

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Tom Lüdde

**Differentielle Expression von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren
in hepatischen Sternzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Elena van Loon

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Hans Bock

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zusammenfassung

Hepatische Sternzellen (HSCs) sind vor allem für ihren Beitrag zur Fibrose bei chronischen Lebererkrankungen bekannt, sie unterstützen aber auch maßgeblich die Regeneration von Lebergewebe durch die Freisetzung von trophischen Faktoren und eine Differenzierung in Leberepithelzellen. Aufgrund dieser Eigenschaften und ihrer unterstützenden Funktion für die fetale Hämatopoese wurden HSCs von unserer Arbeitsgruppe als mesenchymale Stammzellen (MSCs) identifiziert. Für Prozesse der Proliferation und Differenzierung nach einer Leberverletzung verlassen HSCs ihren Ruhezustand und werden aktiviert. Dieser Aktivierungsprozess wird von grundlegenden Veränderungen in ihrem Expressionsprofil und dem Auftreten von MSC-Markern wie Nestin und *nerve/glia antigen 2* (NG2) begleitet. Frühere Studien an MSCs legen nahe, dass die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Subtypen (S1PR) unterschiedliche Funktionen in MSCs haben. S1PR1 und 3 sind demnach an der Zellproliferation beteiligt, während der S1PR2 mit der Zelldifferenzierung assoziiert zu sein scheint. Die S1PR1-3 wurden bereits in HSCs als MSCs der Leber identifiziert und scheinen mit der Progression der Leberfibrose assoziiert zu sein. Es ist jedoch derzeit unklar, durch welche Signalwege die S1PR reguliert werden und ob der S1PR4 und 5 auch von HSCs exprimiert werden. Diese Fragen wurden in der vorliegenden Studie anhand von isolierten HSCs und Lebergewebe von Ratten untersucht. Die Expression aller fünf S1PR wurde in HSCs nachgewiesen. Mit der Aktivierung von HSCs in Kultur nahm die Expression der S1PR ab, mit Ausnahme des S1PR2. *Platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB), das proliferativ auf HSCs wirkt, erhöhte die Expression des S1PR1 und 3, der eine Reduktion der mRNA des S1PR4 und 5 gegenüberstand. Die Hochregulierung des S1PR1 und 3 konnte durch die Zugabe eines TGF- β RI/II (*transforming growth factor β receptor I/II*)-Inhibitors (LY2109761) weiter verstärkt werden. TGF- β 1 wirkt dem PDGF-Rezeptor (PDGFR)-Signalweg entgegen und fördert die Differenzierung der Zellen zu Myofibroblasten. Die Behandlung von HSCs mit verschiedenen Mitgliedern der TGF- β -Familie hatte keine wesentlichen Auswirkungen auf die Expression der S1PR. Der S1PR2 ließ sich durch Interleukin-1 β heraufregulieren, was auf eine mögliche Funktion des S1PR2 im Zusammenspiel zwischen Immunsystem und HSC-Aktivierung schließen lässt. Zusammenfassend wurden PDGF-BB-, TGF- β -, und Interleukin-1 β -vermittelte Signalwege identifiziert, die die Expression der S1PR1-5 in HSCs kontrollieren. Unsere Ergebnisse weisen auf eine differentielle Expression und Regulationsmechanismen von S1PR1/3 und S1PR4/5 hin, welche entweder die Zellproliferation oder die Zelldifferenzierung als konkurrierende Prozesse zu begünstigen scheinen.

Abstract

Hepatic stellate cells (HSCs) are mainly known for their contribution to fibrosis in chronic liver diseases, but they also critically support the regeneration of liver tissue after injury by the release of trophic factors and differentiation into liver epithelial cells. Based on these properties and their supportive function for fetal hematopoiesis, HSCs were classified as mesenchymal stem cells (MSCs) by our research group. For the initiation of cell proliferation and differentiation after liver injury, HSCs leave their quiescent state and become activated. This activation process is accompanied by fundamental changes in their expression profile and the appearance of MSC markers such as nestin and nerve/glial antigen 2 (NG2). Previous studies on MSCs suggest that sphingosine-1-phosphate receptor subtypes (S1PR) have differential functions in MSCs. S1PR1 and 3 are involved in cell proliferation, whereas S1PR2 seem to be associated with cell differentiation. The S1PR1-3 have already been identified in HSCs as liver-resident MSC and seem to be associated with liver fibrosis progression. However, it is currently unclear which signaling pathways regulate the S1PRs and whether S1PR4 and 5 are also expressed by HSCs. These questions were addressed by the present study using isolated HSCs and liver tissue from rats. All five S1PRs were detected in HSCs, including S1PR4 and 5. During activation of HSCs in culture, the expression of S1PRs decreased except for S1PR2. Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) triggered HSC proliferation and increased S1PR1 and 3 expression accompanied by S1PR4 and 5 mRNA regression. The upregulation of S1PR1 and 3 could be further enhanced by addition of a TGF- β RI/II (transforming growth factor β receptor I/II) inhibitor (LY2109761). TGF- β 1 can counteract PDGF receptor (PDGFR) signaling and facilitates cell differentiation into myofibroblasts. However, treatment of HSCs with several TGF- β family members had no significant effect on S1PR expression. S1PR2 was upregulated by interleukin-1 β , indicating a possible function of S1PR2 in the interplay between the immune system and HSC activation. In conclusion, signaling cascades that control S1PR1-5 expression in HSCs, such as PDGF-BB, TGF- β and interleukin-1 β mediated pathways were identified. Our results indicate differential expression and regulatory mechanisms of S1PR1/3 and S1PR4/5, which seem to be either involved in cell proliferation or differentiation of HSCs.

Abkürzungsverzeichnis

2-AAF	2-Acetylaminofluorene
AFP	α -Fetoprotein
ApoM	Apolipoprotein M
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CCl₄	Tetrachlormethan
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU-Fs	<i>colony-forming-unit-fibroblasts</i>
CK	<i>Cytokeratin</i>
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CY	Cyanin
d	Tag
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium – high glucose</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDG	<i>endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
HBSS	<i>Hanks´ Balanced Salt solution</i>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HPPCn	Hepatopietin Cn
HPR	<i>horseradish peroxidase</i>
Hprt1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSC	<i>hepatic stellate cell</i> (hepatische Sternzelle)
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium</i>
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
ITS+3	<i>insulin-transferrin-sodium selenite, linoleic;oleic-BSA</i>
kDa	Kilodalton
LGR5	<i>leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5</i>
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i>

LPAR	<i>lysophosphatidic acid receptor</i>
LPL-R	Lysophospholipid-Rezeptor
mA	Milliampere
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
O₂	Sauerstoff
p75NTR	p75 Neutrophin Rezeptor
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit 0,1% Tween20
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PHX	Partielle Hepatektomie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSM	Penicillin/Streptomycin/Mycomycin
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RBP	Retinol-bindendes Protein
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SDF1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SPNS2	Sphingolipid-Transporter 2
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (trisgepufferte Salzlösung)
TBS-T	TBS mit 0,1% Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUDC	<i>tauroursodeoxycholic acid</i>
U	Atomare Masseneinheit
UV	Ultraviolett
YAP	<i>yes-associated protein</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
α-SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hepatische Sternzellen	1
1.1.1	Physiologische Funktion von HSCs	2
1.1.2	Aktivierung von HSCs	2
1.1.3	HSCs als mesenchymale Stammzellen der Leber	3
1.1.3.1	Mesenchymale Stammzellen	3
1.1.3.2	Stammzellmarker von HSCs und ihr Beitrag zur Leberregeneration	5
1.2	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PR)	7
1.2.1	Biologische Funktion von Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	11
1.2.2	S1PR in HSCs und anderen MSCs	13
1.3	Ziele der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Reagenzien für die Zellkultur und zur Analyse	18
2.1.2	Primer	20
2.1.3	Antikörper	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Leberschädigungsmodelle	22
2.2.2	Isolation von HSCs aus der Rattenleber	22
2.2.3	Zellkultur	24
2.2.4	Probengewinnung und Protein-/RNA-Isolation	24
2.2.4.1	Proteinisolation	24
2.2.4.2	Aufreinigung der RNA	25
2.2.5	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	25
2.2.5.1	Synthese der cDNA	25
2.2.5.2	qPCR	26
2.2.6	Western Blot	27

2.2.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
2.2.6.2	Proteintransfer	29
2.2.6.3	Proteindetektion	29
2.2.7	BrdU-ELISA	30
2.2.8	Immunfluoreszenzfärbung	31
2.2.9	Lichtmikroskopie	32
2.2.10	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Charakterisierung von isolierten HSCs	33
3.2	Expression der S1PR1-5 in HSCs der Ratte	34
3.3	Einfluss von S1P auf die Proliferation von HSCs	38
3.4	Expression der S1PR in proliferierenden HSC	39
3.5	Expression der S1PR in HSCs nach Behandlung mit Liganden der TGF- β -Familie	45
3.6	Expression der S1PR in HSCs nach Behandlung mit Faktoren zur Beeinflussung der Entwicklung von Stammzellen	47
3.7	Expression der S1PR während der Leberregeneration	50
4	Diskussion	52
4.1	Expression der fünf S1PR in HSCs	52
4.2	Regulation und mögliche Funktion der S1PR in HSCs	53
4.2.1	Wirkung von S1P auf die Proliferation von HSCs	54
4.2.2	Assoziation von S1PR1 und 3 mit der Proliferation von HSCs	57
4.2.3	Differenzierung von HSCs im Kontext von Lebererkrankungen	59
4.2.4	Zusammenspiel von Immunsystem und S1PR bei Leberfibrose	60
4.3	Schlussfolgerungen	62
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	64
6	Danksagung	77

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Biosynthese und Signalwege von S1P.	12
Abb. 2: Gegenwärtiger Forschungsstand zur Funktion der S1PR in MSCs und Zielsetzung der Arbeit.....	17
Abb. 3: Charakterisierung frisch isolierter HSCs der Ratte.	33
Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbungen der S1PR1-3 in Leberschnitten und isolierten HSCs der Ratte.	35
Abb. 5: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in isolierten HSCs der Ratte.	36
Abb. 6: Proteinnachweis der S1PR1-5 in isolierten HSCs der Ratte.....	37
Abb. 7: DNA-Synthese isolierter HSCs nach Stimulation mit S1P.	38
Abb. 8: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in isolierten HSC nach Behandlung mit TGF- β 1 oder PDGF-BB.	40
Abb. 9: Proteinnachweis der S1PR1-3 in isolierten HSCs nach Behandlung mit TGF- β 1 oder PDGF-BB.	41
Abb. 10: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in HSC nach Behandlung mit PDGF-BB- und TGF- β 1-Inhibitoren.....	43
Abb. 11: Proteinnachweis der S1PR1-3 in HSCs nach Behandlung mit PDGF-BB- und TGF- β 1-Inhibitoren über 7 Tage.....	44
Abb. 12: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in HSC nach Behandlung mit Liganden der TGF- β -Familie.	46
Abb. 13: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in isolierten HSC der Ratte nach Behandlung mit Faktoren zur Beeinflussung der Entwicklung von Stammzellen.....	48
Abb. 14: Proteinnachweis der S1PR1-3 in isolierten HSC der Ratte nach Behandlung mit Faktoren zur Beeinflussung der Entwicklung von Stammzellen.....	49
Abb. 15: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in Lebergewebeproben zweier Leberschädigungsmodelle der Ratte.	51
Abb. 16: Zelldichte isolierter HSCs nach Behandlung mit S1P.	56
Abb. 17: Erkenntnisse der Arbeit zur Regulation und möglichen Funktion der fünf S1PR in isolierten HSCs der Ratte.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der LPL-R mit Liganden, Synonymen und der GPCR-Subgruppe.....	8
Tabelle 2: Liste der verwendeten Reagenzien für die Zellkultur.....	18
Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien für die Analysen.	19
Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzienansätze (Kits).	20
Tabelle 5: Liste der verwendeten Primer.....	20
Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper.....	21
Tabelle 7: Zusammensetzung des Proteinlysepuffers (RL-Puffer).....	25
Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur cDNA-Synthese.	26
Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qPCR.	27
Tabelle 10: Zusammensetzung des Dichtungsgels für die Gelelektrophorese.	28
Tabelle 11: Zusammensetzung des Trenngels für die Gelelektrophorese.	28
Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels für die Gelelektrophorese.	28
Tabelle 13: Zusammensetzung des 5x Tris-Glyzin-Elektrophoresepuffers.	28
Tabelle 14: Zusammensetzung des Auftragspuffers für Western Blot-Analysen.	29
Tabelle 15: Zusammensetzung des 10x Transferpuffers für Western Blot-Analysen. .	29

1 Einleitung

1.1 Hepatische Sternzellen

Hepatische Sternzellen (*hepatic stellate cells*), die auch als Ito-Zellen, Perisinusoidalzellen, Lipozyten oder Fettspeicherzellen bekannt sind, wurden erstmals 1876 von dem Anatom Carl Wilhelm von Kupffer beschrieben [1]. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Namen für diese Zellen wurde 1996 die Bezeichnung „hepatische Sternzellen (HSCs)“ eingeführt [2]. Etwa 5-8% aller Zellen der normalen Leber sind HSCs [3], die im Disse`schen Raum zwischen sinusoidalen Endothelzellen und der basolateralen Seite der Hepatozyten lokalisiert sind [4]. HSCs haben zahlreiche Ausläufer, die benachbarte Sinusoide erreichen, sowie den Disse`schen Raum durchspannen und in Kontakt mit den Hepatozyten stehen [4].

Der Ursprung von HSCs ist Gegenstand der Forschung und bis heute noch nicht abschließend geklärt. Es werden verschiedene Möglichkeiten der embryonalen Herkunft diskutiert [4, 5]. Eine Studie von Toi et al. deutet darauf hin, dass sich HSCs aus Nestin-positiven Zellen im Septum transversum, welches wiederum dem Mesoderm entstammt, entwickeln [6]. Darüber hinaus liefern weitere Arbeiten Hinweise auf den Ursprung von HSCs aus submesothelialen Zellen des Septum transversum [7-12]. Die Expression der neuronalen Marker Nestin und GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) legt eine Abstammung der von HSCs von Zellen der Neuralleiste nah. [13-15]. Einem neuroektodermalen Ursprung widerspricht hingegen eine Studie von Cassiman et al., die die Herkunft YFP (*yellow fluorescent protein*) exprimierender HSCs in der sich entwickelnden Leber untersuchte [16]. Auch ein entodermaler Ursprung der Sternzellen wird in Betracht gezogen [17-19]. Suskind und Muench unterstützen diese These, indem sie CD34⁺CK7/8⁺-Zellen als potentielle embryonale Vorläuferzellen der HSCs identifizierten [17].

Sternzellen kommen jedoch keineswegs ausschließlich in der Leber vor. Nagy et al. wiesen Vitamin A-Speicherzellen in der Lunge, der Niere und dem Darm von Ratten unter erhöhter Vitamin A-Zufuhr nach, was darauf schließen lässt, dass nicht nur HSCs, sondern auch extrahepatische Sternzellen eine Rolle für die Vitamin A-Speicherung spielen [20, 21]. In morphologischer und funktioneller Hinsicht wurde insbesondere für pankreatische und hepatische Sternzellen eine besondere Ähnlichkeit gezeigt und ein gemeinsamer embryonaler Ursprung dieser beiden Zelltypen wird diskutiert [22, 23].

1.1.1 Physiologische Funktion von HSCs

Die Funktion ruhender HSCs in der gesunden Leber steht weit weniger im Zentrum der Forschung als die Rolle nach ihrer Aktivierung. Eine chronische Aktivierung der HSCs kann zur Entstehung einer Leberfibrose/-zirrhose führen, die im Abschnitt 1.1.2 eingehender erläutert wird.

Zunächst ist eine herausragende Eigenschaft von HSCs die Speicherung von Vitamin A in der Leber [24]. Im Zytoplasma der ruhenden Sternzelle befinden sich zahlreiche, membranumhüllte Lipidvesikel, die der Speicherung von Retinoiden dienen [25]. Etwa 50-80% des gesamten Vitamin A des Körpers ist in HSCs als Retinylester gespeichert [26, 27]. Ob die HSCs das gespeicherte Vitamin A in einer gesunden Leber auch wieder mobilisieren und in den Organismus freisetzen können bleibt jedoch unklar. Quadro et al. vermuteten, dass möglicherweise Retinol-bindendes Protein (RBP), eine Freisetzung von Vitamin A ermöglicht [28]. Unter Anregung mit ultraviolettem (UV-) Licht zeigt Vitamin A eine Eigenfluoreszenz, die zum Nachweis der Sternzellen genutzt wird [25, 29]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass HSCs eine Schlüsselfunktion in der Immunregulation der Leber besitzen, indem sie beispielsweise die Differenzierung und Akkumulation regulatorischer T-Zellen hemmen oder Einfluss auf die immunsuppressive Therapie bei Lebertransplantationen nehmen [30-32]. Auch durch die Regulation des Vasotonus der Sinusoide und damit des Blutflusses in der Leber scheint den Sternzellen eine Funktion zuzukommen [33-35]. Funktionen der HSCs im Rahmen der Regeneration nach einer Schädigung der Leber werden in Abschnitt 1.1.3.2 thematisiert.

1.1.2 Aktivierung von HSCs

HSCs werden durch eine Leberschädigung *in vivo*, sowie durch Kultivierung auf Zellkulturschalen aus Kunststoff *in vitro* aktiviert und durchlaufen im Rahmen dieser Aktivierung zahlreiche funktionelle und morphologische Veränderungen [36, 37]. Eine Aktivierung geschieht *in vivo* wahrscheinlich in Form von parakriner Stimulation durch benachbarte Zellen, einschließlich Hepatozyten, Kupfferzellen und Endothelzellen [4]. Starke Stimuli sind beispielsweise der fibrogene Botenstoff *transforming growth factor beta* (TGF- β) [36, 38], von Endothelzellen produziertes Fibronectin [39], reaktive Sauerstoffspezies [40] sowie Produkte geschädigter Hepatozyten [41]. Im Zuge der Aktivierung entwickeln HSCs einen kontraktilen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, der eine zunehmende Expression von *α -smooth muscle actin* (α -SMA) zeigt [42, 43]. Ferner gilt der Verlust der Vitamin A-haltigen Lipidtropfen allgemein als Zeichen der Sternzellaktivierung, wobei bisher ungeklärt ist, ob der Verlust von Vitamin A eine

Voraussetzung für die Aktivierung darstellt [44, 45]. Eine aktuelle Arbeit von Jophlin et al. deklariert hingegen, dass das Vitamin A nicht, wie bisher angenommen, in Form von Retinol vollständig aus der Sternzelle ausgeschieden wird, sondern dass lediglich die Größe der Lipidtropfen abnimmt und die Veränderungen der Lipidtropfen somit nicht den Grund für die Aktivierung der Sternzellen darstellen [46]. Neben der Kontraktilität sind Proliferation, Chemotaxis, Fibrogenese, Zytokinfreisetzung und Matrixdegradation weitere entscheidende Charakteristika für aktivierte HSCs [47]. HSCs werden als Hauptproduzenten von extrazellulärer Matrix, insbesondere Kollagen Typ I, bei chronischer Leberschädigung angesehen und sind vor allem aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Entstehung der Leberfibrose bekannt [48]. Die Leberfibrose stellt einen physiologischen und prinzipiell reversiblen Wundheilungsprozess der Leber als Antwort auf eine Schädigung dar, der die Waage zwischen Leberregeneration und dem Übergang zu Narbengewebe hält. Erst bei einer chronischen Leberschädigung, wenn regenerative Prozesse der Leber dauerhaft beeinträchtigt sind, geht die Leberfibrose in eine irreversible Leberzirrhose über [47, 49].

1.1.3 HSCs als mesenchymale Stammzellen der Leber

1.1.3.1 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSCs), die auch Knochenmark-Stroma-Zellen genannt werden, sind adulte, multipotente Stammzellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen [50-52]. Erstmals mutmaßte Cohnheim im Jahr 1867 im Rahmen seiner Untersuchungen zur Entzündung und Eiterung, dass Zellen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben, über die Blutbahn in geschädigtes Gewebe migrieren und dort zur Geweberegeneration beitragen [53, 54]. Anfang des 20. Jahrhunderts zeigte Maximow, dass Fibroblasten aus dem Knochenmark durch die Schaffung eines günstigen Mikromilieus die Hämatopoese unterstützen [55]. Friedenstein et al. beschrieben die Entwicklungsfähigkeit von sogenannten *colony-forming-unit fibroblasts* (CFU-Fs) aus dem Knochenmark, die als gemeinsame Vorläuferzellen von knorpel- und knochenbildenden Zellen dienen können [56]. Anfang der 90er Jahre wies Arnold Caplan auf die Existenz einer weiteren Stammzelle im Knochenmark hin und prägte für CFU-Fs den Namen MSCs [57]. Die Lokalisation der MSCs beschränkt sich jedoch nicht auf das Knochenmark – sie konnten postnatal in nahezu allen Organen und Geweben nachgewiesen werden und sind als Perizyten mit Blutgefäßen assoziiert [58, 59]. MSCs können zu verschiedenen mesenchymalen Zelltypen wie Osteoblasten, Myoblasten, Chondrozyten oder Adipozyten differenzieren und sind aufgrund ihrer Fähigkeit regenerative Prozesse zu

unterstützen von großem wissenschaftlichem Interesse [60-62]. Eine weitere wichtige Funktion von MSCs ist die Unterstützung der Hämatopoese durch hämatopoetische Stammzellen [63].

Da die Herangehensweise für die Charakterisierung der MSCs mitunter sehr unterschiedlich war, wurden 2006 von dem *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) drei Kriterien festgelegt, die humane MSCs definieren [64]. Dazu gehören die Adhärenz auf Plastik Kulturschalen unter standardisierten Kulturbedingungen, sowie die Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 bei fehlender Expression von CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 und HLA-DR. Darüber hinaus müssen die Zellen *in vitro* zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren können.

Neben der Möglichkeit von MSCs sich zu den oben genannten Zellen mesodermalen Ursprungs zu differenzieren, gibt es Hinweise auf Differenzierungsmöglichkeiten zu Zellen entodermaler und ektodermaler Herkunft [65]. So zeigen einige Arbeiten die Differenzierung von MSCs zu neuronalen Zellen, die einen ektodermalen Ursprung haben [66-69]. Diese neuronalen Zellen weisen einen für Neurone typischen Phänotyp auf, bilden Axone aus und exprimieren Neuronen-spezifische Oberflächenmarker und Gene [70]. Darüber hinaus ist eine Differenzierung zu Zellen entodermalen Ursprungs, wie Hepatozyten oder Pankreaszellen möglich [65]. Die unter Induktion mit *hepatocyte growth factor* (HGF) *in vitro* differenzierten Zellen zeigen funktionelle Charakteristika von Hepatozyten, wie eine Albuminproduktion und Glykogenspeicherung [71-75]. MSCs aus dem Knochenmark wurden *in vitro* zu endokrinen Pankreaszellen differenziert und stellen somit Hoffnungsträger in der Therapie des Diabetes mellitus dar [76-78]. Auch von der Differenzierung adulter, humaner MSCs zu Zellen mit phänotypischen und funktionellen Aspekten endothelialer Zellen wird vielfach berichtet [79-83]. MSCs zeigen neben ihrer hohen Plastizität immunmodulatorische Eigenschaften und sezernieren trophische Faktoren, die die Geweberegeneration begünstigen [84, 85]. Aufgrund dieser Charakteristika und der guten Verfügbarkeit dieser Zellen vor allem in Fettgeweben werden MSCs als vielversprechende potentielle Therapeutika für verschiedenste Krankheitsbilder, beispielsweise die Graft-versus-Host-Reaktion oder Osteogenesis imperfecta angesehen und bereits in klinischen Studien untersucht [85].

1.1.3.2 Stammzellmarker von HSCs und ihr Beitrag zur Leberregeneration

Aufgrund der Tatsache, dass aktivierte HSCs die Stammzellmarker Nestin [13], p75 Neutrophin Rezeptor (p75NRT) [86], c-kit Ligand [87] und CD105 [88] exprimieren, untersuchten Kordes et al. ob es sich bei diesen Zellen um undifferenzierte Stamm- oder Progenitorzellen handelt [89]. Der Oberflächenmarker CD133, der typisch für Stammzellen aus dem hämatopoetischen System ist, konnte neben anderen Stammzellmarkern auf HSCs nachgewiesen werden [89]. Darüber hinaus zeigten HSCs *in vitro* Differenzierungspotential zu Adipozyten, Osteozyten und Hepatozyten-ähnlichen Zellen [89, 90]. Die Autoren schlossen daraus, dass es sich bei HSCs um bisher nicht identifizierte MSCs der Leber handelt [90]. Auch die immortalisierte Sternzelllinie LX-2 [91] kann zu verschiedenen mesenchymalen Zelllinien wie Adipozyten und Osteozyten differenziert werden und zeigt einen Phänotyp, der dem von MSCs des Knochenmarks ähnlich ist [92]. Pankreatische Sternzellen, die Parallelen zu HSCs aufweisen, exprimieren ebenfalls Stammzellmarker und tragen zur extrapancreatischen Geweberegeneration nach partieller Hepatektomie bei [93].

Im Rahmen eines Leberschädigungsmodells konnten Kordes et al. belegen, dass transplantierte HSCs zum Ort der Gewebeschädigung migrieren und dort zu Progenitorzellen, Hepatozyten oder Cholangiozyten differenzieren und auf diese Weise zur Leberregeneration beitragen [94]. Darüber hinaus siedeln sich die transplantierten HSCs im Knochenmark an und fördern nach Entnahme und Retransplantation erneut die Leberregeneration [94]. Gewebespezifisches *homing*, Migration zu geschädigtem Gewebe, Fähigkeit zur Geweberegeneration, Transplantierbarkeit und Selbsterneuerung sind wichtige Charakteristika von Stammzellen [52, 95, 96], die auch von HSCs erfüllt werden [94].

Leberprogenitorzellen, die bei Nagern Ovalzellen genannt werden, sind kleine Zellen, die bei beeinträchtigter Hepatozytenproliferation zur Regeneration einer geschädigten Leber beitragen [97, 98]. Es wird angenommen, dass Progenitorzellen von Stammzellen mit epithelialen Eigenschaften abstammen [99]. Kordes et al. untersuchten in diesem Zusammenhang ob Progenitorzellen möglicherweise eine Zwischenstufe in der Differenzierung von HSCs und anderen MSCs darstellen [94]. In der 21-tägigen *in vitro* Differenzierung von HSCs zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen zeigte sich eine vorübergehende Ausprägung der Progenitorzellmarker Zytokeratin 19 (CK19), *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM), *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (LGR5) und α -Fetoprotein (AFP) [94]. Auch Yang et al. identifizierten HSCs als eine Art Ovalzellen, die während ihrer Differenzierung zu

Hepatozyten eine mesenchymale Phase durchlaufen [100]. Andere Untersuchungen zur Abstammungsverfolgung widersprechen der Annahme hingegen, da sie keine Differenzierung von HSCs zu epithelialen Zellen zeigen konnten [101, 102].

HSCs können einerseits selbst *in vitro* und *in vivo* zu Hepatozyten differenzieren und auf diesem Wege zur Leberregeneration beitragen [103], sie fördern andererseits in Kokultorexperimenten aber auch die Proliferation und Differenzierung verschiedener Stamm- und Progenitorzellen [104-106] sowie Hepatozyten [107]. HSCs wurden als Hauptproduzenten von HGF in der Leber identifiziert, welches stark mitogen auf Hepatozyten wirkt [108]. In einem durch 2-Acetylaminofluorene (2-AAF) induzierten Leberschädigungsmodell der Ratte konnte außerdem gezeigt werden, dass HSCs in der frühen Phase der Leberregeneration HGF freisetzen und die Proliferation der Ovalzellen fördern, wohingegen sie in der späten Phase der Leberregeneration eher einen negativen regulatorischen Effekt haben [109]. Diese regulatorische Wirkung wird durch die Freisetzung von TGF- β 1 vermittelt, das antiproliferativ auf Hepatozyten wirkt und legt eine mögliche Funktion der HSCs bei der Terminierung der Leberregeneration nahe, wenn eine für den Organismus ausreichende Lebermasse erreicht wird [109, 110]. Darüber hinaus wurde die Rolle der HSCs bei der Leberregeneration in *loss of function*-Studien untersucht, indem aktivierte HSCs in einem Paracetamol-induzierten Leberschädigungsmodell mit Gliotoxin depletiert wurden. Dies führte zu einer gestörten Leberregeneration mit erhöhter Apoptoserate von Hepatozyten sowie verminderter Anzahl von Ovalzellen [111]. Bei einer frühen Depletion von HSCs kam es zu einer gestörten Leberregeneration, wohingegen aus einer späten Depletion ein beeinträchtigter Abschluss der Leberregeneration resultierte [112]. Dies lässt differentielle Funktionen der HSCs in unterschiedlichen Phasen der Leberregeneration (Initiationsphase, Proliferationsphase, Terminationsphase) vermuten.

Ruhende HSCs befinden sich im Disse'schen Raum, der als ihre Stammzellnische bezeichnet werden kann und der Aufrechterhaltung des ruhenden Phänotyps der Sternzelle, beziehungsweise der Erhaltung eines Gleichgewichts zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung dient [113, 114]. Schofield entwickelte 1978 das Modell der Stammzellnische als ein Kompartiment, in dem durch direkte Zell-Zell-Kontakte und parakrine Stimulation die Charakteristika von hämatopoetischen Stammzellen erhalten werden [115]. Der Disse'sche Raum, bestehend aus sinusoidalen Endothelzellen, Hepatozyten und den Basallaminaproteinen Laminin und Kollagen Typ IV zeigt darüber hinaus Analogien zu typischen Stammzellnischen [114]. So konnte beispielsweise im Disse'schen Raum eine, für Stammzellnischen typische [116], sympathische Innervation nachgewiesen werden [114]. Darüber hinaus setzen

Endothelzellen *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), auch bekannt als CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12), frei, das an den CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) der HSCs bindet [114]. Diese SDF-1/CXCR4-Achse ist bekannt dafür, während der Ontogenese hämatopoetische Stammzellen entlang eines SDF-1-Gradienten zu ihrer Stammzellnische ins Knochenmark zu leiten [117]. Zwei andere Signalwege, die in der Stammzellnische neuronaler und hämatopoetischer Stammzellen eine zentrale Rolle spielen sind der β -Catenin abhängige WNT- und der Notch-Signalweg [118, 119]. Auch diese Signalwege sind im Disse'schen Raum von Bedeutung, da Hepatozyten den Notch-Liganden *Jagged1* und HSCs den entsprechenden Rezeptor exprimieren [114]. Kordes et al. zeigten schon 2008, dass der β -Catenin abhängige WNT-Signalweg zur Erhaltung des ruhenden Zustands von HSCs beiträgt [120].

Diese Untersuchungsergebnisse unterstützen die Annahme, dass Sternzellen neben ihrer Funktion als Produzenten extrazellulärer Matrix eine entscheidende Rolle in der Regeneration der geschädigten Leber spielen.

1.2 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PR)

S1PR sind G-Protein-gekoppelte Lysophospholipid-Rezeptoren (LPL-R), die in die Subgruppe A13 der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) eingeordnet werden [121]. GPCRs werden anhand funktioneller Ähnlichkeiten und Sequenzhomologien in die Gruppen A-F unterteilt [122-124]. Die Subgruppe A, die Gruppe der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, ist die größte Gruppe der GPCRs und ihrerseits wiederum in 19 Untergruppen (A1-A19) unterteilt [125]. Die Gruppe der Lysophospholipid-Rezeptoren setzt sich zusammen aus den S1PR mit dem endogenen Liganden Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und den Lysophosphatidsäure-Rezeptoren (*lysophosphatidic acid receptor*, LPAR) mit dem endogenen Liganden Lysophosphatidsäure (*lysophosphatidic acid*, LPA) [126]. Die LPL-R-Gene werden auch als *endothelial differentiation genes* (EDG) bezeichnet [126]. Es wurden bisher fünf Mitglieder der S1P-Rezeptorfamilie identifiziert: S1PR1, 2, 3, 4 und 5 [126]. 1990 wurde durch Klonierung aus humanen Endothelzellen der Nabelvene unter Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) der erste S1PR identifiziert und als Rezeptor mit signifikanten strukturellen Ähnlichkeiten zu GPCRs beschrieben, wobei der Ligand zunächst unbekannt blieb [127]. Wenige Jahre später identifizierte man S1P als endogenen Liganden [128, 129]. Es folgte die Identifizierung vier weiterer Rezeptoren der S1P-Rezeptorfamilie: S1PR2 [130, 131], S1PR3 [132, 133], S1PR4 [134] und S1PR5 [135, 136]. Die S1PR2, 4 und 5 sind beim Menschen auf dem Chromosom 19

lokalisiert, wobei S1PR2 und 5 nah aneinander liegen. S1PR1 ist hingegen auf dem Chromosom 1 und S1PR3 auf dem Chromosom 9 lokalisiert [137]. Diese variable chromosomale Verteilung innerhalb einer GPCR-Familie kann beispielsweise auch bei Chemokinrezeptoren beobachtet werden [138]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle LPL-R mit dem dazugehörigen Liganden, den Synonymen sowie der exakten Einordnung in die GPCR-Subgruppen.

Tabelle 1: Liste der LPL-R mit Liganden, Synonymen und der GPCR-Subgruppe.

Rezeptor	Ligand	Synonym	GPCR-Subgruppe
S1PR1	S1P	EDG1	A13
S1PR2	S1P	EDG5	A13
S1PR3	S1P	EDG3	A13
S1PR4	S1P	EDG6	A13
S1PR5	S1P	EDG8	A13
LPAR1	LPA	EDG2	A13
LPAR2	LPA	EDG4	A13
LPAR3	LPA	EDG7	A13
LPAR4	LPA	GPR23	A15
LPAR5	LPA	GPR92	A15
LPAR6	LPA	P2Y5	A15

Es ist allgemein anerkannt, dass die S1PR1-3 prinzipiell in allen Zelltypen exprimiert werden, wohingegen es zur Expression des S1PR4 und 5 unterschiedliche Angaben in der Literatur gibt [126, 138, 139]. Auf der einen Seite wird eine auf einige Gewebe und Zelltypen limitierte Expression des S1PR4 und 5 beschrieben, wonach der S1PR4 in erster Linie in lymphatischem [138, 140] aber auch in hämatopoetischem Gewebe und der Lunge exprimiert wird [134] und der S1PR5 im zentralen Nervensystem, der Haut und der Milz detektiert wurde [135, 138]. Auf der anderen Seite widerspricht dieser eingeschränkten Ausprägung des S1PR4 und 5 in wenigen Zelltypen eine Arbeit, die die Expression dieser Rezeptoren in verschiedensten Gewebeproben beschreibt [141]. Wang et al. untersuchten mittels Immunhistochemie an 384 Gewebeproben (183 benigne und 201 maligne) die Lokalisation aller fünf S1PR. Hierbei zeigten sich Signale aller Rezeptoren sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma, mit Ausnahme des S1PR3, dessen Signale ausschließlich im Nukleus detektiert wurden [141]. Auf der Zellmembran wurden die fünf S1PR kaum detektiert [141]. Price et al. und Nincheri et al. beschrieben darüber hinaus den Nachweis von mRNA aller fünf S1PR in MSCs [142, 143].

Alle fünf Rezeptoren der S1PR-Familie binden S1P spezifisch und es gibt bislang keine Hinweise auf einen weiteren endogenen Liganden [126]. Die Biosynthese und die biologischen Funktionen von S1P werden in Kapitel 1.2.1 detailliert thematisiert. Andere Sphingolipide können die Rezeptoren in sehr hohen, mikromolaren Konzentrationen ebenfalls aktivieren – diese Konzentrationen werden jedoch generell als nicht physiologisch angesehen [126]. S1PR zeigen den für GPCRs typischen strukturellen Aufbau aus 7 spiralförmig angeordneten Transmembrandomänen, die mit den griechischen Ziffern I-VII bezeichnet werden [144]. Das N-terminale Ende liegt extrazellulär, wohingegen das C-terminale Ende intrazellulär liegt [145]. Intrazellulär binden die Rezeptoren an verschiedene heterotrimere G-Proteine: alle fünf Rezeptoren binden $G_{i/o}$, S1PR2-5 binden zusätzlich $G_{q/11}$ und S1PR2 sowie S1PR3 binden darüber hinaus noch $G_{12/13}$. Die aktivierten G-Proteine setzen verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden, beispielsweise den Ras-, Rho-, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)- oder Phospholipase C (PLC)-Signalweg in Gang - diese führen schließlich zu zellulären Antworten wie Proliferation oder Migration (Abb. 1) [121, 138, 146].

Um genauere Erkenntnisse über die Funktion der S1PR *in vivo* zu erlangen, wurden Versuche durchgeführt, in denen einzelne S1PR in Mäusen gezielt deletiert wurden [126, 138]. S1PR1(-/-)-Mäuse sind nicht lebensfähig und es kommt zum intrauterinen Tod aufgrund gestörter vaskulärer Reifung trotz initial normaler Vaskulogenese und Angiogenese [147]. Eine Deletion des S1PR2 kann unterschiedliche Folgen haben: Kono et al. zeigten, dass eine Ausschaltung des S1PR2 zu Störungen des Innenohrs wie Taubheit und Gleichgewichtsproblemen führt, die als Folge veränderter Haarzellen auftreten [148]. MacLennan et al. berichteten hingegen von phänotypisch unauffälligen Mäusen direkt nach der Geburt, die jedoch zwischen der 3. und 7. Lebenswoche neuronale Exzitationsstörungen entwickeln [149]. Lorenz et al. fanden Hinweise auf einen reduzierten Widerstand mesenterialer und renaler Gefäße [150]. Die Deletion des S1PR3 führt zu einer normal entwickelten Maus mit unauffälligem Phänotyp [151], die kombinierte Deletion von S1PR2 und S1PR3 reduziert jedoch die Fertilität [152]. S1PR4(-/-)-Mäuse zeigen eine gestörte Megakaryozytendifferenzierung und eine eingeschränkte Funktion dendritischer Zellen [153, 154]. Eine Deletion des S1PR5 führt zu einer gestörten Mobilisation und *homing* natürlicher Killerzellen [155-157], einer verringerten Anzahl peripherer Ly6C⁺ Monozyten [158] sowie einem gestörten Rückzug von Zellfortsätzen in der Entwicklung von Oligodendrozyten [159]. Diese *Knockout*-Experimente lassen darauf schließen, dass die einzelnen S1PR in Abhängigkeit von dem Gewebe- und Zelltyp eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen erfüllen. Eine besondere Rolle scheinen die fünf Rezeptoren vor allem in der

Regulation des Immunsystems, des Nervensystems sowie des Gefäß- und Lymphsystems zu spielen [139]. Auch die Bedeutung der S1PR in der Onkogenese wird vielfach diskutiert [160]. Wang et al., die die Lokalisation der S1PR5 in benignen und malignen Gewebeproben untersuchten, konnten zeigen, dass alle fünf Rezeptoren in malignen Gewebeproben eine stärkere Lokalisation im Zellkern aufwiesen als in benignen Gewebeproben [141]. Die Translokation der S1PR in den Zellkern stellt damit möglicherweise einen kritischen Schritt in der Onkogenese und Tumorprogression dar. Die einzelnen Rezeptoren sind für verschiedene Krebsarten relevant, so führt beispielsweise bei akuter myeloischer Leukämie eine Aktivierung des S1PR2 zu einem verstärkten Wachstum und/oder Proliferation von Tumorzellen [161] und bei Blasenkrebs konnte im Mausmodell eine S1PR2-vermittelte Tumormetastasierung beobachtet werden [162].

Mit Fingolimod (FTY-720) ist bereits seit 2011 ein S1PR-Agonist als Immunsuppressivum für die Therapie der hochaktiven, schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose in Deutschland zugelassen [163]. Bei FTY-720 handelt es sich um ein S1P-Analogon, das *in vivo* durch eine Phosphorylierung in seine aktive Form FTY-720-P umgewandelt wird und an S1PR1, 3, 4 und 5, nicht jedoch an S1PR2 bindet [163, 164]. Fingolimod bindet mit ähnlicher Affinität wie S1P an S1PR1, 3 und 5, jedoch mit deutlich höherer Affinität als S1P an S1PR4 [165]. Eine andauernde Stimulation des S1PR1 durch FTY-720-P führt zu einer Internalisierung und Degradation des Rezeptors. FTY-720-P fungiert also als funktioneller Antagonist und inhibiert so die Auswanderung von Lymphozyten aus lymphatischen Organen [166]. In den letzten Jahren wurden zusätzlich Siponimod (BAF312) als selektiver S1PR1- und S1PR5-Modulator zur Therapie der sekundär progredienten Multiplen Sklerose (2020) [167] sowie Ponesimod als selektiver S1PR1-Modulator zur Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose zugelassen (2021) [168]. Ozanimod (RPC-1063), das als S1PR1- und S1PR5-Modulator bereits zur Therapie der schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose zugelassen war, erhielt im letzten Jahr zusätzlich die Zulassung für Behandlung von Colitis ulcerosa [169].

1.2.1 Biologische Funktion von Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

S1P ist ein Lysophospholipid (auch Lysophosphatid genannt), das primär als extrazelluläres Signalmolekül fungiert und an die S1PR1-5 bindet [139]. 1884 wurde Sphingosin aufgrund seiner damals rätselhaften Struktur nach der Sphinx, einer Kreatur der griechischen Mythologie, benannt [170].

Ausgangsstoff für die Synthese von S1P ist das Sphingolipid Ceramid [146, 171]. Ceramid wird entweder *de novo* synthetisiert oder durch das Enzym Sphingomyelinase aus dem Zellmembranbestandteil Sphingomyelin generiert [146, 171]. Das Enzym Ceramidase hydrolysiert Ceramid zu Sphingosin und die Sphingosinkinasen 1 und 2 bilden schließlich unter Phosphorylierung von Sphingosin S1P (Abb. 1) [146, 171]. S1P kann über zwei verschiedene Wege abgebaut werden: einerseits ist eine Umkehr des letzten Syntheseschrittes durch die S1P-Phosphatase intrazellulär sowie die Phosphatidat-Phosphatase extrazellulär möglich, wodurch wieder Sphingosin und Phosphat entsteht, andererseits kann die S1P-Lyase eine irreversible Spaltung von S1P in Phosphoethanolamin und Hexadecenal katalysieren [172, 173].

S1P kann sowohl intrazellulär als *second messenger* fungieren, als auch extrazellulär über die Bindung an S1PR parakrine oder autokrine Wirkungen entfalten [174]. Erythrozyten, Thrombozyten, Mastzellen, Endothelzellen und Hepatozyten sind in der Lage S1P zu produzieren und in das Blutplasma freizusetzen, wobei Erythrozyten und Endothelzellen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des S1P-Plasmaspiegels spielen [175-178]. S1P unterliegt im Plasma aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von 15 Minuten einem schnellen Umsatz, was auf eine kontinuierlich hohe S1P-Produktion hindeutet [178]. Die Konzentration von S1P im Blutplasma und in der Lymphe ist hoch (0,1 bis 1,2 $\mu\text{mol/L}$), die Konzentration im Interstitium wird jedoch gering gehalten, sodass ein Gradient für S1P entsteht [178]. Der Transport von S1P in den Extrazellulärraum wird vermutlich vorwiegend durch den Sphingolipid-Transporter 2 (SPNS2) vermittelt [173], der auch als Transporter für das oben genannte immunmodulatorische S1P-Analogon Fingolimod (FTY-720) fungiert [179]. Auch ABC-Transporter spielen möglicherweise eine Rolle bei der Freisetzung des intrazellulären S1P [180-182]. Das nach extrazellulär transportierte S1P bindet an zwei verschiedene Transportproteine: 35% des im Plasma befindlichen S1P ist an Albumin und 65% ist an Apolipoprotein M (ApoM) gebunden, von denen 5% in *high density lipoprotein* (HDL)-Partikeln gefunden werden kann [139, 183-185].

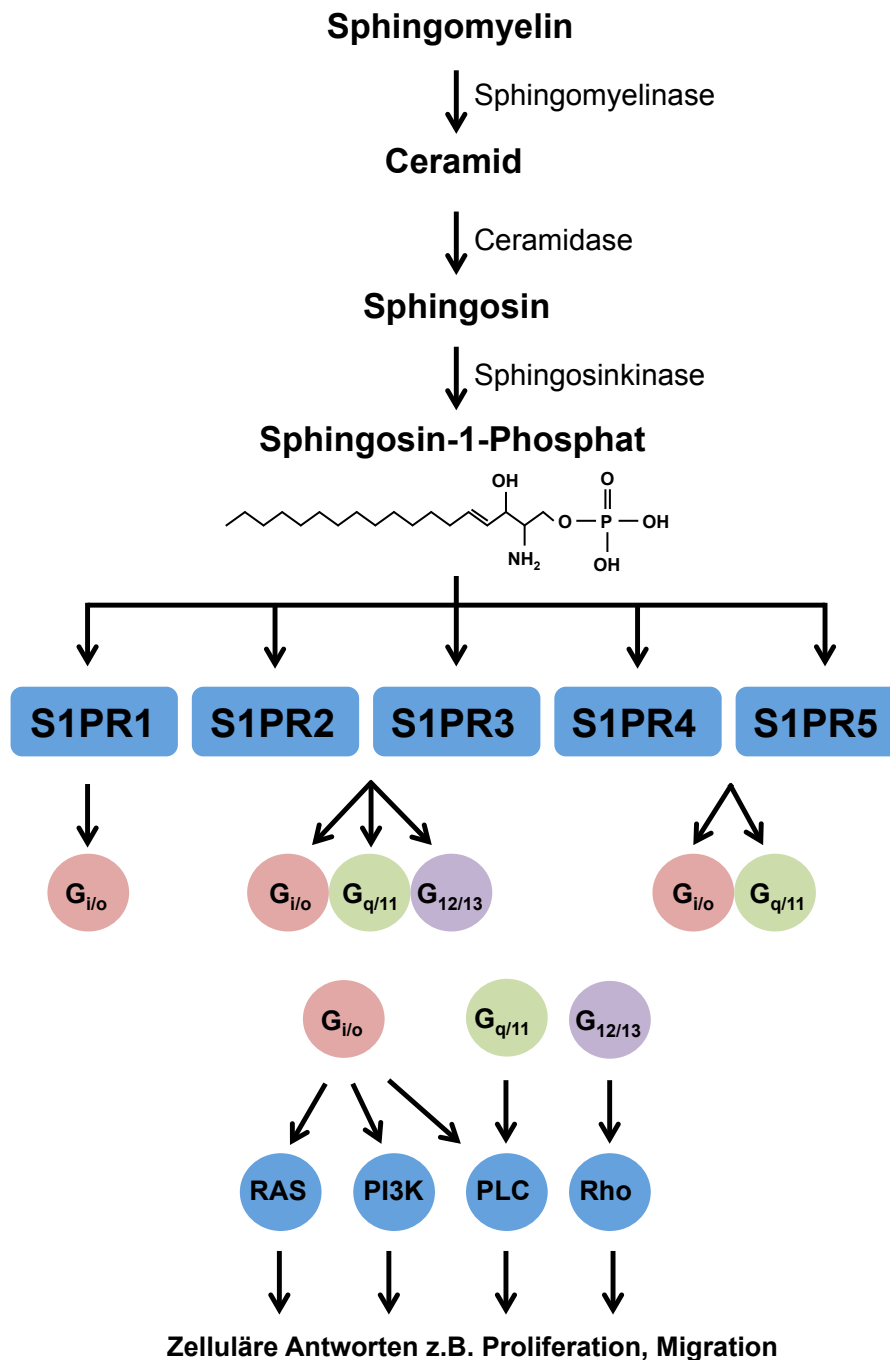


Abb. 1: Biosynthese und Signalwege von S1P.

Dargestellt ist die, von dem Zellmembranbestandteil Sphingomyelin ausgehende Synthese von S1P mit den Synthesestufen Ceramid und Sphingosin, sowie den beteiligten Enzymen. S1P bindet an die S1PR1-5, die an verschiedene G-Proteine gekoppelt sind. Diese vermitteln in Abhängigkeit von den intrazellulären Signalkaskaden verschiedene zelluläre Antworten.

Bezüglich der biologischen Funktion von S1P ist bekannt, dass es das Wachstum und Überleben ruhender Fibroblasten begünstigt [186, 187] und vor Apoptose schützt [188], wohingegen die Synthesestufen Ceramid und Sphingosin mit Zellwachstumsarrest und der Vermittlung von Apoptose assoziiert werden [170]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, die

verschiedene Funktionen von S1P in der Immunregulation, Entwicklung verschiedener Organsysteme, Zellmotilität, Zellmigration und anderen zellulären Prozessen nahelegen, von denen im Folgenden nur einige beispielhaft genannt werden [189]: Bei der Immunmodulation spielt der bereits genannte Konzentrationsgradient von S1P zwischen Plasma und Gewebe eine Rolle, indem er die Auswanderung von Lymphozyten aus sekundär lymphatischen Organen und dem Thymus ins Blut vermittelt [175, 190]. Auch die Zirkulation hämatopoetischer Progenitorzellen scheint durch S1P beeinflusst zu werden [191]. Für das Gefäßsystem ist S1P von entscheidender Bedeutung, da es an der Regulation der Angiogenese, Gefäßreifung und Gefäßpermeabilität beteiligt ist [192] und den Gefäßtonus moduliert [193]. Visentin et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass eine Neutralisation von S1P durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper zu einem reduzierten Tumorwachstum führt, das durch antiangiogenetische Effekte vermittelt wird [194]. Während der Organogenese fördert S1P die Entwicklung der Extremitäten [195], des Nervensystems [196], des Herzens [197] und des Pankreas [198]. Darüber hinaus steht eine gesteigerte S1P-Produktion mit zahlreichen pathophysiologischen Prozessen wie Krebs, Allergien, Atherosklerose und Autoimmunerkrankungen im Zusammenhang [199, 200].

1.2.2 S1PR in HSCs und anderen MSCs

Die Expression, Regulation und Funktion der S1PR in HSCs wurde bisher vorwiegend im Hinblick auf die Entstehung von Leberfibrose unter Berücksichtigung möglicher therapeutischer Ansätze untersucht. S1P ist als Ligand der S1PR bei der Untersuchung der Rezeptoren von entscheidender Bedeutung. In geschädigtem Lebergewebe findet sich unabhängig von der Ätiologie der Schädigung stets ein erhöhter S1P-Spiegel [201-203]. Ikeda et al. zeigten im Jahr 2000, dass eine dreitägige Behandlung mit 10 μ M S1P die DNA-Synthese subkultivierter aktivierter HSCs *in vitro* steigert, wohingegen die DNA-Synthese primärer HSCs davon unbeeinflusst bleibt [204]. Liu et al. untersuchten in diesem Zusammenhang an Zellen der immortalisierten Sternzelllinie LX-2 [91] die Rolle von S1PR in der Motilität und Aktivierung von HSCs und kamen zu dem Ergebnis, dass S1P die Migration und fibrogenetische Aktivität (gesteigerte α -SMA- und Prokollagenexpression) von HSCs fördert und zu einer erhöhten Expression von S1PR1 und 3, nicht jedoch von S1PR2 führt [205]. Studien mit dem S1PR2-Antagonisten JTE-013 zeigen, dass S1PR2 die S1P-induzierte Zellmigration negativ reguliert [205]. Dies deutet auf eine Rolle der S1P-S1PR1/3-Achse bei der Migration und fibrogenetischen Aktivierung von HSCs hin. Passend zu diesen Befunden zeigte sich in einem CCl₄ (Tetrachlormethan)-induzierten Leberschädigungsmodell eine erhöhte S1P-Produktion sowie Expression des S1PR1

und 3, jedoch eine reduzierte Expression des S1PR2. Nach zusätzlicher Gabe von Melatonin, welches das Ausmaß der Leberfibrose reduziert, kam es zu einer Reduktion des S1P und verminderten Expression der S1PR1 und 3 [206]. Auch Fadel et al. beschreiben eine Aktivierung von HSCs über den S1PR3 durch S1P, das von Hepatozyten unter Stimulation mit Palmitinsäure synthetisiert und in den Extrazellularraum sezerniert wird [207]. FTY-720 inhibiert folglich als S1PR-Modulator die Proliferation und Migration von HSCs nach PDGF-Stimulation und wird als mögliches antifibrotisches Medikament diskutiert [208].

Auch im Rahmen der Angiogenese, die eng mit der Leberfibrose assoziiert ist, sind die S1PR möglicherweise von zentraler Bedeutung, denn Angiopoietin 1 wird von aktivierten HSCs der fibrotischen Leber exprimiert [209]. Eine Stimulation von Sternzellen mit S1P führt über S1PR1 und 3 zu erhöhter Expression von Angiopoietin 1, dieser Effekt kann jedoch durch Antagonisten der S1PR inhibiert werden, wodurch das Ausmaß der Leberfibrose reduziert wird. S1PR2-Antagonisten zeigen dagegen keinen Effekt auf die Angiogenese [209].

Im Zusammenhang mit Leberfibrose kann es zu einer portalvenösen Hypertension kommen, an deren Entstehung HSCs über die S1P/S1PR-Achse möglicherweise beteiligt sind. Ikeda et al. zeigten, dass S1P die Kontraktilität von HSCs stimuliert und eine S1P-Infusion an isolierten und perfundierten Rattenlebern zu einem erhöhten portalvenösen Druck führt, der durch den S1PR2-Antagonisten JTE-013 wieder gesenkt werden kann [210]. Bestätigt wurde dies von Kageyama et al., die *in vivo* an zirrhotischen Rattenlebern nach Infusion von JTE-013 ebenfalls eine Reduktion des portalvenösen Drucks ohne Veränderung des mittleren arteriellen Drucks beobachten konnten [211]. Bei Ratten, die einer Scheinoperation unterzogen wurden, zeigte sich bei identischer Behandlung keine Veränderung des portalvenösen und mittleren arteriellen Drucks [211]. Diese Beobachtungen legen eine Rolle des S1PR2 in der Pathophysiologie der portalen Hypertension nahe und lassen auf S1PR2-Antagonisten als mögliches Therapeutikum schließen. Weitere Arbeiten deuten ebenfalls auf einen protektiven Effekt einer S1PR2-Inhibition hin und zeigen, dass eine S1PR2-Inhibition Mäuse vor CCl₄-induzierter Leberfibrose schützt [212] und das Ausmaß einer durch chronische Leberschädigung bedingten Zirrhose bei S1PR2(-/-)-Mäusen deutlich geringer ausfällt als bei Wildtyp-Mäusen [213]. Diesem Befund steht jedoch eine Arbeit von Liu et al. gegenüber: Eine erhöhte Expression des hepatischen Wachstumsfaktors Hepatopoietin Cn (HPPCn) in transgenen Mäusen mildert eine Ethanol- und CCl₄-induzierte Leberfibrose und eine Behandlung mit rekombinantem humanem

HPPCn reduziert eine HSC-Aktivierung. Der S1PR2-Antagonist JTE-013 schwächt die Wirkung von HPPCn auf die HSC-Aktivierung ab und wirkt somit profibrotisch [214].

Zusammenfassend lassen die bisher verfügbaren Beobachtungen auf eine differentielle Funktion der S1PR in HSCs schließen. S1PR1 und 3 unterstützen möglicherweise ähnliche Prozesse und unterliegen ähnlichen Regulationsmechanismen. Alle fünf Rezeptoren der S1PR-Familie werden in der immortalisierten Sternzelllinie LX-2 [91] exprimiert, hinsichtlich der Expression und Funktion von S1PR4 und 5 in primären HSCs gibt es jedoch bisher keine Untersuchungen in der Literatur [207].

Analysen zur Funktion und Expression von S1PR in anderen MSCs lassen Rückschlüsse auf eine mögliche differentielle Rolle der S1PR bei der Beeinflussung von Zellproliferation und -differenzierung zu. Kitada et al. untersuchten an Präadipozyten die Proliferation und Differenzierung von MSCs nach Behandlung mit verschiedenen S1PR-Antagonisten und kamen zu dem Ergebnis, dass S1PR1 und 3 die Proliferation der Zellen fördern, wohingegen S1PR2 Differenzierungsprozesse vermittelt. Die Effekte konnten durch die jeweiligen Antagonisten abgeschwächt werden [215]. Price et al. unterstützen die Rolle des S1PR2 in der Differenzierung, indem sie zeigten, dass die Inhibition des S1PR2 zu einer reduzierten Differenzierung von MSCs zu Adipozyten und Osteoblasten sowie einer verstärkten Proliferation und Migration der MSCs führt [142]. Auch andere Arbeitsgruppen schreiben dem S1PR2 eine zentrale Bedeutung in Differenzierungsprozessen von MSCs zu [143, 216, 217]. Yang et al. sehen jedoch in S1PR1 und 3 Vermittler einer TGF- β 1-induzierten Differenzierung von Knochenmarkstammzellen zu Myofibroblasten [218]. Zahlreiche Studien kommen zu dem Schluss, dass für die Proliferation von MSCs insbesondere dem S1PR1 und 3 eine entscheidende Funktion zukommt [219-222].

Neben der Vermittlung von Proliferation und Differenzierung scheint die S1P/S1PR-Achse für die Migration von MSCs von Bedeutung zu sein. S1P fördert beispielsweise über den S1PR3 die Migration von Knochenmarkstammzellen in das geschädigte Lebergewebe, wo sie diese zu Myofibroblasten entwickeln und zur Fibrose beitragen [201, 202]. Auch Kong et al. und Golan et al. identifizierten den S1PR1 und 3 als Vermittler der Migration von Knochenmarkstammzellen [223, 224], wohingegen Quint et al. und Chen et al. eine Begünstigung der Migration durch den S1PR2 beschreiben [225, 226]. Der S1PR-Modulator FTY-720 inhibiert die S1P-vermittelte Migration von Knochenmarkstammzellen zum geschädigten Lebergewebe und wird aufgrund dessen als mögliches Therapeutikum für die Leberfibrose diskutiert [227].

Eine Arbeit von Ogle et al. zeigt darüber hinaus, dass der S1PR3 das Verbleiben von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in ihrer Stammzellnische im Knochenmark fördert und ein *Knockout* des S1PR3 zu einer Mobilisation der Zellen in die Blutzirkulation führt [228].

1.3 Ziele der Arbeit

HSCs spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Leberfibrose, da sie bei chronischen Erkrankungen der Leber extrazelluläre Matrix ablagern. Vor allem aufgrund ihrer unterstützenden Funktion während der Hämatopoese in der fötalen Leber können HSCs als MSCs angesehen werden, die zu verschiedenen Zelltypen differenzieren können. Sowohl für Prozesse der Differenzierung und Proliferation als auch der Fibrose verlassen die Sternzellen ihren ruhenden Zustand und weisen im Zuge dieses Aktivierungsprozesses eine dynamische Veränderung der Genexpression auf.

Das Expressionsmuster von S1PR in HSCs wurde bislang vorwiegend im Rahmen der Aktivierung der Sternzellen untersucht und lässt Rückschlüsse auf Funktionen der S1P/S1PR-Achse bei der Aktivierung, Migration und Fibrogenese von HSCs zu. In anderen MSCs zeigt sich darüber hinaus eine differentielle Funktion der S1PR hinsichtlich gegenläufiger Prozesse wie der Proliferation und Differenzierung. Unklar ist jedoch, durch welche Signalwege die S1PR in HSCs reguliert werden und welche Funktion einzelne dieser Rezeptoren in diesen Zellen erfüllen. So gibt es für den S1PR4 und S1PR5 bislang keine Studien, die ihre Regulation und Funktion in HSCs untersuchten.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es deshalb, die Expression der S1PR1-5 in isolierten, primären HSCs als MSCs der Leber nachzuweisen und Erkenntnisse über die Regulation dieser Rezeptoren und damit möglichen Funktion zu gewinnen (Abb. 2).

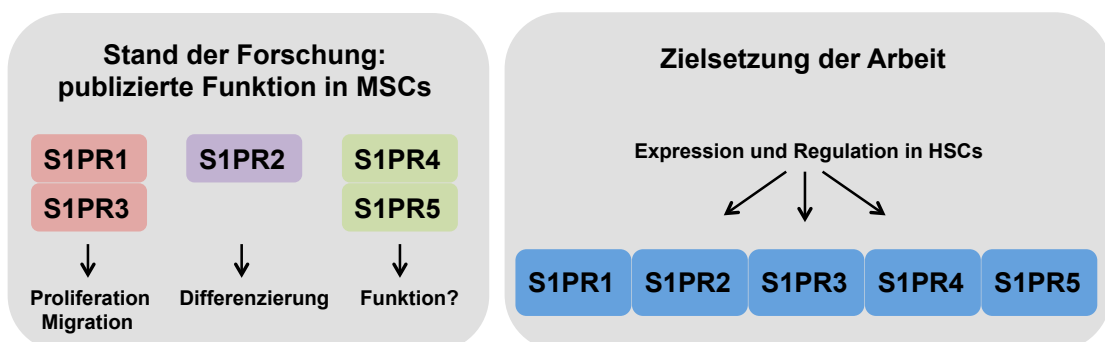


Abb. 2: Gegenwärtiger Forschungsstand zur Funktion der S1PR in MSCs und Zielsetzung der Arbeit.

S1PR erfüllen differentielle Funktionen in MSCs (links) [142, 215]. Ihre Bedeutung für HSCs als MSCs der Leber ist nur teilweise bekannt. Deshalb sollte die Expression, Regulation und damit mögliche Funktion der S1PR in HSCs untersucht werden (rechts).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien für die Zellkultur und zur Analyse

In Tabelle 2 werden Reagenzien aufgeführt, die für die Zellkultur verwendet wurden, in Tabelle 3 finden alle Materialien Erwähnung, die für die biochemischen und molekulargenetischen Analysen verwendet wurden.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Reagenzien für die Zellkultur.

Reagenz	Katalognummer	Hersteller mit Hauptsitz
activin A, recombinant human/murine/rat	120-14P	PeptoTech, Rocky Hill, USA
BMP-4, recombinant human	4578-10	BioVision, Milpitas, USA
BMP-7, recombinant human	120-03P	PeptoTech, Rocky Hill, USA
CHIR99021 (GSK 3-Inhibitor)	SML1046	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland
Crenolanib	S2730	Selleckchem, München, Deutschland
DMEM – high glucose (mit L-Glutamin)	D6429	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM – high glucose (ohne L-Glutamin)	D6546	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EGF, recombinant rat	400-25	PeptoTech, Rocky Hill, USA
FCS	F0804	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FGF-4, recombinant human	100-31	PeptoTech, Rocky Hill, USA
FGF-7, recombinant human	100-19	PeptoTech, Rocky Hill, USA
HGF, recombinant human	100-39	PeptoTech, Rocky Hill, USA
IL-1 β , recombinant rat	400-01B	PeptoTech, Rocky Hill, USA
IMDM	12440-053	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ITS+3 liquid media supplement	I2771	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-glutamine solution 200 mM	59202C	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland
LY2109761 (TGF- β 1-Rezeptor I/II-Inhibitor)	2704	Selleckchem, München, Deutschland
Nodal, recombinant human	3218-ND-025	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
PBS	D8537	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PD 98059 – CAS 167869-21-8	513000	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland
PDGF-BB, recombinant rat	P4056	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland
PSM	A5955	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
S1P	S9666	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland
TGF- β 1, recombinant human	100-21C	PeptoTech, Rocky Hill, USA
TGF- β 2, recombinant human	C-63506	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
TUDC	T0277	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien für die Analysen.

Reagenz	Katalognummer	Hersteller mit Hauptsitz
Acrylamid 4K – Lösung (30 %)	A0951,1000	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
APS	9592.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz	A512.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	11836145001	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
DAPI-Fluoromount-G®	0100-20	SouthernBiotech, Birmingham, USA
DTT	6908.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	8043.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	3054.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	24388.295	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	3908.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	T145.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	9265.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaF	71519	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	822335	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyrophosphat	P8010	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland
Pierce™ lane marker reducing sample buffer	39000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Precision Plus Protein™ all blue standard	1610373	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
protein assay dye reagent concentrate (Bradford-Reagenz)	5000006	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Roti®Free Stripping-Puffer 2.0	3319.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histofix 4 %	P087.5	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Stock 20 % SDS	1057.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	3060.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TBS	sc-362305	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
TEMED	2367.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	4855.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3 (Fortsetzung): Liste der verwendeten Reagenzien für die Analysen.

Reagenz	Katalognummer	Hersteller mit Hauptsitz
Triton™ X-100	T8787	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	9127.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β-glycerol phosphate disodium salt pentahydrate	50020	Merck GkaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzienansätze (Kits).

Name des Kits	Katalognummer	Hersteller mit Hauptsitz
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	11647229001	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Clarity™ Western ECL substrate	1705060	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	K0253	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	K1632	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy Mini Kit	74106	Qiagen, Hilden, Deutschland
WesternBright Quantum HRP substrate	K-12042-D20	Advansta, San Jose, USA
WesternBright Sirius HRP substrate	K-12043-D20	Advansta, San Jose, USA
ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green	R37609	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Primer

Die verwendeten Primer wurden unter Zuhilfenahme der Software Primer 3 (<https://primer3.ut.ee>, Whitehead Institute for Biomedical Research (Steve Rozen et al., Cambridge, USA)) entworfen und von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg hergestellt [229].

Tabelle 5: Liste der verwendeten Primer.

Gen	Sequenz	Basen-paare	Referenz-Nummer
Hprt1	Forward: AAGTGTGGATACAGGCCAGA Reverse: GGCTTTGACTTGGCTTTTCC	145	NM_012583.2
S1PR1	Forward: GCGGACGCAGCTTCGTCC Reverse: AGTTGTAATGCCGGACTATGA	289	NM_017301.2
S1PR2	Forward: AGCCAACAGTCACCAAAGTCA Reverse: CTGAGTATAAACCGCCCATGG	153	NM_017192.1
S1PR3	Forward: CCAGATGAGCCTTGCAGAAC Reverse: CCAGCTTCCCCACGTAATCA	254	NM_001271143.1
S1PR4	Forward: TGTGCTCTTTTGTGTGGTGG Reverse: CCAAGATCATCAGCACGGTG	161	NM_001108075.1
S1PR5	Forward: GCTAACTCGCTGCTGAATCC Reverse: TTGGAGGAGTCTTGGTTGCA	161	NM_021775.2

2.1.3 Antikörper

In der folgenden Tabelle finden sich alle Primär- und Sekundärantikörper, die für Western Blot-Analysen sowie immunhistochemische Färbungen verwendet wurden.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Katalognummer	Hersteller mit Hauptsitz
Primärantikörper		
Desmin XP	5332S	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Desmin	M0760	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GFAP	MAB3402	Merck GkA, Darmstadt, Deutschland
GFAP XP	12389S	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
S1PR1	PA1-1040	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
S1PR1	sc-25489	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
S1PR1	ab125074	Abcam, Cambridge, UK
S1PR2	sc-365589	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
S1PR2	NBP1-00794	Novus Biologicals, Centennial, USA
S1PR2	sc-25491	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
S1PR2	PA5-23208	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
S1PR3	ab108370	Abcam, Cambridge, UK
S1PR4	MBS2529432	MyBioSource, Inc., San Diego, USA
S1PR4	MABC97	Merck GKaA, Darmstadt, Deutschland
S1PR5	13874-1-AP	Proteintech Group, Inc., Rosemont, USA
S1PR5	PA5-23195	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vimentin	M072529-2	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Sekundärantikörper		
Anti-ms-IgG, Cy3	AP192C	Merck GKaA, Darmstadt, Deutschland
Anti-ms-IgG, FITC	AP192F	Merck GKaA, Darmstadt, Deutschland
Anti-ms-IgG, HRP	AP192P	Merck GKaA, Darmstadt, Deutschland
Anti-rb-IgG, Cy3	AP182C	Merck GKaA, Darmstadt, Deutschland
Anti-rb-IgG, FITC	AP182F	Merck GKaA, Darmstadt, Deutschland
Anti-rb-IgG, HRP	AP182P	Merck GKaA, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Leberschädigungsmodelle

Für dieses Experiment wurden an männlichen Wistar-Ratten zwei verschiedene Leberschädigungsmodelle eingesetzt. Die Versuche wurden von Dr. Iris Sawitza und Dr. Claus Kordes (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt und die Methoden wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (Aktenzeichen: 9.93.2.10.34.07.163).

Das eine Leberschädigungsmodell beruht auf der Leberregeneration durch eine partielle Hepatektomie (PHX) [230]. Hierfür wurden die Ratten zunächst mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht) über eine intraperitoneale Injektion in Narkose versetzt. Nach dem Einsetzen der Narkose folgte eine Laparotomie und die Unterbrechung der Blutversorgung der beiden größten Leberlappen durch eine Ligatur. Diese beiden Leberlappen (etwa 70% der Lebermasse) wurden entfernt und das Abdomen mit steriler Ringer-Lactat-Lösung mehrfach gespült. Das Abdomen wurde verschlossen und der Ratte wurden zur Linderung postoperativer Schmerzen Caprofen (5 mg/kg Körpergewicht) subkutan injiziert. An Tag 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 und 14 nach dem Eingriff wurden die Ratten euthanasiert und die Leber entnommen, um die Regeneration zu analysieren.

Das andere Leberschädigungsmodell beruht auf der Induktion einer Stammzell-/Progenitorzell-basierten Leberregeneration durch Implantation eines Wirkstoffpellets mit 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) und anschließender PHX [231]. Das 2-AAF wird von Hepatozyten metabolisiert und inhibiert daraufhin ihre Proliferation. Auch hierfür wurde die Ratte zunächst mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht) über eine intraperitoneale Injektion in Narkose versetzt. Nach Erlöschen der Reflexe wurde ein kurzer Schnitt im Bereich des dorsalen Halses gesetzt und ein wenige Millimeter großes 2-AAF-Pellet eingebracht, welches 20 mg 2-AAF pro kg Körpergewicht und Tag freisetzte. Nach 7 Tagen Vorbehandlung mit 2-AAF folgte die PHX nach dem oben beschriebenen Vorgehen, an die sich die Probenentnahme zu den oben genannten Zeitpunkten anschloss.

2.2.2 Isolation von HSCs aus der Rattenleber

Die Isolation von HSCs aus der Rattenleber erfolgte gemäß des Protokolls von Hendriks et al. [232] und wurde von Frau Claudia Rupprecht (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf)

durchgeführt. Es wurden Wistar-Ratten im Alter von 12 bis 15 Monaten und mit einem Gewicht von über 500g verwendet. Für die Isolation der Sternzellen lag eine Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen vor (Aktenzeichen 84-02.04.2015.A287).

Zu Beginn der Isolation wurden die Ratten mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (20 mg/kg) anästhesiert. Nach Eröffnung der Bauchwand wurde die *Vena portae* mit einer Kanüle punktiert und zur Reduktion des Drucks in der Leber die *Aorta descendens* eröffnet. Über die Kanüle wurde die Leber für einige Minuten mit *Hanks' Balanced Salt solution* (HBSS) perfundiert. Anschließend wurde die Leber entnommen, an ein Perfusionssystem angeschlossen und extrakorporal erneut einige Minuten mit HBSS gespült. Zur Verdauung der Leber wurde diese im nächsten Schritt mit 0,35%iger Pronase-Lösung und 0,028%iger Kollagenase-Lösung perfundiert sowie nach ausreichender enzymatischer Zersetzung von dem Perfusionssystem diskonnektiert. Die Leber sowie 0,1%ige Pronase-Lösung und 5 mg DNase (in 500 µl HBSS) wurden in ein steriles Gefäß gegeben und das übrige nicht lebereigene Gewebe wurde entfernt. Mittels zweier Pinzetten wurde die Leberkapsel eröffnet und die infolgedessen ausgetretene Zellsuspension wurde in zwei Schritten filtriert (200 µm und 70 µm Porengröße). Es folgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 44 x g und 4 °C, um Zellklumpen und Hepatozyten zu entfernen. Nun wurde der Überstand mit nicht-Parenchymzellen abgenommen und erneut für 10 Minuten bei 450 x g und 4 °C zentrifugiert, um die Enzyme von den Zellen zu trennen. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in vier Falcons mit je 29 ml HBSS resuspendiert und es wurden 11 ml Nycodenz-Lösung durch Pipettieren untergemischt. Anschließend wurden in vier neue Falcons je 8 ml HBSS gegeben und mit 20 ml der Nycodenz-enhaltenden Zellsuspension unterschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 1400 x g und 4 °C ohne Benutzung der Zentrifugenbremse. Vorsichtig wurde die oberste, weiße, Sternzellen-enhaltende Schicht des Gradienten abgenommen und in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10% *fetal calf serum* (FCS) aufgenommen sowie für 5 Minuten bei 450 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in einer definierten Menge DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin/Mycomycin (PSM) aufgenommen, um die Zellzahl zu bestimmen. Schließlich wurden die Zellen auf Zellkulturschalen aus Plastik ausgebracht und bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Pro 10 cm-Zellkulturschale wurden 3.000.000 Zellen, pro 6 cm-Zellkulturschale 1.000.000

Zellen und pro 6- beziehungsweise 12-Well-Platte jeweils 3.000.000 Zellen ausgebracht.

2.2.3 Zellkultur

An Tag 1 nach der Isolation wurden die Zellen auf das jeweilige experimentelle Medium, beziehungsweise das Kontrollmedium umgesetzt. Es wurden Versuche mit serumhaltigem (*Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium* (IMDM), 10% FCS, 1% PSM), sowie mit serumfreiem (IMDM, 1% PSM, 1% ITS+3 (*Insulin-transferrin-sodium selenite, linoleic;oleic-BSA*)) Medien durchgeführt. Die Zellen wurden mit 5 ml Medium pro 6 cm-Zellkulturschale und 10 ml Medium pro 10 cm-Zellkulturschale kultiviert. Die Medien wurden an jedem zweiten Tag gewechselt.

2.2.4 Probengewinnung und Protein-/RNA-Isolation

Sowohl für die RNA-Gewinnung als auch für die Proteingewinnung wurde nach entsprechender Kulturzeit zunächst das Zellkulturmedium aus den Zellkulturschalen abgenommen und die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellernte erfolgte an Tag 1 und Tag 7 sowie für einige Experimente zusätzlich an Tag 3.

2.2.4.1 Proteinisolation

Für die Proteingewinnung wurden die Zellen auf Eis mit 500 µl kaltem Proteinlysepuffer (RL-Puffer) (Tabelle 7) mit einem Zellspatel abgekratzt und vollständig lysiert.

Die Zelllysate wurden für 7 Minuten bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung der Bradford-Methode, die darauf basiert, dass sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 von von 465 nm zu 595 nm verschiebt, wenn der Farbstoff an Proteine bindet [233]. Dazu wurden die Proben in eine 96-Well-Platte gegeben und je 1:200 mit Bradford-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Absorption photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde schließlich rechnerisch anhand der Absorptionswerte einer Standardreihe von BSA-Lösungen bestimmt.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Proteinlysepuffers (RL-Puffer).

Substanz	Menge
2 M Tris pH 7,4	5 ml
5 M NaCl	14 ml
NaF	210 mg
Na-Pyrophosphat x 10 H ₂ O	2,2 g
Triton X-100	5 ml
0,5 M EDTA pH 8	1 ml
0,5 M EGTA pH 8	1 ml
Na-Vanadat	100 mg
β-Glycerolphosphat	2,2 g
Complete Proteaseinhibitor	10 Tabletten
Nanopure Wasser	ad 500 ml

2.2.4.2 Aufreinigung der RNA

Für die Gewinnung und Aufreinigung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Zellen wurden mit 350 µl RLT-Puffer, dem 3,5 µl β-Mercaptoethanol zugesetzt wurde, lysiert und mit einem Zellspatel vollständig abgekratzt. Um Verklumpungen zu vermeiden, wurde das Lysat mehrfach pipettiert.

Zunächst wurde der Probe ein dem Volumen der Probe entsprechendes Volumen an 70%igem Ethanol hinzugefügt und durch Pipettieren gemischt. Die Probe wurde dann auf eine Isolationssäule gegeben und die Gesamt-RNA wurde, entsprechend der Anleitung des Herstellers, aufgereinigt. Dazu wurden in mehreren Schritten zwei verschiedene Puffer auf die Isolationssäule gegeben und es folgten Zentrifugationen von 1-2 Minuten, um die RNA zu waschen. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Im letzten Schritt wurde die RNA durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation bei 8000 x g für eine Minute eluiert und anschließend gekühlt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem DropSense16 von Trinean.

2.2.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

2.2.5.1 Synthese der cDNA

Für die Synthese der cDNA wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Fisher Scientific und der Mastercycler Personal der Eppendorf AG verwendet. Pro Reaktionsansatz von 40 µl wurde je 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurden zu der RNA Nuklease-freies Wasser und Primer gegeben und die Lösung wurde zur Denaturierung der RNA für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Mastermix bestehend aus RNase-Inhibitor, reverser

Transkriptase, dNTP Mix und Reaktionspuffer hinzugefügt. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes kann der Tabelle 8 entnommen werden. Auf eine Inkubation für 5 Minuten bei 37 °C folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 42 °C, die der Synthese der cDNA diente. Eine Inkubation für 10 Minuten bei 72 °C führte zur Inaktivierung der Enzyme und Beendigung der Reaktion. Die synthetisierte cDNA wurde 1:3 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur cDNA-Synthese.

Substanz	Volumen [µl]
1 µg RNA	Abhängig von der RNA-Konzentration
Oligo(dT) ₁₈ -Primer	2
Random Hexamer-Primer	2
5x Reaktionspuffer	8
RNase Inhibitor (RiboLock)	2
dNTP Mix	4
Reverse Transkriptase (RevertAid)	2
H ₂ O Nuklease-frei	Ad 40

2.2.5.2 qPCR

Die qPCR wurde am qTOWER³ touch der Analytik Jena AG durchgeführt und diente dazu, die relative Expression verschiedener Gene zu bestimmen. Die Fluoreszenz des Farbstoffs SYBR Green, der sich in die DNA einlagert und dessen Fluoreszenz proportional zur Menge der Amplifikate ansteigt, wurde über 45 Replikationszyklen gemessen. Für die Messung wurde der in Tabelle 9 beschriebene Reaktionsansatz in jedes Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Messung erfolgte für jede Probe in Triplikaten. Das qPCR-Programm bestand aus einer zehnminütigen Aktivierungsphase der Taq-Polymerase und Denaturierung der cDNA bei 95 °C sowie 45 Zyklen mit jeweils drei Schritten: Denaturierung bei 95 °C für 20 Sekunden, Annealing der Primer bei 58 °C für 20 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden. Am Ende eines jeden Laufes wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese beruht auf der Annahme, dass alle spezifischen Amplifikate bei der gleichen Temperatur schmelzen und dient dazu, die Spezifität der Amplifikate zu beurteilen. Die qPCR Soft 3.1 (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) wurde zur Generierung der Ct-Werte genutzt. Der Ct-Wert beschreibt den Replikationszyklus, in dem die Fluoreszenz der Replikate einen festgesetzten Grenzwert überschreitet. Die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [234] diente zur Auswertung der Primärdaten und Bestimmung der relativen Expression des untersuchten Gens verglichen mit der Expression eines Haushaltsgens. Als Haushaltsgen diente in der vorliegenden Arbeit die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (Hprt1).

Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qPCR.

Substanz	Menge [μ l]
cDNA (1 μ g/120 μ l)	2,5
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	12,5
forward Primer (10 pmol/ μ l)	1,5
reverse Primer (10 pmol/ μ l)	1,5
H ₂ O Nuklease-frei	7

2.2.6 Western Blot

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte mittels der von Laemmli beschriebenen Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

2.2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zunächst wurden die Gele für die Elektrophorese vorbereitet. Im ersten Schritt wurden 2,5 ml Dichtungsgel (Tabelle 10) zwischen zwei, durch Spacer getrennte und mit Klebeband abgedichtete Platten gegeben. Anschließend wurden ungefähr 30 ml Trenngel (Tabelle 11) und, nach einer Polymerationszeit von 30 Minuten, 10 ml Sammelgel (Tabelle 12) hinzugegeben. Das ausgehärtete Gel wurde in eine, mit Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer (Tabelle 13) gefüllte Elektrophoresekammer (MAXI-Vertikal Doppel-Elektrophorese-Kammer Standard X950.01, Carl Roth GmbH + Co. KG) gespannt und es wurden je 40 μ g Probe aufgetragen. Die Proteinproben wurden zuvor mit der gleichen Menge Auftragspuffer (Tabelle 14) versetzt und für 5 Minuten in kochendem Wasser denaturiert. Es folgte die Auftrennung der Proben im elektrischen Feld entsprechend ihrem Molekulargewicht, indem eine Spannung von 160V angelegt wurde, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Anschließend durchliefen die Proben das Trenngel bei einer Spannung von 240V. Die Auftrennung der Proben im Spannungsfeld beruht auf der negativen Ladung des Natriumdodecylsulfat (SDS), das an Proteine bindet und ihnen so, entsprechend ihrem Molekulargewicht verschieden starke negative Ladungen verleiht. Als Referenz diente ein Proteinstandard, der Proteine mit definierten Molekulargewichten enthielt (Precision Plus Protein™ All Blue Protein Standard, Bio-Rad).

Tabelle 10: Zusammensetzung des Dichtungsgels für die Gelelektrophorese.

Substanz	Menge [ml]
H ₂ O Nanopure	2,5
PAA 30%	2,5
APS 10%	0,1
Temed	0,02
Gesamtvolumen	5,12

Tabelle 11: Zusammensetzung des Trenngels für die Gelelektrophorese.

Substanz	Menge [ml]	
Geldichte	8%	10%
H ₂ O Nanopure	13,9	11,9
PAA 30%	8	10
Tris 1,5 M, pH 8,8	7,5	7,5
SDS 10%	0,3	0,3
APS 10%	0,3	0,3
Temed	0,018	0,012
Gesamtvolumen	30	30

Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels für die Gelelektrophorese.

Substanz	Menge [ml]
H ₂ O Nanopure	6,8
PAA 30%	1,7
Tris 1,5 M, pH 6,8	1,25
SDS 10%	0,1
APS 10%	0,1
Temed	0,01
Gesamtvolumen	10

Tabelle 13: Zusammensetzung des 5x Tris-Glyzin-Elektrophoresepuffers.

Substanz	Menge [g]
SDS	25
Glycin	470
Tris	75,5
Aqua bidest	Ad 5 l

Tabelle 14: Zusammensetzung des Auftragspuffers für Western Blot-Analysen.

Substanz	Menge [ml]
10% SDS	12
1 M Tris, pH 6,8	3
Aqua bidest	3
Glycerin	6
Bromphenolblau	4
1 M DTT	7

2.2.6.2 Proteintransfer

Der Proteintransfer wurde im *semidry*-Verfahren durchgeführt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde hierfür das Gel zwischen den Glasplatten entfernt, zugeschnitten und mit 6 Lagen Whatman-Filterpapier kurz in Transferpuffer (Tabelle 15) eingelegt. Die Blottingkammer (Semi-Dry Transfer Unit TE77, GE Healthcare) wurde von unten nach oben wie folgt bestückt: 3 Lagen Filterpapier, Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 µm, Amersham™ Hybond™, Cytiva, Washington, D.C., USA), Elektrophoresegel, 3 Lagen Filterpapier. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 140 mA pro Gel für 2 Stunden auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Im Anschluss an den Proteintransfer wurden unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert, indem die Nitrocellulosemembran für mindestens eine Stunde mit 5% Milchpulver oder 5% BSA (in TBS-T, *Tris-buffered saline* mit 0,1% Tween20) in Abhängigkeit vom Primärantikörper behandelt wurde.

Tabelle 15: Zusammensetzung des 10x Transferpuffers für Western Blot-Analysen.

Substanz	Menge [g]
SDS	6
Glycin	58
Tris	116
Aqua bidest	Ad 2 l

2.2.6.3 Proteindetektion

Der für den spezifischen Proteinnachweis notwendige Primärantikörper (Tabelle 6) wurde in der angegebenen Verdünnung entweder in 5% Milchpulver oder 5% BSA in TBS-T gelöst und auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C unter Einsatz eines Schüttlers auf der Membran belassen. Am nächsten Tag wurden durch drei zehnminütige Waschzyklen mit TBS-T nicht gebundene Antikörper abgewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (Tabelle 6) im Verhältnis 1:20.000 (entsprechend dem Primärantikörper entweder in

5% Milchpulver oder 5% BSA in TBS-T) verdünnt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Erneut folgten drei zehnmütige Waschzyklen mit TBS-T, um nicht gebundene Sekundärantikörper zu entfernen. Die verwendeten Sekundärantikörper sind an das Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HPR) gekoppelt, was nach Zugabe von 1,3 ml Chemilumineszenz-Substrat (s. Tabelle 4) zur Emission von Lumineszenz bei einer Enzymaktivität führt. Es wurden verschiedene Aufnahmezeitpunkte festgelegt. Diese Lumineszenz wurde mit dem ChemiDoc™ Imaging System von Bio-Rad Laboratories detektiert. Für die Quantifizierung und Auswertung der Lumineszenz-Signale wurde die Software AlphaView SA (Version 3.4.0) von Protein Simple (San Jose, USA) genutzt.

Sofern eine Nitrocellulosemembran für die Detektion verschiedener Proteine mit mehreren Primärantikörpern der gleichen Spezies genutzt wurde, wurde sie nach der ersten Proteindetektion für 15 Minuten mit 30 ml Stripping-Puffer (Roti®Free Stripping-Puffer 2.0, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf dem Schüttler inkubiert um den zuerst verwendeten Primärantikörper von der Membran zu lösen. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBS-T (PBS mit 0,1% Tween20) für 10 Minuten gewaschen und erneut blockiert.

2.2.7 BrdU-ELISA

Die Proliferation von HSCs wurde mittels Bromdesoxyuridin-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (BrdU-ELISA) untersucht. Bromdesoxyuridin ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin, welches in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird und über eine Antikörper-vermittelte Enzymbindung sowie Zugabe eines geeigneten Substrats nachgewiesen und photometrisch quantifiziert werden kann. Es wurde das Cell Proliferation ELISA BrdU Kit von Roche verwendet.

Frisch isolierte HSCs wurden hierzu in einer Dichte von 20.000 Zellen pro Well auf 96-Well-Platten ausgebracht und mit DMEM mit 10% FCS und 1% PSM kultiviert. Die Kultivierung erfolgte jeweils mit 200 µl Medium pro Well bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen serumfreies Medium (IMDM mit 1% PSM und 1% ITS+3) ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. Am zweiten Tag nach der Isolation begann die Stimulation der Sternzellen mit PDGF-BB (*platelet derived growth factor-BB*) oder verschiedenen Konzentrationen von S1P für 48 Stunden. Die Kontrollen wurden weiterhin mit serumfreiem Medium behandelt. Zeitgleich mit dem Beginn der Stimulation wurden 20 µl BrdU-Markierungslösung (Roche) in jedes Well gegeben. Die Auswertung der Proliferation erfolgte an Tag 4 nach der Isolation. Zunächst wurde das Kulturmedium

entfernt und durch 200 µl FixDenat ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde 100 µl anti-BrdU-POD-Arbeitslösung in jedes Well gegeben und es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 90 Minuten. Die Zellen wurden dreimal mit der im Kit enthaltenen Waschlösung gewaschen und mit 100 µl Substratlösung versetzt, was zu einem Farbumschlag führte. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten durch Hinzugabe von 25 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Schließlich wurde die Absorption photometrisch mit dem Spektralphotometer Epoch2 von BioTek Instruments für Mikrotiterplatten bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) bestimmt.

2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung dient nicht nur dem spezifischen Nachweis von Proteinen in fixierten Zellen oder fixiertem Gewebe, sie lässt auch Rückschlüsse auf die Lokalisation eines exprimierten Proteins innerhalb der Zelle zu. Es wurden immunhistochemische Färbungen an isolierten Sternzellen, sowie an Gefrierschnitten der normalen und geschädigten Rattenleber (siehe Kapitel 2.2.1) durchgeführt.

Für die Färbung isolierter Zellen wurden 3.000.000 HSCs pro 6- oder 12-Well-Platte auf Coverslips ausgebracht und mit DMEM, versetzt mit 10% FCS und 1% PSM, kultiviert.

Die Gefrierschnitte der normalen und regenerierenden Leber wurden von Dr. Claus Kordes (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) angefertigt.

Die Fixierung der Proben erfolgte unter Verwendung von Methanol oder Formaldehydlösung. Für die Methanol-Fixierung wurden die Objektträger mit den anhaftenden Leberschnitten und die Coverslips mit den Sternzellen für 5 Minuten in eiskaltem Methanol getränkt. Die Zellen wurden vor und nach der Methanolbehandlung mehrfach mit PBS gewaschen. Für die Formaldehyd-Fixierung wurden die Leberschnitte und Zellen für 15 Minuten in phosphatgepufferte 4%ige Formaldehydlösung (Roti-Histofix, Carl Roth GmbH) gegeben, mit PBS gewaschen, anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und erneut gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurden alle fixierten Proben für eine Stunde mit 10% FCS in PBS benetzt. Der Primärantikörper (Tabelle 6) wurde 1:100 in 2% FCS in PBS verdünnt und auf die Proben gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlraum. Nicht gebundene Primärantikörper wurden in drei Waschschritten für 5 Minuten mit PBS entfernt. Es wurden an die Farbstoffe Cy3 oder FITC gekoppelte

Sekundärantikörper (Tabelle 6) verwendet. Diese wurden 1:200 (Cy3) oder 1:100 (FITC) in 2% FCS in PBS verdünnt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht auf die Objektträger und Coverslips gegeben. Es folgten drei Waschzyklen für 5 Minuten mit PBS. Für Ko-Färbungen wurden die oben genannten Schritte mit einem anderen Primär- und Sekundärantikörper erneut durchgeführt. Die gefärbten Zellen und Leberschnitte wurden schließlich mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI mit Fluoromount-G), das der DNA- und damit der Kernfärbung dient, eingedeckt und dunkel gelagert.

2.2.9 Lichtmikroskopie

Für alle lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde das Mikroskop IX50 (Vergrößerung 10x: Objektiv CPlan 10x / 0,25 PhC; Vergrößerung 20x: Objektiv LCPlanFI 20x / 0,40 Ph1; Vergrößerung 40x: Objektiv UPlanFLN 40x / 0,75 Ph2) und die Digitalkamera DP71 von Olympus verwendet. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden nach Anregung der Fluorochrome mit der Quecksilberlichtquelle U-RFL-T-200 von Olympus und den Fluoreszenzfiltern von Olympus und Chroma Technology (U-MWU, BP 330-385 nm, DM 400 nm, BA 420 nm; U-MNIBA2, BP 470-490 nm, DM 510 nm, BA 510-550 nm; U-M41007A, BP 525-560 nm, BA 594 nm) angefertigt. Für die UV-Fluoreszenz-Aufnahmen wurden die HSCs mit UV-Licht der Wellenlänge 350 nm angeregt. Diese Anregung führt zu einer Autofluoreszenz, die auf die Speicherung von Retinoiden in den Sternzellen zurückzuführen ist. Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte mit der Software CellSens Dimension (Version 1.16) von Olympus (Hamburg, Deutschland).

2.2.10 Statistische Auswertung

Der Mittelwert der Anzahl aller Proben wurde als arithmetisches Mittel bestimmt. Als Fehlerindikator wurde der SEM (*standard error of the mean*) gewählt. Für die Berechnung des arithmetischen Mittels, sowie des Standardfehlers wurde Microsoft® Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) genutzt. Die statistische Auswertung wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, als Post-hoc-Test wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test) verwendet. Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen. Für die statistische Auswertung wurde IBM SPSS Statistics 25 (International Business Machines Corporation, Armonk, USA) verwendet. Eine statistische Beratung erfolgte durch das statische Beratungsbüro des Instituts für systemische Neurowissenschaften des Universitätsklinikums Düsseldorf.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von isolierten HSCs

Zunächst wurden isolierte HSCs der Ratte an Tag 1 nach der Isolation hinsichtlich typischer Sternzellmarker untersucht. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden in den Methanol-fixierten Zellen die für Sternzellen charakteristischen Typ 3-Intermediärfilamente Desmin (Abb. 3 A) und Vimentin (Abb. 3 B) sowie GFAP (Abb. 3 C), das in ruhenden Sternzellen exprimiert wird, nachgewiesen. Darüber hinaus wurden die Zellen mit UV-Licht der Wellenlänge 350 nm angeregt, was zu einer charakteristischen Eigenfluoreszenz der Vitamin A-haltigen Lipidtropfen führte (Abb. 3 D, E).

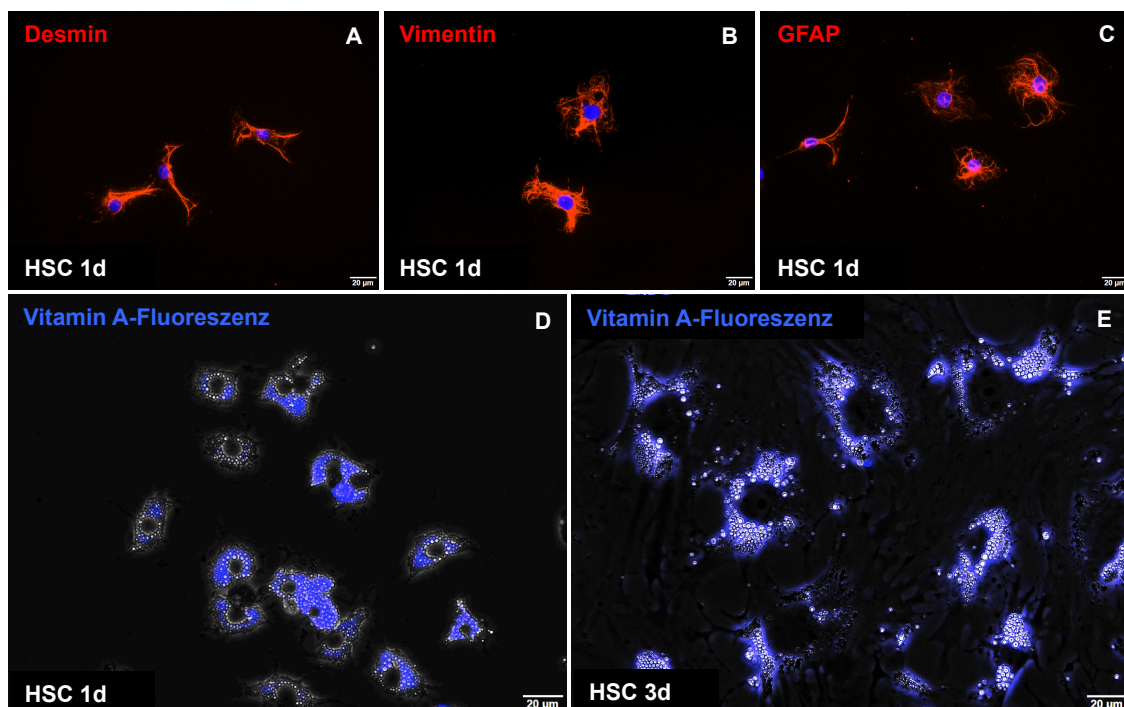


Abb. 3: Charakterisierung frisch isolierter HSCs der Ratte.

HSCs wurden an Tag 1 (1d) nach der Isolation mit Methanol fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden die charakteristischen Sternzellmarker Desmin (A), Vimentin (B) und GFAP (C) nachgewiesen. Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Unter Anregung mit UV-Licht zeigten die Sternzellen eine typische Eigenfluoreszenz der Vitamin A-haltigen Lipidtropfen, die einen spezifischen Nachweis dieser Zellen ermöglicht (D,E). Die Kultivierung der Zellen auf Zellkulturschalen aus Polystyrol führte zur Aktivierung der Sternzellen, die durch einen Verlust der Lipidtropfen gekennzeichnet ist. Die Maßstabachsen entsprechen 20 μm .

3.2 Expression der S1PR1-5 in HSCs der Ratte

Um die Expression von S1PR in HSC nachzuweisen und Erkenntnisse über das Expressionsmuster der Rezeptoren im Zuge ihrer Aktivierung (Kulturzeitraum von 7 Tagen) zu gewinnen, wurden die S1PR1-5 in isolierten HSCs der Ratte mittels qPCR-, Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen und quantifiziert. Um die relative mRNA-Menge der S1PR über einen Kulturzeitraum von 7 Tagen mittels qPCR-Analysen zu untersuchen, wurden isolierte HSCs der Ratte über 7 Tage mit serumhaltigem oder -freiem Medium behandelt und an Tag 1, 3 und 7 analysiert. Das serumhaltige Medium könnte unbekannte Faktoren enthalten und möglicherweise Einfluss auf die Expression der S1PR nehmen. Es zeigte sich unter serumhaltigen sowie unter serumfreien Kulturbedingungen ein deutlicher Rückgang der S1PR1, 3, 4 und 5 an Tag 3 und 7 verglichen mit dem Tag 1 der Kultur (Abb. 5 A, C, D, E). Die mRNA-Menge des S1PR2 fiel an Tag 3 unter serumhaltigen Bedingungen leicht ab und stieg unter serumfreien Bedingungen leicht an. An Tag 7 unterschied sich die mRNA-Menge des S1PR2 jedoch kaum von der mRNA-Menge an Tag 1 unter beiden Kulturbedingungen (Abb. 5 B).

Für die Western Blot-Analysen wurden die isolierten HSCs der Ratte über 7 Tage in serumhaltigem Medium kultiviert und an Tag 1, 3 und 7 untersucht. Die densitometrischen Analysen ließen einen Anstieg des S1PR2 (Abb. 6 B) sowie einen Abfall des S1PR3 (Abb. 6 C) über die Kulturzeit von 7 Tagen erkennen. Die relative Proteinmenge des S1PR1 stieg an Tag 3 transient an und fiel an Tag 7 wieder ab, bleibt jedoch höher als an Tag 1 (Abb. 6 A). Für den S1PR4 zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der relativen Proteinmenge über die Kulturzeit von 7 Tagen. Die Proteinbande des S1PR4 zeigte sich jedoch nicht wie erwartet bei 45 kDa, sondern bei 37 kDa. Bei dem S1PR5 zeigte sich neben der erwarteten Bande bei 42 kDa eine weitere Bande bei ungefähr 37 kDa. Zur Auswertung wurde lediglich die Bande bei 42 kDa herangezogen. Die unerwartete Höhe der Bande des S1PR4 bei 37 kDa sowie die Doppelbande des S1PR5 lassen auf eine geringe Spezifität der Antikörper schließen und stellen die Ergebnisse der Western Blot-Analysen für diese beiden Rezeptoren infrage. Trotz Testung mehrerer Antikörper für die S1PR4 und 5 konnten keine validen Ergebnisse erzielt werden, bei denen die Proteinbanden auf der erwarteten Höhe detektiert wurden. Für den S1PR4 wurden Antikörper von MyBioSource (MBS2529432, San Diego, USA) und Merck (MABC97, Darmstadt, Deutschland), für den S1PR5 Antikörper von Proteintech (13874-1-AP, Rosemont, USA) und Thermo Fisher Scientific (PA5-23195, Waltham, USA) getestet. Obwohl weitere Proteinanalysen für diese beiden Rezeptoren durchgeführt wurden, wird im Folgenden auf die Darstellung

verzichtet. Die Spezifität der verwendeten Antikörper könnte im Weiteren durch die Verwendung von KO-Gewebe als Negativkontrolle oder siRNA zur gezielten Abschaltung eines Gens in Zelllinien untersucht werden. Eine Überprüfung der Ergebnisse durch andere, validierte monoklonale Antikörper ist notwendig. Diese Antikörper sind jedoch derzeit für die Ratte nicht verfügbar.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden Leberschnitte mit Methanol fixiert und anschließend gefärbt. Die S1PR1-3 wurden detektiert (Abb. 4 A, D, G). Isolierte HSCs der Ratte wurden mit serumhaltigem Medium kultiviert und an Tag 1 und 3 mit Methanol fixiert und gefärbt. Es konnten die S1PR1-3 in isolierten HSCs der Ratte an beiden Tagen der Kultur nachgewiesen werden (Abb. 4). Der S1PR3 zeigte eine deutliche Kernfärbung (Abb. 4 H, I). Für die S1PR4 und 5 wurden ebenfalls Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, auf deren Darstellung jedoch aufgrund der zweifelhaften Spezifität der Antikörper in den Western Blot-Analysen verzichtet wird.

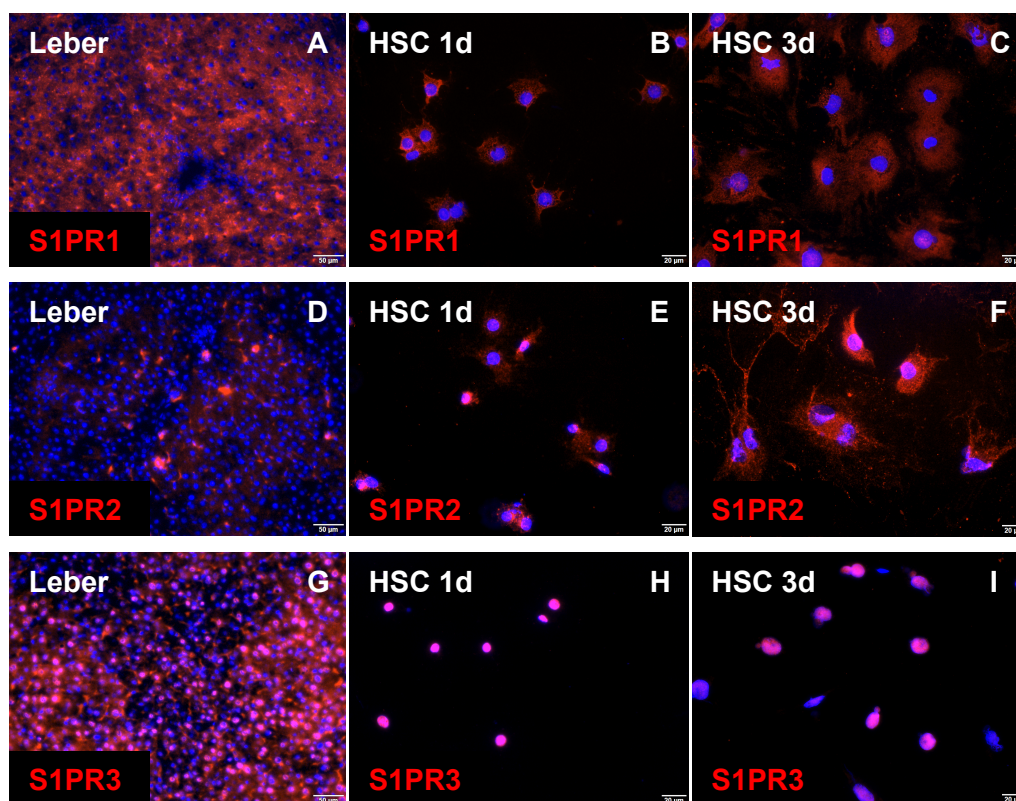


Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbungen der S1PR1-3 in Leberschnitten und isolierten HSCs der Ratte.

Die S1PR1-3 wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung in Leberschnitten der Ratte sowie in frisch isolierten HSCs der Ratte an Tag 1 (1d) und 3 (3d) detektiert (rot). Die Leberschnitte und die isolierten Sternzellen wurden mit Methanol fixiert. Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Alle drei S1PR konnten in HSCs an Tag 1 (B, E, H) und Tag 3 (C, F, I) detektiert werden. Auch in den Leberschnitten konnten die S1PR1-3 nachgewiesen werden (A, D, G). Die Maßstabablen entsprechen 50 µm (Leberschnitte) bzw. 20 µm (isolierte Sternzellen).

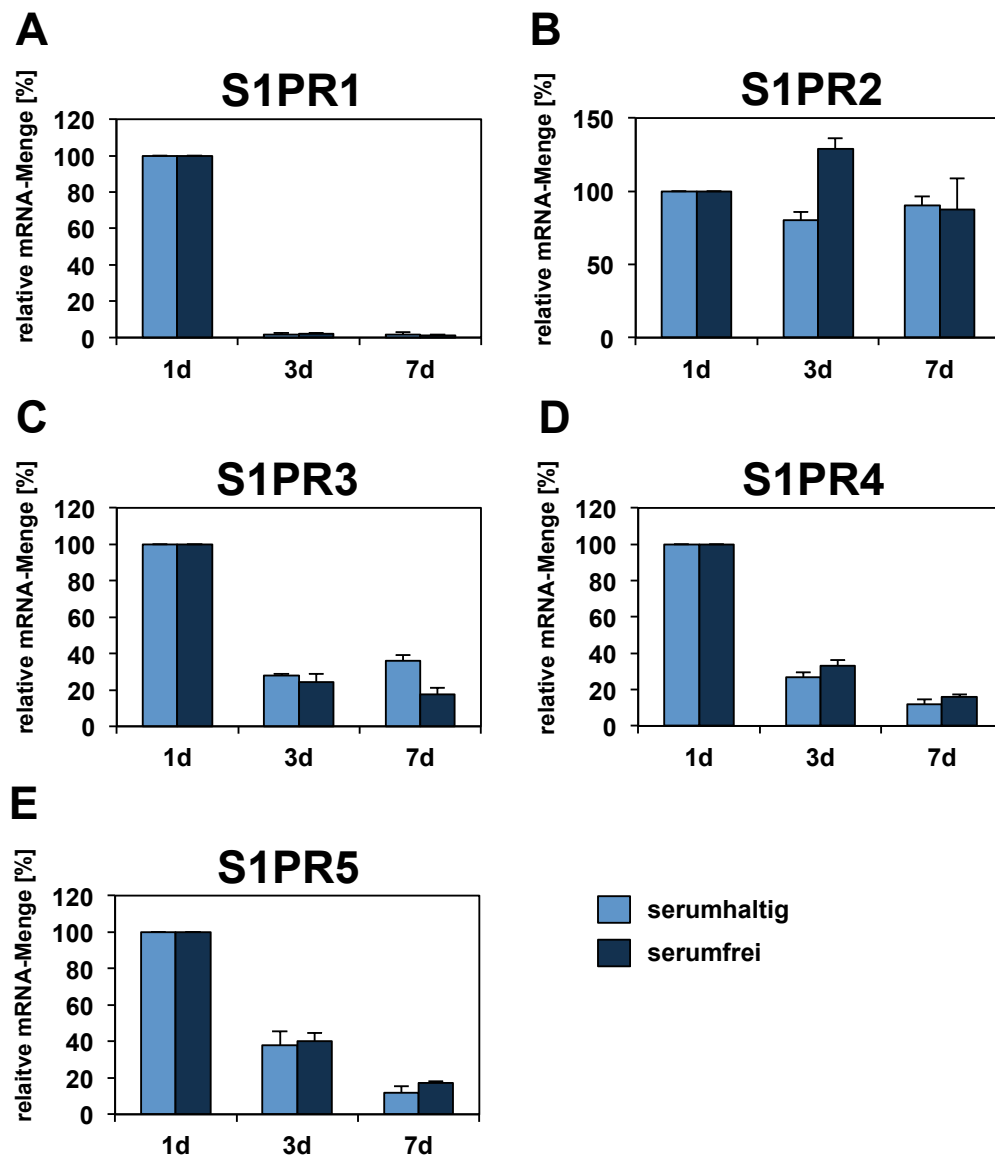


Abb. 5: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in isolierten HSCs der Ratte.

Isolierte HSCs der Ratte wurden über 7 Tage mit serumhaltigem oder -freiem Medium behandelt. Die Zellen wurden an Tag 1 (1d), 3 (3d) und 7 (7d) lysiert und die mRNA-Menge der S1PR mittels qPCR bestimmt. Die mRNA-Menge an Tag 1 der jeweiligen Kulturbedingungen wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der Folgetage in Relation dazu gesetzt. Über die Kulturzeit von 3 und 7 Tagen zeigten der S1PR1 (A), 3 (C), 4 (D) und 5 (E) sowohl unter serumhaltigen als auch unter serumfreien Kulturbedingungen einen deutlichen Rückgang, wohingegen sich der mRNA-Gehalt des S1PR2 (B) an Tag 7 kaum von Tag 1 unterschied. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test.

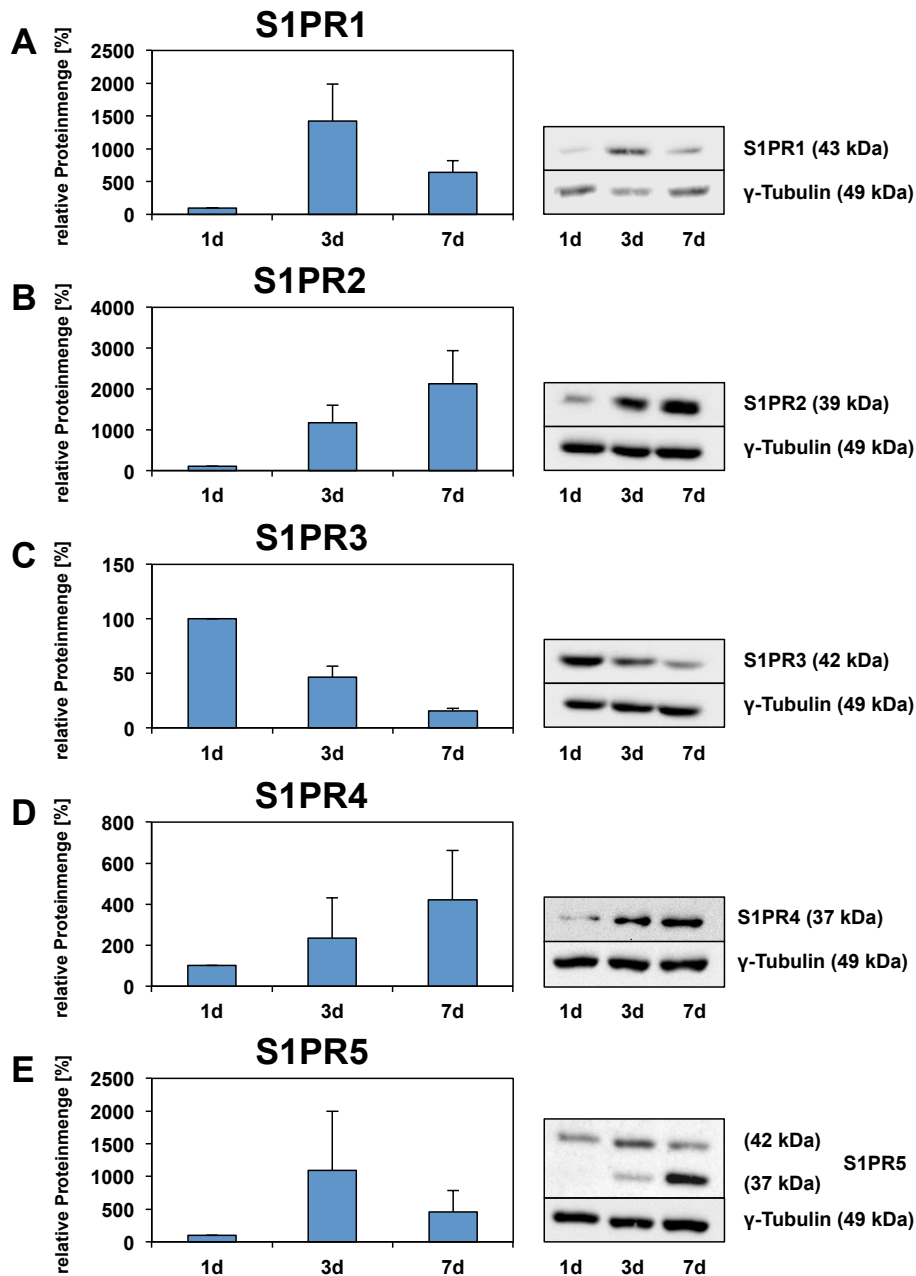


Abb. 6: Proteinnachweis der S1PR1-5 in isolierten HSCs der Ratte.

Isolierte HSCs der Ratte wurden über 7 Tage mit serumhaltigem Medium behandelt. Die Zellen wurden an Tag 1 (1d), 3 (3d) und 7 (7d) lysiert und die Proteinmenge der S1PR mittels Western Blot-Analysen bestimmt. Die Proteinmenge an Tag 1 wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der Folgetage in Relation dazu gesetzt. Links sind die densitometrischen Analysen abgebildet, rechts beispielhaft die zur Auswertung herangezogenen Proteinbanden. Der S1PR1 und 5 zeigte einen transienten Anstieg an Tag 3, dem ein Abfall der relativen Proteinmenge an Tag 7 folgte (**A, E**). Der S1PR2 und 4 stieg über die Kulturzeit von 7 Tagen an (**B, D**), wohingegen der S1PR3 abfiel (**C**). Die Proteinbande des S1PR4 zeigte sich jedoch nicht auf der erwarteten Höhe von 45 kDa, sondern bei 37 kDa, der S1PR5 zeigte eine Doppelbande. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an ($n=3$). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test.

3.3 Einfluss von S1P auf die Proliferation von HSCs

Um den Einfluss von S1P auf die Proliferation primärer HSCs zu untersuchen, wurde der Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA als Indikator für eine DNA-Synthese und somit Zellteilung analysiert. Isolierte HSCs der Ratte wurden ab dem zweiten Tag nach der Isolation für 48 Stunden mit PDGF-BB (20 ng/ml) oder 0,25 bis 8 μM S1P behandelt. Anschließend wurde durch einen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) das in die DNA eingebaute BrdU quantifiziert.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich unter Behandlung mit PDGF-BB (20 ng/ml), das proliferativ auf HSCs wirkt, ein Anstieg der DNA-Synthese auf nahezu 150% ($p = 0,029$) (Abb. 7). Die Stimulation mit S1P in den Konzentrationen 0,25 μM ($p = 0,029$) und 0,5 μM ($p = 0,029$) führte nur zu einer leichten Steigerung der DNA-Synthese (Abb. 7). Unter 4 μM ($p = 0,029$) und 8 μM ($p = 0,029$) S1P kam es hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Absorption des eingelagerten BrdU auf 71% beziehungsweise 56% im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Abb. 7).

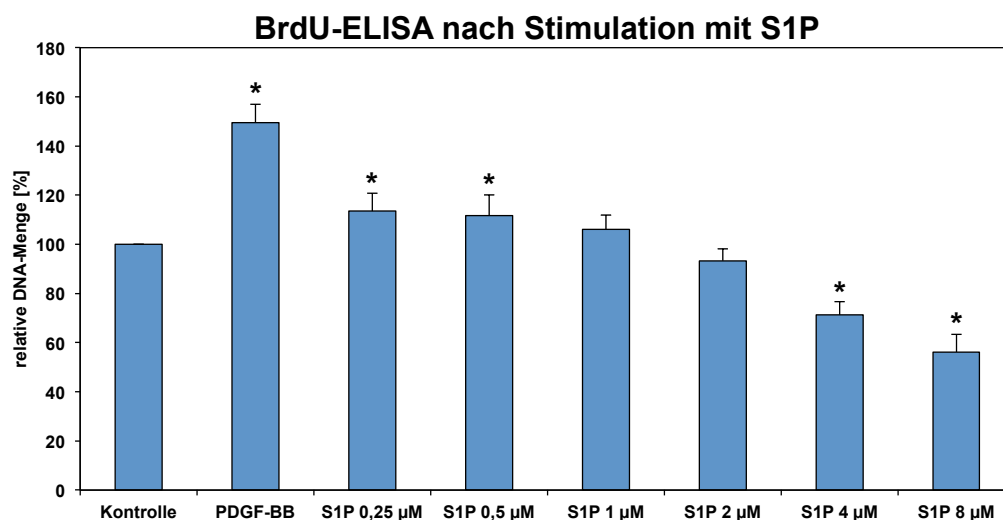


Abb. 7: DNA-Synthese isolierter HSCs nach Stimulation mit S1P.

Isolierte HSCs der Ratte wurden ab Tag 2 nach der Isolation für 48 Stunden mit PDGF-BB (20 ng/ml) oder S1P in aufsteigenden Konzentrationen von 0,25 bis 8 μM behandelt. Mittels BrdU-ELISA wurde die Menge des eingelagerten BrdU bestimmt, die proportional zur Menge der neu synthetisierten DNA ist. Die Absorption der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der experimentellen Behandlungen in Relation dazu gesetzt. Es zeigte sich ein Anstieg der Absorption nach Behandlung mit PDGF-BB, 0,25 und 0,5 μM S1P. Die Stimulation mit S1P in den Konzentrationen 4 und 8 μM führte dagegen zu einer Reduktion der DNA-Synthese. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an ($n=4$). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test, Sternchen markieren einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

3.4 Expression der S1PR in proliferierenden HSC

PDGF-BB hat eine starke proliferative Wirkung auf HSCs [208] - dies spiegelt sich auch in der DNA-Syntheseaktivität der Sternzellen unter Stimulation mit PDGF-BB wider (Abb. 7). TGF- β 1 hingegen wirkt antiproliferativ und unterstützt die Differenzierung von MSCs [218]. Kordes et al. zeigten, dass PDGF-BB und TGF- β 1 auch in pankreatischen Sternzellen antagonistische Effekte vermitteln [235].

Um die Expression der S1PR1-5 in HSCs unter proliferativen und antiproliferativen Bedingungen zu untersuchen, wurden isolierte HSCs der Ratte über 7 Tage unter serumfreien Kulturbedingungen mit PDGF-BB (20 ng/ml) oder TGF- β 1 (2 ng/ml) behandelt. Die Zellen wurden am siebten Tag der Behandlung lysiert und die relative mRNA- und Proteinmenge der S1PR1-5 mittels qPCR- und Western Blot-Analysen quantifiziert.

Nach der 7-tägigen Behandlung mit PDGF-BB zeigte sich ein deutlicher Anstieg der mRNA-Menge des S1PR1 ($p = 0,05$) (Abb. 8 A) und 3 ($p = 0,043$) (Abb. 8 C) auf jeweils über 180%, dem ein deutlicher Abfall des S1PR4 ($p = 0,004$) (Abb. 8 D) und 5 ($p = 0,003$) (Abb. 8 E) auf ungefähr 50% gegenüberstand. Der S1PR2 ließ sich als einziger Rezeptor der S1PR nur wenig durch PDGF-BB regulieren, er zeigte nur eine leicht verringerte mRNA-Menge ($p = 0,004$) (Abb. 8 B). Die Behandlung mit TGF- β 1 hatte insgesamt nur einen geringen Einfluss auf die Expression der fünf S1PR auf mRNA-Ebene, es zeigte sich eine leichte reduzierte mRNA-Menge der S1PR4 ($P = 0,05$) und 5 ($p = 0,043$) (Abb. 8).

Auf Proteinniveau konnte nach 7-tägiger Behandlung mit PDGF-BB eine gesteigerte Expression der S1PR1 bestätigt werden, jedoch zeigte auch der S1PR2 einen leichten Anstieg (Abb. 9 A, B). Die relative Proteinmenge des S1PR1 stieg auf über 225% an (Abb. 9 A), die des S1PR2 dagegen nur auf 125% (Abb. 9 B). Für den S1PR3 zeigte sich nach Behandlung mit PDGF-BB ebenfalls eine gesteigerte Proteinmenge (Abb. 9 C). TGF- β 1 führte nicht zu einer veränderten Expression der S1PR (Abb. 9).

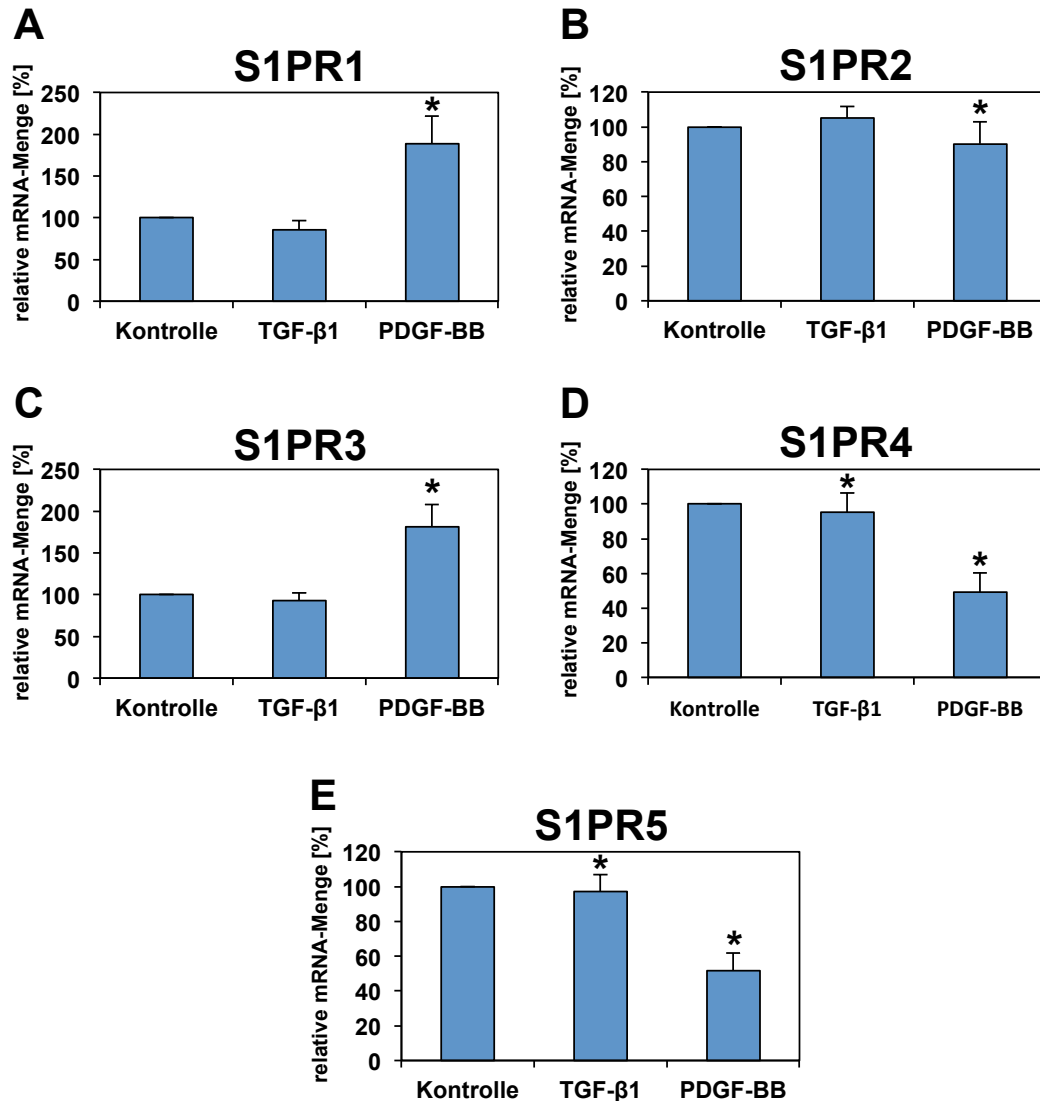


Abb. 8: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in isolierten HSC nach Behandlung mit TGF-β1 oder PDGF-BB.

Isolierte HSCs der Ratte wurden über 7 Tage mit TGF-β1 (2 ng/ml) oder PDGF-BB (20 ng/ml) behandelt. Die Zellen wurden an Tag 7 lysiert und die mRNA-Menge der S1PR mittels qPCR bestimmt. Die mRNA-Menge der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der experimentellen Behandlungen in Relation dazu gesetzt. Nach Behandlung mit PDGF-BB zeigte sich eine deutliche Hochregulation des S1PR1 (A) und 3 (C) sowie eine deutliche Herabregulation des S1PR4 (D) und 5 (E). Der S1PR2 (B) zeigte nur eine geringfügig verringerte Expression nach Behandlung mit PDGF-BB. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an (n=9). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test, Sternchen markieren einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

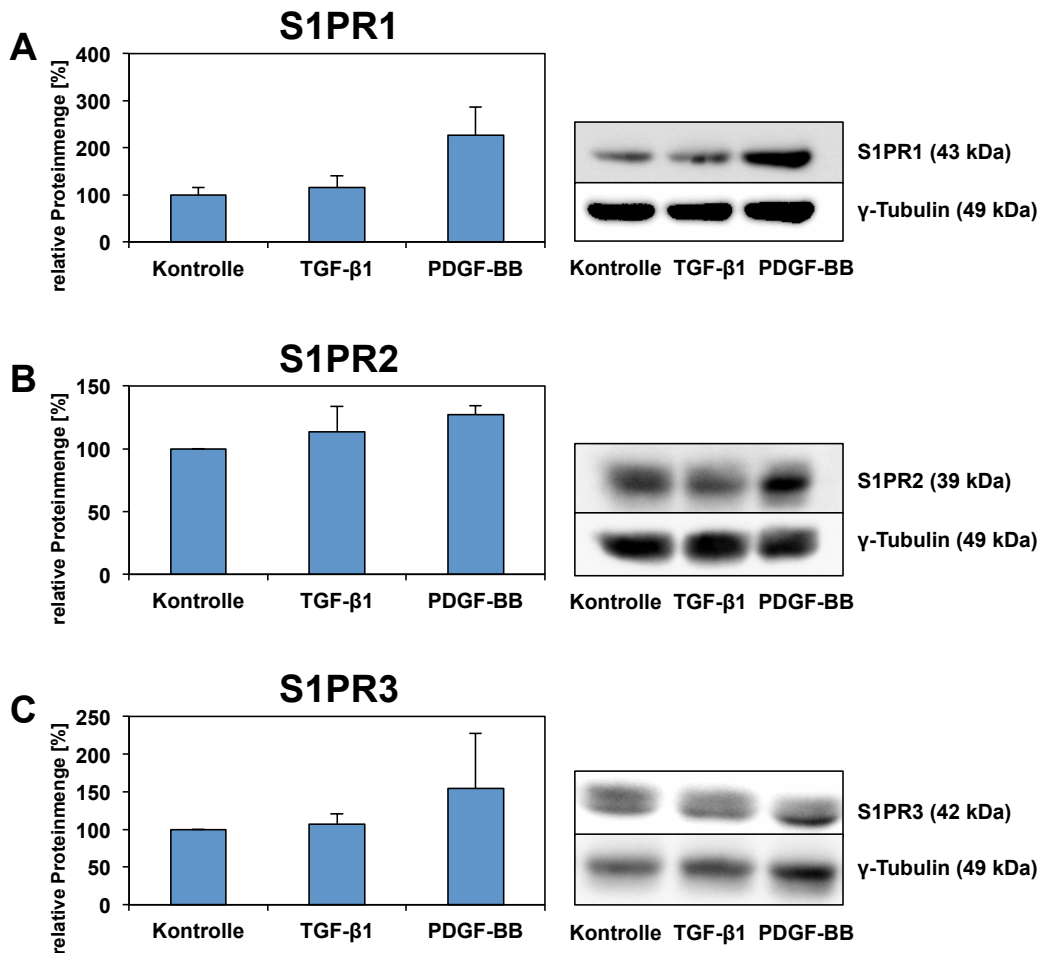


Abb. 9: Proteinnachweis der S1PR1-3 in isolierten HSCs nach Behandlung mit TGF-β1 oder PDGF-BB.

Isolierte HSCs der Ratte wurden über 7 Tage mit TGF-β1 (2 ng/ml) oder PDGF-BB (20 ng/ml) behandelt. Die Zellen wurden an Tag 7 lysiert und die Proteinmenge der S1PR mittels Western Blot-Analysen bestimmt. Die Proteinmenge der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der experimentellen Behandlungen in Relation dazu gesetzt. Links sind die densitometrischen Analysen abgebildet, rechts beispielhaft die zur Auswertung herangezogenen Proteinbanden. Die relative Proteinmenge der S1PR1-3 stieg nach der Behandlung mit PDGF-BB an, der S1PR2 zeigte jedoch den geringsten Anstieg (**A**, **B**, **C**). Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an (n=6). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test.

Um die beobachteten Auswirkungen einer Behandlung von HSCs mit PDGF-BB oder TGF- β 1 noch zu verstärken, wurde zu den serumfreien Medien neben PDGF-BB oder TGF- β 1 zusätzlich ein Antagonist des jeweils anderen Rezeptors gegeben. Isolierte HSCs der Ratte wurden über 7 Tage mit TGF- β 1 (2 ng/ml) in Kombination mit dem PDGF-Rezeptor α/β -Inhibitor Crenolanib (100 nM) behandelt. PDGF-BB (20 ng/ml) wurde in Kombination mit dem TGF- β 1-Rezeptor I/II-Inhibitor LY2109761 (1 μ M) verwendet. Am siebten Tag der Kultur wurden die Zellen lysiert und mittels qPCR- und Western Blot-Analysen die Expression der S1PR1-5 untersucht.

Es zeigte sich eine signifikante Hochregulation der relativen mRNA-Menge des S1PR1 nach der Behandlung mit PDGF-BB ($p = 0,05$) oder dem TGF- β 1-Rezeptor I/II-Inhibitor LY2109761 ($p = 0,009$) allein, sowie die stärkste Hochregulation auf über 1000% nach der kombinierten Behandlung ($p = 0,009$) (Abb. 10 A). Die Behandlung mit Crenolanib ($p = 0,009$) oder TGF- β 1+Crenolanib ($p = 0,009$) führte ebenfalls zu einem geringen Anstieg der mRNA-Menge des S1PR1. Auch die mRNA-Menge des S1PR2 ließ sich sowohl nach der alleinigen Behandlung mit LY2109761 ($p = 0,009$) als auch nach der kombinierten Behandlung mit PDGF-BB+LY2109761 ($p = 0,009$) signifikant heraufregulieren (Abb. 10 B). Die Expression des S1PR3 konnte ebenfalls nach der Stimulation mit PDGF-BB in Kombination mit LY2109761 ($p = 0,009$) signifikant gesteigert werden. Die Messwerte waren höher als nach der Behandlung mit PDGF-BB ($p = 0,05$) (Abb. 10 C). Bei dem S1PR4 und 5 konnte nach der Behandlung mit LY2109761 der größte Anstieg der relativen mRNA-Menge beobachtet werden (Abb. 10 D, E). Die kombinierte Behandlung von TGF- β 1 und Crenolanib zeigte ebenfalls bei beiden Rezeptoren einen Anstieg der mRNA-Menge auf 177%, bzw. 147%. PDGF-BB (S1PR4 $p = 0,004$, S1PR5 $p = 0,004$) sowie PDGF-BB+LY2109761 (S1PR4 $p = 0,009$, S1PR5 $p = 0,009$) ließ dagegen die Expression des S1PR4 und 5 signifikant abfallen. TGF- β 1 führte lediglich zu einem geringen Rückgang des S1PR4 ($p = 0,05$) und 5 ($p = 0,05$).

Auf Proteinebene bestätigte sich der Anstieg des S1PR1 nach der Behandlung mit PDGF-BB, beziehungsweise der Kombination von PDGF-BB und LY2109761 (Abb. 11 A). Die Behandlung mit LY2109761 allein führte hingegen zu einer leichten Abnahme der Proteinmenge des S1PR1. Für den S1PR2 zeigte sich im Gegensatz zu der Analyse der mRNA-Menge ebenfalls eine Reduktion der relativen Proteinmenge nach der Behandlung mit TGF- β 1, Crenolanib oder LY2109761 (Abb. 11 B). Eine Hochregulation des S1PR2 unter PDGF-BB in Kombination mit LY2109761 bestätigte sich in den Western Blot-Analysen nicht. Die Proteinmenge des S1PR3 konnte nicht entscheidend verändert werden (Abb. 11 C).

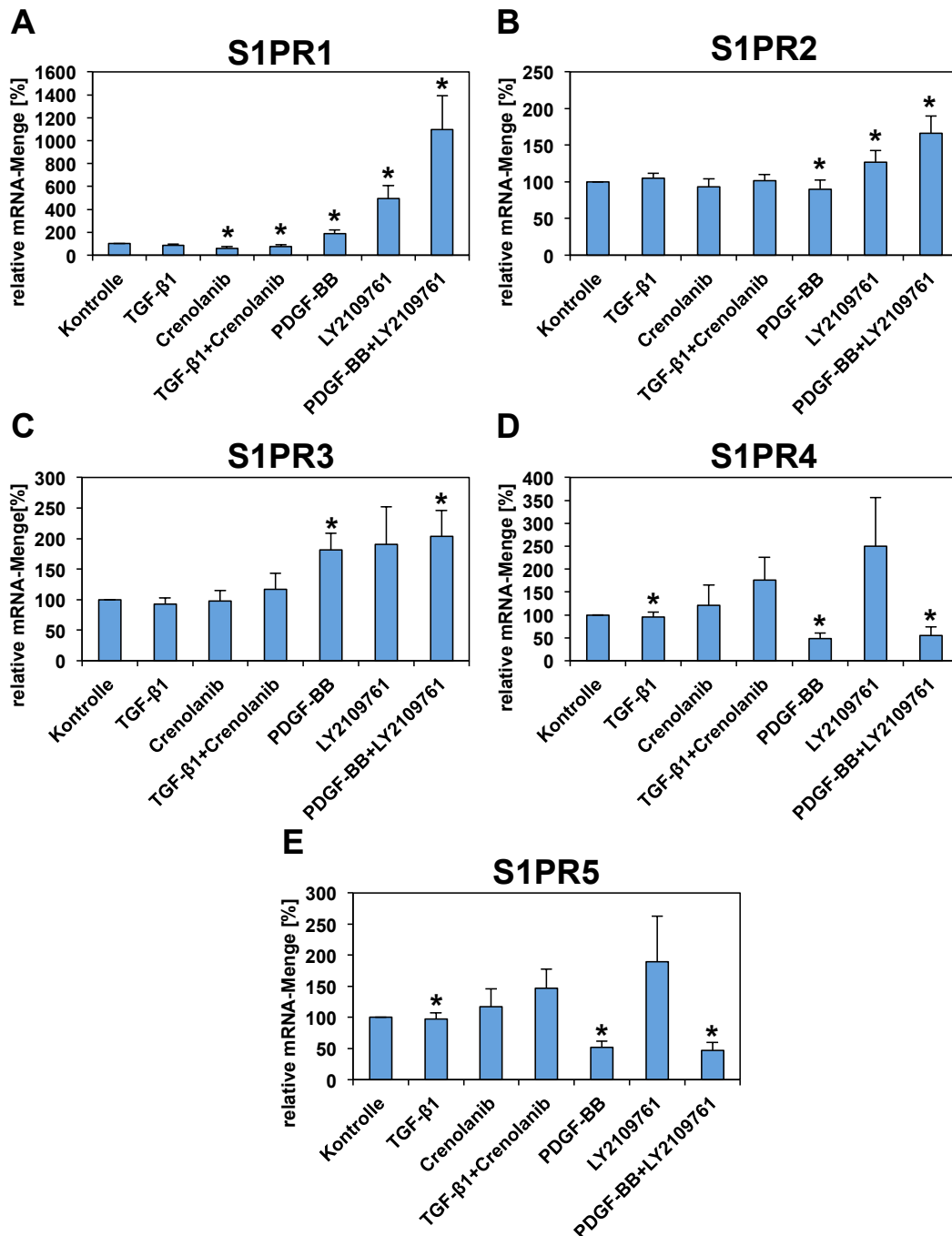


Abb. 10: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in HSC nach Behandlung mit PDGF-BB- und TGF- β 1-Inhibitoren.

Isolierte HSCs der Ratte wurden über 7 Tage mit TGF- β 1 (2 ng/ml), PDGF-BB (20 ng/ml), dem PDGF-Rezeptor α/β -Inhibitor Crenolanib (100 nM) oder dem TGF- β 1-Rezeptor I/II-Inhibitor LY2109761 (1 μ M) behandelt. Die Zellen wurden an Tag 7 lysiert und die mRNA-Menge der S1PR mittels qPCR bestimmt. Die mRNA-Menge der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der experimentellen Behandlungen in Relation dazu gesetzt. Die Behandlung mit PDGF-BB + LY2109761 führte zu einer verstärkten Expression der S1PR1-3 sowie verringerten Expression des S1PR4 und 5. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an (n=3-9). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test, Sternchen markieren einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

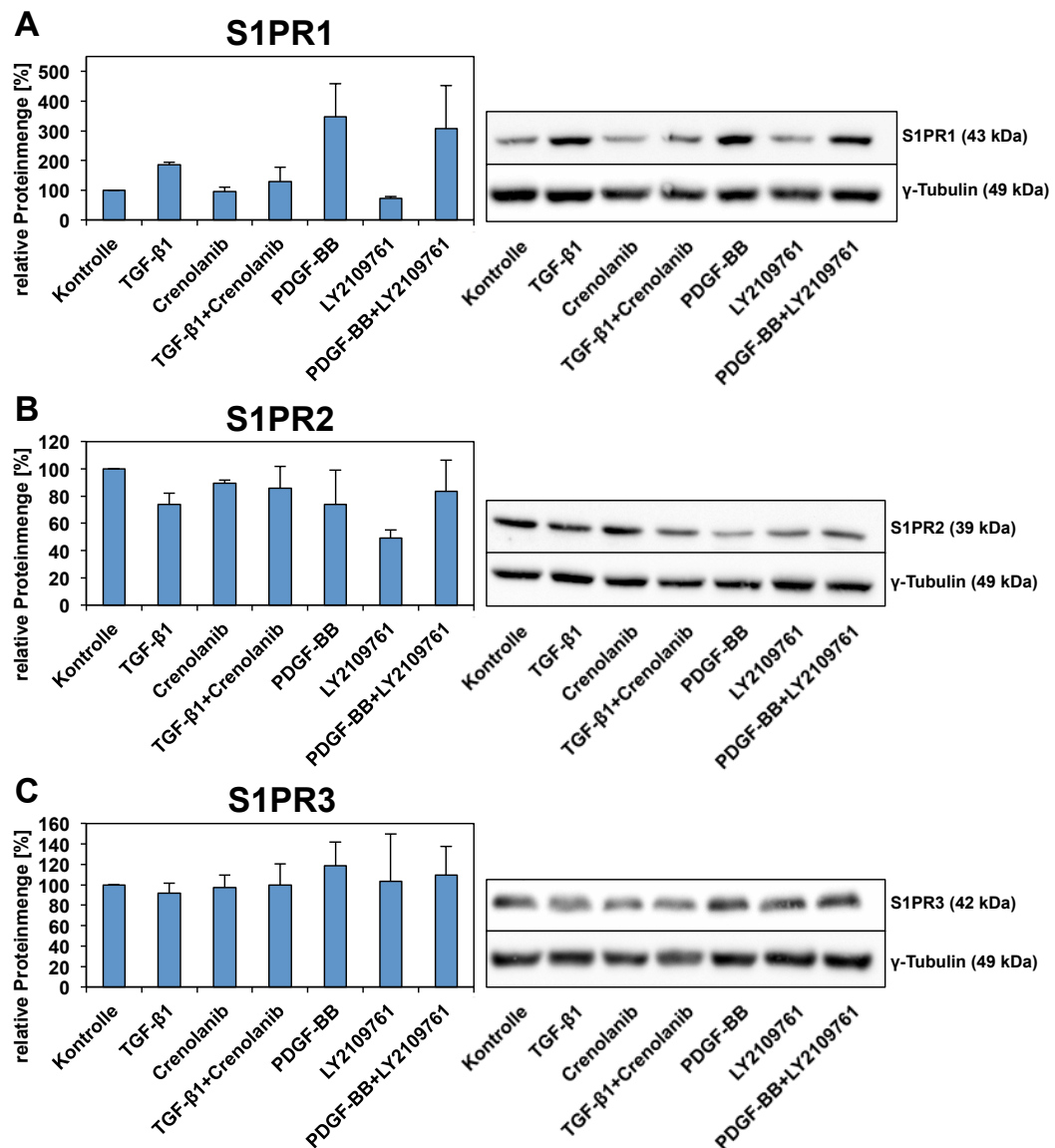


Abb. 11: Proteinnachweis der S1PR1-3 in HSCs nach Behandlung mit PDGF-BB- und TGF-β1-Inhibitoren über 7 Tage.

Isolierte HSCs der Ratte wurden über 7 Tage mit TGF-β1 (2 ng/ml), PDGF-BB (20 ng/ml), dem PDGF-Rezeptor α/β-Inhibitor Crenolanib (100 nM) oder dem TGF-β1-Rezeptor I/II-Inhibitor LY2109761 (1 μM) behandelt. Die Zellen wurden an Tag 7 lysiert und die Proteinmenge der S1PR mittels Western Blot-Analysen bestimmt. Die Proteinmenge der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der experimentellen Behandlungen in Relation dazu gesetzt. Links sind die densitometrischen Analysen abgebildet, rechts beispielhaft die zur Auswertung herangezogenen Proteinbanden. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test.

3.5 Expression der S1PR in HSCs nach Behandlung mit Liganden der TGF- β -Familie

Da sich unter proliferativen Bedingungen bereits eine signifikante Steigerung der Expression des S1PR1 und S1PR3 zeigte (Abb. 8 A, C), sollte das Expressionsverhalten der fünf S1PR auch unter entgegengesetzten, nämlich antiproliferativen Bedingungen weiterführend untersucht werden. Die Behandlung mit TGF- β 1 führte nicht zu einer stark veränderten Expression der S1PR (Abb. 8 und Abb. 9), sodass die Behandlung von Sternzellen mit verschiedenen anderen Liganden der TGF- β -Familie erfolgte, die bekanntermaßen an der Steuerung von Differenzierungsprozessen von MSCs beteiligt sind [236].

Isolierte HSCs der Ratte wurden daher über 7 Tage unter serumfreien Kulturbedingungen mit verschiedenen Liganden der TGF- β -Familie behandelt: TGF- β 1 (2 ng/ml), Nodal (10 ng/ml), *bone morphogenetic protein 4* (BMP4: 10 ng/ml), *bone morphogenetic protein 7* (BMP7: 10 ng/ml) und TGF- β 2 (10 ng/ml). Da TGF- β 1 bei Konzentrationen über 2 ng/ml keine Steigerung der Wirkung mehr zeigt [235], wurden im Gegensatz zu den anderen Liganden der TGF- β -Familie nicht 10 ng/ml eingesetzt. Am siebten Tag der Kultur wurden die Zellen lysiert und die relative mRNA-Menge der Rezeptoren wurde mittels qPCR-Analysen bestimmt.

Die Expression der S1PR1 ($p = 0,05$) und 2 ($p = 0,004$) konnte, wie bereits zuvor gezeigt, durch PDGF-BB gesteigert werden. Die Liganden der TGF- β -Familie führten hingegen nicht zu einer signifikanten Veränderung der S1PR1 und 2 (Abb. 12 A, B). Auch die relative mRNA-Menge des S1PR3 ließ sich durch PDGF-BB signifikant hochregulieren ($p = 0,05$) (Abb. 12 C). Die Behandlung mit BMP4 führte bei dem S1PR4 zu einer geringfügigen Steigerung der Expression auf ungefähr 115% ($p = 0,009$) (Abb. 12 D). Darüber hinaus zeigte sich nach der Behandlung mit BMP7 eine leicht verringerte Expression des S1PR4 im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ($p = 0,009$) (Abb. 12 D). Die relative mRNA-Menge der S1PR4 und 5 sank nach der Behandlung mit PDGF-BB (S1PR4 $p = 0,004$, S1PR5 $p = 0,004$) sowie der Behandlung mit TGF- β 1 (S1PR4 $p = 0,05$, S1PR5 $p = 0,05$) ab, wobei PDGF-BB einen deutlich stärkeren Effekt zeigte (Abb. 12 D, E). Von den untersuchten Liganden der TGF- β -Familie zeigte insgesamt keiner einen deutlichen Einfluss auf die Expression der S1PR, sodass keine weiteren Proteinanalysen durchgeführt wurden.

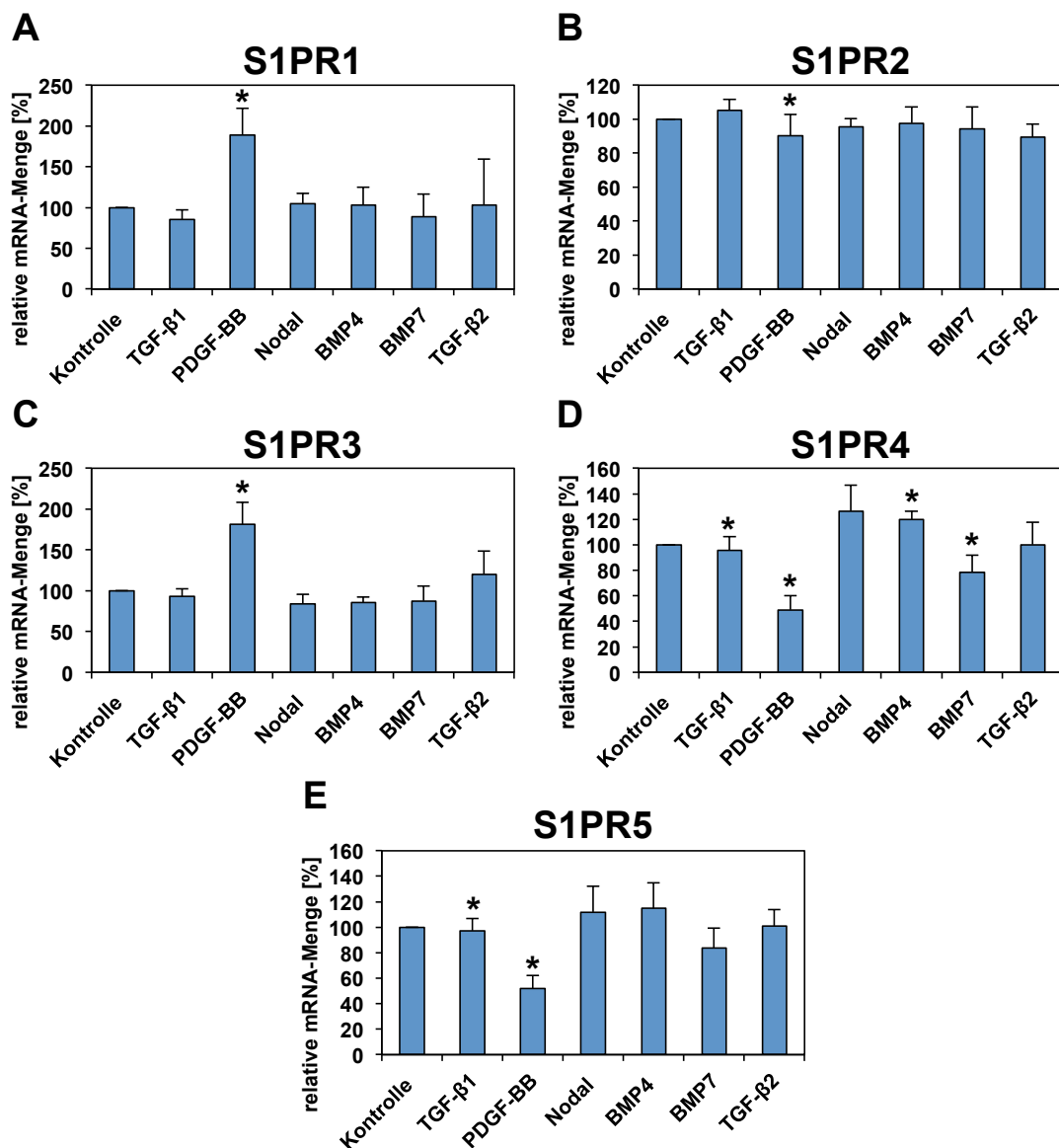


Abb. 12: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in HSC nach Behandlung mit Liganden der TGF-β-Familie.

Isolierte HSCs der Ratte wurden über 7 Tage mit PDGF-BB (20 ng/ml) oder verschiedenen Liganden der TGF-β-Familie behandelt: TGF-β1 (2 ng/ml), Nodal (10 ng/ml), BMP4 (10 ng/ml), BMP7 (10 ng/ml) oder TGF-β2 (10 ng/ml). Die Zellen wurden an Tag 7 lysiert und die mRNA-Menge der S1PR mittels qPCR bestimmt. Die mRNA-Menge der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der experimentellen Behandlungen in Relation dazu gesetzt. Nach der Behandlung mit PDGF-BB stieg die relative mRNA-Menge des S1PR1 und 3 an, die mRNA-Menge des S1PR4 und 5 hingegen fiel ab. Die Liganden der TGF-β-Familie zeigten keinen deutlichen Einfluss auf die Expression der S1PR1-5. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an (n=3-9). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test, Sternchen markieren einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,05$).

3.6 Expression der S1PR in HSCs nach Behandlung mit Faktoren zur Beeinflussung der Entwicklung von Stammzellen

Um zu untersuchen, ob die S1PR möglicherweise für die Differenzierung von HSCs von Bedeutung sind, wurden isolierte HSCs der Ratte unter serumfreien Kulturbedingungen über 7 Tage mit verschiedenen Faktoren behandelt, die die Entwicklung von Stammzellen beeinflussen. Die Behandlung erfolgte mit Taurodesoxycholsäure (TUDC: 2 - 8 μ M), *hepatocyte growth factor* (HGF: 20 ng/ml), *fibroblast growth factor 4* (FGF-4: 20 ng/ml), *fibroblast growth factor 7* (FGF-7: 20 ng/ml), *epidermal growth factor* (EGF: 20 ng/ml), Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK 3)-Inhibitor CHIR99021 (3 μ M) oder Interleukin-1 β (IL-1 β : 20 ng/ml). Am siebten Tag der Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Expression der S1PR anschließend mittels qPCR- und Western Blot-Analysen quantifiziert.

In den qPCR-Analysen zeigte sich eine Hochregulation des S1PR1 auf über 3800% nach der Behandlung mit Interleukin-1 β , sowie eine Steigerung der relativen mRNA-Menge auf nahezu 700% nach der Behandlung mit dem GSK 3-Inhibitor CHIR99021 (Abb. 13 A). Auch die Behandlung mit TUDC (2 μ M), FGF-4 und EGF führte zu einer Steigerung der Expression des S1PR1 auf jeweils über 150% (Abb. 13 A). Ähnlich wie bei dem S1PR1 wurde auch die relative mRNA-Menge des S1PR3 durch TUDC (2 μ M), FGF-4, EGF und Interleukin-1 β hochreguliert, wobei FGF-4 den stärksten Effekt hatte (Abb. 13 C). Die Behandlung mit Interleukin-1 β führte auch zu einer gesteigerten Expression des S1PR2 auf nahezu 200% (Abb. 13 B). Die S1PR4 und S1PR5 zeigten insgesamt ähnliche Expressionsmuster: bei beiden Rezeptoren führte die Behandlung mit TUDC 8 μ M, FGF-4 oder EGF zu einer Reduktion der relativen mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13 D, E).

In den Proteinanalysen bestätigte sich eine Hochregulation des S1PR1 nach der 7-tägigen Behandlung mit FGF-4, EGF, CHIR99021 und Interleukin-1 β , wobei der Interleukin-1 β -vermittelte Effekt am stärksten ausfiel (Abb. 14 A). Auch für den S1PR2 bestätigten die densitometrischen Analysen der Proteinbanden eine gesteigerte Expression nach der Behandlung mit CHIR99021 und Interleukin-1 β auf jeweils über 300% (Abb. 14 B). Der S1PR3 zeigte unter der Interleukin-1 β -Behandlung ebenfalls die Tendenz zu einer Hochregulation der Expression (Abb. 14 C).

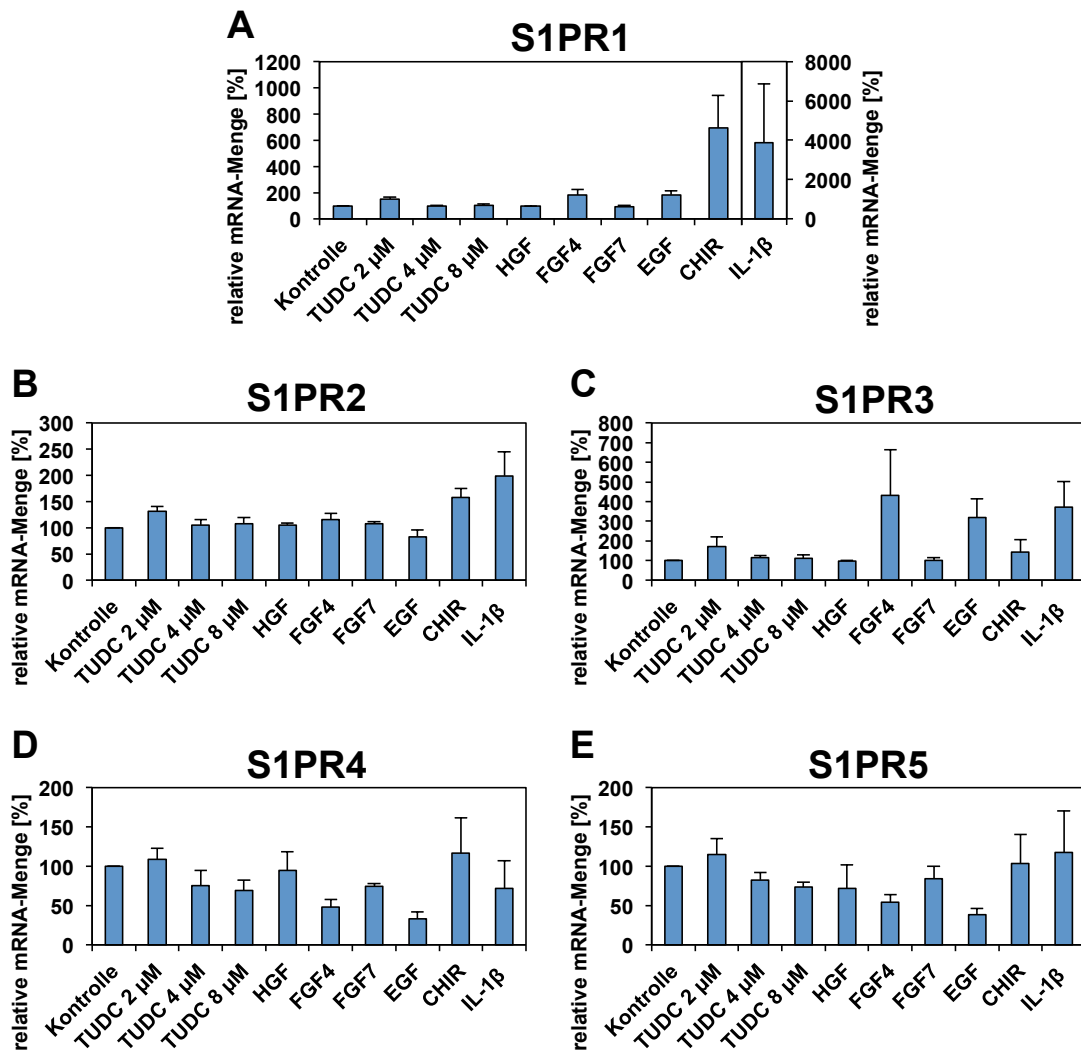


Abb. 13: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in isolierten HSC der Ratte nach Behandlung mit Faktoren zur Beeinflussung der Entwicklung von Stammzellen.

Isolierte HSC der Ratte wurden über 7 Tage mit verschiedenen Faktoren behandelt, die die Entwicklung von Stammzellen beeinflussen: TUDC (2, 4 und 8 μ M), HGF (20 ng/ml), FGF-4 (20 ng/ml), FGF-7 (20 ng/ml), EGF (20 ng/ml), CHIR99021 (3 μ M), IL-1 β (20 ng/ml). Die Zellen wurden an Tag 7 lysiert und die mRNA-Menge der S1PR mittels qPCR bestimmt. Die mRNA-Menge der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der experimentellen Behandlungen in Relation dazu gesetzt. IL-1 β führte zu einer gesteigerten Expression der S1PR1-3 (**A, B, C**). Die Behandlung mit FGF-4 und EGF steigerte die mRNA-Menge des S1PR1 und 3 (**A, C**), senkte jedoch die mRNA-Menge des S1PR4 und 5 (**D, E**). Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test.

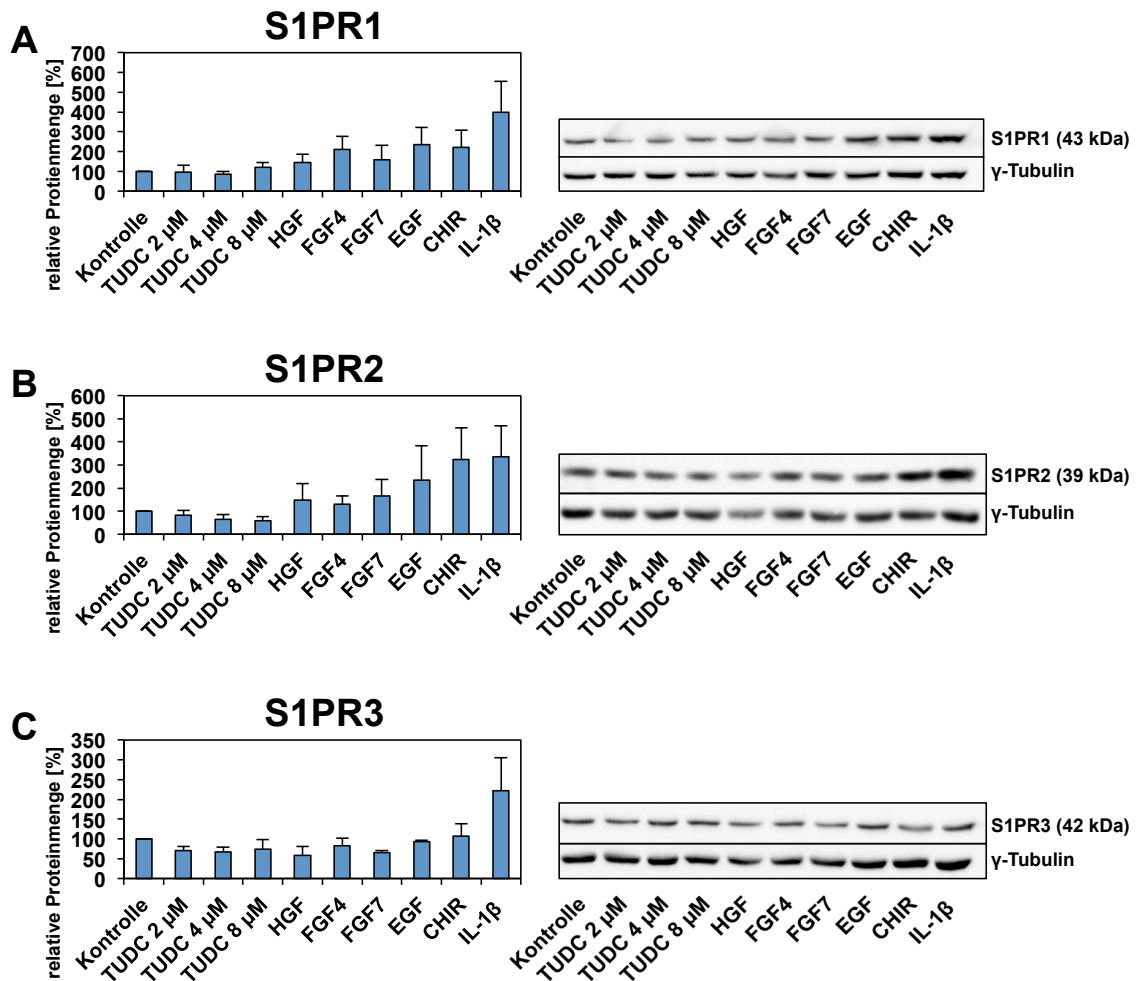


Abb. 14: Proteinnachweis der S1PR1-3 in isolierten HSC der Ratte nach Behandlung mit Faktoren zur Beeinflussung der Entwicklung von Stammzellen.

Isolierte HSC der Ratte wurden über 7 Tage mit verschiedenen Faktoren behandelt, die die Entwicklung von Stammzellen beeinflussen: TUDC (2, 4 und 8 μ M), HGF (20 ng/ml), FGF-4 (20 ng/ml), FGF-7 (20 ng/ml), EGF (20 ng/ml), CHIR99021 (3 μ M), IL-1 β (20 ng/ml). Die Zellen wurden an Tag 7 lysiert und die Proteinmenge der S1PR mittels Western Blot-Analysen bestimmt. Die Proteinmenge der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der experimentellen Behandlungen in Relation dazu gesetzt. Links sind die densitometrischen Analysen abgebildet, rechts beispielhaft die zur Auswertung herangezogenen Proteinbanden. Die Behandlung mit IL-1 β führte zu einer gesteigerten Expression der S1PR1-3 (**A, B, C**). Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis- und U-Test.

3.7 Expression der S1PR während der Leberregeneration

Um Erkenntnisse über eine mögliche Funktion der S1PR in regenerativen Prozessen der Leber zu erlangen, wurde die Expression der fünf Rezeptoren in zwei verschiedenen Leberschädigungsmodellen untersucht. Das erste Leberschädigungsmodell basiert auf einer Regeneration der Leber nach PHX, das zweite Modell ist mit dem Auftreten von fakultativen Leberprogenitorzellen, die zur Regeneration beitragen können, verbunden (2-AAF-PHX). An Tag 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 und 14 nach der PHX wurde die Leber entnommen und der relative mRNA-Gehalt der S1PR 1-5 in den Lebergewebeproben wurde mittels qPCR-Analysen bestimmt. Die Quantifizierung der mRNA des S1PR4 und S1PR5 in den Leberschädigungsmodellen wurde von Frau Dr. Doreen Reichert (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt.

Für den S1PR1 zeigte sich sowohl im PHX-Modell als auch im 2-AAF/PHX-Modell eine Reduktion der relativen mRNA-Menge an den Tagen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 10 im Vergleich zu Tag 0 (Abb. 15 A, B). Der S1PR2 wurde im 2-AAF/PHX-Modell an Tag 10 auf 212% im Vergleich zu Tag 0 hochreguliert, im PHX-Modell auf 200% im Vergleich zu Tag 0 (Abb. 15 C, D). Die Expression des S1PR3 veränderte sich im 2-AAF/PHX-Modell über die Zeit nur geringfügig, wohingegen sich im PHX-Modell eine generell reduzierte mRNA-Menge über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigte, ähnlich wie beim S1PR1. Die relative mRNA-Menge des S1PR3 reduzierte sich nach PHX auf 28% bis 54% im Vergleich zur ungeschädigten Leber (Tag 0; Abb. 15 E, F). Für die S1PR4 und 5 zeigte sich in diesem Experiment, wie auch in vorangegangenen Experimenten, eine gleichsinnige Veränderung der relativen mRNA-Menge. Im PHX-Modell stieg die relative mRNA-Menge der S1PR4 und 5 an allen Tagen außer Tag 3 im Vergleich zu Tag 0 an. Die stärkste Veränderung zeigte sich an den Tagen 1, 4, 6, 7 und 10 (Abb. 15 G, I). Generell zeigten die S1PR4 und 5 einen Trend zur stärkeren Expression an Tag 6 der Regeneration im 2-AAF/PHX-Modell kurz vor dem Auftreten von gangbildenden Leberprogenitorzellen, die ab Tag 7 der Regeneration verstärkt erscheinen (Abb. 15 H, J) [237].

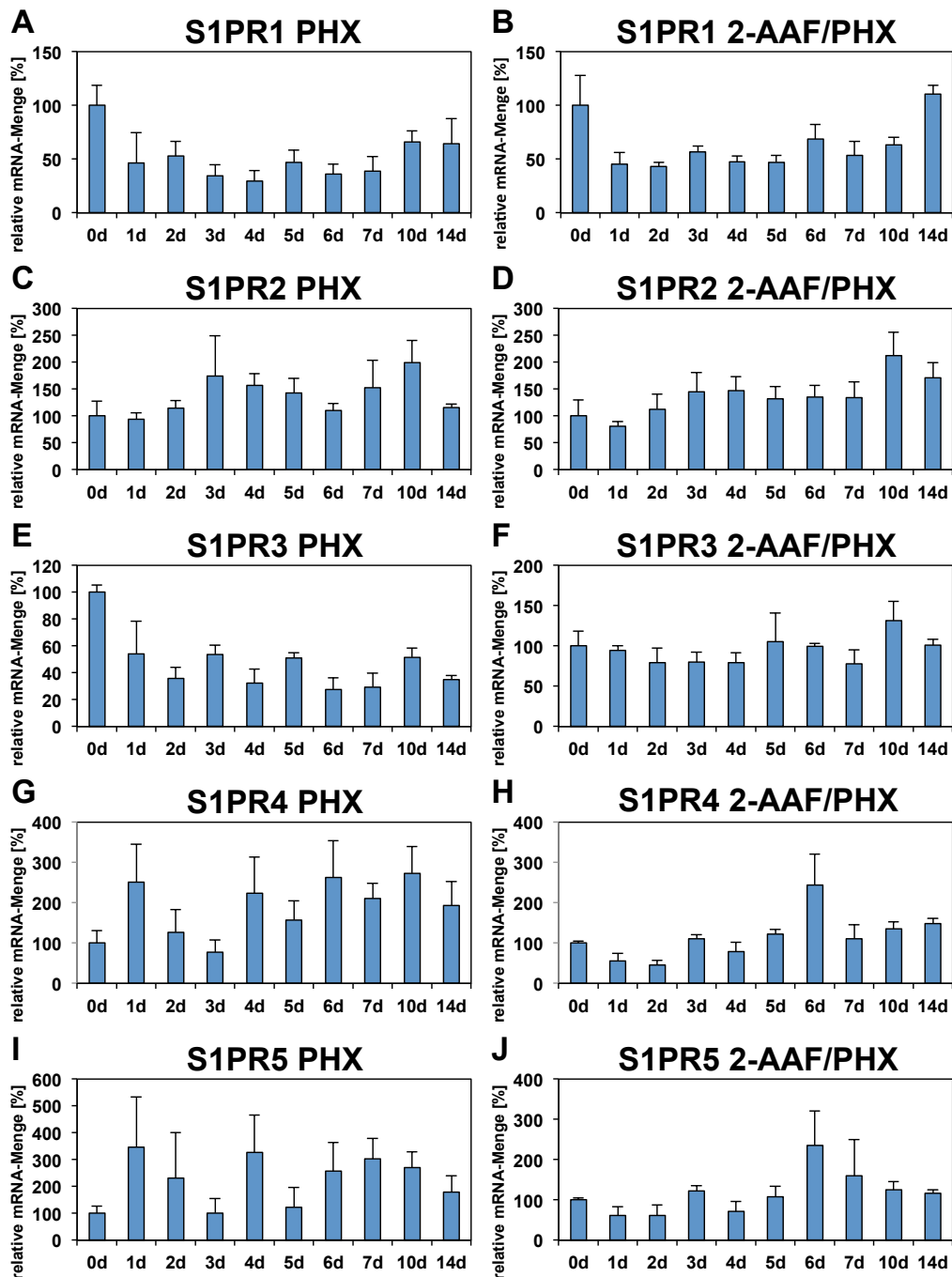


Abb. 15: Quantifizierung der mRNA der S1PR1-5 in Lebergewebeproben zweier Leberschädigungsmodelle der Ratte.

Die mRNA-Menge der S1PR wurde mittels qPCR-Analysen in zwei verschiedenen Leberschädigungsmodellen der Ratte bestimmt. Für das PHX-Modell, das auf einer normalen Leberregeneration beruht, wurden die Ratten einer PHX unterzogen und es wurden Gewebeproben der Leber an Tag 0 (0d), Tag 1 (1d), Tag 2 (2d), Tag 3 (3d), Tag 4 (4d), Tag 5 (5d), Tag 6 (6d), Tag 7 (7d), Tag 10 (10d) und Tag 14 (14d) entnommen. Für das 2-AAF/PHX-Modell, das ein vermehrtes Auftreten von fakultativen Leberprogenitorzellen ab dem 7. Tag der Regeneration zeigt, wurden die Ratten vor der PHX zusätzlich für 7 Tage über ein subkutanes Wirkstoffpellet mit 2-AAF behandelt. Die mRNA-Menge an Tag 0 wurde auf 100% gesetzt und die Messungen der Folgetage in Relation dazu gesetzt. Die Säulen zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerindikatoren geben den positiven SEM an (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis und U-Test.

4 Diskussion

4.1 Expression der fünf S1PR in HSCs

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und Regulation der S1PR1-5 in isolierten HSCs der Ratte untersucht, um Hinweise auf mögliche Funktionen der S1PR in HSCs als MSCs der Leber zu erlangen. Der erste Teilaspekt beinhaltete die Analyse der Expression aller fünf S1PR in isolierten HSCs der Ratte. Mittels qPCR, Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen wurden die fünf Subtypen der S1PR in isolierten HSCs nachgewiesen. Die S1PR1-3 in HSCs von Nagern und Menschen sind insbesondere hinsichtlich ihrer möglichen Bedeutung für die Entstehung der Leberfibrose bereits vielfach beschrieben und untersucht worden [204, 205] und in der immortalisierten Sternzelllinie LX-2 wurde bereits die Expression aller fünf S1PR belegt [207]. Bezüglich der Expression des S1PR4 und 5 in primären HSCs finden sich derzeit keine Hinweise in der Literatur, im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es jedoch erstmals gelungen, auch die Genexpression des S1PR4 und 5 auf Transkriptebene in primären HSCs der Ratte als MSCs der Leber nachzuweisen.

Die Immunfluoreszenzfärbungen wiesen nicht nur die S1PR in HSCs nach, sondern ließen auch Rückschlüsse auf die Lokalisation der S1PR zu. So wurde der S1PR3 aufgrund der Immunfärbung im Zellkern von HSCs festgestellt, wohingegen die anderen vier S1PR keine deutliche Kompartimentierung zeigten. Wang et al. untersuchten mittels *Tissue-Microarrays* und Immunhistochemie in malignen und benignen Gewebeproben von insgesamt 34 humanen Organen die Lokalisation der S1PR in den Zellkompartimenten. In gesundem Lebergewebe wiesen sie die S1PR1, 2 und 5 im Zellkern und im Zytoplasma, den S1PR3 ausschließlich im Zellkern und den S1PR4 ausschließlich im Zytoplasma nach. An der Zellmembran wurden alle fünf S1PR kaum detektiert [141]. Interessanterweise zeigte sich in Gewebeproben hepatozellulärer Karzinome (HCC) im Vergleich zu gesunden Lebergewebeproben eine höhere Expression der S1PR im Zellkern und eine erniedrigte Expression im Zytoplasma. Wang et al. schlossen daraus, dass die nukleäre Translokation der S1PR eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des HCC spielen könnte.

Über einen Kulturzeitraum von 7 Tagen, der bei einer Kultur auf Zellkulturschalen aus Polystyrol mit der Aktivierung von HSCs einhergeht, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Rückgang der relativen mRNA-Menge aller S1PR mit Ausnahme des S1PR2 beobachtet. Der Proteinnachweis des S1PR1 hingegen zeigte mit der Kulturzeit einen transienten Anstieg an Tag 3 der Kultur gefolgt von einem Abfall der Proteinmenge an Tag 7. Diese divergenten Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch eine zeitlich

Verzögerung der Proteinbiosynthese erklären. Die Aktivierung von HSCs und damit der Übergang zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp erfolgt *in vivo* bei einer Schädigung der Leber unter anderem nach parakriner Stimulation durch benachbarte Zellen und stellt einen entscheidenden Schritt in der Pathogenese der Leberfibrose dar [36]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der mRNA-Nachweise in der vorliegenden Arbeit zeigten auch Ikeda et al. in primären HSCs der Ratte eine reduzierte mRNA-Menge des S1PR1 sowie eine unveränderte mRNA-Menge des S1PR2 im Rahmen der Sternzellaktivierung *in vitro* [204]. Der Nachweis des S1PR1 und 2 in HSCs, die aus gesunden und CCl₄-behandelten Ratten isoliert wurden ergab in ihrer Studie, dass die Expression des S1PR2 unter beiden Bedingungen ähnlich war, wohingegen die Expression des S1PR1 in der geschädigten Leber deutlich niedriger war als im normalen Lebergewebe Ratten. Somit wurde auch *in vivo* ein Rückgang der S1PR1-Expression im Zuge der Aktivierung von HSCs belegt. Dies lässt vermuten, dass die Herunterregulation des S1PR1 von Bedeutung für die Aktivierung von HSCs sein könnte. Der im Rahmen der Aktivierung von HSCs *in vitro* ebenfalls beobachtete Rückgang der S1PR3, 4 und 5 lässt vermuten, dass auch die Herunterregulation dieser Rezeptoren für die Aktivierung von HSCs eine Rolle spielen könnte. Darüber hinaus konnten Ikeda et al. jedoch in der oben genannten Arbeit weder in primären HSCs, die für drei Tage kultiviert wurden, noch in subkultivierten HSCs mRNA des S1PR3 nachweisen [204].

4.2 Regulation und mögliche Funktion der S1PR in HSCs

Der zweite Teilaspekt der vorliegenden Arbeit beinhaltete einen Erkenntnisgewinn bezüglich der Regulation der S1PR in isolierten HSCs und damit verbundenen möglichen Funktion dieser Rezeptoren. Die initiale Arbeitshypothese zur Funktion der S1PR in HSC begründete sich auf zwei Arbeiten von Kitada et al. und Price et al., die den S1PR in MSCs differentielle Funktionen zuschreiben. Diese Gruppe spricht dem S1PR1 und 3 entscheidende Funktionen im Rahmen der Proliferation zu, wohingegen der S1PR2 als relevant für Differenzierungsprozesse angesehen wird [142, 215].

Sollen diese möglichen Funktionen der S1PR in MSCs auf Sternzellen als MSCs der Leber übertragen und in diesen untersucht werden, müssen zunächst die Begriffe Differenzierung und Proliferation im Hinblick auf HSCs abgegrenzt werden. Die Differenzierung von HSCs folgt ihrer Aktivierung und Entwicklung zu einem kontraktile Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, der durch eine zunehmende Expression von α -SMA und die Produktion extrazellulärer Matrix, insbesondere Kollagen Typ 1 gekennzeichnet ist [43, 48]. Diese Veränderungen können einerseits bei einer

chronischen Erkrankung persistieren, sie können auf der anderen Seite jedoch im Rahmen des Rückgang einer Leberfibrose auch reversibel sein, sodass die Expression fibrotischer Gene zurückgeht und die HSCs in einen inaktiven Zustand zurückkehren, der dem Zustand ruhender HSCs ähnelt [238, 239]. In letzterem Fall würde keine terminale Differenzierung der HSCs zu Myofibroblasten vorliegen. HSCs können darüber hinaus zu Epithelzellen der Leber und – wie vielfach für MSCs anderer Organe beschrieben – zu Osteozyten und Adipozyten differenzieren. Mit dem Begriff Differenzierung wird in der Literatur jedoch nicht immer eine terminale Differenzierung von HSCs beschrieben, gelegentlich wird auch die möglicherweise vorübergehende Expression von α -SMA als (Trans-)Differenzierung bezeichnet. Unter dem Begriff Proliferation wird die Vermehrung der Zellzahl verstanden. Eine erhöhte Zellproliferation ist nicht mit einer terminalen Differenzierung zu einer bestimmten Effektorzelle verbunden und ist für die Erhaltung von Stammzellpopulationen sowie Ausbreitung noch nicht terminal differenzierter Vorläuferzellen von Bedeutung. Die Zellproliferation und -differenzierung sind konkurrierende Prozesse [240].

4.2.1 Wirkung von S1P auf die Proliferation von HSCs

Hinsichtlich der Bedeutung von S1P im Gesamtzusammenhang der Pathogenese von Lebererkrankungen ist bislang bekannt, dass in humanen fibrotischen Lebern unabhängig von der Ätiologie der Schädigung der S1P-Spiegel durch eine Hochregulation von Sphingosinkinasen, die an der Biosynthese von S1P beteiligt sind, ansteigt [203]. Eine gezielte Inhibition von Sphingosinkinasen, die zu einem niedrigeren S1P-Spiegel und geringerer Proliferation von HSCs führen könnte, stellt somit möglicherweise einen therapeutischen Ansatz der Leberfibrose dar. Die Wirkung von S1P auf MSCs und Sternzellen als MSCs der Leber ist Gegenstand der aktuellen Forschung und es finden sich bislang in der Literatur diskrepante Angaben zur Wirkung von S1P auf MSCs, die in den folgenden Abschnitten erläutert und diskutiert werden.

Da S1P als natürlicher Ligand der S1PR für die Funktionsweise der Rezeptoren von entscheidender Bedeutung ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von S1P auf die Proliferation von HSCs untersucht. Es zeigte sich zwar eine geringfügige Steigerung der DNA-Synthese primärer HSCs nach der Behandlung mit S1P in den Konzentrationen 0,25 und 0,5 μ M, diese war jedoch deutlich geringer als der Anstieg der DNA-Synthese nach der Behandlung mit PDGF-BB, das proliferativ auf HSCs wirkt [241]. Deutlicher war jedoch die Reduktion der relativen DNA-Menge um 29% bzw. 44% nach der Stimulation mit S1P in höheren Konzentrationen (4 und 8 μ M) im Vergleich zu der Kontrollbedingung ohne S1P. Dies legt eine Steigerung der

Proliferation durch niedrige Konzentrationen S1P sowie eine Inhibition der Proliferation durch höhere Konzentrationen S1P in primären HSCs nahe.

Ikeda et al. konnten in einem ähnlichen Experiment durch eine 24-stündige Stimulation mit 10 μM S1P eine gesteigerte DNA-Synthese bei HSCs erzielen, die zwischen Tag 7 und 10 aufgrund von Konfluenz subkultiviert worden waren. Bei primären HSCs hingegen, die lediglich für 3 Tage kultiviert und nicht subkultiviert worden waren, wurde keine Veränderung der DNA-Synthese beschrieben [204]. Lu et al. zeigten hingegen, dass eine Inkubation mit S1P-haltigen Medien (0,5 bis 1,5 μM S1P) auf primäre MSCs der Maus konzentrationsabhängig proliferativ wirkt - mit dem Proliferationsoptimum bei 1 μM S1P [242]. In einer weiteren Studie wurde nach 48-stündiger Behandlung von humanen LX-2 Zellen (HSC-Linie) mit 10 und 20 μM S1P ein reduziertes Überleben der Zellen gezeigt [205]. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Wirkung von S1P auf die Proliferation von Sternzellen und anderen MSCs liegt in der Zusammensetzung der Zellkulturmedien. Die isolierten HSCs wurden in unserem Experiment zur Untersuchung der Proliferation der HSCs nach Stimulation mit S1P mit serumfreiem Medium kultiviert, wohingegen in den anderen oben genannten Arbeiten serumhaltiges Medium verwendet wurde. Da auch das FCS einen Einfluss auf das Zellwachstum hat, könnten die variablen Effekte von S1P in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Proliferation von HSCs möglicherweise durch FCS zu erklären sein. Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Studien und unserer Arbeit zu schaffen könnten weitere Untersuchungen mittels BrdU-ELISA durchgeführt werden, in denen neben der Behandlung der Zellen mit S1P in verschiedenen Konzentrationen eine Behandlung mit FCS sowie eine kombinierte Behandlung mit S1P und FCS erfolgt. Eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Stimulation mit S1P liegt in der Länge der Inkubationszeit mit S1P, die je nach Arbeit zwischen 24 und 72 Stunden lag.

Im Gegensatz zu den Arbeiten, die eine proliferative Wirkung von S1P auf MSCs belegen, gibt es jedoch auch Studien, die S1P eine unterstützende Funktion bei der Differenzierung von MSCs zuschreiben [143, 243]. Unter Berücksichtigung der von uns beobachteten Hemmung der Proliferation von HSCs durch S1P in den Konzentrationen 4 und 8 μM scheint in diesen hohen Konzentrationen ein Beitrag von S1P zur Differenzierung von HSCs möglich, da Proliferation und Differenzierung konkurrierende Prozesse darstellen. Denkbar wäre jedoch hinsichtlich der Hemmung der Proliferation der HSCs auch ein Verbleiben der Zellen im ruhenden Zustand oder ein Absterben der Zellen unter hohen Konzentrationen von S1P. Letzteres scheint wahrscheinlich, da in unseren Experimenten lichtmikroskopisch eine reduzierte Zelldichte nach der

zweitägigen Behandlung mit 8 μM S1P im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen wurde (Abb. 16). Ein konzentrationsabhängiger Effekt von S1P hinsichtlich der Proliferation und konkurrierenden Prozessen wie der Differenzierung liegt nahe, der jedoch weitere, eingehendere Untersuchungen erfordert. Insgesamt finden sich aktuell in der Literatur diskrepante Angaben zur Wirkung von S1P auf isolierte MSCs, die eine entscheidende Bedeutung von S1P einerseits für die Proliferation und andererseits für die Differenzierung von MSCs andeuten. Insbesondere wäre es interessant herauszufinden, durch welche der fünf S1PR die differentiellen Effekte von S1P bei unterschiedlichen Konzentrationen vermittelt werden, um neben der oben genannten gezielten Inhibition von Sphingosinkinasen weitere mögliche therapeutische Ansätze der Leberfibrose beispielsweise durch eine Modulation einzelner S1PR zu identifizieren.

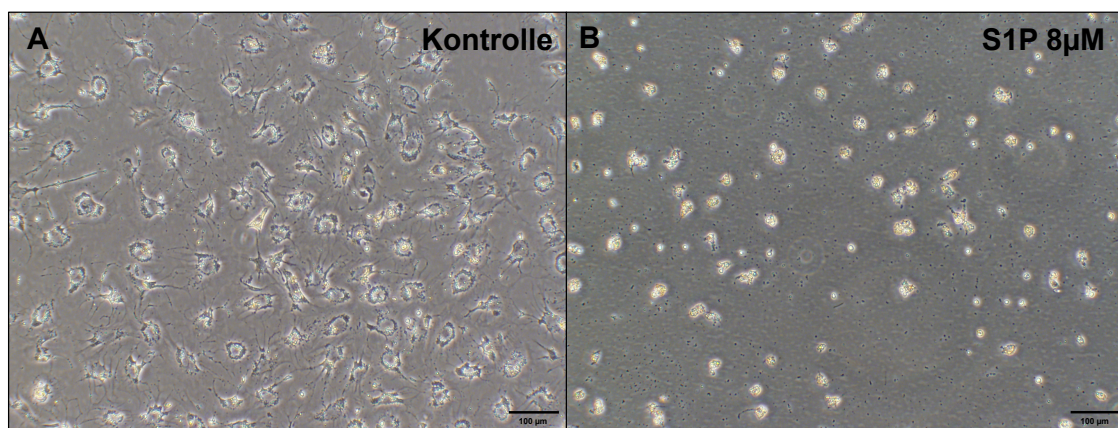


Abb. 16: Zelldichte isolierter HSCs nach Behandlung mit S1P.

Isolierte HSCs wurden ab Tag 1 nach der Isolation für 48 Stunden mit Kontrollmedium oder S1P (8 μM) behandelt. An Tag 3 wurden lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht. Es zeigte sich eine deutlich reduzierte Zelldichte nach der Behandlung mit S1P (**B**) im Vergleich zur Kontrolle (**A**). Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm .

Grammatikos et al. zeigten einen weiteren Aspekt von S1P im Zusammenhang mit chronischen Lebererkrankungen und Karzinomen auf. Sie konnten nachweisen, dass im Blut von Patienten mit einem HCC signifikant höhere S1P-Spiegel vorliegen, als im Blut von Patienten mit einer Leberzirrhose, was eine mögliche Funktion des S1P als Biomarker für die Identifikation eines HCC bei Patienten mit Lebererkrankungen nahelegt [244]. Ji et al. bestätigten in einer aktuellen Studie eine erhöhte S1P-Konzentration im Serum von Patienten mit HCC und belegten darüber hinaus, dass die Expression des S1PR1 in HCC-Gewebeproben erhöht ist. Es wurde auch eine Assoziation zwischen der erhöhten Expression des S1PR1 und der Tumorprogression sowie pathologischen Charakteristika wie der intrahepatischen Metastasierung, der Invasion der *Vena portae* und der histologischen Differenzierung

gezeigt [245]. Folglich scheint nicht nur dem S1P, sondern auch dem S1PR1 eine Rolle als möglicher Tumormarker zuzukommen und es liegt nahe, dass die S1P/S1PR1-Achse für die Tumorgenese von Bedeutung ist.

4.2.2 Assoziation von S1PR1 und 3 mit der Proliferation von HSCs

Einer der stärksten proliferativen Stimuli für HSCs ist PDGF, das die Proliferation der Sternzellen während der Fibrogenese in der Leber fördert [246]. PDGF wird vor allem bei einer akuten Gewebeschädigung der Leber vermehrt freigesetzt [247]. Als potentielle Quellen für PDGF gelten beispielsweise Thrombozyten, Kupffer-Zellen und Endothelzellen [248, 249]. In fibrotischen Lebern kommt es zu einem Anstieg sowohl der PDGF-Rezeptoren, als auch der Liganden und das Ausmaß der PDGFR-Expression korreliert mit der Entzündung und der Schwere der Gewebeläsion [250]. Aktivierte HSCs setzen selbst PDGF frei, das wiederum autokrin und parakrin auf andere HSCs wirken und so zur Aufrechterhaltung der proliferativen Situation im Rahmen der Leberschädigung beitragen kann [251]. Die Proliferation von HSCs stellt einen entscheidenden Schritt in der Pathogenese der Leberfibrose dar und eine Blockierung von PDGFR mittels Inhibitoren wie Crenolanib kann die Regeneration der fibrotischen Leber beschleunigen [240].

In unseren Experimenten zeigte sich in proliferierenden HSCs eine deutlich gesteigerte mRNA-Menge des S1PR1 und 3. Die Proliferation der isolierten HSCs wurde durch eine Behandlung mit PDGF-BB induziert. In Western Blot-Analysen bestätigte sich die gesteigerte Expression des S1PR1, für den S1PR3 zeigte sich ebenfalls ein Trend zu erhöhten Proteinmengen. Diese Ergebnissen stimmen mit der oben genannten Studie von Kitada et al. überein, in der für Präadipozyten, die sich von MSCs des Fettgewebes ableiten, eine Inhibierung des S1PR1 und 3 zu einer reduzierten Zellproliferation führte, wohingegen eine Blockierung des S1PR4 keinen signifikanten Effekt zeigte [215]. Folglich kann vermutet werden, dass der S1PR1 und 3 in HSCs, ähnlich wie bei anderen MSCs mit der Proliferation von Zellen assoziiert ist. Eine möglicherweise inhibierende Wirkung von TGF- β , welches durch HSCs freigesetzt wird und gegenläufige Effekte zum PDGF-BB in Sternzellen vermitteln kann [235], wurde durch eine gleichzeitige Behandlung von HSCs mit PDGF-BB und dem TGF- β 1-Rezeptor I/II-Inhibitor LY2109761 reduziert. TGF- β 1 fördert die Entwicklung von HSCs zu Myofibroblasten und wirkt somit der PDGF-BB-vermittelten Proliferation entgegen [38]. Ziel der Hemmung des TGF- β 1-Rezeptors war es folglich der Differenzierung von HSCs entgegenzuwirken und den PDGF-BB-vermittelten proliferativen Reiz zu verstärken. Die PDGF-BB-vermittelte Hochregulation des S1PR1 und 3 konnte durch

die Inhibition des TGF- β 1-Signalwegs zusätzlich erhöht werden. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass der S1PR1 und 3 für die Proliferation von HSCs als MSCs der Leber relevant sind und damit einen potentiellen präventiven und therapeutischen Ansatz für die Leberfibrose darstellen.

Eine Stimulation mit S1P führte in einer Studie mit der HSC-Linie LX-2 zu einer gesteigerten Expression des S1PR1 und 3 sowie zu einer erhöhten mRNA-Menge der Sphingosinkinase, die zur weiteren S1P-Synthese beiträgt [205]. Da in unseren Experimenten S1P in niedrigen Konzentrationen (0,25 und 0,5 μ M) zu einer Proliferation von HSCs führte und in proliferierenden HSCs der S1PR1 und 3 verstärkt exprimiert wurde, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der proliferative Effekt von S1P auf HSCs durch den S1PR1 und 3 vermittelt wird. Über eine gezielte Inhibition des S1PR1 und 3 könnte so möglicherweise Einfluss auf die S1P-vermittelte Proliferation von HSCs im Rahmen einer Leberschädigung genommen werden. Um diese Vermutung zu erhärten, könnte weiterführend die Expression der S1PR1 und 3 in HSCs nach einer Stimulation mit S1P analysiert und der Einfluss einer gezielten Inhibition dieser beiden Rezeptoren auf die S1P-vermittelte Proliferation von HSCs untersucht werden.

Einen weiteren interessanten Aspekt der S1P-vermittelten Proliferation zeigten Kitada et al. in der bereits oben genannten Arbeit auf, indem sie neben der gesteigerten Proliferation durch den S1PR1 und 3 eine Hemmung der S1P-vermittelten Zellproliferation durch den S1PR2 nachwiesen [215]. Eine alleinige Behandlung isolierter Zellen mit dem S1PR2-Antagonisten JTE-013 führte in ihrer Studie zu einer gesteigerten Proliferation im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Sollte dies auch für HSCs gelten, so scheint es möglich, dass durch S1P gegenläufige Signalwege aktiviert werden können: Proliferation durch den S1PR1 und 3 sowie Prozesse die mit einer Inhibition der Proliferation verbunden sind durch den S1PR2. Dies lässt auf eine kontextabhängige Wirkung von S1P schließen. Aufgrund der von Kitada et al. erzielten Steigerung der Proliferation durch den S1PR2-Antagonisten JTE-013 könnte weiterführend untersucht werden, ob durch eine gezielte Überexpression des S1PR2 bei Gabe eines S1PR2-Agonisten eventuell eine Hemmung der Proliferation von HSCs erreicht werden könnte.

Die Behandlung isolierter HSCs mit TUDC führte in unseren Experimenten in niedrigen Konzentrationen (2 μ M) zu einem Anstieg der relativen mRNA-Menge des S1PR1-3 und in höheren Konzentrationen (8 μ M) zu einer Verringerung der relativen mRNA-Menge des S1PR4 und 5. Studer et al. zeigten, dass Gallensäuren den S1PR2 in Hepatozyten aktivieren können [252] und Sommerfeld et al. kamen zu dem

Ergebnis, dass eine Stimulation von HSCs mit Gallensäuren über eine Aktivierung des EGF-Rezeptors in Abhängigkeit von der aktivierten Signalkaskade entweder zu einer Proliferation oder zu einer Apoptose der Zellen führen kann [253]. Da Gallensäuren an den S1PR2 binden [252] und zur Proliferation von HSCs beitragen können, bleibt zu prüfen, ob Gallensäuren möglicherweise über eine Aktivierung des S1PR2 zu einer Proliferation von HSCs führen könnten. Dies scheint insbesondere im Hinblick auf mögliche therapeutische Optionen bei cholestatischen Lebererkrankungen interessant, bei denen HSCs einer erhöhten Konzentration zirkulierender Gallensäuren ausgesetzt sind. Sollten Gallensäuren tatsächlich auch über S1PR zur Proliferation von HSCs beitragen, könnte möglicherweise durch eine gezielte Inhibition von S1PR die Proliferation von HSCs reduziert und die Entwicklung einer Leberfibrose abgemildert werden.

4.2.3 Differenzierung von HSCs im Kontext von Lebererkrankungen

Die Differenzierung von HSCs ist bei chronischen Erkrankungen der Leber in zweierlei Hinsichten von Bedeutung: einerseits entwickeln sich aktivierte HSCs zu Zellen mit einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, welche zur Progression einer Leberfibrose beitragen [48], andererseits können sie durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren und mögliche Differenzierung in Epithelzellen der Leber zur Leberregeneration beitragen [94]. Aus diesem Grund ist die Erforschung der Differenzierungsprozesse von HSCs von wissenschaftlichem und therapeutischem Interesse.

In unseren Experimenten stand der gesteigerten Expression des S1PR1 und 3 in proliferierenden HSCs eine deutliche Reduktion der relativen mRNA-Menge des S1PR4 und 5 gegenüber. Diese reduzierte Expression des S1PR4 und 5 unter proliferativen Bedingungen lässt vermuten, dass diese beiden Rezeptoren nicht an der Vermittlung der Proliferation von HSCs beteiligt sind, sondern dass sie konkurrierende Prozesse wie beispielsweise die Zelldifferenzierung unterstützen könnten.

In der Literatur finden sich übereinstimmend mit den qPCR-Ergebnissen dieser Arbeit Hinweise, dass der S1PR4 nicht die Proliferation, sondern die Differenzierung von Stammzellen unterstützt. Dillmann et al. zeigten beispielsweise, dass der S1PR4 eine entscheidende Rolle für die Differenzierung von humanen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen zu plasmazytoiden dendritischen Zellen spielt. Die Differenzierung konnte durch einen S1PR4-Agonisten unterstützt und durch einen S1PR4-Antagonisten gehemmt werden [254]. Ebenso zeigte sich in einem Mausmodell eine spezifische Hochregulation des S1PR4 während der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Megakaryozyten, wohingegen die Differenzierung bei

S1PR4-defizienten Mäusen gestört war und die Megakaryozyten aberrant und morphologisch auffällig waren [154].

Neben unserer Hypothese, dass von den fünf S1PR am ehesten der S1PR4 und 5 für die Differenzierung von HSCs von Bedeutung sein könnten gibt es Hinweise von Price et al. und Nincheri et al., dass der S1PR2 eine kritische Rolle in der Differenzierung von MSCs spielt [142, 143].

Aufgrund der Bedeutung, die dem S1PR2 in den Arbeiten von Price et al. und Nincheri et al. für Differenzierungsprozesse von MSCs zugeschrieben wird, vermuteten wir initial, dass auch in HSCs durch die Induktion einer Zelldifferenzierung eine Regulation des S1PR2 zu erzielen sei. Es zeigte sich jedoch keine starke Änderung der relativen mRNA-Menge der S1PR1-5 nach der Behandlung mit TGF- β 1, das bekanntermaßen die Differenzierung von HSCs fördert [218]. Auch andere Liganden der TGF- β -Familie führten zu keiner starken Regulation der Expression der S1PR. Ergänzend sei jedoch gesagt, dass in der vorliegenden Arbeit die Differenzierung von HSCs nicht untersucht wurde, sondern lediglich die Ausprägung der S1PR unter Bedingungen, die eine Differenzierung begünstigen.

Die Differenzierung von MSCs ist jedoch nicht nur für die Pathogenese von Lebererkrankungen und die Leberregeneration von entscheidender Bedeutung, sie ist auch aufgrund des therapeutischen Nutzens der MSCs von großem Interesse. Durch ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Differenzierung von Stammzellen könnten möglicherweise Differenzierungsprotokolle verbessert und die Anzucht patientenspezifischer Zellen zu therapeutischen Zwecken vereinfacht werden. Die mögliche Beteiligung des S1PR4 und 5 an der Differenzierung von HSCs sollte weiterführend untersucht werden. Es könnte beispielsweise analysiert werden, unter welchen Bedingungen es zu einer gesteigerten Expression des S1PR4 und 5 kommt und ob eine Hochregulation oder Überexpression dieser beiden Rezeptoren die Differenzierung von HSCs begünstigt. Die Anwendung von MSCs bei Erkrankungen der Leber wird bereits in klinischen Studien untersucht und ein therapeutischer Effekt in Form einer Verbesserung der Leberfunktion beispielsweise bei Leberzirrhose konnte von mehreren Arbeitsgruppen belegt werden [255].

4.2.4 Zusammenspiel von Immunsystem und S1PR bei Leberfibrose

Hinsichtlich der Proliferation von HSCs scheint insbesondere im Hinblick auf die Leberfibrose auch IL-1 β eine wichtige Rolle zu spielen. Reiter et al. zeigten, dass die Behandlung muriner HSCs mit IL-1 β *in vitro* zu einer signifikant gesteigerten Proliferationsrate der Zellen führte [256] und auch auf immortalisierte HSCs der Ratte

wirkt IL-1 β proliferativ [257]. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die intrahepatische IL-1-Konzentration bereits innerhalb der ersten Stunde nach einer akuten Leberschädigung ansteigt [258]. Gieling et al. kamen zu dem Ergebnis, dass dieser Anstieg der IL-1-Konzentration zeitlich dem Beginn der HSC-Aktivierung und der Fibrogenese vorausgeht und dass IL-1 neben anderen Zytokinen den Übergang einer akuten Leberschädigung zur Leberfibrose über die Aktivierung von HSCs beeinflusst und auch in späteren Phasen für die Aufrechterhaltung der Fibrose von Bedeutung ist. IL-1-Rezeptor-defiziente Mäuse zeigten in ihrer Arbeit eine reduzierte Leberschädigung und Fibrose nach intraperitonealer Injektion von Thioacetamid [259]. In anderen Organen, beispielsweise der Lunge und der Niere ist IL-1 β ebenfalls mit der Fibrogenese assoziiert [260, 261]. Als Hauptproduzenten von IL-1 β werden insbesondere Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen und Monozyten) angesehen, aber auch andere Zelltypen wie Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen können IL-1 β produzieren [262].

In unseren Experimenten kam es nach einer Behandlung isolierter HSCs mit IL-1 β zu einer deutlichen Steigerung der relativen mRNA-Menge der S1PR1-3, die sich in den Western Blot-Analysen bestätigte. IL-1 β ist somit der einzige Faktor, durch den im Rahmen dieser Arbeit sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Regulation (Steigerung) der Expression des S1PR2 erreicht werden konnte. Diese Befunde deuten eine Aktivierung der HSCs durch IL-1 β unter Mitwirkung des S1PR2 an. Der S1PR2 vermittelt möglicherweise eine Aktivierung der HSCs durch das Immunsystem nach einer Schädigung der Leber. In weiterführenden Experimenten könnte untersucht werden, ob über eine Inhibition oder *Knockout* des S1PR2 Einfluss auf die IL-1 β -vermittelte Proliferation von HSCs genommen werden kann.

Der S1PR2 scheint jedoch nicht nur durch das Immunsystem aktiviert zu werden, sondern auch zur Verstärkung der Immunantwort beizutragen. In einem Experiment von Yu et al. konnte gezeigt werden, dass durch bakterielle Pathogene die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- α in murinen Monozyten und Makrophagen aus dem Knochenmark induziert werden kann. Ein *Knockdown* des S1PR2 führte zu einer signifikanten Reduktion der Produktion dieser drei Zytokine, was auf eine essentielle Rolle des S1PR2 für die Regulation der Produktion proinflammatorischer Zytokine schließen lässt [263]. Während einer Leberschädigung könnte über eine Modulation des S1PR2 möglicherweise ebenfalls das Ausmaß der Immunantwort und damit die Proliferation von HSCs beeinflusst werden.

4.3 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Genexpression aller fünf S1PR in isolierten HSCs der Ratte als MSCs der Leber nachzuweisen, erstmals auch den S1PR4 und 5, wenngleich weitere Nachweise dieser beiden Rezeptoren mittels validierter Antikörper noch ausstehen. Es wurden Faktoren identifiziert, die die Expression der S1PR1-5 in isolierten HSCs als leberresidente MSCs der Ratte regulieren. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die S1PR1/3 und S1PR4/5 differentielle Funktionen hinsichtlich der Proliferation und Differenzierung von HSCs vermitteln und die gezielte Regulation einzelner S1PR zugunsten der Proliferation oder Entwicklung von Stammzellen im Rahmen von Differenzierungsprotokollen genutzt werden könnte.

Unter proliferativen Bedingungen wurde eine differentielle Expression der S1PR in isolierten HSCs festgestellt. Der S1PR1 und 3 wurde nach der Behandlung mit PDGF-BB verstärkt exprimiert, wohingegen es bei dem S1PR4 und 5 zu einer Reduktion der Expression kam. Der S1PR1 und 3 ist in HSCs, ähnlich wie bei anderen MSCs, offenbar mit der Zellproliferation assoziiert. Durch eine gezielte Inhibition oder einen *Knockout* des S1PR1 bzw. 3 könnte somit möglicherweise Einfluss auf die Proliferation der HSCs genommen werden, die einen entscheidenden Schritt in der Pathogenese der Leberfibrose darstellt. Die reduzierte Expression der S1PR4 und 5 unter proliferativen Bedingungen lässt eine Beteiligung dieser Rezeptoren an Prozessen vermuten, die mit der Proliferation konkurrieren, beispielsweise der Differenzierung. Es finden sich auch bereits Hinweise in der Literatur, dass der S1PR4 mit der Differenzierung von Stammzellen assoziiert ist. Überträgt man diese mögliche Funktion der S1PR4 und 5 für die Differenzierung von HSCs generell auf Stammzellen, so könnte eine gezielte Stimulation oder Überexpression des S1PR4 und 5 eventuell die Differenzierung dieser Zellen begünstigen. Dies könnte somit zur Verbesserung von Differenzierungsprotokollen beitragen, um beispielsweise das Differenzierungspotential patientenspezifischer Stammzellen zu therapeutischen Zwecken gezielt nutzen zu können.

Der S1PR1/3 sowie der S1PR4/5 zeigten in unseren Experimenten jeweils ähnliche Expressionsmuster und unterlagen ähnlichen Regulationsmechanismen, was darauf schließen lässt, dass diese Rezeptoren synergistische Funktionen in HSCs vermitteln könnten. Der S1PR2 unterschied sich durch andere Regulationsmechanismen von den anderen Rezeptoren. Die Sonderstellung des S1PR2 wurde auch bei der Aktivierung der HSCs deutlich, die *in vivo* bei einer Leberschädigung durch parakrine Stimulation und *in vitro* durch eine Kultivierung auf Zellkulturschalen aus Kunststoff erfolgt. Im

Zuge der Aktivierung *in vitro* beobachteten wir eine Abnahme der Expression aller S1PR mit Ausnahme des S1PR2, die Befunde anderer Studien bestätigte [204].

IL-1 β war der einzige Faktor, durch den sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Hochregulation des S1PR2 erzielt werden konnte. Der S1PR2 stellt somit möglicherweise eine Schnittstelle zwischen dem Immunsystem und HSCs dar, indem er bei einer akuten Leberschädigung eine schnelle Aktivierung der HSCs durch IL-1 β ermöglicht.

Abb. 17 gibt einen Überblick über die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit zur Regulation und möglichen Funktion der fünf S1PR in isolierten HSCs der Ratte als MSCs der Leber, die als Grundlage zur gezielten weiteren Untersuchung der Funktionen von S1PR für die Steuerung des Verhaltens von HSCs dienen könnte, deren langfristiges Ziel die Entwicklung therapeutischer Verfahren zur Behandlung der Leberfibrose ist.

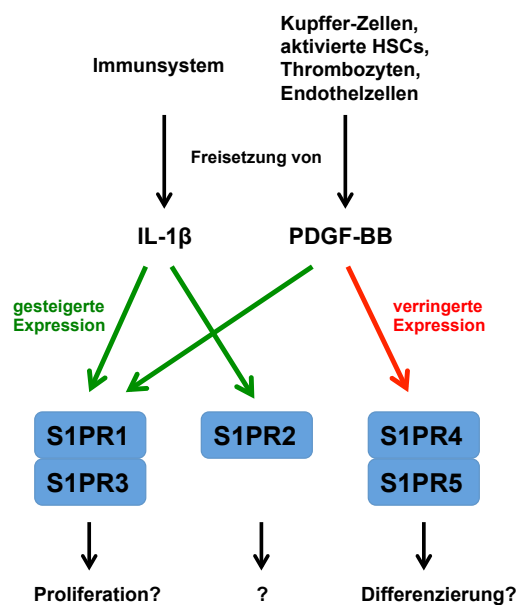


Abb. 17: Erkenntnisse der Arbeit zur Regulation und möglichen Funktion der fünf S1PR in isolierten HSCs der Ratte.

Alle fünf S1PR werden in HSCs der Ratte exprimiert. Die Behandlung der HSCs mit IL-1 β führte zu einer gesteigerten Expression des S1PR1-3. PDGF-BB, das proliferativ auf HSCs wirkt, vermittelte eine gesteigerte Expression des S1PR1 und 3 und eine verringerte Expression des S1PR4 und 5. Die S1PR1/3 sowie S1PR4/5 waren ähnlich reguliert und vermitteln möglicherweise synergistische Effekte. Für den S1PR1 und 3 liegt eine Beteiligung an der Proliferation von HSCs nahe. Der S1PR2 könnte durch eine Aktivierung des Immunsystems nach einer Verletzung der Leber induziert werden. Der S1PR4 und 5 könnte an der Differenzierung von HSCs beteiligt sein, da proliferative Prozesse zu einer verminderten Expression dieser Rezeptoren führten.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Kupffer, C., *Ueber Sternzellen der Leber*. Archiv für mikroskopische Anatomie, 1876. **12**(1): p. 353-358.
2. Ahern, M., et al., *Hepatic stellate cell nomenclature*. Hepatology, 1996. **23**(1): p. 193.
3. Blouin, A., Bolender, R.P., and Weibel, E.R., *Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study*. J Cell Biol, 1977. **72**(2): p. 441-455.
4. Friedman, S.L., *Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver*. Physiol Rev, 2008. **88**(1): p. 125-172.
5. Geerts, A., *On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuroectodermal?* J Hepatol, 2004. **40**(2): p. 331-334.
6. Toi, M., Hayashi, Y., and Murakami, I., *Hepatic stellate cells derived from the nestin-positive cells in septum transversum during rat liver development*. Med Mol Morphol, 2018. **51**(4): p. 199-207.
7. Asahina, K., et al., *Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 983-995.
8. Loo, C.K. and Wu, X.J., *Origin of stellate cells from submesothelial cells in a developing human liver*. Liver Int, 2008. **28**(10): p. 1437-1445.
9. Kalinichenko, V.V., et al., *Foxf1 +/- mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl4 injury*. Hepatology, 2003. **37**(1): p. 107-117.
10. Asahina, K., et al., *Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 998-1011.
11. Enzan, H., et al., *Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells*. Microsc Res Tech, 1997. **39**(4): p. 336-349.
12. Han, L., et al., *Single cell transcriptomics identifies a signaling network coordinating endoderm and mesoderm diversification during foregut organogenesis*. Nature communications, 2020. **11**(1): p. 1-16.
13. Niki, T., et al., *Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 520-527.
14. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2247-2250.
15. Geerts, A., *History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(3): p. 311-335.
16. Cassiman, D., et al., *Hepatic stellate cells do not derive from the neural crest*. J Hepatol, 2006. **44**(6): p. 1098-1104.
17. Suskind, D.L. and Muench, M.O., *Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells*. J Hepatol, 2004. **40**(2): p. 261-268.
18. Kiassov, A.P., et al., *Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an immunohistochemical and morphometric study*. Differentiation, 1995. **59**(4): p. 253-258.
19. Vassy, J., et al., *Confocal microscopy immunofluorescence localization of desmin and other intermediate filament proteins in fetal rat livers*. Hepatology, 1993. **17**(2): p. 293-300.
20. Nagy, N.E., et al., *Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats*. J Lipid Res, 1997. **38**(4): p. 645-658.
21. Blomhoff, R. and Wake, K., *Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis*. FASEB J, 1991. **5**(3): p. 271-277.

22. Buchholz, M., et al., *Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype*. J Mol Med, 2005. **83**(10): p. 795-805.
23. Omary, M.B., et al., *The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 50-59.
24. Blomhoff, R. and Blomhoff, H.K., *Overview of retinoid metabolism and function*. J Neurobiol, 2006. **66**(7): p. 606-630.
25. Wake, K., *"Sternzellen" in the liver: Perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A*. Am J Anat, 1971. **132**(4): p. 429-461.
26. Blomhoff, R., et al., *Transport and storage of vitamin A*. Science, 1990. **250**(4979): p. 399-404.
27. Blomhoff, R., et al., *Hepatic retinol metabolism. Distribution of retinoids, enzymes, and binding proteins in isolated rat liver cells*. J Biol Chem, 1985. **260**(25): p. 13560-13565.
28. Quadro, L., et al., *Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein*. EMBO J, 1999. **18**(17): p. 4633-4644.
29. Popper, H., *Distribution of vitamin A in tissue as visualized by fluorescence microscopy*. Physiol Rev, 1944. **24**(2): p. 205-224.
30. Ichikawa, S., et al., *Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5549-5555.
31. Hsieh, C.C., et al., *Hepatic immune tolerance induced by hepatic stellate cells*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(42): p. 11887-11892.
32. Su, Y.H., et al., *Hepatic stellate cells attenuate the immune response in renal transplant recipients with chronic hepatitis*. Transplant Proc, 2012. **44**(3): p. 725-729.
33. Ueno, T., et al., *Innervation of the sinusoidal wall: regulation of the sinusoidal diameter*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **280**(1): p. 868-873.
34. Reynaert, H., Urbain, D., and Geerts, A., *Regulation of sinusoidal perfusion in portal hypertension*. Anat Rec, 2008. **291**(6): p. 693-698.
35. Rockey, D.C., *Characterization of endothelin receptors mediating rat hepatic stellate cell contraction*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **207**(2): p. 725-731.
36. Tsuchida, T. and Friedman, S.L., *Mechanisms of hepatic stellate cell activation*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(7): p. 397-411.
37. Geerts, A., et al., *In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion*. J Hepatol, 1989. **9**(1): p. 59-68.
38. Hellerbrand, C., et al., *The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo*. J Hepatol, 1999. **30**(1): p. 77-87.
39. Jarnagin, W.R., et al., *Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the E11A segment in rat hepatic fibrogenesis*. J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 2): p. 2037-2048.
40. Nieto, N., Friedman, S.L., and Cederbaum, A.I., *Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9853-9864.
41. Canbay, A., et al., *Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic*. Lab Invest, 2003. **83**(5): p. 655-663.
42. Ramadori, G., et al., *Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1990. **59**(6): p. 349-357.
43. Rockey, D.C., et al., *Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture*. J Submicrosc Cytol Pathol, 1992. **24**(2): p. 193-203.
44. Friedman, S.L., Wei, S., and Blaner, W.S., *Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF*. Am J Physiol, 1993. **264**(5): p. 947-952.

45. Minato, Y., Hasumura, Y., and Takeuchi, J., *The role of fat-storing cells in Disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease*. Hepatology, 1983. **3**(4): p. 559-566.
46. Jophlin, L.L., et al., *Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2018. **315**(5): p. 713-721.
47. Friedman, S.L., *Liver fibrosis—from bench to bedside*. J Hepatol, 2003. **38**: p. 38-53.
48. Friedman, S.L., et al., *Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8681-8685.
49. Lee, U.E. and Friedman, S.L., *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 195-206.
50. Minguell, J.J., Erices, A., and Conget, P., *Mesenchymal Stem Cells*. Exp Biol Med, 2001. **226**(6): p. 507-520.
51. Roufosse, C.A., et al., *Circulating mesenchymal stem cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 585-597.
52. Chamberlain, G., et al., *Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2739-2749.
53. Cohnheim, J., *Über Entzündung und Eiterung*. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin, 1867. **40**(1): p. 1-79.
54. Cohnheim, J., *Neue Untersuchungen über die Entzündung*. 1873: Hirschwald.
55. Maximow, A., *Über experimentelle Erzeugung von Knochenmarks-gewebe*. Anat Anz, 1906. **28**: p. 24-38.
56. Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., and Gerasimov, U.V., *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. Cell Prolif, 1987. **20**(3): p. 263-272.
57. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-650.
58. Meirelles, L.d.S., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B., *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J Cell Sci, 2006. **119**(11): p. 2204-2213.
59. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 301-313.
60. Owen, M. and Friedenstein, A.J., *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp, 1988. **136**(0300-5208 (Print)): p. 42-60.
61. Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A.I., *Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine*. Muscle Nerve, 1995. **18**(12): p. 1417-1426.
62. Prockop, D.J., *Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-74.
63. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-834.
64. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-517.
65. Ullah, I., Subbarao, R.B., and Rho, G.J., *Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective*. Biosci Rep, 2015. **35**(2).
66. Woodbury, D., et al., *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons*. J Neurosci Res, 2000. **61**(4): p. 364-370.
67. Safford, K.M., et al., *Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(2): p. 371-379.

68. Naghdi, M., et al., *Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury*. *Cytherapy*, 2009. **11**(2): p. 137-152.
69. Barzilay, R., et al., *Lentiviral delivery of LMX1a enhances dopaminergic phenotype in differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2009. **18**(4): p. 591-601.
70. Kohyama, J., et al., *Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent*. *Differentiation*, 2001. **68**(4-5): p. 235-44.
71. Lee, K.D., et al., *In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells*. *Hepatology*, 2004. **40**(6): p. 1275-1284.
72. Wang, P.P., et al., *Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **320**(3): p. 712-716.
73. Sgodda, M., et al., *Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(13): p. 2875-2886.
74. Stock, P., et al., *Hepatocytes derived from adult stem cells*. *Transplant Proc*, 2008. **40**(2): p. 620-623.
75. Christ, B. and Dollinger, M.M., *The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into the liver*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2011. **16**(1).
76. Tang, D.-Q., et al., *In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation*. *Am J Stem Cells*, 2012. **1**(2): p. 114.
77. Gabr, M.M., et al., *Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice*. *Cell Transplant*, 2013. **22**(1): p. 133-145.
78. Phadnis, S.M., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo*. *Cytherapy*, 2011. **13**(3): p. 279-293.
79. Oswald, J., et al., *Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro*. *Stem Cells*, 2004. **22**(3): p. 377-384.
80. Hasanzadeh, E., et al., *The stability evaluation of mesenchymal stem cells differentiation toward endothelial cells by chemical and mechanical stimulation*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2017. **53**(9): p. 818-826.
81. Rytlewski, J.A., et al., *Mechanisms of tubulogenesis and endothelial phenotype expression by MSCs*. *Microvasc Res*, 2015. **99**: p. 26-35.
82. Joddar, B., Kumar, S.A., and Kumar, A., *A Contact-Based Method for Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into an Endothelial Cell-Phenotype*. *Cell Biochem Biophys*, 2018. **76**(1-2): p. 187-195.
83. Wang, Q., et al., *Method for in vitro differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into endothelial progenitor cells and vascular endothelial cells*. *Mol Med Rep*, 2016. **14**(6): p. 5551-5555.
84. Castro-Manreza, M.E. and Montesinos, J.J., *Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications*. *J Immunol Res*, 2015. **2015**.
85. Squillaro, T., Peluso, G., and Galderisi, U., *Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update*. *Cell Transplant*, 2016. **25**(5): p. 829-848.
86. Trim, N., et al., *Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(4): p. 1235-1243.
87. Fujio, K., et al., *Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat*. *Lab Invest*, 1994. **70**(4): p. 511-516.

88. Meurer, S.K., et al., *Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 3078-3087.
89. Kordes, C., et al., *CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(2): p. 410-417.
90. Kordes, C., et al., *Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells*. Cell Physiol Biochem, 2013. **31**(2-3): p. 290-304.
91. Xu, L., et al., *Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis*. Gut, 2005. **54**(1): p. 142-151.
92. Castilho-Fernandes, A., et al., *Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Exp Mol Pathol, 2011. **91**(3): p. 664-72.
93. Kordes, C., et al., *Stellate cells from rat pancreas are stem cells and can contribute to liver regeneration*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51878.
94. Kordes, C., et al., *Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration*. J Clin Invest, 2014. **124**(12): p. 5503-5515.
95. Smith, A., *Cell therapy: in search of pluripotency*. Curr Biol, 1998. **8**(22): p. 802-804.
96. Fong, E.L., Chan, C.K., and Goodman, S.B., *Stem cell homing in musculoskeletal injury*. Biomaterials, 2011. **32**(2): p. 395-409.
97. Michalopoulos, G.K., *Principles of liver regeneration and growth homeostasis*. Compr Physiol, 2013. **3**(1): p. 485-513.
98. Riehle, K.J., et al., *New concepts in liver regeneration*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**: p. 203-312.
99. Schmelzer, E., et al., *Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1973-1987.
100. Yang, L., et al., *Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers*. Stem Cells, 2008. **26**(8): p. 2104-2113.
101. Mederacke, I., et al., *Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology*. Nat Commun, 2013. **4**(1): p. 1-11.
102. Lua, I., et al., *Mesodermal mesenchymal cells give rise to myofibroblasts, but not epithelial cells, in mouse liver injury*. Hepatology, 2014. **60**(1): p. 311-322.
103. Kordes, C., et al., *Beyond fibrosis: stellate cells as liver stem cells*. Z Gastroenterol, 2015. **53**(12): p. 1425-1431.
104. Nagai, H., et al., *Differentiation of liver epithelial (stem-like) cells into hepatocytes induced by coculture with hepatic stellate cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(5): p. 1420-1425.
105. Chan, K.M., et al., *Hepatic stellate cells promote the differentiation of embryonic stem cell-derived definitive endodermal cells into hepatic progenitor cells*. Hepatol Res, 2013. **43**(6): p. 648-657.
106. Lin, N., et al., *Hedgehog-mediated paracrine interaction between hepatic stellate cells and marrow-derived mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **372**(1): p. 260-265.
107. Uyama, N., et al., *Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells*. J Hepatol, 2002. **36**(5): p. 590-599.
108. Schirmacher, P., et al., *Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells*. Hepatology, 1992. **15**(1): p. 5-11.
109. Chen, L., et al., *HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration*. Cell Biochem Funct, 2012. **30**(7): p. 588-596.
110. Yin, C., et al., *Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer*. J Clin Invest, 2013. **123**(5): p. 1902-1910.

111. Shen, K., et al., *Depletion of activated hepatic stellate cell correlates with severe liver damage and abnormal liver regeneration in acetaminophen-induced liver injury*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011. **43**(4): p. 307-315.
112. Nejak-Bowen, K.N., et al., *Gliotoxin-induced changes in rat liver regeneration after partial hepatectomy*. Liver Int, 2013. **33**(7): p. 1044-1055.
113. Kordes, C. and Haussinger, D., *Hepatic stem cell niches*. J Clin Invest, 2013. **123**(5): p. 1874-8180.
114. Sawitza, I., et al., *The niche of stellate cells within rat liver*. Hepatology, 2009. **50**(5): p. 1617-1624.
115. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
116. Katayama, Y., et al., *Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow*. Cell, 2006. **124**(2): p. 407-421.
117. Ara, T., et al., *Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny*. Immunity, 2003. **19**(2): p. 257-267.
118. Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 409-414.
119. Nyfeler, Y., et al., *Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal*. EMBO J, 2005. **24**(19): p. 3504-3515.
120. Kordes, C., Sawitza, I., and Haussinger, D., *Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **367**(1): p. 116-123.
121. O'Sullivan, C. and Dev, K.K., *The structure and function of the S1P1 receptor*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(7): p. 401-412.
122. Foord, S.M., et al., *International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(2): p. 279-288.
123. Attwood, T.K. and Findlay, J.B., *Fingerprinting G-protein-coupled receptors*. Protein Eng, 1994. **7**(2): p. 195-203.
124. Kolakowski, L.F., Jr., *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. Receptors Channels, 1994. **2**(1): p. 1-7.
125. Joost, P. and Methner, A., *Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands*. Genome Biol, 2002. **3**(11).
126. Chun, J., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(4): p. 579-87.
127. Hla, T. and Maciag, T., *An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors*. J Biol Chem, 1990. **265**(16): p. 9308-9313.
128. Zondag, G.C., et al., *Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1*. Biochem J, 1998. **330**(2): p. 605-609.
129. Postma, F.R., et al., *Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor*. EMBO J, 1996. **15**(10): p. 2388-2392.
130. Okazaki, H., et al., *Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor expressed in the cardiovascular system*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **190**(3): p. 1104-1109.
131. MacLennan, A.J., et al., *Cloning and characterization of a putative G-protein coupled receptor potentially involved in development*. Mol Cell Neurosci, 1994. **5**(3): p. 201-209.
132. Okamoto, H., et al., *EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics*

- distinct from EDG1 and AGR16*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(1): p. 203-208.
133. An, S., et al., *Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids*. FEBS Lett, 1997. **417**(3): p. 279-282.
134. Graler, M.H., Bernhardt, G., and Lipp, M., *EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue*. Genomics, 1998. **53**(2): p. 164-169.
135. Im, D.S., et al., *Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14281-14286.
136. Glickman, M., et al., *Molecular cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization of a novel nerve growth factor-regulated G-protein-coupled receptor, nrg-1*. Mol Cell Neurosci, 1999. **14**(2): p. 141-152.
137. Adada, M., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor 2*. FEBS J, 2013. **280**(24): p. 6354-6366.
138. Rosen, H., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor signaling*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 743-768.
139. Blaho, V.A. and Hla, T., *An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors*. J Lipid Res, 2014. **55**(8): p. 1596-1608.
140. Graeler, M. and Goetzl, E.J., *Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells*. FASEB J, 2002. **16**(14): p. 1874-1878.
141. Wang, C., et al., *Systemic distribution, subcellular localization and differential expression of sphingosine-1-phosphate receptors in benign and malignant human tissues*. Exp Mol Pathol, 2014. **97**(2): p. 259-265.
142. Price, S.T., et al., *Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 Regulates the Migration, Proliferation, and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells*. Int J Stem Cell Res Ther, 2015. **2**(2).
143. Nincheri, P., et al., *Sphingosine 1-phosphate induces differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells towards smooth muscle cells*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(10): p. 1741-1754.
144. Pulkoski-Gross, M.J., Donaldson, J.C., and Obeid, L.M., *Sphingosine-1-phosphate metabolism: A structural perspective*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2015. **50**(4): p. 298-313.
145. Lu, M. and Wu, B., *Structural studies of G protein-coupled receptors*. IUBMB Life, 2016. **68**(11): p. 894-903.
146. Hannun, Y.A. and Obeid, L.M., *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 139-150.
147. Liu, Y., et al., *Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation*. J Clin Invest, 2000. **106**(8): p. 951-961.
148. Kono, M., et al., *Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10690-10696.
149. MacLennan, A.J., et al., *An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability*. Eur J Neurosci, 2001. **14**(2): p. 203-209.
150. Lorenz, J.N., et al., *Vascular dysfunction in S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor knockout mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(1): p. 440-446.
151. Ishii, I., et al., *Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33697-33704.
152. Ishii, I., et al., *Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25152-25159.

153. Schulze, T., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P4) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model*. FASEB J, 2011. **25**(11): p. 4024-4036.
154. Golfier, S., et al., *Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4*. FASEB J, 2010. **24**(12): p. 4701-4710.
155. Walzer, T., et al., *Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1337-1344.
156. Mayol, K., et al., *Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking*. Blood, 2011. **118**(18): p. 4863-4871.
157. Jenne, C.N., et al., *T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow*. J Exp Med, 2009. **206**(11): p. 2469-2481.
158. Debien, E., et al., *S1PR5 is pivotal for the homeostasis of patrolling monocytes*. Eur J Immunol, 2013. **43**(6): p. 1667-1675.
159. Jaillard, C., et al., *Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival*. J Neurosci, 2005. **25**(6): p. 1459-1469.
160. Ogretmen, B., *Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(1): p. 33-50.
161. Powell, J.A., et al., *Targeting sphingosine kinase 1 induces MCL1-dependent cell death in acute myeloid leukemia*. Blood, 2017. **129**(6): p. 771-782.
162. Ponnusamy, S., et al., *Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(8): p. 761-775.
163. Brinkmann, V., et al., *Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(11): p. 883-897.
164. Huwiler, A. and Zangemeister-Wittke, U., *The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives*. Pharmacol Ther, 2018. **185**: p. 34-49.
165. Mandala, S., et al., *Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists*. Science, 2002. **296**(5566): p. 346-349.
166. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 355-360.
167. Kappos, L., et al., *Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study*. The Lancet, 2018. **391**(10127): p. 1263-1273.
168. Kappos, L., et al., *Ponesimod compared with teriflunomide in patients with relapsing multiple sclerosis in the active-comparator phase 3 OPTIMUM study: a Randomized clinical trial*. JAMA neurology, 2021. **78**(5): p. 558-567.
169. Sandborn, W.J., et al., *Ozanimod as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis*. N Engl J Med, 2021. **385**(14): p. 1280-1291.
170. Spiegel, S. and Milstien, S., *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 397-407.
171. Pyne, S. and Pyne, N.J., *Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells*. Biochem J, 2000. **349**(Pt 2): p. 385-402.
172. Maceyka, M., et al., *Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1585**(2-3): p. 193-201.
173. Nishi, T., et al., *Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(5): p. 759-765.
174. Van Brocklyn, J.R., et al., *Dual Actions of Sphingosine-1-Phosphate: Extracellular through the Gi-coupled Receptor Edg-1 and Intracellular to Regulate Proliferation and Survival*. The Journal of Cell Biology, 1998. **142**(1): p. 229-240.

175. Pappu, R., et al., *Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate*. Science, 2007. **316**(5822): p. 295-298.
176. Hanel, P., Andreani, P., and Graler, M.H., *Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood*. FASEB J, 2007. **21**(4): p. 1202-1209.
177. Ksiazek, M., et al., *Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate*. J Lipid Res, 2015. **56**(7): p. 1271-1281.
178. Venkataraman, K., et al., *Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate*. Circ Res, 2008. **102**(6): p. 669-676.
179. Hisano, Y., et al., *The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720*. J Biol Chem, 2011. **286**(3): p. 1758-1766.
180. Sato, K., et al., *Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes*. J Neurochem, 2007. **103**(6): p. 2610-2619.
181. Takabe, K., et al., *Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2*. J Biol Chem, 2010. **285**(14): p. 10477-10486.
182. Mitra, P., et al., *Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16394-16399.
183. Christoffersen, C., et al., *Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9613-9618.
184. Aoki, S., et al., *Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel*. J Biochem, 2005. **138**(1): p. 47-55.
185. Argraves, K.M. and Argraves, W.S., *HDL serves as a S1P signaling platform mediating a multitude of cardiovascular effects*. J Lipid Res, 2007. **48**(11): p. 2325-2333.
186. Olivera, A. and Spiegel, S., *Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens*. Nature, 1993. **365**(6446): p. 557-560.
187. Zhang, H., et al., *Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation*. J Cell Biol, 1991. **114**(1): p. 155-167.
188. Cuvillier, O., et al., *Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate*. Nature, 1996. **381**(6585): p. 800-803.
189. Mendelson, K., Evans, T., and Hla, T., *Sphingosine 1-phosphate signalling*. Development, 2014. **141**(1): p. 5-9.
190. Cyster, J.G. and Schwab, S.R., *Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 69-94.
191. Massberg, S., et al., *Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues*. Cell, 2007. **131**(5): p. 994-1008.
192. Saba, J.D. and Hla, T., *Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism*. Circ Res, 2004. **94**(6): p. 724-734.
193. Dantas, A.P., Igarashi, J., and Michel, T., *Sphingosine 1-phosphate and control of vascular tone*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. 2045-2052.
194. Visentin, B., et al., *Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 225-238.
195. Chae, S.S., et al., *Regulation of limb development by the sphingosine 1-phosphate receptor S1p1/EDG-1 occurs via the hypoxia/VEGF axis*. Dev Biol, 2004. **268**(2): p. 441-447.
196. Callihan, P., Alqinyah, M., and Hooks, S.B., *Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Signaling in Neural Progenitors*. Methods Mol Biol, 2018. **1697**: p. 141-151.

197. Kupperman, E., et al., *A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development*. *Nature*, 2000. **406**(6792): p. 192-195.
198. Edsbagge, J., et al., *Vascular function and sphingosine-1-phosphate regulate development of the dorsal pancreatic mesenchyme*. *Development*, 2005. **132**(5): p. 1085-1092.
199. Takabe, K., et al., *"Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets*. *Pharmacol Rev*, 2008. **60**(2): p. 181-195.
200. Hla, T., Venkataraman, K., and Michaud, J., *The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1781**(9): p. 477-482.
201. Li, C., et al., *Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P3 signaling in cholestasis-induced liver fibrosis*. *Am J Pathol*, 2009. **175**(4): p. 1464-1472.
202. Li, C., et al., *Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis*. *J Hepatol*, 2009. **50**(6): p. 1174-1183.
203. Gonzalez-Fernandez, B., et al., *Sphingosine 1-Phosphate Signaling as a Target in Hepatic Fibrosis Therapy*. *Front Pharmacol*, 2017. **8**: p. 579.
204. Ikeda, H., et al., *Biological activities of novel lipid mediator sphingosine 1-phosphate in rat hepatic stellate cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **279**(2): p. 304-310.
205. Liu, X., et al., *Essential roles of sphingosine 1-phosphate receptor types 1 and 3 in human hepatic stellate cells motility and activation*. *J Cell Physiol*, 2011. **226**(9): p. 2370-2377.
206. Gonzalez-Fernandez, B., et al., *Inhibition of the SphK1/S1P signaling pathway by melatonin in mice with liver fibrosis and human hepatic stellate cells*. *Biofactors*, 2017. **43**(2): p. 272-282.
207. Al Fadel, F., et al., *Involvement of Sphingosine 1-Phosphate in Palmitate-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **40**(6): p. 1637-1645.
208. Brunati, A.M., et al., *Cross-talk between PDGF and S1P signalling elucidates the inhibitory effect and potential antifibrotic action of the immunomodulator FTY720 in activated HSC-cultures*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(3): p. 347-359.
209. Yang, L., et al., *Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis is involved in liver fibrosis-associated angiogenesis*. *J Hepatol*, 2013. **59**(1): p. 114-123.
210. Ikeda, H., et al., *Sphingosine 1-phosphate enhances portal pressure in isolated perfused liver via S1P2 with Rho activation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **320**(3): p. 754-759.
211. Kageyama, Y., et al., *Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor 2 causes a selective reduction of portal vein pressure in bile duct-ligated rodents*. *Hepatology*, 2012. **56**(4): p. 1427-1438.
212. Wang, R., et al., *Exosome Adherence and Internalization by Hepatic Stellate Cells Triggers Sphingosine 1-Phosphate-dependent Migration*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(52): p. 30684-30696.
213. Ikeda, H., et al., *Sphingosine 1-phosphate regulates regeneration and fibrosis after liver injury via sphingosine 1-phosphate receptor 2*. *J Lipid Res*, 2009. **50**(3): p. 556-564.
214. Liu, Y., et al., *Hepatopoietin Cn reduces ethanol-induced hepatotoxicity via sphingosine kinase 1 and sphingosine 1-phosphate receptors*. *J Pathol*, 2013. **230**(4): p. 365-376.
215. Kitada, Y., et al., *Blockade of Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 Signaling Attenuates High-Fat Diet-Induced Adipocyte Hypertrophy and Systemic Glucose Intolerance in Mice*. *Endocrinology*, 2016. **157**(5): p. 1839-1851.

216. Donati, C., et al., *Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor*. FASEB J, 2005. **19**(3): p. 449-451.
217. Bruno, G., et al., *Bradykinin mediates myogenic differentiation in murine myoblasts through the involvement of SK1/Spns2/S1P2 axis*. Cell Signal, 2018. **45**: p. 110-121.
218. Yang, L., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor-beta1 via sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis*. Am J Pathol, 2012. **181**(1): p. 85-97.
219. Sassoli, C., et al., *Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Is Required for MMP-2 Function in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: Implications for Cytoskeleton Assembly and Proliferation*. Stem Cells Int, 2018. **2018**.
220. Poitevin, S., et al., *Sphingosine kinase 1 expressed by endothelial colony-forming cells has a critical role in their revascularization activity*. Cardiovasc Res, 2014. **103**(1): p. 121-130.
221. Xu, D., et al., *Astrocytes regulate the expression of Sp1R3 on oligodendrocyte progenitor cells through Cx47 and promote their proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **490**(3): p. 670-675.
222. Wang, H., Huang, H., and Ding, S.F., *Sphingosine-1-phosphate promotes the proliferation and attenuates apoptosis of Endothelial progenitor cells via S1PR1/S1PR3/PI3K/Akt pathway*. Cell Biol Int, 2018. **42**(11): p. 1492-1502.
223. Kong, Y., et al., *Sphingosine-1-phosphate/S1P receptors signaling modulates cell migration in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**.
224. Golan, K., et al., *S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release*. Blood, 2012. **119**(11): p. 2478-2488.
225. Quint, P., et al., *Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors 1 and 2 coordinately induce mesenchymal cell migration through S1P activation of complementary kinase pathways*. J Biol Chem, 2013. **288**(8): p. 5398-5406.
226. Chen, R., et al., *Sphingosine 1-phosphate promotes mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection against myocardial infarction via ERK1/2-MMP-9 and Akt signaling axis*. Life Sci, 2018. **215**: p. 31-42.
227. Kong, Y., et al., *FTY720, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, improves liver fibrosis in a mouse model by impairing the motility of bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Inflammation, 2014. **37**(4): p. 1326-1336.
228. Ogle, M.E., et al., *Sphingosine-1-Phosphate Receptor-3 Supports Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Residence Within the Bone Marrow Niche*. Stem Cells, 2017. **35**(4): p. 1040-1052.
229. Kõressaar, T., et al., *Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software*. Bioinformatics, 2018. **34**(11): p. 1937-1938.
230. Higgins, G., *Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal*. Am Med Assoc Arch Pathol, 1931. **12**: p. 186-202.
231. Tatematsu, M., et al., *Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy*. Am J Pathol, 1984. **114**(3): p. 418-430.
232. Hendriks, H.F., et al., *Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver*. Exp Cell Res, 1985. **160**(1): p. 138-149.
233. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-254.

234. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
235. Kordes, C., et al., *Differential and synergistic effects of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta1 on activated pancreatic stellate cells*. *Pancreas*, 2005. **31**(2): p. 156-167.
236. Roelen, B.A. and Dijke, P., *Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members*. *J Orthop Sci*, 2003. **8**(5): p. 740-748.
237. Rohn, F., et al., *Laminin-521 promotes quiescence in isolated stellate cells from rat liver*. *Biomaterials*, 2018. **180**: p. 36-51.
238. Kisseleva, T., et al., *Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(24): p. 9448-9453.
239. Rosenthal, S.B., et al., *Heterogeneity of hepatic stellate cells in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)*. *Hepatology*, 2021.
240. Reichert, D., et al., *Improved recovery from liver fibrosis by Crenolanib*. *Cells*, 2021. **10**(4): p. 804-825.
241. Pinzani, M., *PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells*. *Front Biosci*, 2002. **7**: p. 1720-1726.
242. Lu, W., et al., *Improved Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Into Vascular Endothelial Cells With Sphingosine 1-Phosphate*. *Transplant Proc*, 2015. **47**(6): p. 2035-2040.
243. Zhao, Z., et al., *Sphingosine-1-phosphate promotes the differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into cardiomyocytes under the designated culturing conditions*. *J Biomed Sci*, 2011. **18**: p. 37.
244. Grammatikos, G., et al., *Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16-ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(14): p. 18095-18105.
245. Ji, Y., et al., *Potential biomarkers Ang II/AT1R and S1P/S1PR1 predict the prognosis of hepatocellular carcinoma*. *Oncol Lett*, 2020. **20**(5).
246. Pinzani, M., et al., *Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(6): p. 1786-1793.
247. Pinzani, M., et al., *Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury*. *Hepatology*, 1994. **19**(3): p. 701-707.
248. Ross, R., *Platelet-derived growth factor*. *Annu Rev Med*, 1987. **38**(1): p. 71-79.
249. Ying, H.Z., et al., *PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics*. *Mol Med Report*, 2017. **16**(6): p. 7879-7889.
250. Pinzani, M., et al., *Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis*. *Am J Pathol*, 1996. **148**(3): p. 785-800.
251. Marra, F., et al., *Regulation of platelet-derived growth factor secretion and gene expression in human liver fat-storing cells*. *Gastroenterology*, 1994. **107**(4): p. 1110-1117.
252. Studer, E., et al., *Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes*. *Hepatology*, 2012. **55**(1): p. 267-276.
253. Sommerfeld, A., Reinehr, R., and Häussinger, D., *Bile Acid-induced Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Quiescent Rat Hepatic Stellate Cells Can Trigger Both Proliferation and Apoptosis*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(33): p. 22173-22183.
254. Dillmann, C., et al., *S1PR4 is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation*. *Biol Chem*, 2015. **396**(6-7): p. 775-782.
255. Tsuchiya, A., et al., *Clinical trials using mesenchymal stem cells in liver diseases and inflammatory bowel diseases*. *Inflamm Regen*, 2017. **37**(1): p. 1-15.

256. Reiter, F.P., et al., *Role of interleukin-1 and its antagonism of hepatic stellate cell proliferation and liver fibrosis in the Abcb4(-/-) mouse model*. World J Hepatol, 2016. **8**(8): p. 401-410.
257. Yaping, Z., et al., *Mechanism of interleukin-1 β -induced proliferation in rat hepatic stellate cells from different levels of signal transduction*. APMIS, 2014. **122**(5): p. 392-398.
258. Yan, C., Zhou, L., and Han, Y.-P., *Contribution of hepatic stellate cells and matrix metalloproteinase 9 in acute liver failure*. Liver Int, 2008. **28**(7): p. 959-971.
259. Gieling, R.G., Wallace, K., and Han, Y.-P., *Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(6): p. 1324-1331.
260. Kolb, M., et al., *Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1529-1536.
261. Vesey, D.A., et al., *Interleukin-1 β induces human proximal tubule cell injury, α -smooth muscle actin expression and fibronectin production*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 31-40.
262. Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M., *Interleukin-1 (IL-1) Pathway*. Sci Signal, 2010. **3**(105).
263. Yu, H., *Sphingosine-1-phosphate receptor 2 regulates proinflammatory cytokine production and osteoclastogenesis*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0156303.

6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2016 bis Mai 2022 im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 974 „Kommunikation und Systemrelevanz bei Leberschädigung und Regeneration“ in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie am Universitätsklinikum Düsseldorf erstellt.

Ich danke Herrn Professor Dr. Dieter Häussinger, der mir als Doktorvater die Möglichkeit gegeben hat unter ausgezeichneten Voraussetzungen meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Bedauerlicherweise konnte er aufgrund seiner Emeritierung die Arbeit nicht bis zum Ende begleiten.

Mein besonderer Dank gilt daher Herrn Professor Dr. Hans Bock für die bereitwillige Übernahme der Rolle des Doktorvaters und für weitere inhaltliche Anregungen.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Professor Picker für die bereitwillige Übernahme der Rolle des Zweitgutachters.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Claus Kordes für die intensive Betreuung und sein offenes Ohr für meine Fragen während der Durchführung und Auswertung der Experimente sowie der Niederschrift der Arbeit.

Ich danke Dr. Eva Schumacher, Dr. Friederike Rohn und Dr. Doreen Reichert für ihre Hilfe während meiner Einarbeitung, die angenehme Arbeitsatmosphäre und den regen Austausch innerhalb der Arbeitsgruppe

Ich bedanke mich auch bei Dr. Patrick Friedrich für die umfassende statistische Beratung.

Mein Dank gilt außerdem Claudia Rupprecht für die Zellisolation sowie die exzellente technische Assistenz.

Vielen Dank allen, die mich in dieser lehrreichen Zeit begleitet haben.