

Aus dem Institut für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mathias Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Untersuchung des Einflusses von Toll-like Rezeptor 5 auf humane hepatische und pankreatische Sternzellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Isabell Teresa Böhm
aus Steinfurt

Marburg, 2024

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 23.01.2024

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin.

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr PD Dr. med. Thaddäus Till Hippokrates Wissniowski

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. rer. nat. Stefan Bauer

Meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis	7
1.1. Abkürzungsverzeichnis	7
1.2. Abbildungsverzeichnis	12
1.3. Tabellenverzeichnis	14
2. Einleitung	15
2.1. Fibrose	15
2.2. Humane Sternzellen	17
2.2.1. Hepatische Sternzellen	18
2.2.2. Pankreatische Sternzellen	23
2.3. Toll-like Rezeptoren	27
2.3.1. TLR 5	29
3. Fragestellung und Zielsetzung	32
3.1. Fragestellung	32
3.2. Zielsetzung	32
4. Material	33
4.1. Chemikalien & Reagenzien	33
4.2. Verbrauchsmaterialien	35
4.3. Geräte	37
4.4. Software	40
4.5. Kits	41
4.6. Puffer & Lösungen	42
4.7. Medien	44
4.8. siRNAs	44
4.9. Primer	45
4.10. Antikörper	47
4.11. Zelllinien	50
5. Methodik	51
5.1. Zellbiologische Methoden	51
5.1.1. Zellkultur	51
5.1.1.1. Kultivierung von LX-2 und hPSC 2.2. Zellen	51
5.1.1.2. Subkultivierung	51
5.1.1.3. Bestimmung der Zellzahl	52
5.1.1.4. Kryokonservierung	52

5.1.2. Zellaktivierung	52
5.1.3. Transfektion	53
5.1.4. Zellaktivierung und Transfektion	55
5.1.5. IncuCyte® ZOOM Live-Cell Analysis System	55
5.2. Molekularbiologische Methoden	57
5.2.1. mRNA-Isolierung	57
5.2.2. Photometrische Messung der mRNA-Konzentration	57
5.2.3. Reverse Transkription (RT) / cDNA-Synthese	58
5.2.4. Quantitative RT-PCR	59
5.2.4.1. Prinzip der quantitativen qRT-PCR	59
5.2.4.2. Durchführung der qRT-PCR	59
5.2.5. Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway PCR Array	60
5.3. Biochemische Methoden	61
5.3.1. Proteinisolierung	61
5.3.1.1. Vorbereitung von Zellpellets	61
5.3.1.2. Herstellung von Zelllysaten	61
5.3.2. BCA Protein Assay	61
5.3.3. Western Blot	62
5.3.3.1. Prinzip der Western Blot Analyse	62
5.3.3.2. SDS-Gelelektrophorese	63
5.3.3.3. Immunoblot	65
5.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz	66
5.3.4.1. Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz	66
5.3.4.2. Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz	67
6. Ergebnisse	69
6.1 Zellaktivierung mit TGF-β1	69
6.1.1. Quantitative RT-PCR der Aktivitätsmarker COL1A1, ACTA2, VIM, SNAI1 und SNAI2	69
6.1.2. Bestimmung der Proteinexpression der Aktivitätsmarker COL1A1, ACTA2 und SNAI1 mittels Westernblot	71
6.1.3. Indirekte Immunfluoreszenz der Aktivitätsmarker COL1A1, VIM und SNAIL1	73
6.2. Toll-like Rezeptor Expression	79
6.2.1. Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway PCR Array	80
6.2.2. Quantitative RT-PCR des Zielgens TLR 5 nach TGF- β 1 Behandlung	80

6.2.3. Bestimmung der Proteinexpression des Zielproteins TLR 5 nach TGF- β 1 Behandlung mittels Westernblot	81
6.2.4. Indirekte Immunfluoreszenz des Zielproteins TLR 5	83
6.3. Transfektionsversuche	84
6.3.1. Technische Kontrolle der siRNA	85
6.3.2. Quantitative RT-PCR der Aktivitätsmarker COL1A1, ACTA2, VIM, SNAI1, SNAI2 und TLR5	86
6.3.2.1. TLR 5 Knockdown	86
6.3.2.1. TLR 5 Knockdown und TGF- β 1 Behandlung	88
6.3.3. Bestimmung der Proteinexpression der Aktivitätsmarker COL1A1, ACTA2, SNAI1 und TLR 5 mittels Westernblot	90
6.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz der Zielproteine COL1A1, VIM, SNAI1 und TLR 5	95
6.3.5. Echtzeit-Beobachtung des zellulären Verhaltens der Zelllinien LX-2 und hPSC 2.2.	112
7. Diskussion	116
7.1. TGF-β1 aktiviert hepatische und pankreatische Sternzellen	117
7.2. TLR Expression bei humanen LX-2 und hPSC 2.2. Zellen	117
7.3. TLR 5 Inhibierung führt zur Herunterregulation der Aktivitätsmarker	119
7.4. TLR 5 Inhibierung behindert die Aktivierungseffizienz von TGF-β1	120
7.5. Kritischer Blick auf die Ergebnisse	121
7.6. Klinische Relevanz/ Ausblick	122
8. Zusammenfassung	125
8.1. Deutsche Zusammenfassung	125
8.2. Englische Zusammenfassung	127
9. Literaturverzeichnis	129
10. Anhang	143
10.1. Lebenslauf	143
10.2. Verzeichnis akademischer Lehrer	144
11. Danksagung	145
12. Ehrenwörtliche Erklärung	146

1. Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

1.1. Abkürzungsverzeichnis

≥	Größer als oder gleich
%	Prozent
α	Alpha
α-SMA / <i>α-SMA</i>	Alpha Smooth Muscle Actin / <i>Alpha Smooth Muscle Actin Gen</i>
ab	Antibody
ACTA2 / <i>ACTA2</i>	Alpha-Actin 2 / <i>Alpha-Actin 2 Gen</i>
ACTB1 / <i>ACTB1</i>	Alpha-Actin 1 / <i>Alpha-Actin 1 Gen</i>
aFGF	Acidic Fibroblast Growth Factor
Aqua dest.	Aqua destillata
AP-1	Activating Protein-1
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
β-Actin	Beta-Aktin
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCR5	C-C Chemokine Receptor Type 5
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
cm ²	Quadratcentimeter
Ct	Cycle Threshold
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL1A1 / <i>COL1A1</i>	Kollagen 1 / <i>Kollagen 1 Gen</i>
Δ	Differenz (Delta)
DAMP	Damage-associated Molecular Pattern
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor

et al.	et alii
etc	et cetera
FBS	Fetales Bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
H ₂ O	Wasser
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hHSC	Human Hepatic Stellate Cells
HGF	Hepatocyte Growth Factor
hPSC	Human Pancreatic Stellate Cells
HSC	Hepatic Stellate Cells/ Hepatische Sternzellen
Hz	Hertz
IFN- β	Interferon β
IGF I	Insulin-like Growth Factor I
IGF II	Insulin-like Growth Factor II
IgG	Immunglobulin G
IKK α	Inhibitor Of Nuclear Factor kappa-B Kinase Subunit Alpha
IKK β	Inhibitor Of Nuclear Factor kappa-B Kinase Subunit Beta
IL-1	Interleukin 1
IP-10	Interferon-Gamma Induced Protein 10
IRAK-1	Interleukin-1 Receptor-associated Kinase 1
IRAK-4	Interleukin-1 Receptor-associated Kinase 4
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
l	Liter
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate
LRR	Leucin Rich Repeats
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichoic Acid

M	Molar (mol/l)
mAb	Monoclonal Antibody
MAB-Kinase	Mitogen-activated Protein-Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog
MIP-1	Macrophage Inflammatory Protein 1
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein 2
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mmol	Millimol
MMP-1	Matrix-Metalloprotease 1
Mo	Mouse
mol	Mol
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88 Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-light-chain Enhancer
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nl	Nanoliter
nM	Nanomolar (nmol/l)
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
p21	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1

PAF	Platelet Activating Factor
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pH	Wasserstoffionenexponenten
PPA	Propionic Acid
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSC	Pancreatic Stellate Cells / Pankreatische Sternzellen
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RANTES	Regulated And Normal T Cell Expressed and Secreted
Rb	Rabbit
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
ROS	Reactive Oxygen Species
RRN18S / <i>RRN18S</i>	18S Ribosomal Ribonucleic Acid / <i>18S Ribosomal Ribonucleic Acid Gen</i>
RT	Reverse Transkriptase
SCDF	Stromal Cell Derived Factor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunde(n)
siRNA	Small-interfering Ribonucleic-Acid
SNAIL1 / <i>SNAIL1</i>	Zinc Finger Protein SNAIL1 / <i>Zinc Finger Protein SNAIL1 Gen</i>
SNAIL2 / <i>SNAIL2</i>	Zinc Finger Protein SNAIL2 / <i>Zinc Finger Protein SNAIL2 Gen</i>
TAK 1	Transforming Growth Factor β -aktivated Kinase
TBK-1	TANK Binding Kinase 1
TBS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane Buffered Saline

TBS-T	Tris(hydroxymethyl)aminomethane Buffered Saline With Tween20®
TE-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan- Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
TIMP	Tissue Inhibitors Of Matrix Metalloproteinases
TIR	Toll-Interleukin Receptor
TIRAP	TIR Domain Adapter Protein
TGF- α	Transforming Growth Factor Alpha
TGF β	Transforming Growth Factor Beta
TGF β -1	Transforming Growth Factor Beta 1
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
TLR / <i>TLR</i>	Toll-like Rezeptor / <i>Toll-like Rezeptor Gen</i>
TLR 1-10 / <i>TLR 1-10</i>	Toll-like Rezeptor 1-10 / <i>Toll-like Rezeptor 1-10 Gen</i>
TRAF 6	TNF Rezeptor Associated Factor 6
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAM	Translocating chain-associated Membrane Protein
TRIF	TIR-Domain-containing Adapter-inducing Interferon- β
U	Unit
u.a.	unter anderem
usw	und so weiter
uvm	und viele mehr
V	Volt
VIM / <i>VIM</i>	Vimentin / <i>Vimentin Gen</i>
Wnt-2B	Wingless-type family, member 2B
x g	x-fache Erdbeschleunigung (gravitation)
z.B.	zum Beispiel

1.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Hepatische Sternzellen	19
2	Funktion, Merkmale, Phänotypen und Schicksal von hepatischen Sternzellen in gesundem und geschädigtem Lebergewebe	23
3	Funktion und Tumorinteraktion pankreatischer Sternzellen	26
4	Toll-like Rezeptor spezifische Signalwege	31
5	Pipettierschema - Westernblot	64
6	Indirekte Immunfluoreszenz - Chamber Slide Schema	68
7	qRT-PCR nach TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	70
8	qRT-PCR nach TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	71
9	Westernblot nach TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	72
10	Westernblot nach TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	73
11	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>COL1A1</i> nach TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	74
12	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>COL1A1</i> nach TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	75
13	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>VIM</i> nach TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	76
14	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>VIM</i> nach TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	77
15	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>SNAI1</i> nach TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	78
16	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>SNAI1</i> nach TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	79
17	Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway PCR Array für TLR 1-10	80
18	qRT-PCR von <i>TLR 5</i> nach TGF- β 1 Behandlung von LX-2 und hPSC 2.2. Zellen	81

19	Westernblots für <i>TLR 5</i> nach TGF- β 1 Behandlung von LX-2 und hPSC 2.2. Zellen	82
20	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>TLR 5</i> nach TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	83
21	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>TLR 5</i> nach TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	84
22	qRT-PCR zur technische Kontrolle der siRNAs	85-86
23	qRT-PCR nach Transfektion von LX-2 Zellen	87
24	qRT-PCR nach Transfektion von hPSC 2.2. Zellen	88
25	qRT-PCR nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	89
26	qRT-PCR nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	90
27	Westernblot nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	92
28	Westernblot nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	94
29	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>COL1A1</i> nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	96
30	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>COL1A1</i> nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	98
31	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>VIM</i> nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	100
32	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>VIM</i> nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	102
33	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>SNAI1</i> nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	104
34	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>SNAI1</i> nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	106
35	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>TLR 5</i> nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von LX-2 Zellen	108
36	Indirekte Immunfluoreszenz für <i>TLR 5</i> nach Transfektion und TGF- β 1 Behandlung von hPSC 2.2. Zellen	110

37	Echtzeit-Beobachtung von LX-2 Zellen mittels IncuCyte®	113
38	Echtzeit-Beobachtung von hPSC 2.2. Zellen mittels IncuCyte®	115

1.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Art	Seite
1	Liste verwendeter Chemikalien & Reagenzien	33-35
2	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	35-37
3	Liste der verwendeten Geräte	37-40
4	Liste der verwendeten Software	40-41
5	Liste der verwendeten Kits	41-42
6	Liste der verwendeten Puffer und Lösungen	42-43
7	Liste der verwendeten Medien	44
8	Liste der verwendeten siRNA	44-45
9	Liste der verwendeten Primer	45-47
10	Liste der verwendeten Antikörper - Westernblot	47-48
11	Liste der verwendeten Antikörper - Immunfluoreszenz	48-49
12	Zellaktivierung - Versuchsanordnung	53
13	Transfektion mit siRNA - Versuchsanordnung	54
14	Transfektion mit siRNA - Zelllinien und Reagenzien	54
15	Zellaktivierung und Transfektion mit siRNA - Versuchsanordnung	55
16	IncuCyte® - Plattenschema	56
17	Reverse Transkription - Reaktionskomponenten	58
18	Durchführung der qRT-PCR	59
19	Temperaturschemata der qRT-PCR	60
20	Reaktionskomponenten SDS-Gelelektrophorese	63
21	Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz	67

2. Einleitung

2.1. Fibrose

Fibrose, die übermäßige Zunahme von Bindegewebe im menschlichen Körper, ist vor allem ein Resultat anhaltender, inflammatorischer Reaktionen und tritt im Rahmen verschiedener Erkrankungen auf (Bataller und Brenner, 2005). Hauptauslöser dafür sind vor allem persistierende Infektionen, Autoimmunerkrankungen, allergische Reaktionen, epigenetische Faktoren, Gewebeverletzungen, Tumorerkrankungen, Hypoxie, sowie die Exposition gegenüber schädigenden Noxen, wie z.B. Alkohol oder Strahlung. Sie führen zu akuten und chronischen Entzündungsprozessen im Gewebe und initiieren so sekundär eine Fibrose (Zhao et al., 2016) (Wynn, 2008). Nur selten tritt eine Fibrose primär auf, wie die primäre Myelofibrose oder aber die primäre Retroperitonealfibrose, deren Ätiologien noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Vaglio und Maritati, 2016). Die Mediatoren der Fibrose sind fibrogene Zellen, die sich aus verschiedenen mesenchymalen, epithelialen und endothelialen Zellen differenzieren können. Ihre Aktivierung führt zu einer gesteigerten Produktion von Matrixproteinen im betroffenen Gewebe und damit zu einer Zunahme von Extrazellulärmatrix (Zhao et al., 2016). Inflammatorische Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Akute Phase Proteine, Caspasen, uvm. fungieren dabei als Fibroseregulatoren und -modulatoren. Es resultieren fibrotische Umbauprozesse mit Störung der Gewebe- bzw. Organarchitektur die Funktionseinschränkungen bis hin zum völligen Funktionsverlust zur Folge haben können. Besonders in Leber und Pankreas geht eine Vielzahl an akuten und chronischen Erkrankungen sekundär mit einer Gewebefibrose einher. Sie ist in beiden Organen durch eine komplexe Pathogenese gekennzeichnet und kann abhängig von Ätiologie und Ausmaß der Erkrankung in frühen Stadien noch reversibel sein (Friedmann, 2008). In der Leber führen vor allem anhaltende Gewebeschädigungen durch chronische Inflammation bzw. Exposition gegenüber Noxen zur Initiierung einer Leberfibrose und langfristig zur Zerstörung des gesunden Leberparenchyms. Hepatische Sternzellen (HSC) stellen dabei die Hauptakteure dar (Friedmann, 2008). Eine Exposition gegenüber oben genannter Faktoren kann ihre Aktivierung und damit Differenzierung zu aktiven Myofibroblasten anstoßen (Wilson et al., 2017). Als aktive Zellen sind sie nicht nur zur Kontraktilität, Proliferation, Chemotaxis, Phagozytose, Antigenpräsentation und Detektion pathogener Strukturen,

sondern auch ausgeprägten Produktion von Kollagenen fähig (Friedmann, 2008). Zusammen mit anderen Zellen wie Entzündungszellen, Fibroblasten, Fibrozyten und Myofibroblasten sorgen sie für die übermäßige Vermehrung der Extrazellulärmatrix und unterhalten Entzündungsreaktionen, die zu einer Zerstörung von Hepatozyten und Verlust der endothelialen Fenestrierung der Sinusoide mit Zunahme des hepatischen Gefäßwiderstandes führen können. Über diese Mechanismen gestalten hepatische Sternzellen Ausmaß und Prognose der Leberfibrose nachhaltig mit (Zambrinis et al, 2015) (Puche et al., 2013). Bei einer Expositionskarenz bzw. Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung kann sich die Leberfibrose in frühen Stadien noch reversibel zeigen und es kann zu einer Regeneration des geschädigten Lebergewebes mit Wiedererhalt der physiologischer Organfunktion kommen (Zhao et al., 2016). Unbehandelt mündet die Fibrose jedoch unweigerlich in einer Leberzirrhose, dem irreversiblen fibrotischen Parenchymbau der Leber, mit dramatischem Verlust der hepatischen Organarchitektur, Syntheseleistung und Stoffwechselfunktion (Wilson et al., 2017) (Caviglia et al., 2018). Der Mangel eines physiologischen hepatischen Gefäßsystems durch Fibrose bzw. Zirrhose führt u.a. zur Portalen Hypertension mit ausgeprägten Komplikationen in lebenswichtigen Organen, wie Ösophagus, Magen, Darm, Milz und Nieren. Durch ihren komplikationsträchtigen Verlauf und als maßgeblicher Risikofaktor für das Hepatozelluläre Karzinom gilt die Leberfibrose bzw. Leberzirrhose weltweit als eine der Haupttodesursachen (Suk und Kim, 2015). Auch im Rahmen von Erkrankungen des Pankreas kann es zu einer Sternzell-assoziierten sekundären Gewebefibrose kommen. Vergangene Studien zeigten, dass pankreatische Sternzellen ihren Verwandten, den hepatischen Sternzellen, sehr ähnlich sind und ihnen in einer Vielzahl an Funktionen und morphologischen Eigenschaften gleichen. Als fibrogene und immunkompetente Zellen sind sie in der Lage im Pankreas aktiv fibrotische und inflammatorische Reaktionen, sowie die Karzinogenese durch Interaktion mit Tumorzellen mitzugestalten und weiter zu fördern (Vonlaufen et al., 2008). Erkrankungen wie die chronische Pankreatitis, zystische Pankreasfibrose, Pankreaskarzinome und benigne Pankreastumore können ihre Aktivierung und somit sekundär eine Fibrose bzw. desmoplastische Gewebereaktion initiieren. Es resultieren u.a. exokrine und endokrine Funktionseinschränkungen, sowie Förderung des Tumorprogresses mit fatalen Folgen für den Organismus (Apte et al., 2004)

(Suetsugu et al., 2015). Hohe Komplikationsraten, Tumorinduktion sowie Einschränkungen in Synthese- und Stoffwechsellistung durch Fibrose-assoziierte Erkrankungen von Leber und Pankreas legen eine frühe Therapie bzw. Prävention einer irreversiblen Zerstörung der physiologischen Organarchitektur nahe. Das bessere Verständnis beteiligter zellulärer Akteure, Strukturen und Mechanismen in der komplexen Pathophysiologie der Fibrogenese soll dabei Hilfestellung geben um neue Therapieansätze und Maßnahmen zur Behandlung entwickeln zu können.

2.2. Humane Sternzellen

Hintergrund

Humane Sternzellen im Lebergewebe wurden erstmalig von Karl Wilhelm von Kupffer 1876 beschrieben. Mittels Goldchloridfärbung gelang von Kupffer die Darstellung von Retinoid-speichernden Zellen, die er anfänglich irrtümlicherweise für ortsständige Makrophagen der hepatischen Sinusoide hielt (Senoo, Mezaki und Fujiwara, 2017). In den folgenden 140 Jahren beschäftigten humane Sternzellen immer wieder die Forschung und es zeigte sich ihre bemerkenswerte Vielseitigkeit und unabdingbare Funktion für die Gewebeintegrität vor allem im hepatischen und pankreatischem Gewebe, sowie ihrer Schlüsselrolle bei der komplexen Fibrogenese im Rahmen von akuten und chronischen Entzündungen (Friedmann, 2008) (Geerts, 2001).

Herkunft

Das humane Sternzellensystem verteilt sich im menschlichen Körper in diversen Organen und findet sich unter anderem in Lunge, Nieren, Nebennieren, Leber, Pankreas, Milz, Ductus deferens und den Stimmbändern (Senoo, Mezaki und Fujiwara, 2017). Sie lassen sich bereits im dritten Schwangerschaftsmonat bei Embryonen nachweisen (Geerts, 2004). Eine Vielzahl an vergangenen Studien beschäftigte sich mit der Herkunft humaner Sternzellen und es fanden sich verschiedene Hinweise hinsichtlich des embryonalen Ursprungs. Da HSC Marker wie GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), Nestin, BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) oder NGF (Nerve Growth Factor) exprimieren, wurde initial von einem neuroektodermalen Ursprung ausgegangen (Geerts, 2001). In folgenden Studien zeigte sich vor allem durch die Expression von α -SMA (Alpha-Smooth Muscle Actin), Kollagen Typ 1, Fibronectin, die Typ III

Intermediärfilamente Desmin und Vimentin, sowie SNAIL1 (Zinc Finger Protein SNAI1) eine Entstehung aus multipotenten mesenchymalen Progenitorzellen mesodermaler Abstammung am wahrscheinlichsten (Fausther et al., 2013) (Zhao et al., 2016). Diese Herkunft wird auch für pankreatische Sternzellen (PSC) angenommen (Asahina et al., 2009). Die Vermutung eines medullären Ursprunges hingegen ließ sich in einer Studie aus dem Jahr 2010 stützen bei der PSC im Pankreas beobachtet werden konnten, deren Ursprung im Knochenmark lag (Sparmann et al., 2010). Gegenstand früherer Überlegungen war zudem die Entstehung aus gemeinsamen Vorläuferzellen aufgrund phänotypischen Ähnlichkeiten mit sinusoidalen Endothelzellen oder eine Differenzierung aus Monozyten unter dem Einfluss von MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) (Ankoma-Sey et al., 1998) (Ino et al., 2014).

2.2.1. Hepatische Sternzellen

Morphologie & Funktion

Hepatische Sternzellen machen ca. 15 % der nicht-parenchymalen Zellen der Leber aus. Als Hauptproduzenten des Matrixproteins Kollagen sorgen sie für ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von extrazellulärer Matrix (Friedmann, 2008). Sie präsentieren bei ihrem Verteilungsmuster eine perizentrale Dominanz und liegen als perisinusoidale Zellen unterhalb des fenestrierten Endothels im sogenannten Disse-Raum, der sich zwischen Sinusoiden und Hepatozyten befindet (Senoo, 2004). Ihre charakteristische Zellmorphologie und -funktion ist abhängig von ihrem Phänotyp. Man unterscheidet dabei zwischen einem sogenannten „quieszenten“, d.h. ruhenden, sowie einem aktivierten Zustand. In gesundem Lebergewebe zeigen ruhende Sternzellen ihre typische Form mit spindelartigen Zellkörpern und dendritischen Zellfortsätzen mit denen sie sich an die Sinusoide anlegen und mit benachbarten Zellen in Kontakt stehen. Über winzige Ausläufer an den Zellfortsätzen sind die Zellen auch in Ruhe in der Lage Signale aus der Umgebung zu empfangen und in das Zellinnere zu vermitteln bzw. über eine breites Spektrum an Mediatoren chemotaktisch, parakrin, juxtakrin oder autokrin zu wirken und damit die Integrität und Funktion umliegender Hepatozyten, Kupffer Zellen und sinusoidale Endothelzelle zu unterstützen (Friedman und Bansal, 2006). Sie sind für ihre Umgebung zudem eine wichtige Quelle von Adhäsionsmolekülen, Vasokonstriktoren und Wachstumsfaktoren,

wie z.B. TGF- α (Transforming Growth Factor α), TGF- β (Transforming Growth Factor β), HGF (Hepatocyte Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und IGF I und II (Insulin-like Growth Factor I und II), die neben Proliferation und Regeneration auch eine Fibrose des Lebergewebes stimulieren können (Friedman, 2008). Im Zellinneren beherbergen hepatische Sternzellen trotz ihres geringen Anteils am Lebergewebe etwa 80 - 90 % des im Körper gespeicherten Vitamin A. Dieses, aus dem Darm aufgenommen, wird als Retinol-Ester in unzähligen, winzigen Fetttropfchen perinukleär gespeichert (Senoo, Mezaki und Fujiwara, 2017). Inaktive Zellen zeigen ovale bis längliche Zellkerne, sowie einen wenig differenzierten Golgi-Apparat bzw. ein wenig differenziertes raues endoplasmatisches Retikulum (rER) (Friedmann, 2008).

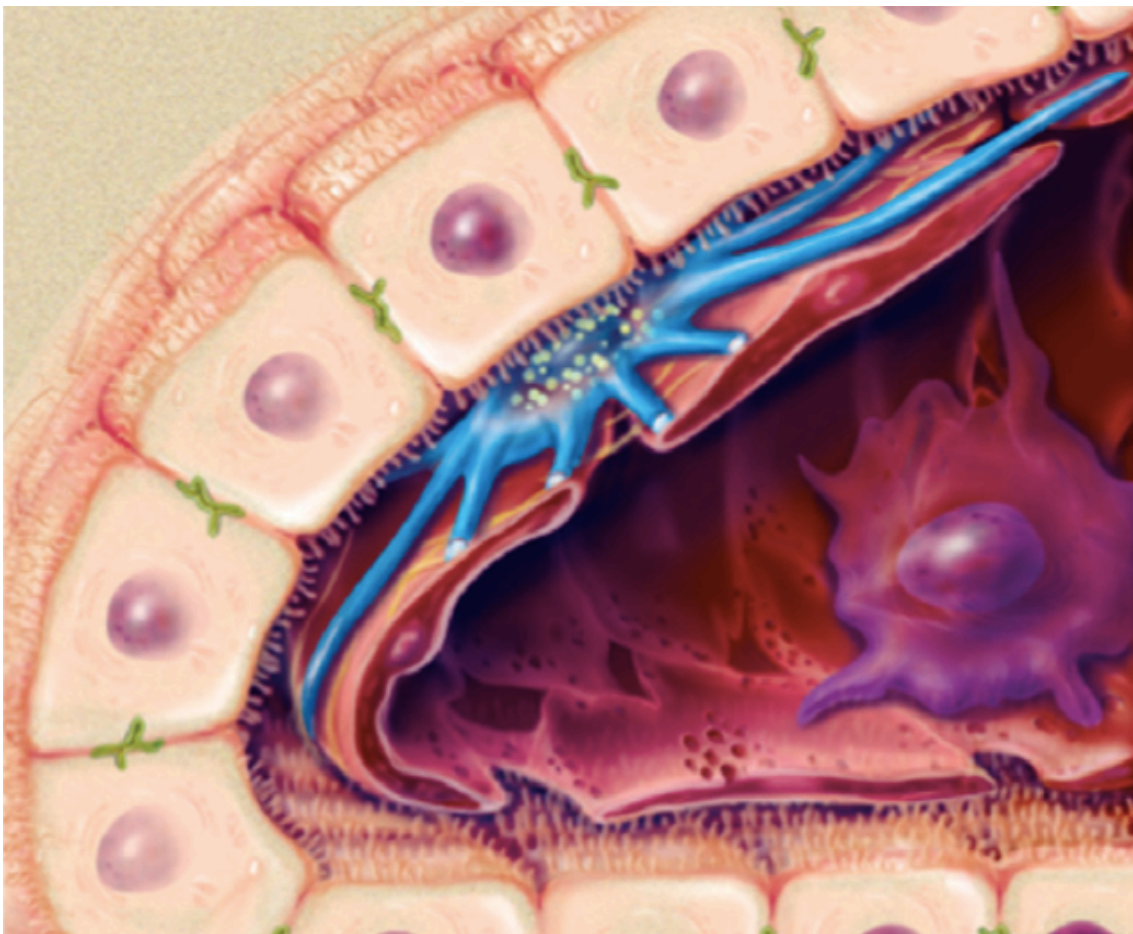


Abbildung 1: Hepatische Sternzellen: In gesundem Lebergewebe liegen hepatische Sternzellen, hier in blau dargestellt, zwischen Hepatozyten und fenestriertem Endothel der Sinusoide im sogenannten Disse-Raum. Neben ihrer Fähigkeit Vitamin A perinukleär als Retinoidtröpfchen zu speichern, unterstützen

sie die Integrität und Funktion umliegender Zellen (aus Puche, Saiman und Friedman, 2013).

Immunologische Kompetenz

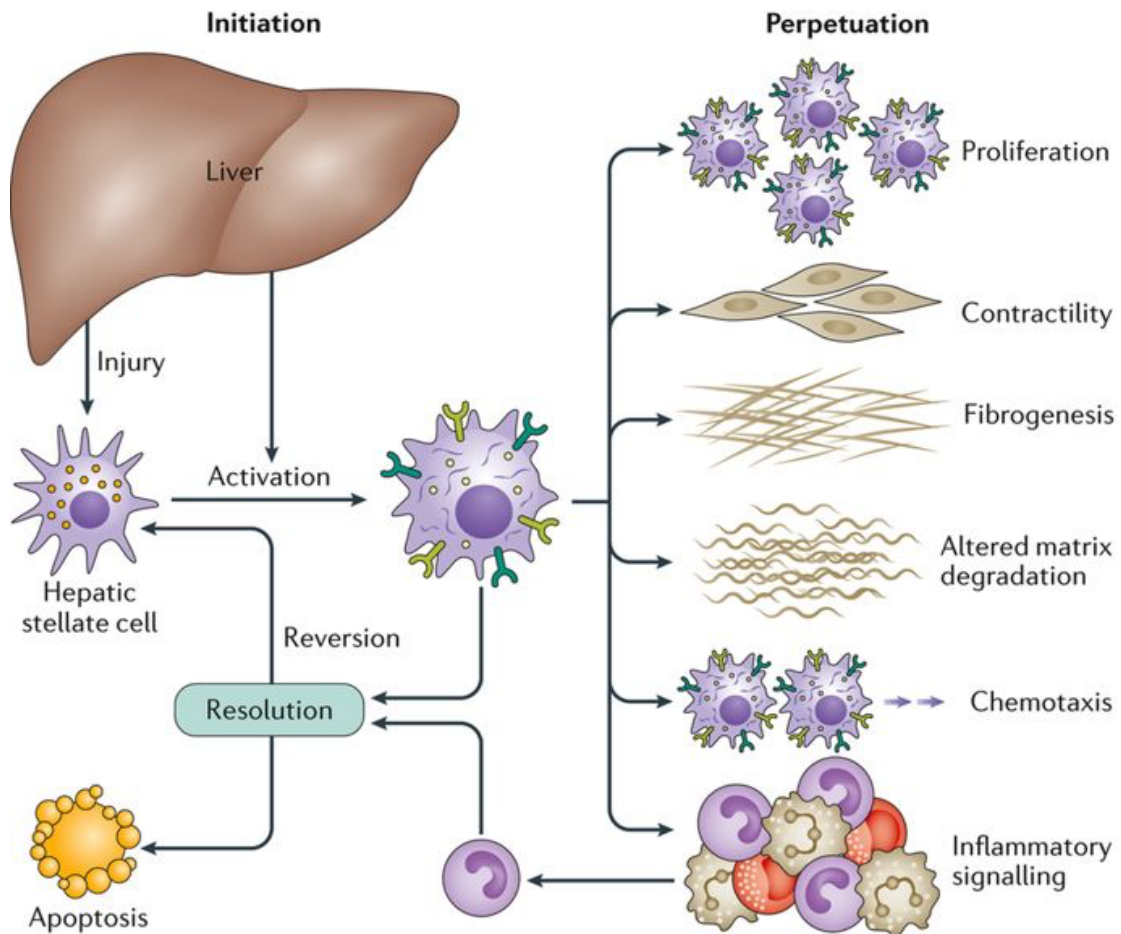
Neben der Aufrechterhaltung der hepatischen Gewebeintegrität spielen HSC eine wesentliche Rolle bei der hepatischen Immunoregulation und zeigen eine ausgeprägte immunologische Kompetenz (Maher, 2001). Dazu gehört u.a. die Expression von MHC- (Major Histocompatibility Complex-) Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche, mit denen sie zur Antigenpräsentation fähig sind und so die Proliferation von Entzündungszellen stimulieren können (Kobayashi et al., 2003). Mit Hilfe von Pattern Recognition Receptors (PPR) in Form von verschiedenen Toll-like Rezeptoren können sie zudem sogenannte PAMP (Pathogen-associated Molecular Pattern) und DAMP (Damage-associated Molecular Pattern) identifizieren. Hierbei handelt es sich um molekulare Strukturen von pathogenen Organismen bzw. geschädigten oder apoptotischen Zellen, die eine immunologische Antwort erzeugen können (Brun et al., 2005). Zu ihren weiteren immunologischen Fähigkeiten gehören u.a. Phagozytose, parenchymale Migration, Produktion von chemotaktischen Zytokinen und Rezeptoren wie PAF (Platelet Activating Factor), aFGF (Acidic Fibroblast Growth Factor), M-CSF (Macrophage Colony-stimulating Factor), MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1), RANTES (Regulated And Normal T cell Expressed And Secreted) oder CCR5 (CC-Chemokine Receptor Type 5) verschiedene Interleukine uvm. (Marra und Pinzani, 2002) (Schwabe et al., 2003) (Friedmann, 2008).

Aktivierung

Die Aktivierung hepatischer Sternzellen stellt einen komplexen pathophysiologischen Prozess dar, der auf diversen akuten und chronischen Lebererkrankungen, aber auch Exposition gegenüber schädlicher Noxen basieren kann und vor allem von einer progredienten Ablagerung von Extrazellulärmatrix charakterisiert ist. Die Aktivierung kann von extrazellulären und intrazellulären Mediatoren parakrin, juxtakrin oder autokrin stimuliert werden. Diese werden im Rahmen der akuten bzw. chronischen Inflammation vermehrt u.a. von Hepatozyten, biliäre Epithelzellen, sinusoidale Endothelzellen, Thrombozyten, Natürlichen Killerzellen, Lymphozyten,

Makrophagen, aber auch hepatischen Sternzellen selbst gebildet (Tsuchida und Friedmann, 2017) (Friedmann, 2008). Durch die Aktivierung kommt es zur Differenzierung von der ruhenden, Vitamin A-reichen Sternzelle zur aktiven Myofibroblasten-ähnlichen Zelle, die zur Proliferation, Chemotaxis, Fibrogenese und Kontraktilität fähig ist. Bei ihrer Aktivierung unterscheidet man drei Phasen: eine präinflammatorische Initiierungsphase, eine Aufrechterhaltungsphase und eine Auflösungsphase (Friedmann, 2008). Die initiale präinflammatorische Phase ist hauptsächlich von einer Änderungen der Genexpression und der Zellmorphologie gekennzeichnet. Der aktivierte Phänotyp erscheint rund mit einem intrazellulär vergrößerten rER, sowie einem ausdifferenzierten Golgi-Apparat für die Proteinsynthese. Die Initiationsphase resultiert vor allem parakrin durch Änderungen in der umliegenden extrazellulären Matrix, Kontakt zu oxidierten Lipiden, sowie PAMP und DAMP von z.B. apoptotischen Hepatozyten (Friedmann, 2008). Mediatoren sind hier u.a. Fibronectin aus dem sinusoidalem Epithel, Substanzen der TGF- β -Superfamilie, wie TGF- β 1, aber auch ROS (Reactive Oxygen Species) (Jarnagin et al., 1994) (Bilzer et al., 2006). In der folgenden Phase der Aufrechterhaltung kommt es zu diversen Veränderungen im zellulären Verhalten, die gemeinsam in einer Zunahme von Extrazellulärmatrix durch die Produktion von Kollagen und damit in einem Voranschreiten der Fibrogenese münden. Sie ist charakterisiert von Proliferation, Chemotaxis, Fibrogenese, Kontraktilität, Matrixveränderungen und Verlust der Retinoidspeicher (Friedmann, 2008). Dabei kommt es PDGF-vermittelt zu einer chemotaktischen Migration der HSC in geschädigtes Gewebe (Ikeda et al., 1999). PDGF stimuliert zudem die Zellproliferation und zelluläre Produktion von Kollagenen. Vor allem der Einfluss von TGF- β 1 führt zu einer gesteigerten Produktion von Kollagen I, II und III (Bataller und Brenner, 2005) (Friedmann, 2008) (Gressner et al., 2002). Ein weiterer profibrotischer Faktor ist die vermehrte Expression von α -SMA, welches zu einer Zunahme der zellulären Kontraktilität führt (Rockey et al., 1992). Hieraus resultiert eine Behinderung des Blutflusses innerhalb der Sinusoide und somit eine Zunahme des portalen Widerstandes (Friedmann, 2008). α -SMA gilt in diesem Zusammenhang als ein Differenzierungsmarker aktivierter Sternzellen. Ein beginnender Verlust der perinukleären Retionidspeicher ist bereits in der Initiierungsphase zu beobachten, erreicht jedoch erst in der Aufrechterhaltungsphase seinen Höhepunkt. Die zunehmende Zerstörung der extrazellulären Matrix ist ebenfalls

mit dieser Phase assoziiert, die vor allem durch ein HSC vermitteltes Ungleichgewicht aus Matrixaufbau und -abbau resultiert (Friedmann, 2008). In der Endphase bzw. Resolutionsphase entscheidet sich das Schicksal der hepatischen Sternzelle und die fibrotische Reversibilität, die nur über eine Reduktion aktivierter HSC möglich ist. Dabei kann es zur Apoptose, Seneszenz, oder Rückführung in den quieszenten Zellzustand kommen (Friedmann, 2008) (Krizhanovsky et al., 2008) (Mallat und Lotersztajn, 2013). Der apoptotische Abbau von HSC findet u.a. TRAIL- (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) vermittelt durch z.B. NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) statt und es kommt über Caspase-abhängige Signalwege zur Auflösung der Zelle (Radaeva et al., 2006). Zudem wirkt von Hepatozyten sekretiertes NGF (Nerval Growth Factor), sowie NF- κ B (Nuclear Factor Kappa-light-chain Enhancer) aktivierter B-Zellen apoptotisch auf HSC (Oakley et al., 2003) (Oakley et al., 2009). Eine Seneszenz von HSC ist von Zellarrest, vermehrter Zytokinexpression und reduzierter Expression von extrazellulären Matrixproteinen gekennzeichnet und kann z.B. durch Interleukin-22 induziert werden (Kong et al., 2012). Im Rahmen verschiedener Studien konnte eine Rückführung von aktivierten HSC in den quieszenten Zustand beobachtet werden, bei der es zur Herunterregulation der typischen Aktivitätsmarker kam (Troeger et al., 2012).



Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology

Abbildung 2: Funktion, Merkmale, Phänotypen und Schicksal von hepatischen Sternzellen in gesundem und geschädigtem Lebergewebe: In gesundem Lebergewebe liegen HSC im quieszenten Zustand vor. Durch eine Schädigung des hepatischen Gewebes wird eine Aktivierung initiiert und es kommt es zur Proliferation, Kontraktilität, Fibrogenese, zunehmendem Matrixzerfall, Chemotaxis und Förderung inflammatorischer Signale. In der schließlich Endphase kann es zur Apoptose, Seneszenz oder Rückführung in den quieszenten Phänotyp kommen (aus Tsuchida und Friedmann, 2017).

2.2.2. Pankreatische Sternzellen

Hintergrund und Funktion

Anfang der 1980er Jahre wurden erstmals auch in pankreatischem Gewebe Retinoid-speichernde Zellen beobachtet und erstmalig von Watari et al. als blau-grün autofluoreszierende Zellen im Pankreas von Mäusen beschrieben (Watari, Hotta und Mabuchi, 1982). Erst 1990 ließ sich diese Autofluoreszenz auch in gesundem Pankreasgewebe von Ratten und Menschen nachweisen

und 1998 gelang es pankreatische Sternzellen erstmals zu isolieren und zu kultivieren (Ikejiri, 1990) (Apte et al., 1998) (Bachem et al., 1998). Trotz ihres nur sehr geringen Anteils mit ca. 4 - 7% an allen parenchymalen Zellen sind sie dennoch essentiell für die Erhaltung einer funktionalen Gewebearchitektur und liegen in gesundem Pankreasgewebe ebenfalls in einem ruhendem Phänotyp vor (Bynigeri et al., 2017). Sie zeigen mehrheitlich ein periazinäres Verteilungsmuster im pankreatischen Gewebe und liegen ähnlich zu HSC mit ihren langen dendritischen Zellausläufern netzartig den Azinuszellen von basolateral auf und stehen über Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren im Kontakt zu ihrer Umgebung. Funktionell weisen sie sehr ähnliche Charakteristika der oben beschriebenen HSC auf und es konnte eine ähnliche Expression der Intermediärfilamente GFAP, Desmin, Nestin und Vimentin beobachtet werden (Omary et al., 2007). Durch die Expression der Matrixproteine Kollagen 1, Fibronectin, Periostin, aber auch MMP (Matrix-Metalloproteinase), TIMP (Tissue Inhibitors Of Matrix Metalloproteinases) gewährleisten sie einen ausgeglichenen Umsatz der Extrazellulärmatrix (Tian et al., 2016) (Phillips et al., 2003). Zudem agieren sie über die Sekretion von Acetylcholin, Beeinflussung der Insulinausschüttung und Induktion der Apoptose von β -Zellen als Regulatoren der exokrinen und endokrinen Pankreasfunktion (Phillips et al., 2010) (Kikuta et al., 2013).

Aktivierung

Die Aktivierung und Transdifferenzierung von PSC zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen zeigt ebenfalls große Ähnlichkeit zu den verwandten HSC und kann im Rahmen von entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen des Pankreas ebenfalls zur Gewebefibrose führen. Besonders im Rahmen der chronischen Pankreatitis und des duktales Pankreaskarzinoms kommt es zu einer progredienten Gewebefibrosierung bzw. desmoplastischen Gewebereaktion (Apte et al., 2004). Diverse Faktoren, wie z.B. oxidativer Stress, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Activin-A, Angiotensin, Hyperglykämien und parakrine Signale von Azinuszellen, Makrophagen, sowie von Tumorzellen, die im Rahmen der inflammatorischen Reaktionen im Pankreasgewebe entstehen, initiieren eine Aktivierung von PSC in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Die Aktivierung kann ebenfalls parakrin, aber auch autokrin durch z.B. die Metabolisierung von Ethanol zu toxischen Metaboliten

erfolgen, die zu oxidativem Stress führen und somit inflammatorische Reaktionen und Selbstaktivierung unterstützen (Wilson und Apte, 2003). Es folgen Zellproliferation, Migration und gesteigerte Produktion von Matrixproteinen wie Kollagen. Der Überschuss dieser Proteine und das Ungleichgewicht von Matrix-Metalloproteasen bzw. deren Inhibitoren im inflammatorischen Milieu begünstigen ebenso im Pankreas den Fibroseprogress und somit Verlust einer gesunden Gewebearchitektur (Bynigeri et al., 2017). Besonders das profibrotische Zytokin TGF- β 1 aus der TGF-Superfamilie gilt als essentieller Regulator in der Aktivierung von PSC und Stimulus für deren Produktion von Kollagenen und vermehrte Expression von MMP-1 (Matrix-Metalloproteinase 1). Als Aktivierungsmarker von PSC gilt u.a. ebenfalls α -SMA, das vom aktivierten Phänotyp vermehrt exprimiert wird. Die vermehrte Expression von α -SMA gibt hierbei nicht nur einen Hinweis auf die Differenzierung in den Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, sondern auch auf das Ausmaß der zellulären Aktivität (Krizhanovsky et al., 2008).

Immunkompetenz & Tumorinteraktion

PSC halten wie andere Sternzellen auch eine immunologische Kompetenz inne: In vergangenen Studien zeigte sich nicht nur ihre Fähigkeit zur Migration und Phagozytose von z.B. seneszenten Neutrophilen und nekrotischen Azinuszellen bei akuter Pankreatitis, sondern auch eine Expression von verschiedenen Toll-like Rezeptoren (TLR) (Shimizu et al., 2005) (Massamune et al., 2008) (Zambrinis et al., 2015). Neben der Erkennung von PAMP, sind PSC im Rahmen des duktales Pankreaskarzinoms u.a. durch verschiedene Wachstumsfaktoren zur dynamischen Interaktion mit Tumorzellen fähig (Tian et al., 2012) (Vonlaufen et al., 2008). Im frühem Tumorstadium kann diese Interaktion u.a. auch zur Inhibierung der Proliferation und Migration bzw. Apoptoseeinleitung von Tumorzellen führen und somit einen protektiven Effekt im pankreatischen Stroma darstellen (Pothula et al., 2016) (Apte, Pirola und Wilson, 2015). Diese Dynamik ändert sich im Verlauf jedoch zu Gunsten von Wachstum, Metastasierung und Chemoresistenz der Tumorzellen (Xu et al., 2010). In späteren Stadien zeigt sich neben einer epithelialen mesenchymalen Transition mit vermehrter Expression der mesenchymalen Marker Vimentin, SNAIL1 und SNAIL2, sowie einer Apoptoseinhibierung, auch eine zunehmende Sekretion von Galectin-3, Thrombospondin-2, SCDF (Stromal Cell Derived Factor) und

NGF, welche die Tumorinvasion und Metastasierung weiter begünstigen (Tian et al., 2012) (Tang et al., 2012), (Farrow, Berger und Rowley, 2009), (Gao et al., 2010) (Zhou, Zhou und Chen, 2012).

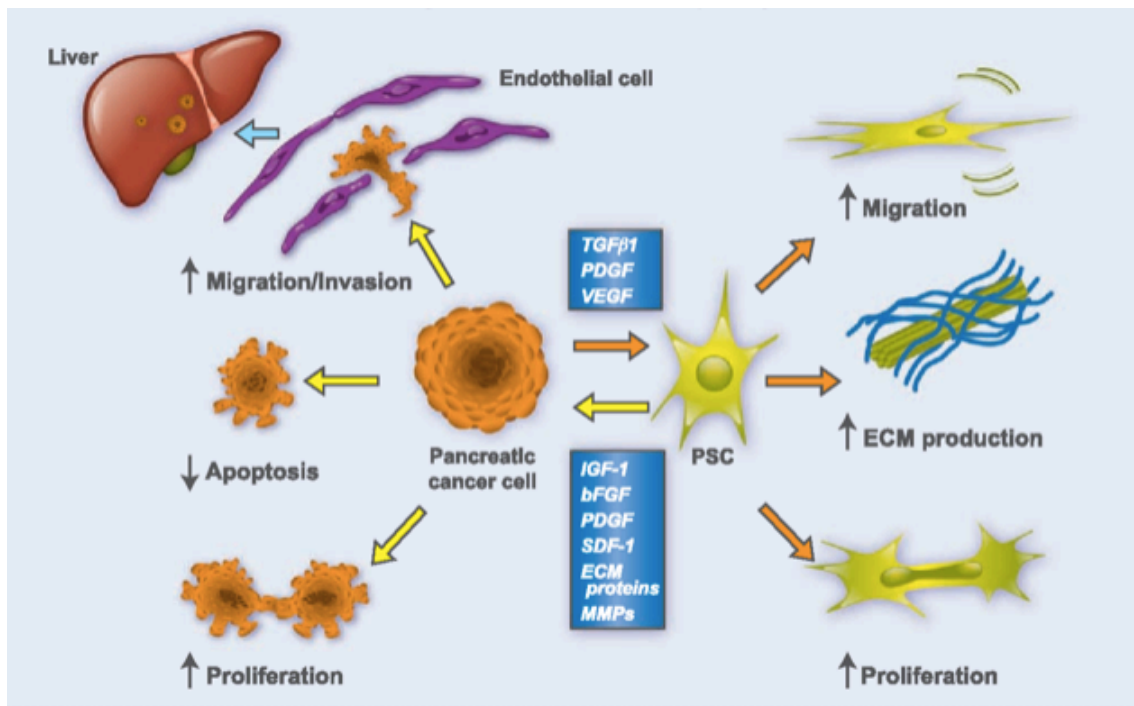


Abbildung 3: Funktion und Tumorinteraktion pankreatischer Sternzellen: PSC präsentieren nach Aktivierung eine vermehrte Zellmigration, Produktion von extrazellulären Matrixproteinen und Proliferation, die über Wachstumsfaktoren durch pankreatische Tumorzellen stimuliert werden kann. Die PSC Aktivierung fördert wechselseitig die Migration, Invasion, Proliferation und Apoptoseresistenz von Tumorzellen (aus Vonlaufen et al., 2008).

Schicksal

Das Schicksal aktivierter PSC nach Abklingen der inflammatorischen Reaktion konnte bisher nicht zufriedenstellend geklärt werden. In vergangenen Studien ergaben sich Hinweise auf eine Apoptose aktivierter Zellen, aber auch eine Rückkehr zum nativen, quieszenten Phänotyp nach Abheilung. Im entzündlichen Gewebe der akuten Pankreatitis konnte ein Untergang der PSC nach Phagozytose nekrotischer Azinuszellen beobachtet werden (Tahara, Shimizu und Shiratori, 2008). Die vermehrte Expression von Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase, sowie erhöhte Spiegel von p21 (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1), MDM2 (Mouse Double Minute 2 Homolog) und Interleukin 6 lassen vermuten, dass aktivierte PSC nach Abklingen der inflammatorischen

Reaktion in einen Zustand der Seneszenz verfallen und damit anfälliger für eine Zytolyse werden (Fitzner et al., 2012).

2.3. Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind transmembranäre Rezeptoren, die zu der Gruppe der PRR gehören und auf fast allen Zellen des Körpers zu finden sind. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind sie in der Lage molekulare Strukturen von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, sogenannte PAMP, zu erkennen. Zu diesen pathogenen Strukturen gehören u.a. bakterielle DNA, Membranbestandteile und Geißelproteine, wie Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäuren, Peptidoglykane, Lipoglykane, mycobakterielle Lipomannane und Flagelline, aber auch mykotische Membranproteine, wie Zymosan, virale RNA und DNA (Babu et al., 2006) (Wang et al., 2016). Außerdem können sie DAMP identifizieren und binden, die als Nebenprodukte von zellulärer Schädigung, Tumorzellen oder anderen abakteriellen, inflammatorischen Reaktionen auftreten können (Zambirinis et al., 2015).

Aufbau und Signalweg

Bisher konnten bei Säugetieren 13 TLR identifiziert werden; davon 10 auf menschlichen Zellen (Lacagnina et al., 2018) (Kawai und Akira, 2011). Als integrierte Membranglykoproteine Typ 1 weisen sie Ähnlichkeit zu Interleukin 1 Rezeptoren auf (Akira und Takeda, 2004). Sie bestehen aus einer Leucinreichen, extrazellulären Domänen, die über einen transmembranären Anteil mit der zytosolischen Toll-Interleukin-1-Rezeptordomäne (TIR) verbunden ist (Kiziltas, 2016). Die konkave Oberfläche der Leucin Rich Repeats (LRR) der extrazellulären Domäne sind für die Identifikation pathogener Strukturen verantwortlich. Die TIR-Domäne besteht aus einer α -Helix und einem β -Faltblatt, deren verschiedene Regionen entscheidend für die Signaltransduktion sind (Kaisho und Akira, 2006). Jeder TLR ist in der Lage sein spezifisches PAMP oder DAMP zu erkennen. Während sich TLR 1, TLR 2, TLR 4, TLR 5 und TLR 6 auf der Zelloberfläche befinden und vor allem bakterielle Membranproteine binden, findet man TLR 3, TLR 7, TLR 8 und TLR 9 hauptsächlich intrazellulär, wo sie z.B. pathogene Nukleinsäuren erkennen können (Yang und Seki, 2012) (Mohammad Hosseini et al., 2015). TLR 2 und TLR 4 sind im Speziellen in der Lage Antigene von Bakterien, Pilzen, Viren und

DAMP zu erkennen, während beispielsweise für TLR 10 bisher noch kein sicherer Ligand bzw. Lokalisation identifiziert werden konnte (Soares et al., 2010) (Takeda, Kaisho und Akira, 2003). Die Bindung eines Liganden an die LRR der TLR führt zur Dimerisierung des Rezeptors und Aktivierung der intrazellulären TIR-Domäne. Hierbei sind ein oder mehrere der Hauptadaptermoleküle MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88), TIRAP (TIR Domain Adapter Protein), TRIF (TIR-Domain-containing Adapter-inducing Interferon- β) oder TRAM (Translocating chain-associated Membrane Protein) beteiligt (O'Neill und Bowie, 2007). In der weiteren Signaltransduktion kommt es über die Bindung von weiteren Adaptermolekülen wie IRAK-1 (IL-1 Receptor Associated-kinase-1), IRAK-4 (IL-1 Receptor Associated-kinase-4), TRAF 6 (TNF Rezeptor Associated Factor 6), TBK-1 (TANK Binding Kinase 1), MAP-Kinase und IKK (I κ B Kinase) zu einer Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren (Lin et al., 2011). Es folgt eine gesteigerte Produktion inflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukine, TNF- α , Interferone bzw. eine Aktivierung der Immunzelle oder vermehrten Phagozytose (De Nardo, 2015). Das Ausmaß der immunologischen Antwort ist abhängig von der Art des TLR bzw. der Immunzelle und kann entsprechend variieren.

TLR und humane Sternzellen

TLR werden wie bereits erwähnt auch von HSC und PSC auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Bisher konnte gezeigt werden, dass hepatische Sternzellen TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 exprimieren (Higashi et al., 2017) (Paik et al., 2003) (Paik et al., 2006) (Seki et al., 2007) (Watanabe et al., 2007) (Raicevic et al., 2015). Vergangene Studien konnten zeigen, dass sie darüber hinaus auch in die Sternzell-assoziierten Fibroseentstehung in Leber und Pankreas involviert sind (Higashi et al., 2017) (Bynigeri et al., 2017). Da aktivierte HSC und PSC die Hauptproduzenten von Matrixproteinen wie Kollagen 1 sind und damit eine Schlüsselrolle bei der Fibroseinduktion in Leber und Pankreas einnehmen, stellen TLR ein wichtiges Bindeglied zwischen mikrobieller bzw. inflammatorischer Exposition und Fibrogenese dar. Durch ihre Bindung verschiedener PAMP und DAMP an der LRR der TLR kommt es zur Aktivierung des intrazellulären TLR-Signalweges und Hochregulierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Kiziltas, 2016). Es resultiert eine erhöhte Produktion von Entzündungsmediatoren, die zur autokrinen Aktivierung der

Sternzelle führen können bzw. über eine Verstärkung der TGF- β Signaltransduktion zu einer Sternzellaktivierung führen (Seki et al., 2007). Neben der Aktivierung beteiligen sie sich zudem an der Aufrechterhaltung eines profibrotischen, inflammatorischen Milieus. Es konnte gezeigt werden, dass u.a. TLR 4 bei HSC die Expression von diversen profibrotischen Chemokinen, wie z.B. MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein 1), MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein 2), RANTES und IP-10 (Interferon-Gamma Induced Protein 10) erhöht bzw. es u.a. über eine Ligandenbindung von TLR 3 zur Induktion der IFN- β (Interferon- β) Produktion in Makrophagen kommen kann. Eine Aktivierung Neutrophiler ist u.a. über die Induktion des TLR 9-abhängigen Signalweges in HSC möglich. Auch PSC exprimieren TLR 9 auf ihrer Zelloberfläche und sind in der Lage über die TLR 9 abhängige Aktivierung fördernden Einfluss auf die Tumorgenese in Rahmen des Pankreaskarzinoms zu nehmen, die mit einer desmoplastischen Gewebefibrosierung einher geht (Zambirinis, 2015).

2.3.1. TLR 5

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich TLR 5 untersucht. Dieser Rezeptor wird wie beschrieben von immunkompetenten Zellen im Körper exprimiert und ist als PRR u.a. verantwortlich für das Erkennen des bakteriellen Geißelproteins Flagellin auf der Zelloberfläche (Bynigeri et al., 2017). Dieses Filamentprotein ist essentiell für die Beweglichkeit begeißelter Bakterien und findet sich u.a. bei dem gramnegativen Stäbchenbakterium *Helicobacter pylori* (Bynigeri et al., 2017). Ist Flagellin als PAMP identifiziert und gebunden worden, kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors und Anlagerung des Adaptermoleküls MyD88 an die TIR-Domäne von TLR 5. Es folgt im Signalweg eine Bindung und Autophosphorylierung von IRAK 1 am Rezeptorkomplex. Über die Anlagerung von TRAF 6 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6) und einer weiteren Phosphorylierung von TAK 1 (Transforming Growth Factor β -activated Kinase) kommt es schließlich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Activating Protein-1). TAK1 kann neben AP-1 auch über IKK α (Inhibitor Of Nuclear Factor kappa-B Kinase Subunit Alpha) und IKK β (Inhibitor Of Nuclear Factor kappa-B Kinase Subunit Beta) zu einer Aktivierung von NF- κ B (Nuklear Factor kappa-B) führen. Das proinflammatorische Zytokin NF- κ B

transloziert nach Aktivierung in den Zellkern und reguliert von da aus die Expression von inflammatorischen Zytokinen (siehe Abbildung) (Kiziltas, 2016). Die Art des Zytokins ist bei der Interaktion von TLR 5 und bakteriellem Flagellin allerdings abhängig vom jeweiligen Zelltyp. So kommt es zum Beispiel bei epithelialen Zellen zur Induktion von Interleukin 8, während in Monozyten und dendritischen Zellen eine vermehrte Sekretion von TNF (Tumor Necrosis Factor) induziert wird (Kiziltas, 2016). Bei Sternzellen kommt es zur vermehrten Zytokinproduktion über eine Verstärkung der TGF- β 1 Signaltransduktion (Seki et al., 2007). TLR, wie TLR 5, stellen durch ihre Empfänglichkeit für mikrobielle Stimuli und ihre resultierenden intrazellulären Signalwege bei Sternzellen ein interessantes Bindeglied zwischen Sternzell-assoziiierter Fibrogenese bzw. Tumorgenese und mikrobieller Besiedlung des Gastrointestinaltraktes dar. In der folgenden Abbildung sind die TLR spezifischen Signalwege vereinfacht dargestellt.

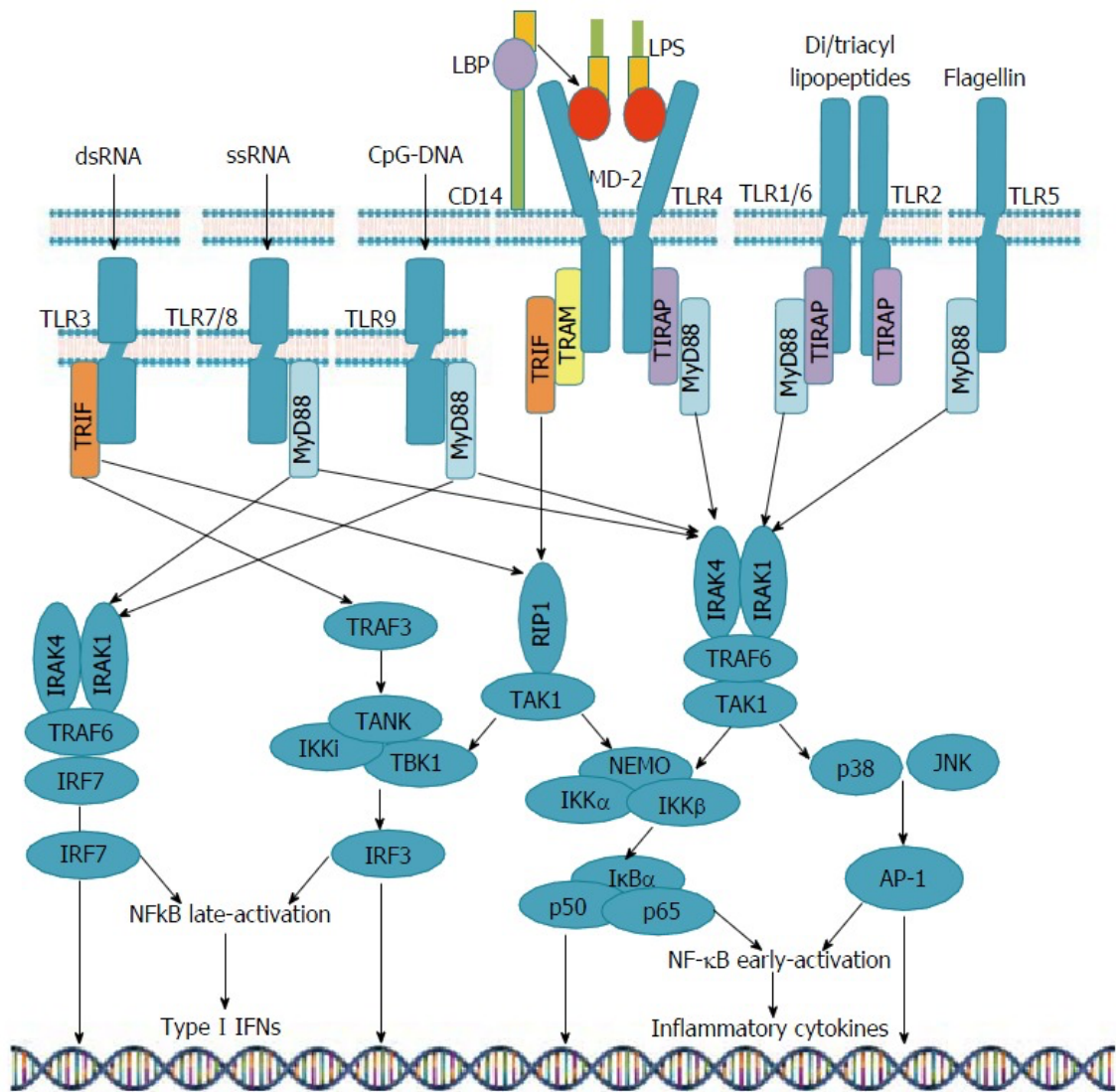


Abbildung 4: Toll-like Rezeptor spezifische Signalwege: Vereinfachte Darstellung des TLR spezifischen Signalweges. Die Bindung eines spezifischen Liganden führt zu Dimerisierung des Rezeptors und Aktivierung der intrazellulären TIR-Domäne. Die Anlagerung verschiedene Adaptermoleküle führt im weiteren Signalweg zur Aktivierung nukleären Transkriptionsfaktoren, die eine gesteigerte Produktion inflammatorischer Zytokine initiieren (aus Kiziltas, 2016).

3. Fragestellung und Zielsetzung

3.1. Fragestellung

1. Expressieren hepatische und pankreatische Sternzellen TLR 5?
2. Hat TLR 5 einen Einfluss auf die TGF- β 1 vermittelte Aktivierung humaner Sternzellen?
3. Hat ein Ausschalten von *TLR 5* einen Einfluss bei der Aktivierung von Sternzellen?
4. Welche Aktivierungsmarker werden moduliert?

3.2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer TGF- β 1 vermittelten Aktivierung hepatischer und pankreatischer Sternzellen, sowie der Beweis der zellulären Expression von TLR 5 und schliesslich eine Inhibierung der *TLR 5* Expression mittels Transfektion der Sternzelllinien. Anhand dieser Methoden sollte geklärt werden, welchen Einfluss *TLR 5* auf die Aktivierung humaner Sternzellen hat und inwiefern sich ein Ausschalten von *TLR 5* auf das zelluläre Verhalten auswirkt. Die mögliche Modulation von Aktivitätsfaktoren sollte anhand von verschiedenen Aktivitäts- und Transdifferenzierungsmarkern näher betrachtet werden.

4. Material

4.1. Chemikalien & Reagenzien

Tabelle 1: Liste verwendeter Chemikalien & Reagenzien

Chemikalie/ Reagenzien	Hersteller	Ort
2-Mercaptoethanol 98+%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.		
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
CryoSure DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH	Steinbach, Deutschland
Complete Mini	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X)	Gibco® by Life Technologies	Paisley, United Kingdom
Dulbecco's PBS (1X)	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
FBS - Fetal Bovine Serum	Gibco® by Life Technologies	Paisley, United Kingdom
Flow Cytometry Fixation Buffer (1X)	RD Systems	Minneapolis, USA
Flow Cytometry Permeabilization/ Wash Buffer 1 (1X)	RD Systems	Minneapolis, USA
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Formaldehyde, wt37% sol. in water, stab. 5-10% methanol	ACROS ORGANICS	New Jersey, USA

Glycerol 99+%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
HCl		
HEPES Pufferan® > 99,5% p.a.	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
HiPerFect® Transfection Reagent 4 x 1 ml	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate - 10 mg/mL Solution in Water	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
MagicMark XP Western Standard Methanol	Invitrogen AG Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Carlsbad, USA Steinheim, Deutschland
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
NuPAGE® LDS 4X LDS Sample Buffer	Invitrogen, AG	Carlsbad, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
Penicillin / Streptomycin (100X)	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
ProSieve Quad Color Protein Marker		
Red Alert (10X) Western Blot Stain	Novagen EMD Millipore Corp.	Billerica, USA
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

rhTGF-β1/ Transforming Growth Factor Beta 1 - recombinant human (CHO cell-derived) 20µg/ml, Cat No. 240-B	RD Systems	Minneapolis, USA
SDS ultra pure > 99 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
SsoAdvanced Universal Supermix SYBER Green	Biorad Laboratories	Hercules, USA
SsoFast EvaGreen Supermix	Biorad Laboratories	Hercules, USA
TBS 1x, pH 7,6	Th.Geyer & Co. KG	Renningen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloride	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100 pure	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Trypsin EDTA (1X) 0,5%/0,2%	Biochrome GmbH	Berlin, Deutschland
Tween 20®	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland

4.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
15 ml- und 50 ml- Röhrchen	Greiner Bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
96 Well PCR Plate, Non-Skirted, Low-Profile	STARLAB International GmbH	Hamburg, Deutschland
Abdeckglas		
BD Microlance 3, 19 G x 1 1/2", 1,1 mm x 40 mm	Becton, Dickinson & Company	Franklin Lakes, USA
CryoPure Gefäß 1,8 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

Deckel für Mikrottestplatte	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Extra thick blot paper/ filter paper	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Feather Disposable Scalpel	Feather	Osaka, Japan
Kapillarspitzen 200 µl	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland
Microflex Xceed Powder-free Nitrile Examination Gloves	Microflex	Den Haag, Niederlande
Mikrottestplatte 96 Well, F	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Nitrocellulose Blotting Membrane	Amersham GE Health Life Science	Amersham, England
Nunc Chamber Slide System 177399 - 4 Well Glas Slide	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm X 12 well	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
Parafilm Laboratory Film	American National Can	Oshkosh, USA
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pipettenspitzen: Biosphere Filter Tipps 0,1–10 µl, 10–100 µl, 100– 1000 µl	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Kimtech Science Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional	Roswell, Kanada
SafeSeal Micro Tube 1,5, 2 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Serological Pipette 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
StarSeal Advanced Polyolefin Film, 100	STARLAB International GmbH	Hamburg, Deutschland
Single Well Blot Spacers	Millipore Corporation	Billerica, USA

TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche TC Standard T 25 T 75 T 175	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

4.3. Geräte

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Absaugpumpe Vario Air	Dräger	Lübeck, Deutschland
Absaugpumpe VHC pro	Vaccubrand	Wertheim, Deutschland
Attune Acoustic Focusing Cytometer	Invitrogen AG	Carlsbad, USA
Beckman GS-15R Centrifuge	Beckman Coulter	Brea, USA
Biofuge Pico	Heraeus	Hanau, Deutschland
Biopak® Ultrafilter	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
C1000 Thermal Cycler Model No.: CFX96™ Optics Module	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Centrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5430R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Combi Spin FVL - 2400N (Vortexer)	Biosan Ltd.	Riga, Lettland
Eismaschine	Manitowoc GmbH	Herborn, Deutschland
Eisschrank - 80°C: CVK-UB2	Sanyo	Osaka, Japan
Eisschrank - 20°C: Liebherr Comfort	Liebherr	Bulle, Schweiz
Elix® Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland

Eppendorf Reference/ Eppendorf Research Pipette 100-1000 µl 20-200 µl 10-100 µl 2-20 µl 0,5-10 µl 0,1-2,5 µl 0,2-2 µl Erlenmeyer Kolben 100 ml, 50 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Flex Cycler Block: Block assembly T48	Analytikjena	Jena, Deutschland
Fusion Chemilumineszenz Kamera C10-079	Vilber Lourmat	Eberhardzell, Deutschland
IncuCyte® ZOOM Live-Cell Analysis System	Essen BioScience, Inc.	Ann Arbor, USA
Integra Pipetboy	Integra Bioscience AG	Zizers, Schweiz
Laborfuge 400R Function Line	Heraeus	Hanau, Deutschland
LEICA CTR 5500	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
LEICA DFC 365FX CCD- Mikroskopkamera	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
LEICA DM 5500 Weitfeldmikroskop	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Messzylinder 1000 ml, 500 ml, 100 ml	ISOLAB GmbH	Wertheim, Deutschland

Mikroskop DM-IL LED	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Nikon TMS	Nikon Metrology NV	Tokio, Japan
Mikroskop Nikon TMS-F	Nikon Metrology NV	Tokio, Japan
Millipak® Express 40 Filter, 22 µm	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Milli-Q® Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Emax Precision Microplate Reader S/N E10643	Molecular Devices	Sunnyvale, USA
Nanodrop Lite Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter Accumet Basic	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pipetierhilfe Accu-Jet Pro	Brand GmbH	Wertheim, Deutschland
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte	Eierstadt, Deutschland
Power Pac 200	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Power Pac 3000	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Rolltaumelbrett CAT R5	Zittere GmbH	Staufen, Deutschland
Schüttler-/ Rüttlerplatte		
Secuflow Laborabzug	Waldner Laboreinrichtung GmbH & Co. KG	Wangen, Deutschland
SNAP i.d. Protein Detection System	Millipore Corporation	Billerica, USA
SNAP i.d. Blot Holders	Millipore Corporation	Billerica, USA

Sterilwerkbank Herasafe (HS) 12	Heraeus	Hanau, Deutschland
Sterilwerkbank Telstar BIO-II-A	Telstar	Frankfurt, Deutschland
Thermocell Cooling & Heating Block CHB-202	Bioer	Hangzhou, China
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Waage Kern ABS 80-4N	Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Waage Kern PLS 4200-2F	Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Wärmeschrank Heracell	Hereaus	Hanau, Deutschland
Wasserbad Julabo TW20	Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach, Deutschland
XCell SureLock Elektrophoresekammer	Invitrogen AG	Carlsbad, USA

4.4. Software

Tabelle 4: Liste der verwendeten Software

Software	Hersteller	Ort
Bio-1D	Vilber Lourmat	Eberhardzell, Deutschland
Bio-Rad CFX-Manager 2.0	Biorad Laboratories	Hercules, USA
Fusion Image Capture 15.15 für Windows	Vilber Lourmat	Eberhardzell, Deutschland
ImageJ 1.51m9	Wayne Rasband National Institute of Health	Kensington, USA
Leica Application Suite AF	Leica	Wetzlar, Deutschland

REST 2009 Relative Expression Software Tool V2.0.13	Qiagen	Hilden, Deutschland
SOFTmax Pro	Molecular Devices	San Jose, USA

4.5. Kits

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits

Kit	Inhalt	Hersteller/Ort
GoTaq qPCR Master Mix	GoTaq qPCR Master Mix Nuclease-free H ₂ O	Promega, Madison, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	iScript Reaction Mix iScript Reverse Transcriptase Nuclease-free Water	Biorad Laboratories, Hercules, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	BCA Reagent A BCA Reagent B Albumin Standard Ampules	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pre-Diluted Protein Assay Standards; Bovine Serum Albumin (BSA) Set	BSA Component 1 of 7 - 125 $\mu\text{g/ml}$ BSA Component 2 of 7 - 250 $\mu\text{g/ml}$ BSA Component 3 of 7 - 500 $\mu\text{g/ml}$ BSA Component 4 of 7 - 750 $\mu\text{g/ml}$ BSA Component 5 of 7 - 1000 $\mu\text{g/ml}$ BSA Component 6 of 7 - 1500 $\mu\text{g/ml}$ BSA Component 7 of 7 - 2000 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy Plus Mini Kit	RLT Plus Buffer RW1 Buffer RPE Buffer Nuclease-free H ₂ O gDNA Eliminator Spin Column RNeasy Mini Spin Column Collection Tubes	Qiagen, Hilden, Deutschland

RT² Profiler™ PCR Array
Human Toll-Like Receptor
Signaling Pathway

RT² SYBR Green qPCR
Mastermix
96-well Plate Containing Dried
Assays
Optical Adhesive Film

Qiagen, Hilden,
Deutschland

SuperSignal West Pico
Chemiluminescent Substrate

Luminol/ Enhancer Solution
Stable Peroxide Buffer

Thermo Fisher
Scientific, Waltham,
USA

4.6. Puffer & Lösungen

Tabelle 6: Liste der verwendeten Puffer & Lösungen

Puffer & Lösungen	Zusammensetzung
0,1% TBS-Tween 20®	1000 ml Aqua dest. 1 ml Tween 20® 2 Tabletten TBS 1x, pH 7,6
0,1 % Triton X-100 / PBS	100 ml Triton X-100 pure 0,1 ml PBS
1 % BSA / TBS	1g Albumin Fraktion V, biotinfrei 100 ml 0,1 % TBS
4% BSA / TBS-Tween 20®	4g Albumin Fraktion V, biotinfrei 100 ml 0,1 % TBS-Tween 20®
Aceton / Methanol Fixierungslösung	5 ml Aceton 10 ml Methanol
Blue Sample Buffer	125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2,5 % SDS ultra pure > 99 % 0,04 % Bromphenol Blau 25 % Glycerol 99+ % 713 mM 2-Mercaptoethanol 98+ %

Hepes Puffer pH 7,6	<p>10 mM HEPES Pufferan® > 99,5% p.a.</p> <p>10ml Aqua dest.</p> <p>1 Tablette Protease Inhibitor <i>Complete</i></p> <p>1 Tablette <i>Mini</i> Phosphatase Inhibitor <i>PhosphoSTOP</i></p>
Hot Lysis Buffer	<p>10 mM Tris-HCl (pH 8,0)</p> <p>1% (500mg/ 50ml) SDS ultra pure > 99 %</p> <p>1 mM NaOH</p> <p>50 ml Aqua dest.</p>
MOPS Puffer	<p>475 ml Aqua dest.</p> <p>25 ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)</p>
Red Alert Staining Solution	<p>9 ml Aqua dest.</p> <p>1 ml Red Alert (10X) Western Blot Stain</p>
TE-Puffer pH 8,0	<p>10 mM Tris(hydroxymethyl)aminome thanhydrochloride</p> <p>1mM EDTA</p>
Transfer Puffer	<p>5 ml NuPAGE® <i>Transfer Buffer</i></p> <p>10 ml (20X) Methanol</p> <p>85 ml Aqua dest.</p>

4.7. Medien

Tabelle 7: Liste der verwendeten Medien

Art des Mediums	Zusammensetzung
Wachstumsmedium für LX - 2	500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 10 ml Fetal Bovine Serum 5 ml 10000 U/ml Penicillin/ 10 mg/ml Streptomycin
Wachstumsmedium für HPSC	500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 50 ml Fetal Bovine Serum 5 ml 10000 U/ml Penicillin/ 10 mg/ml Streptomycin
Einfriermedium für HPSC	45 ml Fetal Bovine Serum 5 ml CryoSure DMSO
Einfriermedium für LX-2	35 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 10 ml Fetal Bovine Serum 5ml CryoSure DMSO

4.8. siRNAs

Tabelle 8: Liste der verwendeten SIRNA

Produkt	Zielsequenz	Katalognr.	Spezie	Hersteller/ Ort
Hs_TLR5_5	AATAGCTTGTATAGCAG AGTC	SI02655163	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Hs_TLR5_6	AAAGATCAACCTTACAG CGAA	SI03026534	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_TLR5_8	GAGGGACTTTCTCATCT TCAA	SI02630810	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_TLR5_9	CAGGTGCTTATCTGACC TTAA	SI02630803	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
AllStar Negativ Control siRNA		SI03650318		Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

4.9. Primer

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer

Produktname	Katalog Nummer	Amplikon -größe	Identität	Hersteller/ Ort
Hs_ACTA2_1_SG QuantiTect Primer Assay alpha smooth muscle actin	NM_1613 (1415 bp) QT00088102	83 bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_ACTB1_1_SG QuantiTect Primer Assay Beta actin	QT00095431	146 bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Hs_COL1A1_1_SG QuantiTect Primer Assay Collagen alpha 1	QT00037793	118 bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_GAPDH_2_SG QuantiTect Primer Assay glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	QT01192646	119 bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_RRN18S_1_SG QuantiTect Primer Assay 18S ribosomal RNA	QT00199367	149 bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_VIM_1_SG QuantiTect Primer Assay <i>Vimentin</i>	QT00095795	94 bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_SNAI1_1_SG QuantiTect Primer Assay snail family zinc finger 1	QT00010010	131 bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_SNAI2_1_SG QuantiTect Primer Assay snail family zinc finger 2	QT00044128	119 bp	Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_TLR3_1_SG QuantiTect Primer Assay toll-like receptor 3	QT00007714		Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Hs_TLR5_2_SG QuantiTect Primer Assay toll-like receptor 5	QT01009596		Human	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
--	------------	--	-------	---

4.10. Antikörper

Tabelle 10: Liste der verwendeter Antikörper Westernblot

Ziel	Produktname Katalog Nummer	Spezies/ Isotyp/ Markierung	Verdünnung	Hersteller/Ort
Primärantikörper				
α -SMA	Rb mAb to aSMA (E184) # ab32575	Kaninchen IgG	1 : 1000	RabMab® technology, Abcam, Cambridge, UK
β -Actin	Monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse # A5441	Maus IgG	1 : 1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
E-Cadherin	Purified Mouse Anti-E- Cadherine # 610181	Maus IgG	1 : 1000	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Kollagen 1	Rb mAb to Collagen 1 (EPR7785) # ab138492	Kaninchen IgG	1 : 500	RabMab® technology, Abcam, Cambridge, UK

Snail	Snail (CD15D3) Rabbit mAb # 3879	Kaninchen IgG	1 : 1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Toll-like Rezeptor 5	Anti-TLR5 antibody (EPR10373) # ab168382	Kaninchen IgG	1 : 1000	RabMab® technology, Abcam, Cambridge, UK
Sekundärantikörper				
Anti-Maus	Anti-Mouse IgG (Fab specific)- Peroxidase # A9917-1ML	Ziege/ Peroxidase	1:10000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti-Kaninchen	Anti-Rabbit IgG (whole molecule)- Peroxidase # A0545-1ML	Ziege/ Peroxidase	1:10000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tabelle 11: Liste verwendeter Antikörper Immunfluoreszenz

Ziel	Produktname Katalog-Nr.:	Spezies/ Isotyp	Verdünnung	Hersteller/Ort
Primärantikörper Toll-like Rezeptor 5	Anti-TLR5 antibody (EPR10373) # ab168382	Kaninchen / IgG	1 : 100	RabMab® technology, Abcam, Cambridge, UK

Kollagen	Rb pAb to Collagen 1 #ab34710	Kaninchen / IgG	1 : 50	RabMab® technology, Abcam, Cambridge, UK
Snail	Snail (CD15D3) Rabbit mAb # 3879	Kaninchen / IgG		Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Vimentin	Vimentin (D21H3) XP® Rabbit mAb #5741	Kaninchen / IgG	1 : 200	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Sekundärantikörper Anti-Kaninchen	AlexaFluor® 568 Flab of goat anti-rabbit IgG 2mg/ml #A21069 Hoechst 3342 Solution (20 Mm)	Ziege/ IgG		Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

4.11. Zelllinien

Für Versuche in der Zellkultur wurden die Zelllinien LX-2 und hPSC 2.2. verwendet. Bei LX-2 handelt es sich um eine humane, hepatische Sternzelllinie, die sich zur Abbildung typischer Sternzellfunktionen etabliert hat. Sie sind eine freundliche Schenkung der AG Detlef Schuppan in Mainz, Deutschland und gehen ursprünglich auf LX-2 Zellen von Scott L. Friedman zurück.

Die humane pankreatische Ziellinie HPSC 2.2 sind eine freundliche Schenkung der AG Malte Bucholtz in Marburg und wurden ursprünglich von Professor Matthias Löhr (Karolinska Institut Stockholm, Schweden) als pankreatische Sternzelllinie etabliert.

5. Methodik

5.1. Zellbiologische Methoden

5.1.1. Zellkultur

5.1.1.1. Kultivierung von LX-2 und hPSC 2.2. Zellen

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zellmorphologie und -konfluenz wurden mittels Mikroskop kontrolliert; bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen passagiert und in neuen Kulturflaschen ausgesät. Der Mediumwechsel fand alle 48 - 72 Stunden statt; dabei wurde für hPSC 2.2. Zellen DMEM mit 10 % FBS und 1 % 10000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin verwendet. LX-2 Zellen wurden mit einem Wachstumsmedium aus DMEM, 2 % FBS und 1 % 10000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin kultiviert. Jede Art von Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt; eingebrachte bzw. nicht steril verpackte Geräte, Arbeitsmaterialien etc. wurden mit 70 % Ethanol desinfiziert oder gegebenenfalls vor Aufnahme der Zellkulturarbeit autoklaviert (121°C, 20 Minuten). Verwendete Medien, Chemikalien, usw. wurden vor Verwendung auf 37°C erwärmt und entsprechend der Herstellerangaben zwischen - 20°C und 4°C gelagert. Eine Kontamination mit Mykoplasmen wurde vor Einsatz der LX-2 und hPSC 2.2. Zellen mittels qRTR-PCR geprüft.

5.1.1.2. Subkultivierung

LX-2 und hPSC 2.2. Zellen wurden unter mikroskopischer Kontrolle bei erreichter Konfluenz mittels Trypsin/ EDTA abgelöst und in neue Kulturflaschen ausgesät. Dazu wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen zum Entfernen verbliebener Mediumreste mit PBS einmalig gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte anschließend mittels Trypsin/ EDTA. Nach 5 - 10-minütiger Inkubation bei 37 °C und sichtbarer Ablösung der Zellen wurden diese mit frischem Wachstumsmedium in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in neuem Wachstumsmedium resuspendiert und in eine entsprechende Kulturflasche ausgesät. LX-2 und hPSC 2.2. Zellen wurden bis zur 40. Passage verwendet.

5.1.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur genauen Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl von in PBS suspendierten Zellen in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und lichtmikroskopisch in allen vier Quadranten ausgezählt. Nach Berechnung des Mittelwertes aus allen Quadranten konnte so die Zellzahl pro ml bestimmt werden.

5.1.1.4. Kryokonservierung

Um Zellen einfrieren zu können, wurden nach Ablösung und Auszählung etwa $>1,5 \times 10^6$ Zellen in Suspension bereitgestellt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in ein auf Eis gelagertes Kryotube pipettiert und bei -80 °C eingefroren. hPSC 2.2. wurden dabei in einer Lösung aus 10 % DMSO und 90 % FBS eingefroren; für LX-2 Zellen wurde ein Einfriermedium aus 70 % DMEM, 20 % FBS und 10 % DMSO hergestellt. Zum Auftauen wurde der Ziellinie entsprechendes Wachstumsmedium in eine Kulturflasche gegeben und bei 37 °C , 5 % CO_2 -Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit erwärmt. Die gefrorenen Zellen wurden aufgetaut und umgehend in die vorbereitete Kulturflasche gegeben. Nach ca. 3 - 4 Stunden Inkubation im Wärmeschrank wurden die Zellen auf ihre Haftung am Flaschenboden mikroskopisch geprüft. Es folgte ein erneuter Mediumwechsel zur Entfernung des DMSO und abgestorbener Zellen.

5.1.2. Zellaktivierung

Zur Aktivierung der hepatischen und pankreatischen Sternzellen erfolgte eine Behandlung mit 2 ng/ml bzw. 2,5 ng/ml TGF- β 1 für 48 Stunden. Diese Behandlung wurde je nach weiterer Verwendung der Zellen in unterschiedlichen Versuchsanordnungen durchgeführt. Hierbei unterschied sich jeweils die Zusammensetzung und Volumen des jeweiligen Wachstumsmedium der beiden verwendeten Zelllinien; DMEM mit 2% FBS für LX-2 und DMEM mit 10 % FBS für hPSC 2.2. Des Weiteren wurden in den Versuchsanordnungen unterschiedliche Zellmengen und Kulturflaschen bzw. Well-Platten verwendet. Für Zellen, die für eine spätere qRT-PCR stimuliert werden sollten, wurden hier 6-Well-Platten verwendet mit einer Zellzahl von $\geq 1 \times 10^5$ pro Well. Für Western Blots und Durchflusszytometrie wurden $\geq 1,5 \times 10^6$ Zellen in 75 cm^2 bzw. $\geq 3 \times 10^6$ in 175 cm^2 Kulturflaschen ausgesät und aktiviert.

LX-2	75 cm ²		175 cm ²
	6-Well Platte	Zellkulturflasche	Zellkulturflasche
DMEM 2 %	2 ml	12 ml	20 ml
Zellzahl	≥ 1 x 10 ⁵	≥ 1,5 x 10 ⁶	≥ 3 x 10 ⁶
TGF-β1	4 ng	24 ng	40 ng
hPSC 2.2.			
DMEM 10%	2 ml	12 ml	20 ml
Zellzahl	≥ 1 x 10 ⁵	≥ 1,5 x 10 ⁶	≥ 3 x 10 ⁶
TGF-β1	5 ng	30 ng	50 ng

Tabelle 12

In den entsprechenden Kulturgefäßen wurde das entsprechende Wachstumsmedium und die jeweilige Konzentration an TGF-β1 vorgelegt und im Wärmeschrank bei 37 °C bereitgestellt. Für die Kontrollprobe wurden Kulturgefäße mit Wachstumsmedium ohne jedweden Zusatz von TGF-β1 vorbereitet. Die Zellen wurden in angegebener Zellzahl geerntet und in die vorbereiteten Zellkulturgefäße gegeben. Die Inkubation der TGF-β1-behandelten bzw. unbehandelten Zellen erfolgte für 48 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit.

5.1.3. Transfektion

Zur technischen Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden LX-2 und hPSC 2.2. Zellen mit verschiedenen, spezifisch gegen *TLR 5* gerichteten siRNA Sequenzen (siRNA *TLR 5.5*, siRNA *TLR 5.6*, siRNA *TLR 5.8* und siRNA *TLR 5.9*) behandelt. Die relative Expression von *TLR 5* wurde anschließend mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Als Negativkontrolle diente wie oben beschrieben AllStars Negative Control siRNA. Anhand der Ergebnisse wurde die siRNA mit dem stärksten Transfektionseffekt bzw. stärksten inhibitorischen Effekt auf *TLR 5* ausgewählt und für alle weiteren Transfektionsversuche verwendet.

Die Transfektion der Zellen wurde in verschiedenen Versuchsanordnungen durchgeführt. Dabei wurden für die qRT-PCR 6-Well-Platten verwendet, sowie 25 cm² Zellkulturflaschen für Westernblots. In folgender Tabelle sind Mengen der verwendeten Zelllinien, sowie verwendete Medien aufgeführt:

	6-Well-Platte	25 cm² Zellkulturflasche
Medium in ml	2,3 ml	4 ml
Zellzahl		
LX-2	> 2,5 x 10 ⁵	> 1 x 10 ⁶
hPSC 2.2.	> 2,5 x 10 ⁵	> 1 x 10 ⁶

Tabelle 13

LX-2 und hPSC 2.2. Zellen wurden wie angegeben ausgesät und für 15 Minuten im Wärmeschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für das Transfektionsreagenz wurden je nach Versuchsanordnung entsprechende Mengen an zusatzfreiem DMEM, HiPerFect® Transfection Reagent und siRNA in ein Eppendorfgefäß pipettiert, gemischt und bei 20 °C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die ausgesäten Zellen mit dem Transfektionsreagenz betropft und für 48 Stunden inkubiert.

LX-2	6-Well-Platte	25 cm² Zellkulturflasche
siRNA	300 ng (10 nM)	512 ng (10 nM)
zusatzfreies DMEM	100 µl	100 µl
HiPerFect® Transfection Reagent	12 µl	20 µl
hPSC 2.2.		
siRNA	150 ng (5 nM)	256 ng (5 nM)
zusatzfreies DMEM	100 µl	100 µl
HiPerFect® Transfection Reagent	12 µl	20 µl

Tabelle 14

Für die Kontrollprobe wurde pro Well bzw. pro 25 cm² Flasche 75 ng (2,5 nM) All Star Negativ Control siRNA (20 nmol) verwendet. Das Reaktionsvolumen

von zusatzfreiem DMEM, HiPerFect® Transfection Reagent und Kulturmedium entsprach dem der anderen Proben.

5.1.4. Zellaktivierung und Transfektion

Für die Transfektion und Aktivierung beider Zelllinien wurden die Methoden der Zellaktivierung, sowie die Transfektion miteinander kombiniert. Dafür wurden die unter 4.1.3. beschriebene Versuchsbedingungen vorbereitet. Zusätzlich fand eine Behandlung der Zellen mit 2 ng/ml bzw. 2,5 ng/ml TGF-β1 für 48 Stunden statt.

LX-2	6-Well-Platte	25 cm² Zellkulturflasche
Zellzahl	> 2,5 x 10 ⁵	> 1 x 10 ⁶
Kulturmedium DMEM 2%	2,3 ml	4 ml
siRNA	300 ng (10 nM)	512 ng (10 nM)
zusatzfreies DMEM	100 µl	100 µl
HiPerFect® Transfection Reagent	12 µl	20 µl
TGF-β1	5 ng	8 ng
hPSC 2.2.		
Zellzahl	> 2,5 x 10 ⁵	> 1 x 10 ⁶
Kulturmedium DMEM 10%	2,3 ml	4 ml
siRNA	150 ng (5 nM)	256 ng (5 nM)
zusatzfreies DMEM	100 µl	100 µl
HiPerFect® Transfection Reagent	12 µl	20 µl
TGF-β1	6 ng	10 ng

Tabelle 15

5.1.5. IncuCyte® ZOOM Live-Cell Analysis System

Bei dem IncuCyte® ZOOM Live-Cell Analysis System handelt es sich um ein zellbiologisches, automatisiertes Bildgebungs- und Quantifizierungsverfahren

von lebenden Zellen in Echtzeit. Im Gegensatz zu Einzelmessungen bzw. Endpunkt-Messungen erlaubt dieses Verfahren eine kontinuierliche, nicht-invasive Beobachtung von zellulärem Verhalten unter in vitro Bedingungen bzw. die kontinuierliche zelluläre Beobachtung und Quantifizierung unter Versuchsbedingungen. Die Bildgebung der Zellen findet dabei in einem frei wählbaren Intervall und automatisiert in einem standardisiertem Zellinkubator statt und ermöglicht so ungestörtes Zellwachstum.

Für die Verwendung des IncuCyte® ZOOM Live-Cell Analysis System wurden Zellen beider Zelllinien in eine 24-Well-Platte ausgesät und mit siRNA gegen *TLR 5*, sowie TGF- β 1 für 48 Stunden transfiziert bzw. aktiviert. Das IncuCyte® ZOOM Instrument wurde im Zellinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit platziert und die vorbereitete 24-Well-Platte im Gerät eingesetzt. Es wurde ein zweistündliches, bildgebendes Intervall während der 48-stündigen Inkubation gewählt. In der folgenden Tabelle sind Zellanzahl und verwendete Reagenzien aufgeführt:

LX-2	hPSC 2.2.
> 1 x 10 ⁵ Zellen/Well	> 1 x 10 ⁵ Zellen/Well
OA 1 mM > 1 x 10 ⁵ Zellen/Well	OA 1 mM > 1 x 10 ⁵ Zellen/Well
TGF- β 1 2,5 ng/ml NTC > 1 x 10 ⁵ Zellen/Well	TGF- β 1 2,5 ng/ml NTC > 1 x 10 ⁵ Zellen/Well
TGF- β 1 2,5 ng/ml siRNA TLR5 > 1 x 10 ⁵ Zellen/Well	TGF- β 1 2,5 ng/ml siRNA TLR5 > 1 x 10 ⁵ Zellen/Well

Tabelle 16

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. mRNA-Isolierung

Für die RNA-Isolation wurden behandelte Zellen, sowie unbehandelte Zellen nach 48 h Behandlung zunächst pelletiert. Dazu wurde das jeweilige Medium aus einem Well abpipettiert und in einem 50 ml Tube aufgefangen. Nach einmaligem Waschen mit PBS, das ebenfalls wieder abpipettiert und aufgefangen wurde, wurden die Zellen für 5 - 10 min mit Trypsin / EDTA zur Ablösung bei 37°C inkubiert. Nach sichtbarer Ablösung der Zellen wurde die Reaktion mit Medium gestoppt und die Zellsuspension ebenfalls in das 50 ml Röhrchen pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde danach mit 2 ml PBS resuspendiert und erneut für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach einem weiteren Verwerfen des Überstandes wurde der Waschvorgang nochmals zum Aufreinigen der Zellen wiederholt und der Überstand verworfen. Das so gewonnene Zellpellet konnte bis zur weiteren Verwendung bei der RNA-Isolation bei - 20 °C eingefroren werden.

Die RNA-Isolation fand mit Hilfe eines RNeasy Plus Mini Kits und enthaltenen Puffern nach Herstellerangaben statt. Nach Auftauen bei 20° C wurde das Zellpellet mit 350 µl RLT Plus Buffer lysiert und für 30 Sekunden gevortext. Das Zelllysate wurde in eine gDNA Eliminator Spin, die in einem Eppendorfgefäß platziert wurde, überführt und bei ≥ 10000 rpm für 30 sec zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und der Durchfluss mit gleichem Anteil 70 % Ethanol gemischt. Zur Bindung der RNA an eine Silikatmembran wurde die Probe in eine RNeasy Spin Silikatsäule überführt und für 15 sec bei ≥ 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Zur weiteren RNA Isolation wurde die Silikatmembran einmalig mit RW1 Puffer und anschließend zweimalig mit RPE Puffer gewaschen und danach jeweils zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die aufgereinigte RNA wurde im abschließenden Schritt mit 10 - 20 µl RNase-freiem Wasser aus der Silikatmembran eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnenen RNA bei - 80 °C eingefroren.

5.2.2. Photometrische Messung der mRNA-Konzentration

Zur Vorbereitung der cDNA-Synthese wurde die RNA-Konzentration mittels Photometer bestimmt. Dazu wurde jeweils 1 µl der isolierten RNA-Probe gemäß

Herstellerangaben auf das Photometer pipettiert und anschließend die optische Dichte der RNA in den gewonnen Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) gemessen entsprechend dem Absorptionsmaximum von RNA. Die zusätzlich Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm (OD_{280}), welche dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht, ließ eine Berechnung des Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{280} zu. Um die Reinheit der RNA sicherzustellen, wurden dabei nur Proben geduldet deren Extinktionskoeffizient E_{260}/E_{280} eine Abweichung von $<0,5$ vom Wert 2 aufwiesen. Zur Bestimmung eines Leerwertes wurde hier 1 μ l RNase freies Wasser verwendet.

5.2.3. Reverse Transkription (RT) / cDNA-Synthese

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde die isolierte RNA mittels Reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung eines iScript cDNA Synthesis Kits nach Herstellerangaben; dafür verwendeten RNA-Proben und Reagenzien wurden während aller Arbeitsschritte auf Eis gelagert. Für ein Reaktionsvolumen von 20 μ l wurden hierbei 500 ng RNA verarbeitet. Zur Herstellung des Reaktionsgemisches wurden in einem Eppendorfgefäß die entsprechende Menge Nuklease-freies Wasser vorgelegt und das Probevolumen hinzugefügt. Anschließend folgten zur Vervollständigung des Reaktionsvolumens die in der folgenden Tabelle angegebenen Mengen der übrigen Komponenten.

Reaktionskomponenten	Volumen
iScript Reaction Mix	4 μ l
iScript Reverse Transcriptase	1 μ l
Nuklease-freies Wasser	14 μ l
RNA Probe 500 ng/ μ l	1 μ l
Totalvolumen	20 μ l

Tabelle 17

Die Inkubation erfolgte in einem Thermocycler bei 25 °C für 5 Minuten und 42 °C für 30 Minuten bevor die Enzymaktivierung bei 85 °C stattfand. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler auf 4 °C herunter gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C eingefroren.

5.2.4. Quantitative RT-PCR

5.2.4.1. Prinzip der quantitativen qRT-PCR

Die quantitative Echtzeit RT-PCR erlaubt über die herkömmlichen PCR hinaus eine Quantifizierung der amplifizierten DNA. Diese erfolgt hierbei mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes der mit der doppelsträngigen DNA interkaliert. Durch eine Konformationsänderung des Farbstoffes kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenz, welche somit detektierbar wird. Diese Echtzeit-Messung finden in der exponentiellen Wachstumsphase in jedem Amplifikationszyklus statt. Die Zunahme der amplifizierten DNA korreliert dabei mit der Zunahme der Fluoreszenz. Nach einer bestimmten Zyklenzahl übersteigt die Fluoreszenz der gefärbten Ziel-DNA die Hintergrundfluoreszenz. Die Zyklenzahl wird automatisch vom Gerät als Threshold Cycle-Wert (Ct- Wert) angegeben mit dem schliesslich die statistische Auswertung erfolgt.

5.2.4.2. Durchführung der qRT-PCR

Bei der Durchführung der quantitativen RT-PCR kamen ein GoTaq qPCR Master Mix Kit, entsprechende Primer, sowie ein C1000 Thermal Cycler Model No.: CFX96™ Optics Module nach Herstellerangaben zur Anwendung. Bei allen Arbeitsschritten wurden sämtliche Reagenzien und Proben auf Eis gelagert. Zur Durchführung der Reaktion wurde im ersten Schritt zur Erstellung einer Standardkurve mit Hilfe von je 1 µl jeder cDNA-Probe eine Verdünnungsreihe von 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 angelegt. Anschließend wurde in einer 96-Well-Platte das Reaktionsgemisch vorgelegt und entsprechend 1 µl cDNA-Probe im Duplikat, Verdünnungsreihe oder Wasser hinzu pipettiert. Das Wasser diente hierbei als Negativkontrolle und konnte damit als Reinheitsreferenz hinzugezogen werden. Aus der Tabelle ist die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zu entnehmen:

Reaktionskomponenten	Volumen
GoTaq qPCR Master Mix	10 µl
Primer	2 µl
Nuklease-freies Wasser	7 µl
cDNA Probe	1 µl
Totalvolumen	20 µl

Tabelle 18

Schließlich wurden die Reaktionsvolumina in der 96-Well-Platte für 2 Minuten bei 1500 rpm herunter zentrifugiert und die quantitative PCR nach folgendem Temperaturschemata im Cyclor gestartet:

Programmschritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Initiale Enzymaktivierung / Hot Start Activation	1	95 °C	2 Minuten
Amplifikation:			
Denaturierung	40	95 °C	15 Sekunden
Annealing/ Anlagerung	40	60 °C	60 Sekunden
Schmelzkurvengenerierung	1	60 - 95 °C	
Kühlen	1	20 °C	

Tabelle 19

Nach Abschluss der qRT-PCR wurde die Ermittlung der Schwellenwert-Zyklus-Werte (C(t)) für die jeweiligen Proben mit Hilfe des CFX Manager™ 2.0 vorgenommen. Mit diesen konnte dann im Weiteren die relative Expression im entsprechenden Versuch berechnet werden.

5.2.5. Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway PCR Array

Der Human Toll-like Receptor Signaling Pathway PCR Array erlaubt eine Analyse der Genexpression von TLR, sowie assoziierten Genen des TLR-Signalweges. Dafür wurde das RT² Profiler™ PCR Array Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway Kit mit RT² SYBR Green qPCR Mastermix, 96-well Plate Containing Dried Assays und Optical Adhesive Film nach Herstellerangaben verwendet. Zur Durchführung der Reaktion wurden die cDNA Proben zum RT² SYBR Green qPCR Mastermix hinzugefügt und auf die entsprechenden Assays der 96-Well Platte aliquotiert. Danach wurde die Reaktion im RT-PCR Cyclor gestartet und nach Abschluss die relative Expression der Zielgene analysiert.

5.3. Biochemische Methoden

5.3.1. Proteinisolierung

5.3.1.1. Vorbereitung von Zellpellets

Zur Vorbereitung der Proteinisolierung wurden je $\geq 1 \times 10^6$ behandelten Zellen und unbehandelten Zellen pelletiert. Dazu wurde das jeweilige Medium aus einem Well abpipettiert und in einem auf Eis gelagerten 50 ml Tube aufgefangen. Nach einmaligem Waschen mit PBS, das ebenfalls wieder abpipettiert und aufgefangen wurde, wurden die Zellen für 5 - 10 Minuten mit Trypsin / EDTA zur Ablösung bei 37°C inkubiert. Nach sichtbarer Ablösung der Zellen wurde mit kaltem Zellkulturmedium gestoppt und die Zellsuspension ebenfalls in das Tube überführt. Der Inhalt des Tubes wurde anschließend bei 1000 rpm bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde mit 1 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und ein weiteres Mal bei 1000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde so oft wiederholt bis sich der Überstand nach Waschen und Zentrifugieren klar zeigte. Nach der letzten Waschung wurde das Zellpellet so gut wie möglich vom Überstand befreit und konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20 °C eingefroren werden.

5.3.1.2. Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten aus den vorbereiteten Zellpellets wurde je 70 µl Hot Lysis Buffer in jede Probe pipettiert und jede Probe für etwa 30 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 30 Minuten erwärmt und währenddessen wiederum intermittierend gevortext. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 30 Minuten im Ultraschallbad bei 50 kHz weiter aufgebrochen und danach für 10 Minuten bei 4 °C bei 10000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert bzw. bei - 20 °C eingefroren.

5.3.2. BCA Protein Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit, sowie entsprechende Pierce BCA Protein Assay BSA Standards nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde jede Probe mit Hot Lysis Buffer in einem Verhältnis von 1 : 5 verdünnt und 10 µl dieser Probe in Duplikatur in einer

96-Well-Platte vorgelegt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden ebenfalls 10 µl des Albumin Standards in Duplikatur vorgelegt. Der Proteingehalt der Standard- Proben entsprach hierbei 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml und 2000 µg/ml. Für die Leerprobe wurde reiner Hot Lysis Buffer verwendet. Zur Vervollständigung des Reaktionsgemisches wurden in jedes beladene Well 200 µl des Working Reagents aus Reagenz A (Pufferlösung) und Reagenz B (Kupfersulfatlösung) in einem Verhältnis von 50:1 pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und mit Hilfe eines ELISA-Readers und des Programmes SOFTmax Pro bei 570 nm Wellenlänge der Proteingehalt gemessen.

5.3.3. Western Blot

5.3.3.1. Prinzip der Western Blot Analyse

Der Western Blot erlaubt als proteinbiochemisches Nachweisverfahren das Auftrennen eines Proteingemisches nach Molekülgröße und elektrischer Ladung. Die Auftrennung der Proteine in Proteinbanden erfolgt dabei mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Nach entsprechender Laufzeit der denaturierten Proben im Polyacrylamid-Gel unter Anlegen einer elektrischen Spannung, folgt der Elektrotransfer im Semi-Dry Blotting Verfahren. Die Proteinbanden werden dabei mit Hilfe des von der Blotting Kammer erzeugten elektrischen Feldes vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Zur Beurteilung des Proteintransfers bzw. der Proteinbanden auf der Membran erfolgt eine Proteindetektion aller Proteine mit Hilfe einer temporären Ponceau-S-Färbung. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung an der Membran folgt eine Blockierung mit Rinderserumalbumin und schließlich die Immundetektion, bei der die Proteinbanden einzelner Proteine mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden können. Während der Inkubation der proteinbeladenen Membran in verdünnter Antikörperlösung kann der spezifische Primärantikörper direkt an das entsprechende Epitop am Protein binden. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Konjugates, dass aus einem signalgebenden Molekül, hier Meerrettich-Peroxidase, und einem Sekundärantikörper besteht. Es bildet mit dem Primärantikörper ein Immunkonjugat und kann über die Meerrettich-Peroxidase in einer Chemolumineszenzreaktion eine Umsetzung

von Luminol in seiner oxidierte Form katalysieren. Die entstehende Lumineszenz wird detektierbar und kann mittels Kamera abgebildet werden.

5.3.3.2. SDS-Gelelektrophorese

Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden bei - 20 °C eingefrorene Zelllysate auf Eis aufgetaut, sowie Hot Lysis Buffer und Blue Sample Buffer auf Raumtemperatur gebracht. Für ein Probevolumen von 20 µl wurden etwa 25 - 30 µg Protein verwendet und mit der entsprechenden Menge Blue Sample Buffer und Hot Lysis Buffer in einem neuen Eppendorfgefäß gemischt. Die Zusammensetzung des Probevolumens ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Reaktionskomponenten	Volumen
(30 µg Protein)	
<i>Blue Sample Buffer</i>	10 µl
Proteinlysat 5 µg/µl	6 µl
<i>Hot Lysis Buffer</i>	4 µl
Totalvolumen	20 µl

Tabelle 20

Gelelektrophorese

Nach kurzem Vortexen und Herunterzentrifugieren wurden die vorbereiteten Proben zur Denaturierung für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt und danach vorerst auf Eis gelagert. Währenddessen wurde eine XCell SureLock Elektrophoresekammer zusammen gebaut, auf Eis platziert und mit NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gelen bestückt. Für den Laufpuffer wurden 485 ml Aqua dest. und 25 ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer gemischt und damit vorsichtig innere, sowie äußere Kammer der Elektrophoresekammer gefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gel vollständig von Running Buffer bedeckt war und beide Kammern vollständige Dichtigkeit aufwiesen. Nach Entfernen des Kammes aus den Geltaschen wurde das vorbereiteten Probevolumen mit Hilfe von Kapillar-Pipettenspitzen vorsichtig in die Taschen pipettiert. In die jeweils äußeren Geltaschen wurden zur späteren Auswertung der Nachweisreaktion

Proteinmarker aufgetragen. LDS Sample Buffer wurde zwischen Proben und Proteinmarkern pipettiert. Das Befüllen erfolgte nach folgendem Schema:

Magic Mark	LDS Buffer	Probe 1	Probe 2	LDS Buffer	LDS Buffer	Magic Mark	LDS Buffer	Probe 1	Probe 2	LDS Buffer	Quad Color
3 µl	10 µl	20 µl	20 µl	10 µl	10 µl	3 µl	10 µl	20 µl	20 µl	10 µl	3 µl

Abbildung 5

Nach dem Auftragen der Proben wurde eine Spannung von 200 Volt für ca. 50 - 70 Minuten angelegt bis der LDS Sample Buffer sichtbar das Ende des Gels erreicht hatte.

Western Blot/ Semi-Dry-Blot

Für das Semi-Dry-Blotting wurde zunächst eine Transferpufferlösung aus 5 ml NuPAGE® Transfer Buffer, 10 ml Methanol, sowie 85 ml Aqua dest. hergestellt und vier Blotting Filterpapiere, sowie eine auf etwa 9 x 7 cm zugeschnittene Nitrocellulose Blotting Membran für 10 Minuten darin äquilibriert. Währenddessen wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt, vorsichtig von der Gekassette befreit und überstehende Ränder verworfen. Auf die Elektrodenplatte der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Kammer wurden daraufhin zwei der vorbereiteten Blotting Filterpapiere, sowie die Nitrocellulose Blotting Membran aufeinander geschichtet und ein Gel vorsichtig darauf gelegt. Entstandene Luftblasen wurden vorsichtig mit einem mit Transferpufferlösung benetztem Roller entfernt und die verbliebenen zwei Blotting Filterpapiere darauf gelegt. Die Blotting Kammer wurde daraufhin geschlossen und für 30 Minuten eine Spannung von 25 V angelegt. Nach dem Blotting wurde die Nitrocellulose Membran von Filterpapieren und Gel befreit und in 0,1 % TBS-T gewaschen. Zur Darstellung der Proteinbanden wurde die Nitrocellulose Membran mit 10 ml Red Alert Solution bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Nach Auffinden der Proteinbanden und Prüfen der Membran auf mögliche zuvor aufgetretene Lufteinschlüsse wurde sie entsprechend der Molekulargewichte der zu identifizierenden Proteine in 2 - 3 Teile geschnitten. Die Zuschnitte wurden erneut mit TBST gewaschen bis die Red Alert Solution

nicht mehr sichtbar war und jeweils in ein 50 ml Tube überführt. Anschließend wurde je 3 ml einer 4 % BSA / TBS-T Lösung hinzugefügt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rolltaumelbrett geblockt um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

5.3.3.3. Immunoblot

Primärantikörper

Jeder Membranzuschnitt wurde nach der Inkubationszeit mit 0,1 % TBS-T gespült und jeweils in ein neues 50 ml Tube überführt. Zur Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern kam pro Membranzuschnitt 3 - 5 ml 4 % BSA / TBS-T Lösung zum Einsatz, sowie je nach Verdünnung die jeweilige Menge an Primärantikörper. Die Inkubation mit Anti-Kollagen 1 und Anti- α -SMA erfolgte hierbei über Nacht gekühlt auf dem Rolltaumelbrett. Für die Inkubation der Membran mit Anti- β -Actin wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rolltaumelbrett veranschlagt. Die folgende Verdünnung der Primärantikörper wurde angewendet:

Primärantikörper	Verdünnung
Rabbit mAb (<i>Kollagen 1</i>)	1 : 500
Rabbit mAb (α -SMA)	1 : 1000
Mouse mAb (β -Actin)	1 : 1000

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Membranen jeweils drei Mal mit Hilfe des Millipore SNAP i.d. Protein Detection System und 0,1 % TBS-T für je 5 Minuten gewaschen.

Sekundärantikörper

Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Membranen jeweils in neue 50 ml Tube überführt und 4 % BSA / TBS-T Lösung mit der entsprechenden Menge Sekundärantikörper hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rolltaumelbrett inkubiert.

Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti Rabbit (Kollagen 1)	1 : 5000
Anti Rabbit (α -SMA)	1 : 10000
Anti Mouse (β -Actin)	1 : 10000

Nach Bindung der Sekundärantikörper wurden die Membranen erneut jeweils drei Mal mit 0,1% TBS-T für je fünf Minuten gewaschen und bis zur Detektion in 0,1% TBS-T belassen, um ein Austrocknen der Membran zu vermeiden.

Detektion

Zum Nachweis der zu identifizierenden Proteine kam ein *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* zum Einsatz, das nach Herstellerangaben verwendet wurde. Dafür wurde die Membran auf einer Beleuchtungsplatte ausgelegt und mit einer Mischung aus Reagenz A und B im Verhältnis 1 : 1 benetzt und mit Hilfe einer Kamera in der Dunkelkammer für 10 Sekunden bis 10 Minuten belichtet und fotografiert. Die Auswertung fand mit dem PC Programm Fusion Image Capture 15.15 statt.

5.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz

5.3.4.1. Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz ist ein biochemisches Analyseverfahren mit dem bestimmte Antigene mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Epitope dieser Antigenen sichtbar gemacht werden können. Dazu wird auf die Zellen, auf denen ein Antigen nachgewiesen werden soll, ein Primärantikörper aufgebracht, der mit seinem Fab-Teil spezifisch an das Epitop des gesuchten Antigens bindet. Dieser Antikörper kann einer bestimmten Antikörperklasse (IgM, IgG) angehören und monoklonal bzw. polyklonal sein. In einem zweiten Schritt wird ein weiterer Antikörper (Sekundärantikörper) aufgetragen, der mit seinem Fab-Fragment an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff kombiniert ist, der bei Anregung durch Licht bestimmter Wellenlänge fluoresziert. Es gibt diverse Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Maxima des Anregungsspektrums, die in entsprechenden Farben aufleuchten.

5.3.4.2. Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz

Für die Durchführung der Immunfluoreszenz wurden Zellen beider Zelllinien in ein Nunc Chamber Slide System 177399 - 4 Well Glas Slide ausgesät und mit siRNA gegen *TLR 5*, sowie TGF- β 1 für 48 Stunden transferiert bzw. stimuliert. Verwendete Zellzahlen und Substanzen sind in folgender Tabelle aufgeführt:

LX-2	1.8 cm² Well/ Kammer
Zellzahl	> 5 x 10 ⁴
Kulturmedium DMEM 2%	500 μ l
siRNA	37,5 ng (5 nM)
zusatzfreies DMEM	100 μ l
HiPerFect® Transfection Reagent	3 μ l
TGF- β 1	1,5 ng
AllStar Negative Control siRNA	7,5 ng (1 nM)

hPSC 2.2.	1.8 cm² Well/ Kammer
Zellzahl	> 5 x 10 ⁴
Kulturmedium DMEM 10%	500 μ l
siRNA	37,5 ng (5 nM)
zusatzfreies DMEM	100 μ l
HiPerFect® Transfection Reagent	3 μ l
TGF- β 1	1,5 ng
AllStar Negative Control siRNA	7,5 ng (1 nM)

Tabelle 21

Chamber Slide

siRNA TLR5 37,5 ng + TGF-β1 1,5 ng	siRNA TLR5 37,5 ng	AllStar Neg. Control siRNA 7,5 ng + TGF-β1 1,5 ng	AllStar Neg. Control siRNA 7,5 ng
---	------------------------------	--	---

Abbildung 6

Nach der 48-stündigen Inkubation wurde das Medium aus den Kammern entfernt und jede Kammer drei Mal mit 500 μ l PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen im nächsten Schritt mit 200 μ l eiskalter Aceton/Methanol Lösung für 10 Minuten inkubiert. Nach Entfernen der Fixierungslösung wurde erneut dreimalig mit PBS gewaschen und zur Vermeidung von unspezifischer Antikörperbindung 200 μ l 0,1% Triton X-100/PBS Lösung in jede Kammer pipettiert. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein weiterer Waschvorgang mit PBS. Anschließend wurden die Zellen jeder Kammer mit 100 μ l des Primärantikörpers, verdünnt 1:100 in 1 % BSA/TBS, für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper AlexaFluor® 568, sowie des Nukleinsäure Farbstoffes Hoechst 33342 in einer 1:1000 Verdünnung mit 1 % BSA/TBS für 1 Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Antikörperlösung entfernt und alle Kammern mit PBS gewaschen. Nach Entfernen der Kammeraufsätze vom Objektträger wurden die Zellen mit einigen Tropfen Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium benetzt und Deckgläschen ohne Einschluss von Luftblasen vorsichtig aufgelegt. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Leica DM 5500 Mikroskops sichtbar gemacht und im Fluoreszenzmikroskop randomisiert abfotografiert. Die erarbeiteten Daten wurden mit der LAS AF Software analysiert.

6. Ergebnisse

6.1 Zellaktivierung mit TGF- β 1

Um das Verhalten aktivierter hepatischer und pankreatischer Sternzellen untersuchen zu können, wurden jeweils die Zelllinien LX-2 und hPSC 2.2. mit 2 ng/ml bzw. 2,5 ng/ml TGF- β 1 für 48 Stunden behandelt. Aus vorherigen Publikationen ist TGF- β 1 als starker profibrotischer Mediator bekannt und dass die gewählte TGF- β 1 Konzentration von 2 ng/ml eine hepatische Sternzellaktivierung stimulieren kann (Caja et al. 2018) (Gao et al. 2013). Daher wurde für die verwendeten pankreatischen Sternzellen, als Verwandte der hepatischen Sternzellen, eine ähnliche Konzentration gewählt. Als Inkubationszeit wurden 48 Stunden festgelegt um eine ausreichende zelluläre Antwort auf die TGF- β 1-Behandlung zu gewährleisten (Tian et al. 2016). Die Beurteilung der Sternzellaktivität erfolgte mit Hilfe der Aktivitätsmarker Kollagen 1 (*COL1A1*), α -SMA (*ACTA2*), Vimentin (*VIM*) sowie Zinc Finger Protein *SNAI1* (*SNAI1*) und Zinc Finger Protein *SNAI2* (*SNAI2*). Bei aktivierten hepatischen und pankreatischen Sternzellen kommt es u.a. zu einer gesteigerten Synthese von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen I und dem Kontraktilitätsprotein α -SMA. Zudem werden erwiesenermaßen deutlich mehr Strukturproteine, wie das Typ III Intermediärfilament Vimentin, sowie Transkriptionsfaktoren, wie Zinc Finger Protein *SNAI1* und *SNAI2*, gebildet als bei quieszenten Sternzellen oder andere nicht-parenchymalen Zellen (Zhang et al. 2018) (Scarpa et al., 2011) (Zhao et al., 2016) (Fausther et al., 2013).

6.1.1. Quantitative RT-PCR der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2*

Zur Quantifizierung der relativen Expression der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* nach TGF- β 1 Behandlung wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Relative Expression bedeutet dabei, dass die Ergebnisse der mit TGF- β 1 behandelten Zellen relativ zu unbehandelten Zellen ausgedrückt wurden. Für alle qRT-PCR-Versuche wurden jeweils Duplikate der Proben angelegt und alle Ergebnisse stets mit dem Haushaltsgen *18S ribosomale RNA (RRN18S)* verglichen. Die Ergebnisse der durchgeführten qRT-PCR sind in folgenden Abbildungen abgebildet.

LX-2:

Nach 48 Stunden TGF- β 1 Inkubation ließ sich für alle Aktivitätsmarker eine gesteigerte Expression relativ zu unbehandelten Zellen detektieren. Bei den Zielgenen *COL1A1*, *ACTA2*, *SNAI1* und *SNAI2* zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Gen-Transkription. Die Aktivierung der LX-2 Zellen wurde folglich durch Behandlung mit 2 ng/ml TGF- β 1 induziert. Den stärksten Anstieg zeigte dabei *SNAI1*, gefolgt von *SNAI2* und *COL1A1*.

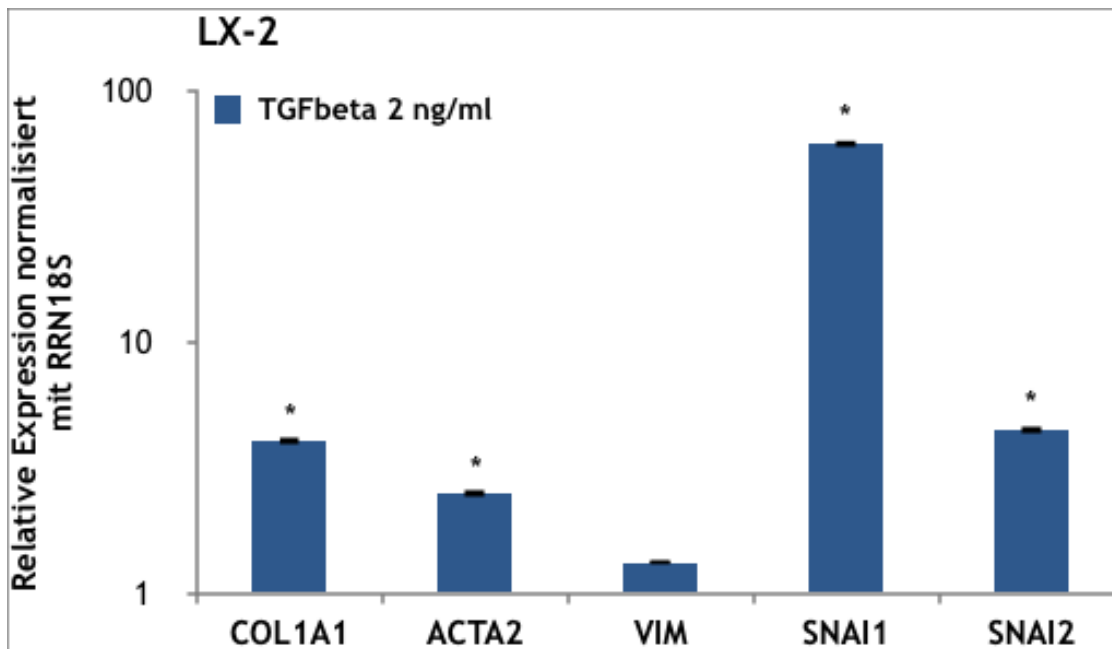


Abbildung 7: LX-2 Zellen: Relative Expression der Zielgene *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* gegenüber unbehandelten Zellen nach Behandlung mit TGF- β 1 für 48 h. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Der positive Standardfehler ist angegeben. Ebenso sind signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert $<0,05$ mit einem „*“ gekennzeichnet.

hPSC 2.2.:

Nach 48 Stunden TGF- β 1 Behandlung zeigte sich bei dieser Ziellinie ebenfalls eine deutliche Steigerung der Expression aller Aktivitätsmarker. Bei *COL1A1*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* kam es zur signifikanter Hochregulation der Gen-Transkription nach Behandlung mit 2,5 ng/ml TGF- β 1. Die gewählte TGF- β 1 Konzentration konnte demnach eine Aktivierung der hPSC 2.2. Zellen induzieren. Bei hPSC 2.2. Zellen konnte für *SNAI1* ebenfalls der höchsten mRNA Gehalt, gefolgt von *SNAI2* und *COL1A1* gemessen werden.

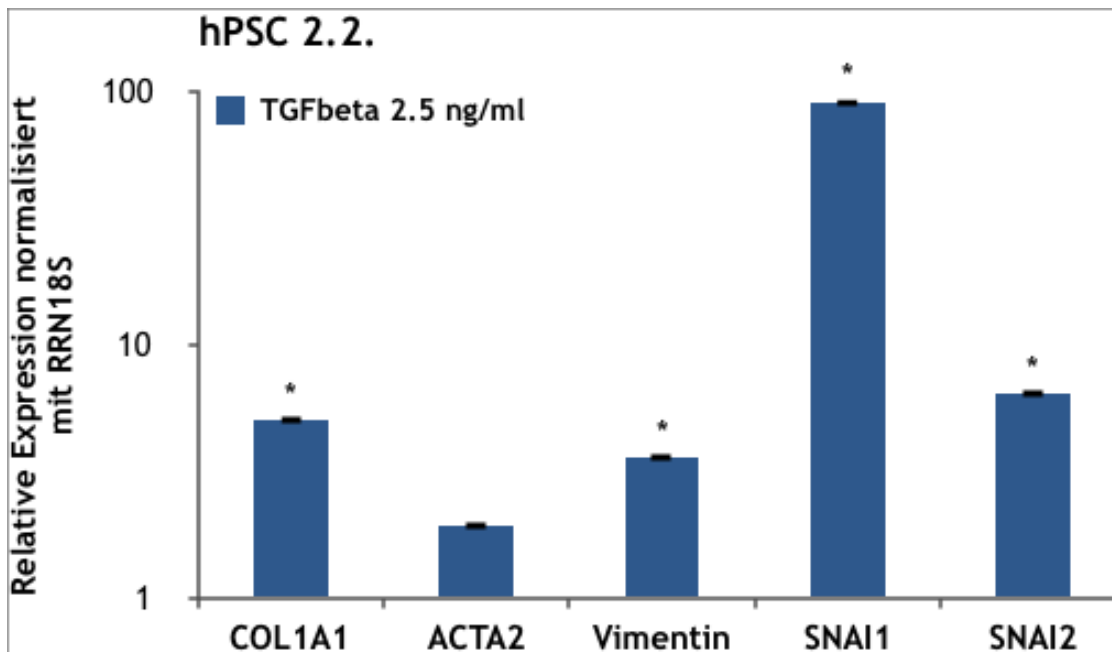


Abbildung 8: hPSC 2.2. Zellen: Relative Expression der Zielgene *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* gegenüber unbehandelten Zellen nach Behandlung mit TGF- β 1 für 48 h. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Der positive Standardfehler ist angegeben. Ebenso sind signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert $<0,05$ mit einem „*“ gekennzeichnet.

6.1.2. Bestimmung der Proteinexpression der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *ACTA2* und *SNAI1* mittels Westernblot

Um den Effekt der TGF- β 1 Behandlung auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Proteinmengen von *COL1A1*, *ACTA2* und *SNAI1* mittels Westernblot nach 48-stündiger TGF- β 1 Inkubation bestimmt. Als Ladekontrolle wurde β -Actin gewählt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

LX-2:

Bei der LX-2 Ziellinie präsentierte sich bei allen untersuchten Aktivitätsmarkern nach 48 Stunden eine ausgeprägte Proteinexpression in Form von deutlichen Proteinbanden und folglich eine Bestätigung der Zellaktivierung mittels TGF- β 1. Bei den Zielproteinen *COL1A1* und *SNAI1* zeigte sich die Proteinexpression signifikant zur unbehandelten Kontrolle bei der eine Proteinexpression gänzlich ausblieb. Bei *ACTA2* konnte in behandelter und unbehandelter Probe etwa gleich starke Proteinbanden beobachtet werden. Diese deutliche Proteinexpression von *ACTA2* in der unbehandelten Probe könnte auf eine unspezifische Autoaktivierung der unbehandelten Zellen zurückzuführen sein.

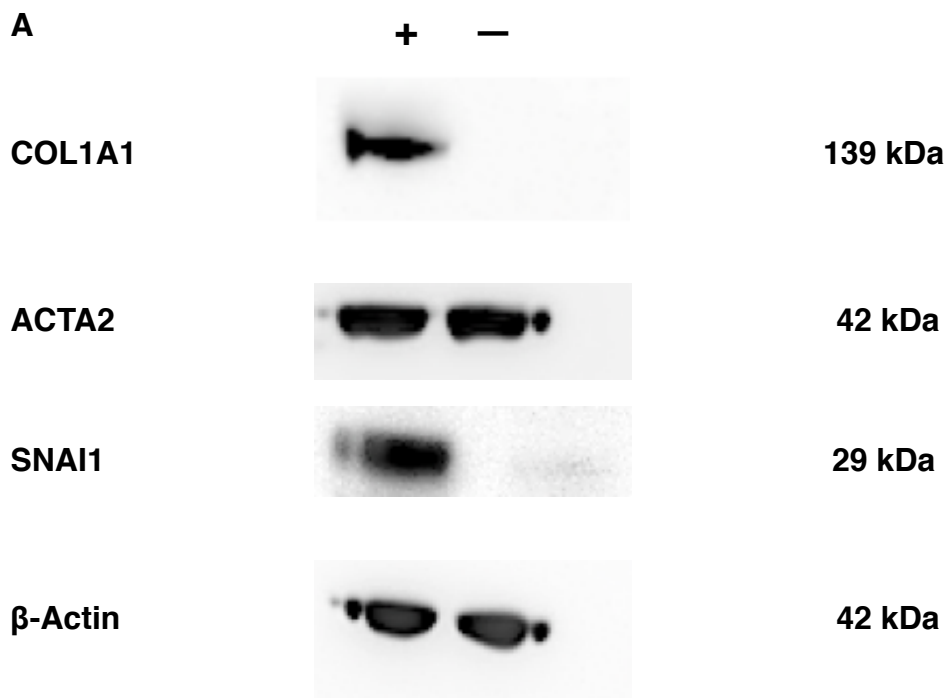


Abbildung 9: Westernblot der Zielproteine *COL1A1*, *ACTA2*, *SNAI1* und β -*Actin* (Ladekontrolle) von **A** LX-2 Zellen nach Behandlung mit TGF- β für 48 h (+) und unbehandelter Kontrolle (-). Die Molmasse der Zielproteine ist in kDa angegeben.

hPSC 2.2.:

Bei der hPSC 2.2. Ziellinie zeigte sich ein ähnliches Verhalten der Proteinexpression nach TGF- β 1 Behandlung. Für alle Zielproteine präsentierten sich deutliche Proteinbanden und folglich konnte eine Zellaktivierung bestätigt werden. Bei *COL1A1* und *SNAI1* zeigte sich die Proteinexpression signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, bei der ebenfalls keinerlei Proteinexpression detektiert werden konnte. Für *ACTA2* zeigte sich etwa gleich starke Proteinbanden, die auf eine unbeabsichtigte Autoaktivierung unbehandelter Zellen zurückzuführen sein könnte.

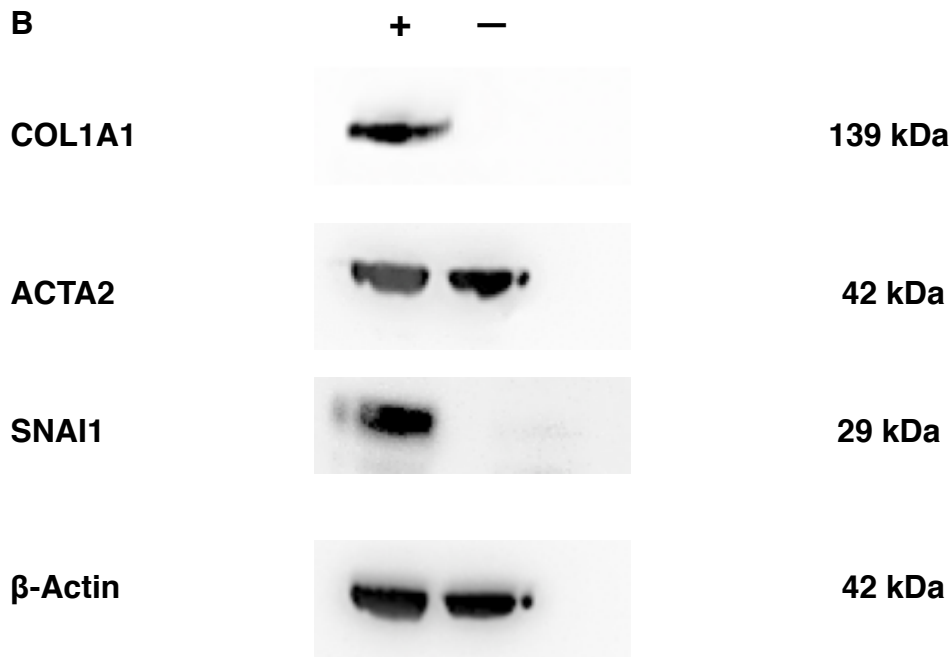


Abbildung 10: Westernblot für die Zielproteine *COL1A1*, *ACTA2*, *SNAI1* und β -*Actin* (Ladekontrolle) von **B** hPSC 2.2. Zellen nach Behandlung mit TGF- β für 48 h (+) und unbehandelter Kontrolle (-). Die Molmasse der Zielproteine ist in kDa angegeben.

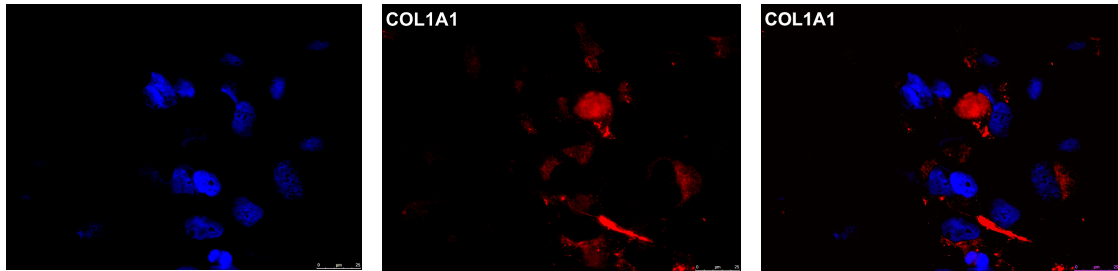
6.1.3. Indirekte Immunfluoreszenz der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *VIM* und *SNAI1*

Um die Aktivierung der Zellen mittels TGF- β 1 Behandlung nochmals auf Proteinebene zu bestätigen bzw. visualisieren, wurde nach 48-stündiger TGF- β 1 Inkubation eine indirekte Immunfluoreszenz bei LX-2 und hPSC 2.2. Zellen durchgeführt. Dabei wurde das Fluoreszenzmuster der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *VIM* und *SNAI1* untersucht. Die Zielproteine *COL1A1*, *VIM* und *SNAI1* wurden dafür nach 48 Stunden mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor® 568 rot markiert. Die blaue Markierung der Zellkerne erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33342). Beide Zelllinien wurden in 40-facher oder 63-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop randomisiert abfotografiert. Die Ergebnisse sind auf den folgenden Abbildungen dargestellt.

LX-2:

Für den Aktivitätsmarker *COL1A1* präsentierte sich nach TGF- β 1 Behandlung ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal als bei der unbehandelten Kontrolle und es konnte folglich die Aktivierung der LX-2 Zellen bestätigt werden.

KO



TGF- β 1

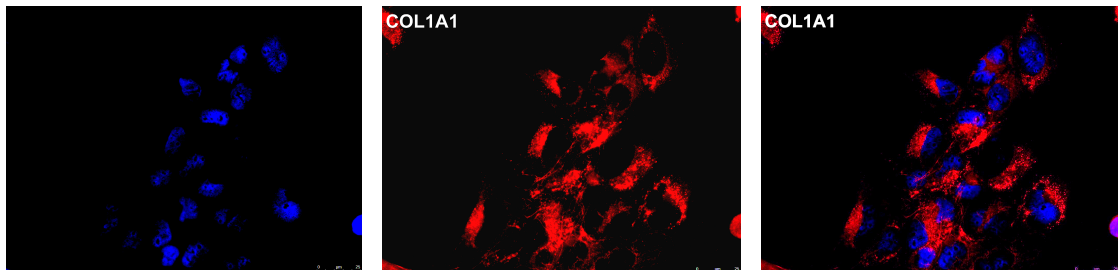
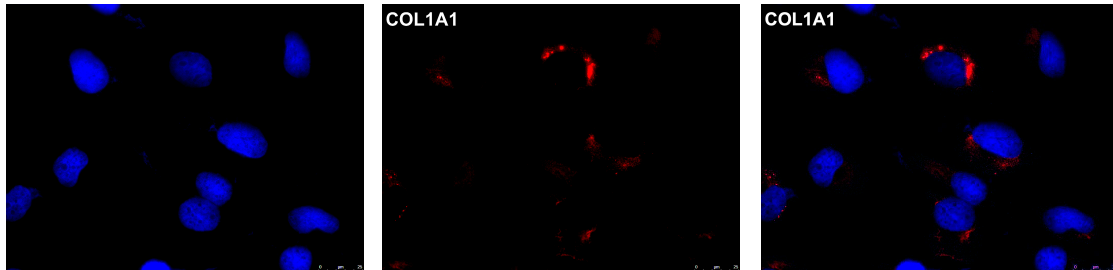


Abbildung 11: LX-2 Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *COL1A1* nach Behandlung mit TGF- β 1 für 48 h und Kontrolle (**KO**). Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

hPSC 2.2.:

Bei dieser Ziellinie zeigte sich für den Aktivitätsmarker *COL1A1* ebenfalls ein stärkeres Fluoreszenzsignal nach TGF- β 1 Behandlung als in der unbehandelten Kontrolle und somit eine Bestätigung der hPSC 2.2. Aktivierung.

KO



TGF- β 1

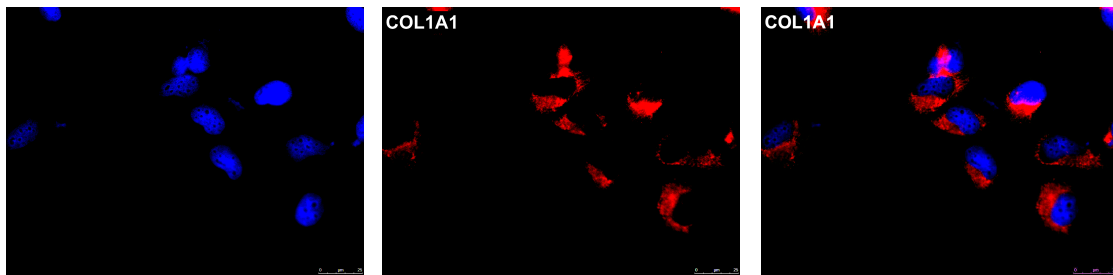
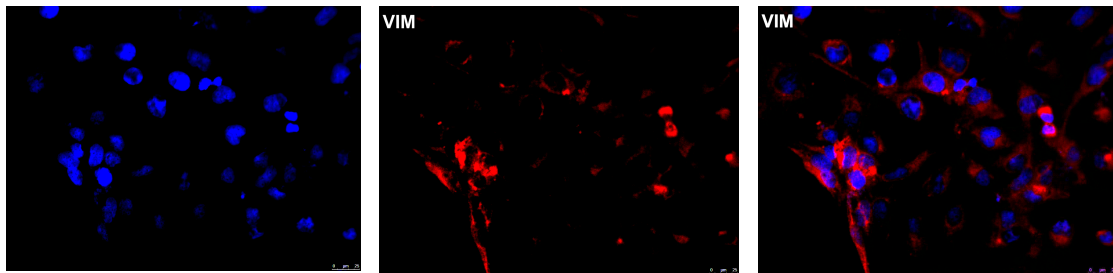


Abbildung 12: hPSC 2.2. Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *COL1A1* nach Behandlung mit TGF- β 1 für 48 h und Kontrolle (**KO**). Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

LX-2:

Für den Marker *VIM* zeigte sich nach TGF- β 1 Inkubation ein stärker sichtbares Fluoreszenzsignal gegenüber unbehandelten Zellen. Bei dem sichtbaren Fluoreszenzsignal der unbehandelten Zellen könnte es sich um eine *VIM* Expression durch eine autokrine Aktivierung unbehandelter LX-2 Zellen handeln.

KO



TGF- β 1

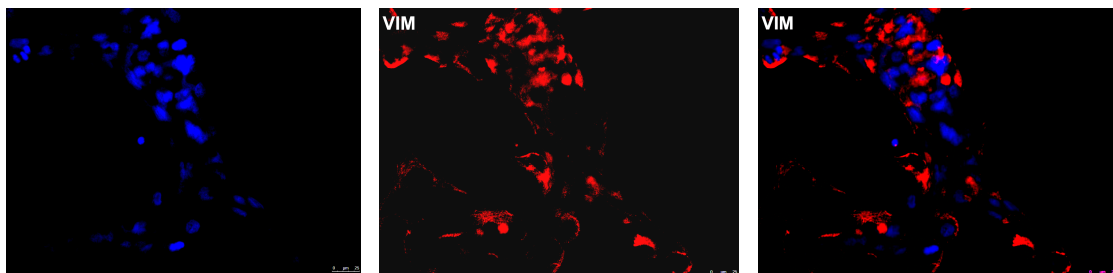
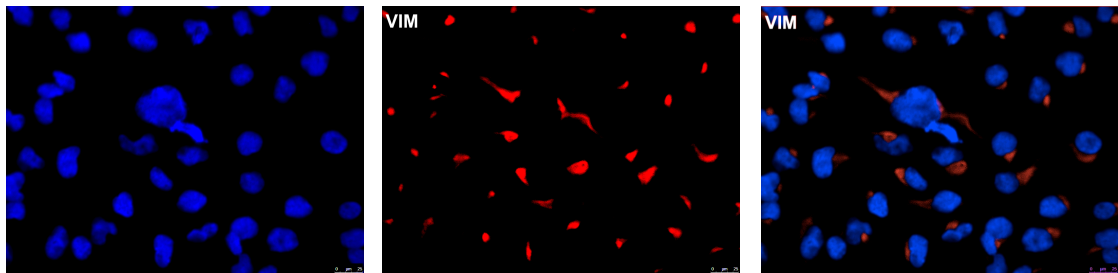


Abbildung 13: LX-2 Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein Vimentin (*VIM*) nach Behandlung mit **TGF- β 1** für 48 h und Kontrolle (**KO**). Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 40-facher Vergrößerung.

hPSC 2.2.:

Bei der hPSC 2.2. Ziellinie präsentierte sich für den Marker *VIM* bei behandelten Zellen ein etwas stärker sichtbares Fluoreszenzsignal. Eine unspezifische Fluoreszenz bzw. Expression von *VIM* durch autokrine Aktivierung der unbehandelten hPSC 2.2. Zellen kann hier ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

KO



TGF- β 1

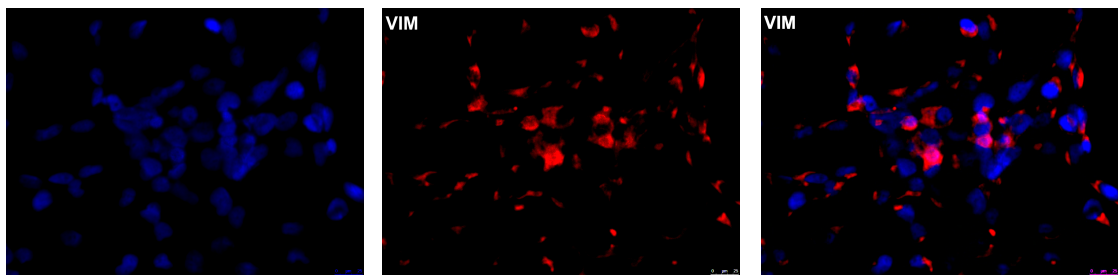
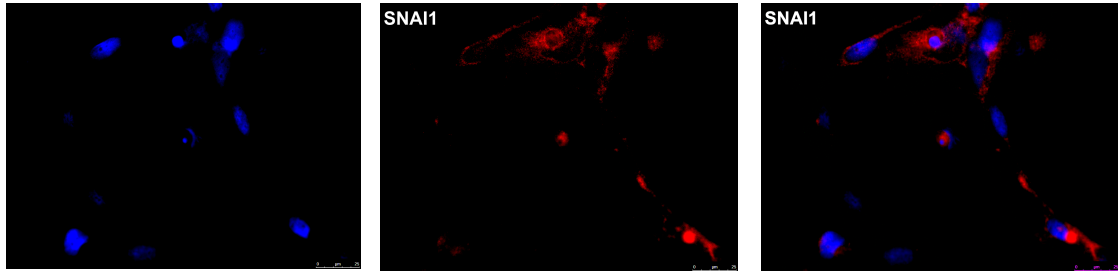


Abbildung 14: hPSC 2.2. Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *VIM* nach Behandlung mit **TGF- β 1** für 48 h und Kontrolle (**KO**). Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 40-facher Vergrößerung.

LX-2:

Für den Aktivitätsmarker *SNAI1* präsentierte sich nach TGF- β 1 Behandlung ein deutlich ausgeprägtes Fluoreszenzsignal und folglich konnte sich die Aktivierung anhand dieses Aktivitätsmarkers ebenfalls bestätigen.

KO



TGF- β 1

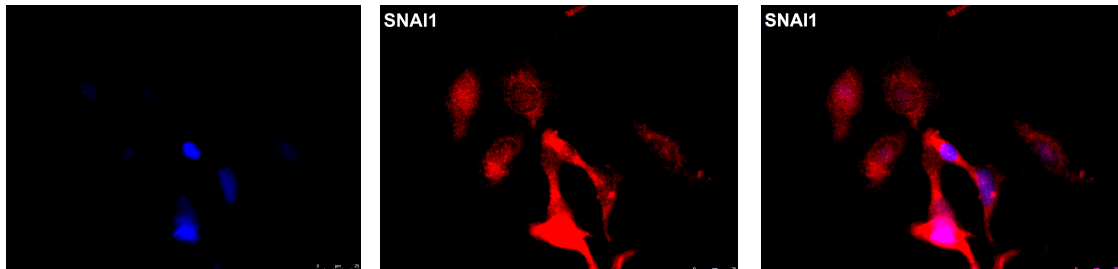
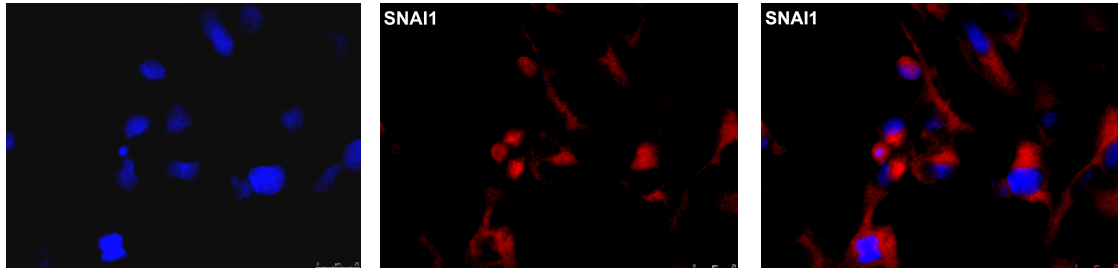


Abbildung 15: LX-2 Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *SNAI1* nach Behandlung mit **TGF- β 1** für 48 h und Kontrolle (**KO**). Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

hPSC 2.2.:

Bei dieser Ziellinie zeigte sich ebenfalls ein starkes Fluoreszenzsignal für das Protein *SNAI1* nach TGF- β 1 Behandlung und eine Bestätigung der Zellaktivierung mittels TGF- β 1 nach 48 Stunden

KO



TGF- β 1

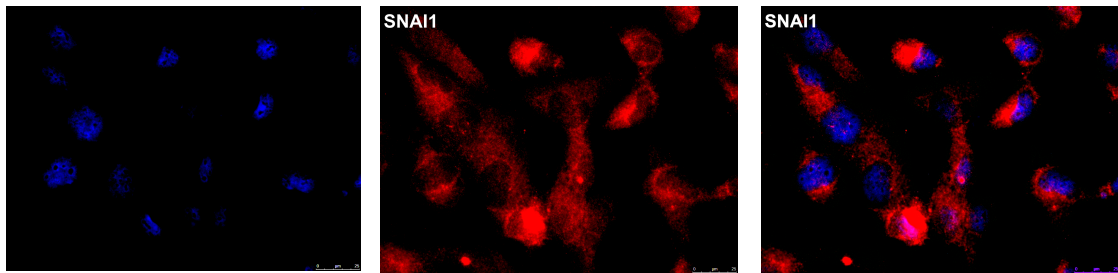


Abbildung 16: hPSC 2.2. Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *SNAI1* nach Behandlung mit TGF- β 1 für 48 h und Kontrolle (**KO**). Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

6.2. Toll-like Rezeptor Expression

Nachdem die Sternzellaktivierung bei beiden Zelllinien bestätigt werden konnte, sollten aktivierte LX-2 und hPSC 2.2. Zellen hinsichtlich ihrer Toll-like Rezeptor Expression untersucht werden. Dazu wurden Zellen beider Zelllinien zunächst auf ihre generelle Expression von TLR 1-10 detektiert. Anschließend wurde der ausgewählte *TLR 5* mittels qRT-PCR, Westernblot und indirekter Immunfluoreszenz näher betrachtet.

6.2.1. Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway PCR Array

Mit Hilfe des Human Toll-like Receptor Signaling Pathway PCR Array wurden aktivierte LX-2 und hPSC 2.2. Zellen auf ihre Expression von TLR 1-10 detektiert. Dafür wurde cDNA aktivierter Zellen eingesetzt. Die Aktivierung erfolgte, wie oben beschrieben, mit TGF- β 1 für 48 Stunden. Die Expression wurde relativ gegenüber unbehandelten Zellen ausgedrückt. Nach 48-stündiger Behandlung mit TGF- β 1 präsentierte sich bei LX-2 Zellen eine vermehrte Expression von *TLR 1*, *TLR 5*, *TLR 6* und *TLR 10*; bei *TLR 5* und *TLR 10* kam es zur signifikante Hochregulation der Gentranskription. Bei Zellen der hPSC 2.2. Zelllinie konnte eine signifikante Hochregulation von *TLR 1* und *TLR 5* beobachtet werden. Die übrigen TLR zeigten sich herunter reguliert oder nicht exprimiert. Aufgrund der der signifikanten Ergebnisse für *TLR 5* bei LX-2 und hPSC 2.2. Zellen rückte *TLR 5* besonders in den Fokus und wurde näher untersucht.

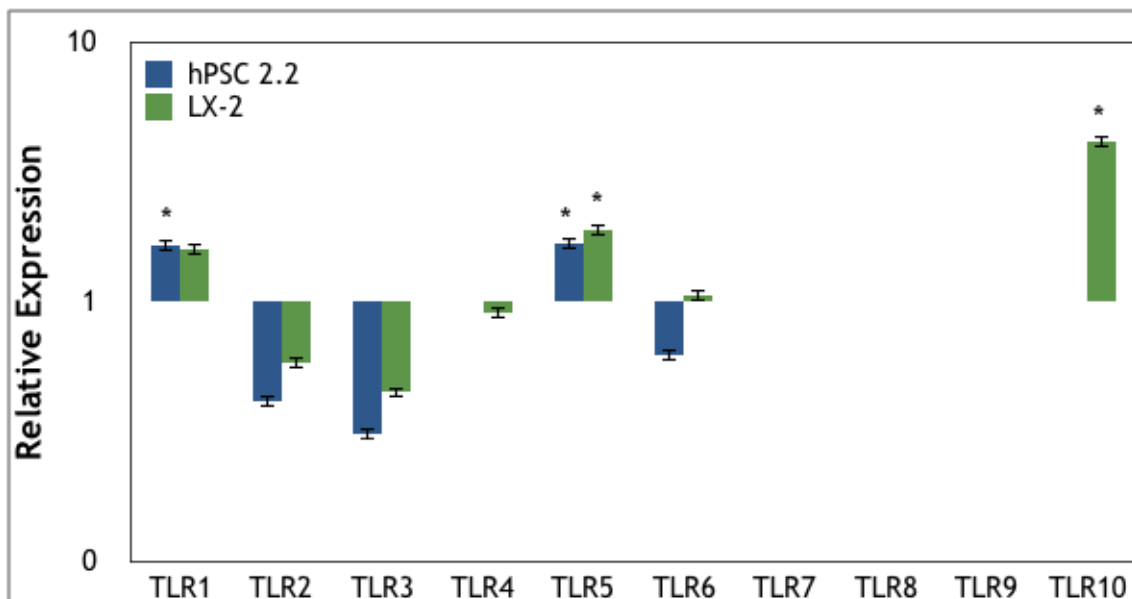


Abbildung 17: LX-2 Zellen und hPSC 2.2.: Relative Expression von *TLR 1 - 10* nach Behandlung mit TGF- β 1 für 48 h. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Der positive Standardfehler ist angegeben. Ebenso sind signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 mit einem „*“ gekennzeichnet.

6.2.2. Quantitative RT-PCR des Zielgens TLR 5 nach TGF- β 1 Behandlung

Nachdem mittels TLR PCR Array eine generelle Expression von TLR bei aktivierten LX-2 und hPSC 2.2. Zellen detektiert werden konnte, wurde im nächsten Schritt das Verhalten von *TLR 5* bei aktivierten Sternzellen näher

untersucht. Dafür wurde mittels qRT-PCR die Genexpression von *TLR 5* bei aktivierten LX-2 und hPSC 2.2. Zellen nach 48 Stunden Inkubation quantifiziert. Als Haushaltsgen wurde *RRN18S* gewählt. Die Ergebnisse der durchgeführten qRT-PCR sind in den folgenden Abbildungen abgebildet. Nach 48 Stunden TGF- β 1 Behandlung präsentierte sich bei beiden Zelllinien eine gesteigerte Gen-Transkription von *TLR 5* relativ zu unbehandelten Zellen. Folglich induzierten die gewählten TGF- β 1 Konzentrationen eine vermehrte Expression von *TLR 5* bei den untersuchten Zelllinien.

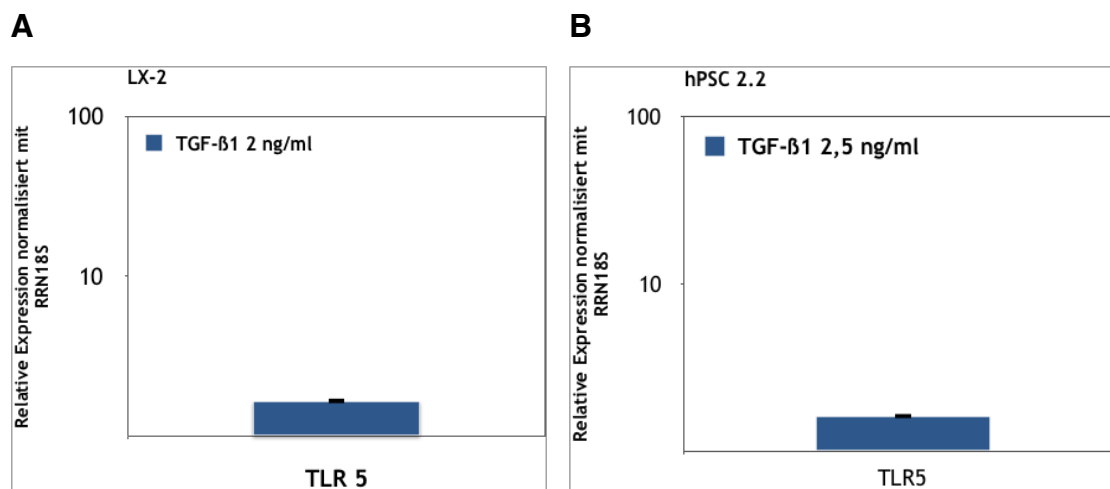


Abbildung 18: A LX-2 Zellen **B** hPSC 2.2.: Relative Expression des Zielgens *TLR 5* gegenüber unbehandelten Zellen nach Behandlung mit TGF- β 1 für 48 h. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Der positive Standardfehler ist angegeben. Ebenso sind signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 mit einem „*“ gekennzeichnet.

6.2.3. Bestimmung der Proteinexpression des Zielproteins *TLR 5* nach TGF- β 1 Behandlung mittels Westernblot

Um die Ergebnisse der qRT-PCR auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Proteinmengen von *TLR 5* mittels Westernblot nach 48 Stunden TGF- β 1 Behandlung bestimmt. Als Ladekontrolle wurde β -Actin gewählt. Bei der LX-2 und hPSC 2.2. Ziellinie präsentierte sich für *TLR 5* nach 48 Stunden eine ausgeprägte Proteinexpression in Form von deutlichen Proteinbanden. Eine Induktion der *TLR 5* Expression bei aktivierten Sternzellen konnte somit auf Proteinebene bestätigt werden. Bei unbehandelten Zellen der hPSC 2.2. Zelllinie zeigte sich ebenfalls eine deutlich sichtbare Proteinbande für *TLR 5*.

Diese vergleichbar starke Proteinexpression der beiden Proben könnte auf eine autokrine Autoaktivierung mit *TLR 5* Expression der unbehandelten Zellen zurückzuführen sein. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

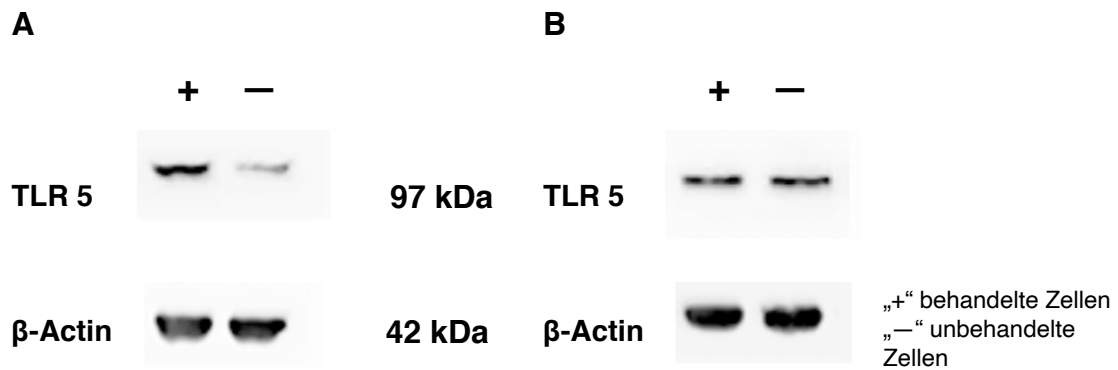


Abbildung 19: Westernblots für die Proteine *TLR 5* und β -Actin (Ladekontrolle) von **A** LX-2 Zellen **B** hPSC 2.2. Zellen nach Behandlung mit TGF- β für 48 h (+) und unbehandelter Kontrolle (-). Die Molmasse der Zielproteine ist in kDa angegeben.

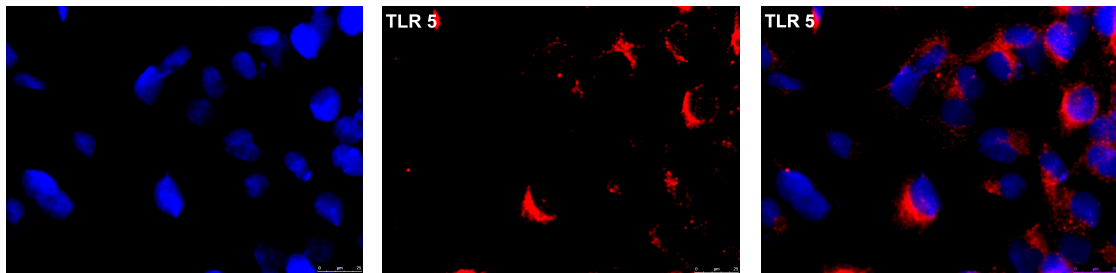
6.2.4. Indirekte Immunfluoreszenz des Zielproteins *TLR 5*

Um die Induktion der *TLR 5* Expression bei aktivierten Sternzellen nochmals zu bestätigen und visualisieren, wurde nach 48-stündiger Inkubation eine indirekte Immunfluoreszenz bei LX-2 und hPSC 2.2. Zellen durchgeführt und das Fluoreszenzmuster von *TLR 5* untersucht.

LX-2:

Bei der indirekten Immunfluoreszenz zeigten beide Proben eine sichtbare Fluoreszenz für *TLR 5*, die jedoch bei behandelten Zellen der Ziellinie stärker erschien und die Induktion der Proteinexpression von *TLR 5* bei aktivierten LX-2 Zellen nochmals bestätigte.

KO



TGF- β 1

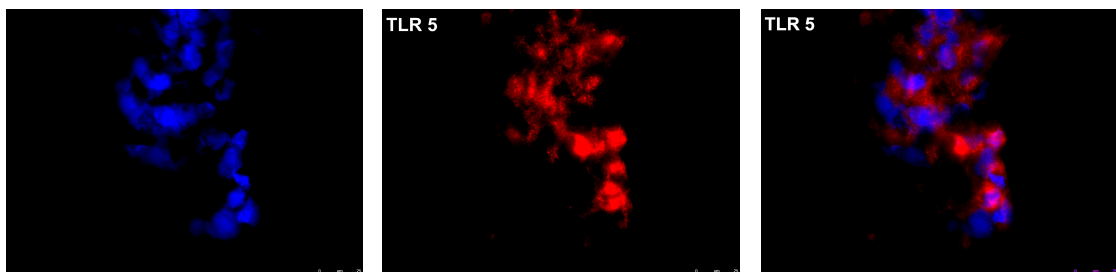
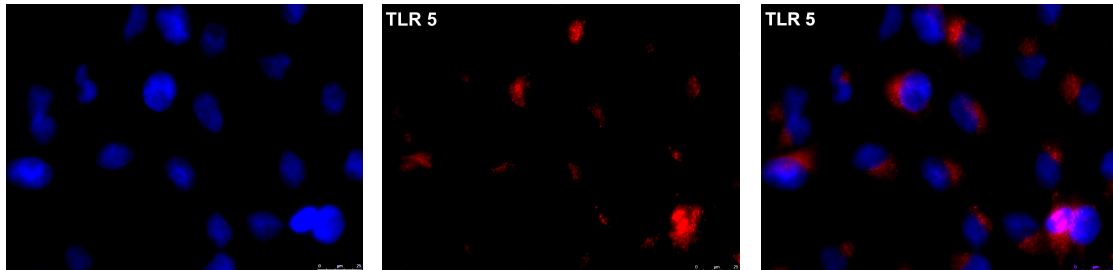


Abbildung 20: LX-2 Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *TLR 5* nach Behandlung mit **TGF- β 1** für 48 h und Kontrolle (**KO**). Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

hPSC 2.2.:

Bei behandelten hPSC 2.2. präsentierte sich ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal im Vergleich zu unbehandelten Zellen und eine Induktion der TLR 5 Expression bei aktivierten Zellen konnte nochmals bestätigt werden.

KO



TGF-β1

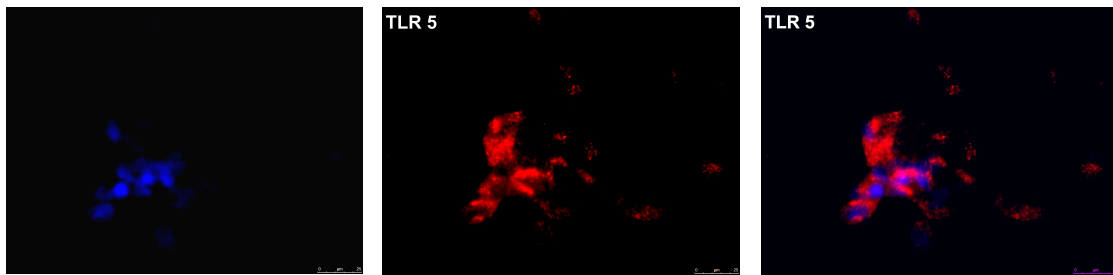


Abbildung 21: hPSC 2.2.: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *TLR 5* nach Behandlung mit **TGF-β1** für 48 h und Kontrolle (**KO**). Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

6.3. Transfektionsversuche

Nachdem sich bei den vorangegangenen Ergebnissen zeigte, dass aktivierte Zellen der LX-2 und hPSC 2.2. Ziellinie vermehrt *TLR 5* exprimierten, wurde die Funktion von *TLR 5* hinsichtlich der Aktivierung der Sternzelllinien untersucht. Dazu sollte mit Hilfe der Transfektion von LX-2 und hPSC 2.2 Zellen mit siRNA gegen *TLR 5* ein Knockdown von *TLR 5* erzielt werden. Anschließend wurde das Verhalten der Aktivitätsmarker und *TLR 5* während des *TLR 5* Knockdowns und der TGF-β1 induzierter Aktivierung untersucht. Zellen beider Zelllinien wurden dafür 48 Stunden mit siRNA gegen *TLR 5* transfiziert und bzw. oder mit

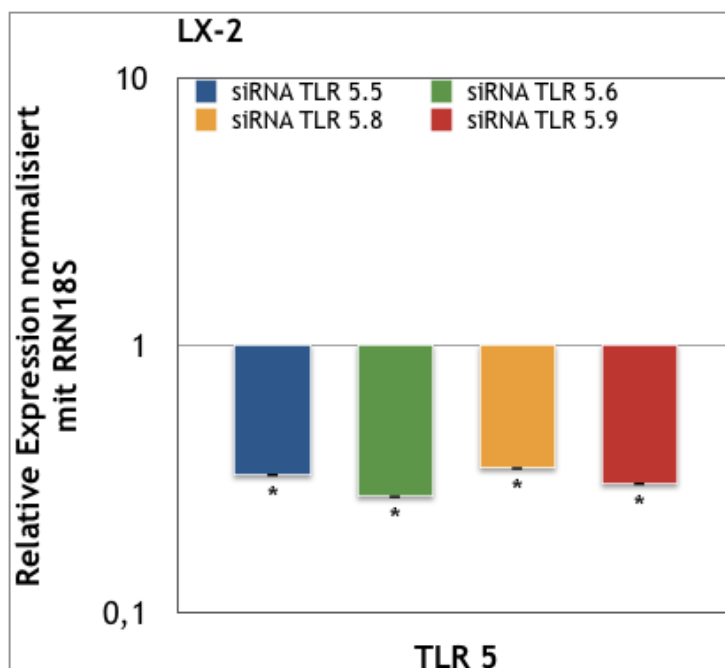
TGF- β 1 behandelt. Für die Negativkontrolle wurde AllStars Negative Control siRNA verwendet.

6.3.1. Technische Kontrolle der siRNA

Zur technischen Kontrolle der siRNA und ihrer Einsetzbarkeit in den Transfektionsversuchen wurden zunächst verschiedene siRNA gegen *TLR 5* geprüft. Anhand der Ergebnisse wurde die siRNA mit dem stärksten inhibitorischen Effekt auf *TLR 5* ausgewählt und für alle folgenden Transfektionsversuche verwendet. Dafür wurden LX-2 und hPSC 2.2. Zellen mit den siRNA Sequenzen *TLR 5.5.*, *TLR 5.6*, *TLR 5.8.* und *TLR 5.9.* für 48 Stunden transfiziert. Die Behandlung der Negativkontrolle erfolgte mit AllStars Negative Control siRNA. Die relative Expression des Zielgens gegenüber der Negativkontrolle wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Als Haushaltsgen wurde *RRN18S* gewählt. Die graphische Auswertung der qRT-PCR ist auf den folgenden Abbildung dargestellt.

Bei den LX-2 Zellen konnte nach Transfektion bei allen siRNA eine signifikante Herunterregulation der *TLR 5* mRNA relativ zur Negativkontrolle beobachtet werden. Den stärksten quantitativen *TLR 5* Knockdown zeigte sich bei der siRNA *TLR 5.6.* Bei hPSC 2.2. Zellen erzielte die siRNA *TLR 5.6.* ebenfalls den stärksten inhibitorischen Effekt auf *TLR 5* mit einer signifikanten Herunterregulation der Gen-Transkription für *TLR 5*.

A



B

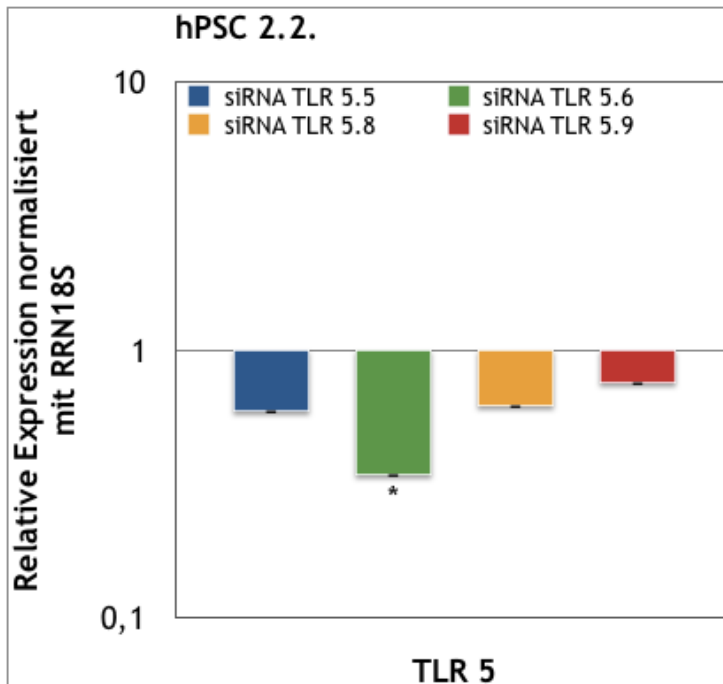


Abbildung 22: A LX-2 Zellen und **B** hPSC 2.2. Zellen: Relative Expression des Zielgens *TLR 5* gegenüber der Negativkontrolle nach Transfektion mit verschiedenen siRNA gegen *TLR 5*. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Der positive Standardfehler ist angegeben. Ebenso sind signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert $<0,05$ mit einem „*“ gekennzeichnet.

6.3.2. Quantitative RT-PCR der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1*, *SNAI2* und *TLR5*

Die Quantifizierung der relativen Expression der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1*, *SNAI2* und *TLR 5* nach den Transfektionsversuchen erfolgte mittels qRT-PCR. Es wurden stets biologische Duplikate aller Proben angelegt und die Ergebnisse jeweils mit dem Haushaltsgen *RRN18S* verglichen. Die graphische Auswertung der qRT-PCR ist auf der folgenden Abbildung dargestellt.

6.3.2.1. *TLR 5* Knockdown

LX-2:

Nach 48-stündiger Transfektion mit siRNA gegen *TLR 5* präsentierte sich eine erfolgreiche Inhibierung von *TLR 5* mit signifikanter Herunterregulation der Gentranskription. Alle untersuchten Aktivitätsmarker präsentierten eine

signifikante Hochregulation mit vermehrter Genexpression relativ zur Negativkontrolle.

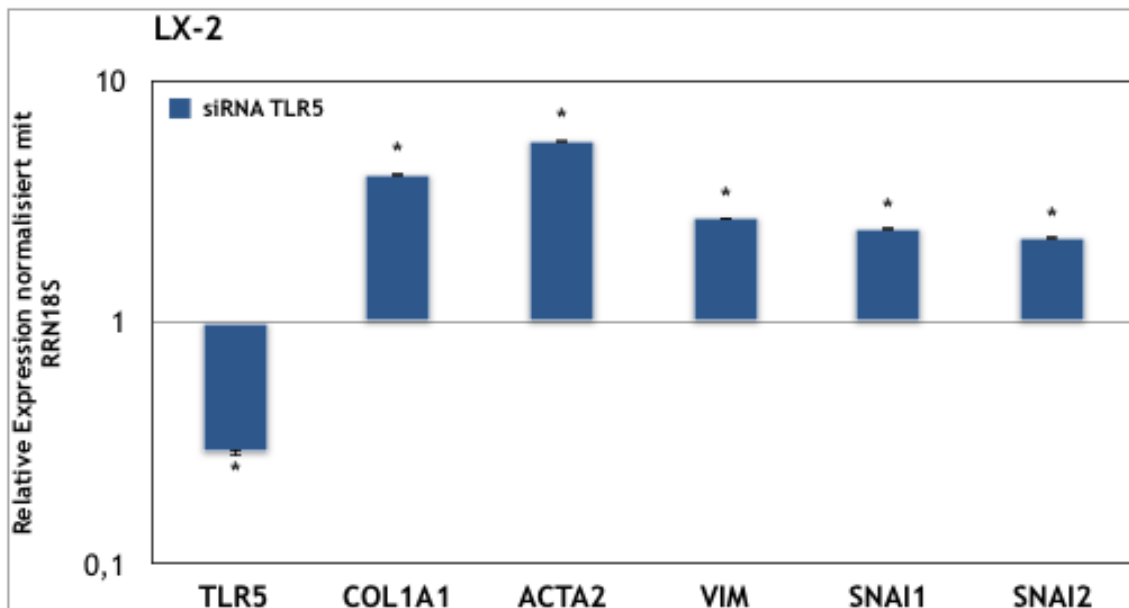


Abbildung 23: LX-2 Zellen: Relative Expression der Zielgene *TLR5*, *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* nach Transfektion (siRNA *TLR5*) für 48 h gegenüber der Negativkontrolle. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Der positive Standardfehler ist angegeben. Ebenso sind signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 mit einem „*“ gekennzeichnet.

hPSC 2.2.:

Bei dieser Ziellinie konnte nach *TLR 5* Knockdown ebenfalls eine erfolgreiche Inhibierung von *TLR 5* mit signifikanter Herunterregulation der Gentranskription beobachtet werden. Für *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* zeigten sich eine stabil basale Expression im Vergleich zur Negativkontrolle bzw. konnte für *COL1A1* eine Hochregulation vermutet werden. Insgesamt erschienen die relative Expression der Aktivitätsmarker nach *TLR 5* Inhibierung reduziert.

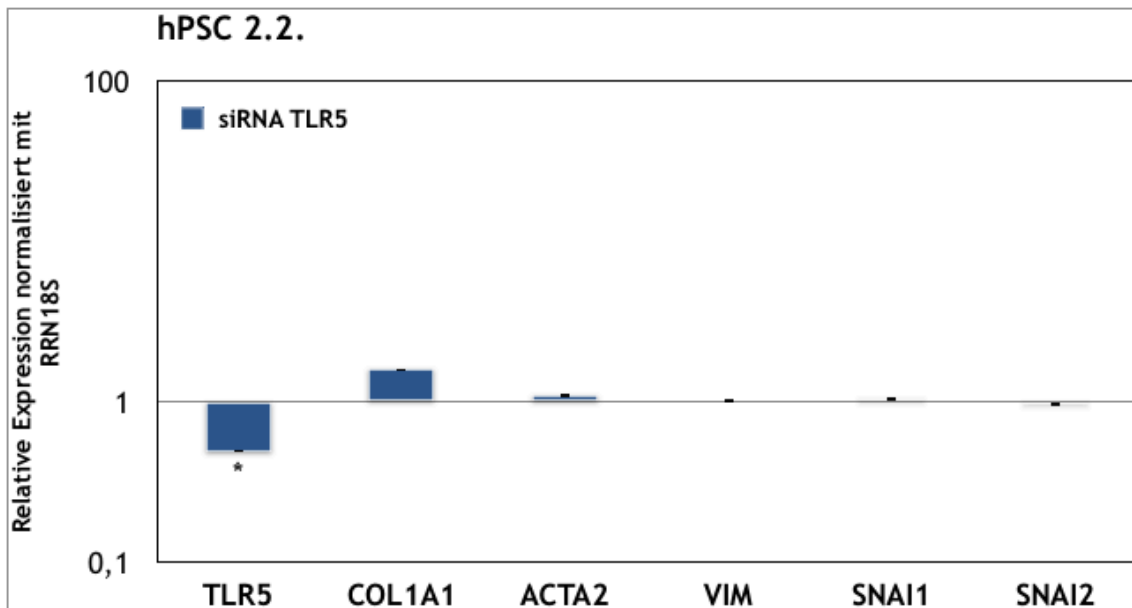


Abbildung 24: *hPSC 2.2. Zellen:* Relative Expression der Zielgene *TLR5*, *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* nach Transfektion (siRNA *TLR5*) für 48 h gegenüber der Negativkontrolle. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Der positive Standardfehler ist angegeben. Ebenso sind signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 mit einem „*“ gekennzeichnet.

6.3.2.1. *TLR 5* Knockdown und TGF- β 1 Behandlung

LX-2:

Nach 48-stündiger TGF- β 1 Behandlung präsentierte sich wie erwartete eine signifikante Hochregulation der untersuchten Aktivitätsmarker *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2*; die Zellen wurden somit von TGF- β 1 aktiviert. Der höchste mRNA Gehalt konnte hier für *COL1A1*, gefolgt von *SNAI1* und *ACTA2*, gemessen werden. Bei LX-2 Zellen mit *TLR 5* Knockdown und TGF- β 1 Behandlung zeigten sich *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* im Vergleich dazu weniger stark exprimiert bzw. weniger stark hochreguliert. Die zusätzliche TGF- β 1 Behandlung erschien nach *TLR 5* Inhibierung in ihrer Aktivierungseffizienz behindert und führte zu einer weniger ausgeprägten Genexpression der Aktivitätsmarker.

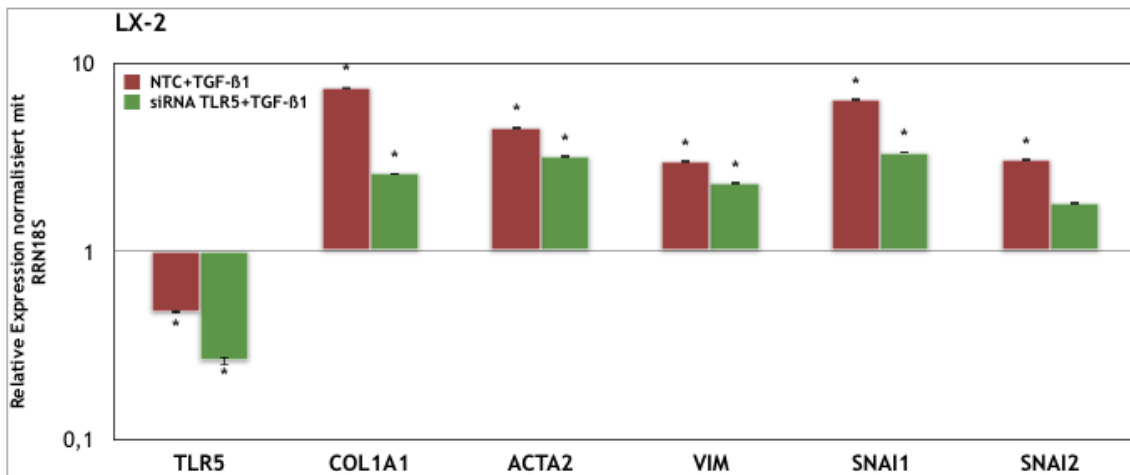


Abbildung 25: LX-2 Zellen: Relative Expression der Zielgene *TLR5*, *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* nach TGF-β1 Behandlung (**NTC + TGF-β1**) und nach Transfektion + TGF-β1 Behandlung (**siRNA TLR5 + TGF-β1**) für 48 h gegenüber der Negativkontrolle. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Der positive Standardfehler ist angegeben. Ebenso sind signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 mit einem „*“ gekennzeichnet.

hPSC 2.2.:

Nach 48-stündiger TGF-β1 Behandlung zeigte sich bei den Aktivitätsmarkern *COL1A1*, *ACTA2*, *SNAI1* und *SNAI2* eine vermehrte Expression mit signifikanter Hochregulation von *COL1A1* und *SNAI1*. Der höchste mRNA Gehalt konnte hier für den Aktivitätsmarker *SNAI1* gemessen werden. *VIM* zeigte sich in seiner Expression reduziert relativ zur Kontrolle. Nach *TLR 5* Inhibierung und TGF-β1 Behandlung zeigte sich eine vermehrte Expression der Aktivitätsfaktoren *COL1A1*, *ACTA2*, *SNAI1* und *SNAI2*; für die Marker *COL1A1*, *SNAI1* und *SNAI2* konnte eine signifikante Hochregulation der Gentranskription festgestellt werden. Es konnte demnach auch hier eine TGF-β1 induzierte Aktivierung von nicht transfizierten Zellen beobachtet werden, die jedoch zur geringeren Genexpression führte als in den vorherigen reinen Aktivierungsversuchen. Die TGF-β1 Wirkung zeigte sich im Vergleich dazu bei transfizierten Zellen ausgeprägter mit stärkerer Expression der Zielgene *COL1A1*, *ACTA2* und *SNAI2*. Vermutlich wurde dieser Umstand durch eine Interaktion des lipophoben TGF-β1 mit lipophiler AllStars Negative Control siRNA zu Ungunsten der aktivierenden TGF-β1 Wirkung verursacht.

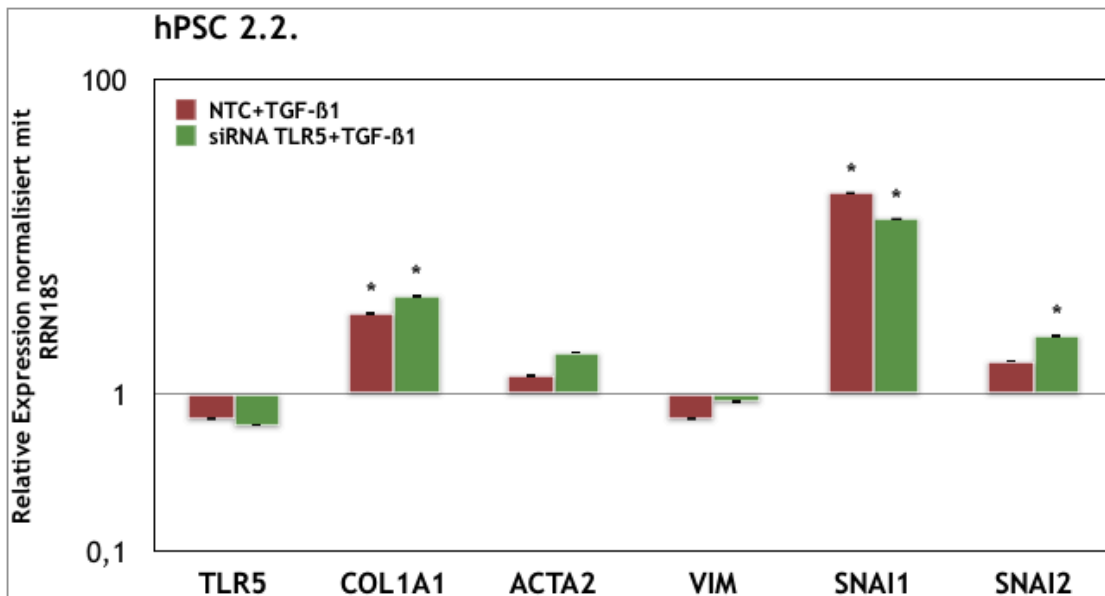


Abbildung 26: hPSC 2.2. Zellen: Relative Expression der Zielgene *TLR5*, *COL1A1*, *ACTA2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* nach TGF-β1 Behandlung (**NTC + TGF-β1**) und nach Transfektion + TGF-β1 Behandlung (**siRNA TLR5 + TGF-β1**) für 48 h gegenüber der Negativkontrolle. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Der positive Standardfehler ist angegeben. Ebenso sind signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 mit einem „*“ gekennzeichnet.

6.3.3. Bestimmung der Proteinexpression der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *ACTA2*, *SNAI1* und *TLR 5* mittels Westernblot

Um den Effekt des *TLR 5* Knockdowns und der TGF-β1 Behandlung auf die Proteinaktivität zu detektieren bzw. die Ergebnisse der qRT-PCR auf Proteinebene zu bestätigen, wurde ein Westernblot durchgeführt. Dafür wurden Proteinmengen von *COL1A1*, *ACTA2* und *SNAI1* nach 48-stündiger Transfektion und TGF-β1 Inkubation bestimmt. Als Ladekontrolle diente auch hier *β-Actin*.

LX-2:

Nach 48-stündiger TGF-β1 Behandlung präsentierte sich für alle untersuchten Proteine eine deutliche Expression. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kam es bei *COL1A1*, *SNAI1* und *TLR 5* zur Induktion der Proteinexpression mit sichtbar größeren Proteinbanden und es bestätigte sich die Induktion der Zellaktivierung durch TGF-β1. Nach *TLR 5* Knockdown zeigte sich entgegen der Ergebnisse der quantitative RT-PCR eine Expression von *TLR 5* jedoch eine deutliche Reduktion der Proteinexpression der Aktivitätsmarker *COL1A*,

ACTA2 und *SNAI1* mit deutlich schmalen bzw. kleineren Proteinbanden. Die zusätzliche TGF- β 1 Behandlung konnte während dem *TLR 5* Knockdown keine Zunahme der Proteinexpression der Aktivitätsmarker induzieren. Im Gegenteil, es wurden keine Proteinbanden für *COL1A1* und *SNAI1* sichtbar bzw. für *ACTA2* nur geringfügig sichtbar. Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen: TGF- β 1 induziert, wie bereits in der qRT-PCR gezeigt, eine Aktivierung von LX-2 Zellen mit Zunahme der Proteinexpression der Aktivitätsmarker. Nach einem *TLR 5* Knockdown mittels siRNA zeigt sich bei dieser Zelllinie zwar eine Expression von *TLR 5*, jedoch kommt es zu einer Reduktion der Genexpression der Aktivitätsmarker. Eine TGF- β 1 Behandlung während des *TLR 5* Knockdowns hat keinen steigernden Effekt auf die Aktivitätsmarker der untersuchten LX-2 Zellen. Damit bestätigen sich die Ergebnisse der qRT-PCR auf Proteinebene: Eine Transfektion mit siRNA gegen *TLR 5* inhibiert die Expression der Aktivitätsmarker und behindert die Aktivierbarkeit der Zellen durch TGF- β 1.

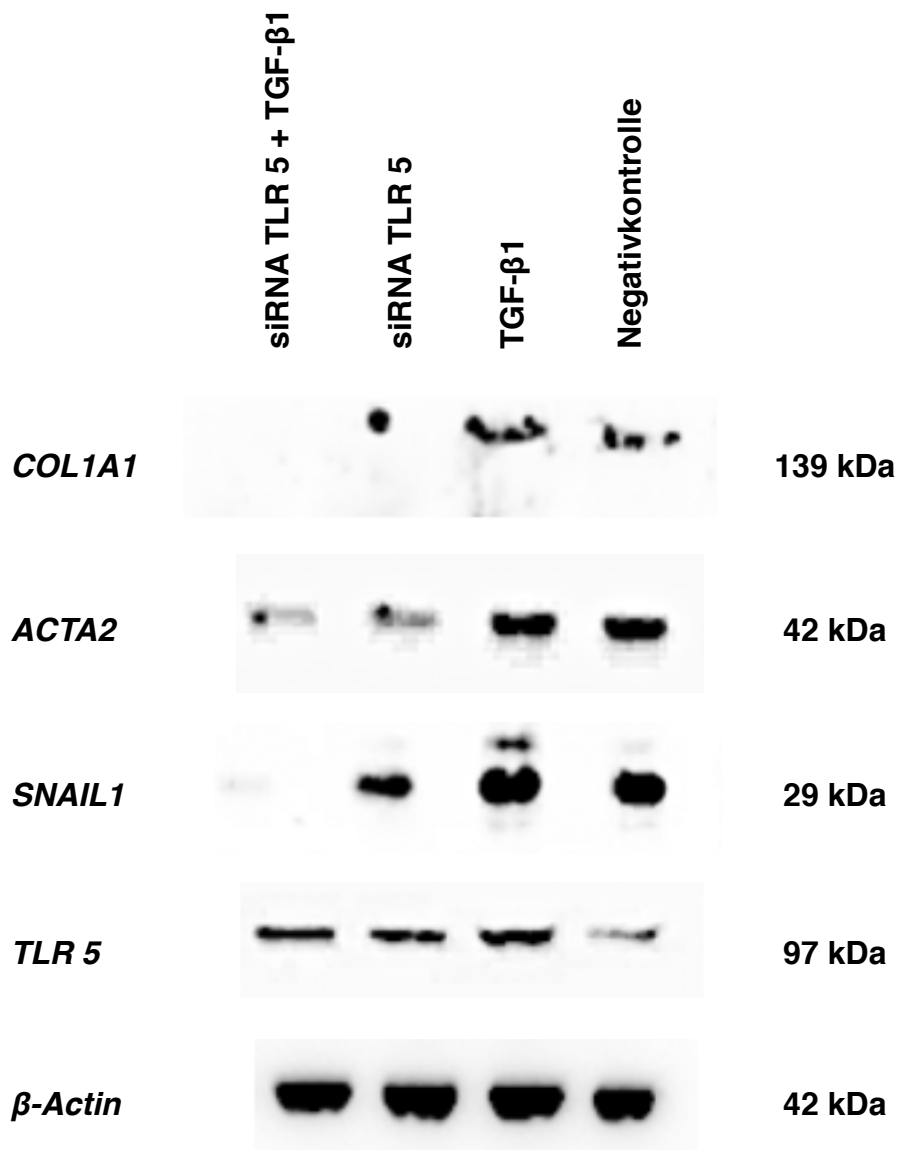


Abbildung 27: Westernblot für die Proteine *COL1A1*, *ACTA2*, *SNAIL1*, *TLR 5* und *β-Actin* (Ladekontrolle) von LX-2 Zellen nach TGF-β1 Behandlung (**TGF-β1**), *TLR 5* Knockdown (**siRNA TLR5**), *TLR 5* Knockdown und TGF-β1 Behandlung (**siRNA TLR5 + TGF-β1**), sowie **Negativkontrolle**. Die Molmasse der Zielproteine ist in kDa angegeben.

hPSC 2.2.:

Nach 48-stündiger TGF- β 1 Behandlung präsentierte sich für die untersuchten Proteine *COL1A1*, *ACTA2* und *TLR 5* eine deutliche Proteinbanden. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kam es durch TGF- β 1 zur Steigerung der Proteinexpression von *COL1A1* und *ACTA2* mit deutlich größeren bzw. überhaupt sichtbaren Proteinbanden. Die Proteinbanden von *TLR 5* erschienen hier etwa vergleichbar groß, was möglicherweise auf eine autokrine Aktivierung der hPSC 2.2. zurückzuführen ist. Nach *TLR 5* Knockdown zeigte sich auch hier eine Inhibierung von *TLR 5* mit sichtbar schmalere, ausgedünnte Proteinbanden. Bei den Aktivitätsmarkern *COL1A1*, *ACTA2* und *SNAI1* präsentierten sich deutlich sichtbare Proteinbanden und es konnte durch den *TLR 5* Knockdown kein hemmender Effekt auf die Aktivitätsmarker beobachtet werden. Durch eine zusätzliche TGF- β 1 Behandlung während dem *TLR 5* Knockdown ließ sich die nur Proteinexpression von *COL1A1* steigern. Die Proteinbande von *ACTA2* erschien etwas verschmälert und von *SNAI1* etwa gleich groß. Damit lässt sich zusammenfassen, dass sich die Induktion der Proteinexpression der Aktivitätsmarker durch TGF- β 1 auf Proteinebene bestätigt. Der *TLR 5* Knockdown inhibiert auch hier *TLR 5* sichtbar, allerdings zeigt sich im Gegensatz zu den Ergebnissen der qRT-PCR keine Inhibierung der Aktivitätsmarker. Durch eine zusätzliche TGF- β 1 Behandlung während des *TLR 5* Knockdowns ließ sich nur die Proteinexpression von *COL1A1* steigern. Auf die Proteinexpression der beiden übrigen Aktivitätsmarker *ACTA2* und *SNAI1* konnte kein steigernder Effekt beobachtet werden. Demnach ist auch auf Proteinebene zu vermuten, dass der *TLR 5* Knockdown eine Zellaktivierung mit TGF- β 1 einschränkt bzw. nur eine partiellen Aktivierbarkeit der Zellen nach *TLR 5* Knockdown mit Steigerung weniger Aktivitätsmarker möglich ist.

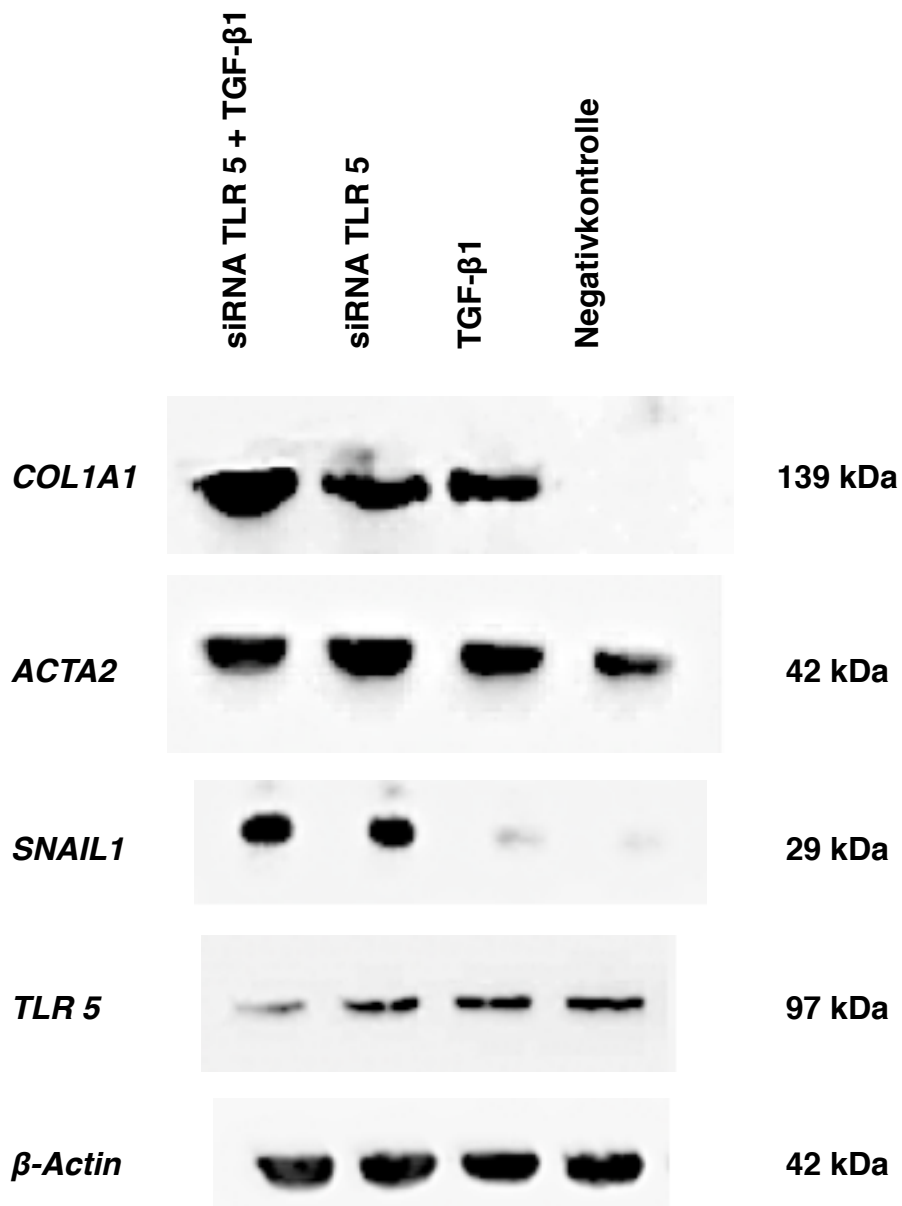


Abbildung 28: Westernblot für die Proteine *COL1A1*, *ACTA2*, *SNAIL1*, *TLR 5* und *β-Actin* (Ladekontrolle) von hPSC 2.2. Zellen nach TGF-β1 Behandlung (**TGF-β1**), TLR 5 Knockdown (**siRNA *TLR5***), TLR 5 Knockdown und TGF-β1 Behandlung (**siRNA *TLR5* + TGF-β1**), sowie **Negativkontrolle**. Die Molmasse der Zielproteine ist in kDa angegeben.

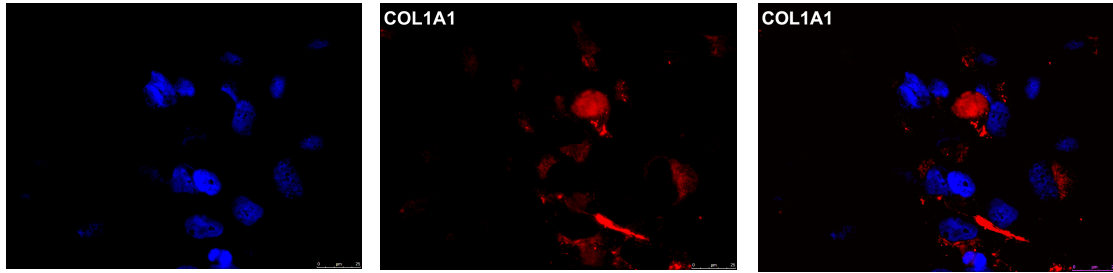
6.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz der Zielproteine *COL1A1*, *VIM*, *SNAI1* und *TLR 5*

Um den Effekt des *TLR 5* Knockdowns und der TGF- β 1 Behandlung auf das Fluoreszenzmuster der der Zielproteine zu untersuchen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz bei LX-2 und hPSC 2.2. Zellen durchgeführt. Dafür wurden Zellen beider Zelllinien wie oben beschrieben transfiziert und behandelt. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zielproteine *COL1A1*, *VIM* und *SNAI1* mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor® 568 rot markiert. Die blaue Markierung der Zellkerne erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33342). Beide Zelllinien wurden in 40-facher oder 63-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop randomisiert abfotografiert. Die Ergebnisse sind auf den folgenden Abbildungen zu sehen.

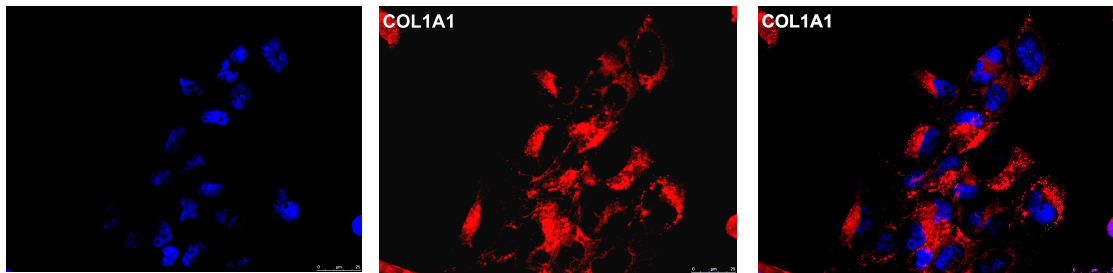
LX-2:

Nach 48-stündiger TGF- β 1 Behandlung präsentierte sich für den Aktivitätsmarker *COL1A1* ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal gegenüber unbehandelten Zellen. Nach dem *TLR 5* Knockdown kam es zur einer Reduktion der Proteinexpression mit einem sichtbar abgeschwächten Fluoreszenzsignal für *COL1A1*. Die Proteinexpression von *COL1A1* ließ sich durch eine TGF- β 1 Behandlung während des *TLR 5* Knockdowns etwas steigern mit leichter Zunahme der Fluoreszenz. Die Fluoreszenzstärke zeigte sich jedoch in ihrer Ausprägung deutlich schwächer als bei TGF- β 1 Probe.

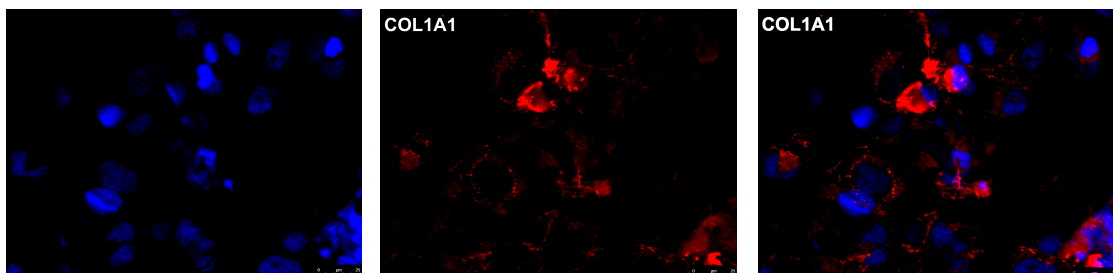
KO



TGF-β1



siRNA



siRNA + TGF-β1

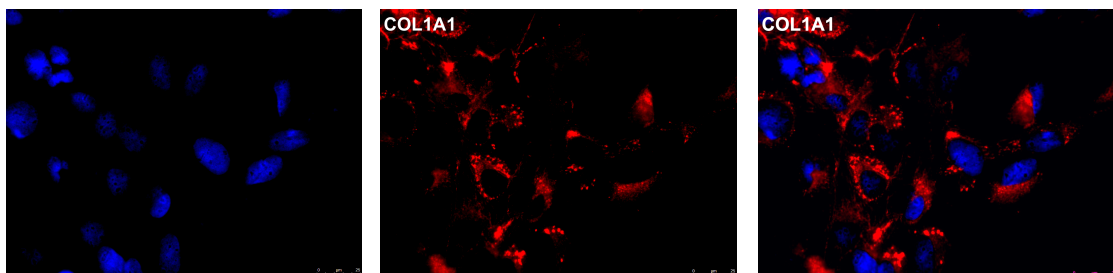
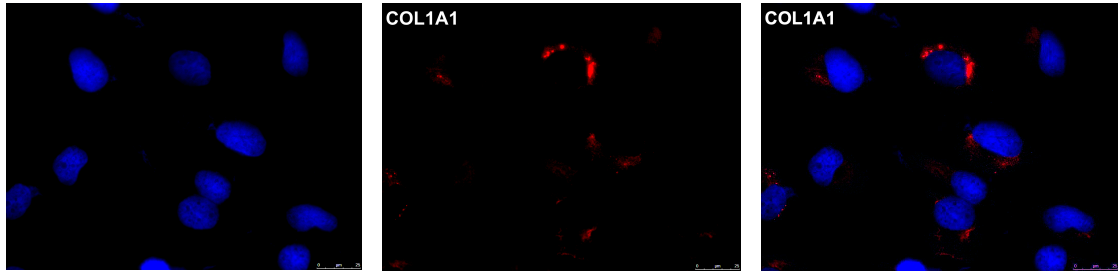


Abbildung 29: LX-2 Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *COL1A1* nach TGF-β1 Behandlung (**TGF-β1**), nach *TLR 5* Knockdown (**siRNA**), nach *TLR 5* Knockdown und TGF-β1 Behandlung (**siRNA + TGF-β1**) und Negativkontrolle (**KO**) für 48 h. Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

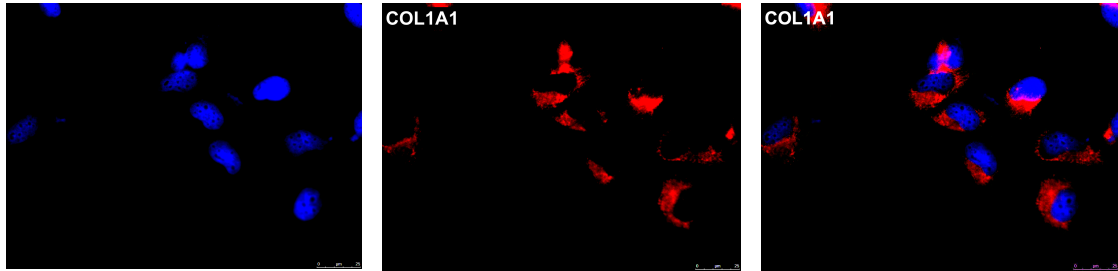
hPSC 2.2.:

Durch die TGF- β 1 Behandlung ließ sich für *COL1A1* auch bei dieser Ziellinie eine Induktion der Proteinexpression mit Fluoreszenzverstärkung beobachten. Die Inhibierung von *TLR 5* führte hier nur zu einer geringen Abnahme der Proteinexpression und Abschwächung der Fluoreszenz. Eine TGF- β 1 Behandlung während des *TLR 5* Knockdowns zeigte einen steigernden Effekt auf die Fluoreszenz des Proteins, erreichte aber auch hier nicht die Signalstärke der TGF- β 1 Probe.

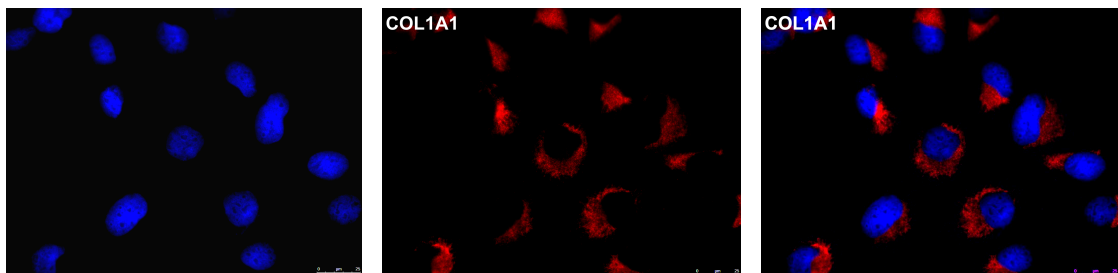
KO



TGF- β 1



siRNA



siRNA + TGF- β 1

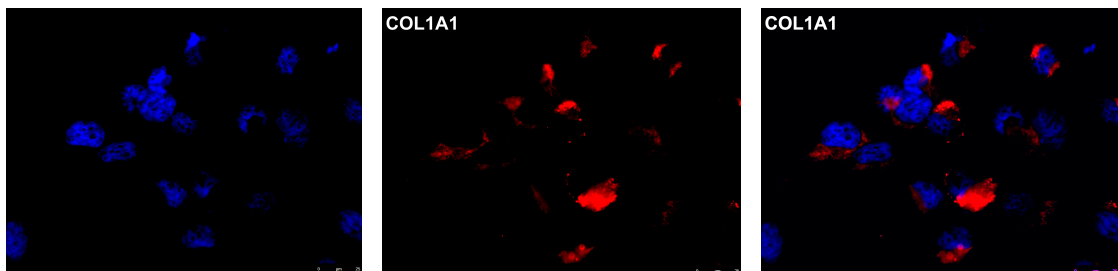
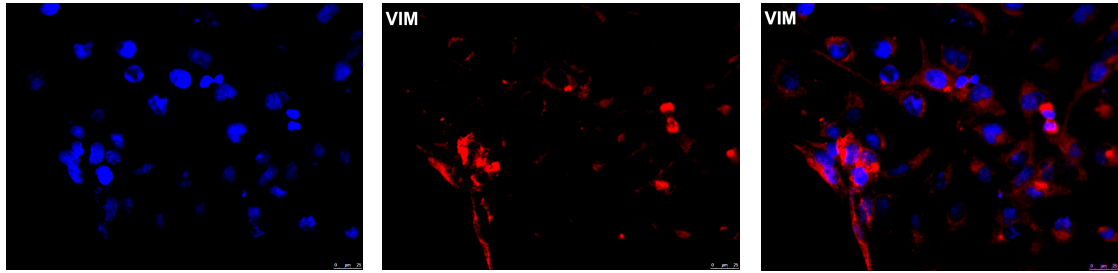


Abbildung 30: hPSC 2.2. Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *COL1A1* nach TGF- β 1 Behandlung (**TGF- β 1**), nach *TLR 5* Knockdown (**siRNA**), nach *TLR 5* Knockdown und TGF- β 1 Behandlung (**siRNA + TGF- β 1**) und Negativkontrolle (**KO**) für 48 h. Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

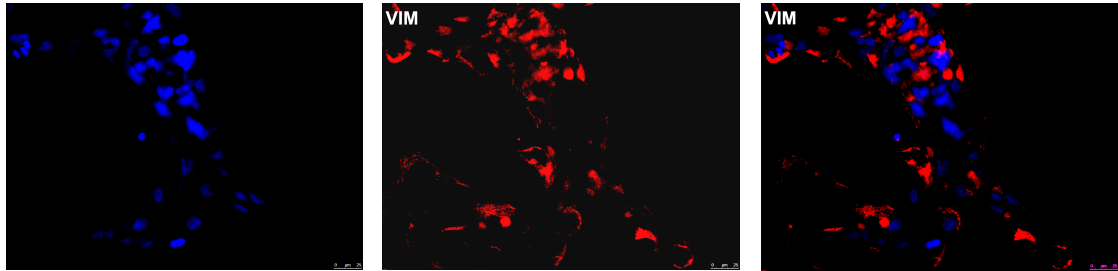
LX-2:

Für den Aktivitätsmarker *VIM* präsentierte sich nach 48-stündiger TGF- β 1 Behandlung eine Induktion der Proteinexpression mit deutlicher Zunahme des Fluoreszenzsignals. Der *TLR 5* Knockdown führte zur Inhibierung der *VIM* Expression und Abnahme der Fluoreszenz. Durch die zusätzliche TGF- β 1 Behandlung während des *TLR 5* Knockdowns konnte eine leichte Steigerung der Fluoreszenz beobachtet werden.

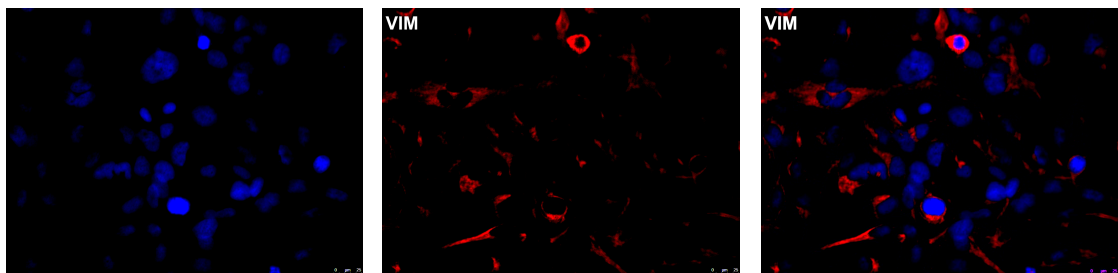
KO



TGF-β1



siRNA



siRNA + TGF-β1

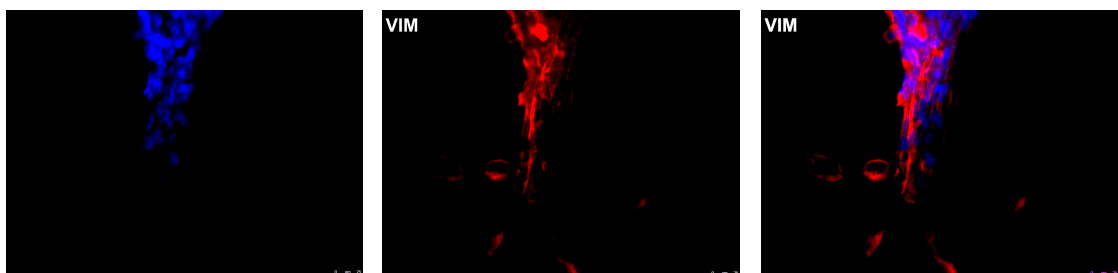
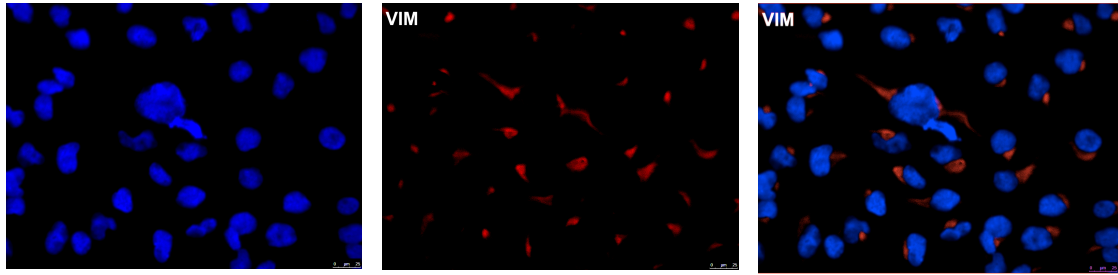


Abbildung 31: LX-2 Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein VIM nach TGF-β1 Behandlung (**TGF-β1**), nach *TLR 5* Knockdown (**siRNA**), nach *TLR 5* Knockdown und TGF-β1 Behandlung (**siRNA + TGF-β1**) und Negativkontrolle (**KO**) für 48 h. Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 40-facher Vergrößerung.

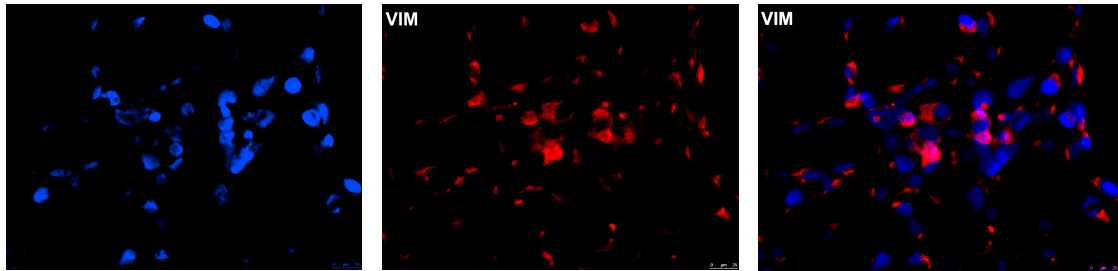
hPSC 2.2.:

Bei der pankreatischen Zelllinien zeigte sich für *VIM* ebenfalls eine Induktion durch TGF- β 1 mit Verstärkung der Fluoreszenz. Die *VIM* Expression nahm durch den *TLR 5* Knockdown sichtbar ab. Nach zusätzlicher TGF- β 1 Behandlung ließ sich nur eine geringfügige Zunahme der Fluoreszenz feststellen und fraglich gesteigerten Effekt auf die Proteinexpression von *VIM* durch TGF- β 1.

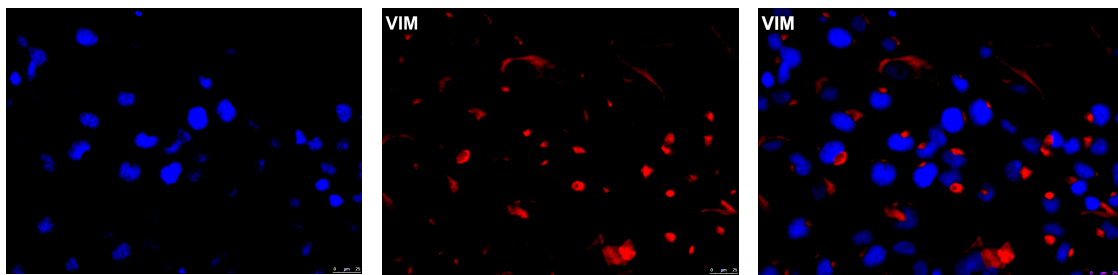
KO



TGF- β 1



siRNA



siRNA + TGF- β 1

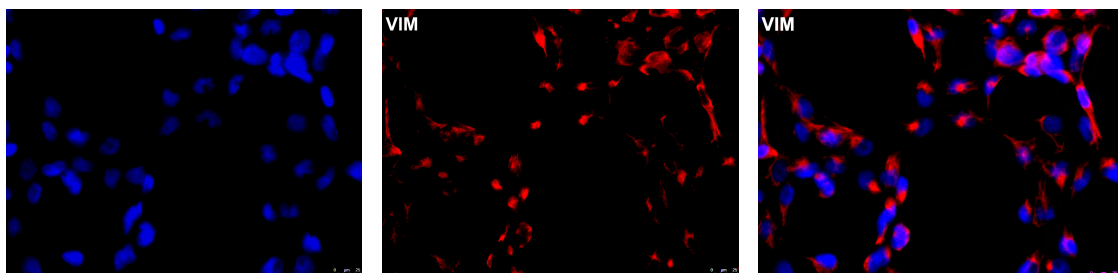
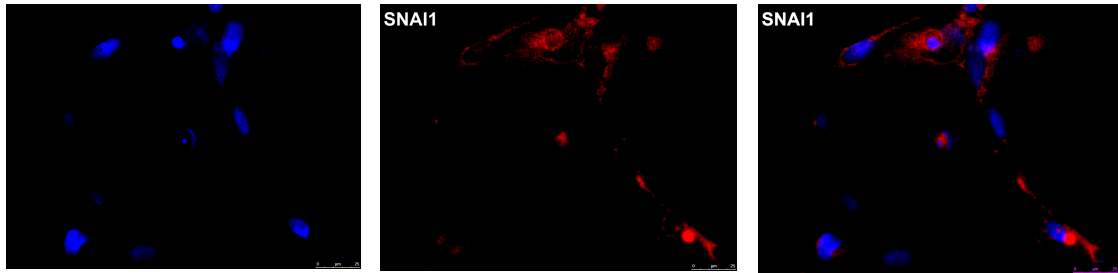


Abbildung 32: hPSC 2.2. Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *VIM* nach TGF- β 1 Behandlung (**TGF- β 1**), nach *TLR 5* Knockdown (**siRNA**), nach *TLR 5* Knockdown und TGF- β 1 Behandlung (**siRNA + TGF- β 1**) und Negativkontrolle (**KO**) für 48 h. Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 40-facher Vergrößerung.

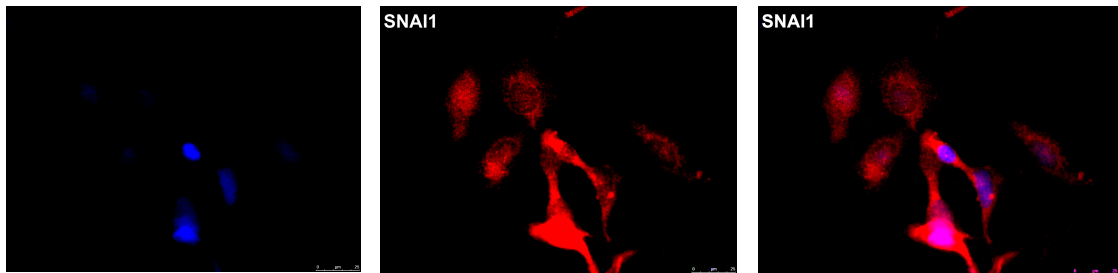
LX-2:

Nach 48-stündiger TGF- β 1 Behandlung imponierte der Aktivitätsmarker *SNAI1* mit einer deutlichen Steigerung der Proteinexpression und stark sichtbarer Fluoreszenz. Durch die *TLR 5* Inhibierung kam es zur deutlichen Reduktion der *SNAI1* Expression. Eine zusätzliche TGF- β 1 Behandlung während des *TLR 5* Knockdowns verursachte eine Zunahme der Fluoreszenz, die jedoch nicht die Signalstärke von nur mit TGF- β 1 behandelten Zellen erreichte.

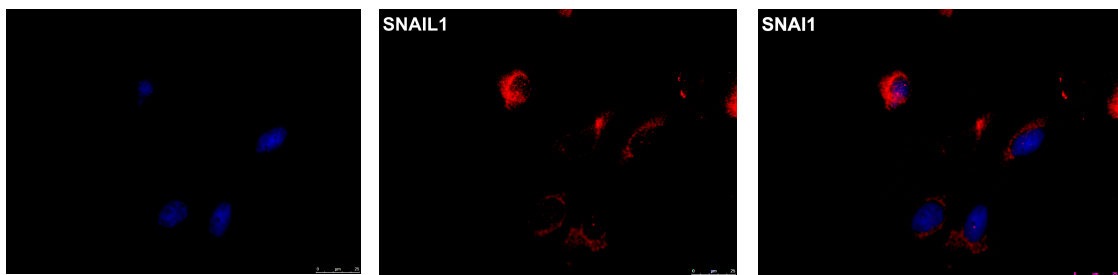
KO



TGF-β1



siRNA



siRNA + TGF-β1

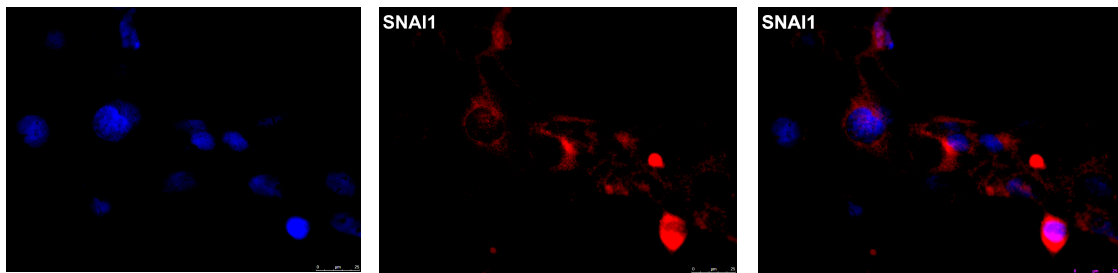
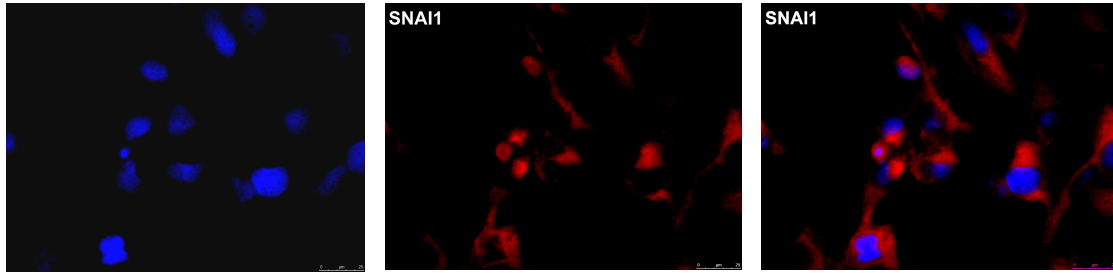


Abbildung 33: LX-2 Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein SNAI1 nach TGF-β1 Behandlung (**TGF-β1**), nach *TLR 5* Knockdown (**siRNA**), nach *TLR 5* Knockdown und TGF-β1 Behandlung (**siRNA + TGF-β1**) und Negativkontrolle (**KO**) für 48 h. Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

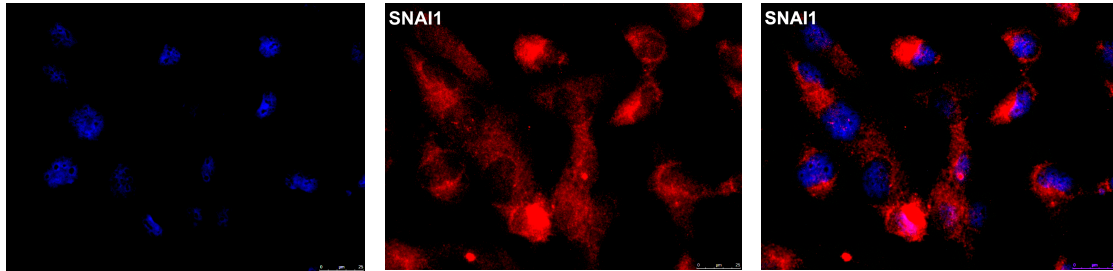
hPSC 2.2.:

Bei dieser Ziellinie präsentierte sich eine deutliche Induktion des Aktivitätsmarkers *SNAI1* durch TGF- β 1 gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der *TLR 5* Knockdown reduzierte die Fluoreszenzstärke von *SNAI1* und somit die Proteinexpression des Aktivitätsmarkers. Durch zusätzliche TGF- β 1 Behandlung während dem *TLR 5* Knockdown verstärkte sich die Proteinexpression wieder und es konnte eine stärkere Fluoreszenz für *SNAI1* beobachtet werden.

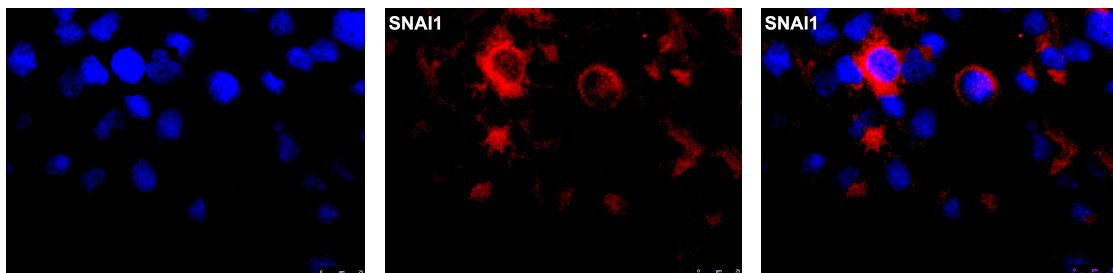
KO



TGF- β 1



siRNA



siRNA + TGF- β 1

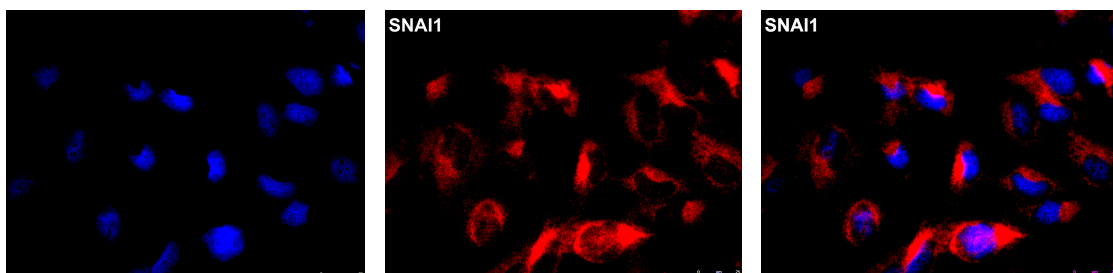
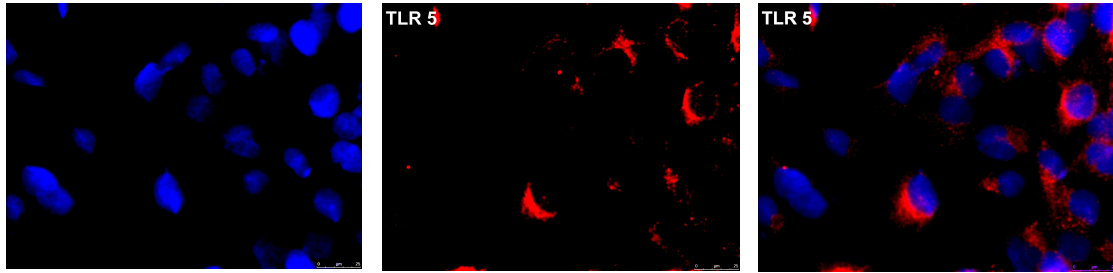


Abbildung 34: hPSC 2.2. Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein SNAI1 nach TGF- β 1 Behandlung (**TGF- β 1**), nach *TLR 5* Knockdown (**siRNA**), nach *TLR 5* Knockdown und TGF- β 1 Behandlung (**siRNA + TGF- β 1**) und Negativkontrolle (**KO**) für 48 h. Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

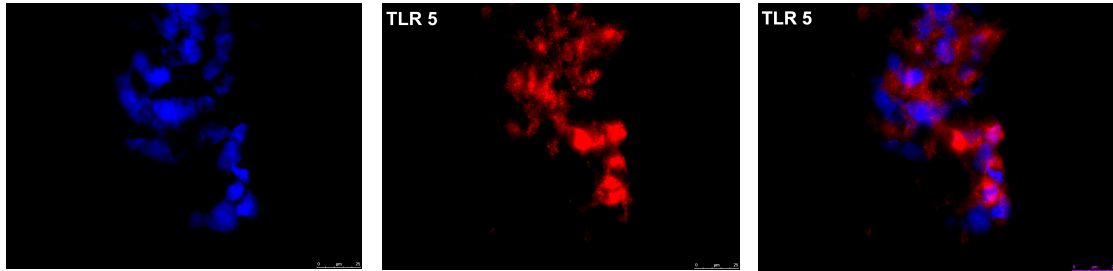
LX-2:

Bei den untersuchten Zellen präsentierte sich eine sichtbare Steigerung der Proteinexpression für *TLR 5* nach 48-stündiger TGF- β 1 Behandlung. Durch den *TLR 5* Knockdown konnte eine erfolgreiche Inhibierung von *TLR 5* mit deutlicher Reduktion der Proteinexpression und kaum sichtbare Fluoreszenz erzielt werden; diese konnte durch eine zusätzliche TGF- β 1 Behandlung nicht beeinflusst werden.

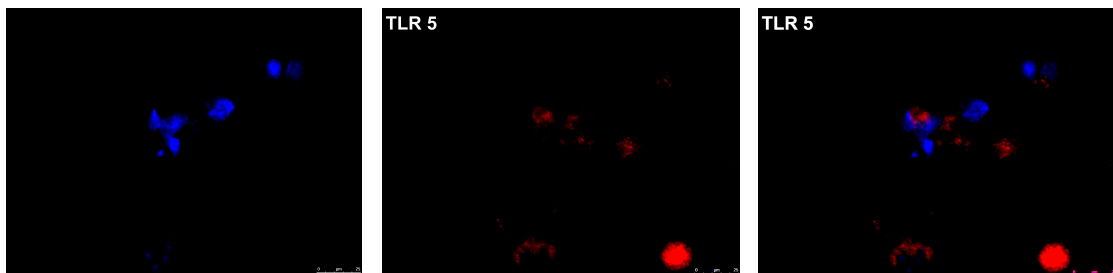
KO



TGF- β 1



siRNA



siRNA + TGF- β 1

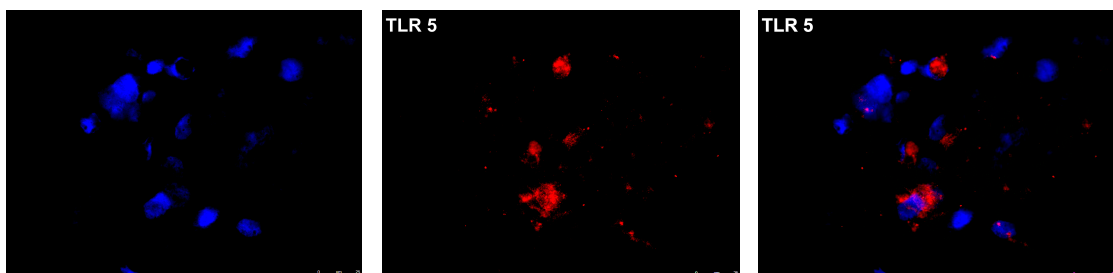
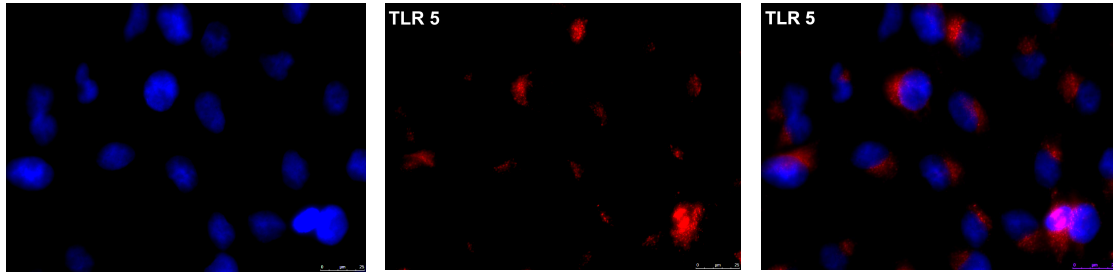


Abbildung 35: LX-2 Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *TLR 5* nach TGF- β 1 Behandlung (**TGF- β 1**), nach *TLR 5* Knockdown (**siRNA**), nach *TLR 5* Knockdown und TGF- β 1 Behandlung (**siRNA + TGF- β 1**) und Negativkontrolle (**KO**) für 48 h. Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

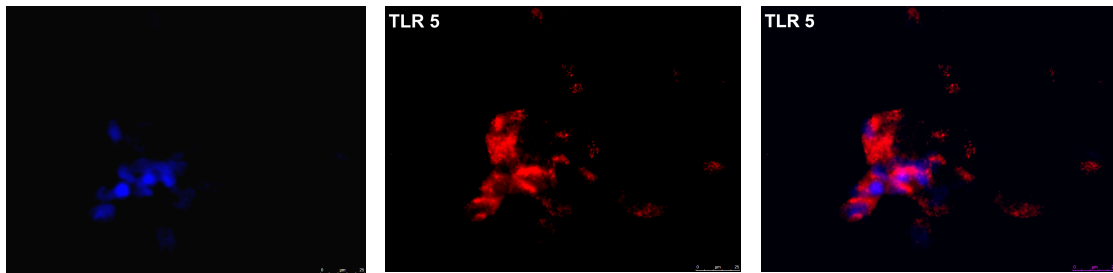
hPSC 2.2.:

Nach 48-stündiger TGF- β 1 Behandlung konnte für die untersuchten Zellen dieser Ziellinie ähnliche Beobachtungen gemacht werden: TGF- β 1 induzierte eine vermehrte *TLR 5* Expression mit sichtbarer Steigerung des Fluoreszenzsignals. Der *TLR 5* Knockdown führte zur erfolgreichen Inhibierung von *TLR 5* und ausgeprägten Reduktion der *TLR 5* Fluoreszenz. Nach zusätzlicher TGF- β 1 Behandlung der Zellen zeigte sich eine Steigerung der *TLR 5* Fluoreszenz.

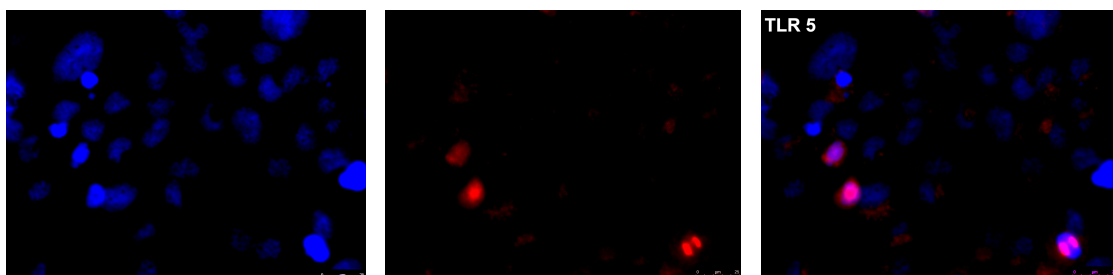
KO



TGF- β 1



siRNA



siRNA + TGF- β 1

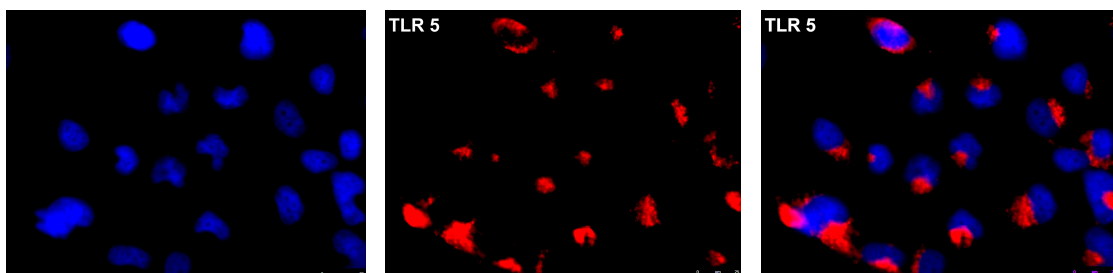


Abbildung 36: hPSC 2.2. Zellen: Indirekte Immunfluoreszenz für das Zielprotein *TLR 5* nach TGF- β 1 Behandlung (**TGF- β 1**), nach *TLR 5* Knockdown (**siRNA**), nach *TLR 5* Knockdown und TGF- β 1 Behandlung (**siRNA + TGF- β 1**) und Negativkontrolle (**KO**) für 48 h. Die linke Seite zeigt die mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) blau angefärbten Zellkerne. Die Mitte zeigt das Zielprotein mit AlexaFluor® 568 rot markiert. Die rechte Seite zeigt Zellkerne und Zielprotein im Overlay. Randomisiert abfotografiert im Immunfluoreszenzmikroskop in 63-facher Vergrößerung.

Aus diesen Ergebnissen kann folgendes zusammengefasst werden: Bei LX-2 Zellen kam es nach 48-stündiger TGF- β 1 Behandlung bei allen untersuchten Proteinen zu einer Induktion der Proteinexpression mit sichtbarer Zunahme der Fluoreszenz und somit Aktivierung der untersuchten Zellen. Nach *TLR 5* Knockdown konnte eine erfolgreiche Inhibierung von *TLR 5* festgestellt werden und es präsentierte sich eine stark reduzierte Proteinexpression der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *VIM* und *SNAI1*. Eine zusätzliche TGF- β 1 Behandlung der LX-2 Zellen konnte bei *COL1A1*, *VIM* und *SNAI1* eine Verstärkung der Fluoreszenz erzielen, die jedoch der Signalstärke von ausschließlich mit TGF- β 1 behandelten Zellen deutlich unterlag. Somit bestätigten sich der inhibierende Effekt des *TLR 5* Knockdowns auf das Verhalten der Aktivitätsmarker der vorangegangenen Ergebnisse bzw. ein inhibierender Effekt auf die Aktivierbarkeit der LX-2 Zellen durch TGF- β 1.

Über die untersuchten hPSC 2.2. Zellen lässt sich zusammenfassend sagen, dass auch hier eine 48-stündige TGF- β 1 Behandlung zur Induktion der Aktivitätsmarker führte und somit von einer Aktivierung der Zellen ausgegangen werden kann. Der Knockdown von *TLR 5* erzielte eine deutliche Reduktion der *TLR 5* Expression und somit eine erfolgreiche Inhibierung des Proteins. Außerdem konnte hier ein leicht reduzierender Effekt auf die Proteinexpression der Aktivitätsmarker mit reduzierter Fluoreszenz beobachtet werden. Eine zusätzliche TGF- β 1 Behandlung während des Knockdowns führte zur Steigerung der Proteinexpression der Proteine *COL1A1*, *VIM*, *SNAI1* mit annähernd ausgeprägter Signalstärke wie ausschließlich aktivierte Zellen. Demnach bestätigt sich auch bei hPSC 2.2. ein gewisser inhibierender Effekt des *TLR 5* Knockdowns auf die untersuchten Aktivitätsmarker und eine eingeschränkte Aktivierbarkeit der Zellen durch TGF- β 1 nach *TLR 5* Inhibierung.

6.3.5. Echtzeit-Beobachtung des zellulären Verhaltens der Zelllinien

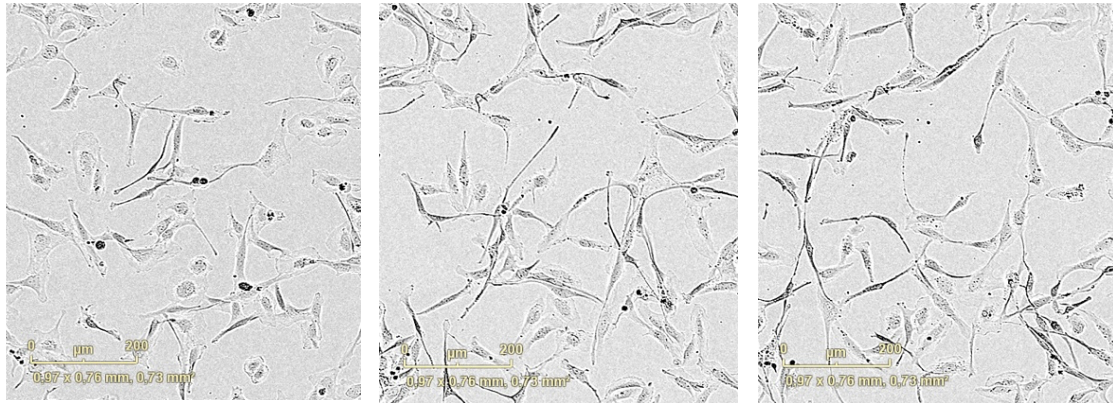
LX-2 und hPSC 2.2.

Um den Effekt des *TLR 5* Knockdowns und der TGF- β 1 Behandlung auf die Morphologie und das Proliferationsverhalten beider Zelllinien in Echtzeit zu beobachten, wurde eine in vitro Bildgebung mittels IncuCyte® ZOOM Live-Cell Analysis System durchgeführt. Dafür wurden LX-2 und hPSC 2.2. Zellen wie oben beschrieben transfiziert und mit TGF- β 1 behandelt. Der Bildgebungszeitraum entsprach der 48-stündigen Inkubationszeit, das bildgebende Intervall wurde zweistündig gewählt. Auf folgenden Abbildungen sind Bilder vom Beginn der Inkubation, nach 24 Stunden und nach 48 Stunden dargestellt.

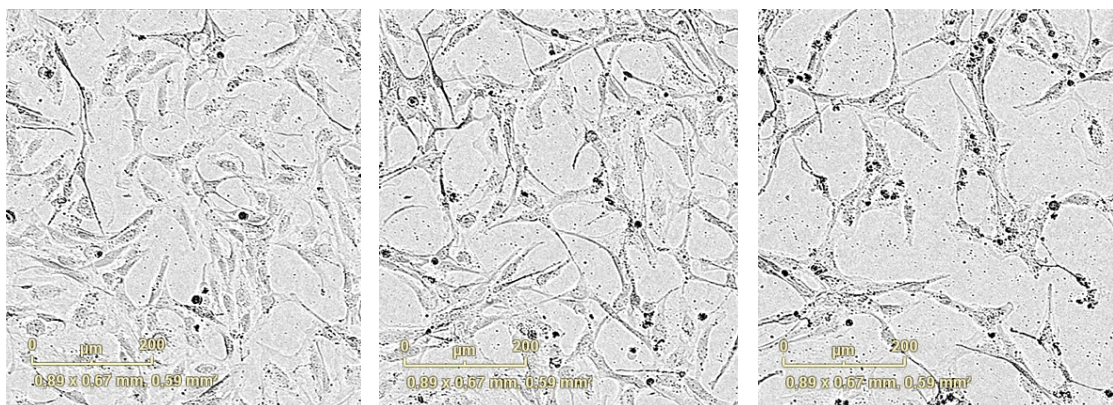
LX-2:

Nach 24 Stunden Inkubationszeit: In der Kontrollprobe ließen sich nur geringfügige Veränderungen erkennen. Die Zellen präsentierten die typische quieszente Morphologie mit spindelartigen Zellkörpern und dendritischen Zellfortsätzen, die sich im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt etwas verlängerten. Bei der TGF- β 1 Probe zeigten die untersuchten Zellen deutliche Hinweise einer Zellaktivierung: Es ließen sich sichtbare Veränderungen der Zellmorphologie mit Verdickung der Zellkörper beobachten. Nach *TLR 5* Knockdown und TGF- β 1 Behandlung zeigte sich eine Zunahme der Zellproliferation ohne dass sich morphologische Veränderungen finden ließen. Nach 48 Stunden Inkubationszeit: Für die Zellen der unbehandelten Kontrollprobe konnten keine weiteren Veränderung beobachtet werden. Bei den beiden Proben mit TGF- β 1 Behandlung ließ sich ein vermehrter Untergang der Zellen mit deutlicher Abnahme der Zellzahl erkennen. In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass eine TGF- β 1 Behandlung in den ersten 24 Stunden zur Aktivierung der Zellen führt und es 48 Stunden es zum Absterben der Zellen kommt. Eine *TLR 5* Inhibierung verhindert morphologische Zellveränderungen und behindert demnach die TGF- β 1 vermittelte Aktivierung.

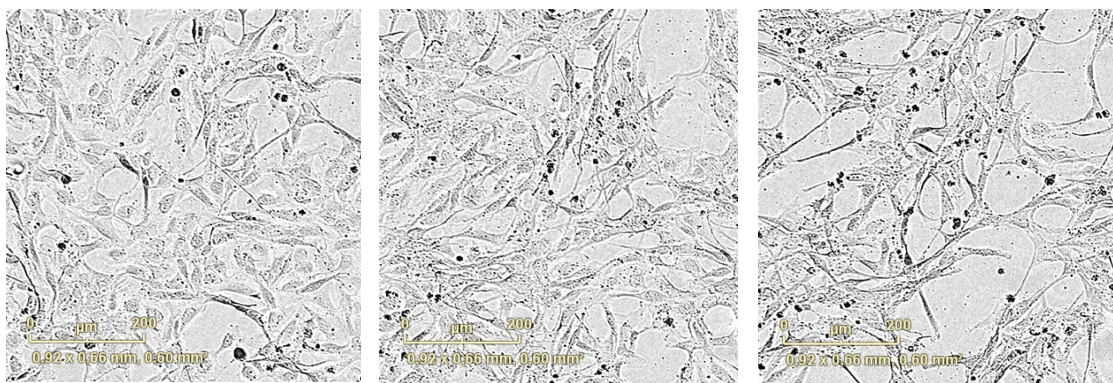
KO



TGF-β1



siRNA + TGF-β1



0 h

24 h

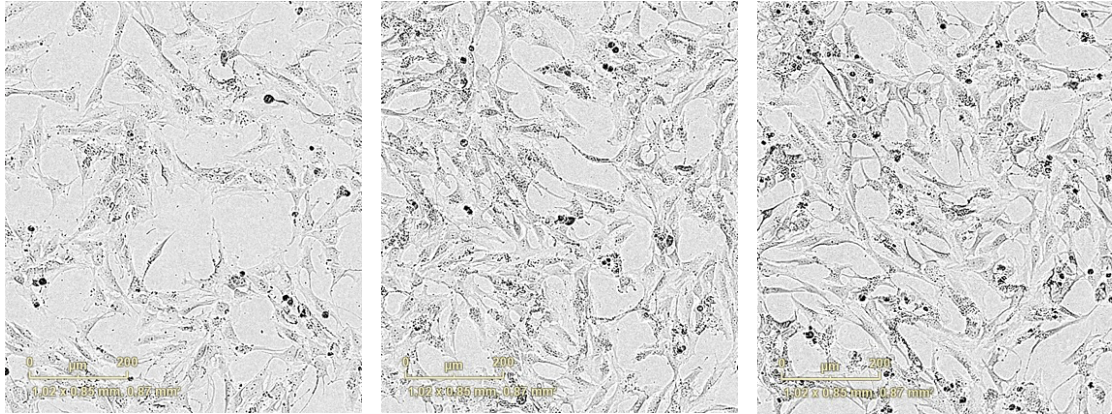
48 h

Abbildung 37: LX-2 Zellen: Echtzeit-Beobachtung mittels IncuCyte® ZOOM Live-Cell Analysis System von unbehandelten Zellen (**KO**), nach TGF-β1 Behandlung (**TGF-β1**) und nach Transfektion plus TGF-β1 Behandlung (**siRNA + TGF-β1**) für 48 h. Bildgebung zu Beginn der Inkubation, nach 24 h und nach 48 h.

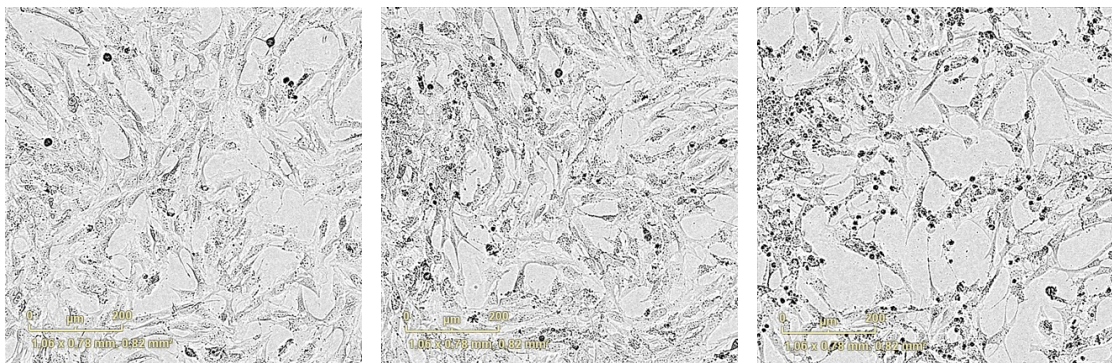
hPSC 2.2.:

Nach 24-stündiger Inkubation: Die unbehandelte Kontrollprobe präsentierte quieszente Zellen mit spindelförmigen, sternförmigen und länglichen Zellkörpern, sowie eine Proliferation der Zellen. Bei den mit TGF- β 1 behandelten Zellen zeigten sich Anhaltspunkte für eine Zellaktivierung. Es präsentierte sich deutlich verdickte Zellen, die kaum voneinander abzugrenzen waren und eine gesteigerte Proliferation. Bei *TLR 5* Inhibierung und TGF- β 1 Behandlung konnte ebenfalls eine Zellproliferation festgestellt werden; deutliche Veränderungen der Zellmorphologie ließen sich nicht beobachten. Nach 48-stündiger Inkubation: Für unbehandelte Zellen ließen sich auch hier keine weiteren Veränderungen erkennen. In den beiden anderen Proben zeigten sich am Ende der Inkubationszeit viele abgestorbene Zellen und deutlich weniger vitale Zellen. Zusammenfassend lässt sich für Zellen der hPSC 2.2. Zelllinie feststellen, dass TGF- β 1 in den ersten 24 Stunden zur Aktivierung der Zellen führt und nach 48 Stunden es zum Absterben der Zellen kommt. Eine *TLR 5* Inhibierung behindert die TGF- β 1 Effizienz und die Zellen zeigen keine morphologischen Hinweise auf eine Aktivierung.

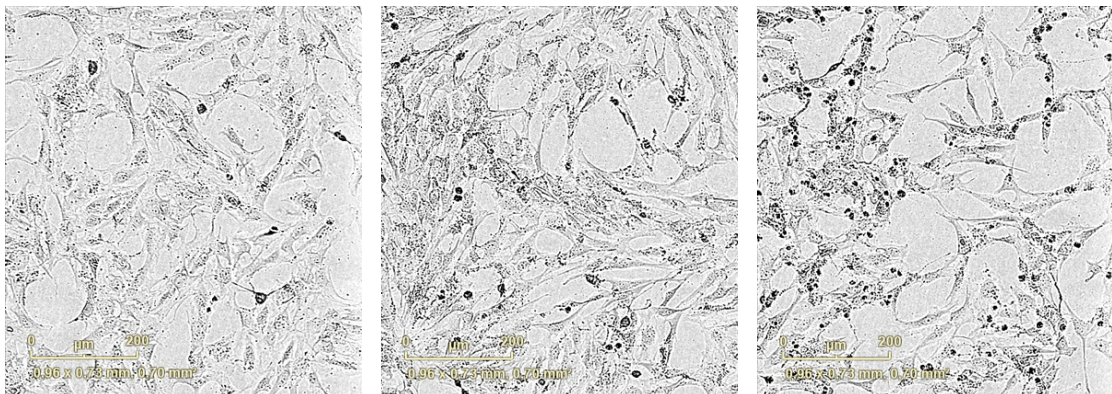
KO



TGF-β1



siRNA + TGF-β1



0 h

24 h

48 h

Abbildung 38: hPSC 2.2. Zellen: Echtzeit-Beobachtung mittels IncuCyte® ZOOM Live-Cell Analysis System von unbehandelten Zellen (**KO**), nach TGF-β1 Behandlung (**TGF-β1**) und nach Transfektion plus TGF-β1 Behandlung (**siRNA + TGF-β1**) für 48 h. Bildgebung zu Beginn der Inkubation, nach 24 h und nach 48 h.

7. Diskussion

Die Fibrose ist eine schwerwiegende Begleiterscheinung vieler akuter und chronischer Erkrankungen von Leber und Pankreas und resultiert aus anhaltenden, inflammatorischen Gewebereaktionen in Verbindung mit einer übermäßigen Produktion extrazellulärer Matrixproteine durch hepatische und pankreatische Sternzellen. Hauptauslöser für den fibrotischen Organumbau von Leber und Pankreas in industrialisierten Ländern sind vor allem die Alkoholische und Nicht-Alkoholische Steatohepatitis (ASH/ NASH), chronische Virushepatitis, Autoimmunhepatitis bzw. chronische Pankreatitis, zystische Pankreasfibrose, sowie das Duktale Adenokarzinom des Pankreas. Diese münden oftmals in einer Zerstörung der physiologischen Organarchitektur durch fibrotische oder schließlich zirrhotische Umbauprozesse mit Störungen der Organfunktion bis hin zur Insuffizienz (Bataller und Brenner, 2005). Durch die stetige Zunahme von Risikofaktoren steigt auch die Inzidenz für Fibrose-assoziierte Erkrankungen an (Carcia-Compean et al. 2020). Außer einer kausalen Therapie der zugrundeliegenden Erkrankung existiert aktuell nur eine begrenzte Anzahl an spezifischen, antifibrotischen Therapieverfahren. Da die Aktivierung von Sternzellen als Hauptmediator der Fibrose gilt, ist es daher wichtig modulierende Faktoren der Sternzellaktivierung weiter auf ihre Einflussnahme zu erforschen, um so neue Grundlagen für antifibrotische Therapieansätze und Präventionsmaßnahmen für Fibrose-assoziierte Erkrankungen in Leber und Pankreas zu schaffen. Als ein vielversprechendes Therapieziel zeigte sich bislang in Studien die Hemmung des profibrinogenen Zytokins TGF- β 1, einem bekannten Initiator der Sternzellaktivierung (Chang und Li, 2020). Als weiterer Modulator der Sternzellinaktivierung konnte zudem die Hemmung von einigen TLR etabliert werden, die von Sternzellen exprimiert werden und sie damit empfänglich für Stimuli aus ihrer Umgebung, sowie dem Mikrobiom machen (Yuan et al. 2017) (Dattaroy et al. 2018) (Watanabe et al. 2007). Dieses Ziel verfolgend, wurde sich in dieser Arbeit vorwiegend auf den Einfluss von TLR 5 auf das zelluläre Verhalten und auf die Aktivierungseffizienz von TGF- β 1 bei hepatischen und pankreatischen Sternzellen konzentriert. Um diesen Einfluss auf das zelluläre Verhalten genauer zu untersuchen, wurden eine Zellaktivierung mit TGF- β 1 induziert und im Verlauf TLR 5 mittels Knockdown

inhibiert und die eintretenden Veränderungen hinsichtlich zellulärem Verhalten und TGF- β 1 Effizienz analysiert.

7.1. TGF- β 1 aktiviert hepatische und pankreatische Sternzellen

Basierend auf den Ergebnissen vorangegangener Studien wurde initial das aktivierende Potential von TGF- β 1 bei humanen Sternzellen geprüft. Die Hypothese, dass TGF- β 1 eine Aktivierung von hepatischen und pankreatischen Sternzellen induziert (Xu et al. 2005) (Jesnowski et al. 2005) (Bynigeri et al. 2017), kann durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. In der primären Quantifizierung mittels qRT-PCR konnte bereits eine signifikante Hochregulation etablierter Aktivitätsmarker bei LX-2 und hPSC 2.2. Zellen gezeigt werden. Da diese Methode fehleranfällig ist und es unter Umständen zu fehlerhaften Messungen kommen kann, wurde zur Bestätigung der Ergebnisse auf Proteinebene eine Bestimmung der Proteinexpression mittels Westernblot durchgeführt, die die Ergebnisse bekräftigten: Bei den mit TGF- β 1 behandelten Zelllinien zeigte sich eine deutlich gesteigerte Proteinexpression der Aktivitätsmarker. Diese gesteigerte Proteinexpression ließ sich mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung der Zielproteine nochmals bestätigen. Ähnliche Ergebnisse präsentierten sich auch in der Echtzeit-Bildgebung des zellulären Verhaltens mittels Incucyte®: Durch die TGF- β 1 Behandlung kam es zur Steigerung der Proliferation und morphologischen Zellveränderungen in den ersten 24 Stunden, die auf eine Transdifferenzierung zu aktiven Myofibroblasten hinwiesen (Friedman, 2008) (Bynigeri et al. 2017). Es wird also die Auffassung, TGF- β 1 induziere die Aktivierung hepatischer und pankreatischer Sternzellen (Xu et al. 2005) (Jesnowski et al. 2005), bestätigt: Nach TGF- β 1 Behandlung zeigt sich ein stärkeres Zellwachstum, morphologische Hinweise auf Transdifferenzierung in aktive Myofibroblasten und eine vermehrte Expression typischer Aktivierungsmarker. Die Expression von TLR bei humanen Sternzellen und deren Einfluss auf Sternzellen wird im Folgenden diskutiert.

7.2. TLR Expression bei humanen LX-2 und hPSC 2.2. Zellen

Es ist bekannt, dass quieszente und aktivierte Sternzellen über eine ausgeprägte immunologische Kompetenz verfügen und TLR exprimieren (Higashi et al., 2017) (Bynigeri et al., 2017). Damit sind sie in der Lage spezifisch pathogene Molekülstrukturen von Mikroorganismen, sogenannte

PAMP, und molekulare Strukturen abgestorbener Zellen, sogenannte DAMP, zu binden und über intrazelluläre Signalwege immunologische bzw. inflammatorische Reaktionen zu generieren (Kiziltas, 2016) (Aoyama, Paik und Seki, 2010) (Masamune et al., 2008). Die Erkennung der Liganden erfolgt dabei spezifisch und aktiviert den entsprechenden TLR Signalweg. (O'Neill und Bowie, 2007). Die intrazelluläre Signaltransduktion resultiert schließlich in der Aktivierung nuklearer Transkriptionsfaktoren und gesteigerter Produktion inflammatorischer Zytokine zur Elimination des pathogenen Stimulus (Lin et al., 2011) (De Nardo, 2015). Humane Sternzellen exprimieren TLR 1, TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 6 und TLR 10 auf ihrer Zelloberfläche und können damit bakterielle, virale, mykotische und zelluläre Membranbestandteile binden, während TLR 3, TLR 7, TLR 8 und TLR 9 endosomal exprimiert werden und bakterielle, virale, sowie endogene Nukleinsäuren identifizieren (Yang und Seki, 2012) (Mohammad Hosseini et al., 2015) (Kiziltas, 2016) (Guan et al., 2010). Bisher konnte gezeigt werden, dass hepatische Sternzellen TLR 1 - 10 exprimieren (Higashi et al. 2017) (Paik et al. 2003) (Paik et al. 2006) (Seki et al. 2007) (Watanabe et al. 2007) (Raicevic et al. 2015). Diese Expression konnte von Mania et al. 2013 nochmals für Zellen der LX-2 Ziellinie spezifiziert werden: Es zeigten sich vermehrte Protein- und mRNA Level für TLR 1-10 (Mania et al., 2013). Die TLR Expression kann zudem durch verschiedene Mediatoren gesteigert werden: Paik et al. beschrieben 2006 eine Induktion von TLR 2 durch LPS, IL-1 und TNF- α Stimulation bei HSC bzw. konnten Seki et al. 2007 eine Wechselwirkung zwischen TLR 4 und TGF- β 1 bei HSC nachweisen (Paik et al. 2006) (Seki et al. 2007). Bei pankreatischen Sternzellen ließen sich in vergangenen Studien TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5 und TLR 9 nachweisen, deren Expression u.a. mittel LPS, LTA (Lipoteichoic Acid), PPA (Propionic Acid) und Flagellin induziert wurde (Zambirinis, 2015) (Masamune et al. 2008) (Vonlaufen et al. 2007). Zur Detektion des TLR Expressionsprofils bei mit TGF- β 1 aktivierten LX-2 und hPSC 2.2. Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Human TLR Signaling Pathway PCR Array durchgeführt, der eine Expression von TLR 1, TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 6 und TLR 10 bei LX-2 Zellen zeigte; mit signifikanter Expression von TLR 5 und TLR 10. Bei hPSC 2.2. Zellen zeigte sich eine Expression von TLR 1, TLR 2, TLR 3, TLR 5 und TLR 6 mit signifikanter Expression von TLR 1 und TLR 5. Diese Ergebnisse stützen die bisherigen Erkenntnisse zur TLR Expression bei humanen Sternzellen. Neu

zeigte sich darüber hinaus eine bisher nicht beschriebene Expression von TLR 1 bei aktivierten pankreatischen Sternzellen, die die Annahme der hohen immunologischen Kompetenz und Ähnlichkeit zu hepatischen Sternzellen bekräftigt (Masamune et al. 2008). TLR 1 ist über die Dimerisierung mit TLR 2 in der Lage Lipopolysaccharide aus der Zellwand Gram-positiver Bakterien zu identifizieren und damit ein wichtiger Faktor bei der Aufrechterhaltung des Gewebemilieus, sowie Induktion immunologischer Antworten (de Kivit et al. 2014). Basierend auf diesen Ergebnissen könnte die vorliegende Arbeit durch weitere Studien zur Identifizierung und Charakterisierung weiterer TLR bei pankreatischen Sternzellen ergänzt werden; im Speziellen zur TLR 1 Expression und dessen Einfluss auf das zelluläre Verhalten. Die Feststellung, dass beide untersuchten Sternzelllinien TLR 5 exprimierten, ergab Anlass zur weiteren Analyse und Charakterisierung dieser Expression: Nachdem wie beschrieben eine TLR 5 Expression bei LX-2 und hPSC 2.2. Sternzellen detektiert werden konnte, wurde die Transkripteexpression von TLR 5 nach TGF- β 1 Behandlung anhand einer qRT-PCR quantifiziert. Es präsentierte sich eine Induktion der Gentranskription für TLR 5 nach Aktivierung bei beiden Sternzelllinien. Diese Ergebnisse bestätigten sich für LX-2 Zellen mittels Westernblot und für beide Zelllinien mittels indirekter Immunfluoreszenz.

7.3. TLR 5 Inhibierung führt zur Herunterregulation der Aktivitätsmarker

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von TLR 5 auf das zelluläre Verhalten von LX-2 und hPSC 2.2. Zellen untersucht werden: Es konnte in der Vergangenheit bereits belegt werden, dass die Anwesenheit von bestimmten TLR eine essentielle Voraussetzung für die Sternzellaktivierung darstellt. Untersuchungen zeigten unter anderem, dass eine Inhibierung von TLR 4 mit dem Signaltransmitter Wnt-2B (Wingless-type family, member 2B) zu einer Suppression der Aktivität von HSC mit Abnahme der Aktivitätsmarker α -SMA und Kollagen 1 führt und sich so protektiv auf den Fibroseprogress auswirken kann (Yuan et al., 2017). In einer weiteren TLR 4 Studie konnte 2018 ebenfalls ein Verminderung der hepatischen Sternzellaktivität nach gezielter TLR 4 Inhibierung mittels dem selektiven TLR 4 Antagonisten Sparstolonin B beobachtet werden (Dattaroy et al., 2018). Dieser hemmende Effekt auf die hepatische Sternzellaktivität zeigte sich auch bei der gezielter Inhibierung von

TLR 9 mittels apoptotischer hepatozytärer DNA (Watanabe et al., 2007). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde eine *TLR 5* Inhibierung durchgeführt und das zelluläre Verhalten mittels Aktivitätsmarker daraufhin untersucht. Hierzu wurde bei LX-2 und hPSC 2.2. Zellen ein *TLR 5* Knockdown mittels RNA-Interferenz generiert. Die dazu durchgeführte Transfektion mit siRNA zeigte sich in der qRT-PCR erfolgreich mit signifikanter Herunterregulation der Gentranskripte für *TLR 5* bei beiden Zelllinien. Diese Ergebnisse konnten für hPSC 2.2. Zellen mittels Westernblot und für beide Zelllinien mittels indirekter Immunfluoreszenz nochmals bestätigt werden. Nach Sicherstellung einer erfolgreichen *TLR 5* Inhibierung mittels Knockdown bei beiden Zelllinien, wurden daraufhin die etablierten Aktivitätsmarker hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens analysiert: Es präsentiert sich in der indirekten Immunfluoreszenz bei beiden Zelllinien eine deutlich verminderte Expression der Aktivitätsmarker. Diese Ergebnisse konnten für LX-2 Zellen zudem im Westernblot und in der qRT-PCR nochmals bestätigt werden. Für die hPSC 2.2. Zelllinie konnten die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz im Westernblot nicht reproduziert werden. Diese Ergebnisse belegen eine Verminderung der Sternzellaktivität nach *TLR 5* Inhibierung mit deutlicher Herunterregulation der untersuchten Aktivitätsmarker und stützt damit die Erkenntnisse oben genannter Studien zum Einfluss von TLR auf die hepatische Sternzellaktivität. Zudem stellt es nicht nur die Bedeutsamkeit von *TLR 5* für die hepatische Sternzellaktivität hervor, sondern lässt vermuten, dass die Anwesenheit von *TLR 5* eine notwendige Voraussetzung für die Sternzellaktivierung sein könnte.

7.4. *TLR 5* Inhibierung behindert die Aktivierungseffizienz von TGF- β 1

In Untersuchungen zur Antifibrose Therapie konnte bereits belegt werden, dass durch eine Inhibierung der Sternzellaktivität und Regulation intrazellulärer Signalwege fibrotische Prozesse nicht nur aufgehalten werden können, sondern sich auch als reversibel erweisen können (Chang und Li, 2020). Ein bekannter, starker Mediator der Sternzellaktivierung ist das profibrotische Zytokin TGF- β 1, dessen Modulation bzw. Inhibierung als therapeutisches Ziel etabliert werden konnte (Xu et al. 2005) (Jesnowski et al. 2005) (Bynigeri et al. 2017). Vergangene Studien konnten zeigen das eine derartige Modulation der TGF- β 1-Aktivität unter anderem auch über TLR erzielt werden können. Bereits 2007

konnte in einer Studie von Seki et al. belegt werden, das TLR 4 zu einer Verstärkung des profibrotischen TGF- β 1-Signalweges in der Leber führen kann (Seki et al., 2007). Im Umkehrschluss war daher zu vermuten, dass eine TLR Inhibierung ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivierungseffizienz von TGF- β 1 haben könnte. Daher wurde, nachdem in den durchgeführten Versuchen eine Verminderung der Sternzellaktivität nach *TLR 5* Inhibierung mit Herunterregulation der untersuchten Aktivitätsmarker belegt werden konnte, schliesslich der Einfluss einer *TLR 5* Inhibierung hinsichtlich der Aktivierungseffizienz von TGF- β 1 bei LX-2 und hPSC 2.2. untersucht. Dafür wurde erneut eine *TLR 5* Inhibierung mittels Knockdown erzielt und nach Zugabe von TGF- β 1 das zelluläre Verhalten beider Zelllinien mittels Aktivitätsmarker analysiert: In der qRT-PCR zeigte sich bei LX-2 Zellen eine verminderte Gentranskription der Aktivitätsmarker. Diese Ergebnisse konnten auf Proteinebene mittels Westernblot und indirekter Immunfluoreszenz, sowie in der zellulären Echtzeitbeobachtung nochmals bestätigt werden. Daraus lässt sich schließen, dass es durch eine *TLR 5* Inhibierung zu einer Behinderung der Aktivierungseffizienz von TGF- β 1 bei LX-2 und hPSC 2.2. Zellen kommt bzw. die Anwesenheit von *TLR 5* eine essentielle Voraussetzung für die TGF- β -vermittelte Sternzellaktivierung in Leber und Pankreas sein könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen damit die Bedeutsamkeit von *TLR 5* bei der TGF- β 1 vermittelten Sternzellaktivierung und eröffnen damit neue Perspektiven zum besseren Verständnis zellulärer Mechanismen bzw. den weitreichenden Einfluss von Sternzellen auf ihre zelluläre Umgebung. Zudem lassen die vorliegenden Ergebnisse *TLR 5* als potentiellen wirksamen Angriffspunkt in der Antifibrose Therapie denkbar werden.

7.5. Kritischer Blick auf die Ergebnisse

Nicht alle Ergebnisse der durchgeführten Versuche ließen sich auch auf Proteinebene bzw. mittels indirekter Immunfluoreszenz reproduzieren. Folgende Beobachtungen liessen sich nicht mit den übrigen Ergebnissen in Übereinstimmung bringen bzw. ließen den Verdacht auf einflussnehmende Störfaktoren vermuten:

LX-2 Zellen

Bei der Bestimmung der Proteinexpression der Aktivitätsmarker *COL1A1*, *ACTA2*, *SNAI1* und *TLR 5* mittels Westernblot nach Transfektion konnte entgegen der Ergebnisse für hPSC 2.2. Zellen eine stabile Proteinexpression für *TLR 5* bei LX-2 Zellen beobachtet werden. Vor dem Hintergrund, dass vor den durchgeführten Transfektionsversuchen die technische Kontrolle eine Wirksamkeit der siRNA belegen konnte und in der quantitativen RT-PCR und indirekten Immunfluoreszenz eine deutliche Herunterregulation der *TLR 5* Expression nach *TLR 5* Knockdown beobachtet werden konnte, lässt sich vermuten, dass möglicherweise bei diesem Transfektionsversuch die Behandlung mit siRNA dennoch unzureichend war, um einen suffizienten *TLR 5* Knockdown zu generieren. Dennoch kam es wie in den vorherigen Versuchen zu einer Abnahme der Sternzellaktivität durch die Behandlung mit siRNA mit einer weniger starken Expression der Aktivitätsmarker.

hPSC 2.2. Zellen

Bei dieser Zelllinie konnten im Westernblot für TGF- β 1 behandelte Zellen und die Negativkontrolle fast gleich grosse Proteinbanden für *TLR 5* beobachtet werden, was möglicherweise auf eine autokrine Aktivierung der hPSC 2.2. zurückzuführen ist. In der indirekten Immunfluoreszenz konnte für diese Zelllinien keine deutliche Herunterregulation der *COL1A1* Expression nach Transfektion reproduziert werden und ein Fluoreszenzsignal blieb sichtbar. Für beide Zelllinien zeigte sich nach Aktivierung mit TGF- β 1 im Westernblot ähnlich grosse Proteinbanden für *ACTA2* in der behandelten Probe, sowie in der unbehandelten Negativprobe, was ebenfalls eine autokrine Aktivierung der Zellen der Negativkontrolle vermuten lässt.

7.6. Klinische Relevanz/ Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen das aktivierende Potenzial von TGF- β 1 und heben die Bedeutsamkeit von TLR 5 für die Sternzellaktivierung hervor. Zudem konnten bei beiden Zelllinien nach *TLR 5* Inhibierung eine Aktivierungsineffizienz von TGF- β 1 nachgewiesen werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei TGF- β 1 um einen potenten chemotaktischen Mediator der interzellulären Kommunikation, über den hepatische und pankreatische Sternzellen von Zellen ihrer Umgebung, sowie

weiter entfernten Zellen aktiviert werden können (Caja et al. 2018) (Gao et al. 2013). Dazu gehören unter anderem Tumorzellen, die eine Zellaktivierung über die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie TGF- β 1, auslösen und so einen Tumorprogress weiter begünstigen können (Gore et al., 2014). In der Vergangenheit konnte TGF- β bereits erfolgreich als bedeutsames, therapeutisches Ziel in der antifibrotischen Therapie etabliert werden (Abd El-Meguid et al., 2018) (Fan et al., 2019). Als Anti-TGF- β -Therapeutika kommen derzeit unter anderem Antisense-Oligonukleotide, Anti-Integrine, TGF- β -Ribosom-Kinase-Inhibitoren oder Ligand-trap-Proteine zum Einsatz, die gezielt in den TGF- β Signalweg eingreifen. Dennoch zeigt sich insbesondere bei der desmoplastischen Fibrose bzw. tumorinduzierten Fibrose eine Limitierung dieser Therapeutika insbesondere bei gleichzeitig fehlender antikanzerogene Therapie der ursächlichen Tumorzellen (Teixeira et al., 2020). Es bedarf demnach weiterer Forschung um weitere effektive, therapeutische Angriffspunkte bei der Fibrosebekämpfung zu identifizieren. Auch TLR konnten in vergangenen und gegenwärtigen Studien als wirksame therapeutische Ziele bei der Behandlung von Tumorerkrankungen, Infektionserkrankungen, aber auch chronischen Autoimmunerkrankungen etabliert werden (Hennessy et al., 2010) (Anwar et al., 2019). Eines der ersten, etablierten Therapeutika stellt hierbei Imiquimod dar, ein TLR 7 Agonist, der unter anderem zur Behandlung von Tumorerkrankungen, Condylomata accuminata und Aktinischer Keratose eingesetzt wird (Hennessy et al., 2010) (Anwar et al., 2019). Für die TLR basierte Behandlung hepatischer Fibrose und Zirrhose stehen seit einiger Zeit Oligonukleotid-basierte TLR 7- und TLR 9 Antagonisten im Mittelpunkt einiger Studien. Bisher entwickelte TLR 5 gerichtete Therapeutika und Adjuvanzien wirken vorwiegend über rekombinantes Flagellin Protein. Da TLR 5 nur Proteinstrukturen erkennen kann, erfolgt je nach Modulation des rekombinanten Flagellin Proteins nach der Rezeptorbindung eine Aktivierung bzw. Inhibierung von TLR 5 (Yang et al., 2016) (Toshkov et al., 2017). Ein Beispiel aus aktuellen präklinischen und klinischen Studien hierfür ist der TLR 5 Agonist Entolimod zur Behandlung des Prostatakarzinoms, der über eine Stimulation von TNF, Migration von NK und Aktivierung von NF- κ B antikanzerogen, sowie radioprotektiv wirkt (Sfondrini et al., 2006) (Yang et al., 2016) (Anwar et al., 2019) (Haderski et al., 2020). Um die durch einen *TLR 5* Knockdown vermittelte Aktivierungsineffizienz von TGF- β 1 zu erzielen, könnten spezifische Oligonukleotid-basierte TLR 5 Antagonisten

denkbar sein. Zudem könnte eine TLR 5 Inhibierung alternativ auch mit Hilfe einer Gentherapie generiert werden bei der *TLR 5* als Zielgen mittels RNA-Interferenz-basierter Therapie inhibiert wird. Dafür wird in Zukunft jedoch weitere Forschung an TLR 5 benötigt. Anschliessend an diese Untersuchungen wäre z.B. weitere Forschung an der Modulierbarkeit von TLR 5, u.a. durch moduliertes Flagellin, sowie deren potenzielle Effekte auf die Sternzellaktivierbarkeit, Aktivierungseffizienz von TGF- β 1 und Expression weiterer Aktivitätsmarker denkbar. Zudem ob die vorliegenden Ergebnisse auch mit anderen Sternzellaktivatoren reproduzierbar wären. Zusätzlich könnten die hier angewandten Methoden auf ein Maus- bzw. Patientenmodell ausgeweitet werden, bei der die TLR 5 Expression und Inhibierbarkeit bei Fibrose analysiert werden könnte.

8. Zusammenfassung

8.1. Deutsche Zusammenfassung

Fibrose, die übermäßige Zunahme von Extrazellulärmatrix im menschlichen Körper, ist eine Folge anhaltender entzündlicher Gewebereaktionen. Besonders in der Leber und im Pankreas fördert eine Vielzahl an akuten und chronischen Erkrankungen, wie z. B. die Alkoholische und Nicht-Alkoholische Steatohepatitis, Virushepatitis, Autoimmunhepatitis, Pankreatitis und Pankreaskarzinome, die Fibroseentwicklung, die sich durch komplexe Pathophysiologie auszeichnet und im Verlauf von einem dramatischen Verlust von funktionalem Gewebe begleitet sein kann. Die bedeutsamsten Mediatoren der Fibrose und Hauptquelle von extrazellulären Matrixproteinen, wie Kollagen, sind humane Sternzellen, deren Aktivierung eine etablierte Schlüsselrolle in der Fibroseentstehung spielt. Quieszente hepatische und pankreatische Sternzellen halten in ihrem ruhendem Zustand als epitheliale Zellen im Leberparenchym bzw. Pankreastroma neben der Speicherung von Vitamin A wichtige Aufgaben zum Erhalt und Gleichgewicht der Gewebeintegrität und Immunregulation inne. Ihre Aktivierung führt zur Transdifferenzierung in mesenchymale Myofibroblasten und damit zur vermehrten Bildung von Extrazellulärmatrix, zur parenchymalen Migration, Chemotaxis, Proliferation, Phagozytose, Tumorinteraktion bzw. -förderung uvm. Diese Mechanismen führen über fibrotische Umbauprozesse bzw. desmoplastische Gewebereaktionen zum Verlust der physiologischen Organarchitektur und können unbehandelt in Zirrhose, Karzinogenese bzw. Tumorprogress münden. Als immunkompetente Zellen exprimieren humane Sternzellen diverse Toll-like Rezeptoren (TLR), die sie zur Erkennung pathologischer mikrobieller Strukturen befähigen. Mittels der Expression von TLR 5 sind sie dazu in der Lage das bakterielle Geißelprotein Flagellin spezifisch zu binden und über TLR-spezifische Signalwege so inflammatorische Gewebereaktionen zu generieren und zu verstärken. Diese Eigenschaft stellt ein interessantes Bindeglied zwischen Sternzell-assoziiierter Fibroseentstehung und mikrobieller Besiedelung des Gastrointestinaltraktes dar. Diese Studie hebt eine mögliche Kommunikation zwischen Sternzellen und anderen Pankreas- bzw. Leberzellen, sowie dem Mikrobiom mittels TLR 5 hervor. Aus in vitro Studien ist bekannt, dass die Behandlung immortalisierte LX-2 und hPSC 2.2. Sternzellen mit geringen Mengen des Wachstumsfaktors TGF- β 1 zur

Transdifferenzierung in Myofibroblasten führen kann. TGF- β 1 war dazu in der Lage die Aktivierung der Sternzellen stimulieren und damit ihren charakteristischen Wandel vom quieszenten zum aktiven Zustand, der sie im hepatischen und pankreatischen Milieu auszeichnet, zu fördern. Die Empfänglichkeit für TGF- β 1 zeigt somit, dass Sternzellen auch über Signale aus ihrer Umgebung, sowie von weiter entfernten Zellen aktiviert werden können. Vor allem die Anwesenheit von Tumorzellen im umliegenden Gewebe könnte für eine Sternzellaktivierung durch die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren, wie TGF- β 1, verantwortlich sein. Um einen Einfluss von TLR 5 auf die Aktivierbarkeit von hepatischen und pankreatischen Sternzellen zu belegen, wurde ein *TLR 5* Knockdown in LX-2 und hPSC 2.2.-Zellen durchgeführt. Die Aktivierung wurde durch unterschiedliche Konzentrationen TGF- β 1 induziert. In der quantitativen RT-PCR zeigte sich eine Induktion von *TLR 5* nach Aktivierung der Zellen mit TGF- β 1. Außerdem nach *TLR 5* Knockdown und TGF- β 1 Behandlung eine Ineffizienz der TGF- β 1 Wirkung bei der Aktivierung der Zellen. Dies konnte durch Westernblots auf Proteinebene bestätigt werden, bei der sich eine vermehrte *TLR 5* Expression bei aktivierten Zellen, sowie eine verminderte Proteinexpression der Aktivitätsmarker nach *TLR 5* Inhibierung präsentierte, die durch TGF- β 1 nicht auf das Niveau des aktiven Zustandes gesteigert werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigten sich ebenfalls in der indirekten Immunfluoreszenz. Das Proliferationsverhalten wurde zusätzlich durch eine Echtzeitbildgebung mittels Incucyte® beobachtet. Hier zeigte sich über einen Zeitraum von 48 Stunden eine verminderte Proliferationsrate nach *TLR 5* Inhibierung und Behinderung der TGF- β 1 Effizienz. Diese Ergebnisse bestätigen das aktivierende Potenzial von TGF- β 1 und heben die Bedeutsamkeit von TLR 5 bei der Aktivierung von Sternzellen hervor und eröffnen damit neue Perspektiven zum besseren Verständnis von Mechanismen die im Gewebe mit einer Beteiligung von Sternzellen einhergeht; im Speziellen hinsichtlich der Sensibilität humaner Sternzellen gegenüber mikrobieller Stimuli und der Fähigkeit von Mikroorganismen molekulare und morphologische Zellveränderungen zu initiieren, die eine wichtige Rolle für Gewebestruktur und Funktionalität spielen. Des Weiteren bietet das weitere Verständnis von Mechanismen der Fibroseentstehung im Zusammenhang mit der Karzinogenese und der Einflussnahme des Mikrobioms neue Hinweise für

zukünftige Therapien und Maßnahmen zur Behandlungen von Erkrankungen des oberen Gastrointestinaltraktes.

8.2. Englische Zusammenfassung

Fibrosis, the increased deposition of extracellular matrix in human body, is a result of sustained inflammatory tissue response. Particularly in liver and pancreas a variety of acute and chronic diseases, including alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis, viral and autoimmune hepatitis, pancreatitis and pancreatic carcinoma, can promote the complex pathophysiologic process of fibrogenesis, and by that lead to a dramatic loss of functional parenchyma. The most significant mediators of fibrosis and main source of extracellular matrix proteins like collagen are human stellate cells, whose activation plays a well established key role of fibrogenesis. Quiescent hepatic and pancreatic stellate cells are characterised by epithelial morphology and storage of Vitamin A and carry out various functions contributing to functional tissue integrity and immunity. Their activation causes the transdifferentiation to mesenchymal myofibroblasts with ability to deposit extracellular matrix by collagen secretion, parenchymal migration, contractility, proliferation, phagocytosis, etc.; which can lead to liver fibrosis, cirrhosis, and tumourigenesis. Past studies indicated the resemblance of pancreatic stellate cells and their hepatic relatives in functionality and morphologic appearance. In the context of pancreatic ductal carcinoma pancreatic stellate cells not only contrive the characteristic desmoplastic tissue formation but they also interact with carcinoma cells and participate considerably in the tumor metabolism and development. As immunocompetent cells, human stellate cells express a various amount of Toll-like receptors (TLR) with whom pathogen molecular patterns can be recognized. Via the expression of TLR 5 human stellate cells can bind specifically the bacterial flagella protein Flagellin leading to intracellular TLR signaling and promoting tissue inflammation; a characteristic feature which indicates an interesting link between stellate cell-mediated fibrogenesis and microbial colonization of the gastrointestinal tract. This study highlights a possible intercommunication existing between the stellate cells, other pancreatic and liver cells and the microbiota via TLR 5. In vitro studies showed that LX-2 and HPSC 2.2 immortalised stellate cells can be easily treated with a low amount of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), leading to their

transdifferentiation into myofibroblasts. TGF- β 1 was able to stimulate the stellate cells, promote their activation, and their change from a quiescent state to an active one, which characterises these cells in their liver and pancreatic tissue environment. The responsiveness to TGF- β 1 highlights the fact that the stellate cells can be activated by signaling coming from both neighbouring and more distant cells. In particular, the presence of tumour cells in the surrounding parenchyma could be also responsible for stellate cell activation through the secretion of several growth stimulating factors, including TGF- β 1. To show that TLR 5 influences the activation of hepatic and pancreatic stellate cells, *TLR 5* was knocked down in LX-2 and hPSC 2.2. cell lines. Additionally, different concentrations of TGF- β 1 were used to stimulate the cell activation. The quantitative RT-PCR showed an increased expression of *TLR 5* after cell activation with TGF- β 1 and a disabled TGF- β 1 activation efficacy during *TLR 5* knockdown; consequently the inhibition of *TLR 5* caused an inefficiency of TGF- β 1. These data could be confirmed by protein level of western blot analysis; activated cells presented an increased expression of *TLR 5* and a decreased expression of the activity marker after inhibiting *TLR 5*, which could not be rehabilitated. These results were also confirmed by indirect immunofluorescence. Additionally, the cell proliferation was observed by real time imaging system Incucyte® revealing a decreased proliferation rate and TGF- β 1 efficacy during *TLR 5* knockdown during 48 hours. These results confirm the activating potential of TGF- β 1, highlight the importance of TLR 5 for stellate cell activation and offer new perspectives for understanding the mechanisms underlying stellate cells' involvement in the tissue environment; in particular, the sensitivity of human stellate cells to stimuli coming from microorganisms populating the host body and the ability of micro-organisms to activate molecular and morphological changes in cells that play a specific role in the structure and functioning of the tissue or organ. Understanding the mechanisms of organ fibrogenesis in correlation with tumourigenesis and the influence of microbiota will open new directions for future treatment of diseases affecting the upper-midgut area of the human body.

9. Literaturverzeichnis

Abd El-Meguid M, Dawood RM, Mokhles MA, El Awady MK. (2018). Extrahepatic Upregulation of Transforming Growth Factor Beta 2 in HCV Genotype 4-Induced Liver Fibrosis. *J Interferon Cytokine Res*; 38(8): 341-347. doi: 10.1089/jir.2018.0045

Akira S, Takeda K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.*; 4(7):499-511. doi: 10.1038/nri1391.

Ankoma-Sey V, Matli M, Chang KB, Lalazar A, Donner DB, Wong L, Warren RS, Friedman SL (1998). Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing." *Oncogene* 17(1): 115-121. doi: 10.1038/sj.onc.1201912.

Anwar MA, Shah M, Kim J, Choi S. Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. (2019). *Med Res Rev.*; 39(3): 1053-1090. doi: 10.1002/med.21553.

Aoyama T, Paik YH, Seki E. (2010). Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. *Gastroenterol Res Pract.* 2010; 192543. doi: 10.1155/2010/192543

Apte M, Pirola RC, Wilson JS. (2015). Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer. *Curr Opin Gastroenterol.*; 31(5): 416-23. doi: 10.1097/MOG.0000000000000196

Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. (1998) Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut.*; 43(1): 128-33. doi: 10.1136/gut.43.1.128.

Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS. (2004). Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*; 29(3): 179-87. doi: 10.1097/00006676-200410000-00002.

Asahina K, Tsai SY, Li P, Ishii M, Maxson RE Jr, Sucov HM, Tsukamoto H. (2009). Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology*. 2009 Mar; 49(3): 998-1011. doi: 10.1002/hep.22721.

Babu S, Blauvelt CP, Kumaraswami V, Nutman TB. (2006). Cutting edge: diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. *J Immunol.*; 176(7): 3885-9. doi: 10.4049/jimmunol.176.7.3885.

Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G. (1998). Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*; 115(2): 421-32. doi: 10.1016/s0016-5085(98)70209-4.

Battaller R, Brenner DA. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest.*; 115(2):209-18. doi: 10.1172/JCI24282.

Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.*; 26(10):1175-86. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x.

Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, Palù G, Martines D. (2005). Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*; 289(3):G571-8. doi: 10.1152/ajpgi.00537.2004

Bynigeri RR, Jakkampudi A, Jangala R, Subramanyam C, Sasikala M, Rao GV, Reddy DN, Talukdar R. (2017). Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology. *World J Gastroenterol.*; 23(3): 382-405. doi: 10.3748/wjg.v23.i3.382.

Caja L, Dituri F, Mancarella S, Caballero-Diaz D, Moustakas A, Giannelli G, Fabregat I. (2018). TGF- β and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. *Int J Mol Sci.*; 19(5): 1294. doi: 10.3390/ijms19051294.

Caviglia JM, Yan J, Jang MK, Gwak GY, Affo S, Yu L, Olinga P, Friedman RA, Chen X, Schwabe RF. (2018). MicroRNA-21 and Dicer are dispensable for hepatic stellate cell activation and the development of liver fibrosis. *Hepatology*; 67(6): 2414-2429. doi: 10.1002/hep.29627.

Chang Y, Li H. (2020). Hepatic Antifibrotic Pharmacotherapy: Are We Approaching Success? *J Clin Transl Hepatol*; 8(2): 222-229. doi: 10.14218/JCTH.2020.00026.

Dattaroy D, Seth RK, Sarkar S, Kimono D, Albadrani M, Chandrashekar V, Hasson FA, Singh UP, Fan D, Nagarkatti M, Nagarkatti P, Diehl AM, Chatterjee S. (2018). Sparstolonin B (SsnB) attenuates liver fibrosis via a parallel conjugate pathway involving P53-P21 axis, TGF-beta signaling and focal adhesion that is TLR4 dependent. *Eur J Pharmacol*; 841: 33-48. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.08.040.

de Kivit S, Tobin MC, Forsyth CB, Keshavarzian A, Landay AL. (2014). Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. *Front Immunol*; 5:60. doi: 10.3389/fimmu.2014.00060.

De Nardo D. (2015). Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*; 74(2):181-9. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.025.

Fan W, Liu T, Chen W, Hammad S, Longerich T, Hausser I, Fu Y, Li N, He Y, Liu C, Zhang Y, Lian Q, Zhao X, Yan C, Li L, Yi C, Ling Z, Ma L, Zhao X, Xu H, Wang P, Cong M, You H, Liu Z, Wang Y, Chen J, Li D, Hui L, Dooley S, Hou J, Jia J, Sun B. (2019). ECM1 Prevents Activation of Transforming Growth Factor β , Hepatic Stellate Cells, and Fibrogenesis in Mice. *Gastroenterology*; 157(5):1352-1367.e13. doi: 10.1053/j.gastro.2019.07.036.

Farrow B, Berger DH, Rowley D. (2009). Tumor-derived pancreatic stellate cells promote pancreatic cancer cell invasion through release of thrombospondin-2. *J Surg Res*; 156(1):155-60. doi: 10.1016/j.jss.2009.03.040.

Fausther M, Lavoie EG, Dranoff JA. (2013). Contribution of Myofibroblasts of Different Origins to Liver Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.*;1(3):225-230. doi: 10.1007/s40139-013-0020-0.

Fitzner B, Müller S, Walther M, Fischer M, Engelmann R, Müller Hilke B, Pützer BM, Kreutzer M, Nizze H, Jaster R. (2012). Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells. *J Cell Mol Med.*;16(11):2620-30. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01573.x.

Friedman SL. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.*; 88(1):125-72. doi: 10.1152/physrev.00013.2007.

Friedman SL, Bansal MB. (2006). Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology.*; 43(2 Suppl 1):S82-8. doi: 10.1002/hep.20974.

Gao X, Cao Y, Yang W, Duan C, Aronson JF, Rastellini C, Chao C, Hellmich MR, Ko TC. (2013). BMP2 inhibits TGF- β -induced pancreatic stellate cell activation and extracellular matrix formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*; 304(9):G804-13. doi: 10.1152/ajpgi.00306.2012.

Gao Z, Wang X, Wu K, Zhao Y, Hu G. (2010). Pancreatic stellate cells increase the invasion of human pancreatic cancer cells through the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis. *Pancreatology.*; 10(2-3):186-93. doi: 10.1159/000236012.

García-Compeán D, Villarreal-Pérez JZ, Cavazos MEO, Lavallo Gonzalez FJ, Borjas-Almaguer OD, Del Cueto-Aguilera AN, González-González JA, Treviño-Garza C, Huerta-Pérez L, Maldonado-Garza HJ. (2020). Prevalence of liver fibrosis in an unselected general population with high prevalence of obesity and diabetes mellitus. Time for screening? *Ann Hepatol.*; 19(3):258-264. doi: 10.1016/j.aohep.2020.01.003.

Geerts A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.*; 21(3):311-35. doi: 10.1055/s-2001-17550.

Geerts A. (2004). On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? *J Hepatol.*; 40(2):331-4. doi: 10.1016/j.jhep.2003.12.006.

Gore AJ, Deitz SL, Palam LR, Craven KE, Korc M. (2014). Pancreatic cancer-associated retinoblastoma 1 dysfunction enables TGF- β to promote proliferation. *J Clin Invest.*; 124(1):338-52. doi: 10.1172/JCI71526.

Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.*; 7:d793-807. doi: 10.2741/A812.

Guan Y, Ranoa DR, Jiang S, Mutha SK, Li X, Baudry J, Tapping RI. (2010). "Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling." *J Immunol.*, 184(9): 5094-5103. doi: 10.4049/jimmunol.0901888.

Haderski GJ, Kandar BM, Brackett CM, Toshkov IM, Johnson CP, Paszkiewicz GM, Natarajan V, Gleiberman AS, Gudkov AV, Burdelya LG (2020). "TLR5 agonist entolimod reduces the adverse toxicity of TNF while preserving its antitumor effects." *PloS One*; 15(2): e0227940. doi: 10.1371/journal.pone.0227940

Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. (2010). "Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?" *Nat Rev Drug Discov*; 9(4): 293-307. doi: 10.1038/nrd3203.

Higashi T, Friedman SL, Hoshida, Y. (2017). "Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis." *Adv Drug Deliv Rev*; 121: 27-42. doi: 10.1016/j.addr.2017.05.007.

Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. (1999). "In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its

augmentation by cell activation." *Hepatology*; 29(6): 1760-1767. doi: 10.1002/hep.510290640.

Ikejiri N. (1990). "The vitamin A-storing cells in the human and rat pancreas." *Kurume Med J*; 37(2): 67-81. doi: 10.2739/kurumemedj.37.67.

Ino K, Masuya M, Tawara I, Miyata E, Oda K, Nakamori Y, Suzuki K, Ohishi K, Katayama N. (2014). "Monocytes infiltrate the pancreas via the MCP-1/CCR2 pathway and differentiate into stellate cells." *PLoS One*; 9(1): e84889. doi: 10.1371/journal.pone.0084889.

Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM. (1994). "Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis." *J Cell Biol* ; 127(6 Pt 2): 2037-2048. doi: 10.1083/jcb.127.6.2037.

Jesnowski R, Furst D, Ringel J, Chen Y, Schrodell A, Kleeff J, Kolb A, Schreck WD, Lohr M. (2005). "Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine." *Lab Invest*; 85(10): 1276-1291. doi: 10.1038/labinvest.3700329

Kaisho T, Akira S. (2006). "Toll-like receptor function and signaling." *J Allergy Clin Immunol* ; 117(5): 979-987; quiz 988. doi: 10.1016/j.jaci.2006.02.023.

Kawai T, Akira S. (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." *Immunity*; 34(5): 637-50. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.

Kikuta K, Masamune A, Hamada S, Takikawa T, Nakano E, Shimosegawa T. (2013). "Pancreatic stellate cells reduce insulin expression and induce apoptosis in pancreatic beta-cells." *Biochem Biophys Res Commun* ; 433(3): 292-297. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.095

Kiziltas S. (2016). "Toll-like receptors in pathophysiology of liver diseases." *World J Hepatol*; 8(32): 1354-1369. doi: 10.4254/wjh.v8.i32.1354.

Kobayashi S, Seki S, Kawada N, Morikawa H, Nakatani K, Uyama N, Jkeda K, Nakajima Y, Arakawa T, Kaneda K. (2003). "Apoptosis of T cells in the hepatic fibrotic tissue of the rat: a possible inducing role of hepatic myofibroblast-like cells." *Cell Tissue Res*; 311(3): 353-364. doi: 10.1007/s00441-002-0670-4

Kong X, Feng D, Wang H, Hong F, Bertola A, Wang FS, Gao B. (2012). "Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice." *Hepatology*; 56(3): 1150-1159. doi: 10.1002/hep.25744.

Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. (2008). "Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis." *Cell*; 134(4): 657-667. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.049

Lacagnina MJ, Watkins LR, Grace PM. (2018). "Toll-like receptors and their role in persistent pain." *Pharmacol Ther*; 184: 145-158. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.10.006.

Lin Q, Li M, Fang D, Fang J, Su SB. (2011). "The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases." *Int Immunopharmacol*; 11(10): 1422-1432. doi: 10.1016/j.intimp.2011.04.026

Maher JJ. (2001). "Interactions between hepatic stellate cells and the immune system." *Semin Liver Dis*; 21(3): 417-426. doi: 10.1055/s-2001-17555.

Mallat A, Lotersztajn S. (2013). "Reversion of hepatic stellate cell to a quiescent phenotype: From myth to reality?" *J Hepatol*; 59(2): 383-386. doi: 10.1016/j.jhep.2013.03.031.

Mania A, Kaczmarek M, Mozer-Lisewska I, Kowala-Piaskowska A, Kolecka-Bednarczyk A, Frydrychowicz M, Brzezicha B, Safadi R, Pauli A, Samara H, Żeromski J. (2013). „Hepatic stellate cells (HSC) cell line (LX-2) and Toll-like receptors - Phenotypic/mRNA expression and in vitro functional studies“ *Central European Journal Of Immunology* 4(4): 486-493. doi:10.5114/ceji.2013.39766

Marra F., Pinzani M. (2002). "Role of hepatic stellate cells in the pathogenesis of portal hypertension." *Nefrologia*, 22 Suppl 5:34-40. PMID: 12107915.

Masamune AK, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Satoh A and Shimosegawa T. (2008). "Pancreatic stellate cells express Toll-like receptors." *J Gastroenterol* 43(5): 352-362. doi: 10.1007/s00535-008-2162-0.

Mohammad Hosseini A, Majidi J, Baradaran B, Yousefi M. (2015). "Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases." *Adv Pharm Bull*; 5(Suppl 1): 605-614. doi: 10.15171/apb.2015.082.

O'Neill LA, Bowie AG. (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol*; 7(5): 353-364. doi: 10.1038/nri2079.

Oakley F, Teoh V, Ching ASG, Bataller R, Colmenero J, Jonsson JR, Eliopoulos AG, Watson MR, Manas D, Mann DA (2009). "Angiotensin II activates I 127 kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis." *Gastroenterology* 136(7): 2334-2344 e2331. doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.081.

Oakley, F, Trim N, Constandinou CM, Ye W, Gray AM, Frantz G, Hillan K, Kendall T, Benyon RC, Mann DA, Iredale JP (2003). "Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis." *Am J Pathol* 163(5): 1849-1858. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63544-4.

Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. (2007). "The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases." *J Clin Invest* 117(1): 50-59. doi: 10.1172/JCI30082

Paik YH, Lee KS, Lee HJ, Yang KM, Lee SJ, Lee DK, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM, Brenner DA. (2006). "Hepatic stellate cells primed with cytokines

upregulate inflammation in response to peptidoglycan or lipoteichoic acid." *Lab Invest* 86(7): 676-686. doi: 10.1038/labinvest.3700422.

Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. (2003). "Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells." *Hepatology* 37(5): 1043-1055. doi: 10.1053/jhep.2003.50182.

Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu MJ, Pirola R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV. (2003). "Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover." *Gut* 52(2): 275-282. doi: 10.1136/gut.52.2.275.

Phillips PA, Yang L, Shulkes A, Vonlaufen A, Poljak A, Bustamante S, Warren A, Xu Z, Guilhaus M, Pirola R, Apte MV, Wilson JS. (2010). "Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(40): 17397-17402. doi: 10.1073/pnas.1000359107.

Pothula SP, Xu Z, Goldstein D, Biankin AV, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. (2016). "Hepatocyte growth factor inhibition: a novel therapeutic approach in pancreatic cancer." *Br J Cancer* 114(3): 269-280. doi: 10.1038/bjc.2015.478.

Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. (2013). "Hepatic stellate cells and liver fibrosis." *Compr Physiol* 3(4): 1473-1492. doi: 10.1002/cphy.c120035.

Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B(2006). "Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners." *Gastroenterology* 130(2): 435-452. doi: 10.1053/j.gastro.2005.10.055.

Raicevic G, Najar M, Najimi M, El Taghdouini A, van Grunsven LA, Sokal E, Toungouz M. (2015). "Influence of inflammation on the immunological profile of

adult- derived human liver mesenchymal stromal cells and stellate cells." *Cytotherapy* 17(2): 174-185. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.10.001.

Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedman SL(1992). "Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture." *J Submicrosc Cytol Pathol* 24(2): 193-203. PMID: 1600511.

Scarpa M, Grillo AR, Brun P, Macchi V, Stefani A, Signori S, Buda A, Fabris P, Giordani MT, De Caro R, Palu G, Castagliuolo I, Martines D. (2011). "Snail1 transcription factor is a critical mediator of hepatic stellate cell activation following hepatic injury." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300(2): G316-326. doi: 10.1152/ajpgi.00141.2010.

Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. (2003). "Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(5): G949-958. doi: 10.1152/ajpgi.00215.2003

Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF (2007). "TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis." *Nat Med* 13(11): 1324-1332. doi: 10.1038/nm1663

Senoo H. (2004). "Structure and function of hepatic stellate cells." *Med Electron Microsc* 37(1): 3-15. doi: 10.1007/s00795-003-0230-3.

Senoo H, Mezaki Y, Fujiwara M. (2017). "The stellate cell system (vitamin A-storing cell system)." *Anat Sci Int* 92(4): 387-455. doi: 10.1007/s12565-017-0395-9.

Sfondrini L, Rossini A, Besusso D, Merlo A, Tagliabue E, Menard S, Balsari A. (2006). "Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer." *J Immunol* 176(11): 6624-6630. 128 doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6624.

Shimizu K, Kobayashi M, Tahara J, Shiratori K. (2005). "Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells." *Gastroenterology* 128(7): 2105-2118. doi: 10.1053/j.gastro.2005.03.025.

Soares JB, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, Leite-Moreira A. (2010). "The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases." *Hepatol Int* 4(4): 659-672. doi: 10.1007/s12072-010-9219-x.

Sparmann G, Kruse ML, Hofmeister-Mielke N, Koczan D, Jaster R, Liebe S, Wolff D, Emmrich J. (2010). "Bone marrow-derived pancreatic stellate cells in rats." *Cell Res* 20(3): 288-298. doi: 10.1038/cr.2010.10.

Suetsugu A, Snyder CS, Moriwaki H, Saji S, Bouvet M, Hoffman RM. (2015). "Imaging the Interaction of Pancreatic Cancer and Stellate Cells in the Tumor Microenvironment during Metastasis." *Anticancer Res* 35(5): 2545-2551. PMID: 25964528.

Suk KT, Kim DJ. (2015). "Staging of liver fibrosis or cirrhosis: The role of hepatic venous pressure gradient measurement." *World J Hepatol* 7(3): 607-615. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.607.

Tahara J, Shimizu K, Shiratori K. (2008). "Engulfment of necrotic acinar cells by pancreatic stellate cells inhibits pancreatic fibrogenesis." *Pancreas* 37(1): 69-74. doi: 10.1097/MPA.0b013e318160a5cb.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003). "Toll-like receptors." *Annu Rev Immunol* 21: 335-376. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.

Tang D, Yuan Z, Xue X, Lu Z, Zhang Y, Wang H, Chen M, An Y, Wei J, Zhu Y, Miao Y, Jiang K. (2012). "High expression of Galectin-1 in pancreatic stellate cells plays a role in the development and maintenance of an immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer." *Int J Cancer* 130(10): 2337-2348. doi: 10.1002/ijc.26290.

Teixeira AF, Ten Dijke P, Zhu HJ. (2020). On-Target Anti-TGF- β Therapies Are Not Succeeding in Clinical Cancer Treatments: What Are Remaining Challenges? *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:605. doi: 10.3389/fcell.2020.00605.

Tian L, Lu ZP, Cai BB, Zhao LT, Qian D, Xu QC, Wu PF, Zhu Y, Zhang JJ, Du Q, Miao Y, Jiang KR. (2016). "Activation of pancreatic stellate cells involves an EMT-like process." *Int J Oncol* 48(2): 783-792. doi: 10.3892/ijo.2015.3282.

Tian X, Chen G, Zhou S, Henne-Bruns D, Bachem M, Kornmann M. (2012). "Interactions of pancreatic cancer and stellate cells are mediated by FGFR1-III isoform expression." *Hepatogastroenterology* 59(117): 1604-1608. doi: 10.5754/hge10366.

Toshkov IA, Gleiberman AS, Mett VL, Hutson AD, Singh AK, Gudkov AV, Burdelya LG (2017). "Mitigation of Radiation-Induced Epithelial Damage by the TLR5 Agonist Entolimod in a Mouse Model of Fractionated Head and Neck Irradiation." *Radiat Res* 187(5): 570-580. doi: 10.1667/RR14514.1.

Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, Pradere JP, Friedman RA, Schwabe RF. (2012). "Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice." *Gastroenterology* 143(4): 1073-1083 e1022. doi: 10.1053/j.gastro.2012.06.036.

Tsuchida T, Friedman SL. (2017). "Mechanisms of hepatic stellate cell activation." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14(7): 397-411. doi: 10.1038/nrgastro.2017.38.

Vaglio A, Maritati F. (2016). "Idiopathic Retroperitoneal Fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 27(7): 1880-1889. doi: 10.1681/ASN.2015101110.

Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. (2008). "Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance." *Cancer Res* 68(19): 7707-7710. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1132.

Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, Kumar RK, Pirola R, Wilson J, Apte MV. (2007). Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology*; 133(4):1293-303. doi: 10.1053/j.gastro.2007.06.062.

Wang Y, Song E, Bai B, Vanhoutte PM. (2016). "Toll-like receptors mediating vascular malfunction: Lessons from receptor subtypes." *Pharmacol Ther* 158: 91-100. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.12.005.

Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA, Town T, Badou A, Flavell RA, Mehal WZ. (2007). "Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9." *Hepatology* 46(5): 1509-1518. doi: 10.1002/hep.21867.

Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. (1982). "Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration." *Okajimas Folia Anat Jpn* 58(4-6): 837-858. doi: 10.2535/ofaj1936.58.4-6_837.

Wilson CL, Mann DA, Borthwick LA. (2017). "Epigenetic reprogramming in liver fibrosis and cancer." *Adv Drug Deliv Rev* 121: 124-132. 129 doi: 10.1016/j.addr.2017.10.011.

Wilson JS, Apte MV. (2003). "Role of alcohol metabolism in alcoholic pancreatitis." *Pancreas* 27(4): 311-315. doi: 10.1097/00006676-200311000-00007.

Wynn TA. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." *J Pathol*; 214(2): 199-210. doi: 10.1002/path.2277.

Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ. (2005). "Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis." *Gut*; 54(1):42-151. doi: 10.1136/gut.2004.042127.

Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, Fiala-Beer E, Zhang X, Yang L, Biankin AV, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. (2010). "Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis." *Am J Pathol*; 177(5): 2585-2596. doi: 10.2353/ajpath.2010.090899.

Yang H, Brackett, CM, Morales-Tirado VM, Li Z, Zhang Q, Wilson MW, Benjamin C, Harris W, Waller EK, Gudkov AV, Burdelya LG, Grossniklaus HE (2016). "The Toll-like receptor 5 agonist entolimod suppresses hepatic metastases in a murine model of ocular melanoma via an NK cell-dependent mechanism." *Oncotarget*; 7(3): 2936-2950. doi: 10.18632/oncotarget.6500.

Yang L, Seki E. (2012). "Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms." *Front Physiol*; 3: 138. doi: 10.3389/fphys.2012.00138.

Yuan Y, Han Q, Li S, Tian Z, Zhang J. (2017). "Wnt2b attenuates HSCs activation and liver fibrosis through negative regulating TLR4 signaling." *Sci Rep*; 7(1): 3952. doi: 10.1038/s41598-017-04374-5.

Zambirinis CP, Levie E, Nguy S, Avanzi A, Barilla R, Xu Y, Seifert L, Daley D, Greco SH, Deutsch M, Jonnadula S, Torres-Hernandez A, Tippens D, Pushalkar S, Eisenthal A, Saxena D, Ahn J, Hajdu C, Engle DD, Tuveson D, Miller G. (2015). "TLR9 ligation in pancreatic stellate cells promotes tumorigenesis." *J Exp Med* 212(12): 2077-2094. doi: 10.1084/jem.20142162.

Zhang D, Zhuang R, Guo Z, Gao M, Huang L, You L, Zhang P, Li J, Su X, Wu H, Chen X, Zhang X. (2018). "Desmin- and vimentin-mediated hepatic stellate cell-targeting radiotracer (99m)Tc-GlcNAc-PEI for liver fibrosis imaging with SPECT." *Theranostics* 8(5): 1340-1349. doi: 10.7150/thno.22806.

Zhao YL, Zhu RT, Sun YL. (2016). "Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis." *Biomed Rep* 4(3): 269-274. doi: 10.3892/br.2016.578.

Zhou Y, Zhou Q, Chen R. (2012). "Pancreatic stellate cells promotes the perineural invasion in pancreatic cancer." *Med Hypotheses* 78(6): 811-813. doi: 10.1016/j.mehy.2012.03.017.

10. Anhang

10.1. Lebenslauf

10.2. Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanke.

Vorklinischer Studienabschnitt:

Adamkiewicz, Bauer, Bette, Bonaterra, Braun, Brehm, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Feuser, Grundmann, Hildebrandt, Kinscherf, Koolmann, Lill, Löffler, Luers, Milani, Mueller, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Patrascan, Preisig-Müller, Rost, Sahmland, Schratt, Schütz, Schwarz, Steiniger, Stiewe, Thieme, Weihe, Westermann, Wrocklage

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Arenz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Besgen, Best, Bien, Bohlander, Burchert, Czubayko, Damanakis, Dettmeyer, Donner-Banzhoff, Dodel, Duda, Eberhart, Eming, Fendrich, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Gress, Grimm, Grosse, Grzeschik, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kill, Kirschbaum, Klose, Köhler, König, Kruse, Kühnert, Lechler, Librizzi, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisch, Mandic, Metzelder, Moll, Mossdorf, Mueller, Mutters, Nenadić, Neubauer, Nimsky, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Peterlein, Plant, Renz, Richter, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schu, Schüttler, Seifert, Seipelt, Sekundo, Sommer, Tackenberg, Teymoortasch, Timmermann, Vogelmeier, Vorwerk, Wagner, Waldmann, Werner, Wilhelm, Wissniowski, Wulf, Zemlin, Zentgraf, Zwiorek

11. Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Thaddäus Till Hippokrates Wissniowski bedanken für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit mit Bereitstellung des hochinteressanten Themas im Institut für Gastroenterologie, Endokrinologie, und Stoffwechsel des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Pietro Di Fazio vor allem für die unermüdliche Unterstützung und Geduld bei der Planung und Umsetzung der Experimente, sowie für die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse und schliesslich das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Pia Janssen, Norman Gercke und Carmen Bollmann danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor, die mir immer mit Rat und Tat in allen praktischen Angelegenheiten zur Seite standen.

Mein Dank gilt insbesondere unserer Arbeitsgemeinschaft FDL, den Freunden der Leber, sowie meinen engsten Freunden und Kollegen für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihren Beistand, Hilfe beim Korrekturlesen und für das Ermutigen, trotz so mancher Durchhänger, das Ziel „Dissertation“ nicht aus den Augen zu verlieren.

12. Ehrenwörtliche Erklärung