiman et al., 2001), RhoN (Nishi et al., 1999), Glutaminsynthetase (Bode et al., 1998) und den peripheren Benzodiazepinrezeptor (PBR, Fischer et al., 2001). Des Weiteren werden HSZ in der Rattenleber stark innerviert (Shibazaki et al., 1996).

Es gibt Hinweise, dass HSZ vom hämatopoietischen System abstammen, da sie Merkmale von Progenitor-/Stammzellen aufweisen, sowie Elemente des kanonischen Wnt-Signalwegs exprimieren. Darüber hinaus transformieren sie nicht nur zu Myofibroblasten-artigen Zellen, sondern können auch zu Hepatozyten- und Endothelzell-artigen Zellen (Kordes et al., 2007 und 2008). Des Weiteren bilden HSZ tubuläre Strukturen, die in ähnlicher Weise während der Leberregeneration auftreten (sog. duktuläre Reaktionen) (Kordes et al., 2007). Dies legt den Schluss nahe, dass HSZ ein bislang unerkanntes Stamm-/Progenitorzellkompartiment der Leber, mit wesentlicher Funktion bei der Leberregeneration, darstellen.

1.4. Transformation hepatischer Sternzellen

HSZ weisen zwei Phänotypen auf: Einen sogenannten ruhenden Phänotyp, in der normalen Leber oder während der ersten 48 h nach Isolation in Kultur und den sogenannten aktivierten Phänotyp, welcher während einer Leberentzündung und Fibrose oder bei HSZ auftritt, die länger als 4 Tage auf einer unphysiologischen Oberfläche wie Glas oder Plastik kultiviert wurden (Abbildung 1.2.).



Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der pathologischen Vorgänge in der Leber auf Zellebene

(A) Gesunde Leber: Ruhende hepatische Sternzellen (HSZ) enthalten Vitamin A-Tröpfchen. Die niedrige Dichte der Matrix erlaubt eine normale Leberfunktion.
(B) Fibrose: HSZ differenzieren zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen, proliferieren, produzieren Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) und verlieren Lipidtröpfchen.
Modifiziert nach Bataller, R. and D.A. Brenner, Liver fibrosis. The Journal of Clinical Investigation, 2005. 115(2): p. 209-218.

Der ruhende Phänotyp ist charakterisiert durch eine hohe Zahl an Lipidtröpfchen (Friedman et al., 1985), eine geringe Proliferationsrate, die Expression von GFAP und das Fehlen von αSMA (Friedman et al., 1993). Im Vergleich dazu wird der Myofibroblasten-ähnliche aktivierte Zelltyp durch den Verlust von Lipidtröpfchen

(Friedman et al., 1985), eine verstärkte Zellproliferation, die Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix, den Mangel an GFAP und die Expression von αSMA charakterisiert (Friedman et al., 1993).

Aktivierte HSZ sind kontraktil und tragen so zur Erhöhung des Portaldrucks bei der Leberfibrose bei (Rockey et al., 1992). Sie exprimieren sowohl Endothelin-A-, als auch Endothelin-B-Rezeptoren und werden als Hauptquelle der hepatischen Endothelin-1-Sekretion in der zirrhotischen Leber angesehen. Endothelin-1 bewirkt an aktivierten HSZ deren Kontraktion und trägt somit zum erhöhten sinusoidalen Widerstand in der zirrhotischen Leber bei (Housset et al., 1993; Pinzani et al., 1996; Reinehr et al., 1998).

HSZ weisen in frühen Kulturen ein migratorisches Potential auf, das durch den *platelet derived growth factor* (PDGF) oder die Anwesenheit von Kupfferzellen induziert wird (Ikeda et al., 1999). Außerdem exprimieren HSZ den *hepatocyte growth factor* (HGF), TGF β (*transforming growth factor* β), *Insulin-like growth factor 1* (IGF 1) und andere Zytokine, um mit anderen benachbarten Zellen zu kommunizieren. HGF ist mitogen und stimuliert die Proliferation von Hepatozyten (Matsumoto & Nakamura, 1996). Der IGF 1 wird von beiden, parenchymalen- und nicht-parenchymalen Zellen synthetisiert und reguliert die HGF-Sekretion von HSZ. Zusätzlich sezernieren HSZ Komponenten des Plasminogen-Aktivierungs-Systems, wie das Urokinase-Typ-I-Plasminogen oder den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor I (Leyland et al., 1996) und steuern so zur Blutgerinnung und Wundheilung in der Leber bei.

1.5. Physiologie der Apoptose

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und umschreibt das Herabfallen der Blätter im Herbst. In der modernen Biologie dagegen steht der Begriff Apoptose für den programmierten Zelltod.

Die Apoptose ist für die Aufrechterhaltung der Leberfunktion essentiell, da sie die effiziente Entfernung überschüssiger oder beschädigter Zellen in einer kontrollierten Art und Weise gewährleistet. Gekennzeichnet ist die Apoptose durch bestimmte Veränderungen der Zellen, wie die Chromatin-Kondensation, die DNS-Fragmentierung und die Zellschrumpfung mit Ausbildung von membranumschlossenen Vesikeln, den so genannten *apoptotic bodies*. Die Bindung von Liganden an Rezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie resultiert in der Initiation des extrinsischen Signalwegs (Typ I), einem der zwei Signalwege der Apoptose (Ashkenazi & Dixit, 1999; Locksley et al., 2002). Verschiedene Stimuli wie DNS-Schädigung und der Entzug von Wachstumsfaktoren lösen den intrinsischen Signalweg (Typ II) über Aktivierung pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie von Proteinen (z.B. Bax, Bak) aus, die eine mitochondriale Dysfunktion vermitteln (Green & Reed, 1998). Beide Mechanismen führen zur Aktivierung bestimmter Enzyme, den zellulären Cystein-Aspartat-Proteasen (Caspasen) und den Endonukleasen. Sie spalten Zellstrukturproteine und leiten die DNS-Kondensation und damit die Fragmentierung des Zellkerns ein.

1.6. Charakterisierung des CD95-Rezeptors (CD95)

Rezeptoren der TNF-Superfamilie, sind in der Lage eine apoptotische Signalkaskade nach Bindung ihrer Liganden oder spezifischen Antikörpern zu initiieren (Ashkenazi et al., 1999; Locksley et al., 2001). Bis heute wurden 29 Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie identifiziert. Zu den bekanntesten zählen der CD95-Rezeptor (Fas oder Apo1), der TNF α - und die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2, die sich durch die sogenannte Todesdomäne (*death domain*, DD) auszeichnen. Die Todesdomäne ist eine stark homologe Region innerhalb der extrazellulären Domäne, bestehend aus 1-5 Cystein-reichen Wiederholungen und einer 60-80 Aminosäuren großen zytoplasmatischen Sequenz, die für die Initiierung des Todessignals notwendig ist.

Die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie sind Typ I-Transmembranproteine mit einem C-terminalen intrazellulären Teil, einer membrandurchspannenden Region und einer extrazellulären N-terminalen Domäne (Abbildung 1.3.). Durch Interaktion mit der N-terminalen Domäne bindet der Rezeptor seine sogenannten Todesliganden, bei denen es sich hauptsächlich um Typ II-Transmembranproteine der TNF-Familie handelt.

Zytokine aus der TNF-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Leberregeneration, sind aber auch an der Apoptose von Leberzellen beteiligt (Gaur & Aggarwal, 2003).

In unstimulierten Hepatozyten wird CD95 nur in geringen Mengen in der Plasmamembran exprimiert (Bennett et al., 1998; Reinehr et al., 2002; Graf et al., 2002), wohingegen der größte Teil im Zytosol, besonders im Golgi-Komplex und im Trans-Golgi-Netzwerk exprimiert wird (Bennett et al., 1998). Nach einem proapoptotischen Stimulus translozieren CD95-Vesikel zur Zelloberfläche, erhöhen so die CD95-Expression in der Plasmamembran und initiieren das apoptotische Signal (Bennett et al., 1998; Sodeman et al., 2000; Reinehr et al., 2002).



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des CD95 *death inducing signaling complex* (DISC)

Nach Bindung des CD95L interagiert die *death domain* (DD) des Adapterproteins FADD mit der DD des CD95, während die *death effector domain* (DED) die entsprechende Pro-Domäne der Initiatorcaspase-8 und/oder-10 bindet.

1.7. Der CD95/CD95L-Signalweg

Die Bindung von agonistischen Antikörpern oder CD95L führt zu einer Trimerisierung des CD95-Rezeptors, gefolgt von der Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (Fas-associated death domain), einem zytosolischen Protein mit einer C-terminalen Todesdomäne und einer Todeseffektordomäne am N-Terminus (Wallach et al., 1999). FADD assoziiert durch Interaktion der Todesdomänen mit CD95, während die Todeseffektordomäne an die entsprechende Domäne der inaktiven Initiatorcaspasen Pro-Caspase-8 oder -10 bindet. Der so gebildete Komplex wird als death inducing signaling complex (DISC) bezeichnet. Die Anlagerung und Akkumulation der Pro-Caspase-8 und/oder -10 resultiert durch autoproteolytische Spaltung in einer spontanen Aktivierung der

Caspase und Initiation der proteolytischen Kaskade (Abbildung 1.3.). Die Aktivierung der Effektorcaspasen, wie die Caspase-3, -6 und -7 kann auf zwei verschiedenen Signalwegen erfolgen (Scaffidi et al., 1998; Faubion & Gores, 1999). In Typ I-Zellen, z.B. Lymphozyten werden große Mengen an Caspase-8 am DISC aktiviert, welche dann direkt, unter Umgehung der Mitochondrien, die Effektor-Caspase-3 spaltet und damit aktiviert. In Typ II-Zellen, z.B. Hepatozyten, dagegen spaltet die Caspase-8 das Protein Bid, wobei das trunkierte Bid (tBid) zu den Mitochondrien transloziert und dort zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und zur Cytochrom c-Freisetzung führt. Diese Cytochrom c-Freisetzung hat dann die Aktivierung von Effektor-Caspasen, wie Caspase-9 und schließlich die Aktivierung der Caspase-3 zur Folge (Malhi et al., 2006).

1.8. Epidermal growth factor receptor (EGFR)

Die Rezeptoren der meisten Wachstumsfaktoren sind Transmembranproteine, die eine Tyrosin-spezifische Proteinkinase-Aktivität aufweisen (Schlessinger & Ullrich 1992).

Der *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) gehört zur Familie der ErbB-Transmembranrezeptoren, einer Unterfamilie von 4 eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her-3 (ErbB-3) und Her4 (ErbB-4). Er besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, der konservierten intrazellulären Tyrosinkinase-Aktivität und einer Transmembranregion mit einer hydrophoben Ankersequenz (Abbildung 1.4.) (Schlessinger, 2002).



Abbildung 1.4.: Schematischer Aufbau des EGFR

Der EGFR besteht aus jeweils einer transmembranen und einer intrazytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne. Wichtige Tyrosinreste des EGFR sind: Y845 (Src-Kinasen Zielstruktur), Y1045 (Cbl-Bindungsstelle (Internalisierungssignal)) und Y1173 (EGFR-Autophosphorylierung (EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität)).

Die Bindung eines spezifischen Liganden, wie dem *epidermal growth factor* (EGF) an den EGFR induziert innerhalb des Rezeptors Konformationsänderungen, welche die katalytische Aktivität der intrinsischen Tyrosinkinase erhöhen. Der EGFR kann homodimerisieren oder bildet mit anderen Mitgliedern der Rezeptorfamilie Heterodimere. Die Dimerisierung resultiert in der Autophosphorylierung der spezifischen Tyrosinreste (1173, 1148, 1086, 1068 und 992) im C-terminalen Ende der intrazellulären Region des EGFR. Diese Autophosphorylierung löst dann eine nachgeschaltete Aktivierung und Signaltransduktion durch andere Proteine aus, die mit den phosphorylierten Tyrosinresten über ihre Phosphotyrosin-bindenden *src homology* (SH2)-Domänen assoziieren. Diese Signalproteine initiieren dann weitere Signaltransduktionselemente, wie den MAPK-Signalweg, und resultieren in DNS-Synthese und Zellproliferation (Voldborg et al., 1997; Wells, 1999).

1.9. Gallensäuren

Die Gallenflüssigkeit ist ein Sekretionsprodukt der Leber, zu dessen Funktionen vor allem die Fettemulgierung durch Micellenbildung und die Eliminierung bestimmter körpereigener oder exogener Substanzen gehört.

Gallensäuren gehören zur Stoffklasse der Steroide und werden in den Leberparenchymzellen synthetisiert. Aus dem Substrat Cholesterin entstehen die primären Gallensäuren Chenodesoxycholsäure und Cholsäure. Vor Exkretion in die Galle werden unkonjugierte Derivate an der Carboxylgruppe der Seitenkette über eine Amidbindung mit Glycin oder Taurin konjugiert, wodurch die Fähigkeit zur Micellenbildung erhöht wird. Im Gegensatz zu den unkonjugierten Gallensäuren, die im Colon durch passiven Transport wieder aufgenommen werden, werden über 95% der konjugierten Gallensäuren im terminalen Ileum über passive und aktive Mechanismen wieder rückresorbiert.

Hydrophobe Gallensäuren können in der Leber sowohl nekrotischen als auch apoptotischen Zelltod auslösen (Schmucker et al., 1990). Eine langfristige Exposition gegenüber erhöhten Konzentrationen von hydrophoben Gallensäuren, wie sie bei cholestatischen Leberkrankheiten auftreten, kann eine irreversible Schädigung und den zirrhotischen Umbau der Leber nach sich ziehen. Hierbei wird der Apoptose als wesentlicher Mechanismus des Zelluntergangs eine bedeutende Rolle zugesprochen (Patel et al., 1998).

Zahlreiche *in vitro*-Untersuchungen haben bislang gezeigt, dass hydrophobe Gallensalze wie Taurolithocholat-3-Sulfat (TLCS), Taurochenodesoxycholat (TCDC) oder Glycochendesoxycholat (GCDC) in Hepatozyten Apoptose auslösen können (Rodriguez et al., 1999; Graf et al., 2002; Yoon & Gores 2002; Reinehr et al., 2003a). Dieser Mechanismus erfolgt sowohl CD95- (Faubion et al., 1999; Reinehr et al., 2003a) als auch TRAIL-vermittelt (Higuchi & Gores, 2003). Das Gallensalz Taurocholat (TC) hat dagegen keinen Einfluss auf die hepatozelluläre Apoptose (Chieco et al., 1997, Miyoshi et al., 1999; Reinehr et al., 2003a). Das therapeutisch verwendete Gallensalz Ursodesoxycholat (UDCA), welches mit Taurin zu Tauroursodesoxycholat (TUDC) konjugiert, hat anti-apoptotische Eigenschaften (Rodriguez et al., 1998, Benz et al., 2000; Kurz et al., 2000; Reinehr et al., 2003a).

Bisher ist nicht viel über die Wirkung von Gallensalzen auf HSZ bekannt. Im Vergleich zu ihren Effekten auf Hepatozyten, aktivieren Gallensalze in HSZ

wahrscheinlich über den Erk- und PKC-Signalweg den EGFR und bewirken somit die Proliferation von HSZ (Svegliati-Baroni et al., 2005).

1.10. Apoptose von hepatischen Sternzellen

Hinsichtlich ihrer bedeutenden Rolle während hepatischen der Wundheilungsantwort, sind HSZ zu einem vielversprechenden Angriffsziel antifibrotischer Therapien geworden. Während der frühen Fibrose und nach dem Entzug schädigender Agenzien verfügt die Leber über ein hohes Regenerationspotential. Es ist bis heute aber nicht vollständig aufgeklärt, ob die Redifferenzierung vom aktivierten in den ruhenden Zustand der HSZ während der hepatischen Wundheilung verläuft. Wahrscheinlich spielt der apoptotische Zelltod eine wichtige Rolle. Die Apoptose von HSZ scheint mit einer verringerten Expression von TIMP assoziiert zu sein. Daraus resultiert eine erhöhte Kollagenaseaktivität und die Resorption extrazellulärer Matrix (Iredale et al., 1998). Des Weiteren wurde beschrieben, dass Liganden des PBR (Fischer et al., 2001), Gliotoxin (Wright et al., 2001), Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten (Siegmund et al., 2007) und Rapamycin (Elsharkawy et al., 2005) potente Auslöser der Apoptose in aktivierten HSZ sind. Zusätzlich können Lipopolysaccharid (LPS)-behandelte Kupfferzellen bei einer Ko-Kultivierung eine TRAIL- und Caspase-9-abhängige Apoptose aktivierter HSZ auslösen (Fischer et al., 2002). Eine Apoptose-Induktion in ruhenden HSZ dagegen wurde noch nicht beschrieben.

Aus verschiedenen Publikationen ist bekannt, dass ruhende und aktivierte HSZ den CD95-Rezeptor, sowie CD95L exprimieren (Gressner et al., 1998; Gong et al., 1998; Cariers et al., 2002). Die CD95L-vermittelte Apoptose findet parallel mit der Aktivierung der HSZ statt. In Kultur-transformierten HSZ tritt die CD95L-vermittelte Apoptose nur in Anwesenheit von Cycloheximid (CHX) ein (Sato et al., 1995). Cycloheximid ist ein fungizides Antibiotikum, das als Translationshemmer wirkt (Bennett et al., 1965). Die Transformation von HSZ zu MFB erhöht die Sensitivität gegenüber der CD95L-vermittelten Apoptose, und führt zu einem starken Verlust der Bcl-2 und Bcl-X_I-Expression (Fischer et al., 2002). Das Verhältnis antiapoptotischer (Bcl-2, Bcl-X_I, Bcl-w, mcl-1) und pro-apoptotischer Proteine (Bax, Bac, Bcl-X_S, Bad, Bid) der Bcl-2- Familie entscheidet, wie die Zelle auf ein apoptotisches Signal reagiert. Die CHX-Abhängigkeit der CD95L-induzierten Apoptose in transformierten HSZ wird durch die Aktivierung der c-Jun-N-

terminalen-Kinase (JNK) (Gong et al., 1998) und durch eine Herunterregulation anti-apoptotischer Proteine, wie z.B. FLIP (FLICE (Caspase-8) inhibitorisches Protein) (Fulda et al., 2000), erklärt.

Obwohl bisher mehrere Mechanismen des Zelltods in aktivierten HSZ identifiziert wurden, ist wenig über die Apoptose-Induktion in ruhenden HSZ bekannt. Diese Zellen sind auch in Anwesenheit von CHX nahezu resistent gegenüber einer CD95L-induzierten Apoptose (Gong et al., 1998; Cariers et al., 2002), werden nicht von LPS-behandelten Kupfferzellen aktiviert (Siegmund et al., 2007) und durchlaufen keine PBR-Liganden-abhängige Apoptose (Fischer et al., 2001). Im Gegensatz zu aktivierten HSZ, exprimieren ruhende HSZ nur in geringen Mengen den PBR (Fischer et al., 2001) und die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 (Fischer et al., 2002; Taimr et al., 2003), das dem Schutz der ruhenden HSZ vor PBR-Ligand-, TRAIL-, und LPS-behandelten Kupfferzell-induzierten Zelltod dient.

Eine Gallensäure-bedingte Aktivierung des EGFR konnte in verschiedenen Zelltypen der Leber, z.B. in Hepatozyten (Qiao et al., 2001; Reinehr et al., 2003a) in Cholangiozyten (Werneburg et al., 2003) und auch in Kultur-aktivierten HSZ gezeigt werden (Svegliati-Baroni et al., 2005), wobei aber die zugrundeliegenden Signalelemente zwischen den Zelltypen variieren. In Hepatozyten induzieren hydrophobe Gallensalze (TLCS, TCDC, GCDC) über Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (acidic sphingomyelinase, ASM), Ceramid-Bildung und einer Aktivierung der NADPH-Oxidase-Untereinheit p47^{phox} eine schnelle Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Fang et al., 2004; Reinehr et al., 2005). ROSbedingt kommt es auf der einen Seite zur EGFR-Transaktivierung durch die Tyrosinkinase Yes, einem Mitglied der Src-Kinase-Familie, und auf der anderen Seite zur Aktivierung der JNK, welche die Assoziation des EGFR mit dem CD95 vermittelt, der ein Substrat für die EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität ist. Die Phosphorylierung des CD95 an den Positionen Tyr²³² und Tyr²⁹¹ ist eine Voraussetzung für die Translokation des CD95 an die Membran, die DISC-Bildung (also die Assoziation von FADD und Caspase-8 an den CD95) und die Apoptose in Hepatozyten (Reinehr et al., 2003b). In Cholangiozyten dagegen induzieren hydrophobe Gallensalze durch eine c-Src-vermittelte Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen (MMP) eine Abspaltung von TGFa, das dann zu einer Liganden-abhängigen Aktivierung des EGFR führt (Werneburg et al., 2003). Während in Hepatozyten Gallensalze Apoptose auslösen, induzieren Gallensalze in aktivierten HSZ Zellproliferation über Aktivierung des EGFR (Svegliati-Baroni et al., 2005). Der detaillierte Mechanismus der Gallensalz-induzierten EGFR-Aktivierung in HSZ ist bis heute aber noch nicht aufgeklärt.

1.11. Fragestellung und Zielsetzung

Die Proliferation hepatischer Sternzellen (HSZ) ist ein Schlüsselereignis in der Entwicklung der Leberfibrose. Bei vielen Erkrankungen der Leber sind HSZ inflammatorischen Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Gallensalzen ausgesetzt. Wenngleich bekannt ist, dass inflammatorische Zytokine und ROS die Proliferation von HSZ begünstigen, ist wenig über die Wirkung von CD95 (Fas)-Ligand und Gallensalze auf die Proliferation und Apoptose in ruhenden HSZ bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher,

- (1) die molekularen Mechanismen der CD95-Aktivierung in hepatischen Sternzellen aufzuklären,
- (2) die zugrundeliegenden Mechanismen der Gallensalz-induzierten EGFR-Aktivierung zu identifizieren
- (3) und eine mögliche Verbindung der Signalelemente zwischen Zellproliferation und Zelltod in ruhenden HSZ aufzuzeigen.

Als Modellsysteme wurde die CD95 Ligand-induzierte Apoptose und die Stimulation mit den pro-apoptotischen Gallensalzen TLCS, TCDC und GCDC, sowie dem neutralen Gallensalz TC und dem anti-apoptotischen Gallensalz TUDC in isolierten und kultivierten HSZ und Parenchymzellen der Ratte gewählt.

2. Materialien und Methoden

2.1. Zellpräparationen

2.1.1. Isolierung und Kultivierung hepatischer Sternzellen der Leber

Hepatische Sternzellen (HSZ) von 14-18 Monate alten männlichen Wistar-Ratten (Gewicht >500 g) wurden mit Hilfe der Pronase-Kollagenase-Perfusionsmethode unter Verwendung einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert (Knook et al., 1982, Schäfer et al., 1987).

Die Reinheit lag bei >98%, die Ausbeute bei 20-50 x 10^6 Zellen/Leber. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit auf Plastikkulturschalen (Ø 6 cm, Greiner, Heidelberg, Deutschland) in einer Dichte von 2x10⁶ Zellen/Kulturschale kultiviert, um eine Transformation in Myofibroblastenartige Zellen zu ermöglichen. *Dulbeccos`s Modified Eagle`s Medium* (DMEM) (13 mmol/I Glukose, 4 mmol/I Glutamin) angereichert mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin wurde für die Kultivierung verwendet. Der erste Mediumwechsel erfolgte am Tag 1 (1. Tag nach Isolierung und Aussaat) und darauffolgend alle 2-3 Tage. Vor Stimulationen wurden die Zellen über Nacht in Serum-armen Medium (1% FCS) kultiviert.

2.1.2. Isolierung und Kultivierung von Leberparenchymzellen

Parenchymzellen (Hepatozyten) der Leber wurden aus 4-6 Wochen alten männlichen Wistar-Ratten mittels Kollagenase-Perfusion isoliert (Meijer et al., 1975).

1x10⁶ Zellen wurden auf Kollagen-beschichteten Zellkulturschalen (Ø 6 cm) ausplattiert und zunächst 3 h bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit in Krebs-Henseleit-Puffer mit 6 mmol/l Glukose kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit *Williams E Medium* (2 mmol/l Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,1 µmol/l Insulin, 0,1 µmol/l Dexamethason und 5% FCS) für 24 h kultiviert. Die Vitalität wurde durch Trypanblau-Färbung bestimmt und betrug stets mehr als 95%. Versuche wurden im Anschluss an die 24-stündige Kultivierung durchgeführt.

2.1.3. Medien und Lösungen in der Zellkultur

Dulbecco's modified Eagle's Medium

4 mmol/l Glutamin

13 mmol/l Glukose

10% FCS

100 U/ml Penicillin / 0,1 mg/ml Streptomycin

Williams E Medium

2 mmol/L Glutamin

100 U/ml Penicillin / 0,1 mg/ml Streptomycin

0,1 µmol/L Dexamethason

0,1 µmol/L Insulin

5% FCS

Nycodenz (pH 7,3)

287 g/L Nycodenz 370 mg/ml KCl 210 mg/ml MgCl₂ \cdot 6 H₂O 70 mg/ml MgSO₄ \cdot 7 H₂O 150 mg/ml Na₂HPO₄ \cdot 2 H₂O 30 mg/ml KH₂PO₄ 1090 mg/ml Glukose 227 mg/ml NaHCO₃ 225 mg/ml CaCl₂ \cdot 2 H₂O gelöst nach pH-Einstellung zugeben

Krebs-Henseleit-Puffer

92 mM NaCl 20 mM NaHCO₃ 4,72 mM KCl 0,944 mM MgCl₂ \cdot 6 H₂O 0,984 mM Na₂PO₄ \cdot H₂O 0,96 mM Na₂SO₄ 1 mM CaCl₂ \cdot 2 H₂O

2.2. Proteinanalytische Methoden

2.2.1. Aufarbeitung der Zellen

Zellen für die Proteinanalytik wurden nach Abschluss der Stimulationen vorsichtig mit eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen und mit Lysis-Puffer auf Eis lysiert. Nach Sedimentation (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 rpm, 5 min, 4℃) wurden die Überstände bis zur Analyse bei –20℃ gelagert.

2.2.2. Proteinmengenbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Der Nachweis beruht auf einer Reaktion des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 mit basischen Aminosäuren, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt.

Die Proteinprobe wurde im Verhältnis 1:100 mit Bradford Reagenz (Bio-Rad-Protein-Assay, Bio-Rad, München, Deutschland) vermischt und der Proteingehalt bei einer Wellenlänge von 595 nm mit Hilfe eines ELISA-Reader bestimmt.

2.2.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinproben wurden mit 2x Auftragspuffer versetzt, 3 min bei 95 ℃ denaturiert und dann in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Dies erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach dem Prinzip von Laemmli (Laemmli, 1970) und wurde mit Hilfe eines 8-12%igen Acrylamidgels durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 240 mA bis zu 3,5 h.

2.2.4. Protein-Transfer

Nach Abschluss der Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine durch einen Elektronentransfer auf eine Nitrozellulose-Transfer-Membran übertragen. Der Proteintransfer erfolgte mittels einer *"Hofer semi dry transfer* Kammer" (Amersham Biotech, Großbritannien) für bis zu 2,5 h bei einer Stromstärke von 1,25 mA/cm² Membranfläche. Zur Kontrolle der Transferqualität wurden die Membranen mit Ponceau-Rot-Färbelösung inkubiert und anschließend mit TBS-T gewaschen.

2.2.5. Western Blot-Hybridisierung und Detektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran unter Schütteln für 1 h bei RT in 5% BSA oder Milchpulver abgesättigt und anschließend mit dem in BSA oder Milchpulver verdünnten primären Antikörper über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran mit TBS-T wurde sie mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10.000) für 2 h bei RT inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden danach durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Detektion der Antikörperkonjugate erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham Biotech, Großbritannien). Eine quantitative densitometrische Auswertung erfolgte mittels LabImage Software auf einem Standard-PC-System.

2.2.6. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Methode zur Isolation von distinkten Proteinen aus dem Zelllysat mittels im Überschuss eingesetzter spezifischer Antikörper. Auch der Nachweis geringer Konzentrationen eines Proteins ist so möglich und störende Signale anderer Proteine können dadurch reduziert werden. Um das an den Antikörper gebundene Zielprotein zu selektieren macht man sich den Eigenschaften von Protein A und G zu Nutze. Diese sind Bestandteil der Zellwand von *Staphylococcus aureus* bzw. *Streptococcus* und binden mit hoher Affinität an die Fc-Region der Immunglobuline durch Interaktion mit der schweren Kette. Für die Immunpräzipitation sind Protein A und G jeweils an Sepharose-Kügelchen gebunden, so dass sie mit den spezifisch gebundenen Proteinen durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Herstellung des Zelllysats wurde wie unter 2.2.1. beschrieben durchgeführt. Gleiche Proteinmengen wurden auf identische Probenvolumina ergänzt, mit den entsprechenden Antikörpern und Agarose A/G+ vesetzt und dann über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Das ausgefällte Protein wurde anschließend durch mehrmaliges vorsichtiges Waschen mit Lysispuffer und anschließender Zentrifugation für 3 min bei 5.000 g aufgereinigt. Das gewonnene Präzipitat wurde daraufhin mit Auftragspuffer versetzt und für 3 min bei 95 °C erhitzt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe der Western Blot-Analyse.

2.2.7. Antikörper und Lösungen zur Proteinanalytik

Tab. 2.1. Antikörper zur Proteinanalytik

rabbit anti n47 ^{phox}	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA			
Tabbit anti-p47	Upstate Biotechnology, CA, USA			
rabbit anti-gp91 ^{phox} (Nox 2)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA			
mouse anti-α-SMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland			
mouse anti-Caspase-8	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA			
rabbit anti-DUOX1/2	Prof. Dr. C. Dupuy, INSERM, Fakultät für			
	Pharmazie, Universität Paris, Frankreich			
rabbit anti-CD95	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA			
rabbit anti-EGFR	Upstate Biotechnology, CA, USA			
rabbit anti-Phospho-EGFR-Y ⁸⁴⁵	BioSource Int., Camarillo, CA, USA			
rabbit anti-Phospho-EGFR-Y ¹⁰⁴⁵	Cell Signalling, Beverly, MA, USA			
rabbit anti-Phospho-EGFR-Y ¹¹⁷³	BioSource Int., Camarillo, CA, USA			
rabbit anti-Erk-1/-2	Cell Signalling, Beverly, MA, USA			
mouse anti-Phospho-Erk-1/-2	Cell Signalling, Beverly, MA, USA			
rabbit anti-FADD	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA			
rabbit anti-Fyn	Upstate Biotechnology, CA, USA			
mouse anti-GAPDH	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA			
mouse anti-GFAP	Chemicon, Hampshire, UK			
mouse anti-JNK-1/2	Cell Signalling, Beverly, MA, USA			
rabbit anti-Phosho-JNK-1/2	BioSource Int., Camarillo, CA, USA			
rabbit anti-MMP2	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA			
rabbit anti-MMP9	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA			
mouse anti-MMP13	Chemicon, Hampshire, UK			
mouse anti-3`-Nitrotyrosin (Klon 1A6)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland			
rabbit anti-p38 ^{MAPK}	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA			
rabbit anti-Phosho-p38 ^{MAPK}	BioSource Int., Camarillo, CA, USA			
mouse anti-Phospho-Src-Y ⁴¹⁸	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland			
rabbit anti-Phospho-Src family-Y ⁴¹⁸	Cell Signalling, Beverly, MA, USA			
mouse anti-Phospho-Serin (Klon 16B4)	Biomol, Hamburg, Deutschland			
mouse anti-Phospho-Tyrosin	Upstate Biotechnology, CA, USA			
rabbit anti-Yes	Upstate Biotechnology, CA, USA			
mouse anti-γ-Tubulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland			
Meerettich-konj. Mouse IgG	Bio-Rad, Herkules, USA			
Meerettich-konj. rabbit IgG	Bio-Rad, Herkules, USA			

Lysispuffer

20 mM Tris pH 7,4

140 mM Natriumchlorid

10 mM Natriumfluorid

10 mM Natrium-Pyrophosphat

1% Triton X-100

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1 mM Natrium-Vanadat

20 mM B-Glycerolphosphat

20 Tabl./L Proteaseinhibitor (CompleteTM, Boehringer)

Auftragspuffer (2x)

220 mM Tris/HCl pH 6,8 9% SDS 40% Glyzerin 0,125% Bromphenolblau 1 M DTT

Sammelgelpuffer

1 M Tris/HCl pH 6,8

Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Polyacrylamid/SDS Sammelgel (5 ml)

3,4 ml H₂O 0,83 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 0,63 ml Sammelgelpuffer 0,05 ml 10% SDS 0,05 ml 10% Ammoniumpersulfat 0,005 ml TEMED

10% Polyacrylamid/SDS Trenngel (25 ml)

9,9 ml H₂O

8,3 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1

6,3 ml Trenngelpuffer

0,25 ml 10% SDS

0,25 ml 10% Ammoniumpersulfat

0,01 ml TEMED

Elektrophoresepuffer

5 g/L SDS 15,1 g/L Tris 95 g/L Glyzin

Transferpuffer

40 mM SDS 10 mM Glyzin 10 mM Tris 25% Methanol

Tris buffered saline with Tween (TBS-T)

20 mM Tris pH 7,4 150 mM Natriumchlorid 0,1% Tween 20

Als Lösungsmittel diente vollentsalztes oder destilliertes Wasser (NANOPure).

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Nachweis der mRNA-Expression mittels RT-PCR

Die semiquantitative RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) erlaubt den Nachweis der Genexpression auf mRNA Ebene. Gesamt-RNA wurde mittels peqGold TriFast Kit (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS isoliert. Eine Quantifizierung erfolgte durch UV-Spektroskopie (Eppendorf Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die cDNS konnte aus 1 µg Gesamt-mRNA pro Reaktionsansatz mit Hilfe des *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) umgewandelt werden.

Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 200 nmol/L bei 5 µl TemplatecDNS für ein Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl verwendet. Die Amplifikation der DNS erfolgte in einem Thermocycler nach einem Standard-PCR-Programm. Nach Amplifikation wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines 2%igen Agarosegels durch Elektrophorese und anschließender Ethidiumbromidfärbung analysiert. Die PCR Produkte wurden dann aus dem Gel isoliert (*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System,* Promega, Madison, WI, USA) und ansequenziert (GATC-Biotech, Konstanz, Deutschland).

2.3.2.	Verwendete Prim	er und Lösunge	n für molekularb	iologische Methode	n
Tab. 2.	2.: Primer				

MMP2	sense-5´-GGACAGTGACACCACGTGAC-3´
	antisense-5'-GTATCCTCGCTCCAGAGTGC-3'
MMP9	sense-5´-AAATGTGGGTGTACACAGGC-3´
	antisense-5'-TTCACCCGGTTGTGGAAACT-3'
MMP13	sense-5´-GCCATTACTAGTCTCCGAGGA-3´
	antisense-5'-GGAATTTGTTGGCATGACTCTCAC-3'
β-Aktin	sense-5´-GCCCTAGACTTCGAGCAAGA-3´
	antisense-5'-CAGTGAGGCCAGGATAGAGC-3'

TBE-Puffer (5x)

54 g/L Tris bas. 27,5 g/L Borsäure 3,72 g/L EDTA

2.4. Immunzytochemische Methoden

2.4.1. Färbeprotokoll

Für die Immunzytochemie wurden HSZ auf Glas-Cover Slips (Ø 12 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) in einer Dichte von 0.025x10⁶ Zellen/Cover Slip ausgesät. Nach einem Waschschritt mit PBS wurde die Zellen mit Paraformaldehvd oder Zamboni für 10 min bei RT (CD95, GFAP, αSMA) oder mit Methanol 2 min bei -20 °C (MMP2, MMP9, MMP13, DUOX1/2, gp91^{phox}, p47^{phox}) fixiert. Mit Paraformaldehyd fixierte Zellen wurden darauffolgend 2 min bei 4°C mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen wurden unspezifische Bindungen durch Blockierung mittels 1% BSA (w/v) in PBS abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (1:100-1:500 in PBS) für 2 h bei RT. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen wurden diese mit einem FITC- bzw. Cy-3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:100 bzw. 1:500) für weitere 60 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt wurden die Zellen in Vectashield Mounting Medium mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Vector Laboratories, Burlingame, USA), zur Anfärbung der Zellkerne, eingedeckt. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Laserscanning-Mikroskops (LSM 510, Zeiss, Jena, Deutschland) und der Software LSM 5 Image der Firma Zeiss durchgeführt.

2.4.2. Antikörper und Lösungen für die Immunzytochemie

Tab. 2.3.: Antikörper für die Immunzytochemie

rabbit anti-p47 ^{phox}	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
rabbit anti-gp91 ^{phox} (Nox 2)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
mouse anti-α-SMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
rabbit anti-DUOX-1/2	Prof. Dr. C. Dupuy, INSERM, Fakultät
	für Pharmazie, Universität Paris, Frankreich
rabbit anti-CD95	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
mouse anti-GFAP	Chemicon, Hampshire, UK
rabbit anti-MMP2	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
rabbit anti-MMP9	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
mouse anti-MMP13	Chemicon, Hampshire, UK
Cy-3 konj. goat anti-rabbit	Dianova, Hamburg, Deutschland
FITC konj. rabbit anti-mouse	Dako, Hamburg, Deutschland

Phosphat buffered saline (PBS)

137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM NaH₂PO₄ 1,8 mM KH₂PO₄

Paraformaldehyd 4% (w/v)

45 ml H₂O auf 60 °C erhitzen 2 g PFA + 1 Tropfen NaOH (1 M) zugeben, filtrieren 5 ml 10 x PBS mit H₂O auf 50 ml auffüllen

Zamboni

4% Paraformaldehyd 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M PBS

2.5. Proliferationstest mittels BrdU-ELISA

Der BrdU-ELISA ist ein nichtradioaktiver Test, bei dem die Proliferation der Zellen über den Einbau von 5-Bromo-2´-desoxy-Uridin (BrdU) in die zelluläre DNS bestimmt wird. Die Zellen wurden nach Inkubation mit BrdU lysiert und fixiert. Über Antikörperbindung an BrdU und anschließendem Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratumsatz wurde die Menge an eingebautem BrdU im ELISA-Reader bei 450 nm ermittelt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Roche, Mannheim, Deutschland).

2.6. Apoptosequantifizierung mittels TUNEL-Markierung

Ein Kennzeichen der Apoptose ist die DNS-Fragmentierung. Durch DNS-Spaltung der internukleosomalen DNS-Linker-Region entstehen einzelin und doppelsträngige DNS-Brüche. Beide Typen von DNS-Brüchen können durch Bindung von modifizierten Nukleotiden (z.B. Fluorescein-dUTP) an die freien 3'-OH-Gruppen in einer enzymatischen Reaktion markiert werden. Die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert die Template-unabhängige Polymerisation der Desoxyribonukleotide der 3'-Enden der DNS. Diese Methode wird als TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) bezeichnet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Roche, Mannheim, Deutschland).

Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde unter einem Laserscanning-Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Jena, Deutschland) ermittelt, indem TUNEL-positive Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen gesetzt wurden. Es wurden jeweils mindestens 100 Zellen pro Ansatz ausgezählt.

2.7. EGF-ELISA

Über Antikörperbindung an EGF und anschließendem TMB-Substratumsatz wurde die Menge an abgegebenen EGF mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland).

2.8. Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels CM-H₂DCFDA

5'-(und-6')-Chlormethyl-2',7'-dichlordihydrofluorescein-diacetat (CM-H₂DCFDA) ist ein zellmembran-permeabler Indikator für reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Da Acetylesterderivate von Fluoreszenzfarbstoffen lipophile Moleküle darstellen, können diese die Zellwand passieren. Innerhalb der Zelle wird CM-H₂DCFDA durch zelleigene Esterasen hydrolysiert, so dass ein geladenes Molekül entsteht, welches nicht mehr in der Lage ist, die Zellwand erneut zu permeieren. Durch Oxidation innerhalb der Zelle wird das stark fluoreszierende Oxidationsprodukt DCF gebildet, dessen Fluoreszenzemission bei Anregung unter Licht der Wellenlänge 488 nm zwischen 515 und 565 nm gemessen werden kann.

Die Zellen wurden mit 5 µmol/L CM-H₂DCFDA in PBS 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Stimulation der CM-H₂DCFDA-beladenen Zellen wurden sie mit eisgekühltem PBS gewaschen und in 0,1% Triton X-100 lysiert. Das Lysat wurde daraufhin bei 10.000 g und 4 °C für 1 min zentrifugiert und die Emission des Überstand nach Anregung bei 488 nm mittels eines Lumineszensspektrometers (LS-5B, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) bestimmt.

2.9. Statistische Methoden

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwerts) angegeben. Jedes Experiment wurde mit mindestens 3 verschiedenen unabhängigen Ansätzen durchgeführt (n = Anzahl der Ansätze). Die Signifikanz wurde mittels Student t-Test berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von α = 5 % mit p<0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

1	0	Inh	ihii	
Z .I	υ.	11111	IDI	oren

3-Amino-1,2,4-Triazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
6-Propyl-2-Thiouracil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
AG1478	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Apozynin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
AY9944	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chelerythrin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Desipramin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Diphenyliodonium (DPI)	Biomol, Hamburg, Deutschland
GM6001 (Galardin)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
L-JNKI-1	Alexis, Grünberg, Deutschland
L-NMMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methimazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MMP2-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
(Cis-9-Octadecenoyl-N-Hydroxylamid)	
MMP2/9-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
(2R-2[(4-Biphenylylsufonyl)-amino]-3-	
Phenylpropionsäure)	
N-Acetylcystein (NAC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PD090859	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
PKCζ-Pseudosubstrat	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
PP-2	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
SU6656	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland

2.11. Reagenzien

30% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
All Blue Protein Marker	Bio-Rad, München, Deutschland
Bradford-Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Bio-Rad, München, Deutschland
Cell proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim, Deutschland
CD95L	Alexis, Grünberg, Deutschland
CM-H₂DCFDA	Molecular Probes, Eugene, USA

Complete Proteaseinhibitor Cocktail Dulbecco's modified Eagle's medium

EGF-ELISA Enhanced Chemiluminescent Substrate

Ethidiumbromid Fötales Kälberserum (FCS)

Heparin Hyperfilm ECL

- Insulin Ketavet Kollagenase H L-Glutamin
- Low Range DNA Ladder Nycodenz Paraformaldehyd 2x PCR Master Mix Penicillin / Streptomycin peqGold TriFast Kit
- Pronase

RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Rinderserumalbumin (BSA) RNEasy RNA Extraction Kit Rompun TLCS TUNEL Kit Vectashield Mounting Medium mit DAPI William's E Medium

Roche, Mannheim, Deutschland Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland GE Healthcare, Braunschweig, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland GE Healthcare, Braunschweig, Deutschland Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland Pharmacia, Erlangen, Deutschland Roche, Mannheim, Deutschland Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland Fermentas, St Leon-Roth, Deutschland Axis-Shield, Oslo, Norwegen Merck, Darmstadt, Deutschland Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland Biochrom, Berlin, Deutschland peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland

Roth, Karlsruhe, Deutschland Qiagen, Hilden, Deutschland Bayer, Leverkusen, Deutschland Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland Roche, Mannheim, Deutschland Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, in der jeweils höchst möglichen Qualität bezogen.

3. Ergebnisse

3.1. CD95 Ligand-abhängige Signaltransduktion

Der erste Teil dieser Dissertation beschäftigt sich mit den durch CD95L induzierten Signalwegen in ruhenden, sowie aktivierten Sternzellen der Ratte.

3.1.1. Charakterisierung hepatischer Sternzellen

HSZ wurden aus der Leber männlicher Ratten isoliert und 1-2 Tage kultiviert. Unter diesen Bedingungen waren noch Vitamin A-speichernde Fetttröpfchen sichtbar und die Zellen exprimierten GFAP (Abbildung 3.1.) und Desmin (nicht gezeigt) (Yokoi et al., 1984), jedoch kein αSMA (Abbildung 3.1.) (Friedman et al., 1993). Dies entsprach dem ruhenden Phänotyp. Nach 7-14 Tagen Kultivierung konnte ein Verlust an Lipidtröpfchen und eine starke Expression von αSMA beobachtet werden (Abbildung 3.1.), das den aktivierten Phänotyp der HSZ entsprechend ihrer Transformation zu Myofibroblasten anzeigte (Rockey et al., 1993; Reinehr et al., 1998; Friedman 2000).





erläuterten Protokolls isoliert und kultiviert. Die Expression von α SMA nahm während der Kultivierungsdauer zu, wohingegen die Expression von GFAP im Laufe der Transformation abnahm. (**A**; ICC, n=3; Maßstabsbalken 10 µM, n=3; **B**; Western Blot, n=3, GAPDH diente als Beladungskontrolle).

Abbildung 3.1.: Expression von αSMA und

B Kultivierungsdauer

1	2	4	7	14	Та	age
-	-	_				GFAP
-	-	-	-	-	•	αSMA
-	-	_	_	-		GAPDH
3.1.2. CD95L-induzierte Aktivierung des EGFR in ruhenden HSZ

Mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen an permeabilisierten HSZ konnte in ruhenden, sowie aktivierten HSZ eine starke Expression von CD95 detektiert werden (Abbildung 3.2.) (Gressner et al., 1998; Gong et al., 1998; Cariers et al., 2002). Immunzytochemische Färbungen an nicht-permeabilisierten Zellen zeigten hingegen keine Expression von CD95 (nicht gezeigt) (Cariers et al., 2002), sodass eine eindeutige Lokalisation des Rezeptors in der Membran ausgeschlossen werden konnte. Während der Aktivierung zu einem Myofibroblasten-artigen Phänotyp kam es zu einer deutlichen Zunahme der CD95-Expression (Abbildung 3.2.).





Abbildung 3.2.: CD95-Expression in kultivierten HSZ (Reinehr et al., 2008) Bereits ruhende HSZ exprimieren CD95, wobei die Expression während der Kultivierung zunimmt (**A**; ICC, n=3; Maßstabsbalken 10 μM; **B**; WB, n=3, GAPDH diente als Beladungskontrolle).

In Anwesenheit von Cycloheximid, einem Translationshemmer, löste CD95L in 7 und 14 Tage alten kultivierten HSZ, nicht jedoch in ruhenden HSZ, konzentrationsabhängig, Apoptose aus. (Abbildung 3.3.) (Gong et al., 1998; Cariers et al., 2002).



Abbildung 3.3.: Apoptose-Induktion in kultivierten HSZ (Reinehr et al., 2008) In Anwesenheit von Cycloheximid (CHX, 0,5 μ mol/L) löste CD95L in 7 (Δ) und 14 Tage (\blacksquare) alten kultivierten HSZ, nicht jedoch in ruhenden HSZ (\bullet), Apoptose aus (n=3).

Interessanterweise löste CD95L in ruhenden HSZ auch innerhalb von 5 min eine Aktivierung des EGFR aus (Abbildung 3.4.).

Tyr⁸⁴⁵ des EGFR ist bekannt als Src-Phosphorylierungs-Seite (Biscardi et al., 1999), wohingegen Tyr¹¹⁷³ die Autophosphorylierung (Poppleton et al., 1999) und Aktivierung des EGFR anzeigt. Durch Stimulation mit CD95L konnte auch in ruhenden HSZ gezeigt werden, dass der EGFR durch Phosphorylierung am Tyrosinrest 845 eine Tyrosinkinase-Aktivität erhält und sich selbst phosphorylieren kann. Dies konnte durch die Zunahme der Tyr¹¹⁷³-Phosphorylierung am C-Terminus des EGFR gemessen werden. Gleichzeitig kam es zu einer Phosphorylierung des Tyrosinrest 1045 (Abbildung 3.4.). Diese ist bekannt als Cbl-Bindungsstelle, welche die EGFR-Internalisierung nach EGF-Stimulation vermittelt (Levkowitz et al, 1998; De Melker et al., 2001; Soubeyran et al. 2002).





HSZ wurden 48 h kultiviert und dann 30 min mit CD95L (100 ng/ml), TNFα (10 ng/ml oder 1 μg/ml), TRAIL (100 ng/ml) oder EGF (50 ng/ml) stimuliert. GM6001 (25 μmol/L), ein Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen und der neutralisierende anti-EGF-Antikörper (10 μg/ml) wurden 16 h bzw. 2 h, vor CD95L-Stimulation zugegeben. Die Phosphorylierung der EGFR-Tyrosinreste Y⁸⁴⁵, Y¹⁰⁴⁵ und Y¹¹⁷³ wurde mittels Western Blot analysiert (**A**; n=3, **B**; n=3). Gesamt-EGFR diente als Beladungskontrolle. CD95L, TNFα und TRAIL induzierten eine EGFR-Tyrosinphosphorylierung, welche sensitiv gegenüber der Hemmung der MMP und EGF-neutralisierenden Antikörpern war.

3.1.3. Mechanismus der EGFR-Aktivierung durch CD95L in ruhenden Zellen

Zur näheren Charakterisierung der CD95L-induzierten EGFR-Aktivierung wurde untersucht, durch welche Inhibitoren die Aktivierung gehemmt werden konnte. Die CD95L-induzierte EGFR-Aktivierung wurde in Gegenwart von GM6001, einem Inhibitor der Matrixmetalloproteasen (MMP) (Werneburg et al., 2003) und in Gegenwart des EGF-neutralisierenden Antikörper fast gänzlich aufgehoben (Abbildung 3.4. und 3.5.). Diese Befunde legten nahe, dass CD95L in ruhenden HSZ die Abspaltung von EGF induziert, was wiederum zu einer autokrinen EGFR-Aktivierung führt. Auch andere Todesrezeptor-Liganden, wie TNFα und TRAIL induzierten eine EGFR-Aktivierung (Abbildung 3.5.).



Abbildung 3.5.: Todesrezeptor-Liganden induzierte EGFR-

Phosphorylierung (Reinehr et al., 2008) HSZ wurden 48 h kultiviert und dann 30 min mit CD95L (100 ng/ml), TNFα (10 ng/ml) oder TRAIL (100 ng/ml) stimuliert. GM6001 (25 µmol/L), anti-EGF-Antikörper (10 µg/ml), und N-Acetylcystein (NAC, 30 mmol/L) wurden 16 h, 2 h, oder 30 min vor CD95L-Gabe zugegeben. Die Phosphorylierung der EGFR-Tyrosinreste Y⁸⁴⁵, Y¹⁰⁴⁵ und Y¹¹⁷³ wurde mittels EGFR-Immunpräzipitation und anschließender Detektion analysiert. Gesamt-EGFR diente als Beladungskontrolle (n=3).

Matrixmetalloproteinasen (MMP) spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der HSZ (Iredale, 1997). Wie in Abbildung 3.6. gezeigt, exprimieren ruhende HSZ MMP2, MMP9 und MMP13 auf RNA- und Protein-Ebene. Die Matrixmetalloproteasen 2 und 9 werden im Laufe der HSZ-Aktivierung weniger exprimiert, wohingegen die MMP13-Expression zunimmt.



Abbildung 3.6.: Expression von Matrixmetalloproteinasen in kultivierten HSZ (Reinehr et al., 2008)

HSZ wurden laut Protokoll 1-14 Tage kultiviert. Die Expression von MMP2, MMP9 und MMP13 wurde auf mRNA-Ebene mittels PCR (**A**; n=3) und auf Protein-Ebene mit Hilfe der Western Blot-Analyse (**B**; n=3) und Immunzytochemie (**C**; n=3, Maßstabsbalken 10 μ m) detektiert.

Die EGFR-Aktivierung durch CD95L, TNFα und TRAIL wurde durch einen Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 unterdrückt, wohingegen der spezifische MMP2-Inhibitor inaktiv war (Abbildung 3.7.A). Diese Ergebnisse zeigten, dass MMP9 ein Proteinase-Kandidat für die Abspaltung von EGF nach Stimulation mit Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie sein könnte.



Abbildung 3.7: Charakterisierung der EGFR-Phosphorylierung in ruhenden HSZ (Reinehr et al., 2008)

HSZ wurden 48 h kultiviert und danach 30 min mit CD95L (100 ng/ml), TNF α (1 µg/ml) und TRAIL (100 ng/ml) stimuliert. Die Inhibitoren MMP2/9 (10 µmol/L) und MMP2 (10 µmol/L) wurden 3 h, die Src-Kinase-Inhibitoren PP-2 (10 µmol/L) und SU6656 (10 µmol/L) 30 min vorinkubiert. Die EGFR-Phosphorylierung wurde durch EGFR-Immunpräzipitation und darauffolgender EGFR-Tyrosinphosphorylierung ermittelt. Gesamt-EGFR diente als Beladungskontrolle. Die CD95L-, TNF α -, und TRAIL-induzierte EGFR-Tyrosinphosphorylierung von MMP2/9, wohingegen die selektive MMP2-Inhibierung keinen Effekt zeigte (**A**; n=3).

Die Src-Aktivierung wurde mittels eines Phospho-Src-Y⁴¹⁸-spezifischen Antikörpers bestimmt, wohingegen die Aktivierung von Fyn und Yes, mittels Immunpräzipation ermittelt wurde. Gesamt-Src, -Fyn und -Yes dienten als Beladungskontrollen. CD95L, TNF α und TRAIL induzierten eine Phosphorylierung von Src, hatten aber keinen Effekt auf Fyn und Yes. TLCS führte dagegen zu einer starken Yes-Phosphorylierung (**B**; n=3).

Um die Abspaltung von EGF nach CD95L-Stimulation zu zeigen, wurde die Menge an EGF im Überstand der Zellen gemessen. In ruhenden HSZ führte die Stimulation mit CD95L innerhalb von 3 h zu einer Abgabe von 390±32 pg EGF/µg Protein ins Medium (p<0.05; n=3), wobei nur 209±4 pg EGF/µg Potein im Überstand der Kontrollzellen messbar waren. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Src-Kinase-Familienmitglieder c-Src, Fyn und Yes vorgeschaltete oder nachgeschaltete Elemente der EGFR-Signaltransduktion sind (Werneburg et al., 2003; Carpenter et al., 1192). Mit Hilfe von Immunpräzipitationsstudien und nachfolgender Detektion mit phosphospezifischen Antikörpern sollte geprüft werden, inwiefern die Src-Kinasen eine Rolle bei der EGFR-Aktivierung in HSZ spielen.

Die Stimulation von ruhenden HSZ mit CD95L, TNFa oder TRAIL resultierte in einer Aktivierung von c-Src, welche mit GM6001 und AG1478, Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität, nicht hemmbar war. Die Todesrezeptor-Liganden hatten dagegen in Abhängigkeit von CD95L keinen Effekt auf die Fyn- und nur geringen Effekt auf die Yes-Aktivierung (Abbildung 3.7.). Koeinen Immunpräzipitationsstudien zeigten, dass weder c-Src noch Yes mit EGFR in Abhängigkeit von CD95L, TNFa oder TRAIL assoziierten (nicht gezeigt). In Leberparenchymzellen dagegen konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit CD95L innerhalb von 1 min zur aktivierenden Tyr⁴¹⁸-Phosphorylierung der Yes-Kinase kommt, gefolgt von einer Assoziation des EGFR und Yes (Reinehr et al., 2004). Das Tyrosinmotiv Tyr⁴¹⁸ der Kinasen der Src-Familie entspricht dem Tyr⁸⁴⁵ des EGFR (Biscardi et al., 1999). Die Inhibitoren der Src-Kinasen PP-2 und SU6656 jedoch konnten die EGFR-Aktivierung in HSZ in Abhängigkeit von CD95L, TNFa und TRAIL verhindern (Abbildung 3.7.). Die inhibitorischen Effekte von PP-2 und SU6656 weisen darauf hin, dass es sich bei den Src-Kinasen um wichtige vorgeschaltete Elemente der EGFR-Phosphorylierung handelt.

3.1.4. CD95L stimuliert die Proliferation von ruhenden HSZ

Wachstumsfaktoren, die das Zellwachstum und -differenzierung stimulieren, übermitteln ihre Signale über die *extracellular-signal regulated kinases* (Erk). Der MAPK-Signalweg wird von Adapter- und G-Proteinen aktiviert, welcher in der Aktivierung und Dimerisierung der Erk mündet. Nach Translokation in den Zellkern können die Erk-Dimere Transkriptionsfaktoren aktivieren und dadurch die Genexpression regulieren (Lewis et al., 1998).

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, induziert CD95L in ruhenden HSZ innerhalb von 60 min eine Aktivierung der Erk, wohingegen keine Effekte auf die c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) und Protein-Kinase B beobachtet wurden (Abbildung 3.8.). Aus der Literatur ist bekannt, dass JNK durch zellulären Stress, Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert werden können, was häufig zu einer Hemmung des Zellwachstums und zur Induktion von Apoptose führt (Guo et al., 1998). Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie wie TNF α oder CD95 können JNK-vermittelt Apoptose auslösen. Auch der Proteinkinase B, einer wichtige Serin- und Threoninkinase, wird eine Beteiligung bei der Induktion von Apoptose zugesprochen.

TNFα und TRAIL lösten, wie EGF und PDGF eine Phosphorylierung von Erk-1/-2 in ruhenden HSZ aus. Das CD95L-induzierte Erk-Signal wurde in Anwesenheit von GM6001 oder EGF-neutralisierenden Antikörpern unterdrückt, was darauf hindeutet, dass das Erk-Signal durch eine Liganden-abhängige EGFR-Aktivierung induziert wurde (Abbildung 3.8.).



Abbildung 3.8.: CD95L-, EGF- und PDGF-induzierte Erk-Phosphorylierung in ruhenden HSZ (Reinehr et al., 2008)

HSZ wurden isoliert, 48 h kultiviert und dann entweder mit CD95L (100 ng/ml), EGF (50 ng/ml) oder PDGF (10 ng/ml) stimuliert. Der Inhibitor GM6001 (25 µmol/L) bzw. der anti-EGF-Antikörper (10 µg/ml) wurden 16 h bzw. 2 h vorgegeben. Eine Erk-Phosphorylierung wurde mittels phosphospezifischer Antikörper und Western Blot-Analyse bestimmt. Gesamt-Erk-1/-2 diente als Beladungskontrolle. Die Stimulation mit CD95L, EGF oder TRAIL führte zu einem starken Anstieg der Erk-1/-2-Phosphorylierung (**B**; n=3), wobei die CD95L-induzierte Erk-Phosphorylierung mit Hilfe des MMP-Inhibitors GM6001 bzw. EGFneutralisierenden Antikörpern unterdrückt werden konnte (**A**; n=3).

Übereinstimmend mit der EGFR-abhängigen mitogenen Signalkaskade, war auch der Einbau von BrdU durch CD95L in HSZ signifikant erhöht. Dieser Effekt konnte durch GM6001 und EGF-neutralisierenden Antikörpern unterdrückt werden, was darauf hindeutet, dass CD95L über Aktivierung des EGFR, die Proliferation fördert (Abbildung 3.9.B). Der mitogene Effekt ging jedoch in HSZ, die 7-14 Tage kultiviert

wurden, verloren, obwohl auch diese Zellen auf CD95L mit einer Aktivierung des EGFR reagierten (Abbildung 3.9.B).



Abbildung 3.9.: CD95-, TNF α - und TRAIL-induzierter BrdU-Einbau in (Reinehr et al., 2008)

HSZ wurden isoliert, 48 h kultiviert und dann mit CD95L (100 ng/ml), TNFα (10 ng/ml, 1 µg/ml), TRAIL (10 ng/ml), EGF (50 ng/ml) oder PDGF (10 ng/ml) stimuliert. Der Inhibitor GM6001 (25 µmol/L) wurde 16 h und der anti-EGF-Antikörper (10 µg/ml) 2 h vorgegeben. (**A**) CD95L führte im Vergleich zu unbehandelten Zellen (gleich 1 gesetzt) zu einer signifikanten Zunahme der BrdU-Aufnahme ([#]p<0.05, n=6), die durch GM6001 und anti-EGF-Antikörper gehemmt werden konnte (*p<0.05, n=3). Auch TNFα (n=6), TRAIL (n=5), EGF (n=3) und PDGF (n=3) führten zu einem erhöhten BrdU-Einbau ([#]p<0.05). (**B**) Abnahme des CD95L-induzierten BrdU-Einbaus im Verlauf der HSZ-Transformation ([#]p<0.05, Tag 1, n=6; Tag 7, n=3; Tag 14, n=3).

Des Weiteren führte die Stimulation mit CD95L (50 ng/ml) in ruhenden HSZ innerhalb von 48 h zu einem 1,52 \pm 0,03-fachen Anstieg der Zellzahl (p<0.05, n=3). Dies deutet auf eine erhöhte Zellproliferation hin. CD95L hatte dagegen keinen Effekt auf die HSZ-Transdifferenzierung in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, gemessen an der α SMA-Expression während der Kultivierung (Abbildung 3.10.).



Abbildung 3.10.: CD95L hat keine Wirkung auf die Transdifferenzierung von HSZ (Reinehr et al., 2008)

HSZ wurden 12 h kultiviert und dann entweder mit Kontrollmedium oder CD95L (50 ng/ml) für die angezeigten Zeitpunkte inkubiert. Die Expression von α SMA wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt. γ -Tubulin diente als Beladungskontrolle. CD95L hatte in Bezug auf die α SMA-Expression über einen Zeitraum von 14 Tagen keine Wirkung auf die Transdifferenzierung in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp (n=3).

3.1.5. Todesrezeptor-Liganden-induzierte CD95-Tyrosinnitrierung in ruhenden HSZ

Wie in Hepatozyten gezeigt (Reinehr et al., 2003), benötigt die Apoptose-Induktion über das CD95-System, als Voraussetzung für die CD95-Aktivierung und Bildung des DISC, eine EGFR-katalysierte CD95-Tyrosinphosphorylierung. Dieser Prozess der CD95-Aktivierung wird nach CD95-Tyrosinnitrierung gehemmt, da CD95 nicht länger phosphoryliert werden kann und dadurch resistent gegen die CD95-abhängige Apoptose wird (Reinehr el al., 2004). Interessanterweise löste die Zugabe von CD95L in ruhenden HSZ innerhalb von 15 min eine Tyrosinnitrierung des CD95 aus (Abbildung 3.11.A).

Schon CD95L-Konzentrationen geringer von 10 ng/ml waren ausreichend, um eine deutliche CD95-Tyrosinnitrierung auszulösen (Abbildung 3.11.B). Im Laufe der HSZ-Aktivierung zu Myofibroblasten dagegen kam es zu einem Verlust der Tyrosinnitrierung von CD95 (Abbildung 3.11.).



Abbildung 3.11.: CD95L-induzierte CD95-Tyrosinnitrierung (Reinehr et al., 2008) HSZ wurden isoliert, 2, 7 oder 14 Tage kultiviert und dann für die angegebenen Zeitpunkten mit CD95L (100 ng/ml) stimuliert. CD95 wurde immunpräzipitiert und die CD95-Tyrosinnitrierung detektiert. Gesamt-CD95 diente als Beladungskontrolle. (**A**, Zeitreihe) Innerhalb von 15 min induzierte CD95L in ruhenden HSZ, nicht jedoch in aktivierten HSZ eine Tyrosinnitrierung von CD95 (n=5). (**B**, Konzentrationsreihe) HSZ wurden 3 h mit CD95L mit den angegebenen Konzentrationen stimuliert (n=5).

Auch TNFa und TRAIL induzierten eine Tyrosinnitrierung des CD95-Todesrezeptors (Abbildung 3.12.B-C). Abgesehen von CD95 wurden auch andere Proteine als Reaktion auf CD95L und TRAIL Tyrosin-nitriert. Nur wenige spezifische Banden Tyrosin-nitrierter Proteine, hauptsächlich bei ca. 50 und ca. 28 kD, konnten in Abhängigkeit von CD95L detektiert werden. Die etwa 50 kD schwere Proteinbande spiegelt wahrscheinlich den CD95 wieder, das Protein der 28 kD Eine schweren Bande dagegen ist nicht bekannt. unselektive Proteintyrosinnitrierung durch die Gabe von Peroxynitrit konnte, wie schon in anderen Zelltypen gezeigt (Ramezanian et al., 1996; Goldstein et al., 2000; Klotz et al., 2000), auch in HSZ erzielt werden (Abbildung 3.12.A).





HSZ wurden isoliert, 24 h kultiviert und dann 60 min mit CD95L (100 ng/ml), TNF α (10 ng/ml oder 1µg/ml), TRAIL (100 ng/ml) oder Peroxynitrit (ONOO⁻, 500 µmol/L für 15 min) stimuliert. (**A**) Die Gesamt-Protein-Tyrosinnitrierung wurde mittels Western Blot-Analyse ermittelt. (n=6). (**B**) CD95 wurde immunpräzipitiert und die CD95-Tyrosinnitrierung 3 h nach Stimulation detektiert. Gesamt-CD95 diente als Beladungskontrolle (n=6). Das Balkendiagramm (**C**) zeigt die densitometrische Analyse der CD95-Tyrosinnitrierung im Vergleich zu Kontrollexperimenten (gleich 1 gesetzt). CD95L, TNF α und TRAIL induzierten eine signifikante Zunahme der CD95-Tyrosinnitrierung ([#]p<0.05, n=6).

Interessanterweise induzierten auch TNFα und TRAIL eine CD95-Tyrosinnitrierung. Dies deutet daraufhin, dass eine Verbindung zwischen den verschiedenen Todesrezeptorsystemen besteht (Abbildung 3.12.B-C).

3.1.6. Mechanismus der CD95-induzierten CD95-Tyrosinnitrierung

Eine Tyrosinnitrierung von Proteinen kann in Peroxynitrit-abhängigen und unabhängigen Wegen ablaufen (Bian et al., 2006). Da sich das Superoxidanion-Radikal O²⁻ und NO zu Peroxynitrit verbinden können und CD95L eine O²⁻-Bildung über die NADPH-Oxidase-Aktivierung in Hepatozyten der Ratte induzieren kann, wurde der Effekt von CD95L auf die p47^{phox}-Phosphorylierung und die ROS-Produktion untersucht. Wie schon zuvor beschrieben (Reinehr el al., 2005), exprimieren ruhende HSZ die mRNA der NADPH-Oxidase-Untereinheiten Nox 1 und 2 (gp91^{phox}), genauso wie die mRNA der DUOX-Enzyme 1 und 2. Wie in Abbildung 3.13. gezeigt, werden die Untereinheiten gp91^{phox}, p47^{phox} und DUOX auch auf Proteinebene exprimiert.



DUOX-Enzyme sind bifunktional und beinhalten neben einer NADPH-Oxidaseauch eine Peroxidase-Domäne. Der vorliegende anti-DUOX-Antikörper detektierte beide Isoformen (DUOX 1 und 2). Im Vergleich zu aktivierten HSZ war die DUOX1/2-Expression auf Proteinebene in ruhenden HSZ am stärksten (Abbildung

A HSZ 2 Tage

3.13.), während die DUOX-mRNA-Expression in aktivierten HSZ höher war (Reinehr et al., 2005). Auf der anderen Seite erhöhte sich die Expression der regulatorischen Untereinheit p47^{phox} mit der Kultivierungsdauer (Abbildung 3.13.B). Obwohl ruhende HSZ die für die Funktion der NADPH-Oxidase nötigen Untereinheiten exprimieren, reagierten diese Zellen in Abhängigkeit von CD95L nicht mit der Bildung von ROS (angezeigt durch den Anstieg an DCFDA-Fluoreszenz). In Hepatozyten dagegen wurde eine signifikante ROS-Antwort beobachtet (Abbildung 3.14.).



Abbildung 3.14.: CD95L induziert die Bildung von ROS in Parenchymzellen (Reinehr et al., 2008)

HSZ wurden isoliert, 1-2 oder 14 Tage kultiviert und mit 24 h-kultivierten Parenchymzellen (PZ) verglichen. Die Stimulation mit CD95L (100 ng/m) führte in PZ zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), angezeigt durch die DCFDA-Fluoreszenz. In HSZ dagegen konnte keine signifikante ROS-Antwort beobachten werden. Die DCFDA-Fluoreszenz Fluoreszenz von Kontrollzellen wurde gleich 1 gesetzt (*p<0.05, n=3).

Entsprechend dieser Ergebnisse, blieb eine Serinphosphorylierung von p47^{phox} nach Stimulation mit CD95L in ruhenden HSZ aus. In Hepatozyten dagegen fand die Serinphosphorylierung binnen einer Minute statt (Abbildung 3.15.). Dies könnte ein Hinweis auf die Aktivierung der NADPH-Oxidase und der Bildung von ROS sein, da aus der Literatur bekannt ist, dass der Aktivierung der NADPH-Oxidase eine Aktivierung der regulatorischen Untereinheit p47^{phox} vorausgeht (Pani et al., 2001; Bokoch & Diebold, 2002).



Abbildung 3.15.: CD95L-induzierte p47^{phox}-Serinphosphorylierung in Parenchymzellen der Leber (Reinehr et al., 2008)

HSZ wurden isoliert, 2 oder 14 Tage kultiviert und mit 24 h-kultivierten Parenchymzellen (PZ) verglichen. Die Stimulation mit CD95L (100 ng/ml) führte innerhalb einer Minute zu einer starken p47^{phox}-Serinphosphorylierung in PZ, nicht jedoch in ruhenden HSZ. Dagegen wurde ein geringe p47^{phox}-Phosphorylierung in transformierten HSZ beobachtet. Gesamt-p47^{phox} diente als Beladungskontrolle (n=3).

Ferner konnte gezeigt werden, dass weder L-NMMA noch Harnsäure, ein potenter Peroxynitrit-Radikalfänger (Whiteman & Halliwell, 1996) oder Apozynin, ein NADPH-Oxidase Hemmstoff der vor einer CD95L-induzierten CD95-Tyrosinnitrierung in ruhenden HSZ schützen (Abbildung 3.16.A). Diese Befunde zeigten, dass p47^{phox}-abhängige NADPH-Oxidasen, NO und Peroxynitrit eine unbedeutende Rolle bei der CD95L-induzierten Tyrosinnitrierung spielen. Eine geringe, aber signifikante Inhibierung der CD95L-induzierten CD95-Tyrosinnitrierung wurde in Anwesenheit von Katalase beobachtet. In Anwesenheit von Methimazol, Thiouracil und Aminotriazol dagegen war eine signifikante Hemmung zu beobachten (Abbildung 3.16.B). Methimazol, Thiouracil und Aminotriazol wurden auch als Inhibitoren der DUOX-Enzyme beschrieben (Nagasaka & Hidaka, 1976; Ha et al., 2005), obgleich die Spezifität dieser Hemmstoffe sehr fraglich ist.



Abbildung 3.16.: Charakterisierung der CD95L-induzierten CD95-Tyrosinnitrierung (Reinehr et al., 2008)

HSZ wurden isoliert und 48 h kultiviert. CD95 wurde immunpräzipitiert, die CD95-Tyrosinnitrierung per Western Blot analysiert und anschließend densitometrisch ausgewertet, wobei die Nitrierung unter Kontrollbedingungen gleich 1 gesetzt wurde. Gesamt-CD95 diente als Beladungskontrolle. (**A**) HSZ wurden 3 h mit CD95L (50 ng/ml) stimuliert. Harnsäure (200 µmol/L), Apozynin (300 µmol/L), L-NMMA (1 mmol/L), BAPTA (20 µmol/L) oder Katalase (8000 U/ml) wurden 30 min vorinkubiert. Die geringe, aber signifikante CD95L-induzierte Tyrosinnitrierung, konnte im Gegensatz zu Harnsäure, Apozynin, L-NMMA und BAPTA durch Katalase inhibiert werden (*p<0.05, n=6). (**B**) HSZ wurden 1 h mit CD95L (50 ng/ml) stimuliert, Thiouracil, Methimazol und Aminotriazol (jeweils 1mmol/L) 30 min vorinkubiert. Alle drei Inhibitoren verringerten die CD95Linduzierte Tyrosinnitrierung signifikant (*p<0.05, n=3).

3.1.7. Cycloheximid sensibilisiert aktivierte, nicht jedoch ruhende HSZ, gegenüber der CD95L-induzierten Apoptose

Es konnte gezeigt werden, dass Cycloheximid (CHX), ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese auf Ebene der Peptidelongation, aktivierte HSZ gegenüber CD95L-induzierter Apoptose, sensibilisiert (Gong et al., 1998; Cariers et al., 2002). Diese pro-apoptotische Wirkung von CHX wurde in anderen Zelltypen auf eine Hemmung der Synthese kurzlebiger anti-apoptotischer Proteine wie FLIP zurückgeführt (Fulda et al., 2000). Die Herunterregulation von FLIP durch CHX wurde auch in aktivierten HSZ beobachtet, jedoch trat der Effekt erst nach 6 h (nicht gezeigt), also viel später als die CD95L-induzierte DISC-Bildung in Hepatozyten ein (Reinehr et al., 2003).

Um weitere Erkenntnisse der CD95-Aktivierung durch CD95L zu erhalten, wurden die bekannten Schritte die zur CD95-Aktivierung in Hepatozyten (Malhi et al., 2006) führen mit den CD95L-Reaktionen in ruhenden und aktivierten HSZ verglichen (Abbildung 3.17.A). Wie schon zuvor im Detail gezeigt, induzierte CD95L in Leberparenchymzellen eine schnelle p47^{phox}-Serinphosphorylierung. Das daraus entstandene NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Signal löste eine Yes-Aktivierung, gefolgt von einer Yes-abhängigen EGFR-Aktivierung aus. Auch in ruhenden und aktivierten HSZ induzierte CD95L eine EGFR-Aktivierung, welche aber im Vergleich zur Antwort in Hepatozyten Liganden-abhängig war.

CD95L produziert in Parenchymzellen ein JNK-Signal, welches die EGFR/CD95-Assoziation und somit die EGFR-katalysierte CD95-Tyrosinphosphorylierung und DISC-Bildung auslöst, das heißt, die Rekrutierung von FADD und der Caspase-8 an den CD95 (Reinehr et al., 2003; Eberle et al., 2005 und 2007). Keine dieser Reaktionen konnte in ruhenden oder aktivierten HSZ beobachtet werden. Nach simultaner Stimulation mit CHX, konnte jedoch in ruhenden sowie aktivierten HSZ gezeigt werden, dass es JNK-vermittelt zu einer Assoziation des EGFR mit dem CD95 kommt (Abbildung 3.17.B).

Eine EGFR-katalysierte CD95-Tyrosinphosphorylierung mit nachfolgender DISC-Bildung (Reinehr et al., 2003) wurde dagegen nur in aktivierten HSZ beobachtet, da es selbst in Anwesenheit von CHX zu einer Tyrosinnitrierung des CD95 in ruhenden HSZ kam und somit zur Unterdrückung der apoptotischen Signalkaskade.





HSZ wurden 2 bzw. 14 Tage, PZ 24 h kultiviert und dann mit 100 ng/ml CD95L und CHX (0,5 µmol/L) stimuliert. (**A**) Yes, EGFR und CD95 wurden immunpräzipitiert und per Western Blot analysiert. Eine Yes-Y⁴¹⁸-Phosphorylierung und EGFR-Tyrosinphosphorylierung (EGFR-Y-P) konnte 1 min nach CD95L-Stimulation detektiert

werden. Die EGFR/CD95-Assoziation und CD95-Tyrosinphosphorylierung (CD95-Y-P) wurde 60 min nach CD95L-Exposition beobachtet, wohingegen die DISC-Bildung, also die Caspase-8/CD95- und FADD/CD95-Assoziation erst 3 h nach CD95L-Stimulation detektiert werden konnte. In PZ konnte im Gegensatz zu HSZ eine CD95L-induzierte Yes-Phosphorylierung beobachtet werden. Eine EGFR-Phosphorylierung trat in beiden Zelltypen ein, wobei die EGFR/CD95-Assoziation die Zugabe von CHX benötigte. Allein in ruhenden HSZ löste CD95L eine CD95-Tyrosinnitrierung aus. CD95L induzierte in PZ eine CD95-Tyrosinphosphorylierung, welche auch nach simultaner Stimulation mit CHX in aktivierten HSZ beobachtet werden. (B) Die JNK-1/-2-Phosphorylierung wurde mittels spezifischer Antikörper in ruhenden und aktivierten HSZ bestimmt. Gesamt-JNK diente als Beladungskontrolle. CD95L/CHX, nicht jedoch CD95L allein induzierten eine JNK-1/-2-Phosphorylierung (n=3).

3.2. CD95 Ligand-unabhängige Signaltransduktion

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen der durch Gallensäuren hervorgerufenen Reaktionen in ruhenden, sowie aktivierten Sternzellen der Ratte.

3.2.1. Gallensalz-induzierte Phosphorylierung des EGFR in ruhenden HSZ

HSZ wurden 48 h kultiviert und dann mit dem Gallensalz Taurolithocholsäure-3-Sulfat (TLCS) stimuliert. TLCS löste innerhalb von 30 min eine Phosphorylierung der Tyrosinreste 845 und 1173 des EGFR in ruhenden HSZ aus, wobei die Phosphorylierung am Tyrosinrest 1045 ausblieb (Abbildung 3.18.). Die Phosphorylierung am Tyrosinrest 845 konnte durch Hemmstoffe der Src-Kinasen unterdrückt werden. Durch Inhibierung der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität wurde auch die EGFR-Autophosphorylierung an Position Y¹¹⁷³, nicht jedoch an Position Y⁸⁴⁵, unterdrückt. In Übereinstimmung mit zuvor gezeigten Ergebnissen (Abbildung 3.4.) induzierten CD95L und EGF eine starke Phosphorylierung der EGFR-Tyrosinreste 845, 1045 und 1173 (Abbildung 3.18.).



Abbildung 3.18.: TLCS-induzierte Phosphorylierung des EGFR

HSZ wurden 48 h kultiviert und dann mit TLCS (100 μmol/L), CD95L (100 ng/ml) oder EGF (50 ng/ml) stimuliert. SU6656 (10 μmol/L), ein Inhibitor der Src-Kinasen und AG1478 (5 μmol/L), ein EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor wurden 30 min vor CD95L-Stimulation zugegeben. Die Phosphorylierung der EGFR-Tyrosinreste Y⁸⁴⁵, Y¹⁰⁴⁵ und Y¹¹⁷³ wurde mittels Western Blot analysiert. Gesamt-EGFR diente als Beladungskontrolle (n=3). Wie schon in Abbildung 3.4. gezeigt, induzierten CD95L und EGF eine EGFR-Tyrosinphosphorylierung an den Positionen Y⁸⁴⁵, Y¹⁰⁴⁵ und Y¹¹⁷³. Im Gegensatz dazu löste TLCS nur an den Positionen Y⁸⁴⁵ und Y¹¹⁷³ eine Tyrosinphosphorylierung des EGFR aus, welche sensitiv gegenüber Inhibierung der Src-Kinasen war. Dagegen konnte durch Inhibierung der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität die EGFR-Autophosphorylierung an Position Y¹¹⁷³, nicht jedoch an Position Y⁸⁴⁵, unterdrückt werden.

Da TLCS keine Phosphorylierung am Tyrosinrest 1045 auslösen konnte, war eine Liganden-abhängige EGFR-Aktivierung durch EGF, *transforming growth factor* (TGF)- α oder *heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) sehr unwahrscheinlich.

Da die EGFR-Tyrosinkinase-Domäne (z.B. EGFR-Y⁸⁴⁵) ein Substrat der Src-Kinasen ist und Yes eine Gallensalz-induzierte EGFR-Aktivierung in Hepatozyten vermittelt (Reinehr et al., 2004), wurde getestet, ob Gallensalze eine Src-Kinase-vermittelte EGFR-Aktivierung in ruhenden HSZ induzieren können. Wie in Abbildung 3.19.A gezeigt, führte die Stimulation mit den hydrophoben Gallensalzen TLCS, Taurochenodesoxycholat (TCDC) und Glycochenodesoxycholat (GCDC) innerhalb 30 min zu einer starken Yes-Phosphorylierung, während nur eine schwache Phosphorylierung von c-Src und keine Fyn-Phosphorylierung beobachtet werden konnte. Das hydrophobe Gallensalz Tauroursodesoxycholat (TUDC) induzierte eine c-Src-Phosphorylierung, während die Phosphorylierung von Yes nur sehr schwach auszumachen war (Abbildung 3.19.A).



Abbildung 3.19.: Gallensalz-induzierte Src-Kinase-Aktivierung und Assoziation des EGFR mit Yes

HSZ wurden 48 h kultiviert und dann 30 min mit TLCS, TCDC, TC, TUDC oder GCDC (alle 100 µmol/L) stimuliert. (**A**) Eine Yes-, Src- und Fyn-Phosphorylierung wurde mittels phosphospezifischer Antikörper bestimmt. Gesamt-Yes, -Src und -Fyn dienten als Beladungskontrollen. Die hydrophoben Gallensalze TLCS, TCDC und GCDC induzierten eine starke Yes-Phosphorylierung, wohingegen nur eine geringe Src-Phosphorylierung sichtbar war. Das Gallensalz TUDC dagegen löste nur eine geringe Yes-Phosphorylierung aus und führte zusätzlich zu einer Phosphorylierung von Src (n=3). (**B**) Eine mögliche Assoziation des EGFR mit Yes, Src oder Fyn wurde mit Hilfe der EGFR-Immunpräzipitation und nachfolgender Western Blot-Analyse sichtbar gemacht. Gesamt-EGFR diente als Beladungskontrolle. TLCS, TCDC und GCDC induzierten im Gegensatz zu TUDC und TC eine starke Yes/EGFR-Assoziation (n=3).

Src-Kinase-vermittelte EGFR-Transaktivierung Da die eine physikalische Assoziation der beiden Proteine benötigt, wurde eine mögliche Assoziation zwischen dem EGFR und den Mitgliedern der Src-Kinase-Familie Yes, c-Src und Fyn untersucht. Wie in Abbildung 3.19.B konnte durch Immunpräzipitation und nachfolgender Detektion im Western Blot mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper eine Assoziation zwischen Yes und EGFR, dagegen aber nicht zwischen dem EGFR und c-Src oder Fyn beobachtet werden. Während TLCS, TCDC und GCDC eine starke EGFR/Yes-Assoziation induzierten, war das durch TUDC ausgelöste Signal nur sehr schwach (Abbildung 3.19.B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TLCS, TCDC und GCDC die Src-Kinase Yes aktivieren, gefolgt von einer Assoziation von Yes und EGFR und einer Yes-vermittelten EGFR-Aktivierung.

3.2.2. Die Gallensalz-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt zu einer Yes-vermittelten Phosphorylierung des EGFR in ruhenden HSZ

Es stellte sich nun die Frage, ob hydrophobe Gallensalze, also TLCS, TCDC und GCDC zu einer NADPH-Oxidase-abhängigen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie in Hepatozyten beobachtet (Reinehr et al., 2005), führen.

Die Serinphosphorylierung der zytosolisch lokalisierten regulatorischen Untereinheit p47^{phox} der NADPH-Oxidase ist ein wichtiges Element bei der Gallensalz-induzierten ROS-Bildung. Wie in Abbildung 3.20. zu erkennen, lösten TLCS, TCDC und GCDC in ruhenden HSZ eine Serinphosphorylierung der p47^{phox} aus. Die Serin-Reste der p47^{phox}-Untereinheit, die durch Phosphorylierung ihre Konformation ändert (Bokoch & Diebold, 2002), sind ein Substrat der Proteinkinase C (PKC)ζ (Dang et al., 2001; Fontayne et al., 2002), einer Serin/Threonin-Kinase, die an einer Vielzahl von Regulationsvorgängen wie der Steuerung von Proliferation und Apoptose beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren der Proteinkinase Cζ (PKCζ-Inhibitor, ASM Chelerythrin) und der (AY9933, Desipramin) die aktivierende Serinphosphorylierung hemmen (Abbildung 3.20.).



Abbildung 3.20.: Charakterisierung der Gallensalz-bedingten EGFR-Phosphorylierung in ruhenden HSZ

HSZ wurden 48 h kultiviert und dann 30 min mit TLCS, TCDC, TC, TUDC oder GCDC (alle 100 µmol/L) stimuliert. Die Inhibitoren AY9933 (5 µmol/L), Desipramin (5 µmol/L), PKCζ-Inhibitor (100 µmol/L), Chelerythrin (20 µmol/L), Apozynin (300 µmol/L), Diphenyleniodonium (DPI, 10 µmol/L), SU6656 (10 µmol/L), PP-2 (10 µmol/L) und AG1478 (5 µmol/L) wurden 30 min, GM6001 (25 µmol/L) 16 h zuvor hinzugegeben. $p47^{phox}$, Yes and EGFR wurden immunpräzipitiert und dann hinsichtlich einer $p47^{phox}$. Serinphosphorylierung, Yes-Y⁴¹⁸-Phosphorylierung und EGFR-Tyrosinphosphorylierung analysiert. Geamt- $p47^{phox}$, -Yes und -EGFR dienten als Beladungskontrollen (n=3). Die TLCS-induzierte Aktivierung von $p47^{phox}$ war sensitiv gegenüber Inhibierung der sauren Sphingomyelinase und der Proteinkinase C ζ . Zusätzlich war die TLCS-induzierte Yes-Phosphorylierung des EGFR konnte auch durch die Inhibitoren, die sowohl die NADPH-Oxidase als auch die Yes-Aktivierung hemmten, unterdrückt werden. TLCS, TCDC und GCDC lösten eine Phosphorylierung der $p47^{phox}$, Yes und des EGFR aus.

Um die These, Gallensalze induzieren eine NADPH-Oxidase-getriebene ROS-Bildung, zu untermauern, wurden HSZ 48 h kultiviert und die ROS-Bildung mittels DCFDA-Fluoreszenz gemessen. TLCS, TCDC und GCDC lösten innerhalb von 5 min eine signifikante Zunahme der DCFDA-Fluoreszenz aus, die eine erhöhte intrazelluläre ROS-Bildung andeutet (Abbildung 3.21.A). Dagegen, war nur eine leichte, nicht signifikante Zunahme der DCFDA-Fluoreszenz nach Stimulation mit TC und TUDC zu beobachten (Abbildung 3.21.A). Die TLCS-induzierte ROS-Bildung in ruhenden HSZ konnte durch Hemmstoffe der sauren Sphingomyelinase (AY9933) und der Proteinkinase Cζ (PKCζ-Inhibitor) (Abbildung 3.21.B) unterdrückt werden. Zusätzlich wurde die TLCS-induzierte ROS-Bildung in ruhenden HSZ durch die Inhibitoren Apozynin und DPI der NADPH-Oxidase gehemmt (Abbildung 3.21.B).



Abbildung 3.21.: Gallensalz-induzierte Bildung von ROS in ruhenden HSZ

HSZ wurden 48 h kultiviert und dann 5 min mit TLCS, TCDC, TC, TUDC oder GCDC (alle 100 μ mol/L) behandelt. AY9933 (5 μ mol/L), PKCζ-Inhibitor (100 μ mol/L), Apozynin (300 μ mol/L) oder Diphenyleniodonium (DPI, 10 μ mol/L) wurden 30 min vorinkubiert. Die Bildung von ROS wurde mittels Veränderungen der DCFDA-Fluoreszenz, verglichen mit Kontrollzellen (gleich 1 gesetzt), ermittelt. (**A**) TLCS, TCDC und GCDC induzierten, verglichen mit TC und TUDC, eine starke ROS-Bildung (*p<0.05, n=3). (**B**) Die TLCS-induzierte Bildung von ROS wurde durch Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase, PKCζ und NADPH-Oxidase unterdrückt ([#]p<0.05, n=3).

In Hepatozyten induziert die Gallensalz-bedingte ROS-Bildung eine Aktivierung von Yes wahrscheinlich durch Inhibierung der Yes-Kinase-regulierenden Phosphatasen (Reinehr et al., 2004). Daher wurde auch in ruhenden HSZ getestet, ob die saure Sphingomyelinase (acidic sphingomyelinase, ASM), PKCζ und die NADPH-Oxidase vorgeschaltete Enzyme der Gallensalz-vermittelten Yes-Aktivierung sind. Die durch TLCS, TCDC und GCDC ausgelöste Yes-Phosphorylierung war nicht nur sensitiv gegenüber Inhibitoren der NADPH-Oxidase (Apozynin, DPI), sondern auch Desipramin) und PKCζ gegenüber der ASM (AY9933, (PKCZ-Inhibitor, Chelerythrin). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der ASM, PKCζ und der NADPH-Oxidase der Gallensalz-induzierten Yes-Phosphorylierung vorgeschaltet ist. In Übereinstimmung mit der Literatur (Reinehr et al., 2004), konnte die Yes-Aktivierung mit dem Inhibitor SU6656 gehemmt werden. Dagegen hatte der Src-Kinase-Inhibitor PP-2 keinen Effekt auf die Yes-Kinase-Aktivität (Abbildung 3.20.). Auch der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 hatte keinen Effekt auf die

Gallensalz-bedingte Yes-Phosphorylierung, was darauf hindeutete, dass die EGFR-Phosphorylierung *downstream* der Yes-Aktivierung lokalisiert ist. Alle Inhibitoren, die eine Yes- und p47^{phox}-Aktivierung verhinderten, unterdrückten auch eine Gallensalz-induzierte EGFR-Phosphorylierung (Abbildung 3.20.).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass hydrophobe Gallensalze in ruhenden HSZ zu einer ASM- und PKC-ζ-abhängigen und NADPH-Oxidasegetriebenen ROS-Bildung führen, die ferner zu einer Aktivierung von Yes mit nachfolgender EGFR/Yes-Assoziation und Yes-Tyrosinkinase-vermittelten EGFR-Phosphorylierung am Tyrosinrest 845, gefolgt von einer EGFR-Phosphorylierung am Tyr-Y¹¹⁷³, führt.

3.2.3. Gallensalze stimulieren die Proliferation von ruhenden HSZ

Während die Gallensalz-induzierte EGFR-Aktivierung in Hepatozyten mit einer Aktivierung des CD95-Systems und anschließendem apoptotischen Zelltod assoziiert ist (Reinehr et al., 2003a), konnte in aktivierten HSZ eine Gallensalzbedingte HSZ-Proliferation beobachtet werden. Daher wurden die möglichen Effekte der Gallensalze auf die MAP-Kinasen (Abbildung 3.22.), Mitogenese (Abbildung 3.24.A), Proliferation (Abbildung 3.24.B), Transformation (Abbildung 3.24.) und Apoptose (Abbildung 3.25.) in ruhenden HSZ untersucht. Wie in Abbildung 3.22. gezeigt, führte die Stimulation mit TLCS in ruhenden HSZ zu einer starken Aktivierung von Erk-1/-2, wohingegen keine wesentliche Aktivierung von p38^{MAPK} und JNK-1/-2 beobachtet werden konnte. Da beschrieben wurde, dass CHX aktivierte HSZ gegenüber der CD95L-vermittelten Apoptose sensibilisiert (Cariers et al., 2002), wurden die Zellen simultan mit TLCS und CHX stimuliert. Während eine starke JNK-1/-2- und p38^{MAPK}-Phosphorylierung zu beobachten war, nahm die Aktivierung von Erk-1/-2 im Vergleich zur Stimulation ohne CHX ab. Interessanterweise konnte in Hepatozyten gezeigt werden, dass eine anhaltende JNK-1/-2-Phosphorylierung eine Voraussetzung für die CD95L-vermittelte Apoptose ist (Reinehr et al., 2003 und 2008).



Abbildung 3.22.: Gallensalz-induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen in ruhenden HSZ HSZ wurden 48 h kultiviert und dann mit TLCS (100 μmol/L) und CHX (0,5 μmol/L) stimuliert. Mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper wurde die Phosphorylierung der Erk-1/-2, p38^{MAPK} und JNK-1/-2 im Western Blot analysiert. Gesamt-Erk-1/-2, -p38^{MAPK} und -JNK-1/-2 dienten als Beladungskontrollen. TLCS induzierte innerhalb von 30 min eine starke Erk-1/-2. Phosphorylierung, wohingegen keine Aktivierung der p38^{MAPK} und JNK-1/-2 sichtbar war. Nach Zugabe von CHX dagegen, war nur noch eine leichte Erk-1/-2-Phosphorylierung, dagegen aber eine starke Aktivität der p38^{MAPK} und JNK-1/-2 nach 30 min zu erkennen (n=6).

Übereinstimmend mit früheren Beobachtungen in Kultur-aktivierten HSZ (Svegliati-Baroni et al., 2005), bedingte TLCS einen gesteigerten BrdU-Einbau (Abbildung 3.24.A) und eine erhöhte Zellzahl (Abbildung 3.24.B). Die Kinase-Inhibitoren Apozynin, SU6656, AG1478 und PD098059 konnten den TLCS-bedingten Einbau von BrdU signifikant hemmen (Abbildung 3.24.C). Der JNK-Inhibitor L-JNKI-1 dagegen hatte keinen Einfluss auf die TLCS-induzierte BrdU-Aufnahme. Diese Ergebnisse deuten an, dass TLCS als Mitogen wirkt und unter diesen Bedingungen eine Proliferation der HSZ bewirkt. Im Gegensatz dazu, kam es nach Stimulation mit TLCS, hinsichtlich der Expression von αSMA, nicht zu einer beschleunigten HSZ-Transformation in MFB-ähnliche Zellen (Abbildung 3.25.).



Abbildung 3.24.: Gallensalz-bedingt den Einbau von BrdU und HSZ Proliferation

HSZ wurden isoliert, 24 h kultiviert und dann mit TLCS (100 μ mol/L) und/oder CHX (0,5 μ mol/L) stimuliert. Die Inhibitoren Apozynin (300 μ mol/L), SU6656 (10 μ mol/L), AG1478 (5 μ mol/L), PD098059 (5 μ mol/L) und L-JNKI-1 (5 μ mol/L) wurden 30 min vor Stimulation hinzugegeben (**A**) TLCS bedingte innerhalb 48 h eine statistisch signifikante Zunahme des BrdU-Einbaus in ruhenden HSZ (*p<0.05, n=3). (**B**) Auch die Gesamtzahl der Zellen erhöhte sich nach Stimulation mit TLCS, wohingegen die Zellzahl nach Ko-Stimulation mit TLCS und CHX deutlich abnahm (*p<0.05, n=3). (**C**) Die Zugabe der Inhibitoren Apozynin, SU6656, AG1478 und PD098059 hemmte den BrdU-Einbau signifikant. Der JNK-Inhibitor L-JNKI-1 dagegen hatte keinen Einfluss auf die TLCS-induzierte Aufnahme von BrdU. Die simultane Stimulation von TLCS und CHX führte dagegen zu einem erniedrigten BrdU-Einbau. Die Zugabe des JNK-Inhibitor L-JNKI-1 bedingte hier eine erhöhte BrdU-Aufnahme (*p<0.05, n=3).

Überraschenderweise löste die simultane Stimulation mit TLCS und CHX eine starke Abnahme der Zellzahl (Abbildung 3.24.B), und einen erniedrigten BrdU-Einbau (Abbildung 3.24.A/C) aus, die durch Zugabe eines JNK-Inhibitors gehemmt werden konnte (Abbildung 3.24.C).





HSZ wurden 12 h kultiviert und dann entweder mit Kontrollmedium oder TLCS (100 μ mol/L) für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert. Die Expression von α SMA wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt. γ -Tubulin diente als Beladungskontrolle. TLCS hatte in Bezug auf die α SMA-Expression keine Wirkung auf die Transdifferenzierung in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp (n=3).

3.2.4. Cycloheximid sensibilisiert ruhende HSZ gegenüber Gallensalzinduzierte Apoptose

Hydrophobe Gallensalze sind in Hepatozyten in der Lage, Liganden-unabhängig *in vitro* sowie *in vivo* CD95-vermittelt Apoptose zu induzieren (Rodriguez et al., 1998; Faubion et al., 1999; Yoon & Gores, 2002; Reinehr et al., 2003a). HSZ jedoch sind resistent gegen eine Gallensalz-induzierte Apoptose (Kim et al., 2006; Svegliati-Baroni et al., 2005).

Wie in Abbildung 3.26.A gezeigt, sensibilisiert CHX ruhende HSZ gegenüber der TLCS-induzierten Apoptose, wohingegen die Exposition mit TLCS oder CHX allein keinen apoptotischen Zelltod auslöste. Die durch TLCS und CHX induzierte Zunahme an TUNEL-positiven Zellen, konnte durch Zugabe, von Apozynin, SU6656 und AG1478, sowie dem JNK-Inhibitor L-JNKI-1 gehemmt werden. Der Erk-1/-2 Inhibitor PD098059 dagegen hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate (Abbildung 3.26.B).



Abbildung 3.26.: Die Ko-Stimulation von TLCS und CHX führt zu einer erhöhten Apoptoserate in ruhenden HSZ

HSZ wurden 24 h kultiviert und dann 18 h mit TLCS (100 μ mol/L) und/oder CHX (0,5 μ mol/L) inkubiert. Die Inhibitoren Apozynin (300 μ mol/L), SU6656 (10 μ mol/L), AG1478 (5 μ mol/L), PD098059 (5 μ mol/L) und L-JNKI-1 (5 μ mol/L) wurden 30 min vor Stimulation hinzugegeben. (**A**) Die simultane Stimulation mit CHX führte zu einer signifikanten Zunahme der TUNEL-positiven Zellen, wohingegen TLCS und CHX allein keinen Effekt auf die Apoptoserate hatten (*p<0.05, n=6). (**B**) Die durch TLCS und CHX induzierte Zunahme an TUNEL-positiven Zellen, konnte durch Zugabe des JNK-Inhibitors L-JNKI-1, sowie Apozynin, SU6656 und AG1478 gehemmt werden. Der Erk-1/-2 Inhibitor PD098059 dagegen hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate (*p<0.05, n=3).

Um die zugrunde liegenden Mechanismen der Signaltransduktion aufzuklären, wurden die entscheidenden Schritte der Aktivierung des CD95-Systems in ruhenden HSZ nach Behandlung mit TLCS und CHX untersucht (Abbildung 3.27.). TLCS allein oder nach simultaner Stimulation mit CHX induzierte eine Aktivierung des EGFR, welche durch das Antioxidans NAC und dem Src-Inhibitor SU6656 inhibiert werden konnte. TLCS und CHX gemeinsam lösten zusätzlich, wie schon in Abbildung 3.22. gezeigt, eine starke JNK-1/-2-Phosphorylierung aus, welche mit L-JNKI1, einem JNK-1/-2-inhibitorischen Peptid (Abbildung 3.27.) gehemmt werden konnte. Eine physikalische Assoziation zwischen dem EGFR und CD95 konnte nur nach simultaner Stimulation mit TLCS und CHX, jedoch nicht nach alleiniger Stimulation mit TLCS oder CHX beobachtet werden. Während CD95L ruhende HSZ vor einer CD95-vermittelten Apoptose durch Tyrosinnitrierung des CD95 schützt (Abbildung 3.17.A), konnte keine Tyrosinnitrierung nach Stimulation mit TLCS und CHX, dagegen aber eine CD95-Tyrosinphosphorylierung, gezeigt werden (Abbildung 3.27.). Diese CD95-Tyrosinphosphorylierung erlaubte die Assoziation von FADD und Caspase-8 mit CD95 (DISC-Bildung, Abbildung 3.27.).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Gallensalze in ruhenden HSZ als mitogenes und proliferatives Signal unter Einbindung des EGFR wirken. Wird jedoch ein Ko-Stimulus, z.B. CHX, der zu einer Aktivierung von JNK-1/-2 führt, zugefügt, so kommt es zur Assoziation von EGFR und CD95, wodurch die apoptotische Signalkaskade aktiviert wird.



Abbildung 3.27.: Gallensalz-induzierte Aktivierung des CD95-Systems

2 Tage alte HSZ wurden mit TLCS (100 µmol/L), CHX (0,5 µmol/L) oder CD95L (100 ng/ml) über einen Zeitraum von 3 h stimuliert. Die Inhibitoren N-Acetylcystein (NAC, 30 mmol/L), SU6656 (10 µmol/L), JNK-Inhibitor (L-JNKI-1, 5 µmol/L) oder AG1478 (5 µmol/L) wurden 30 min vorgegeben. EGFR und CD95 wurden immunpräzipitiert und dann hinsichtlich der Tyrosinphosphorylierung und -nitrierung, sowie der DISC-Bildung mit spezifischen Antikörpern mittels Westen Blot analysiert. Eine Aktivierung von JNK-1/-2 konnte mit Hilfe von phophospezifischen Antikörpern detektiert werden. Die EGFR-Tyrosinund JNK-1/-2-Phosphorylierung wurde nach 30 min, die CD95/EGFR-Assoziation, CD95-Tyrosinphosphorylierung (CD95-Y-P) und CD95-Tyrosinnitrierung (CD95-Y-NO₂) nach 60 min und die DISC-Bildung nach 3 h detektiert. Gesamt-EGFR, -CD95 und -JNK-1/-2 dienten als Beladungskontrollen. TLCS und CD95 induzierten eine Phosphorylierung des EGFR, lösten dagegen aber keine JNK-1/-2-Aktivierung, eine Voraussetzung für die CD95/EGFR-Assoziation und CD95-Tyrosinphosphorylierung, aus. Zusätzlich bedingte CD95 eine CD95-Tyrosinnitrierung, wohingegen keine Nitrierung nach Stimulation mit TLCS erfolgte. Wurden TLCS und CHX simultan verabreicht, so kam es zu einer starken JNK-1/-2-Phosphorylierung, mit nachfolgender CD95/EGFR-Assoziation, welche durch L-JNKI-1 Zugabe des **JNK-Inhibitors** gehemmt werden konnte (n=3).

4. Diskussion

4.1. CD95L-induzierte EGFR-Aktivierung in hepatischen Sternzellen

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Stimulation mit CD95L zu einer schnellen Aktivierung des EGFR in HSZ. Diese Aktivierung ist scheinbar Liganden-abhängig und bedingt eine Proteinase-vermittelte Ablösung von EGF, die wiederum den EGFR in einem auto- und parakrinem Weg aktiviert. Ein ähnlicher Mechanismus für die EGFR-Aktivierung in Abhängigkeit von pro-apoptotischen Gallensalzen wurde kürzlich in Cholangiozyten beschrieben (Werneburg et al., 2003). Auch in dieser Arbeit konnte eine EGFR-Tyrosinphosphorylierung an den Positionen 845, 1045 und 1173 gezeigt werden. Diese Tyrosinreste werden auch in Ratten-Hepatozyten nach Zugabe von exogenem EGF phosphoryliert (Reinehr et al., 2004).

Im Gegensatz zu den HSZ, aktiviert CD95L in Hepatozyten den EGFR über einen Liganden-unabhängigen Weg. CD95L aktiviert die p47^{phox}, eine regulatorische Untereinheit der NADPH-Oxidase und das so entstandene oxidative Stresssignal aktiviert die Src-Kinase Yes (Reinehr et al., 2005). Yes leitet dann die Phosphorylierung des EGFR am Tyr⁸⁴⁵ ein, gefolgt von dessen Aktivierung der Autophosphorylierung an Tyr¹¹⁷³. Unter diesen Bedingungen wird der EGFR nicht am Tyr¹⁰⁴⁵ phosphoryliert und die EGFR-Internalisierung bleibt in Ratten-Hepatozyten unter dem Einfluss von CD95L aus (Eberle et al., 2005 und 2007). Das schnelle CD95L-induzierte oxidative Stresssignal leitet auch die Aktivierung der JNKs ein, welche für die Apoptose-Induktion in Hepatozyten benötigt werden (Reinehr et al., 2003b und 2005; Malhi et al., 2006). Interessanterweise konnte keine dieser Antworten, also die Induktion der p47^{phox}-Serinphosphorylierung, das oxidative Stresssignal und die Yes- und JNK-Aktivierung in Abhängigkeit von CD95L in ruhenden und aktivierten HSZ beobachtet werden. Dass CD95L kein JNK-Signal in HSZ auslöst, könnte erklären, warum die EGFR-Aktivierung nicht von einer EGFR/CD95-Assoziation und nachfolgender CD95-Tyrosinphosphorylierung, wie man es in Hepatozyten beobachten kann, begleitet wird (Reinehr et al., 2005; Malhi et al., 2006). Auch in Mesangialzellen der Ratte wurde beschrieben, dass eine Phosphorylierung der JNK Zellen gegenüber einer TNFα-induzierten Apoptose sensibilisieren kann (Guo et al., 1998a). Eine anhaltende JNK-Aktivierung wurde als wichtiger Auslöser für Apoptose durch verschiedene Stimuli beschrieben (Guo et al., 1998a/b; Chen et al., 2001; Reinehr et al., 2003b, 2004 und 2005) und hat wahrscheinlich Einfluss auf die Genexpression und die Mitochondrien (Leppa et al., 1999; Kharbanda et al., 2000).

Entsprechend der Inhibitorstudien ist die Matrixmetalloproteinase (MMP) 9 wahrscheinlich in die Vermittlung der EGF-Abspaltung als Antwort auf CD95L in ruhenden HSZ involviert. c-Src wurde *upstream* der EGFR-Aktivierung nachgewiesen. Schon in verschiedenen Tumorzelllinien konnte eine Src-abhängige MMP9-Sekretion und -Aktivierung gezeigt werden (Razandi et al., 2003; Segarra et al., 2005).

4.2. CD95L als mitogenes, anti-apoptotisches Signal in ruhenden HSZ

Es konnte gezeigt werden, dass CD95L in ruhenden, nicht jedoch in aktivierten HSZ als mitogenes Signal wirkt. Auch die Stimulation mit anderen Liganden der TNF-Rezeptorfamilie resultierte in ruhenden HSZ in einer Phosphorylierung des EGFR, einer Erk-Phosphorylierung und einem erhöhten Einbau von BrdU. Diese unerwartete Antwort auf die Todesrezeptor-Liganden muss in dem Kontext kürzlich veröffentlichter Ergebnisse betrachtet werden. Es wurde beschrieben, dass sich HSZ in Myofibroblasten, Endothelzellen und Hepatozyten differenzieren können und wahrscheinlich ein Progenitor-/Stammzellkompartiment in der Leber darstellen (Kordes et al., 2007). Demnach könnten HSZ eine große Rolle bei der Leberregeneration in Folge einer Leberverletzung, die von der Abgabe verschiedener Zytokine, einschließlich Todesrezeptor-Liganden begleitet wird, spielen. Aus teleologischer Sicht, sollten Progenitor-/Stammzellen, wenn sie solch Zytokinmilieu ausgesetzt sind, proliferieren nicht einem und sterben. Dementsprechend wirkt CD95L in ruhenden HSZ nicht nur proliferationsfördernd, sondern inaktiviert gleichzeitig auch CD95 durch Tyrosinnitrierung. Jedoch ist das mitogene Potential von CD95L im Vergleich zu EGF oder PDGF sehr gering und die physiologische Relevanz dieses Befundes muss weiter untersucht werden.

Ebenso ist unklar, in welchem Umfang sich EGF in Abhängigkeit von CD95L aus HSZ löst, und eine regenerative Antwort in benachbarten Hepatozyten auslösen kann.

Der CD95 besitzt 3 Tyrosinreste. Zwei von diesen (Tyr²³² und Tyr²⁹¹) sind in der sogenannten Todesdomäne des Rezeptors lokalisiert und wie durch mehrere Studien gezeigt werden konnte, ist ihre Phosphorylierung für die Übertragung des CD95-Todessignals essentiell (Eberle et al., 2005 und 2007). Eine Nitrierung dieser

Tyrosinreste erlaubt keine weitere Phosphorylierung und inhibiert dadurch die proapoptotische CD95-Signalkaskade (Reinehr et al., 2004). Interessanterweise induziert nicht nur CD95L, sondern auch TNFa und TRAIL eine Tyrosinnitrierung in ruhenden HSZ, was auf eine Wechselbeziehung zwischen den verschiedenen Todesrezeptorsystemen schließen lässt. Die Inaktivierung des CD95-Todesrezeptors in ruhenden, aber nicht in aktivierten HSZ erklärt auch, warum CHX aktivierte und nicht ruhende HSZ gegen den CD95L-induzierten Zelltod sensibilisieren kann. CHX erzeugt in beiden Fällen das fehlende JNK-Signal, welches für die Assoziation des EGFR mit CD95 benötigt wird. Eine CD95-Tyrosinphosphorylierung und Apoptose wird aber nur in aktivierten HSZ eingeleitet. Aus der Literatur ist bekannt, dass CHX als Translationshemmer wirkt und die Resistenz gegenüber der CD95-induzierten Apoptose in aktivierten HSZ abhängig von der Proteinsynthese ist (Gong et al., 1998). Eine Sensibilisierung von Zellen gegenüber der CD95-induzierten Apoptose durch Inhibitoren der Translation, Transkription oder Proteinkinase C wurde auch in Hepatozyten (Roquet et al., 1996; Tanaka et al., 1998) und einigen nicht-hepatischen Zelltypen (Ogasawara et al., 1993; Itoh & Nagata, 1993) beschrieben.

Schema 4.1. fasst die aktuelle Sicht der Wirkung von CD95L in ruhenden und aktivierten HSZ, sowie Hepatozyten der Rattenleber zusammen.




JNK-Signal erzeugt wird, wird die pro-apoptotische Signalkaskade unterdrückt. Die Zugabe von CHX löst die fehlende JNK-Phosphorylierung aus, sodass Ruhende HSZ: CD95L induziert eine Liganden-abhängige EGFR-Aktivierung über einen Src- und MMP-abhängigen Mechanismus, der die mitogene Wie in ruhenden HSZ, induziert CD95L eine Liganden-abhängige EGFR-Aktivierung, dagegen aber keine inaktivierende CD95-Tyrosinnitrierung. Da kein Signaltransduktion auslöst. Eine simultan induzierte CD95-Tyrosinnitrierung verhindert die pro-apoptotische CD95-Signaltransduktion. Aktivierte HSZ/MFB: CD95 und EGFR assoziieren, CD95 phosphoryliert, der DISC gebildet und Apoptose ausgelöst werden kann. Modifiziert nach Reinehr et al., 2008.

4.3. Mechanismus der CD95L-induzierten CD95-Tyrosinnitrierung

Die Mechanismen, die der CD95L-induzierten Inaktivierung von CD95 durch die Tyrosinnitrierung zu Grunde liegen sind unklar. Die Inhibitorstudien suggerieren, dass p47^{phox}-abhängige NADPH-Oxidase-(Nox)-Isoformen, NO und Peroxynitrit nicht am Prozess der CD95L-induzierten Tyrosinnitrierung beteiligt sind. Neben Peroxynitrit, ist Nitrogendioxidradikal (NO2) ein anderes nitrierendes Intermediat, das durch eine Peroxidase-katalysierte Oxidation von Nitrit generiert werden kann. Eine enzymatische Oxidation von Tyrosin durch Wasserstoffperoxid erlaubt die Bildung von Tyrosylradikalen, welche sich zusammen mit NO₂-Radikal zu Nitrotyrosin verbinden können. Übereinstimmend mit der erforderlichen Präsenz von Hydrogenperoxid für die CD95L-induzierte CD95-Tyrosinnitrierung, konnte eine Inhibierung der CD95L-induzierten CD95-Tyrosinnitrierung in Anwesenheit von Katalase in ruhenden HSZ beobachtet werden. Im Gegensatz zu aktivierten HSZ, exprimieren ruhende HSZ stärker bifunktionale DUOX-Enzyme. Diese weisen neben der NADPH-Untereinheit auch einen Peroxidaserest auf (Lambeth, 2002). In der Schilddrüse ist DUOX als prinzipieller H₂O₂-Bilder, der für die Schilddrüsenhormonsynthese benötigt wird, etabliert (Ris-Stalpers, 2006). Jedoch werden DUOX-Enzyme in fast allen Geweben exprimiert und ihre Funktion in nichtthyroidalen Geweben ist weitgehend unklar. Ob DUOX-Enzyme in die CD95Linduizierte Tyrosinnitrierung involviert sind, ist lediglich eine Spekulation, da Thiouracil, Methimazol und Aminotriazol in der Lage waren, die CD95-Tyrosinnitrierung signifikant zu inhibieren. Obwohl eine DUOX-Hemmung dieser Verbindungen schon publiziert wurde (Nagasaka & Hidaka, 1976; Ha et al., 2006), sollte bemerkt werden, dass die Inhibitoren eine Vielzahl anderer Effekte haben. Letztlich lässt sich sagen, das Todesrezeptor-Liganden wie CD95L in HSZ als Mitogene agieren und simultan die CD95-abhängige Signaltransduktion inaktivieren. Dies könnte die Zellen dahingehend unterstützen, ihre Rolle als Progenitor-/Stammzellkompartiment in der regenerierenden Leber nach einer

Leberverletzung wahrzunehmen.

68

4.4. Gallensalz-induzierte EGFR-Phosphorylierung in ruhenden HSZ

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Mechanismen der Gallensalz-induzierten Wirkung auf hepatische Sternzellen und deren Antagonisierung durch exogene Stimuli untersucht.

Durch mehrere Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass Gallensalze Zelltypabhängig eine Liganden-abhängige, sowie Liganden-unabhängige Aktivierung des EGFR in Hepatozyten und Cholangiozyten auslösen können. Diese Phosphorylierung ist mit einer Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden und mit einer Resistenz gegenüber Apoptose assoziiert (Qiao et al., 2001; Rao et al., 2002; Werneburg et al., 2003; Reinehr et al., 2003 und 2004; Rust et al., 2002).

In ruhenden HSZ konnte beobachtet werden, dass das hydrophobe proapoptotische Gallensalz TLCS eine schnelle Aktivierung des EGFR induziert. Diese Aktivierung ist im Vergleich zur CD95L-induzierten EGFR-Phosphorylierung Liganden-unabhängig, da TLCS keine Phosphorylierung am Tyrosinrest 1045, der die EGFR-Internalisierung nach Stimulation mit EGF oder TGFα induziert, auslöst. In Cholangiozyten dagegen, lösen pro-apoptotische Gallensalze wie TLCS eine Liganden-abhängige EGFR-Aktivierung aus (Werneburg et al., 2003).

Da die EGFR-Tyrosinkinase-Domäne (z.B. EGFR-Y⁸⁴⁵) ein Substrat der Src-Kinasen ist und Yes eine Gallensalz-induzierte EGFR-Aktivierung in Hepatozyten vermittelt (Reinehr et al., 2004), wurde getestet, ob Gallensalze eine Src-Kinasevermittelte EGFR-Aktivierung in ruhenden HSZ induzieren. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, aktivieren hydrophobe Gallensalze die Src-Kinase Yes, wohingegen andere Src-Kinasen, wie Fyn und c-Src nur sehr schwach aktiviert wurden. Die unterschiedlichen Gallensalze scheinen sich in ihrer Fähigkeit Src-Kinasen zu aktivieren zu unterscheiden, da sowohl TC als auch TUDC keine Yes-Aktivierung auslösen konnten. Der Befund der Src-vermittelten-EGFR-Aktivierung wurde durch eine schnelle Assoziation von Yes mit dem EGFR und eine SU6656sensitive Phosphorylierung des EGFR unterstützt. Ferner unterdrückten alle weiteren Inhibitoren, welche die Gallensalz-induzierte Yes-Aktivierung oder Yes/EGFR-Assoziation hemmten, die Gallensalz-induzierte EGFR-Assoziation. Dies lässt schlussfolgern, dass Yes als vorgeschaltete Kinase der EGFR-Phosphorylierung agiert. Dementsprechend konnte keine Interaktion der TLCSinduzierten Yes-Aktivierung mit AG1478 beobachtet werden. Gefolgt von einer direkten Phosphorylierung des EGFR-Y¹¹⁷³ induziert TLCS eine EGFR- Phosphorylierung am Tyrosinrest 845. Demnach könnte EGFR-Y⁸⁴⁵ das primäre Ziel der Yes-Kinase-Aktivität sein. Die Phosphorylierung an dieser Stelle könnte die Autophosphorylierung des EGFR-Y¹¹⁷³ auslösen. Übereinstimmend hiermit, unterdrückte die Inhibierung von Yes durch SU6656 die TLCS-induzierte EGFR-Phosphorylierung, wohingegen AG1478, ein Hemmstoff der Tyrosinkinase-Aktivität, nur einen geringen Effekt auf die EGFR-Phosphorylierung hatte.

Da Gallensalze in Hepatozyten eine schnelle oxidative Stressantwort induzieren (Yerushalmi et al., 2001; Sokol et al., 1995), könnte diese die Yes-Aktivierung auslösen. Übereinstimmend hiermit konnten Antioxidantien die TLCS-induzierte Zunahme der DCFDA-Fluoreszenz und die Yes-Aktivierung hemmen.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Organellen der Gallensalz-induzierten ROS-Bildung, wie Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum identifiziert (Rodriguez et al., 1998; Reinehr et al., 2003). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die welche schnelle ROS-Antwort durch NADPH-Isoformen getriggert, in verschiedenen Zelltypen einschließlich HSZ und Hepatozyten (Reinehr et al., 2005) nachgewiesen worden sind, und demnach eine wichtige Stelle der zellulären Signaltransduktionsmechanismen ist. Entsprechend dieser Ergebnisse, induzierten die hydrophoben Gallensalze TLCS, TCDC und GCDC eine Aktivierung der sauren Sphingomyelinase, der ΡΚϹζ darauffolgend und eine schnelle Serinphosphorylierung der regulatorischen Untereinheit p47^{phox}. Diese TLCSinduzierte ROS-Antwort konnte durch Inhibitoren der NADPH-Oxidasen unterdrückt werden.

4.5. Gallensalze als proliferatives Signal in ruhenden HSZ

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere Gallensalze in ruhenden HSZ als Proliferations-auslösende Faktoren identifiziert werden. Entsprechend der Studie von Svegliati-Baroni (2005) in aktivierten HSZ, konnte gezeigt werden, dass Gallensalze den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus erhöhen und die Steigerung des Zellzyklus (Einbau von BrdU) von einer Zunahme der Gesamtzahl an Zellen begleitet wurde.

In Einklang mit Gallensalz-stimulierten Hepatozyten (Qiao et a., 2002; Reinehr et al., 2004) konnte auch in ruhenden HSZ eine starke Erk-1/-2-Phosphorylierung beobachtet werden (Brady et al., 1996; Svegliati-Baroni et al., 2005). Die MAP-Kinasen Erk-1/-2 sind wichtige Elemente in der Übertragung von mitogenen extrazellulären Stimuli in HSZ (Friedman et al., 2000). Dieser Effekt konnte durch simultane Stimulation mit CHX gehemmt werden. Im Gegensatz zur Erk-1/-2-Phosphorylierung konnte keine Aktivierung der JNK und p38^{MAPK} nach Inkubation mit den Gallensalzen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass nur ein spezifisches Mitglied der MAPK unter diesen experimentellen Bedingungen induziert werden konnte.

4.6. Cycloheximid sensibilisiert ruhende HSZ gegenüber der Gallensalzinduzierten CD95-Aktivierung und Apoptose

Gallensalze allein lösten in ruhenden HSZ keine Apoptose aus. Ein Grund für die Resistenz gegen diese Gallensalz-induzierte Apoptose könnte im Vergleich zu Hepatozyten die geringere Gallensalz-Aufnahme sein. Im Gegensatz zu Hepatozyten können HSZ keine fluoreszierenden Gallensalze aufnehmen und verfügen nicht über den wichtigen Gallensalz-Transporter Ntcp. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Gallensalz-induzierte Apoptose in primären Hepatozyten und HepG2-Hepatoma-Zellen von der Ntcp-vermittelten Aufnahme abhängig ist (Schoemaker et al., 2004). Die Aufnahme von Gallensalzen über Oatp-Transporter-Isoformen ist auch unwahrscheinlich, da HSZ den Oatp1 und 2 nicht exprimieren und die Expression von Oatp3 sehr gering ist.

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass COX-2 und Mcl-1 wichtig für die Überlebensfähigkeit von Cholangiozyten ist (Yoon et al., 2002a/b). Auch in aktivierten HSZ konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte COX-2 und Mcl-1 Expression durch Gallensalze das Überleben während einer Cholestase fördern kann (Kim et al., 2006).

4.7. JNK-Aktivierung als entscheidender Auslöser für die Apoptose

Ruhende HSZ benötigen CHX als Ko-Stimulus zur Induktion von Apoptose durch das hydrophobe Gallensalz TLCS. Eine anhaltende JNK-Aktivierung konnte als entscheidender Auslöser für die Apoptose in ruhenden HSZ identifiziert werden. Nur wenn TLCS und CHX als Ko-Stimulus gleichzeitig verabreicht wurden, konnte JNK-1/-2 phosphoryliert, der CD95 mit dem EGFR assoziieren und die Apoptosekaskade eingeleitet werden. Abbildung 4.2. fasst die aktuelle Sicht der Wirkung von TLCS in ruhenden HSZ der Rattenleber zusammen.

Eine JNK-Aktivierung wurde auch bei vielen anderen Stimuli als wichtiger Auslöser ermittelt (Chen et al., 2001; Guo et al., 1998) und könnte Effekte auf die Genexpression und Mitochondrien ausüben (Leppa & Bohmann, 2001; Kharbanda et al., 2000). Bislang ist nicht bekannt, warum eine anhaltende, nicht jedoch transiente JNK-Aktivierung zum Zelltod führt. Es ist möglich, dass entscheidende Effektoren des JNK-Signalwegs erst einige Zeit nach der Stimulation in der Zelle verfügbar sind, oder dass solche Effektoren erst akkumulieren müssen, um Apoptose zu induzieren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der apoptotische JNK-Signalweg zeitweise durch eine gleichzeitige Aktivierung von anti-apoptotischen Signalwegen gehemmt wird, wie z.B. dem Erk- und Akt/PKB-Signalweg (Davis 2000; Lei et al., 2002). Neuere Ergebnisse der Arbeitsgruppe um G. Franzoso zeigten eine Beteiligung des Proteins GADD45β (growth arrest and DNA damage) an der JNK-induzierten Apoptose. GADD45 β wird nach Stimulation mit TNF α , durch einen Mechanismus der NF-kB benötigt, induziert. Seine ektope Expression blockiert die MAP-Kinase-Kinase 7, die selektiv JNK-1/-2 phosphoryliert. RNA- oder Proteinsynthesehemmer wie Actinomycin D oder CHX jedoch blockieren GADD456, sodass JNK-1/-2 phosphoryliert und Apoptose induziert werden kann (Papa et al., 2004a/b und 2007). Inwieweit auch GADD45β bei der Gallensalz- und CD95L-induzierten Apoptose in HSZ eine Rolle spielt, muss weiter untersucht werden.



Abbildung 4.2. TLCS-induzierte Signalwege in ruhenden HSZ

TLCS, TCDC oder GCDC verursachen in ruhenden HSZ oxidativen Stress, der eine EGFR-Tyrosinphosphorylierung induziert. Nur mit CHX als Ko-Stimulus kommt es zu einer Aktivierung der JNK-1/-2. Das anhaltende JNK-Signal erlaubt die Assoziation von CD95 und EGFR mit einer darauffolgenden DISC-Bildung an der Zellmembran und Induktion der Apoptose. Fehlt CHX als Ko-Stimulus, so kommt es zur Aktivierung der MAP-Kinasen Erk-1/-2 und zur Proliferationssteigerung.

Letztlich lässt sich sagen, dass pro-apototische Gallensalze wie TLCS, TCDC und GCDC die Proliferation von ruhenden HSZ über eine Aktivierung des EGFR auslösen können. HSZ scheinen, sofern CHX als Ko-Stimulus fehlt, vor einer Gallensalz-induzierten Apoptose geschützt zu sein. Diese Ergebnisse suggerieren, dass es sich bei den erhöhten Gallensalz-Konzentrationen während der Cholestase um einen unabhängigen pro-fibrogenetischer Faktor handelt.

5. Zusammenfassung

Die Proliferation hepatischer Sternzellen (HSZ) ist ein Schlüsselereignis bei der Entwicklung der Leberfibrose. Bei vielen Lebererkrankungen sind HSZ inflammatorischen Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Gallensalzen ausgesetzt. Obwohl bekannt ist, dass inflammatorische Zytokine und ROS die Proliferation von HSZ begünstigen, ist nichts über die Effekte von CD95 (Fas)-Ligand und Gallensalzen auf die Proliferation und Apoptose in ruhenden HSZ bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wichtige molekulare Signaltransduktionsmechanismen der CD95-Aktivierung in hepatischen Sternzellen aufgeklärt werden.

CD95 Ligand (CD95L) und andere Todesrezeptoren induzieren in ruhenden HSZ eine Liganden-abhängige Phosphorylierung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) über einen Src- und Matrixmetalloproteinase 9-abhängigen Mechanismus. Dieser löst eine mitogene Signalkaskade über Aktivierung des Erk-Signalwegs aus. Eine simultan induzierte CD95-Tyrosinnitrierung unterdrückt dagegen die proapoptotische Signalkaskade. Als auslösendes Signaltransduktionselement kommt die DUOX, eine Untereinheit der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatoxidase (NADPH), in Frage.

In aktivierten HSZ, induziert CD95L wie in ruhenden HSZ eine Phosphorylierung des EGFR, dagegen aber keine inaktivierende CD95-Tyrosinnitrierung. Da kein Apoptose-auslösendes c-Jun-N-terminale Kinase (JNK)-Signal erzeugt wird, kann auch die pro-apoptotische Signalkaskade nicht aktiviert werden. Die Zugabe von Cycloheximid (CHX) jedoch, ein Inhibitor der Proteinbiosynthese, induziert die notwendige JNK-Phosphorylierung, die die Assoziation des EGFR mit dem CD95 ermöglicht. Der EGFR phosphoryliert sodann den CD95 innerhalb der Todesdomäne, als Bedingung für die Translokation des EGFR/CD95-Proteinkomplexes an die Membran. Durch Anlagerung der *Fas-associated death domain* (FADD) und der Pro-Caspase-8, wird der *death inducing signaling complex* (DISC) gebildet. Die dadurch aktivierte Initiator-Caspase-8 aktiviert ihrerseits die Effektor-Caspase-3, sodass der apoptotische Zelltod induziert wird.

Gallensalze Taurochenocholat-3-Sulfat (TLCS) Einige wie und Glycochenodesoxycholat (GCDC) sind wirksame Induktoren der Apoptose in Hepatozyten und Cholangiozyten, und lösen Proliferation über die Aktivierung des EGFR aktivierten HSZ aus. Die Aufklärung der beteiligten von

Signaltransduktionselemente an der Gallensalz-induzierten EGFR-Aktivierung in HSZ war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Durch Stimulation mit den pro-apoptotischen Gallensalzen TLCS, GCDC und Taurochenodesoxycholat nicht jedoch mit dem neutralen Gallensalz Taurocholat und dem anti-apoptotischen Tauroursodesoxycholat kommt es zu einer schnellen Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (ASM). Die nachfolgend aktivierte Proteinkinase C ζ (PKC ζ) phosphoryliert die regulatorische Untereinheit p47^{phox} der NADPH-Oxidase an ihren Serinresten. Durch Aktivierung der NADPH-Oxidase kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS-vermittelt wird dann die Src-Kinase Yes aktiviert, welche mit dem EGFR assoziiert und dessen Phosphorylierung auslöst. Erk-vermittelt kommt es zur Initiation der Proliferation.

Stimuliert man ruhende HSZ dagegen simultan mit TLCS und dem Translationshemmer CHX, so wird neben der ROS-vermittelten Yes/EGFR-Assoziation, JNK aktiviert. Das anhaltende JNK-Signal erlaubt daraufhin die Assoziation von CD95 und EGFR und die Phosphorylierung des CD95 mit folgender DISC-Bildung an der Zellmembran und Induktion von Apoptose.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten demnach wichtige Signaltransduktionselemente der CD95L- und Gallensalz-induzierten Apoptose und Proliferation in ruhenden und aktivierten HSZ identifiziert und eine Verbindung der Signalkaskaden zwischen Zellproliferation und Zelltod in ruhenden HSZ aufgezeigt werden.

6. Abstract

The proliferation of hepatic stellate cells (HSC) is a key event in the development of hepatic fibrosis. In many liver diseases HSC are exposed to inflammatory cytokines, reactive oxygen species (ROS) and bile salts. It is well established that inflammatory cytokines and ROS promote the proliferation of HSC. But nothing is known about the effects of CD95 (Fas) ligand and bile salts on proliferation and apoptosis in quiescent HSC. Within these work crucial molecular signal transduction mechanisms of the CD95 activation in HSC could be elucidated.

Despite expression of CD95 (Fas)-receptor, HSC are fairly resistant towards CD95ligand (CD95L)-induced cell death. The underlying mechanisms and the function of the CD95-system in quiescent HSC, however, are unknown.

In quiescent HSC (2 days of culture), CD95L and other death receptor ligands led to a rapid phosphorylation of the epidermal growth factor-receptor (EGFR), extracellular signal regulated kinases (Erk) and of c-Src, but not of c-Jun-N-terminal kinases (JNK) and p47^{phox}, an activating subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase. In quiescent HSC, CD95L did not induce apoptotic cell death but stimulated HSC proliferation and triggered a rapid inactivating CD95 tyrosine nitration, which was not detected in activated HSC (10-14 days of culture). In quiescent HSC, CD95L and other death receptor-ligands act as mitogens through a ligand-dependent EGFR phosphorylation. Simultaneously, an antiapoptotic signaling is triggered by CD95L-induced CD95 tyrosine nitration. This unusual response to death receptor ligands may help quiescent HSC to participate in liver regeneration following liver injury.

Like in quiescent HSC, CD95L induces ligand-dependent EGFR-activation, but no inactivating CD95-tyrosine nitration. No proapoptotic signaling occurs, because the failure to produce a JNK-signal prevents CD95/EGFR-association and consequently CD95-tyrosine phosphorylation. The missing JNK-signal is introduced by further addition of CHX and under these conditions, CD95/EGFR-association occurs, which allows for EGFR-catalyzed CD95-tyrosine phosphorylation within the death domain and subsequent translocation of the EGFR/CD95 protein complex to the membrane and triggers the DISC formation, i.e. the recruitment of FADD and caspase 8 to CD95 and apoptosis-induction.

Some bile salts like taurolithocholate-3-sulfate (TLCS) and glycochenodeoxycholate (GCDC) are potent inducers of apoptosis in hepatocytes and cholangiocytes and

induced proliferation in activated HSC. However, nothing is known about the effect of bile acids on quiescent HSC.

The proapoptotic bile salts TLCS, GCDC and taurochenodeoxycholate but not the neutral bile salt taurocholate and the anti-apoptotic tauroursodeoxycholate induced a rapid oxidative stress formation in quiescent HSC, inhibited by diphenyleneiodonium and apocynin, suggestive for the involvement of NADPH. TLCS induced a rapid serine phosphorylation of the regulatory subunit $p47^{phox}$, which was sensitive to the inhibition of protein kinase ζ (PKC ζ). These ligand-independent EGFR activation stimulated HSC proliferation. Only when CHX was coadministrated the JNK was activated, followed by EGFR-catalyzed CD95-tyrosine phosphorylation, formation of the death inducing complex (DISC), and execution of apoptosis.

These data suggest that hydrophobic bile salts induce HSC proliferation via the activation of EGFR, whereas HSC are protected against bile acid-induced apoptosis unless CHX is coadministrated as a sensitizer.

7. Literaturverzeichnis

- Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr Opin Cell Biol 1999;11:255-260.
- **Bataller R, Brenner DA.** Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. Semin Liver Dis 2001;21:665-672.
- Bataller, R und Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005;115(2):209-218.
- Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T,
- Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH-oxidase-signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. J Clin Invest 2003;112:1383-1394.
- Bennet M, MacDonald K, Chan S-W. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. Science 1998;282:290-293.
- Bennett LL Jr, Ward VL, Brockman RW. Inhibition of protein synthesis in vitro by cycloheximide and related glutarimide antibiotics. Biochim Biophys Acta. 1965;103(3):478-85.
- **Benyon RC, Arthur MJ.** Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells.Semin Liver Dis 2001;21(3):373-84. Review.
- Bian K, Ke Y, Kamisaki Y, Murad F. Proteomic Modification by Nitric Oxide. J Pharmacol Sci 2006;101:271-279.
- **Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ.** c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor-receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. J Biol Chem 1999;274:8335-8343.
- Blake R.A., Broome M.A., Liu X., Wu J., Gishizky M., Sun L., Courtneidge S.A. SU6656, a selective Src-family-kinase-inhibitor, used to probe growth factor-signaling. Mol Cell Biol 2000;20:9018-9027.
- Bode JG, Peters-Regehr T, Gressner AM, Häussinger D. De novo expression of glutamine synthetase during transformation of hepatic stellate cells into myofibroblast-like cells. Biochem J 1998;335:697–700.
- **Bokoch GM, Diebold BA.** Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. Blood 2002;100(8):2692-6.
- **Bradford, MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
- **Brady LM, Beno DW, Davis BH.** Bile acid stimulation of early growth response gene and mitogen-activated protein kinase is protein kinase C-dependent. Biochem J 1996;316:765-9.

- **Canbay A, Friedman S, Gores GJ.** Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. Hepatology 2004;39(2):273-8.Review.
- Cariers A, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Häussinger D. c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane-targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells. Cell Physiol Biochem 2002;12:179-186.
- **Carpenter G.** Tyrosine kinase substrates: src homology domains and signal transduction. FASEB J 1992;6:3283-3289.
- **Cassiman D, Denef C, Desmet V, Roskams T.** Human and rat hepatic sellate cells express neurotrophins and neurothrophin receptors. Hepatology 2001;33:148–158.
- **Chen Y, Lai MZ.** c-Jun NH2-terminal kinase activation leads to a FADD-dependent but Fas ligand-independent cell death in Jurkat T cells. J Biol Chem 2001;276(11):8350-7.
- **Dang PM, Fontayne A, Hakim J, El Benna J, Périanin A**. Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. J Immunol 2001;166(2):1206-13.
- **Davis RJ.** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell 2000:13; 103(2):239-52.Review.
- **De Leeuw AM, McCarthy SP, Geerts A, Knook DL.** Purified rat liver fat-storing cells in culture divide and contain collagen. Hepatology 1984:4;392–403.
- **De Melker AA, van der Horst G, Calafat J, Jansen H, Borst J.** c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. J Cell Sci 2001;114:2167-2178.
- Eberle A, Reinehr R, Becker S, Häussinger D. Fluorescence resonance energy transfer analysis of proapoptotic CD95-EGF-receptor-interactions in Huh7 cells. Hepatology 2005;41:315-326.
- **Eberle A, Reinehr R, Becker S, Keitel V, Häussinger D.** CD95-tyrosinephosphorylation is required for CD95-oligomerization. Apoptosis 2007;12:719-729.
- Eckardt KU, Pugh CW, Meier M, Tan CC, Ratcliffe PJ, Kurtz A. Production of erythropoetin by liver cells in vivo and in vitro. Ann NY Acad Sci 1994;718:5060.
- **Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA.** The role and regulation of hepatic stellate cell-apoptosis in reversal of liver fibrosis. Apoptosis 2005;10:927-939.
- Emonard H, Marcq V, Mirand C, Hornebeck W. Inhibition of gelatinase A by oleic acid. Ann NY Acad Sci 1999;878:647-649.
- Fang Y, Han SI, Mitchell C, Gupta S, Studer E, Grant S, Hylemon PB, Dent P. Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine

kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. Hepatology 2004;40(4):961-71.

- Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. J Clin Invest 1999;103:137-145.
- **Faubion WA, Gores GJ.** Death receptors in liver biology and pathobiology. Hepatology 1999:29;1-4.Review.
- Fischer R, Cariers A, Reinehr R, Häussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. Gastroenterology 2002;123:845-861.
- Fischer R, Schmitt M, Bode JG, Häussinger D. Expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and apoptosis induction in hepatic stellate cells. Gastroenterology 2001;120:1212-1226.
- **Fischer R, Schliess F, Häussinger D.** Hyperosmolarity triggers CD95-membranetrafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. Hepatology 2002;36:602-614.
- Fischer R, Cariers A, Reinehr R, Häussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. Gastroenterology 2002;123(3):845-61.
- Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. Biochemistry 2002;41(24):7743-50.
- Friedman SL, Roll JF, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: The principal collagen producing cells of normal rat liver. Proc Nat I Acad Sci1985;82:8681-8685.
- **Friedman SL, Arthur MJ.** Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors.J Clin Invest 1989;84(6):1780-5.
- **Friedman SL.** Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem 2000;257:2247-2250.
- **Friedman SL.** Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. N Engl J Med 1993;328:1828-1835.
- **Fulda S, Meyer E, Debatin KM.** Metabolic inhibitors sensitize for CD95(APO-1/Fas)induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. Cancer Res 2000;60:3947-3956.

- **Gaur U, Aggarwal BB.** Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochem. Pharmacol.2003: 66;1403-1408.
- **Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Häussinger D.** Taurolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. Gastroenterology 2002;122(5):1411-27.
- Gard AL, White FP, Dutton GR. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP)immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of the liver. J Neuroimmunol 1985;8:359–375.
- **Geerts A.** History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin Liver Dis 2001:21;311-335.Review.
- Geerts A, Niki T, Hellemans K, De Craemer D, Van Den Berg K, Lazou JM, Stange G, Van De Winkel M, De Bleser P. Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting. Hepatology 1998;27(2):590-8.
- **Geerts A, Bouwens L, Wisse E.** Ultrastructure and function of hepatic fat-storing and pit cells. Electron Micros Tech 1990;47–256.
- **Goldstein S, Czapski G, Lind J, Merényi G.** Tyrosine nitration by simultaneous generation of (.)NO and O-(2) under physiological conditions. How the radicals do the job. J Biol Chem 2000;275(5):3031-6.
- **Gong W, Pecci A, Roth S, Lahme B, Beato M, Gressner AM.** Transformation-dependent susceptibility of rat hepatic stellate cells to apoptosis induced by soluble Fas ligand. Hepatology 1998;28:492-502.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998;281:1309-1312.
- **Gressner AM, Bachem MG.** Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. Semin Liver Dis 1990;10(1):30-46.Review.
- **Gressner AM.** The biology of liver fibrogenesis an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. Cell Tissue Res 1998;292:447- 452.
- **Guicciardi ME, Gores GJ.** Signaling pathways in liver diseases. Springer Verlag 2005.
- **Guo YL, Baysal K, Kang B, Yang LJ, Williamson JR.** Correlation between sustained cJun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. J Biol Chem 1998a;273(7):4027-34.
- **Guo YL, Kang B, Williamson JR.** Inhibition of the expression of mitogen-activated protein phosphatase-1 potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells.J Biol Chem 1998b;273(17):10362-6.
- Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ. A direct role for dual oxidase in Drosophila gut immunity. Science 2005;310:847-850.

- Hanke J.H., Gardner J.P., Dow R.L., Changelian P.S., Brissette W.H., Weringer
 E.J., Pollok B.A., Connelly P.A. Discovery of a novel, potent, and Src-familyselective tyrosine-kinase-inhibitor. J Biol Chem 1996;271:695-701.
- **Higuchi H, Gores GJ.** Mechanisms of liver injury: an overview. Curr Mol Med 2003a;3:483-90. Review.
- **Higuchi H, Yoon JH, Grambihler A, Werneburg N, Bronk SF, Gores GJ.** Bile acids stimulate cFLIP phosphorylation enhancing TRAIL-mediated apoptosis. J Biol Chem 2003b;287:454-461.
- Higuchi H, Bronk SF, Tanai M, Canbay A, Gores GJ. Cholestasis increases tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-R2/DR5 expression and sensitizes the liver to TRAIL-mediated cytotoxicity. J Pharmacol Exp Ther 2002;303:461-467:
- **Hoffman AF.** The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. Arch Int Med 1999;159.
- Housset C, Rockey DC, Bissell DM. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. Proc Natl Acad Sci USA 1993.
- Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. Hepatology 1999;29:1760–1767.
- Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. Hepatology 1996;24(1):176-84.
- Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. Int J Biochem Cell Biol 1997;29:43-54.
- Itoh N, Nagata S. A novel protein domain requiered for apoptosis. J Biol Chem 1993;268:10932-10937.
- Jones BA, Rao Y-P, Stravitz T, Gores GJ. Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. Am J Physiol 1997;272:G1109–G1115.
- Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen YN, Campbell A, Sudha T, Yuan ZM, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. J Biol Chem 2000;275(1):322-7.
- Kim KM, Yoon JH, Gwak GY, Kim W, Lee SH, Jang JJ, Lee HS. Bile acid-mediated induction of cyclooxygenase-2 and Mcl-1 in hepatic stellate cells. Biochem Biophys Res Commun 2006;342(4):1108-13.

- **Klaassen, Watkins JB.** Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. Pharmacol Rev 1984;36:1.
- Klotz LO, Schieke SM, Sies H, Holbrook NJ. Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. Biochem J 2000;352 Pt 1:219-25.
- **Knook DL, Seffelaar AM, de Leeuw AM.** Fat storing cells in the liver: their isolation and purification. Exp Cell Res 1982;139:468-471.
- **Kordes C, Sawitza I, Häussinger D.** Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells. Biochem Biophys Res Commun 2008;367:116-23.
- Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Häussinger D. CD133+hepatic stellate cells are progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun 2007;352:410-417.
- **Kubitz R, Häussinger D.** Osmoregulation of bile formation. Methods Enzymol 2007;428:313-324.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
- Lambeth JD. Nox/Duox-family of nicotinamide-adenine-dinucleotide (phosphate)oxidases. Curr Opin Hematol 2002;9:11-17.
- Lei K, Nimnual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D, Davis RJ. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. Mol Cell Biol 2002;22(13):4929-42.
- **Leppä S, Bohmann D.** Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. Oncogene 1999;18(45):6158-62.
- Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestais. Semin liver Dis 2004:24;21-42.
- Li J, Lin ML, Wiepz GJ, Guadarrama AG, Bertics PJ. Integrin-mediated migration of murine B82L fibroblasts is dependent on the expression of an intact epidermal growth factor-receptor. J Biol Chem 1999;274:11209-11219.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L.,Geiger, B. & Yarden Y. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of theepidermal growth factor receptor. Genes Dev 1998;12:3663-3674.

Leyland H, Gentry J, Arthur MJP, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. Hepatology 1996;24:1172–1178.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamily: integrating mammalian biology. Cell 2001;104:487-501.

- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? Hepatology 2006;43:S31-44.
- **Mallat A, Lotersztajn S.** Multiple hepatic functions of endothelin-1: physiopathological relevance. J Hepatol 1996;25(3):405-413.
- Mathew J, Geerts A, Burt AD. Pathobiology of hepatic stellate cells. Hepatogastroenterology 1996;43:72-91.
- Meijer, A. J., Gimpel, J. A., Deleeuw, G. A., Tager, J. M. and Williamson, J. R. Role of anion translocation across the mitochondrial membrane in the regulation of urea synthesis from ammonia by isolated rat hepatocytes. J Biol Chem 1975;250:7728±7738.
- **Matsumoto K, Nakamura T.** Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. J Biochem 1996;119:591–600.
- Nagasaka A, Hidaka H. Effect of antithyroid agents 6-propyl-2-thiouracil and 1-methyl-2-mercaptoimidazole on human thyroid-iodine-peroxidase. J Clin Endocrinol Metab 1976;43:152-158.
- Nishi M, Takeshima H, Houtani T, Nakagawara K, Noda T, Sugimoto T. RhoN, a novel small GTP-binding protein expressed predominantly in neurons and hepatic stellate cells. Brain Res Mol Brain Res 1999;67:74–81.
- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature 1993;364:806-809.
- Pani G, Bedogni B, Colavitti R, Anzevino R, Borrello S, Galeotti T. Cell compartmentalization in redox signaling. IUBMB Life 2001;52(1-2):7-16.
- Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S, Nguyen DU, Pham CG, Nelsbach AH, Melis T, De Smaele E, Tang WJ, D'Adamio L, Franzoso G. Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. Nat Cell Biol. 2004;6(2):146-53.
- Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C, Franzoso G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. J Cell Sci 2004;117(Pt 22):5197-208.
- Papa S, Monti SM, Vitale RM, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, De Smaele E, Dathan N, Pedone C, Ruvo M, Franzoso G. Insights into the structural basis of the GADD45beta-mediated inactivation of the JNK kinase, MKK7/JNKK2. J Biol Chem 2007;282(26):19029-41.
- Parsons CJ, Bradford BU, Pan CQ, Cheung E, Schauer M, Knorr A, Krebs B, Kraft
 S, Zahn S, Brocks B, Feirt N, Mei B, Cho MS, Ramamoorthi R, Roldan G, Ng
 P, Lum P, Hirth-Dietrich C, Tomkinson A, Brenner DA. Antifibrotic effects of a

tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. Hepatology 2004;40(5):1106-15.

- Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. Semin Liver Dis 1998;18:105-114.
- Piiper A, Elez R, You SJ, Kronenberger B, Loitsch S, Roche S, Zeuzem S. Cholecystokinin stimulates extracellular signal-regulated kinase through activation of the epidermal growth factor-receptor, Yes, and protein kinase-C. J Biol Chem 2003;278:7065-7072.
- **Pinzani M.** Hepatic stellate (ITO) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte. J Hepatol 1995;22:700-706.
- Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. Gastroenterology 1996;110(2):534-48.
- **Poppleton HM, Wiepz GJ, Bertics PJ, Patel TB.** Modulation of the protein-tyrosinekinase activity and autophosphorylation of the epidermal growth factor-receptor by its juxtamembrane region. Arch Biochem Biophys 1999;363:227-236.
- Qiao L, Studer E, Leach K, McKinstry R, Gupta S, Decker R, Kukreja R, Valerie K, Nagarkatti P, El Deiry W, Molkentin J, Schmidt-Ullrich R, Fisher PB, Grant S, Hylemon PB, Dent P. Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase- signaling module enhances DCA-induced apoptosis. Mol Biol Cell 2001;12(9):2629-45.
- Qiao L, Yacoub A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, Hylemon PB, Dent P. Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. Hepatology 2002;35(4):779-89.

Ramadori G, Veit T, Schwogler S, Dienes HP, Knittel T, Meyer zum Buschenfelde K. Expression of the gene of the a-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in fat-storing (Ito)cells. Virchows. Arch B Cell Pathol 1999;59:349–357.

- Ramezanian MS, Padmaja S, Koppenol WH. Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxynitrite. Methods Enzymol. 1996;269:195-201.Review.
- Rao YP, Studer EJ, Stravitz RT, Gupta S, Qiao L, Dent P, Hylemon PB. Activation of the Raf-1/MEK/ERK cascade by bile acids occurs via the epidermal growth factorreceptor in primary rat hepatocytes.Hepatology 2002;35(2):307-14.
- Ravid T, Sweeny C, Gee P, Carraway KL, Goldkorn T. Epidermal growth factorreceptor activation under oxidative stress fails to promote c-Cbl mediated downregulation. J Biol Chem 2002;277:31214-31219.

- Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasmamembrane estrogen-receptors. J Biol Chem 2003;278:2701-2712.
- Reinehr M, Kubitz R, Peters-Regehr T, Bode JG, Häussinger D. Activation of rat hepatic stellate cells in culture is associated with increased sensitivity to endothelin 1. Hepatology 1998;28(6):1566-77.
- Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95Linduced apoptosis. Hepatology 2002;36(3):602-14.
- Reinehr R, Fischer R, Häussinger D. Regulation of endothelin-A receptor sensitivity by cyclic adenosine monophosphate in rat hepatic stellate cells. Hepatology 2002b;36(4 Pt 1):861-73.
- **Reinehr R, Graf D. Häussinger D.** Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. Gastroenterology 2003a;125:839-853.
- **Reinehr R, Schliess F, Häussinger D.** Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGFR-association and tyrosine-phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95-membrane-trafficking and DISC-formation. FASEB J 2003b;17:731-733.
- Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. Involvement of the Src-familykinase yes in bile salt-induced apoptosis. Gastroenterology 2004;127:1540-1557.
- Reinehr R, Görg B, Höngen A, Häussinger D. CD95-tyrosine-nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95-activation in rat hepatocytes. J Biol Chem 2004;279:10364-10373.
- Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. Involvement of NADPH-oxidase isoforms and Src-family-kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. J Biol Chem 2005;280:27179-27194.
- **Reinehr R, Sommerfeld A, Häussinger D.** CD95 ligand is a proliferative and antiapoptotic signal in quiescent hepatic stellate cells. Gastroenterology 2008;134:1494-1506.
- **Ris-Stalpers C.** Physiology and pathophysiology of the DUOXes. Antioxid Redox Signal 2006;8:1563-1572.
- Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR, Gabbiani G, Friedman SL. Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma. Hepatology 1992;16:776–784.
- **Rockey DC, Housset CN, Friedman SL.** Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. J Clin Invest 1993;92:1795-1804.

- **Rodriguez CM, Steer CJ.** Bile acids and hepatocyte apoptosis: living/leaving life in the Fas lane. Gastroenterology 1999;117(3):732-736.
- Roquet N, Carlier K, Briand P, Wiels J, Joulin V. Multiple pathways of Fas-induced apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. Exp Cell Res 1994;229:27-35.
- Rust C, Karnitz LM, Paya CV, Moscat J, Simari RD, Gores GJ. The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. J Biol Chem 2000;275(26):20210-6.
- Saile B, Matthes N, El Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. The bcl, NFkappaB and p53/p21WAF1-systems are involved in spontaneous apoptosis and in the antiapoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells. Eur J Cell Biol 2001;80:554-561.
- Sato T, Kato R, Tyson CA. Regulation of differentiated phenotype of rat hepatic lipocytes by retinoids in primary culture. Exp Cell Res 1995;217:72–83.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. EMBO J 1998;17:1675-1687.
- Schäfer S, Zerbe O, Gressner AM. The synthesis of proteoglycans in fat storing cells of rat liver. Hepatology 1987;7:680-687.
- Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survivalpathways. Hepatology 2004;39(6):1563-73.
- Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. Neuron 1992;9:383-391.
- Schlessinger J Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell 2002;110:669-672.
- Schmucker DL, Ohta M, Kanai S et al. Hepatic injury induced by bile salts correlation between biochemical and morphological events. Hepatology 1990;12:1216-1221.
- Schuppan D, Atkinson J, Ruehl M, Rieckern EO. Alcohol and liver fibrosispathobiochemistry and treatment. Z Gastroenterol 1995;546-550.
- Schwabe RF, Uchinami H, Qian T, Bennett BL, Lemasters JJ, Brenner DA. Differential requirement for c-Jun NH₂-terminal kinase in TNF-α- and Fas-mediated apoptosis in hepatocytes. FASEB J 2004;18:720-722.

Segarra M, Vilardell C, Matsumoto K, Esparza J, Lozano E, Serra-Pages C, Urbano-Márquez A, Yamada KM, Cid MC. Dual function of focal adhesion kinase in regulating integrin-induced MMP-2 and MMP-9 release by human T lymphoid cells. FASEB J 2005;19:1875-1877.

- Shibazaki S, Aoki T, Yoshimi T. Electronmicrocopic studies on the innervation in human liver.In: Shimazu T. Liver innervation and neural control of hepatic functions. John Libbey & Company Ltd., London, 1999. pp. 57–63.
- Siegmund SV, Uchinami H, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. Hepatology 2005;41:1085-1095.
- Siegmund SV, Qian T, de Minicis S, Harvey-White J, Kunos G, Vinod KY, Hungund B, Schwabe RF. The endocannabinoid2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. FASEB J 2007;21(11):2798-806.
- Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing

cell surface trafficking of Fas. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000;278:G992-G999.

- **Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM Jr.** Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. Gastroenterology 1995;109(4):1249-56.
- Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I. CbI-CIN85endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. Nature 2002;416:183-187.
- Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Hannivoort R, Saccomanno S, Homan M, DeMincis S, Jansen PLM, Candelaresi C, Benedetti A, Moshage H. Bile acids induce hepatic stellate cell proliferation via activation of the epidermal growth factor receptor. Gastroenterology 2005;128:1042–1055.
- Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL- mediated apoptosis. Hepatology 2003;37:87-95.
- Tamura Y, Watanabe F, Nakatani T, Yasui K, Fuji M, Komurasaki T, Tsuzuki H, Maekawa R, Yoshioka T, Kawada K, Sugita K, Ohtani M. Highly selective and orally active inhibitors of type IV collagenase (MMP-9 and MMP-2): N-sulfonylamino acid derivatives. J Med Chem 1998;41:640-649.
- Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. Nature Med 1998;4:31-36.
- Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Skovgaard Poulsen H. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann Oncol 1997;8:1197-1206.

- Wake, K. Sternzellen. in the liver: Perisinusoidal cells with reference to storage of vitamin A. Am J Anat 1971;132(4):429-462.
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL. Tumor necrosis factor receptor and Fas signalling mechanisms. Annu Rev Immunol 1999;17:331-367.

Wells A. EGF receptor. Int.J.Biochem. Cell Biol 1999;31:637-43. Review.

- Werneburg NW, Yoon JH, Higuchi H, Gores GJ. Bile acids activate EGF-receptor via a TGF-alpha-dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. Am J Physiol 2003;285:G31-36.
- Whiteman M, Halliwell B. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine-nitration and alpha 1-antiproteinase-inactivation by ascorbic acid. Free Radic Res 1996;25:275-283.
- Wright MC, Issa R, Smart DE, Trim N, Murray GI, Primrose JN, Arthur MJ, Iredale JP, Mann DA. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. Gastroenterology 2001;121:685-698.
- Wu J, Zern AM. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. J Gastroenterol 2000;35:665-672.
- **Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumpricht E, Sokol RJ.** Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. Hepatology 2001;33(3):616-26.
- Yokoi Y, Namihisa T, Kuroda H, Komatsu I, Miyazaki A, Watanabe S, Usui K. Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). Hepatology 1984;4:709–714.
- Yoon JH, Gores GJ. Death-receptor-mediated apoptosis and the liver. J Hepatol 2002;37(3):400-410.
- Yoon JH, Higuchi H. Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ. Bile acids induce cycooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. Gastroenerology 2002;122:985-993.
- Yoon JH, Werneburg NW, Higuchi H, Canbay AE, Kaufmann SH, Akgul C, Edwards SW, Gores GJ. Bile acids inhibit Mcl-1 protein turnover via an epidermal growth factor receptor/Raf-1-dependent mechanism. Cancer Res 2002; 62:6500-6505.

8. Abkürzungsverzeichnis

Α	ASM	acidic spingomyelinase
В	BAPTA	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
	BrdU	Bromodesoxyuridin
С	Caspase	Cystein-Aspartat-spezifische Protease
	CD95	CD95 Rezeptor
	CD95L	CD95 Ligand
	CM-H ₂ DCFDA	Chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrid-Fluoreszein Diazetat
	Су-З	Carbocyanin-3
	CHX	Cycloheximid
	COX-2	Cyclooxygenase-2
D	DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
	DD	death domain
	DED	death effector domain
	DISC	death-inducing signaling complex
	DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
	DPI	Diphenyleniodoniumchlorid
	DUOX	duale Oxidase
	DTT	Dithiothreitol
Е	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	EGFR	epidermal growth factor receptor
	EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat
	ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
	Erk	Extracellular-signal regulated kinase
F	FADD	Fas associated death domain
	FCS	fetal calf serum
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	FLIP	FLICE (Caspase-8)-inhibitorisches Protein
G	GADD45β	growth arrest and DNA-damage-inducible gene 45 eta
	GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
	GCDC	Glycochendesoxycholat
	GFAP	glial fibrillary acidic protein
Н	HGF	hepatocyte growth factor

	HRP	horseraddish peroxidase
	HSZ	Hepatische Sternzellen
I.	IGF	insulin growth factor
J	JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
L	L-JNKI-1	c-Jun-N-terminale-Kinase-Inhibitor-1
	L-NMMA	N(G)-Monomethyl-L-Arginin
	LPS	Lipopolysaccharid
М	MAPK	mitogen activated protein kinase
	MFB	Myofibroblasten
	MMP	Matrixmetalloproteinase
Ν	NAC	N-Acetylcystein
	NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatoxidase
	NGF	nerve growth factor
Ρ	р38 ^{МАРК}	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
	PBR	peripherer Benzodiazepin-Rezeptor
	PBS	phosphate buffered saline
	PCR	polymerase chain reaction
	PDGF	plateled derived growth factor
	PFA	Paraformaldehyd
	phox	phagocyte oxidase
	PKC	Proteinkinase C
	PKCζ-Inhibitor	zellpermeables myristoyltiertes PKCζ-Pseudosubstrat
	PZ	Leberparenchymzellen (Hepatozyten)
R	ROS	reactive oxygen species
	RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
S	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SEM	standard error of mean
	SH	src homology
	SMA	α-smooth muscle actin
т	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
	TBS-T	Tris-buffered saline with Tween
	ТС	Taurocholat
	TCDC	Taurochenodesoxycholat
	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TGF	transforming growth factor
TLCS	Taurolithocholsäure-3-Sulfat
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	Tumornekrosefaktor-assoziierter Apoptose-induzierender
	Ligand
TUDC	Tauroursodesoxycholat
TUNEL	TdT-mediating X-dUTP nick end labelling

Publikationen/Posterbeiträge

Reinehr R, <u>Sommerfeld A</u>, Keitel V, Grether-Beck S, Häussinger D. Amplification of CD95 activation by caspase 8-induced endosomal acidification in rat hepatocytes. JBC. 2008; 283:2211-2222.

Reinehr R, <u>Sommerfeld A</u>, Häussinger D. CD95 ligand is a proliferative and antiapoptotic signal in quiescent hepatic stellate cells. Gastroenterology. 2008;134:1494-1506.

<u>Sommerfeld A</u>, Kircheis G, Häussinger D, Reinehr R (2006) Differential expression of neuroreceptors in rat hepatic stellate cells during activation *in vitro* and *in vivo*. Posterpräsentation, 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston

Reinehr R, <u>Sommerfeld A</u>, Becker S, Häussinger D (2008) CD95 ligand induces proliferation and CD95-tyrosine nitration in quiescent rat hepatic stellate cells. Posterpräsentation, 24. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Frankfurt.

Reinehr R, Becker S, <u>Sommerfeld A</u>, Grether-Beck S, Häussinger D (2008) Caspase 8-induced endosomal acidification is an upstream event in CD95dependent hepatocyte apoptosis.

Posterpräsentation, 24. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Frankfurt.

Lebenslauf

Persönliche Information

Name	Annika Sommerfeld
Adresse	Klausenergrund 1
	44803 Bochum
Email	Annika.Sommerfeld@freenet.de
Geburtsdatum	06.05.1979
Geburtsort	Herne
Nationalität	deutsch

Schullaufbahn

Jul. 1985 – Jun. 1989	St. Barbara Grundschule, Bochum
Aug. 1989 – Jun. 1998	Goethe-Schule, Staatliches Gymnasium, Bochum
	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Akademischer Werdegang

Diplom

Okt. 1998 – Okt. 2004	Diplomstudiengang Biologie
	Hauptfächer: Zoologie, Neurobiologie, Zellbiologie, Biochemie
	Diplom am Lehrstuhl für Tierphysiologie,
	Thema: Analyse zum dopaminergen Zelltod in
	Zellkultursystemen
Promotion	
Dez. 2004 bis Apr. 2005	Ruhr-Universität Bochum
	Lehrstuhl für Tierphysiologie
	Thema: Untersuchung zur Funktion von Mitochondrien
	und Proteasomen in Tiermodellen des Morbus Parkinson
Jun. 2005 bis Dez.2008	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
	Graduiertenkolleg des SFB 575
	Thema: CD95 Ligand-induzierte Proliferation und
	Apoptose in hepatischen Sternzellen

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2005 bis Oktober 2008 in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie am Universitätsklinikum Düsseldorf im Rahmen des SFB 575, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Häussinger angefertigt. Ohne die engagierte und tatkräftige Unterstützung meiner Betreuer und des gesamten Laborteams hätte diese Arbeit in dieser Form nicht entstehen können. Daher möchte ich mich bei allen recht herzlich für die Hilfe und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Häussinger für die Möglichkeit diese Arbeit an seiner Klinik anfertigen zu können, das interessante Thema und seine kritische Begutachtung.

Für die kurzfristige freundliche Übernahme des Koreferats und die damit verbundenen Mühen danke ich sehr herzlich Herrn Prof. Dr. F. Wunderlich.

Herrn PD Dr. R. Reinehr danke ich für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Von Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung.