
Aus der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie,
Infektiologie, Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Inhibition fibrotischer Prozesse am Beispiel der
Leberfibrose mittels Untereinheiten des Kollagen VI-
Fragmentes an hepatischen Sternzellen im
Zellkulturmodell mit der Rattenzelllinie CFSC**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jessica Cziomer

aus Leipzig

Datum der Promotion: 23. Juni 2019

“I never saw a wild thing sorry for itself. A small bird will drop frozen dead from a bough without ever having felt sorry for itself.” David Herbert Lawrence

Meinen am 15. April 2010 in Afghanistan gefallenen Kameraden Josef K. und

Marius D., in ewigem Gedenken.

Und für meine Omi in tiefer Liebe.

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	v
II	Tabellenverzeichnis	vi
III	Abkürzungsverzeichnis	vii
IV	Kurzfassung	x
V	Abstract:	xii
1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und spezifische Struktur der Leber.....	1
1.2	Lebererkrankungen: Fibrose und Zirrhose.....	4
1.2.1	Fibrogenese.....	6
1.3	Hepatische Sternzellen.....	7
1.4	Die extrazelluläre Matrix der Leber.....	9
1.4.1	Kollagene.....	10
1.4.2	Kollagen Typ VI (KVI) und sein tripelhelikales Fragment (KVI-F).....	11
1.5	Aktuelle therapeutische Ansätze bei Leberfibrose.....	13
1.6	Aufgaben-/ Fragestellung.....	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Reagenzien und Kits.....	18
2.2	Gewinnung von KVI-F aus humanen Plazenten.....	20
2.2.1	Puffer und Lösungen.....	20
2.2.2	Isolierung von Kollagenen aus Gewebe.....	20
2.2.3	Entsalzung und Konzentrierung der KVI-F-Präparation.....	21
2.2.4	Reaktivierung von präpariertem KVI-F.....	21
2.3	Isolierung von Einzelketten des KVI-F.....	23
2.3.1	Puffer und Lösungen.....	23
2.3.2	Aufschmelzen der Einzelketten durch Reduktion und Alkylierung.....	24
2.3.3	Trennung alkylierter und reduzierter Einzelketten des KVI-F.....	24
2.4	Aus KVI-F-abgeleitete Peptide.....	27
2.5	Zellkultur.....	28
2.5.1	Medien, Puffer und Lösungen.....	28
2.5.2	Die Zelllinie CFSC.....	29
2.5.3	Standardkultur von CFSC.....	29
2.5.4	Bestimmung der Vitalität und Zelldichte.....	30
2.5.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	30
2.5.6	Synchronisation von Zellen in der Kultur.....	31
2.6	Nachweis der Zellproliferation durch Einbau von [³ H]-Thymidin.....	32
2.7	Vitalitäts- und Apoptoseassay.....	33
2.8	Nachweis der Genexpression mittels quantitativer PCR.....	34
2.9	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit Nano Orange®.....	36
2.10	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
2.10.1	Puffer und Lösungen.....	37
2.10.2	Proteintrennung durch Elektrophorese.....	37

2.10.3	Färbung von Gelen mit Coomassie®-G250	38
2.11	Proteinnachweis mittels Western-Blot	39
2.11.1	Puffer und Lösungen	39
2.11.2	Proteintrennung, -Blotting und Färbung	39
2.11.3	Immundetektion	40
2.12	Statistische Auswertung	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Isolierung von Kollagen VI aus humanen Plazenten	42
3.2	Rückfaltung/ Reaktivierung von KVI-F	44
3.2.1	Trennung der Einzelketten von KVI-F	46
3.3	Optimierung der Bedingungen für den [³ H]-Thymidineinbau durch CFSC	48
3.3.1	Einfluss der Synchronisationsbedingungen auf den KVI-F-induzierten [³ H]-Thymidineinbau	48
3.3.2	Positivkontrolle für den maximal induzierbaren [³ H]-Thymidineinbau	49
3.3.3	Wirkung von Essigsäure, des Lösungsmittels für KVI-F	50
3.4	Proliferationsfördernde Wirkung von KVI-F auf CFSC	52
3.5	Wirkung der Einzelketten von KVI-F auf die Proliferation von CFSC	53
3.5.1	Äquimolares Gemisch der drei Einzelketten von KVI-F	53
3.5.2	Äquimolares Gemisch von $\alpha 1(VI)$ und $\alpha 3(VI)$ -Kette	54
3.5.3	Einzelne isolierte KVI-F-Ketten	55
3.6	Wirkung der KVI-F-Einzelketten auf die KVI-F-induzierte Proliferation von CFSC	56
3.6.1	Äquimolares Gemisch der drei Einzelketten von KVI-F	56
3.6.2	Äquimolares Gemisch von $\alpha 1(VI)$ und $\alpha 3(VI)$ -Kette	57
3.6.3	Einzelne isolierte KVI-F-Ketten	57
3.7	Einfluss der isolierten alpha-Einzelketten aus KVI-F auf die Vitalität von CFSC	59
3.8	Einfluss von KVI-F und den isolierten Einzelketten auf die Genexpression von Fibrosemarkern in CFSC	61
3.9	Effekte von aus $\alpha 3(VI)$ -abgeleiteten Peptiden auf die KVI-F-induzierte Proliferation von CFSC	63
4	Diskussion	65
	Literaturverzeichnis	75
	Eidesstattliche Versicherung	85
	Lebenslauf	86
	Danksagung	88

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Feinaufbaus der Leber.	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der zellulären Mechanismen im Rahmen der Fibrogenese.	8
Abbildung 3: Relative Kollagenzusammensetzung der EZM in gesunder und zirrhotischer, humaner Leber.....	9
Abbildung 4: Schematische Struktur von KVI-F.	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Renaturierungsprozedur für KVI-F.	22
Abbildung 6: Aufbau eines „Blot-Sandwich“ und Platzierung im Tank [91].....	39
Abbildung 7: SDS Gel der 10% NaCl-Fällung.	42
Abbildung 8: Western Blot zum KVI Nachweis.....	43
Abbildung 9: Vergleich von unbehandeltem und reaktiviertem KVI-F.	45
Abbildung 10: (A) Nachweis der aufgetrennten Ketten; (B) Darstellung des FPLC-Graphen der über eine Hydroxyapatitsäule aufgetrennten, alkylierten und reduzierten Einzelketten des KVI-F..	47
Abbildung 11: Variation von Serumgehalt, Inkubationsdauer und -temperatur zur Synchronisation von CFSC.	48
Abbildung 12: Titration des FKS-Gehaltes in der Kultur von CFSC.	49
Abbildung 13: Wirkung von HAc auf die Proliferation von CFSC.	51
Abbildung 14: Wirkung von KVI-F auf die Proliferation von CFSC im Vergleich zur FKS-Wirkung.	52
Abbildung 15: Wirkung von KVI-Einzelketten im Gemisch auf den $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau in der Kultur der CFSC.....	53
Abbildung 16: Wirkung von $\alpha 1(\text{VI})+\alpha 3(\text{VI})$ -Kettengemisch auf den $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau in CFSC.	54
Abbildung 17: Wirkung von isolierten KVI-Einzelketten auf den $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau in der Kultur der CFSC.	55
Abbildung 18: Wirkung des isomolaren Gemisches der drei Einzelketten auf den KVI-F-induzierten $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau in CFSC.....	56
Abbildung 19: Wirkung des isomolaren Gemisches der $\alpha 1/ \alpha 3(\text{VI})$ -Ketten auf den KVI-F-induzierten $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau in CFSC.....	57
Abbildung 20: Wirkung der isolierten KVI-Einzelketten auf den KVI-F-induzierten $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau in CFSC.	58

Abbildung 21: Effekte der isolierten drei Einzelketten von KVI-F auf die Vitalität und Apoptoseinduktion in CFSC.	60
Abbildung 22: Effekte von KVI-F alleine und im Gemisch mit den isolierten alpha-Einzelketten auf die Expression von Fibrose-assoziierten Genen in CFSC.	62
Abbildung 23: Effekte von aus $\alpha 3(VI)$ abgeleiteten synthetischen Peptiden alleine (A) und auf die KVI-F-induzierte Proliferation (B) in CFSC.	64
Abbildung 24: (A) Schematische Übersicht der KVI-F Wirkung; (B) Schematische Darstellung der durch KVI-F-Untereinheiten induzierten Aufhebung der KVI-F-Wirkung.....	67
Abbildung 25: Aminosäuresequenz der $\alpha 3(VI)$ -Kette und Zuordnung der Peptide...	71

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologische Stadieneinteilung der Leberfibrose	5
Tabelle 2: Darstellung der bei einer Wellenlänge von 234nm erfassten und in 1ml Fraktionen gesammelten eluierten Peaks.....	25
Tabelle 3: Darstellung der eluierten Peaks entsprechend dem Anteil an Puffer D ...	26
Tabelle 4: Darstellung der Aminosäuresequenzen der synthetisierten Peptide	27
Tabelle 5: Verwendete Sonden und Primer für die quantitative real-time PCR	35

III Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin Rezeptor
A	Aminosäure Alanin
Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
APS	Ammoniumpersulfat
α X(VI)	α 1-, α 2- bzw. α 3-Kette von KVI-F
α -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
Bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CFSC	<i>cirrhotic fat-storing cells</i>
CO6-MMP	durch MMPs degradiertes Fragment aus der α 1(VI)-Kette
CWHM 12	<i>small molecule RGD peptidomimetic antagonist</i>
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DDR	<i>Discoidin Domain Rezeptor</i>
DE	Deutschland
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure (eng. <i>DNA</i>)
E	Aminosäure Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
erk2	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
EZM	<i>Extrazelluläre Matrix</i>
FACIT	fibrillenassoziiertes Kollagen
FAK	fokale Adhäsionskinase
FKS	Fötales Kälberserum
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
G	Aminosäure Glycin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GI	gastrointestinal
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HbA1c	Glycohäoglobin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom

HSZ	Hepatische Sternzellen
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
K	Aminosäure Lysin
KI	Kollagen Typ I
KII	Kollagen Typ II
KIII	Kollagen Typ III
KIV	Kollagen Typ IV
KV	Kollagen Typ V
KVI	Kollagen Typ VI
KXII	Kollagen Typ XII
KXVIII	Kollagen Typ XVIII
KVI-F	Tripelhelikales Kollagen Typ VI - Fragment
Ly6C ^{hi/lo}	Unreife Makrophagenart
<i>miR</i>	<i>MicroRNS</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNS	<i>Messenger RNS</i>
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NC 1	Nicht-kollagene C-terminale Domäne 1
NEM	N-Ethylmaleimid
<i>NF-κB</i>	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<i>NG2</i>	<i>nerve/ glial antigen 2</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NKG2D	Immunzellrezeptor aus der Familie CD94/NKG2
NK	Natürliche Killerzellen
P	Aminosäure Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	<i>P21-activated Kinase</i>
PAMPS	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion

PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGF-BB	Homodimer der PDGF-Familie
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTM	posttranslationale Modifikation
p53	Tumorsuppressorprotein 53
P130CAS	BCAR1 – <i>breast cancer anti-estrogen resistance 1</i>
R	Aminosäure Arginin
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RNS	Ribonukleinsäure (eng. <i>RNA</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAD	Homologes Gen <u>MAD</u> (<i>mothers against decapentaplegic</i>) von <i>Drosophila melanogaster</i> und Gen für das Protein <u>Sma</u> (<i>small body size</i>) von <i>Caenorhabditis elegans</i>
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transkription 1</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TGF- β R1/2	Transmembranrezeptor 1 und 2 für TGF- β
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i> (z.B. als Maß der enzymatischen Aktivität)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
YAP-1	<i>Yes-associated Protein 1</i>

IV Kurzfassung

Einleitung:

Durch das chronische Einwirken verschiedener Noxen kann eine Leberfibrose bzw. -zirrhose entstehen. Hauptmotor der überschießenden Matrixproduktion sind die Hepatischen Sternzellen (HSZ), welche durch die chronische Schädigung aktiviert werden, zu Myofibroblasten transdifferenzieren und verstärkt Kollagen I (KI) synthetisieren. Dies führt zu einer veränderten Matrixzusammensetzung, wobei Kollagen IV und VI (KVI) den prozentual höchsten Anstieg erfahren.

Methodik:

Das Kollagen VI-Fragment (KVI-F) wurde durch Pepsinverdau aus humanen Plazenten isoliert und mittels Reduzierung und Alkylierung in seine drei alpha-Einzelketten fragmentiert. Mittels Hydroxyapatit-Chromatographie und Ionenaustauschchromatographie konnten die alpha-Einzelketten von KVI-F isoliert werden. Diese wurden im Gemisch, alleine sowie mit und ohne KVI-F in Zellkulturstudien an der Rattenzelllinie CFSC eingesetzt. Synthetisierte überlappende Peptide aus der Aminosäuresequenz der alpha3-Einzelkette von KVI-F ($\alpha 3(VI)$) wurden ebenfalls in Zellkulturstudien eingesetzt, um funktionelle Abschnitte in der Aminosäuresequenz der Einzelkette zu identifizieren.

Die Proliferation der Zellen wurde durch Detektion des Einbaus von [3H]-Thymidin bestimmt. Bei Inhibitionsversuchen gegenüber KVI-F wurden die Zellen 1h vor KVI-F-Zugabe mit den isolierten Einzelketten vorinkubiert. Effekte von KVI-F und der überlappenden Peptide wurden mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion bestimmt.

Ergebnisse:

Zunächst konnte gezeigt werden, dass eine lagerungsbedingte Abnahme der biologischen Aktivität von KVI-F durch Denaturierung und Rückfaltung wiederhergestellt werden kann. Die bereits bekannten mitogenen Effekte von KVI-F in anderen Zelltypen konnten hier auch in CFSC gezeigt werden. Die Proliferationsinduktion durch KVI-F ließ sich durch Co-Behandlung mit 2-4-fachen molaren Überschüssen der alpha-Einzelketten hemmen, am stärksten durch $\alpha 1(VI)$ - und $\alpha 3(VI)$. Für $\alpha 3(VI)$ konnten durch analoge Versuche mit überlappenden Peptiden funktionelle Motive auf den Peptiden A3, A4 und C2 identifiziert werden. In Genexpressionsstudien konnten alle drei Einzelketten von KVI-F, die KVI-F-induzierte Genexpression der Fibrosemarker KI, TGF- β und α SMA, signifikant senken. Zudem wurde die Expression des während der Fibrose von HSZ vermehrt synthetisierten TIMP-1 durch die Einzelketten signifikant gesenkt.

Schlussfolgerung:

Die KVI-F Untereinheiten können nicht nur die durch KVI-F selbst induzierte Proliferation von HSZ inhibieren, sondern interferieren auch mit der Fibrose-typischen Synthese von Matrixbestandteilen (KI), para- und autokrin wirkenden Wachstumsfaktoren (TGF- β), Zellstrukturproteinen (α SMA) sowie Kollagenaseinhibitoren (TIMP-1). Als Mechanismus denkbar wäre eine Blockade der Aggregation des KVI-Rezeptors durch KVI-Primärstrukturen, diese Frage bedarf aber gezielter Studien.

Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen die rationale Möglichkeit, aus KVI abgeleitete Oligopeptide oder Peptidanaloga zu nutzen, um die mitogene Funktion von KVI-F während der hepatischen Fibrogenese zu blockieren und sollte perspektivisch in spezifischen Organmodellen realisiert werden.

V Abstract:

Introduction:

Due to the chronic effects of various noxae, liver fibrosis and cirrhosis can occur. Amongst other cell types, hepatic stellate cells (HSC) are central effectors during liver fibrogenesis. They get activated and transdifferentiate to myofibroblasts which mainly synthesize collagen I (CI). This results in a modified matrix composition, in which the percentage increase of collagen IV and VI (CVI) is the highest.

Methodology:

Collagen-VI-fragment (CVI-F) was isolated by pepsin digestion from human placentas. It consists of three alpha-single chains which were obtained by reduction and alkylation of CVI-F. Further, overlapping peptides based on the amino acid sequence of the alpha3-single chain ($\alpha 3(VI)$) were synthesized.

Cell culture studies were performed using a rat-derived HSC cell line (CFSC). Effects on proliferation were determined by incorporation of [3H]-thymidine. To determine inhibitory effects of the single chains and the peptides against CVI-F, the cells were 1 h preincubated before addition of CVI-F. Effects on gene expressions were determined by quantitative polymerase chain reaction.

Results:

A storage-dependent decrease of the biological activity of CVI-F could be restored by denaturation and refolding of the peptide. In vitro, CVI-F induced a concentration-dependent proliferation in CFSC confirming the already known mitogenic effects of CVI-F in other cell types. These effects of CVI-F were blocked by co-treatment with a 2-4-fold molar excess of the alpha-single chains. Here, $\alpha 1(VI)$ and $\alpha 3(VI)$ showed the strongest inhibitory activity. The $\alpha 3(VI)$ -derived overlapping peptides as well interfered with CVI-F-induced proliferation of CFSC. The peptides A3, A4 and C2 showed the strongest effects. Besides proliferation, the individual alpha single chains significantly reduced the CVI-F-induced expression of the fibrosis-associated genes CI, TGF- β and α SMA and vice versa induced the expression of TIMP-1, which was downregulated by CVI-F. The strongest effects were observed for $\alpha 2(VI)$ and $\alpha 3(VI)$.

Conclusions:

The profibrotic effects of CVI-F could be blocked by CVI-F-derived alpha single chains and $\alpha 3(VI)$ -derived peptides. Besides proliferation, the CVI-F subunits interfere with the synthesis of matrix constituents (CI), para- and autocrine-acting growth factors (TGF- β), cell structure

proteins (α SMA) and inhibitors of collagenases (TIMP-1). This might be due to a blockade of the aggregation of the CVI receptor by CVI primary structures.

The data of the present study imply the possibility of using CVI derived oligopeptides or peptide-analoga to block the promoting effects of CVI-F in liver fibrosis. This should be further studied in suitable organ models of fibrosis.

1 Einleitung

Lebererkrankungen sind in den westlichen Industriestaaten auf dem Vormarsch. Alleine in Deutschland gab es im Jahr 2015 13.934 Todesfälle, welche auf eine Leberfibrose oder –zirrhose zurückzuführen waren, 7361 (53%) davon aufgrund einer alkoholischen Genese (ICD-10 K70.3) [1]. Im Jahr 2015 resultierten daraus 1.210 Rentenzugänge in der gesetzlichen Rentenversicherung (ICD-10 K70 +K74), wobei 843 (69,7%) davon männliche Antragsteller waren, ihr Durchschnittsalter lag bei 53,02 Lebensjahren [2]. Insgesamt entstehen durch Lebererkrankungen allgemein (ICD-10 K70-77) Kosten um etwa 1,045 Mrd. Euro pro Jahr, was pro Bundesbürger Kosten von etwa 12 Euro im Jahr bedeuten [3].

Bei einer manifesten und fulminanten Lebererkrankung ist die einzige therapeutische Möglichkeit häufig die Lebertransplantation. Die weltweit erste Lebertransplantation wurde im Jahr 1963 von dem US-amerikanischen Chirurgen Th. E. Starzl in Denver durchgeführt [4]. In Deutschland erfolgte die erste Transplantation durch A. Gütgemann 1969 am Universitätsklinikum Bonn [5]. Im Jahr 2016 wurden in Deutschland 888 Lebertransplantationen durchgeführt, darunter 50 Lebendspenden. Es wurden jedoch 1284 Patienten zur Transplantation neu angemeldet. Die Hauptindikationen für eine Anmeldung zur Lebertransplantation waren im Jahr 2016 mit 626 Fällen eine Leberfibrose oder -zirrhose sowie eine äthyltoxische Leberkrankheit (ICD-10: K70 +74).[6] In einer aktuellen multizentrischen Studie liegt die 10-Jahres-Überlebensrate nach Lebertransplantation für die Jahre 2005-2010 bei 54%, für die Jahre 1990-1994 lag sie noch bei 46% [7].

Zum aktuellen Zeitpunkt konnte, trotz vielfältiger und vielversprechender Forschungsansätze, klinisch noch keine grundlegende antifibrotische Therapie etabliert werden [8].

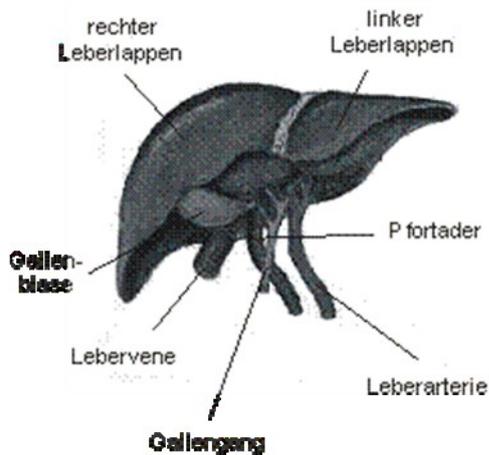
1.1 Anatomie und spezifische Struktur der Leber

Die Leber erreicht als die größte Drüse und das größte Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers ein Gewicht von 1500 bis 2000g. Sie besteht aus vier Leberlappen und wird in acht Segmente unterteilt. Über das Pfortaderblut nimmt sie die über die Darmwand resorbierten Stoffe auf, verstoffwechselt, speichert und/ oder

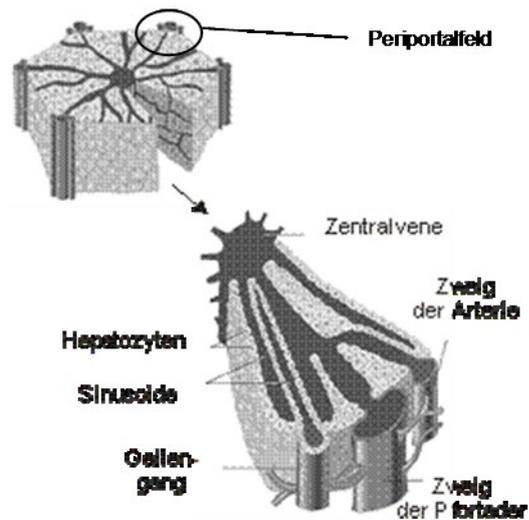
entgiftet diese und gibt sie als Stoffwechselprodukte wieder ab. In ihrer Funktion als exokrine Drüse bildet die Leber Galle und transportiert diese über die intrahepatischen Gallengänge zum Ductus hepaticus communis, von dort wird die Galle über den Ductus choledochus ins Duodenum abgegeben oder in der Gallenblase zwischengespeichert. Die intrahepatischen Gallengänge (Ductuli interlobulares) gehören genau wie die *Vv. interlobulares* (von der *V. portae hepatis*) und die *Aa. interlobulares* (von der *A. hepatica propria*) zur Glisson-Trias und werden mit dem umgebenden Bindegewebe als Periportalfeld bezeichnet. Das klassische Leberläppchen, der *Lobulus hepatis*, wird von mehreren Periportalfeldern, ähnlich Kanten begrenzt. Zentral verläuft die *V. centralis*. Sternförmig zur *V. centralis* hin verlaufen die Sinusoide, sie enthalten Mischblut aus der *V. portae* und der *A. hepatica*, zwischen diesen stehen die Leberzellplatten. In Richtung der Periportalfelder verstärken sich die Gallenkapillaren und münden schließlich in die *Dd. interlobulares* (Abbildung 1A+1B).

Geht man noch weiter ins Detail, so zeigt sich, dass die Leber aus verschiedenen Zelltypen aufgebaut ist. Die eigentliche Leberfunktion wird durch die Hepatozyten verwirklicht. Sie produzieren Galle und Plasmaproteine (Albumin, Globuline, Enzyme, Gerinnungsfaktoren), bauen Glykogen auf und speichern dieses, zudem können Fette gespeichert oder zu Lipoproteinen umgewandelt werden. Und als ein sehr wichtiger Punkt: sie metabolisieren und entgiften verschiedene Substanzen. In Richtung der Sinusoide, welche von einer fenestrierten Endothel ausgekleidet sind, besitzen die Hepatozyten winzige zottenähnliche Strukturen, die Mikrovilli. Im Verband der Endothelzellen der Sinusoide liegen Kupfferzellen, die in das Lumen hineinragen und zum mononukleären Phagozytensystem gerechnet werden. Diese speichern Zelltrümmer, Bakterien und Farbstoffe, runden sich im gefüllten Zustand ab und werden dann vom Blutstrom fortgetragen. Zwischen den Endothelzellen und den Hepatozyten liegt der schmale perisinusoidale Raum, der Disse'sche Raum (Abbildung 1C). Er enthält neben Gitterfasern und abfiltriertem Blutplasma die hepatischen Sternzellen (HSZ) (s. Kap. 1.3).[9]

A) Leber



B) Lobulus



C) Sinusoid

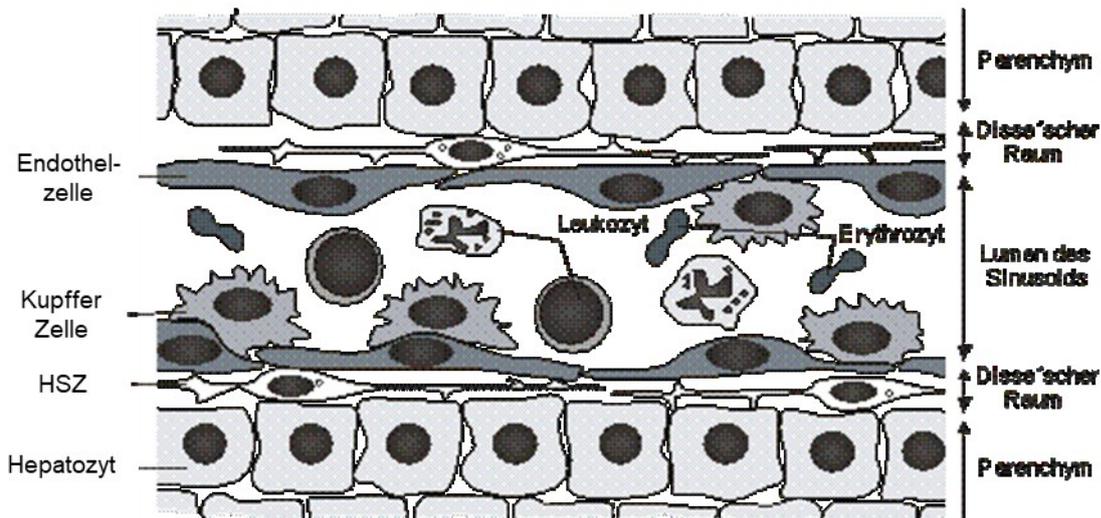


Abbildung 1: Darstellung des Feinaufbaus der Leber. Die Leber besteht aus vier Leberlappen (*Lobus*) (A) und wird in acht Segmente unterteilt, die sich wiederum aus 1-2 mm großen Leberläppchen (*Lobuli*) zusammensetzen. An den Eckpunkten benachbarter *Lobuli* liegen die Periportalfelder, in denen jeweils ein Ast der Leberarterie, der Pfortader und ein Gallengang verlaufen (B). Zwischen den Hepatozyten liegen die Kapillaren der Leber, die Sinusoide. Diese transportieren das Blut aus der Pfortader und der Arterie in Richtung Zentrum der *Lobuli*, wo es von einer Zentralvene aufgenommen wird. Die Zentralvenen vereinigen sich und das Blut verlässt die Leber über die Lebervene. Die Sinusoide der Leber werden von einem fenestrierten Endothel ausgekleidet und sind durch den Disse'schen Raum vom Parenchym getrennt (C). Im Lumen der Sinusoide sind die Leber-residenten Makrophagen, die Kupfferzellen, angesiedelt, im Disse'schen Raum die HSZ. Modifiziert nach [10].

1.2 Lebererkrankungen: Fibrose und Zirrhose (Definition/ Epidemiologie/ Ätiologie)

Die Leber hat im Vergleich zu anderen Organen eine beeindruckende Regenerationsmöglichkeit. So kann sie nach einer akuten Schädigung mit einer Zerstörung eines großen Teils, diesen wieder in relativ kurzer Zeit und in nahezu identischem Umfang sowie Funktion wiederaufbauen.

Erst eine chronische Schädigung bewirkt, über eine wiederholte Zerstörung von Gewebe und begleitet von Entzündungsreaktion und überschießender Narbenbildung, eine deutlich herabgesetzte Regenerationsfähigkeit.[11, 12] Dies führt im weiteren Verlauf zu fehlerhafter Gefäßarchitektur und Organfunktion. Pathognomonisch für die überschießende Narbenbildung ist dabei ein bis zu 10-facher Konzentrationsanstieg einzelner Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), wodurch sich das Matrixprofil und die strukturelle Mikroheterogenität ändern.[13]

Diese Bindegewebsakkumulation bei erhaltener Läppchenarchitektur und Gefäßversorgung ist charakteristisch für die Leberfibrose. Zwar kommt es nicht zu einer Produktion von untypischen EZM-Komponenten, jedoch zu einer Änderung der physiologischen Zusammensetzung mit einer Zunahme der Produktion von Kollagen Typ I (KI) sowie Kollagen Typ III (KIII).[14] Die Fibrose lässt sich entsprechend ihrer histologischen Merkmale in verschiedene Stadien einteilen (Tab. 1). Als Serummarker einer Leberfibrose in Diagnostik und Verlaufskontrolle dienen Hyaluronan, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie deren endogenen Inhibitoren, die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), spezifische Prokollagenfragmente und standardisierte klinisch-chemische Werte (in Kombination als Fibrotest). Dennoch ist zur Validierung weiterhin die histologische Untersuchung einer Leberbiopsie notwendig.[13]

Tabelle 1: Histologische Stadieneinteilung der Leberfibrose nach Desmet und Scheuer [15]

Histologische Merkmale	Stadium
Keine Faservermehrung (keine Fibrose)	F 0
Portale Faservermehrung ohne Septen (geringgradige Fibrose)	F 1
Inkomplette oder komplette porto-portale Fasersepten bei erhaltener Lappchenarchitektur (mittelgradige Fibrose)	F 2
Septenbildung durch Faservermehrung mit Störung der Lappchenarchitektur jedoch ohne Anhalt für kompletten zirrhotischen Umbau (hochgradige Fibrose)	F 3
Wahrscheinlicher oder definitiver zirrhotischer Umbau (Zirrhose)	F 4

Aufgrund einer Leberfibrose (ICD-10 K74.0) wurden im Jahr 2015 1098 Patienten stationär in deutschen Krankenhäusern behandelt, wobei hier das Verhältnis von 575:523 zwischen Männern und Frauen eher ausgeglichen ist. Dies entspricht einer altersstandardisierten Fallzahl von 27/100.000 Einwohnern.[16]

Ein Endstadium der Fibrose stellt die Leberzirrhose dar. Der Begriff Zirrhose leitet sich vom altgriechischen Wort für „gelb-orange“ *κίρρωσις* (*kírrōsis*) ab und wurde um 1800 von Laennec aufgrund der gelbgrünen Färbung einer zirrhotischen Leber geprägt. Die Zirrhose wird als entzündliche und nekrotisierende Leberschädigung verstanden. Durch Entstehung von Parenchymregeneratknoten aufgrund der Bildung von Bindegewebssepten wird die Lappchenarchitektur empfindlich verändert.[14]

Entgegen dem früheren Verständnis der Zirrhose als unumkehrbares Endstadium, ist wie bei der Fibrose auch eine Rückbildung, insbesondere bei viraler Hepatitis, möglich [17, 18].

Alkoholische Leberzirrhosen (ICD-10 K70.3) führten im Jahr 2015 in Deutschland zu 33.642 stationären Behandlungen, davon waren 23.901 männliche Patienten. Dies entspricht einer altersstandardisierten Fallzahl von 40/100.000 Einwohnern. Betrachtet man die unter der ICD-10 K74 subsumierten Leberfibrose und -zirrhose Fälle, so zeigt sich eine Fallzahl von 22.917, mit 1845 Sterbefällen während des stationären Settings.[16]

Verschiedene Erkrankungen oder dauerhafte Noxeneinwirkung können eine Leberfibrose und Zirrhose bedingen. Ätiologisch führend ist dabei die Äthyltoxizität. So werden in Deutschland etwa 60% der Leberzirrhosen durch einen chronischen Alkoholabusus verursacht. Neben chronischen Virushepatitiden (30%) sind noch die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), die Autoimmunhepatitis, die primär biliäre Zirrhose und primär sklerosierende Cholangitis, sowie verschiedene Stoffwechselerkrankungen wie Hämochromatose und Morbus Wilson zu nennen. Des Weiteren sind auch andere exogene Noxen, wie Medikamente, eine chronische Stauungsleber, häufig kardialer Genese (Rechtsherzinsuffizienz) oder parasitäre Erkrankungen ursächlich. Eine Leberzirrhose ist als Präkanzerose anzusehen, da sich etwa 60-90% aller hepatozellulären Karzinome (HCC) auf Basis einer zirrotischen Leber entwickeln. Das HCC ist ein epithelialer Tumor, der sich aus Hepatozyten entwickelt und hochmaligne ist. Seine Inzidenz liegt in Europa bei etwa 2 pro 100.000 Einwohnern und hat neben der Leberzirrhose ähnlich vielfältige Ursachen wie diese.[19] Wie bei der Fibrose existiert zur Behandlung des HCC, mit Ausnahme des Multikinase-Inhibitors Sorafenib, bis heute keine zugelassene medikamentöse Therapieoption [20].

1.2.1 Fibrogenese

Für die Entstehung einer Leberfibrose und ihrem Endstadium, einer Leberzirrhose, ist, wie oben genannt, eine anhaltende Schädigung vor allem der Hepatozyten, aber auch der hepatischen Makrophagen (Kupfferzellen), der Sinusendothelzellen sowie Lymphozyten notwendig [21]. So geschädigte Hepatozyten geben über Nekrose, Apoptose und Nekroptose (eine *Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 3* (RIPK3)-vermittelte regulierte Nekrose) [22] verschiedene profibrogene und proinflammatorische Botenstoffe an die umgebenden nicht-parenchymalen Zellen ab und führen zur Infiltration von Immunzellen. Diese können sowohl zur Fibrosezunahme als auch zu deren Abbau beitragen.[11, 12, 23] So bewirken Desoxyribonukleinsäure- (DNS) Fragmente der untergehenden Hepatozyten, ebenso wie *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) und apoptotische Zellkörperchen zusammen mit reaktiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species* – ROS) eine Aktivierung der Kupfferzellen. Diese wiederum setzen

verschiedene proinflammatorische Botenstoffe wie Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α), die Chemokine CC-Chemokin-Ligand 2 und 5 (CCL2, CCL5) und *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), sowie profibrogene Botenstoffe, hier am bedeutsamsten der Transformierende Wachstumsfaktor beta (*Transforming Growth Factor- β* – TGF- β), frei.[24-26] Die freigesetzten Botenstoffe wiederum, allen voran TGF- β sowie der *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), aktivieren die HSZ [24-26], welche maßgeblich zur Fibrogenese beitragen [21] (siehe Abb. 2 und Kap. 1.3). Neben HSZ sind auch weitere Zelltypen an der Fibrogenese beteiligt. Durch die gleichzeitige Stimulation von Thrombozyten durch PDGF, TGF- β und *Epidermal Growth Factor* (EGF) [21] sowie von unreifen Monozyten aus dem Knochenmark durch CCL2 von Kupfferzellen und HSZ, werden weitere nicht leberstämmige Zellen [27, 28] in das Geschehen involviert. Auch die monozytenabstammenden unreifen Ly6C^{hi} (CD11b⁺F4/80⁺)-Makrophagen wurden als Fibrose-fördernd identifiziert [29]. Wenn diese zu Ly6C^{lo}-Makrophagen differenzieren (fraglich über den *C-X3-C motif chemokine receptor 1* (CX₃CR1)), wird ihnen auch eine Fibrose-auflösende Wirkung zugeschrieben [30].

1.3 Hepatische Sternzellen

Für die HSZ, welche erstmals 1876 von Kupffer beschrieben wurde, gab es bis zur Einigung auf einen standardisierten Namen 1996, verschiedene Begriffe wie: Ito-Zelle, Lipozyte, Perisinusoidal – oder Parasinusoidal-Zelle sowie Fettspeicherzelle [31]. Die HSZ befinden sich wie oben beschrieben im Disse'schen Raum, sie weisen im ruhenden (quieszenten) Zustand zahlreiche Vitamin A-haltige Fetttropfen auf und umfassen mit ihren zytoplasmatischen Ausläufern das Endothel [9]. Durch diese Ausläufer sollen sie in der Lage sein, den Blutfluss in der Leber zu regulieren und die Angiogenese zu stimulieren [32]. Die HSZ sind ein wesentlicher Produzent der EZM, sowie von MMPs und TIMPs. Ruhende HSZ exprimieren hauptsächlich interstitielle Kollagenasen und Stromelysin-1, wohingegen sie in aktivierter Form hauptsächlich MMP-2, MMP-1, TIMP-1 und TIMP-2 produzieren.[33] Diese Aktivierung oder Transdifferenzierung der HSZ zu kontraktile Myofibroblasten erfolgt bei chronischer Schädigung der Leber (siehe Kap. 1.2.1.) [31, 34]. Sie lässt sich in zwei Phasen einteilen, die Initiierungsphase und die Phase der Aufrechterhaltung (Perpetuation).

Während der Initiierungsphase kommt es zu Änderungen in der Genexpression und im Phänotyp, so verlieren sie ihre Vitamin-A – Speicherfunktion, exprimieren stark das zytoskeletale Protein α -smooth muscle actin (α SMA) und sind deutlich proliferativer als ihre ruhenden Vorläufer.[35] Die Zellen werden durch diese Veränderungen noch empfänglicher für para- aber auch autokrine Stimuli [36, 37]. Dies wird durch vermehrte Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β) und anderen Substanzen (s.o.) induziert [9]. Die sich anschließende Phase der Aufrechterhaltung ist dann eine Folge der externen Stimuli (autokrin und parakrin). Es kommt zum Verlust der Vitamin-A Vakuolen, zudem können die HSZ z.B. durch PDGF-vermittelte Chemotaxis in die geschädigten Areale der Leber einwandern.[36, 37] Aktivierte HSZ proliferieren verstärkt, zeigen eine erhöhte, TGF- β -vermittelte Produktion von EZM und tragen damit maßgeblich zur hepatischen Fibrogenese bei [21].

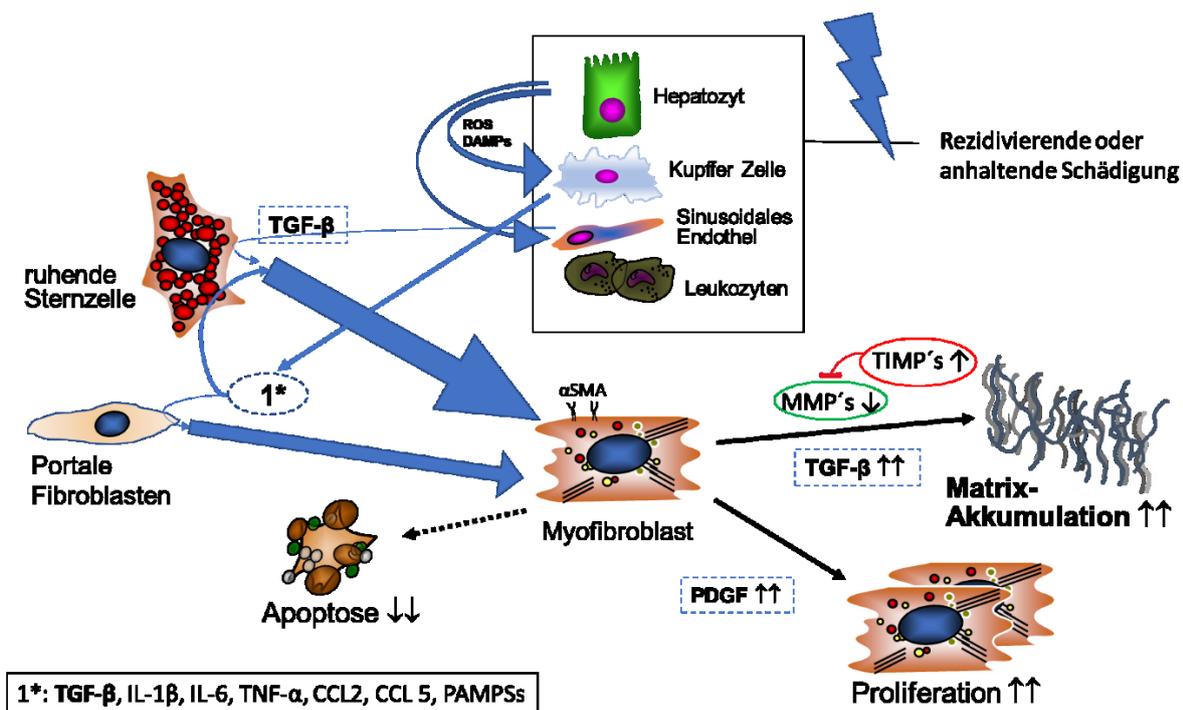


Abbildung 2: Schematische Darstellung der zellulären Mechanismen im Rahmen der Fibrogenese. Im Rahmen der Fibroseentstehung kommt es zu einer Aktivierung von quieszenten HSZ sowie portalen Fibroblasten über verschiedene Botenstoffe. Geschädigte Hepatozyten setzen u.a. ROS und DAMPs frei, die zur Botenstoff-sezernierung in Kupfer- und Endothelzellen führen. Dies führt jeweils zur Transdifferenzierung der HSZ und portalen Fibroblasten zu einem Myofibroblasten-Phänotyp (α SMA). Dieser zeigt dann eine TGF- β vermittelte verstärkte Produktion von EZM, sowie eine PDGF-induzierte verstärkte Proliferation. Zeitgleich sind der Matrix-Abbau sowie die Apoptose der Myofibroblasten erniedrigt. Dies führt letztlich zur EZM-Akkumulation, welche die Fibrose charakterisiert. Zeichen: \uparrow -Steigerung, \downarrow -Verringerung, \perp -Hemmung. Modifiziert nach [38].

Eine Inaktivierung der aktivierten HSZ, im Sinne einer Differenzierungsinduktion, sowie vermehrte Apoptose der aktivierten HSZ, können, bei Wegfall der Noxe, zu einer Fibroseregression (Regressions- oder Resolutionsphase) führen [11, 12, 21, 23, 32]. Bedingt wird dies z.B. durch natürliche Killerzellen (NK) über den *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-Signalweg und durch die o.g. Ly6C^{lo}-Makrophagen, vermittelt durch MMP-9 und MMP-13 sowie IL-10 [30, 39]. Ebenso ist dies für Hepatozyten mittels des *Nerve growth factors* (NGF) beschrieben [40].

1.4 Die extrazelluläre Matrix der Leber

Die EZM, unabhängig vom Organsystem, beinhaltet zahlreiche biologisch aktive Moleküle und dient als Speicher verschiedenster Moleküle der Zellkommunikation, welche durch proteolytische Prozesse freigesetzt werden können. Ihr kommt daher nicht nur Bedeutung als verbindender und stützender Bindegewebsraum zu, sondern auch als Speicher und interzellulärer Kommunikationsplattform.

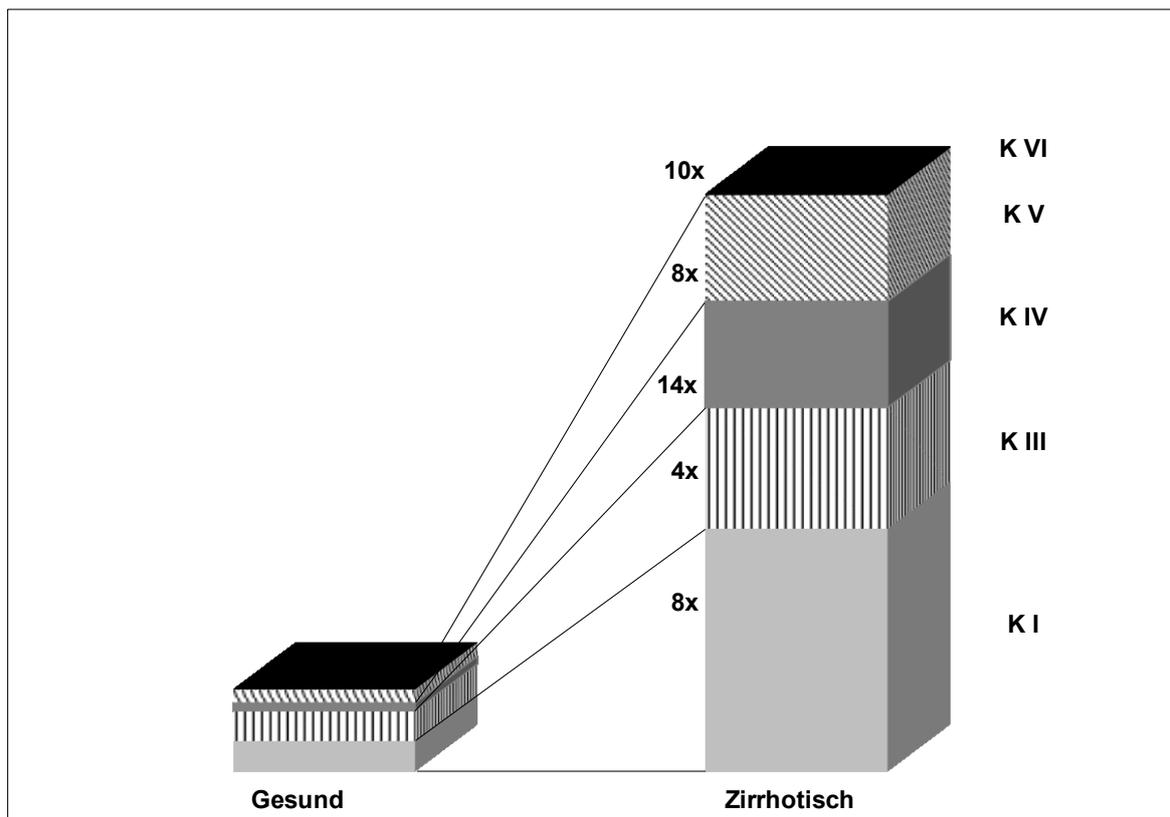


Abbildung 3: Relative Kollagenzusammensetzung der EZM in gesunder und zirrhotischer, humaner Leber. Kollagen Typ I ist in der zirrhotischen Leber zwar das anteilmäßig häufigste Kollagen, jedoch zeigen die Kollagene Typ IV und VI eine bis zu 14-fache Zunahme ihrer Masse im Vergleich zur gesunden Lebermatrix. Modifiziert nach [35].

Hauptbestandteile der hepatischen EZM sind Kollagene, wobei KI, KIII und KV am häufigsten vertreten sind, Kollagen VI (KVI) dagegen nicht so häufig.[41] In der fibrotischen Leber jedoch zeigt sich ein etwa zehnfacher Anstieg des KVI [42, 43] (Abb. 3). Auch weitere Moleküle wie Elastin, Fibronectin, Hyaluron, Laminin und Proteoglykane sind maßgeblich am Aufbau der Matrix beteiligt [44]. Im physiologischen Zustand besteht ein Gleichgewicht zwischen Fibrogenese und Fibrolyse, bewerkstelligt durch MMPs und ihre natürlichen Inhibitoren, den TIMPs [45]. Kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts, etwa wie bei der Leberfibrose durch ein Einwirken einer Noxe, überwiegt die massiv gesteigerte Fibrogenese bei gleichzeitig verminderter Fibrolyse [44].

1.4.1 Kollagene

Kollagene gehören zur Familie der Glykoproteine [41], welche sich in ihrer jeweiligen Molekülfaltung und -länge von Typ zu Typ unterscheiden. Aktuell sind beim Menschen 28 Isoformen bekannt.[46] Allen gemein ist, dass bei den Aminosäuresequenzen an jeder dritten Stelle Glycin steht, zudem wiederholt sich die Sequenz Glycin-Prolin-Hydroxyprolin sehr häufig (20-22%). Lange Polypeptidketten (α -Ketten, Primärstruktur) bilden eine linksgängige Helix (Sekundärstruktur) und drei davon umwinden sich untereinander zu einer rechtsgängigen Superhelix bzw. Tripelhelix (Tertiärstruktur), welche über Wasserstoffbrückenbindungen, durch das Hydroxyprolin stabilisiert werden. Dabei ist innerhalb eines Kollagenmoleküls nur ein bestimmter Teil (Kollagen Typ-spezifisch) tripelhelikal aufgebaut. Die Länge der Tripelhelix ist also ein unterscheidendes Merkmal bei den verschiedenen Kollagentypen. Sie kann durch nicht-helikale Anteile unterbrochen sein. Stabilisierende Zwischenverbindungen, sog. *cross-links*, innerhalb und zwischen den Kollagenmolekülen werden durch Lysin und Hydroxylysin vermittelt und bedingen entsprechende supramolekulare Formen (Quartärstruktur). Zudem kann Hydroxylysin glykosyliert werden, wobei auch dieser Anteil zusammen mit den *cross-links* ein typenspezifisches Unterscheidungsmerkmal darstellt.[41]

Einige ausgesuchte Beispiele werden im Folgenden dargestellt.

KI gehört wie Kollagen Typ II (KII) und KIII zu den klassischen fibrillären Kollagenen, welche etwa 80-90% des Gesamtkollagens im menschlichen Körper ausmachen,

wobei KI ubiquitär vorkommt und der häufigste Kollagentyp im Bindegewebe ist. Kollagen Typ XII (KXII) gehört zu den fibrillenassoziierten Kollagenen (FACIT), welche selbst keine Fibrillen bilden, und kommt vor allem in Haut, Sehnen und Knorpel vor.[47]

1.4.2 Kollagen Typ VI (KVI) und sein tripelhelikales Fragment (KVI-F)

KVI kommt in der interstitiellen Matrix des Menschen ubiquitär vor (insbesondere in Knochen, Knorpel, Haut und Gefäßen) [47]. Es ist elektronenmikroskopisch gut an seiner perlenkettenartigen Struktur erkennbar. KVI ist ein Heterotrimer, das keine Fibrillen bildet, aber Mikrofilamente aufbaut (Abb. 4). Durch die Verbindung von Zellen besitzt KVI eine wichtige Funktion für die Gewebsintegrität.[48] Über Apoptosehemmung und Reduzierung oxidativer Schäden hat KVI auch zytoprotektive Effekte. Es reguliert und fördert die Zelldifferenzierung und kann zudem Tumorwachstum begünstigen [49]. Je nach Gewebeart kommen noch weitere spezifische Funktionen hinzu, so fördert es z.B. die Vernarbung des Herzmuskels nach einem Herzinfarkt [50]. In verschiedenen Zelltypen wirkt das tripelhelikale Fragment von KVI (KVI-F) proliferativ und fördert die *de novo* DNS-Synthese [51]. So ist KVI-F in der Lage die DNS-Synthese der HSZ und anderer mesenchymaler Zellen, nahezu 100-fach zu stimulieren und ist damit ähnlich potent wie PDGF-BB, der stärkste bekannte Wachstumsfaktor für aktivierte HSZ [52]. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits nachgewiesen werden, dass KVI-F intrazellulär die Tyrosinphosphorylierung der Adhäsionsproteine p130CAS, Paxillin und fokaler Adhäsionskinase (FAK) induziert und die *Mitogen-activated protein Kinase* (MAP-Kinase) ERK2 aktiviert [51]. KVI-F ist zudem in der Lage *in vitro* die Apoptose von HSZ ebenso effizient zu inhibieren, wie es eine Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FKS) zum Kultursmedium vermag [53]. Da die $\alpha 1-3(VI)$ -Ketten diese Effekte nicht bewirken bzw. teilweise sogar inhibieren, erfordert die Signaltransduktion über KVI-F vermutlich die Aggregation des putativen KVI-Rezeptorkomplexes [52]. Im Vergleich zu fibrillären Kollagenen besitzt KVI nur eine sehr kurze tripelhelikale Region, jedoch große globuläre N- und C-terminale Regionen [46]. Eine Mehrzahl dieser globulären Domänen haben dabei eine strukturelle Übereinstimmung mit von-Willebrand-Faktor (vWF) A Domänen, diese

finden sich in unterschiedlicher Anzahl in den globulären Regionen aller KVI-Ketten [54]. Beim KVI beginnt der supramolekulare Zusammenbau, im Gegensatz zu allen anderen Kollagenen, schon innerhalb der Zelle. Zunächst werden antiparallele Dimere aufgebaut und nachfolgend Tetramere gebildet, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Anschließend werden diese in den Extrazellularraum exozytiert, wo sie sich zu perlschnurartigen Filamenten oder o.g. Mikrofibrillen zusammenlagern [46]. In Abbildung 4 sind der Aufbau und die Mikrofilamentbildung von KVI schematisch dargestellt.

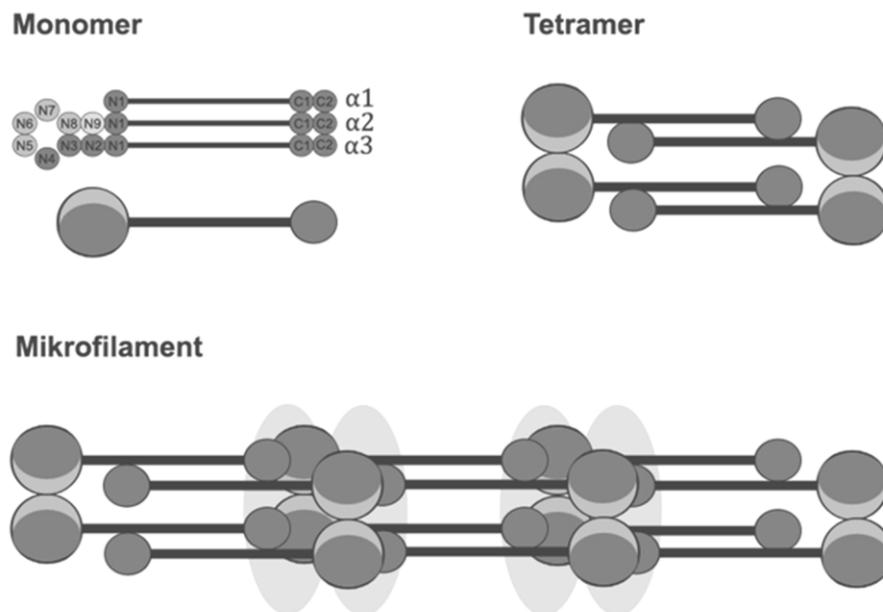


Abbildung 4: Schematische Struktur von KVI-F. Alle Überstrukturen werden aus den drei alpha-Ketten $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ und $\alpha 3(VI)$ gebildet. In der Zelle lagern sich zunächst zwei Monomere zu einem Dimer aneinander, wobei die antiparallele Ausrichtung durch die Affinität des C-Terminus zur Tripelhelix entsteht und das Dimer durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Je zwei Dimere assoziieren zu einem Tetramer, das schließlich sezerniert wird. Mikrofilamente bauen sich extrazellulär selbstorganisiert aus den Tetrameren auf [46]. Modifiziert nach [58].

In der intakten Form enthält das KVI den beschriebenen globulären Anteil und zeigt in der Gelelektrophorese ein typisches Bandenmuster zwischen 185-240 kDa und eine starke Bande bei 145 kDa. Das KVI, welches im eigenen Labor aus humanen Plazenten gewonnen wurde, enthält diesen globulären Anteil aufgrund der Isolierungsmethode (inkl. Pepsinverdau) nicht und wird daher als KVI-Fragment (KVI-F) bezeichnet. Es besteht nur aus dem tripelhelikalen Abschnitt des KVI-Moleküls. Durch Auflösen der tripelhelikalen Struktur von KVI-F mittels Denaturierung und

Alkylierung, können die drei alpha-Einzelketten des KVI-F (α 1-3(VI)) isoliert werden, welche ein unterschiedliches Molekulargewicht aufweisen [55]. Kürzlich wurden auch drei neue alpha-Einzelketten von KVI identifiziert, welche entsprechend α 4(VI), α 5(VI) und α 6(VI) benannt wurden, aber nicht in der Leber exprimiert werden [56, 57].

1.5 Aktuelle therapeutische Ansätze bei Leberfibrose

Rationale Angriffspunkte für eine antifibrotische Therapie der Leber sind, aufgrund der Pathogenese, die Ausschaltung der chronischen Schädigung sowie eine Eindämmung der Entzündungsreaktion und Immunantwort, zudem ein Angriff auf bestimmte Signalwege, eine Reduktion der Fibrogenese und ein Auflösen der Fibrose mittels Apoptoseinduktion in HSZ, einer vermehrten Matrixdegradation oder Knochenmark- und Zelltransplantationen [8].

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es jedoch noch kein Medikament auf dem Markt, welches als antifibrotisch zugelassen ist [8]. Trotz mehrerer vielversprechender präklinischen Studien mit dem Nachweis einer antifibrotischen Wirkung in Zellkultur- oder Tiermodellen, steht ein klinischer Nachweis noch aus [59].

Nachfolgend werden verschiedene therapeutische Ansätze skizziert:

Ätiologischer Behandlungsansatz:

Das Ausschalten der chronischen Schädigung ist entsprechend abhängig von der Ursache. Nachvollziehbarer Weise ist „die Abstinenz von Alkohol bei alkoholischer Lebererkrankung und ein Absenken von Eisen oder Kupfer bei Hämochromatose oder M. Wilson ebenso effektiv, wie die erfolgreiche Bekämpfung der Hepatitis B- und C-Viren bei viraler Hepatitis (...) oder einer Dekompression bei einer Gallengangsobstruktion“ (Übersetzung durch den Autor) [21].

Verminderung von Entzündungsreaktion und Immunantwort:

Zur Eindämmung der Entzündungsreaktion erfolgen Versuche mit Antioxidantien. Hier zeigte z.B. Vitamin E in einer großen Studie mit 247 erwachsenen Patienten mit NASH ein signifikante Verbesserung im Vergleich zur Placebogruppe mit deutlichem Absinken der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT)-Blutserumlevel und histologischer Verbesserung in der Leberbiopsie nach 96

Behandlungswochen [60]. Eine weitere Studie mit 173 an Steatosis hepatis (Fettleber) erkrankten Kindern zeigte jedoch ein negatives primäres *Outcome* für eine Vitamin E-Supplementation [61]. Eine Langzeitbehandlung von Patienten mit Leberfibrose bei chronischer Hepatitis C mit Losartan®, einem reinen Angiotensin-II-Antagonisten, konnte eine antiinflammatorische Wirkung über ein signifikantes Absinken in der Genexpression für reduzierte Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase, MMP2 sowie Prokollagen $\alpha 1$ (I), $\alpha 1$ (IV) u.w. zeigen [62]. Immunmodulatorische Corticosteroide finden aktuell nur Anwendung bei der Autoimmunhepatitis, werden aber oft mit Azathioprin kombiniert, um die Cortisondosis aufgrund der Nebenwirkung eines Cushing-Syndroms möglichst gering zu halten [63]. Auch die Neutralisierung inflammatorischer Zytokine wird intensiv beforscht, in einer Studie mit 48 Patienten mit schwerer alkoholischer Hepatitis zeigte jedoch das TNF α -neutralisierende Molekül Etanercept eine deutlich erhöhte Sechsmonats-Mortalität im Vergleich zur Placebogruppe (57,7% vs. 22,7%) [64]. Pentoxifyllin, welches die Freisetzung von Interleukinen und TNF α hemmen kann, zeigte in einer Studie mit 335 Patienten mit Leberzirrhose zwar nicht die initial von Akriadiadis et al. (2000) [65] nachgewiesene Senkung der Kurzzeit-Mortalität, jedoch zeigten die so behandelten Patienten im Vergleich zur Placebogruppe deutlich weniger Zirrhose-assoziierte Nebenwirkungen (66,8% vs. 49,7%), wie hepatische Enzephalopathie oder gastrointestinale (GI) Blutungen [66].

Unterbrechung Fibrose-assoziiierter Signalwege:

Bezüglich eines Angriffs an den komplexen Signalwegen gibt es vielschichtige Versuchsansätze, so exprimieren Myofibroblasten u.a. den 5-Hydroxytryptamin Rezeptor 2B –Rezeptor (5-HT_{2B}), welcher stark mit einer fibrotischen Leber der Ratten assoziiert ist. Serotoninantagonisten (selektiv für 5-HT₂), wie Methiothepin oder Spiperone hemmten die Proliferation der HSZ und induzierten sogar deren Apoptose [67]. Bei den Adipozytokinen führt das Ghrelin, ein GI-Hormon zur Steuerung von Hunger- und Sättigungsgefühl, zu einer deutlich geringeren Leberschädigung, u.a. durch vermindertem EZM-Umbau sowie verminderter Myofibroblasten-Akkumulation bei Gallengangs-ligierten Ratten [68]. Als *small-molecule*-Bcr-Abl Tyrosine-Kinase-Antagonist konnte für Nilotinib *in vitro* und *in vivo* (fibrotische Mäuse) eine Reduzierung der Leberschädigung und Fibrose über eine

Hemmung der PDGF- und TGF- β -Phosphorylierung nachgewiesen werden. Es hemmt damit die Proliferation und Migration der HSZ ebenso wie die Expression von Kollagenen und α -SMA, und soll zudem über eine erhöhte Tumorsuppressorprotein (p53)-Expression eine Apoptose der HSZ induzieren können [69].

Fibroseinhibition:

Eine Hemmung der Fibrogenese ist eines der frühesten Ziele in der Fibrosetherapie. Bemerkenswert ist eine Beobachtungsstudie von Patienten mit Leberfibrose und -zirrhose über sechs Monate (mit einer Leberbiopsie zur Verifizierung), bei der die Probanden regelmäßig nach ihren Kaffeekonsumgewohnheiten befragt wurden. Es zeigte sich, dass eine mittlere tägliche Koffeinaufnahme von etwa 308 mg (2,25 Tassen Kaffee) mit einer signifikant niedrigeren Leberfibrosierungsrate assoziiert war [70]. Auch weitere pflanzliche bzw. Naturheilstoffe wurden untersucht. Für Curcumin konnte an Nagetieren gezeigt werden, dass es die HSZ-Proliferation hemmt und zudem deren Apoptose initiiert. Außerdem Verhindert es indirekt die EZM-Akkumulation über eine vermehrte Expression von MMPs [71].

Fibroseresolution:

Zur Fibroseresolution gibt es Ansätze an unterschiedlichen Systemen. So konnte gezeigt werden, dass eine Adenovirenvektor-vermittelte Überexpression von MMP-8 *in vivo* zu einer Fibroseremission führt [72]. Das Alkaloid Halofuginone, welches in der Tiermedizin als Kokzidiostatikum (gegen Darmparasiten) eingesetzt wird, hemmt spezifisch die KI-Synthese. Eine Halofuginon-Behandlung führte in HSZ zu vermehrter Heparanase-mRNS-Synthese, einem Enzym zur Spaltung von Heparan-Sulfat-Proteoglykan, welches eine besondere Rolle in der fibrotischen EZM hat. Zudem führt es zu vermehrter VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) mRNS-Expression, was ebenfalls Heparanase-induzierend wirkt [73].

HSZ-spezifische Ansätze:

In einem Modell mit NASH-Mäusen konnte Polaprezinc, ein Zink-Carnosin-Chelat-Komplex, in einer frühen Phase die HSZ-Aktivierung, Lipidperoxidation sowie die Expression proinflammatorischer Zytokine hemmen. In einer späteren Phase wurde auch die Expression von TIMP 1 gehemmt.[74] Für *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) ist bekannt, dass es die Sensibilität der HSZ

gegenüber der Apoptoseinduktion reduziert, wogegen Angiotensin II über Untereinheiten die Aktivität von NF- κ B induziert. Ein Einsatz des *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE)-Hemmers Captopril und des *Inhibitor- κ B-Kinasekomplex* (IKK)-Hemmers Sulfasalazin reduzierte das Myofibroblastenüberleben und bewirkte einen Rückgang der Fibrose.[75] Das während der HSZ-Aktivierung freigesetzte Vitamin A induziert den 1/NKG2D-Liganden, welcher wiederum die NK bedingte Zelllyse der HSZ hemmt. INF- γ sowie Polyinosinic-polycytidylic-Säure (synthetische Nachbildung viraler dsRNS) erhöhen die Zytotoxizität der NK gegen HSZ sowie die Expression von NKG2D und TRAIL.[39]

Signal Transducer and Activator of Transkription 1 (STAT1) wies in einer in vivo Studie ebenfalls einen therapeutischen Effekt auf die Leberfibrose auf. Durch Anregung von NK zum Abtöten der HSZ werden die HSZ-Proliferation sowie der TGF- β -Signalweg gehemmt.[76]

Terai et al. konnten nachweisen, dass die periphervenöse Infusion von mononuklearen Knochenmarkszellen bei Patienten mit Leberzirrhose zu einem Anstieg der Lebersynthese (Albumin und Gesamtprotein) und zu einer Verbesserung des Child-Pugh-Scores führt [77].

1.6 Aufgaben-/ Fragestellung

Unter Nutzung eines etablierten Zellkulturmodells mit einer HSZ-Zelllinie aus Ratten sollten fibrogene Effekte von KVI-F untersucht werden. Vor dem Hintergrund einer möglichen Hemmung dieser Effekte, sollten zudem mögliche inhibitorische Wirkungen von KVI-F-Einzelketten sowie daraus abgeleiteten Peptiden gegenüber der Wirkung von KVI-F bestimmt werden. Die Arbeiten sollen die Grundlage für weitere Arbeiten in Organmodellen der Leberfibrose legen, um medikamentöse anti-fibrotische Ansätze zu erforschen.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- (1) Lässt sich die vorbeschriebene mitogene Wirkung von KVI-F in HSZ durch eine geeignete Synchronisation der Zellen vor Versuchsbeginn optimieren, um mögliche inhibitorische Effekte von Testsubstanzen sensitiver zu erfassen?
- (2) Wie unterscheidet sich die Wirkung eines äquimolaren Gemisches der reduzierten/alkylierten Einzelketten von KVI-F auf die HSZ-Proliferation von der Wirkung des intakten KVI-F?
- (3) Zeigen die isolierten Einzelketten $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ und $\alpha 3(VI)$ Unterschiede in ihrer biologischen Wirkung?
- (4) Wie beeinflussen die isolierten Einzelketten $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ und $\alpha 3(VI)$ die proliferative Wirkung von KVI-F auf HSZ?
- (5) Lassen sich die Effekte der Einzelketten auf einen kleineren strukturellen Abschnitt der $\alpha 3(VI)$ eingrenzen (Konsensusstruktur)?
- (6) Wie beeinflusst KVI-F die Expression von Fibrose-assoziierten Genen und lassen sich diese Effekte durch die isolierten Einzelketten $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ oder $\alpha 3(VI)$ antagonisieren?

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Kits

2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland (DE)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung; 37, 5:1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Aktivkohle	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, DE
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, DE
Calcein AM	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck, Darmstadt, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, DE
Dithiothreitol	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Essigsäure (HAc); absolut	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol; absolut	Merck, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, DE
fluoreszenzmarkierte Sonden	Sigma-Genosys, Steinheim, DE
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Glycerol	Sigma, Deisenhofen, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Guanidin-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe, DE
HCl	Merck, Darmstadt, DE
High Capacity RNA to DNA-Kits	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Jodacetamid	Sigma, Deisenhofen, DE
KCl	Merck, Darmstadt, DE
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, DE
Kit für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen (NanoOrange Protein Quantitation Kit)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
L-Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen, DE
L-Glutaminlösung, 200 mmol/L, steril	Biochrom, Berlin, DE
Methanol	Sigma, Deisenhofen, DE
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Na ₂ HPO ₄ x 4H ₂ O	Merck, Darmstadt, DE

NaCl	Sigma, Deisenhofen, DE
NaOH	Merck, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumpyruvatlösung, 100 mmol/L, steril	Biochrom, Berlin, DE
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma, Deisenhofen, DE
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, DE
Ortho-Phosphorsäure	Sigma, Deisenhofen, DE
Penicillin (10.000 Units/mL) /Streptomycin (10 mg/mL)-Lösung, steril	Biochrom, Berlin, DE
Pepsin A, E.C. 3.4.23.1; spezifische Aktivität 600 U/mg Protein	Serva, Heidelberg, DE
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen, DE
Primer-Paare	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Protein Molekulargewichts (Mr)-Standard, SDS-7B	Sigma, Deisenhofen, DE
quantitative real-time polymerase chain reaction	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, DE
RNApure-Reagenzes	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Staurosporin	Sigma, Deisenhofen, DE
Szintillatorcocktail	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TGF- β	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
[6- ³ H]-Thymidin, spezifische Aktivität 185 GBq/mmol ([³ H]-Thymidin)	Amersham/GE Healthcare, München, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris-HCL	Merck, Darmstadt, DE
Trypanblaulösung, 0,5% in PBS, steril	Biochrom, Berlin, DE
Trypsin (0,5%)/EDTA (0,2%) Lösung in PBS, steril	Biochrom, Berlin, DE
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen, DE
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Zellkulturmedium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 4,5 g/L Glukose (DMEM)	Cambrex, New Jersey, USA

2.2 Gewinnung von KVI-F aus humanen Plazenten

2.2.1 Puffer und Lösungen

Neutralpuffer	50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 500 mmol/L NaCl 500 mmol/L PMSF 2 mmol/L NEM 5 mmol/L EDTA
Phosphatpuffer, pH 7,2	6 mmol/L KH_2PO_4 14 mmol/L Na_2HPO_4
Acetatpuffer, pH 4,8	300 mmol/L Natriumacetat 2 mol/L Harnstoff

2.2.2 Isolierung von Kollagenen aus Gewebe

Von frischen, in Neutralpuffer aufgenommenen humanen Plazenten wurden die fötalen Membranen entfernt und das gespülte verbleibende Gewebe in 500 mmol/L HAc (2,5 Liter pro Kilogramm Feuchtgewicht) homogenisiert (Homogenisator Ultraturrax; IKA, Staufen, DE). Nach Einstellen eines pH 2,5 (pH-Meter; 766 Calimatic mit Einstab-Meßelektrode; Knick, Berlin, DE) wurde Pepsin (1 g pro Kilogramm des initialen Feuchtgewichtes) zum Homogenisat gegeben und dieses unter ständigem Mischen (Magnetprüher; IKA, Staufen, DE) 20 h bei 8°C inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend 30 min bei 4°C und 8.000 U/min zentrifugiert (Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge J2-21M/E; Beckman Coulter, Krefeld, DE). Diese Zentrifugationsbedingungen galten auch für alle anderen Wasch- und Sedimentationsschritte.

Das KVI wurde dann durch fraktionierte Salzfällung aus dem Überstand der Zentrifugation dargestellt. Dazu wurde zum Überstand sukzessive NaCl zu Endkonzentrationen von 7-10% dazu gegeben und das Präzipitat abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 200 mL 500 mmol/L HAc gelöst und über Nacht bei 4°C gegen 20 L 500 mmol/L HAc dialysiert (Dialyseschlauch, Ausschlussgröße: 12-14 kDa; Servapor; Serva, Heidelberg, DE). Um kontaminierende Kollagene I, III, IV und V zu beseitigen, wurde die Lösung erneut mit 7-10% NaCl präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 150 mmol/L gelöst und durch Dialyse innerhalb von drei Tagen bei 4°C gegen 20 L Phosphatpuffer, der mehrfach gewechselt wurde, erneut

ausgefällt. Diese Dialyse wurde mit dem Überstand aus dem jeweils vorherigen Schritt zweimal wiederholt. Alle gefällten Proteine wurden im nächsten Schritt wiederum in 150 mmol/L HAc gelöst. Die folgende Dialyse über Nacht bei 4°C gegen 2x 20 L Acetatpuffer präzipitierte lösliches KVI, im weiteren KVI-F genannt[53].[42]

2.2.3 Entsalzung und Konzentrierung der KVI-F-Präparation

Das Präzipitat aus der letzten Fällung enthielt überwiegend KVI-F und wurde zunächst in 150 mmol/L HAc vollständig gelöst. Die Lösung wurde in Dialyseschläuche (Ausschlussgröße: 12-14 kDa; Servapor; Serva, Heidelberg, DE) gefüllt und über Nacht gegen 20 L Phosphatpuffer dialysiert. Das so erhaltene Präzipitat wurde durch Zentrifugation vom Überstand getrennt und wieder in 150 mmol/L HAc gelöst. Diese Dialyse wurde mit dem Überstand aus dem jeweils vorherigen Schritt zweimal wiederholt. Die gelösten Präzipitate wurden abschließend innerhalb von drei Tagen bei täglichem Wechsel der äußeren Lösung gegen 150 mmol/L HAc umdialysiert. Der Inhalt der Dialyseschläuche wurde in einen Rundkolben überführt und der Inhalt durch Eintauchen des Kolbens in flüssigen Stickstoff schockgefroren (Lagertank für flüssigen Stickstoff; tec-lab, Königstein, DE). Diese Präparation wurde bei -70°C und 0,01-0,001 mbar lyophilisiert (Gefriertrockner Beta 1-8K; Christ, Osterode, DE). Das so gewonnene KVI-F wurde bei -80°C gelagert, bei Bedarf eingewogen (Analysenwaage; Sartorius, Göttingen, DE) und mit einer Stammkonzentration von 2 µg/mL KVI-F in 150 mmol/L HAc gelöst. Diese Stammlösungen wurden unmittelbar in Zellkulturexperimenten eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -80°C (Tiefkühlschrank, Forma Scientific, Karlsruhe, DE) aufbewahrt.

2.2.4 Reaktivierung von präpariertem KVI-F

Guanidin-HCl (6 mol/L) wurde über Nacht mit Aktivkohle gerührt und anschließend durch einen Faltenfilter (mittlere Laufgeschwindigkeit; Schleicher und Schüll, Dassel, DE) filtriert. Unmittelbar vor der Verwendung wurde die Lösung mit 50 mmol/L Tris-Base auf pH 8,0 eingestellt.

Es wurden 10 mg lyophilisiertes KVI-F eingewogen und in 1 mL Tris-gepuffertem Guanidin-HCl gelöst. Dazu wurden die beiden Komponenten maximal 1 h bei Raumtemperatur vorsichtig gemischt (Vortex; IKA, Staufen, DE), anschließend 1 h bei 37°C inkubiert (Hybridisierungsöfen; Bachofer, Reutlingen, DE) und 10 min bei 4°C und 13.000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus/Kendro, Hanau, DE) zentrifugiert. Der Überstand wurde als KVI-F-Lösung weiterverarbeitet.

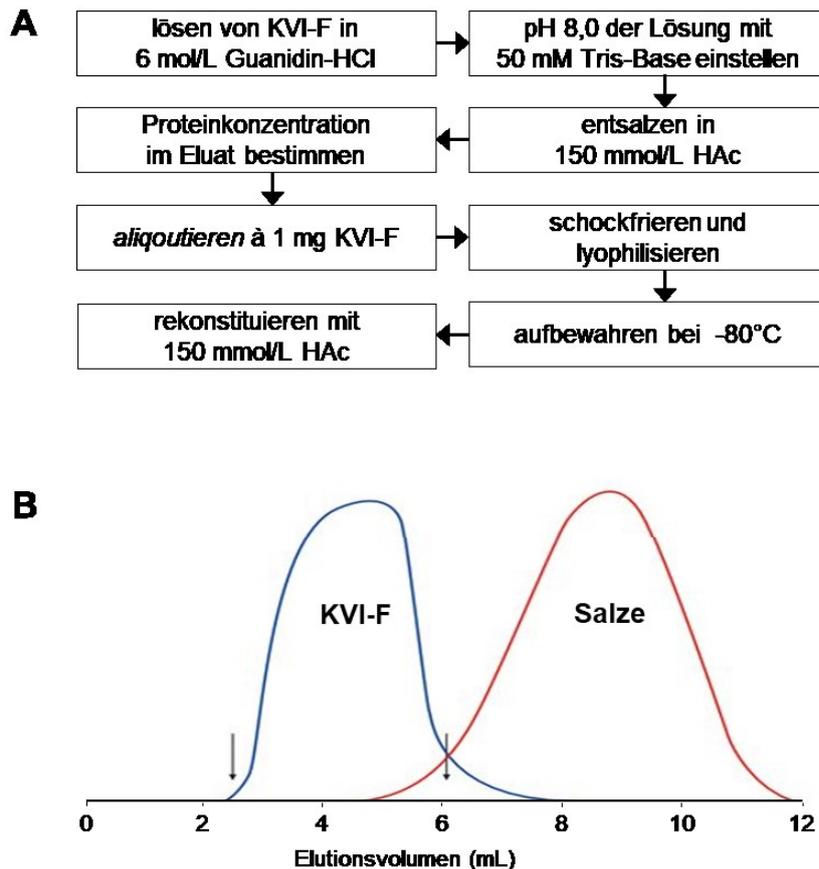


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Renaturierungsprozedur für KVI-F. (A) Fließschema zur Renaturierung von gereinigtem KVI-F. **(B)** modifiziertes Elutionsprofil einer Entsalzung über Sephadex G-25 [Produktinformation: Fertigsäule NAP-10; GE Healthcare, München, DE] aus eigenen Experimenten.

Die Gelfiltration erfolgte im Durchflussprinzip bei Normaldruck. Zur Vorbereitung wurde eine NAP10-Säule (Fertigsäule, Sephadex-G25, GE Healthcare, München, DE) mit 15 mL 150 mmol/L HAc äquilibriert. Die wie oben hergestellte KVI-F-Lösung wurde sukzessive als zweimal 500 µL auf die Säule aufgetragen, bevor diese achtmal mit jeweils 500 µL 150 mmol/L HAc eluiert wurde. Beginnend mit dem Probenauftrag wurde jedes Eluat als einzelne Fraktion gesammelt.

Durch Proteinbestimmung mit Nano-Orange® und native SDS-PAGE wurden die KVI-F-haltigen Elutionsfraktionen ermittelt. Typischerweise lag das KVI-F in den Fraktionen 3-6 vor. Für die Zellkulturversuche wurden die Fraktionen 3-4 vereinigt. Die Fraktionen 5 und 6 wurden einzeln weiterverarbeitet. Die Eluate wurden über flüssigem Stickstoff bei -170°C schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Die Abbildung 5 fasst schematisch den Renaturierungsprozess für KVI-F aus den gelagerten Präparationen zusammen.

2.3 Isolierung von Einzelketten des KVI-F

2.3.1 Puffer und Lösungen

Reduktionspuffer	100 mmol/L Tris-HCl, pH 8,6 10 mmol/L EDTA 2 mmol/L Dithiothreitol 6 mol/L Guanidin-HCl
Alkylierungslösung	13.4 mg Jodacetamid in 100 µL 500 mmol/L NaOH
Dialysepuffer	20 mmol/L Tris-HCl, pH 8, 400 mmol/L Harnstoff
Puffer A	1 mmol/L Na ₂ HPO ₄ , pH 6,8 150 mmol/L NaCl 1 mol/L Harnstoff
Puffer B	200 mmol/L Na ₂ HPO ₄ , pH 6,8 150 mmol/L NaCl 1 mol/L Harnstoff
Puffer C	20 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0 4 mol/L Harnstoff
Puffer D	20 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0 500 mmol/L NaCl 4 mol/L Harnstoff

Alle Puffer und Lösungen für die Chromatographie wurden unmittelbar vor der Verwendung durch einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,45 µm, Weißrand; Schleicher und Schüll, Dassel, DE) filtriert und durch Erzeugen eines Unterdrucks (Vakuumpumpe VDE 0530; Neuberger, Freiburg, DE) entgast.

2.3.2 Aufschmelzen der Einzelketten durch Reduktion und Alkylierung

Eingewogenes KVI-F wurde mit einer Endkonzentration von 2 mg/mL in Reduktionspuffer gelöst und 2 h bei 37°C unter nicht-oxidativen Bedingungen im Stickstoffstrom inkubiert (Inkubator; Bachofer, Reutlingen, DE). Für die Alkylierung der reduzierten Ketten wurden 100 µL Alkylierungslösung dazu gegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 min wurde der Überschuss von Jodacetamid durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol zu einer Endkonzentration von 1% blockiert. Das Gemisch der reduzierten und alkylierten $\alpha 1(\text{VI})$, $\alpha 2(\text{VI})$, $\alpha 3(\text{VI})$ und der teilweise Pepsin-resistenten $\alpha 3'(\text{VI})$ -Kette des KVI-F wurde über Nacht bei 4°C gegen zweimal 2 L 150 mmol/L HAc dialysiert, anschließend lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.[78, 79]

2.3.3 Trennung alkylierter und reduzierter Einzelketten des KVI-F

Die Kettentrennung erfolgte durch Hydroxyapatit-Chromatographie. Dazu wurde eine vorgefertigte Hydroxyapatitsäule mit einem Gelbettvolumen von 5 mL (Fertigsäule Econo-Pac® CHT-II; Bio-Rad, München, DE) in einer *Fast Performance Liquid Chromatography*-Anlage (FPLC; LKB Pharmacia, Bromma, SE) verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 20 mL Puffer A und anschließend mit 20 mL Puffer B bei einer Flussrate von 2 mL/min gewaschen bevor sie mit 25 mL Puffer A bei gleicher Flussrate equilibriert wurde. Von dem Gemisch reduzierter und alkylierter α -Ketten des KVI-F wurden 30 mg eingewogen und in 20 mL Puffer A unter Rühren (Magnetrührer, neoLAB, Heidelberg, DE) über 1 h bei Raumtemperatur gelöst und die filtrierte, und „Vakuumentgaste“ Lösung (Wasserstrahlpumpe) mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Säule geladen. Das Gelbett wurde mit einem nicht-linearen Phosphatgradienten, der durch sukzessives Mischen des Puffers A mit steigenden Anteilen von Puffer B gebildet wurde, bei gleicher Flussrate eluiert. Während der Elution wurden Fraktionen von jeweils 1 mL gesammelt. Entsprechend dem bei einer Wellenlänge von 234 nm erfassten Chromatogramm wurden eluierte Peaks zusammengefasst (Tab. 2).

Tabelle 2: Darstellung der bei einer Wellenlänge von 234nm erfassten und in 1ml Fraktionen gesammelten eluierten Peaks

Gradient			Peak	
% Puffer B	Zeit (min)		#	Zeit (min)
0-15	0-16		1	2-9
15-25	16-30		2	16-18
			3	18-21
			4	21-24
25-100	30-32		5	30-36
100	32-36			
100-20	36-40			

Während Peak 1 mit der $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette und Peak 5 mit der $\alpha 3'(\text{VI})$ -Kette schon gereinigte Einzelketten darstellten, repräsentierten die Peaks 2-4 ein Gemisch der $\alpha 1(\text{VI})$ - und der $\alpha 3(\text{VI})$ -Ketten des KVI-F.

Alle Fraktionen wurden durch Dialyse über Nacht bei 4°C gegen 150 mmol/L HAc entsalzt, anschließend gefriergetrocknet und bei -80°C aufbewahrt.

Das Gemisch der $\alpha 1(\text{VI})$ - und $\alpha 3(\text{VI})$ -Ketten wurde im nächsten Schritt durch Ionenaustauschchromatographie mit Elution durch einen nicht-linearen NaCl-Gradienten getrennt. Dazu wurde die lyophilisierte Präparation mit den Peaks 2-4 aus der Hydroxyapatitchromatographie in 10 mL Puffer C gelöst. Eine Säule mit einer Anionenaustauschermatrix (Fertigsäule Ressource Q; GE Healthcare, München, DE) wurde in der FPLC-Anlage mit 50 mL Puffer C bei einer Flussrate von 2 mL/min äquilibriert, bevor die filtrierte Probenlösung bei einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte dann durch Mischung steigender Anteile von Puffer D in Puffer C (Tab. 3).

Tabelle 3: Darstellung der eluierten Peaks entsprechend dem ansteigenden Anteil an Puffer D

Gradient			Peak	
% Puffer D	Zeit (min)		#	Zeit (min)
0-10	0-19		1	3-5
			2	5-7
			3	7-10
			4	10-12
			5	12-15
10-40	19-27		6	21-23
			7	23-27
40-75	27-35		8	27-29
75-100	35-37			
100	37-40			

Für die Elution wurde eine Flussrate von 1 mL/min verwendet. Die Peaks 1-5 aus der Ionenaustauschchromatographie enthielten die $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette, die Peaks 7-8 die $\alpha 1(\text{VI})$ -Kette. Die Eluate wurden entsprechend zusammengefasst, durch Dialyse über Nacht bei 4°C gegen 150 mmol/L HAc entsalzt, gefriergetrocknet und bei -80°C aufbewahrt.

Die Qualität aller Präparationen getrennter Ketten wurde durch nicht reduzierende SDS-PAGE geprüft und die Proteinkonzentrationen mit der NanoOrange®-Methode (s. Kap. 2.8) bestimmt.

2.4 Aus KVI-F-abgeleitete Peptide

Die Peptide mit überlappenden Sequenzen aus der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette des KVI-F wurden freundlicherweise durch Dr. Werner Tegge (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) bereitgestellt (Tab. 4). Alle Präparationen hatten Synthesereinheit. Sie haben eine Länge von 30 Aminosäuren und überlappen, mit Ausnahme von C4 und C5 (24 Aminosäuren), um 10 Aminosäuren.

Tabelle 4: Darstellung der Aminosäuresequenzen der nach der Sequenz der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette synthetisierten Peptide

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
A1	GQRGDRGPIGSIGPKGIPGEDGYRGYPGDE
A2	DGYRGYPGDEGGPGERGPPGVNGTQGFQGC
A3	VNGTQGFQGCPCGQRGVKGSRGFPGEKGEVG
A4	GFPGEKGEVGEIGLDGLDGEDGDKGLPGSS
A5	DGDKGLPGSSGEKGNPGRRGDKGPRGEKGE
A6	DKGPRGEKGERGDVGIRGDPGNPGQDSQER
B1	GNPGQDSQERGPKGETGDLGPMGVPRDGV
B2	PMGVPRDGVPPGGPGETGKNGGFRRGPPG
B3	GGFGRRGPPGAKGNKGGPGQPFEGEQGTR
B4	PGFEGEQGTRGAQQPAGPAGPPGLIGEQQI
B5	PPGLIGEQQISGPRGSGGARGAPGERGRTG
B6	GAPGERGRTGPLGRKGEPGEPGPKGGIGNP
C1	PGPKGGIGNPGRGETGDDGRDGVGSEGR
C2	RDGVGSEGRRGKKGGERGFPGYPGKGNPGE
C3	YGPKNPGEPLNGTTGPKGIRRRGNSG
C4	GIRRRGNSGPPGIVGQKGRPGYPGPAGPR
C5	GNSGPPGIVGQKGRPGYPGPAGPRGNRGDS

2.5 Zellkultur

2.5.1 Medien, Puffer und Lösungen

PBS, pH 7,4:	137 mmol/L NaCl 2,7 mmol/L KCl 10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 1,8 mmol/L KH ₂ PO ₄
Trypanblaulösung:	0,05% Trypanblau in PBS
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,05% Trypsin 0,02% EDTA in PBS
Penicillin/Streptomycin-Lösung:	10 ⁵ U/mL Penicillin 10 mg/mL Streptomycin in PBS
L-Glutaminlösung:	200 mmol/L L-Glutamin in PBS
Natriumpyruvatlösung	100 mmol/L Natriumpyruvat in PBS
L-Ascorbinsäurelösung:	50 mg/L L-Ascorbinsäure in PBS
Einfriermedium:	80% FKS 20% DMSO steril filtriert durch Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm
Grundmedium:	DMEM mit 4,5 g/L Glukose 2 mmol/L L-Glutamin 1 mmol/L Natriumpyruvat 10 ³ U/mL Penicillin 10 ³ µg/mL Streptomycin 25 µg/L L-Ascorbinsäure
Standardmedium:	Grundmedium 10% FKS
Reduktionsmedium:	Grundmedium 0,25% FKS

Etwa eine Stunde vor dem Beginn der Arbeiten an der Sicherheitswerkbank (Sicherheitswerkbank der Klasse 2 mit laminarem Luftstrom Herasafe 1.8; Heraeus/Kendro, Hanau, DE) wurde das Gebläse angeschaltet und die Arbeitsfläche mit 70% Ethanol (Methylethylketon-vergällt) gründlich gereinigt. Vor der Verwendung in der Zellkultur wurde das FKS zur Inaktivierung des Komplements 30 min bei 56°C (Wasserbad U3; Julabo, Seelbach, DE) inkubiert. Vorbehandeltes FKS wurde

aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Alle Medien und Lösungen waren steril oder wurden vor der Verwendung durch einen Spritzenvorsatzfilter steril filtriert (Porengröße $0,22\ \mu\text{m}$, Rotrand; Schleicher und Schüll, Dassel, DE). Die Zellkulturen wurden bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre bei einem CO_2 -Gehalt von 6% (Begasungsbrutschrank BB18 Function Line; Heraeus, Hanau, DE) inkubiert.

2.5.2 Die Zelllinie CFSC

In den Versuchen wurde die Rattenzelllinie CFSC (*cirrhotic fat-storing cells*), eine Linie hepatischer Sternzellen, die aus zirrhotischer Leber der männlichen Wistar Ratte nach Behandlung mit Tetra-Chlorkohlenstoff gewonnen wurden [80], verwendet. Diese wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W. Dieterich (Erlangen, DE).

2.5.3 Standardkultur von CFSC

Proteine aus dem FKS vermitteln eine Bindung von Zellen an Plastikoberflächen, die durch Proteasen aufgehoben werden kann. Kurze Inkubationszeiten mit der Protease verhindern, dass die Zellhülle nachhaltig verändert wird. Da zweiwertige Ionen die Wirkung der Protease beeinträchtigen, enthält die Trypsinlösung EDTA als Komplexbildner.[81]

Aus den Kulturflaschen (Nunclon 75cm^2 ; Nunc, Roskilde, DK) wurde das Kulturmedium abpipettiert, der Zellrasen zweimal mit jeweils 12 mL PBS gespült, mit 6 mL Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ablösungsprozess wurde mikroskopisch direkt aus der Kultur kontrolliert (Inverses Phasenkontrastmikroskop IM; Zeiss, Oberkochen, DE). Waren alle Zellen in Suspension wurden 6 mL Standardmedium dazu pipettiert. Die Zellsuspension wurde bei 1.500 rpm und Raumtemperatur 5 min zentrifugiert (Kühlzentrifuge Minifuge RF; Heraeus, Hanau, DE), der Überstand dekantiert und die Zellen zweimal mit jeweils 12 mL PBS gewaschen. Die CFSC (2×10^5) wurden in 15 mL frischem Standardmedium in Kulturflaschen überführt und diese inkubiert. Die CFSC wurden alle drei bis vier Tage neu angesetzt, das Standardmedium wurde alle 48 h erneuert.

2.5.4 Bestimmung der Vitalität und Zelldichte

Trypanblau (Sigma, Deisenhofen, DE), ein saurer kolloidaler Farbstoff, durchdringt die Zellumhüllung toter Zellen und bindet als Anion an zytoplasmatische Proteine. Tote Zellen erscheinen im Phasenkontrast blau; lebende Zellen weiß. Die Zelldichte und die Vitalität errechnen sich nach der Zellzählung in der Zählkammer nach Neubauer wie folgt:

$$\text{Zelldichte [10}^6 \text{ Zellen/mL]} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

$$\text{Vitalität [\%]} = \text{Ungefärbte Zellen von 100\%} \cdot [81]$$

Jeweils 40 µl Zellsuspension und 40 µl Trypanblaulösung wurden in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte (96-Loch, Rundboden; Nunc, Roskilde, DK) durch Pipettieren vermischt und zwischen Deckglas und Hämocytometer (Zählkammer nach Neubauer; LO – Laboroptik, Friedrichsdorf, DE) pipettiert. Weiß erscheinende Zellen aus vier Großquadraten wurden im Phasenkontrast gezählt und bei der Berechnung der Zelldichte der Verdünnungsfaktor zwei für den Farbstoff mit einbezogen. Bei zu hohen Zelldichten (über 50 Zellen im Großquadrat) wurde die Zellsuspension mit der Trypanblaulösung weiter verdünnt und der entsprechende Faktor in der Berechnung berücksichtigt.

2.5.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen können über flüssigem Stickstoff bei -170°C bis -196°C lange Zeit aufbewahrt werden. Der Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert bei Temperaturen zwischen 0°C und -46°C während des Einfriervorganges die Kristallbildung inner- und außerhalb der Zellen und die Dehydratation des Zytoplasmas und schützt so die Integrität der einzelnen Zellen.[82] Als reduzierendes Agens ist DMSO ein wirksames Zellgift [83]. Beim Auftauen von Zellen diffundiert bei niedrigen Temperaturen das DMSO langsam aus der Zelle in eine DMSO-freie Lösung.

Zum Einfrieren der Zellen wurden wie oben beschrieben in Suspension gebrachte CFSC aus der Kultur zentrifugiert (5 min, 1.600 rpm, 4°C; Minifuge RF) und der Überstand dekantiert. Sedimentierte Zellen ($3\text{-}7 \times 10^6$) wurden in 750 µL FKS aufgenommen und auf Eis (Eisbereiter, Scotsman, Bettolino di Poliano, IT) gestellt. Diese Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen eisgekühlten

Einfriermediums gemischt. *Aliquots* von 1,5 mL wurden umgehend in auf -20°C vorgekühlte Kryoröhrchen (2 mL mit Kreuzfuß; Nunc; Roskilde; Dänemark) pipettiert und bei -80°C eingefroren. Nach mindestens 1 h und maximal 7 Tagen wurden die tiefgefrorenen Zellen über flüssigem Stickstoff bei -170°C aufbewahrt.

Zum Auftauen der CFSC wurden die tiefgefrorenen Kryoröhrchen kurz im Wasserbad (Wasserbad, VWR, Darmstadt, DE) bei 37°C erwärmt, bis nur noch der Kern der Zellsuspension gefroren schien. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und die Zentrifuge (Minifuge RF, Heraeus, Hanau, DE) war vorgekühlt. Die Zellsuspension wurde aus dem Kryoröhrchen mittels Stabpipette in einem Schritt in ein auf Eis stehendes Zentrifugenröhrchen mit 7 mL Standardmedium überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 1.600 rpm, 4°C) und Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 10 mL Standardmedium resuspendiert und gezählt. Jeweils 2×10^5 CFSC wurden in 15 mL frischem Standardmedium in Kulturflaschen überführt und im Brutschrank kultiviert.

2.5.6 Synchronisation von Zellen in der Kultur

In *in-vitro*-Versuchen mit Zelllinien sollten möglichst viele Zellen zu Behandlungsbeginn in derselben Phase des Zellzyklus sein. Das kann z.B. durch Reduktion des Serumgehaltes im Kulturmedium für einen definierten Zeitraum, typischerweise über Nacht bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank oder kurzzeitige Senkung der Inkubationstemperatur auf 4°C erreicht werden. Die Zellen befinden sich dann in der G1/G0-Phase.[84]

Für die Prüfung der Wirkung von KVI-F und daraus abgeleiteten Strukturen wurden CFSC immer 24 h nach dem Umsetzen aus der Standardkultur verwendet. Die abgelösten Zellen wurden gezählt und die Zellsuspension mit Standardmedium auf eine Konzentration von $5 \times 10^4/\text{mL}$ eingestellt. Jeweils 100 μL dieser Suspension wurde in jedes Loch einer Zellkulturplatte (96-Loch, Flachboden; Nunc, Roskilde, Dänemark) gegeben. Zur schnellen Sedimentation der Zellen wurde die Platte 3 min bei 500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge GPKR, Beckman Coulter, Krefeld, DE) und die Kulturen 24 h inkubiert. Das Standardmedium wurde unter sterilen Bedingungen auf sterile saugfähige Tücher (*Sterile Tissue Pad* 100x200 mm; Johnson & Johnson, Berlin, DE) ausgeschlagen und die Mikrokulturen jeweils mit

200 µL PBS gespült bevor diese mit je 100 µL Reduktionsmedium wieder aufgefüllt wurden. Die Kulturen wurden weitere 24 h im Brutschrank inkubiert, oder im Rahmen von Optimierungsversuchsreihen beim letzten Schritt mit 100µl Standardmedium aufgefüllt und 1 h bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Zu den so synchronisierten Zellen wurden die auf die Proliferation wirkenden Substanzen in Reduktionsmedium dazu gegeben. Alle Ansätze erfolgten in Hexaplikaten. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit 10 µL FKS behandelt. Zum Nachweis der Wirkung von KVI-F, des Gemisches reduzierter und alkylierter Ketten, isolierter Einzelketten oder aus KVI-F abgeleiteten Peptiden wurden diese in jeweils 10 µL der entsprechenden Lösung in 150 mmol/L HAc zu den Kulturen dazu gegeben. Die Behandlungsdauer betrug 24 h. Als Maß für die Proliferation wurde der Einbau von Tritium-markiertem Thymidin bestimmt.

2.6 Nachweis der Zellproliferation durch Einbau von [³H]-Thymidin

Während der Synthesephase des Zellzyklus wird die DNA repliziert und dabei kann von außen zugeführtes radioaktiv markiertes Thymidin in die DNA eingebaut werden. Durch alkalische Lyse von Zell- und Kernmembranen und anschließende Neutralisation wird hochmolekulare DNA frei, die auf einer Glasfasermatrix fixiert werden kann. Die emittierte β-Strahlung des Tritiums ist ein Maß für die Stoffwechsel- und Proliferationsaktivität der Zellen.[85]

Alle nachfolgenden Arbeiten wurden in einem für Arbeiten mit radioaktivem Material zugelassenen Bereich durchgeführt. In den letzten 4, 6 bzw. 8 h der Gesamtbehandlungsdauer von 24 h erhielt jede Mikrokultur 18,5 kBq [³H]-Thymidin in 10 µL Grundmedium. Das Medium wurde auf Zellstoffabschnitten vollständig ausgeschlagen und der Zellrasen zur Fixierung mit 200 µL 10% Trichloressigsäure 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Ausschlagen der Trichloressigsäure wurde in jedes Loch 50 µL 200 mmol/L NaOH gegeben und nach 20 min bei Raumtemperatur die Lösung der Zellinhaltsstoffe durch Zugabe von 50 µL 800 mmol/L HCl neutralisiert. An diesem Punkt konnte die Platte für eine spätere Messung bei -20°C (Tiefkühlschrank, Liebherr, Biberach, DE) tiefgefroren oder sofort weiterbearbeitet werden.

Die Lösungen aus den Vertiefungen wurden auf einen Glasfaserfilter mit angezeichneten Positionen der einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte (*Printed Filter Mat*; LKB Wallac, Bromma, Schweden) gesaugt (*Cell Harvester*; Skatron, Lier, Norwegen). Der Filter wurde dabei mehrfach automatisch mit *A. dest.* gespült und anschließend 20 min bei 175 W getrocknet (Mikrowelle; Bosch, Stuttgart, DE). Die Filter wurden mit 10 mL Szintillationscocktail vollständig benetzt in einen Probenbeutel eingeschweißt (*Heat Sealer*; LKB Wallac, Bromma, Schweden) und mit einer entsprechenden Halterung in das Szintillationsmessgerät (Beta-Counter; LKB Wallac, Bromma, Schweden) gestellt. Dort wurde für jedes Feld, welches einer Mikrokultur entsprach, für eine Minute die emittierte β -Strahlung gemessen.

2.7 Vitalitäts- und Apoptoseassay

Es wurden 5×10^3 CFSC für 24 h mit 100 μ L Standardmedium in 96-Loch Mikrotiterplatten inkubiert, das Medium verworfen und die Zellen zweimal mit 100 μ L Grundmedium gewaschen. Zur Synchronisation wurden die Zellen mit 100 μ L Reduktionsmedium für 24 h bei 37°C inkubiert. In den Ansätzen wurden die Einzelketten in unterschiedlichen Konzentrationen jeweils in HAc, Methanol (5%) für die Vitalitätsassays bzw. Staurosporin (100 nM) für die Apoptoseassays sowie HAc alleine und Starvingmedium als Kontrollen dazugegeben. Die Vitalität von CFSC wurde dann über den Umsatz des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein AM (1 μ M) durch intrazelluläre Esterasen mittels eines Mikrotiterplatten-Fluorimeters (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) bestimmt. Behandlungsabhängige Effekte auf die Apoptoseinduktion wurden durch den Umsatz des Fluoreszenz-Substrates EthD-1 bestimmt.

2.8 Nachweis der Genexpression mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion

Die Genexpression von Zellen lässt sich durch die Umschreibung ihrer *messenger* RNS (mRNS) in *complementary DNS* (cDNS) und deren Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion nach Fluoreszenzmarkierung detektieren [86, 87].

Hierzu wurden 5×10^5 CFSC in 6-Lochplatten (Flachboden, Nunc, Roskilde, Dänemark) in 3 mL 10% FKS für 24 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben für 24 h synchronisiert. Die Behandlung der Zellen für weitere 24 h erfolgte in Reduktionsmedium welches 50 $\mu\text{g/mL}$ KVI-F, 133 $\mu\text{g/mL}$ der isolierten Einzelketten von KVI-F oder 2 ng/mL TGF- β enthielt. Die weiteren Arbeiten fanden am Nukleinsäure-Arbeitsplatz (Werkbank für Nukleinsäurearbeiten Captair bio; Erlab, Köln, DE) statt. Die mRNS der Zellen wurde mittels des RNAPure-Reagenzes isoliert und mittels des *High Capacity RNA to DNA*-Kits in cDNS umgeschrieben. Die cDNS wurde mittels quantitativer *real-time polymerase chain reaction* (qPCR) unter Nutzung fluoreszenzmarkierter Sonden und spezifischen Primer-Paaren (Tab. 5) detektiert. Die Genexpressionen wurden auf die Genexpression des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert und auf die jeweilige Genexpression der unbehandelten Kontrolle (=1,00) bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Sonden und Primer für die quantitative real-time PCR

Zielgen	<i>Oligonucleotide sequence (5'– 3')</i>		
	Sonde ^a	Primer sense	Primer antisense
KI	TTCTTGGCCATGCG TCAGGAGGG	TCCGGCTCCTGCT CCTCTTA	GTATGCAGCTGACTTC AGGGATGT
TGF-β1	ACCGCAACAACGCA ATCTATGACAAAAC CA	AGAAGTCACCCGC GTGCTAA	TCCCGAATGTCTGACG TATTGA
TIMP-1	TTCTGCAACTCGGA CCTGGTTATAAGG	TCCTCTTGTTGCTA TCATTGATAGCTT	CGCTGGTATAAGGTGG TCTCGAT
α-SMA	CTCGGCCGCCTGCT TCACCA	CCTGCCAAGTATG ATGACATCAAGA	GTAGCCCAGGATGCCC TTTAGT
MMP-3	AGATGGTATTCAAT CCCTCTATGGACCT CC	CCGTTTCCATCTCT CTCAAGATGA	CAGAGAGTTAGATTTG GTGGGTACCA
MMP-13	TCTGGTTAGCATCA TCATAACTCCACAC GT	GGAAGACCCTCTT CTTCTCA	TCATAGACAGCATCTA CTTTGTC
GAPDH	TGGTGAAGCAGGCG GCCGAG	CCTGCCAAGTATG ATGACATCAAGA	GTAGCCCAGGATGCCC TTTAGT
^a Die Sonden waren mit 5' 6-carboxy-fluorescein bzw. 3' 6-carboxy-tetramethylrhodamin markiert.			

2.9 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit Nano Orange®

Nach Bindung an Proteine und Anregung bei einer Wellenlänge um 470 nm emittiert NanoOrange®, welches in wässriger Phase nicht fluoresziert, mit einem Maximum bei 570 nm. Die Emission korreliert mit dem Ausmaß der Proteinbindung und ist daher geeignet Proteinkonzentrationen aus Lösungen zu bestimmen. [Produktinformation NanoOrange® Protein Quantitation Kit; Molecular Probes®, Invitrogen, Leiden, Niederlande]

Die Konzentrationen von Lösungen des KVI-F- oder einzelner Ketten des KVI-F wurden im Vergleich zu einer BSA-Standardreihe bestimmt. Für den Standard wurde die Stammlösung des BSA-Standards von der Ausgangskonzentration von 2 mg/mL mit *Aqua bidest.* (Anlage zur Herstellung von VE-Wasser; Millipore, Bedford, US) schrittweise so verdünnt, dass BSA-Konzentrationen von 500 ng/mL bis 5 µg/mL in sieben Stufen eine Standardreihe ergaben. Die KVI-F-Proben wurden unverdünnt, sowie nach Verdünnung im Verhältnis 1:10, 1:50 und 1:100 eingesetzt. *Aqua bidest.* diente als Leerwert. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Konzentrate des *Protein Quantitation Reagent (A)* und *Protein Quantitation Diluent (B)* im Verhältnis 1:500 bzw. 1:10 mit *Aqua bidest.* verdünnt. Gleiche Teile der Verdünnungen von Reagenz A und Reagenz B wurden gemischt und jeweils 100 µL davon wurden mit 100 µL Standard- oder Probenverdünnung in schwarze Mikrotiterplatten (96 Löcher, Flachboden; Greiner BioOne, Frickenhausen) pipettiert. Alle Proben, Standards und Leerwerte wurden als Duplikate bestimmt. Die Platten wurden mit *Cover Film* (Applied Biosystems, Darmstadt, DE) dicht verschlossen und anschließend 5 min bei 600 W in der Mikrowelle (Bosch, Stuttgart, DE) erhitzt und lichtgeschützt innerhalb von 30 min auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Danach wurden die Platten 3 min bei 500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge GPKR; Beckman Coulter, Krefeld, DE). Nach Entfernen des *Cover Films* wurde die Emission in einem Fluorimeter für Mikrotiterplatten (Spectramax Gemini; Molecular Devices, Sunnyvale, USA) im Sinne einer Endpunktmessung bei 590 nm bestimmt. Anregungswellenlänge war 485 nm. Die Proteinkonzentrationen wurden im Vergleich zur Standardkurve nach Abzug des Leerwertes errechnet. Bei Emissionen >3 Fluoreszenzeinheiten wurden die Proteinkonzentrationen mit stärkeren Verdünnungen der gleichen Probenlösung erneut bestimmt.

2.10 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.10.1 Puffer und Lösungen

SDS-Lösung	20% SDS
APS-Lösung	10% APS
Trenngel (10% Polyacrylamid)	12,3 mL <i>Aqua bidest.</i> 7,5 mL 1,5 mol/L Tris-HCl (pH 8,8) 150 µL SDS-Lösung 6,9 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 150 µL APS-Lösung 20 µL TEMED
Sammelgel (4% Polyacrylamid)	3 mL <i>Aqua bidest.</i> 1 mL 1,5 mol/L Tris-HCl (pH 6,8) 25 µL SDS-Lösung 67 µL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 25 µL APS-Lösung 5 µL TEMED
Probenpuffer (5x)	200 mmol/L Tris-HCl (pH 6,8) 10% SDS 20% Glycerol 0,05% Bromphenolblau
Laufpuffer	25 mmol/L Tris-HCl (pH 6,8) 200 mmol/L Glycin 0,1% SDS
Färbelösung	10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1% Coomassie® G-250 3% Ortho-Phosphorsäure 20% Ethanol

2.10.2 Proteintrennung durch Elektrophorese

Negativ geladene SDS-Protein-Komplexe bewegen sich im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe zur Anode. In einer Polyacrylamidmatrix, die über Radikalkettenpolymerisation durch APS und TEMED aus einem Acrylamid/Bisacrylamid unter Luftabschluss entsteht, werden Proteine in der SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Größe

immobilisiert.[88] Die Proteine können durch Coomassie®-Färbung in der Gelmatrix sichtbar gemacht werden. Dabei ist Coomassie®G-250 sensitiver als R-250 [89].

Die Qualität der KVI-F-Präparationen und der gereinigten Einzelketten des KVI-F wurde in nativer SDS-PAGE geprüft. Dazu wurden Trenngele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10% und entsprechende Sammelgele mit 4% Polyacrylamid hergestellt und in die Elektrophoresekammer (System für die vertikale Gelelektrophorese Mini Protean II; Bio-Rad, München, DE) eingespannt.

Vier Teile zu untersuchender Proteinlösung wurden mit einem Teil nicht-reduzierendem Ladepuffer gemischt und im Heizblock (Heizblock Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg, DE) 10 min bei 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen und kurzer Zentrifugation (13.000 rpm, 10 s; Kühlzentrifuge für Reaktionsgefäße 1,5 mL Biofuge fresco; Heraeus, Hanau, DE) wurden 16 µL des jeweiligen Probengemisches in die Auftragesaschen des Sammelgels eingebracht. In jedem Gel wurde ein wie die Proben vorbehandelter Molekulargewichtsstandard mit gefärbten Proteinen im Molekulargewichtsbereich 26.600-180.000 Da mitgeführt. Nach dem Auftragen von Proben und Standard wurde die Kammer in einem Eisbad platziert. Im ersten Schritt wurde eine Spannung von 80 V angelegt (Netzgerät Macrodrive; LKB, Bromma, Schweden) die nach 15 min auf 180 V erhöht wurde. Nach etwa 70 min, wenn die Bromphenolblaufront nahezu die Gesamtlaufstrecke des Gels absolviert hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

2.10.3 Färbung von Gelen mit Coomassie®-G250

Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen und zweimal mit *Aqua bidest.* gewaschen. Anschließend wurde es für vier Stunden bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Gefäß unter Schütteln (Horizontalschüttler 3017; GFL, Burgwedel, DE) in der Färbelösung inkubiert. Nicht an Proteine gebundene überschüssige Farbpartikel wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit *Aqua bidest* entfernt. Die Gele wurden anschließend in Weißlicht fotografiert (Dokumentationssystem BioVision; Peqlab, Erlangen, DE) und die Molekulargewichte der Proteine aus den Proben im Vergleich zum Molekulargewichtsstandard bestimmt.

2.11 Proteinnachweis mittels Western-Blot

2.11.1 Puffer und Lösungen

Tank-Blot-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % Methanol 0,1 % SDS
Blockierungslösung	5% Magermilchpulver-Lösung
Waschlösung, pH 7,2	PBS 0,05 % Tween 20

2.11.2 Proteintrennung, -Blotting und Färbung

Durch Protein-Blotting ist es möglich elektrophoretisch in einem Gel getrennte Proteine auf einer Membran zu immobilisieren und anschließend mit spezifischen Antikörpern und Molekulargewichtsstandards quali- und quantitativ Nachzuweisen [90].

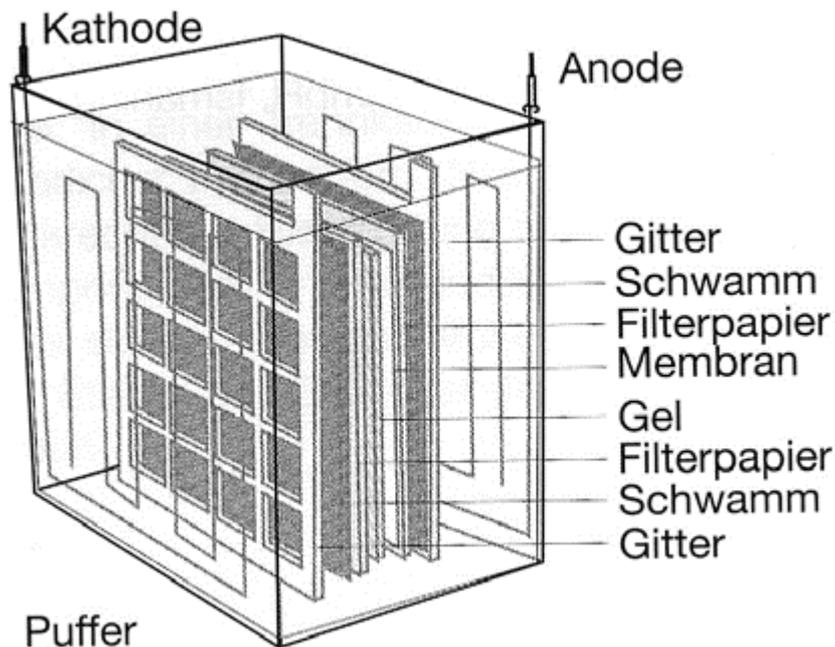


Abbildung 6: Aufbau eines „Blot-Sandwich“ und Platzierung im Tank [91]

Es wurden jeweils 5 µg Proteinlösung bei der Elektrophorese aufgetragen (s. Kap. 2.10). Vor dem Auftragen wurden diese jeweils reduziert. Nitrozellulose-Membranen (GE Healthcare, München, DE) wurden ebenso wie die SDS-Gele in Tank-Blot-Puffer

equilibriert. Eine Membran wurde dann auf ein Gel gelegt und diese dann auf beiden Seiten mit Filterpapier (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE) und Schwämmen bedeckt und als „Blot-Sandwich“ in eine Gitterkassette gespannt. Diese Gitterkassette wurde anschließend mit der Membran zur Anodenseite in den mit Tank-Blot-Puffer gefüllten Tank (Hoefer Inc., Holliston, USA) geschoben (s. Abb. 6). Bei 300 mA erfolgte unter Wasserkühlung auf 10°C der Blot für eine Dauer von 55 min. Zur Transferkontrolle erfolgte eine Färbung des Gels mit Coomassie®G250 (s. Kap. 2.10.3).

2.11.3 Immundetektion

Die Membranen wurden zum Blockieren freier Bindungsstellen nach dem Blotten für 1 h auf dem Laborschüttler (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE) bei Raumtemperatur mit einer 5%igen Magermilchpulver-Lösung inkubiert (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE). Anschließend wurden die Membranen 3 mal 5 min mit Waschlösung gewaschen.

Die Inkubation mit einem im Labor selbst generierten primären KVI-Antikörper (AK) [42] erfolgte für 120 min ebenfalls auf dem Laborschüttler (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE) unter Raumtemperatur. Bei der unspezifischen Kontrolle mit KI wurde dieser in einer Verdünnung von 1:10.000, bei dem Präzipitat nach einmaligem Pepsinverdau mit 1:20.000 und bei dem Präzipitat nach zweimaligen Pepsinverdau und der Positivkontrolle mit einem früher isolierten KVI mit einer Verdünnung von 1:40.000 eingesetzt. Es erfolgte daraufhin eine erneute Waschung mit Waschlösung wiederum dreimal für 5 min. Die Inkubation mit dem Pierce™ Horseradish Peroxidase (HRP)-gekoppelten 2. Antikörper (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) erfolgte in einer Verdünnung von 1:400.000 für 60 min. Danach wurden die Membranen nochmals dreimal für 5 min in Waschlösung gewaschen.

Zur Blotentwicklung bzw. der Detektion der auf der Membran gebundenen Antikörper wurde der Blot zusammen mit 8 ml Pierce™ ECL Western Blotting Substrat (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) in einer Folie eingeschweißt und in einer Dunkelkammer für 1-2 Minuten mit blanko-Filmen (Hyperfilm ECL; GE Healthcare, München, DE) inkubiert. Die belichteten Filme wurden anschließend zur Dokumentation eingescannt (Studio Scan IIsi; Agfa, Mortsel, Belgien).

2.12 Statistische Auswertung

Der Mittelwert (MW) wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$MW = \sum x_i / n$$

Die Standardabweichung (SD) vom Mittelwert wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - MW)^2}$$

(n - Anzahl der Proben, x_i - Einzelmesswerte)

Versuche mit mehreren parallelen Messreihen wurden durch one-way- oder two-way-ANOVA-Analyse mit Tukey post-hoc-Tests mit SigmaStat für Windows Version 2,03 (Sigmaplot, Erkrath, Germany) statistisch ausgewertet. Dabei wurde $p \leq 0,05$ als signifikant gewertet. Im Ergebnisteil wurden die Signifikanzen wie folgt dargestellt:

* $<0,05$, ** $<0,005$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von Kollagen VI aus humanen Plazenten

KVI wurde, wie im Methodenteil beschrieben, aus humanen Plazenten durch fraktionierte Salzfällung isoliert. Zur Reinheitskontrolle wurde das durch wiederholte Fällung mit 7-10% NaCl gewonnene Präzipitat mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 7).

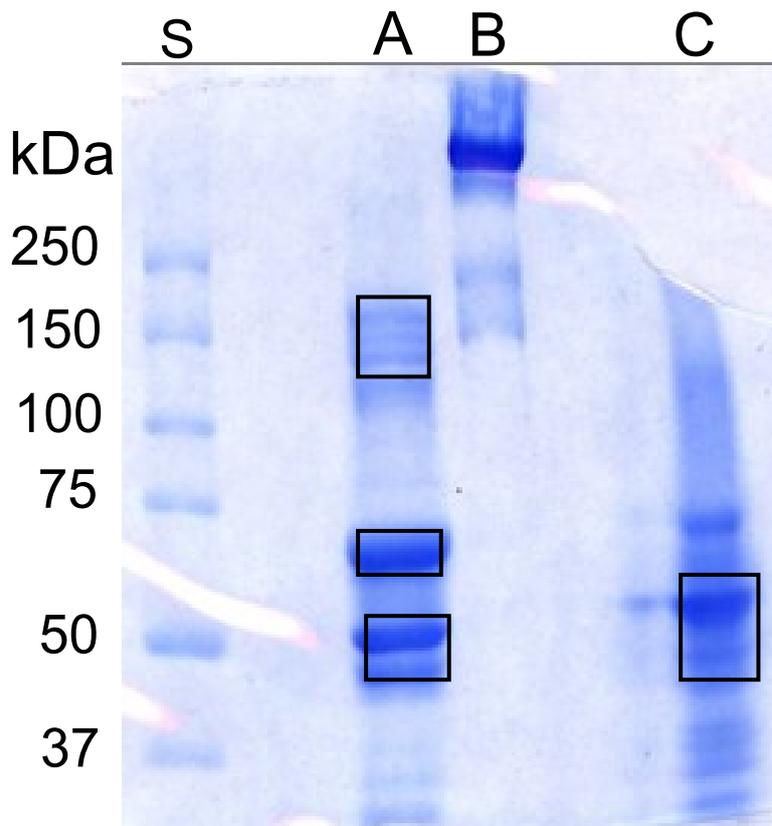


Abbildung 7: SDS Gel der 10% NaCl-Fällung. Spur S: Standard. Spur A: Präzipitat 3, 5 μ l aufgetragen, reduziert. Spur B: Präzipitat 3, 5 μ l aufgetragen, nicht reduziert. Spur C: 12 μ g früher bereits isoliertes Kollagen VI als interner Standard, reduziert.

In Spur A waren drei Banden um 150 kDa, eine dickere zwischen 75 und 50 kDa sowie zwei um 50 kDa zu erkennen. Diese drei Banden entsprechen den alpha-Einzelketten von KVI-F. Die drei letztgenannten traten unter nicht reduzierenden Bedingungen in der Spur B nicht mehr auf. Der KVI-Standard in der Spur C zeigte ebenfalls diese drei Banden. Die Banden bei 150 kDa stellen Verunreinigungen durch KV dar.

Dass es sich bei den 50-75 kDa-Banden tatsächlich um KVI handelte, wurde mittels spezifischer KVI-Antikörper im Western-Blot verifiziert (Abb. 8).

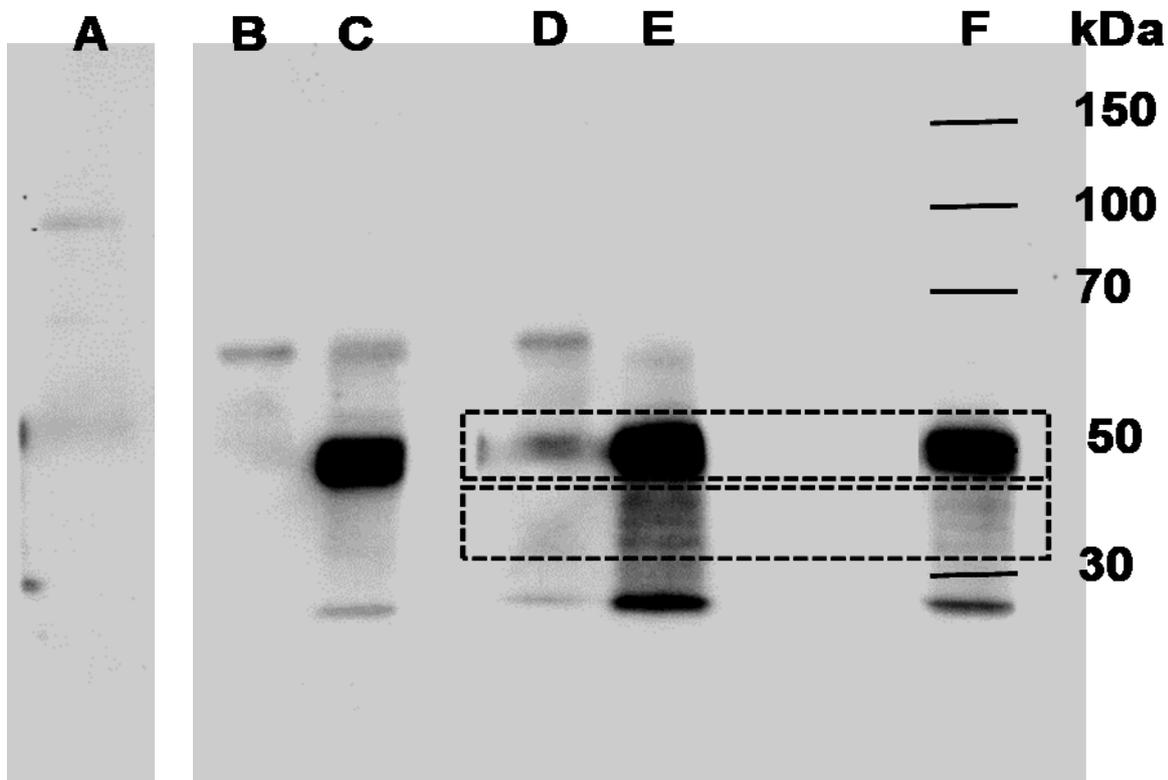


Abbildung 8: Western Blot zum KVI Nachweis. Es wurden jeweils 5 μ g Proteinlösung bei der Elektrophorese aufgetragen. Vor dem Auftragen wurden diese jeweils reduziert. Spur A: KI als unspezifische Kontrolle (primärer KVI-Antikörper (AK) 1:10.000 verdünnt). Spur B und D: Präzipitat 3 (AK 1:20.000 verdünnt), 1x mit Pepsin behandelt. Spur C und E: Präzipitat 3 (AK 1:40.000 verdünnt), 2x mit Pepsin behandelt. Spur F: Früher bereits isoliertes KVI als Positivkontrolle (AK 1:40.000 verdünnt). Dargestellt ist ein repräsentativer Blot des KVI-Nachweises.

Ein Vergleich der Bandenmuster mit der KVI-Positivkontrolle in Spur F zeigte, dass es sich tatsächlich um KVI handelte (siehe gestrichelte Kästen). Der Vorteil eines zweimaligen Pepsinverdaus bei der KVI-Isolierung zeigte sich anhand der Bande im Bereich von 70 kDa, die in Spur C und E weniger intensiv war. Dafür zeigten sich stärkere Banden im Bereich von 30-50 kDa. Diese Banden entsprechen den drei α -Ketten des Heterotrimeres KVI.

3.2 Rückfaltung/ Reaktivierung von KVI-F

Durch eine Änderung äußerer Einflüsse, wie z.B. Temperatur und pH-Wert [92] oder durch Zusatz organischer Lösungsmittel, kann es zum Verlust der biologischen Aktivität eines Proteins durch die Veränderung der Proteinkonformation kommen. Die Primärstruktur wird dabei nicht verändert. Diese Vorgänge, bei denen vor allem hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen der Tertiärstruktur geschwächt werden, bezeichnet man als Denaturierung.[93] Durch den Einsatz chaotroper Substanzen, wie Harnstoff in wässriger Lösung, lassen sich die nicht-kovalenten Proteinbindungen, welche für die Faltung verantwortlich sind, auflösen, so dass das Protein denaturiert. Entfernt man nun schrittweise diese Substanz, kann es zu einer spontanen Rückfaltung, der Renaturierung des Proteins kommen.[94]

Im Verlauf der Optimierungsversuche zeigte sich ein Wirkverlust von länger gelagerten KVI-F-Chargen, was auf Denaturierungsprozesse hinwies. Wir verwendeten den Iminoharnstoff Guanidin für die gezielte De- und Renaturierung.

Abbildung 9 zeigt, dass das KVI-F im reaktivierten Zustand im Vergleich zum nicht-reaktivierten KVI-F einen deutlich erhöhten [³H]-Thymidineinbau induzierte, der sogar stärker als der FKS-induzierte [³H]-Thymidineinbau war. Dieser Effekt zeigte sich bei allen drei getesteten Konzentrationen.

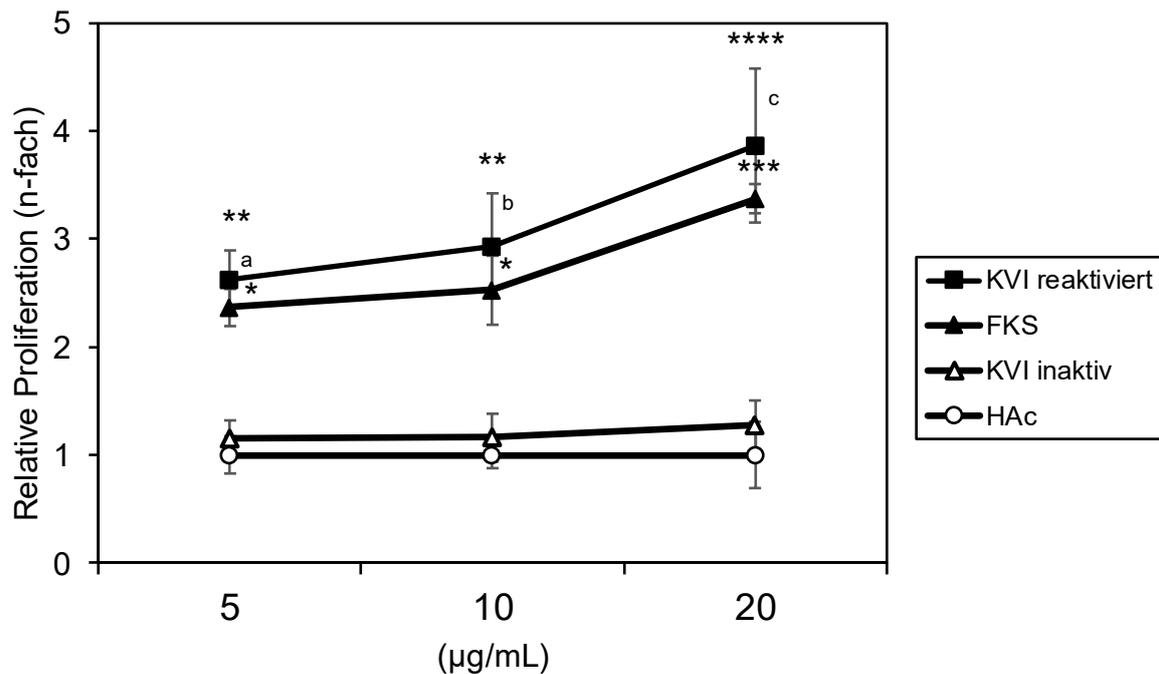


Abbildung 9: Vergleich von unbehandeltem und reaktiviertem KVI-F. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden 24 h mit 100 µL Standardmedium inkubiert, das Medium verworfen und die Zellrasen zweimal mit 100 µL Grundmedium gewaschen. Zur Synchronisation wurden die Zellen mit 100 µL Reduktionsmedium für 24 h bei 37°C inkubiert. In den Ansätzen wurden inaktives KVI-F und reaktiviertes KVI-F jeweils in HAc (bzw. HAc alleine in gleichen Volumina, bzw. FKS als Kontrollen) dazugegeben. Die Kulturen erhielten ^3H -Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtkubationszeit von 24 h. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten ($n=2$). */**/***/**** im Vergleich zu HAc. ^a $p < 0,05$ /^b $p < 0,01$ /^c $p < 0,005$ im Vergleich zu KVI inaktiv. Statistik: Two-way ANOVA; post-hoc Test Tukey.

Alle verwendeten KVI-F-Chargen wurden daher vor einem Einsatz in der Zellkultur reaktiviert. Dies half zudem den Verbrauch von KVI-F durch den möglichen Einsatz geringerer Konzentrationen in Folgeversuchen zu senken.

3.2.1 Trennung der Einzelketten von KVI-F

Proteine bewirken häufig nur in ihrer komplexen Struktur eine Signaltransduktion, es ist daher immer wieder von Interesse, welche Funktion ihren einzelnen Bausteinen zukommt. Da die drei alpha-Einzelketten von KVI-F über Disulfid- und Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, mussten diese gelöst werden um die einzelnen Ketten chromatographisch auftrennen zu können.

Nach erfolgter Reduktion und Alkylierung anhand im Labor etablierter Protokolle wurden die mittels Hydroxyapatid-Chromatographie getrennten und per FPLC erhaltenen unterschiedlichen Fraktionen mittels SDS-PAGE hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht. Wie in Abb. 10A dargestellt, waren in Fraktion I & II um 50 kDa kräftige Einzelbanden erkennbar, welche $\alpha 2(VI)$ mit einer schwachen „Verunreinigung“ von $\alpha 3(VI)$ entsprachen [95]. Bei den anderen Fraktionen gab es keine klaren singulären Banden. Fraktion III enthielt die $\alpha 1$ - und $\alpha 3(VI)$ -Kette als Gemisch und Fraktion IV hauptsächlich die $\alpha 1(VI)$ -Kette allerdings auch mit einer „Verunreinigung“ mit $\alpha 3(VI)$.

Die Fraktionen III & IV wurden mittels Anionenaustauscher-Chromatographie und einem NaCl-Elutionsgradienten weiter aufgetrennt. Abb. 10B zeigt ein entsprechendes Chromatogramm. Bei niedrigem NaCl-Gehalt eluierte ausschließlich $\alpha 3(VI)$, nach Anstieg der Natriumchloridkonzentration eluierte $\alpha 1(VI)$.

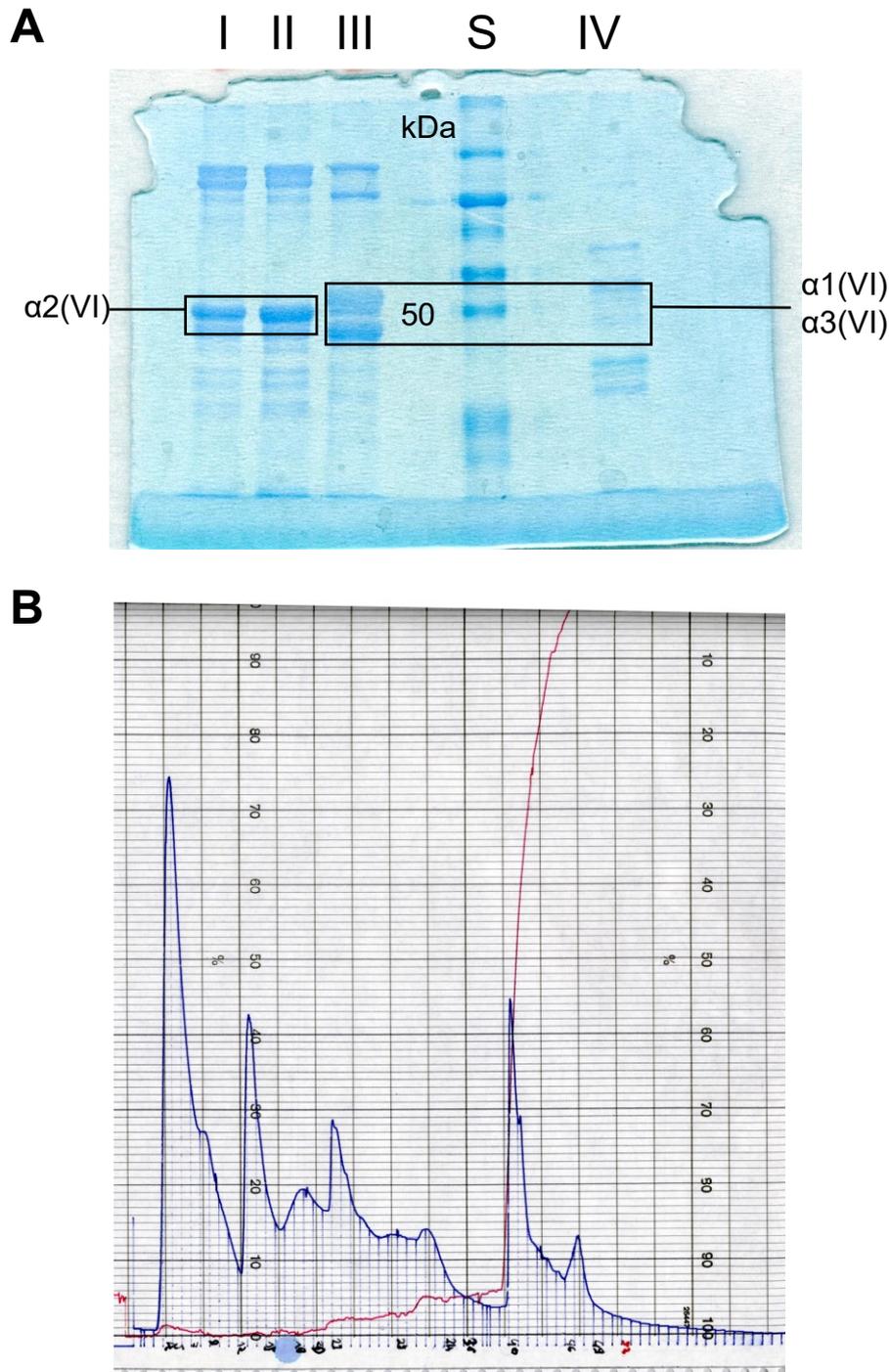


Abbildung 10: (A) Nachweis der aufgetrennten Ketten. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit nichtreduzierendem Puffer gemischt und in die vier Taschen I-IV appliziert, zwischen III und IV wurde der Standard aufgetragen. Unter Eiskühlung wurde die Elektrophorese für 30 min bei konstanter Stromstärke auf 80 V eingestellt und anschließend bis zum vollständigen Durchlaufen der Proben auf 180 V. Anschließen wurde das Gel 3x5 Minuten mit Aqua dest. gespült und anschließend für 1 h mit Coomassie eingefärbt und mittels Scanner digitalisiert. **(B) Darstellung des FPLC-Graphen der über eine Säule mit einer Anionenaustauschermatrix aufgetrennten $\alpha 1(VI)$ - und $\alpha 3(VI)$ -Ketten.** Deutlich zu erkennen die (blau dargestellten) Peaks, welche der Detektion von Proteinen im Eluat entsprechen. Rot dargestellt ist der Salzgradient des Eluierungspuffers.

3.3 Optimierung der Bedingungen für den [³H]-Thymidineinbau durch CFSC

3.3.1 Einfluss der Synchronisationsbedingungen auf den KVI-F-induzierten [³H]-Thymidineinbau

Der physiologische Zustand und die Kulturbedingungen bestimmen wesentlich die Sensitivität der Zellen für exogene Reize. Daher wurden zunächst die Bedingungen für die Synchronisation der CFSC-Population im Zellzyklus durch Serumentzug optimiert. Unabhängig von den Synchronisationsbedingungen war der [³H]-Thymidineinbau in Gegenwart von KVI-F höher als nur mit dem Lösemittel HAc allein. Wurden die Zellen vor der Behandlung unter serumfreien Bedingungen im Kühlschrank synchronisiert, war die Proliferation insgesamt erniedrigt und bei beiden eingesetzten Konzentrationen von KVI-F vergleichbar (Abb. 11, links). Nach einer Synchronisation über 24 h in Reduktionsmedium mit 0,25% FKS dagegen war die Proliferation der CFSC in Gegenwart von 160 µg/ml KVI-F im Vergleich zu den Kulturen mit der geringeren KVI-F-Konzentration signifikant erhöht (Abb. 11, rechts).

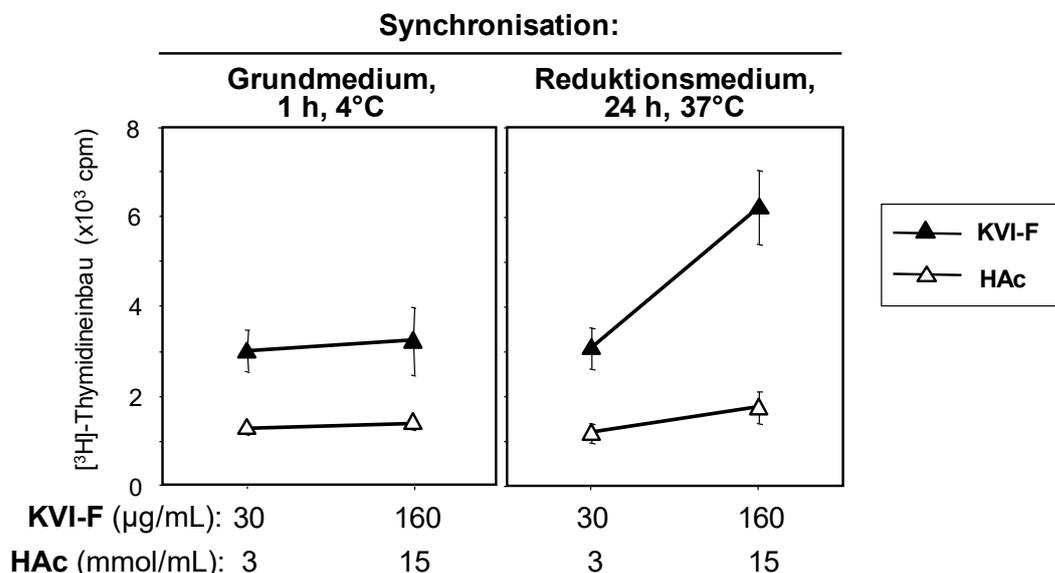


Abbildung 11: Variation von Serumgehalt, Inkubationsdauer und -temperatur zur Synchronisation von CFSC. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden über 24 h mit 100 µL Standardmedium inkubiert, das Medium verworfen und die Zellrasen zweimal mit 100 µL Grundmedium gewaschen. Zur Synchronisation wurden die Zellen (links) mit 100 µL Grundmedium 1 h bei 4°C im Kühlschrank bzw. (rechts) mit 100 µL Reduktionsmedium über 24 h bei 37°C inkubiert. In allen Ansätzen wurde das Medium gegen 100 µL Reduktionsmedium ausgetauscht und KVI-F in HAc bzw. HAc alleine in gleichen Volumina dazugegeben. Die Kulturen erhielten [³H]-Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtinkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Octaplikaten repräsentativ für 4 Experimente.

Daher wurden die CFSC in allen folgenden Experimenten vor der Behandlung mit KVI-F und daraus abgeleiteten Verbindungen über Nacht bei 37°C in Reduktionsmedium inkubiert.

3.3.2 Positivkontrolle für den maximal induzierbaren [³H]-Thymidineinbau

Nach den Synchronisationsbedingungen wurde anschließend der FKS-Gehalt im Kulturmedium so optimiert, dass mit KVI-F ein maximaler [³H]-Thymidineinbau induziert wird. Diese Bedingungen sollten dann als Positivkontrolle in den nachfolgenden Experimenten dienen.

Bis zu einer Konzentration von 1% FKS im Kulturmedium zeigten die CFSC einen [³H]-Thymidineinbau um 2.000 cpm, der sich proportional mit steigenden FKS-Konzentrationen erhöhte. Ein Maximum von 17.250 ± 1.555 cpm wurde mit 10% FKS im Medium erreicht (Abb. 12).

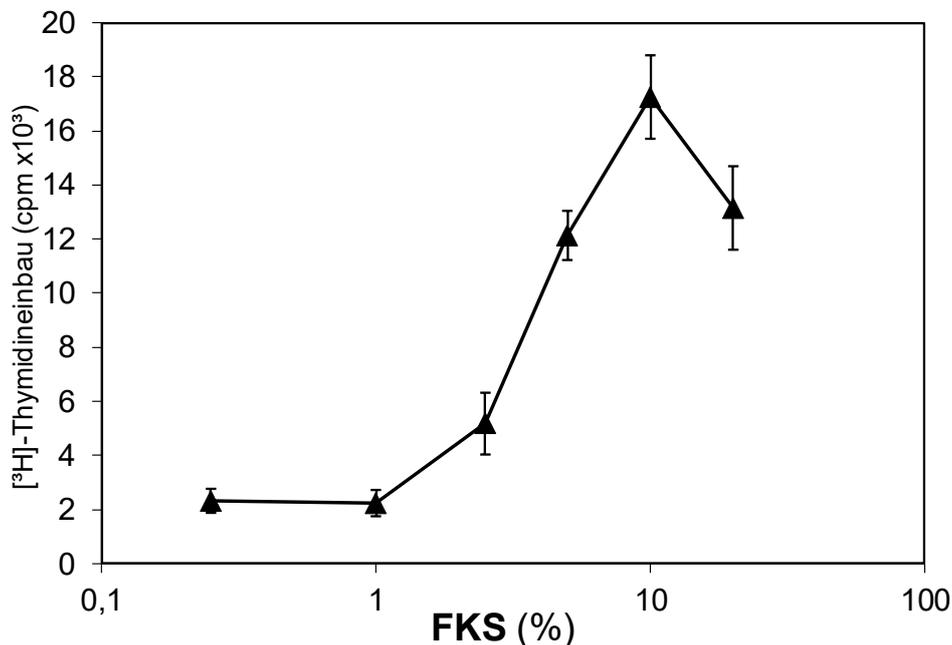


Abbildung 12: Titration des FKS-Gehaltes in der Kultur von CFSC. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden über 24 h mit 100 μ L Standardmedium inkubiert, die Zellrasen zweimal mit 100 μ L Grundmedium gewaschen und mit 100 μ L Reduktionsmedium für 24 h bei 37°C inkubiert. In allen Ansätzen wurde das Reduktionsmedium gegen 100 μ L Kulturmedium mit der entsprechenden FKS-Konzentration ausgetauscht. Die Kulturen erhielten [³H]-Thymidin während der letzten 8 h der Gesamtinkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Pentaplikaten repräsentativ für 3 Experimente.

Um die Effekte von KVI-F, dessen alpha-Einzelketten und entsprechenden Peptiden in den Folgeversuchen besser einordnen zu können (Stärke der Stimulation bzw. Inhibition), wurde ggf. eine Behandlungskontrolle mit 10% FKS im Medium mitgeführt.

3.3.3 Wirkung von Essigsäure, des Lösungsmittels für KVI-F

Da tripelhelikales KVI-F und die daraus isolierten Einzelketten nur bei pH-Werten <4,0 vollständig in Lösung gebracht werden konnten, wurden 150 mmol/L HAc als Lösemittel verwendet und waren deshalb auch in allen Behandlungsansätzen präsent. Daher wurde der Einfluss der HAc selbst auf die Proliferation von CFSC untersucht.

Ohne den Zusatz von HAc lagen Basisproliferation und maximaler [³H]-Thymidineinbau in der gleichen Größenordnung wie bei den Vorversuchen zur Optimierung der Kulturbedingungen (Abb. 13). In Anwesenheit von 3,75 mmol/L HAc wurde die Proliferation der CFSC nicht beeinflusst. Höhere Konzentrationen hatten einen schwachen aber nicht signifikant proliferationsfördernden Effekt, der einen Bereich von 40% der Positivkontrolle mit 10% FKS nicht überschritt. Die in den Experimenten maximal eingesetzte Konzentration von 15 mmol/L HAc als Lösungsmittel beeinflusste die Proliferation von CFSC demnach nicht signifikant, konnte also vernachlässigt werden und ist in allen folgenden Ergebnissen nicht mehr gezeigt.

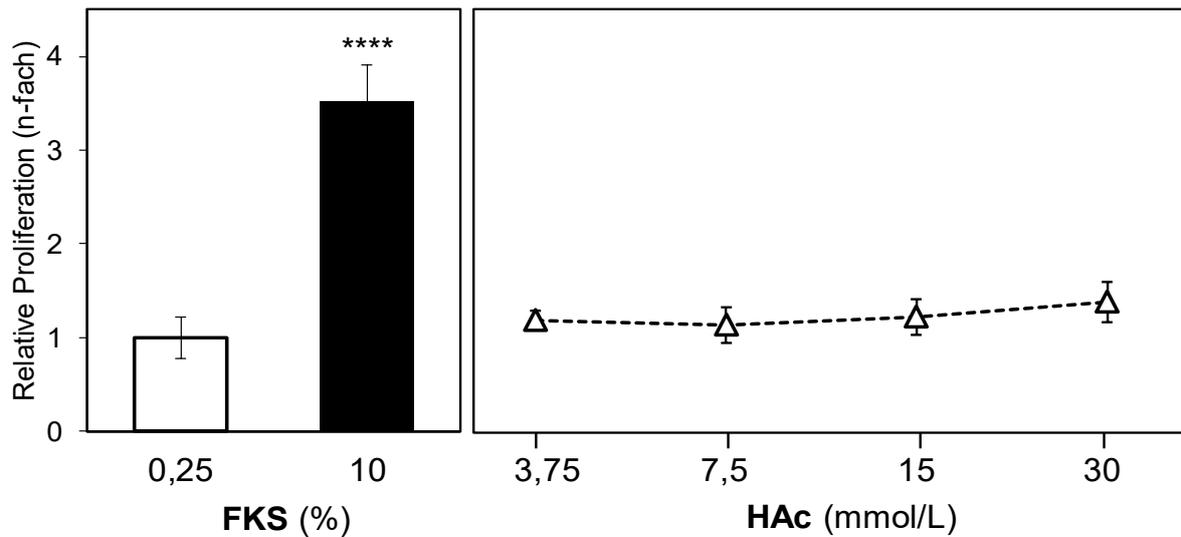


Abbildung 13: Wirkung von HAc auf die Proliferation von CFSC. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden über 24 h mit 100 μ L Standardmedium inkubiert, die Zellrasen zweimal mit 100 μ L Grundmedium gewaschen und mit 100 μ L Reduktionsmedium über 24 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde durch 100 μ L Reduktionsmedium bzw. Standardmedium ohne (Balken) bzw. Reduktionsmedium mit HAc (Dreiecke) ersetzt. Alle Kulturen erhielten [3 H]-Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten, n=3. ****p<0,0001 im Vergleich gegenüber 0,25% FKS und allen dargestellten HAc-Konzentrationen. Statistik: One-way ANOVA, post-hoc Test Tukey.

3.4 Proliferationsfördernde Wirkung von KVI-F auf CFSC

Angelehnt an die Vorversuche der eigenen Arbeitsgruppe mit Fibroblasten und ergänzend zu den Optimierungsversuchen zur KVI-F-Reaktivierung, wurde die mitogene Wirkung von KVI-F auf CFSC in weiteren Konzentrationen getestet. Abbildung 14 zeigt, dass die mitogene Wirkung mit zunehmender Konzentration deutlich zunahm und bei 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ca. 75% der Maximalwirkung von 10% FKS entsprach. Bei 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KVI-F zeigt sich ein deutlich signifikanter Unterschied im Vergleich zum Reduktionsmedium. Daher wurden 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KVI-F als Referenz/Positivkontrolle in den folgenden Versuchen mit möglichen antagonistischen Effekten der KVI-F-Einzelketten verwendet.

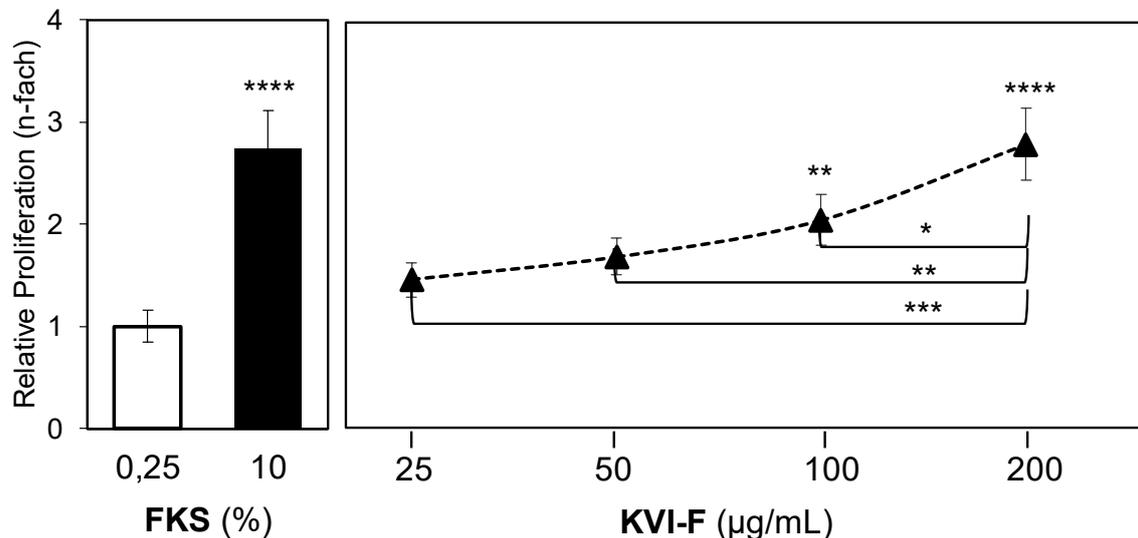


Abbildung 14: Wirkung von KVI-F auf die Proliferation von CFSC im Vergleich zur FKS-Wirkung. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden 24 h mit 100 μL Standardmedium inkubiert, die Zellrasen zweimal mit 100 μL Grundmedium gewaschen und mit 100 μL Reduktionsmedium über 24 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde gegen 100 μL Reduktionsmedium bzw. Standardmedium ohne (Balken) bzw. Reduktionsmedium mit KVI-F (Dreiecke) ausgetauscht. Alle Kulturen erhielten [^3H]-Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtinkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten, $n=3$. **/ **** im Vergleich zu 0,25% FKS; Klammern: */ **/ *** KVI-F-Konzentration jeweils im Vergleich zu 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KVI-F. Statistik: One-way ANOVA; post-hoc Test Tukey.

3.5 Wirkung der Einzelketten von KVI-F auf die Proliferation von CFSC

3.5.1 Äquimolares Gemisch der drei Einzelketten von KVI-F

Durch Reduktion und Alkylierung des KVI-F-Moleküls wurde die tripelhelikale Struktur von KVI-F aufgelöst und man erhielt ein Gemisch der drei alpha-Einzelketten von KVI-F welche dann in Lösung im äquimolaren Verhältnis vorlagen (das Molekulargewicht einer Einzelkette von KVI-F (~50 kDa) entspricht etwa einem Drittel des Molekulargewichtes von KVI-F (~150 kDa)).

Interessant war nun, ob sich die Wirkung des Gemisches der drei Einzelketten auf die CFSC-Proliferation von der Wirkung des intakten KVI-F-Moleküls unterschied.

Während geringe Konzentrationen von 100 und 200 µg/mL schwach stimulierend auf die Proliferation der CFSC wirkten, nahm dieser Effekt mit steigenden Konzentrationen ab und war bei 500 µg/mL signifikant unter dem Niveau der Negativkontrolle mit Reduktionsmedium (Abb. 15)

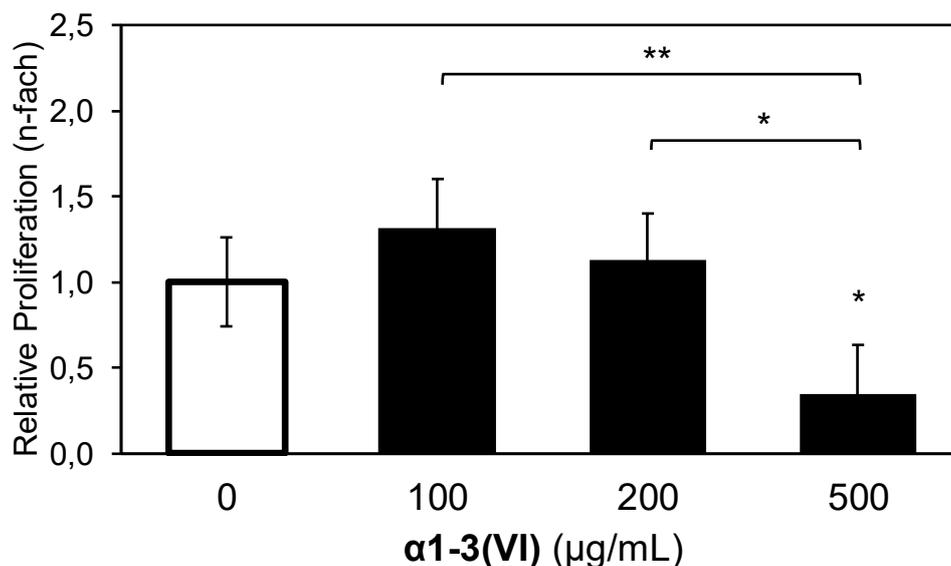


Abbildung 15: Wirkung von KVI-Einzelketten im Gemisch auf den $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau in der Kultur der CFSC. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden über 24 h mit 100 µL Standardmedium inkubiert, das Medium verworfen und die Zellrasen zweimal mit 100 µL Grundmedium gewaschen. Zur Synchronisation wurden die Zellen mit 100 µL Reduktionsmedium über 24 h bei 37°C inkubiert. In allen Ansätzen wurde das KVI-Einzelkettengemisch in HAc in unterschiedlichen Konzentrationen aber in gleichen Volumina dazugegeben. Die Kulturen erhielten $[^3\text{H}]$ -Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtinkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten, $n=3$. *:Wenn nicht anders angegeben: Signifikant im Vergleich zur Kontrolle, Klammern: */** signifikant zu 500µg/mL α1-3(VI). Statistik: One-way ANOVA, post-hoc Test Tukey.

3.5.2 Äquimolares Gemisch von $\alpha 1(\text{VI})$ und $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette

Trennte man die Einzelketten wie oben beschrieben über eine Hydroxyapatit-Chromatographie mittels FPLC, erhielt man zunächst ein isomolares Gemisch von $\alpha 1(\text{VI})/ \alpha 3(\text{VI})$ -Kette sowie einzeln die $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette. Hier war es von Interesse, ob das Gemisch der beiden Ketten eine andere proliferative Wirkung als das gesamte äquimolare Kettengemisch hatte.

In niedriger Konzentration von 66 und 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeigte sich eine Proliferationsrate auf dem Niveau der Negativkontrolle ohne Kettengemischzugabe. Bei einer erhöhten Konzentration von 266 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dagegen war die Proliferationsrate im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich reduziert (Abb. 16).

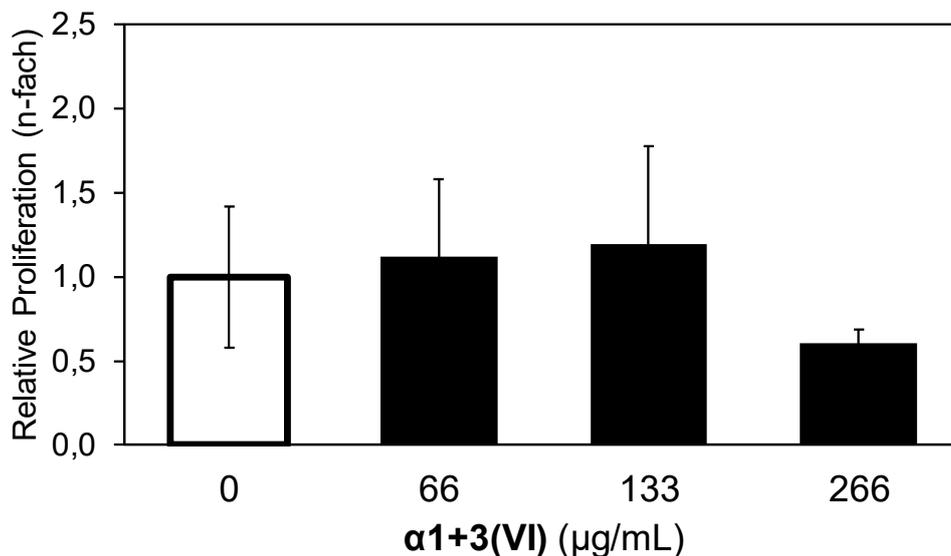


Abbildung 16: Wirkung von $\alpha 1(\text{VI})+\alpha 3(\text{VI})$ -Kettengemisch auf den $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau in CFSC. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden über 24 h mit 100 μL Standardmedium inkubiert, das Medium verworfen und die Zellrasen zweimal mit 100 μL Grundmedium gewaschen. Zur Synchronisation wurden die Zellen mit 100 μL Reduktionsmedium über 24 h bei 37°C inkubiert. In allen Ansätzen wurde das Gemisch von $\alpha 1+3(\text{VI})$ -Ketten in HAc in unterschiedlichen Konzentrationen aber in gleichen Volumina dazugegeben. Die Kulturen erhielten $[^3\text{H}]$ -Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtinkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten, $n=3$ (266 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bzw. $n=5$ (0 und 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Statistik: One-way ANOVA, post-hoc Test Tukey.

Die Konzentration von 266 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\alpha 1+3(\text{VI})$ Kettengemisch wurde im weiteren Verlauf der Arbeit aufgrund des Trends zu erniedrigtem $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau und aus ressourcenschonender Rationalisierung nicht mehr eingesetzt.

3.5.3 Einzelne isolierte KVI-F-Ketten

Mittels der oben beschriebenen Anionenaustausch-Chromatographie wurden im Anschluss auch die $\alpha 1(\text{VI})$ und die $\alpha 3(\text{VI})$ -Ketten voneinander getrennt und auch deren individuelle Effekte zusammen mit denen der bereits vorher isolierten $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette auf die Proliferation der CFSC bestimmt.

Abbildung 17 zeigt, dass $\alpha 1(\text{VI})$ in der Konzentration von 66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (äquimolar zu 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KVI-F) die höchste CFSC-Proliferation auf etwa 188% der Negativkontrolle induzierte. Die $\alpha 2(\text{VI})$ bewirkte mit 158% eine leicht schwächere Proliferationszunahme, während $\alpha 3(\text{VI})$ mit etwa 139% die niedrigste Proliferationszunahme aller drei Einzelketten bewirkte. Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht.

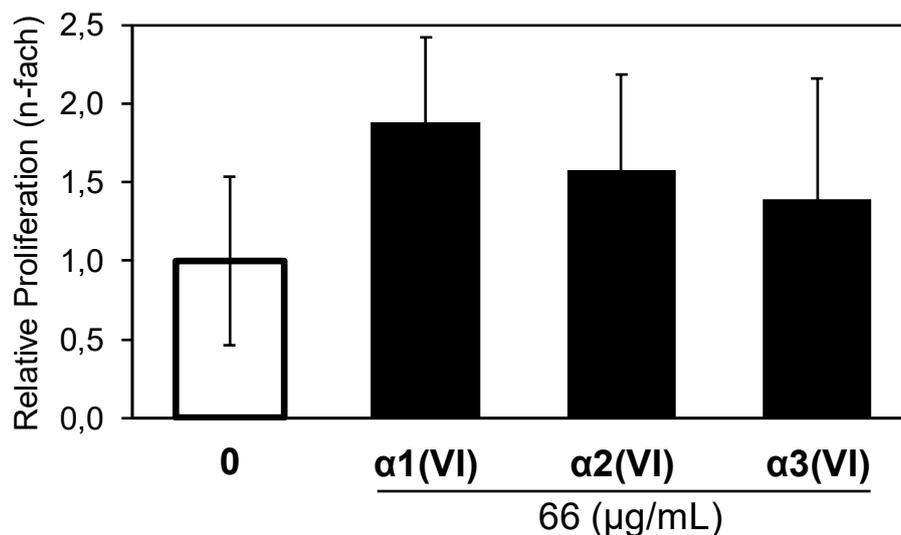


Abbildung 17: Wirkung von isolierten KVI-Einzelketten auf den $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau in der Kultur der CFSC. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden über 24 h mit 100 μL Standardmedium inkubiert, das Medium verworfen und die Zellrasen zweimal mit 100 μL Grundmedium gewaschen. Zur Synchronisation wurden die Zellen mit 100 μL Reduktionsmedium über 24 h bei 37°C inkubiert. In allen Ansätzen wurden die KVI-Einzelketten in HAC in der Konzentration von 66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in gleichen Volumina dazugegeben. Die Kulturen erhielten $[^3\text{H}]$ -Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtinkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten, $n=4$ ($\alpha 1$), $n=3$ ($\alpha 2$ & $\alpha 3$). Statistik: One-way ANOVA, post-hoc Test Tukey ($\alpha 2$).

3.6 Wirkung der KVI-F-Einzelketten auf die KVI-F-induzierte Proliferation von CFSC

3.6.1 Äquimolares Gemisch der drei Einzelketten von KVI-F

Zuvor wurde in Abbildung 15 gezeigt, dass das äquimolare Gemisch der KVI-Ketten im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikant höhere Proliferation der CFSC im Vergleich zur Negativkontrolle bewirkte und bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/mL}$ sogar eine deutliche Proliferationsinhibition bewirkte. Nun wurde geprüft, ob dieses Gemisch aller KVI-Ketten möglicherweise mit der [^3H]-Thymidineinbau-steigernden Wirkung durch KVI-F in CFSC interferiert.

Im Vergleich zur relativen Proliferation nach Behandlung mit 100 $\mu\text{g/mL}$ KVI-F, zeigte sich nach Vorinkubation mit dem Kettengemisch in gleicher Konzentration, also äquimolar, nur eine schwach jedoch nicht signifikant erniedrigte Proliferation. (Abb. 18). Eine Vorinkubation mit der doppelten molaren Menge des Kettengemisches (200 $\mu\text{g/mL}$) führte zu einer deutlicheren Verminderung des KVI-F-induzierten [^3H]-Thymidineinbaus auf 69%. Bei der fünffachen Menge des Kettengemisches war die Proliferation signifikant auf 28% gegenüber der Behandlung mit KVI-F alleine reduziert (Abb. 18).

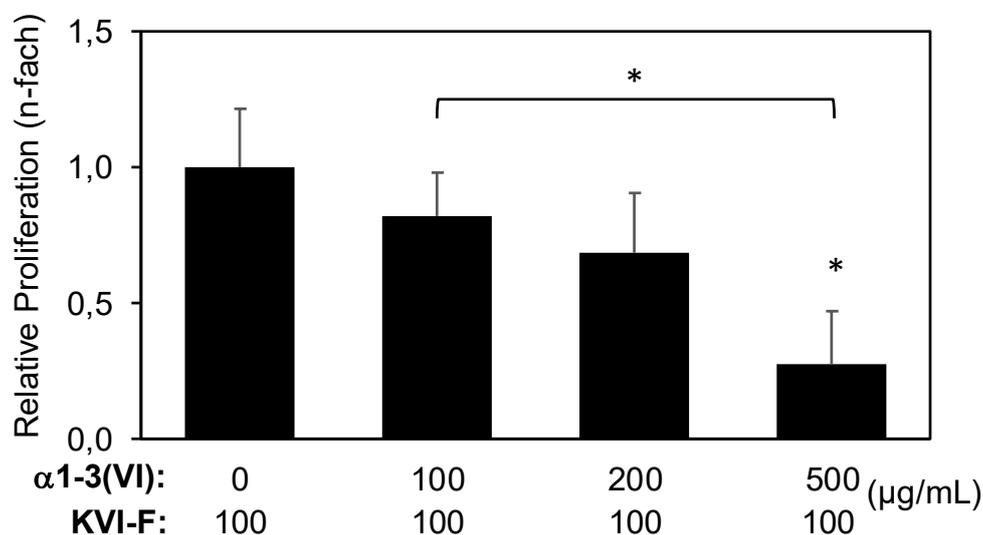


Abbildung 18: Wirkung des isomolaren Gemisches der drei Einzelketten auf den KVI-F-induzierten [^3H]-Thymidineinbau in CFSC. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden über 24 h mit 100 μL Standardmedium inkubiert und anschließend über 24 h synchronisiert. In allen Ansätzen wurde KVI-F in HAc bzw. HAc allein in gleichen Volumina dazugegeben. Das Kettengemisch wurde 1 h vor Zugabe des KVI-F noch während der Synchronisationszeit hinzugegeben. Die Kulturen erhielten [^3H]-Thymidin während der letzten 6 h der Gesamtinkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten, $n=3$. *: Wenn nicht anders angegeben im Vergleich zur Kontrolle mit 100 $\mu\text{g/mL}$ KVI-F alleine. Statistik: One-way ANOVA, post-hoc Test Tukey.

3.6.2 Äquimolares Gemisch von α 1(VI) und α 3(VI)-Kette

Nachfolgend wurde untersucht, ob auch das Gemisch aus α 1(VI)+ α 3(VI), ohne α 2(VI), einen hemmenden Effekt gegenüber der KVI-F-induzierten Proliferation zeigt.

Eine Vorbehandlung mit 66 μ g/mL α 1(VI)+ α 3(VI) (äquimolar zu 100 μ g/mL KVI-F) führte zu keiner signifikanten Reduktion der KVI-F-induzierten Proliferation (Abb. 19). Verdoppelte man jedoch die Konzentration des Kettengemischs auf 133 μ g/mL (2-fach molarer Überschuss gegenüber KVI-F), wurde eine auf 62% verminderte Proliferation im Vergleich zur Behandlung mit KVI-F alleine bewirkt. Signifikanzen zeigten sich hier nicht.

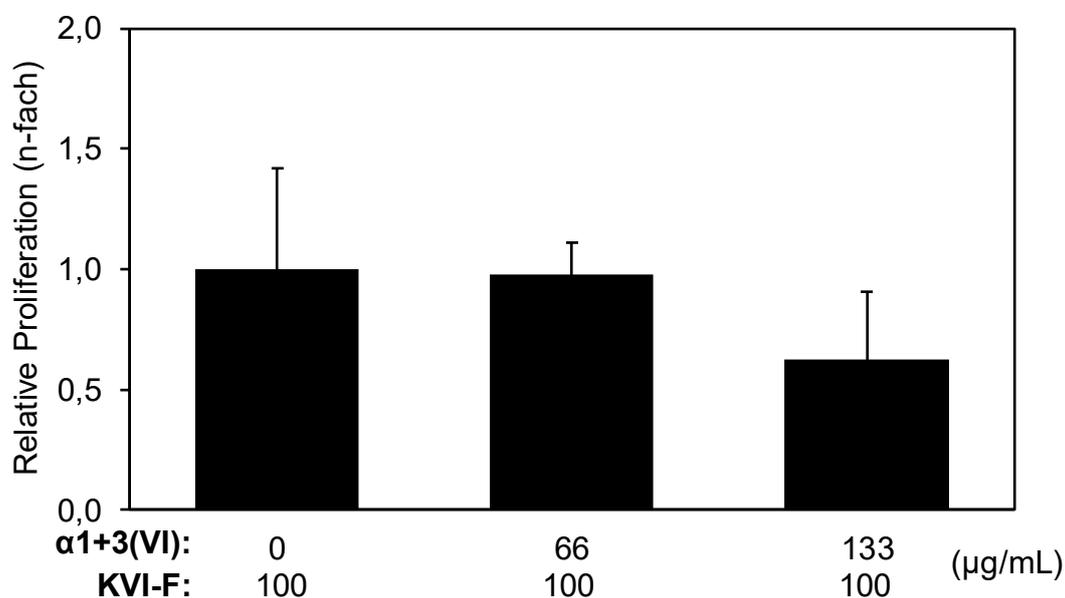


Abbildung 19: Wirkung des isomolaren Gemisches der α 1/ α 3(VI)-Ketten auf den KVI-F-induzierten 3 H]-Thymidineinbau in CFSC. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden über 24 h mit 100 μ L Standardmedium inkubiert und anschließend für 24 h synchronisiert. In allen Ansätzen wurde KVI-F in HAc bzw. HAc allein in gleichen Volumina dazugegeben. Das Kettengemisch wurde 1 h vor der Zugabe von KVI-F bzw. HAc appliziert. Die Kulturen erhielten 3 H]-Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten, n=2 (66 μ g/mL) bis n=5 (0 und 133 μ g/mL). Statistik: One-way ANOVA, post-hoc Test Tukey.

3.6.3 Einzelne isolierte KVI-F-Ketten

Zusätzlich wurde anschließend die Wirkung der jeweils isolierten α 1(VI), α 2(VI) und der α 3(VI) Einzelketten auf die KVI-F-induzierte Proliferation von CFSC bestimmt.

Alle KVI-F-Einzelketten bewirkten bei einer Konzentration von 66 μ g/mL (2-fach molarer Überschuss gegenüber KVI-F) eine deutliche Reduktion der Proliferation

(Abb. 20). Bei der $\alpha 1(\text{VI})$ - und $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette war dieser Effekt am stärksten (Reduktion auf 63%). Bei einer Konzentration der Einzelketten von 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ war dieser Effekt, besonders bei $\alpha 1(\text{VI})$ und $\alpha 3(\text{VI})$, noch deutlicher ausgeprägt.

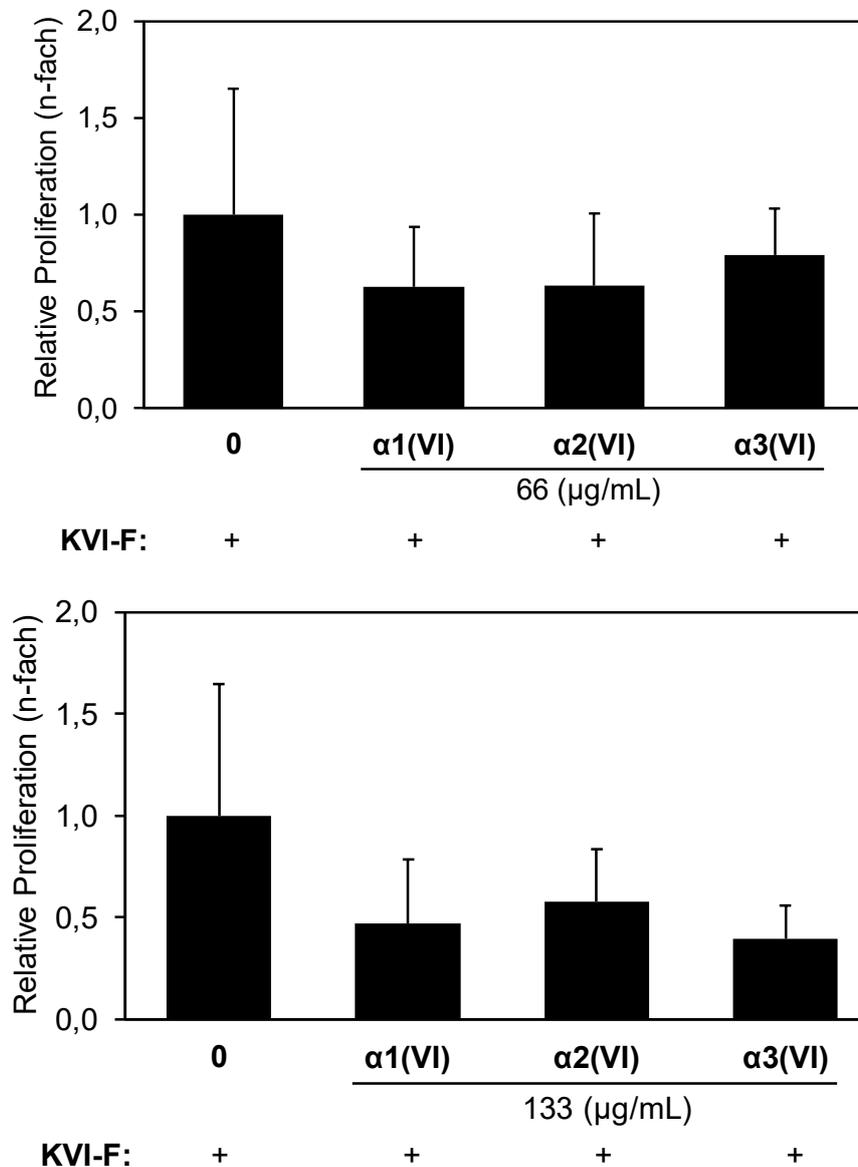


Abbildung 20: Wirkung der isolierten KVI-Einzelketten auf den KVI-F-induzierten $[\text{H}^3]$ -Thymidineinbau in CFSC. Jeweils 5×10^3 CFSC wurden über 24 h mit 100 μL Standardmedium inkubiert und anschließend über 24 h synchronisiert. In allen Ansätzen wurde KVI-F 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in HAc bzw. HAc allein in gleichen Volumina dazugegeben. Die Einzelketten wurden in doppelt bzw. vierfacher molarer Konzentration im Vergleich zu KVI-F (66 bzw. 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1 h vor der KVI-F-Applikation den Zellen hinzugegeben. Die Kulturen erhielten $[\text{H}^3]$ -Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtkubationszeit von 24 h. Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten. $n=2$ (133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\alpha 1,3$), $n=3$ (66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\alpha 2$), $n=4$ (66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\alpha 3$; 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\alpha 2$), $n=4$ (0 & 66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\alpha 1$). Statistik: *One-way ANOVA*, post-hoc Test Tukey.

3.7 Einfluss der isolierten alpha-Einzelketten aus KVI-F auf die Vitalität von CFSC

Um ausschließen zu können, dass die proliferationshemmenden Eigenschaften der individuellen Einzelketten nicht auf toxische Effekte zurückzuführen waren, wurde ein Vitalitäts-/Apoptoseassay durchgeführt.

Wie in Abbildung 21A dargestellt, bewirkte selbst die, über die in den Vorversuchen eingesetzte maximale Einzelkettenkonzentration von 133 µg/mL hinausgehende, Konzentration von 266 µg/mL sowie die entsprechende Kontroll-Behandlung mit dem Lösemittel HAc keine signifikante Abnahme der CFSC-Vitalität. Eine Behandlung der Zellen mit Methanol als Positivkontrolle dagegen führte zu einer signifikanten Abnahme der Vitalität. Entsprechend bewirkten die Ketten auch keine Zunahme von Apoptose in den Zellen, im Gegensatz zu der Positivkontrolle Staurosporin (Abb. 21B).

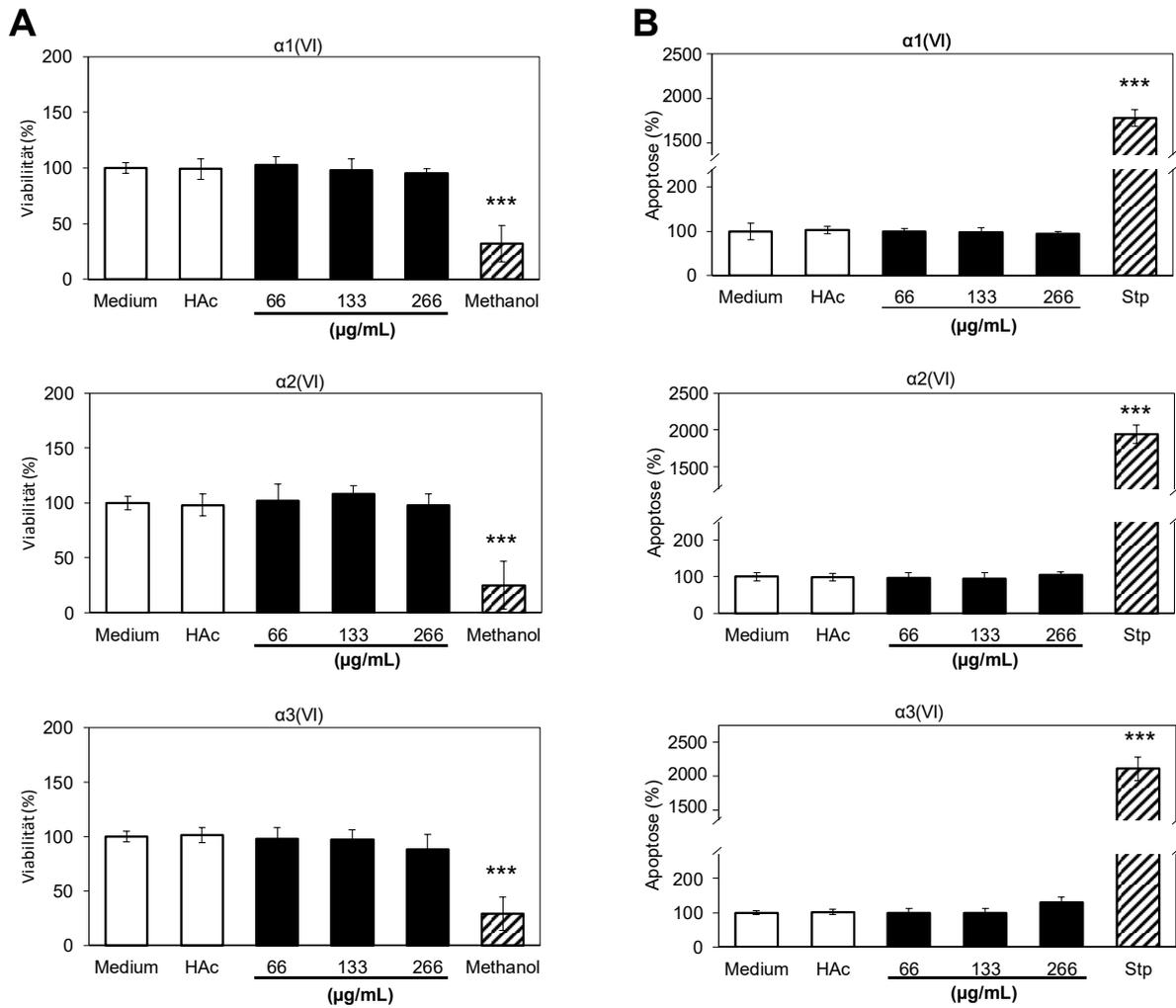


Abbildung 21: Effekte der isolierten drei Einzelketten von KVI-F auf die Vitalität und Apoptoseinduktion in CFSC. **A:** Die Vitalität von CFSC wurde über den Umsatz des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein AM durch intrazelluläre Esterasen bestimmt. **B:** Behandlungsabhängige Effekte auf die Apoptoseinduktion wurden durch Umsatz des Substrates EthD-1 bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen mit Triplikaten. *** $p < 0,001$ (jeweils in Vergleich zur Mediumkontrolle). Abk.: HAc, Essigsäure; Stp, Staurosporin. Statistik: One-way ANOVA, post-hoc Test Tukey.

3.8 Einfluss von KVI-F und den isolierten Einzelketten auf die Genexpression von Fibrosemarkern in CFSC

Um einen ersten Hinweis auf eine biologische Relevanz bzw. eine potentielle therapeutische Nutzbarkeit der KVI-Einzelketten zu erhalten, wurde abschließend untersucht, in wieweit die Einzelketten die profibrotische Wirkung von KVI-F beeinflussen. Als Positivkontrolle einer starken Fibrose-fördernden Wirkung im Zellkulturmodell mit CFSC diente der Wachstumsfaktor TGF- β . Zunächst zeigte sich, dass KVI-F wie erwartet die Genexpressionen der Fibrosemarker KI und TGF- β sowie α SMA als Marker aktivierter HSZ hochregulierte (Abb. 22). Eine Co-Behandlung der CFSC mit KVI-F und der jeweils doppelten Konzentration der jeweiligen alpha-Einzelketten führte zu einer signifikant verringerten Genexpression (Abb. 22). Die hemmenden Effekte von α 2(VI) und α 3(VI) waren jeweils etwas stärker ausgeprägt als die von α 1(VI). Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Genexpression von TIMP-1. Die Proteasen MMP-3 und MMP-13 wurden dagegen durch KVI-F runterreguliert. Hier bewirkte der Zusatz der Einzelketten eine entsprechend weniger starke Runterregulation, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau gegenüber der Behandlung mit KVI-F alleine (Abb. 22).

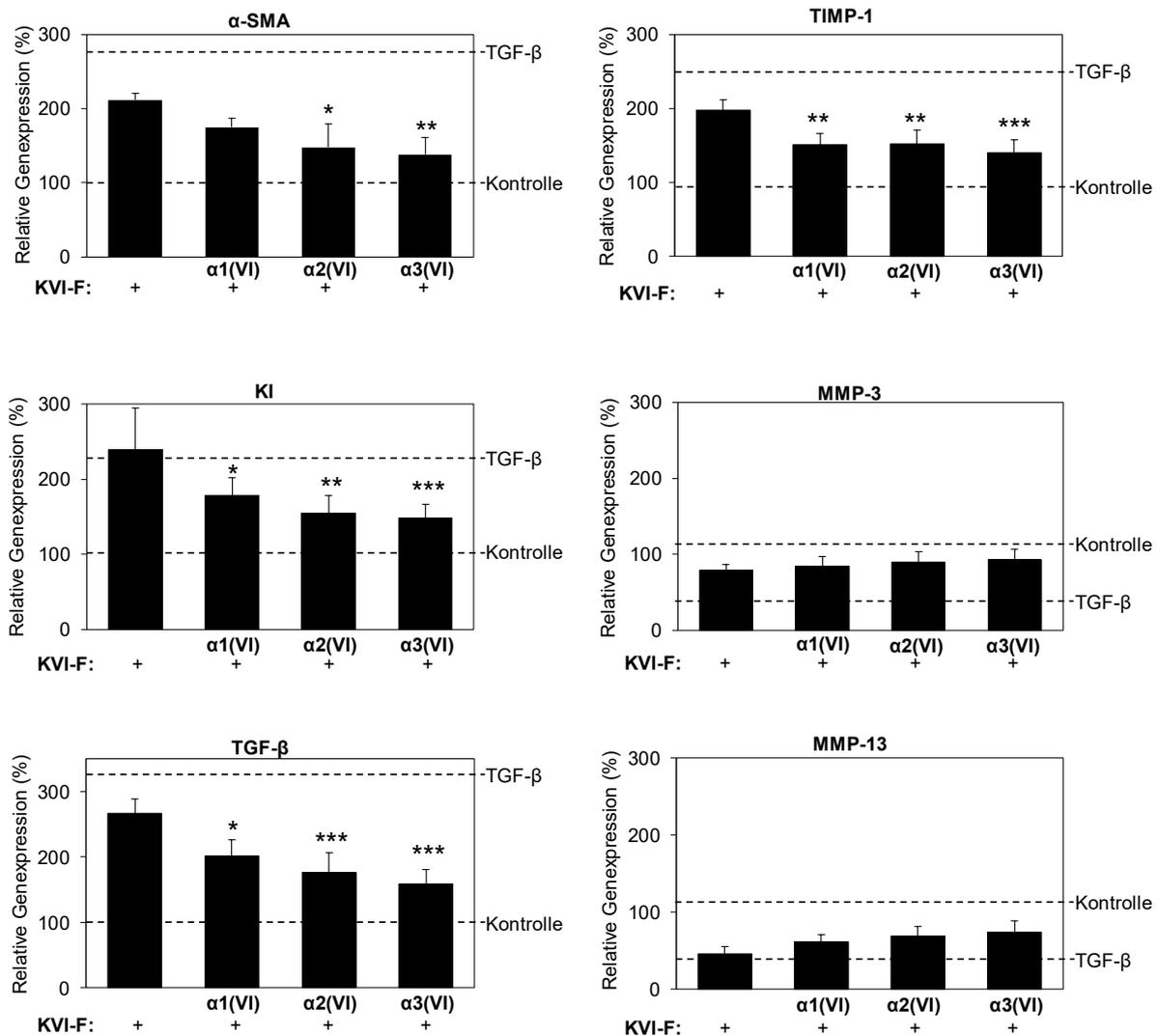


Abbildung 22: Effekte von KVI-F alleine und im Gemisch mit den isolierten alpha-Einzelketten auf die Expression von Fibrose-assoziierten Genen in CFSC. Jeweils 5×10^5 CFSC wurden in einer 6-Lochplatte, nach 24h Anwachsen in Standardmedium und anschließender Synchronisierung über 24h in Reduktionsmedium, mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KVI-F mit und ohne Zusatz von jeweils 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der Einzelketten in jeweils 3 mL Reduktionsmedium über 24 h inkubiert. Medium ohne weitere Zusätze oder 2 ng/mL TGF- β dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Die aus den Zellen isolierte mRNA wurde in komplementäre DNA umgeschrieben und anschließend eine quantitative PCR mit spezifischen Primern und Sonden durchgeführt. Die Genexpressionen wurden auf das Housekeeping Gen GAPDH normalisiert. Die Graphik zeigt MW \pm SD; n=3. */**/**: Wenn nicht anders angegeben im Vergleich zur Kontrolle mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KVI-F alleine. Statistik: One-way ANOVA, post-hoc Test Tukey.

Nachdem die Einzelketten als potentielle Inhibitoren der biologischen Aktivität von KVI-F identifiziert wurden, erfolgte in einem nächsten Schritt der Beginn einer Eingrenzung der biologisch relevanten Struktur. Hierfür wurden zunächst überlappende Peptide aus den Aminosäuresequenz der $\alpha 3(VI)$ -Einzelketten generiert und analog zu den Ketten in Proliferationsstudien mit KVI-F eingesetzt.

3.9 Effekte von aus $\alpha 3(\text{VI})$ -abgeleiteten 30-mer Peptiden auf die KVI-F-induzierte Proliferation von CFSC

Die überlappenden 30-mer Peptide wurden analog zu den Einzelketten als mögliche Antagonisten zu KVI-F in Proliferationsstudien eingesetzt.

Zunächst wurden auch die Peptide alleine hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proliferation von CFSC untersucht. Vor allem die Peptide A5 (159%) und C2 (212%) zeigten eine deutlich über die Kontrolle (Reduktionsmedium) hinausgehende Proliferation (Abb. 23A).

Bezüglich der KVI-F-induzierten Proliferation zeigte ein Großteil der Peptide keine signifikante hemmende Wirkung (Abb. 23B). Starke wachstumshemmende Effekte mit einer Reduktion der Proliferation von 80-90% bewirkten die Peptide A3, A4, B1 sowie C2. Hier erreichten jedoch nur die Peptide A3 ($p < 0,001$), A4 ($p < 0,05$) sowie C2 ($p < 0,05$) ein signifikantes Niveau gegenüber der Behandlung mit KVI-F alleine.

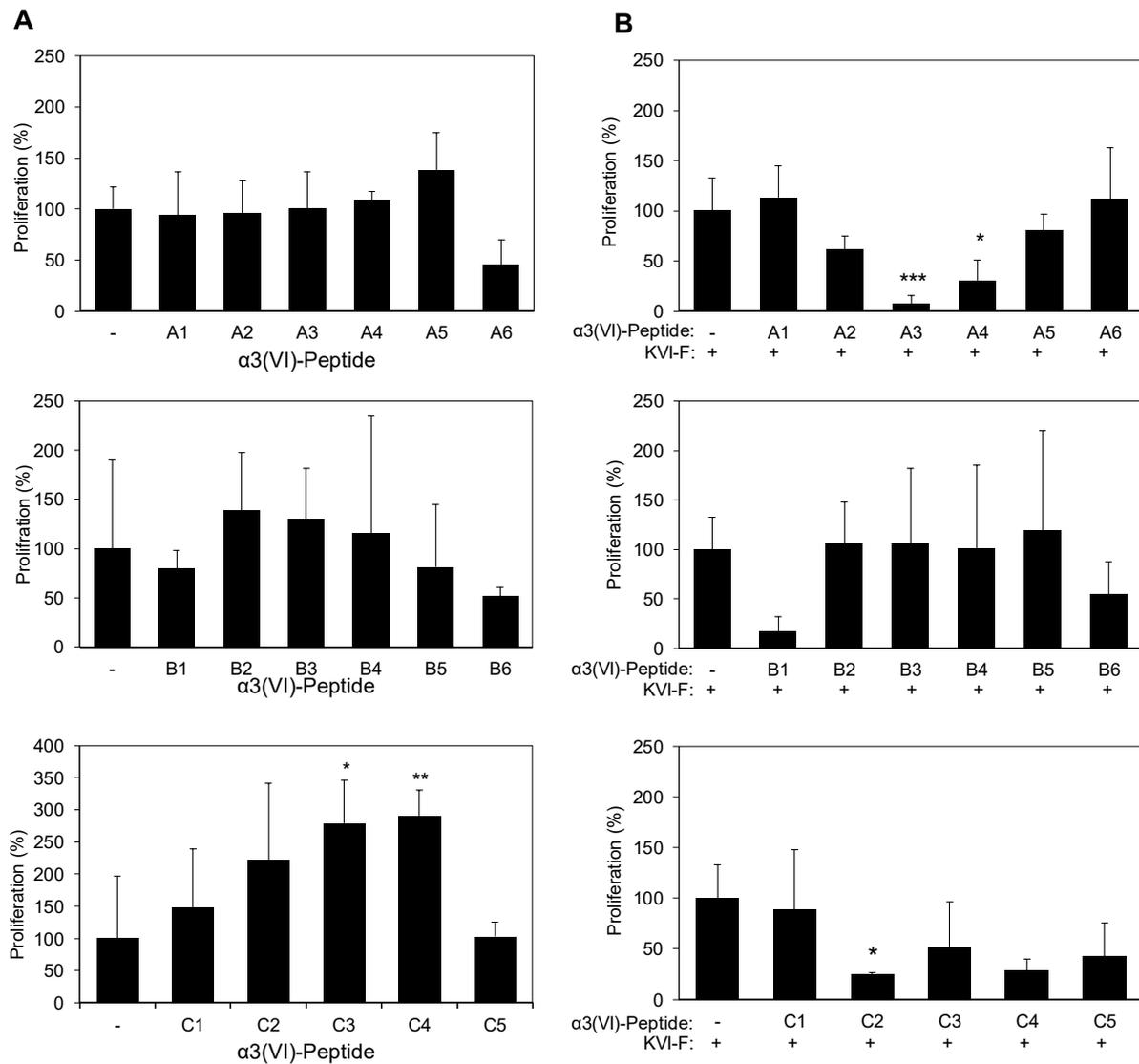


Abbildung 23: Effekte von aus $\alpha 3(\text{VI})$ abgeleiteten synthetischen Peptiden alleine (A) und auf die KVI-F-induzierte Proliferation (B) in CFSC. In Ansatz A wurden jeweils 5×10^3 CFSC über 24 h mit 100 μL Standardmedium inkubiert und anschließend für 24 h synchronisiert. In Ansatz A wurden die CFSC mit den synthetischen $\alpha 3(\text{VI})$ -Peptiden alleine behandelt (100-fach molarer Überschuss gegenüber KVI-F in Ansatz B). In Ansatz B wurden die Zellen 1 h vor der Behandlung mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KVI-F mit einem 100-fach molaren Überschuss (gegenüber KVI-F) der Peptide vorinkubiert. Die Kulturen erhielten $[^3\text{H}]$ -Thymidin während der letzten 4 h der Gesamtinkubationszeit von 24 h. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus Ansätzen in Hexaplikaten für $n=4$ unabhängige Experimente. */**/**: Wenn nicht anders angegeben im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Statistik: One-Way-ANOVA, post-hoc Test Dunnett's.

4 Diskussion

Leberfibrose, Zirrhose und ein im Zuge dessen entstehendes HCC sind Folgen einer chronischen Leberschädigung. Eine Aktivierung von HSZ sowie die Akkumulation von EZM sind wesentliche Charakteristika der Fibrogenese. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die EZM bzw. EZM-Fragmente selbst, in Form von KVI-F, einen HSZ-aktivierenden und damit Fibrose-fördernden Effekt ausüben können und dieser wiederum durch strukturelle KVI-F-Untereinheiten gehemmt werden kann.

Die HSZ-Aktivierung geht mit verstärkter Proliferation einher. Ergänzend zu früheren Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe mit humanen Fibrosarkomzellen (HT 1080) und Maus Fibroblasten (NIH-3T3, Balb-3T3) [51-53], konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das während der Fibrogenese vermehrt generierte tripelhelikale KVI-F eine potente mitogene Wirkung auch auf die Ratten-HSZ-Zelllinie CFSC hat. Da KVI als ein Serummarker für Fibrose gilt [42], erscheint eine (patho)physiologische Relevanz auch in vivo plausibel, bedarf aber einer näheren Untersuchung.

Bevor Effekte von KVI-F in vitro untersucht werden konnten, musste es zunächst aus humanen Plazenten isoliert werden. Methodisch bedingt lässt sich KVI nicht in seiner nativen Form isolieren. Durch den durchgeführten Isolierungsvorgang mit Pepsinverdau und Salzfällung wurde die kurze gut lösliche tripelhelikale Domäne des Moleküls, das hier sogenannte KVI-F, gewonnen.

Im Rahmen der Proliferationsversuche zeigte sich jedoch ein Wirkverlust von länger gelagerten KVI-F-Isolaten, was vermutlich auf eine Denaturierung des KVI-F-Moleküls zurückzuführen war. Für die Ribonuklease des Pankreas ist eine Reaktivierung und Neufaltung der Raumstruktur, nach Denaturierung mit Harnstoff und Mercaptoethanol und deren schrittweise Entfernung durch Dialyse, bekannt [93, 96]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die biologische Aktivität von KVI-F durch gezielte Rückfaltung bzw. Renaturierung des Proteins, nach Denaturierung in einem Guanidin-HCl-Puffer wiederhergestellt werden kann. Dies wurde daraufhin für alle Folgearbeiten mit KVI-F als fester Arbeitsschritt in die Protokolle übernommen.

Neben der Wiederaufbereitung der KVI-F-Präparationen wurden in dieser Arbeit auch die Versuchsbedingungen für den Einsatz von KVI-F in Zellkulturexperimenten

mit CFSC weiter optimiert. Zellkulturmodelle sind sehr empfindliche, von vielen Faktoren beeinflusste Systeme. Dementsprechend wichtig sind optimale Wachstumsbedingungen sowie konstante und reproduzierbare Versuchsbedingungen und -aufbauten. Eine Voraussetzung für eine zuverlässige Reproduzierbarkeit in Zellkulturexperimenten ist die Synchronisation aller Zellen in die gleiche Phase des Zellzyklus zu Versuchsbeginn.[85] Durch Austestung verschiedener Synchronisationsbedingungen zeigte sich für die hier verwendete Zelllinie CFSC, dass ein „Aushungern“ der Zellen über 24 h mit einem FKS-armen Medium einer einstündigen Kältebehandlung bei 4°C in Normalmedium überlegen war. Diese zwar längere aber effektivere Art der Zellsynchronisation wurde in der Folge für alle nachfolgenden Arbeiten/Experimente an CFSC in unserem Labor als Standard übernommen.

Analog zu den Vorstudien an HT1080-, NIH 3T3- und Balb 3T3-Zellen [52], zeigten sich in der vorliegenden Arbeit auch an CFSC divergente biologische Effekte der unterschiedlichen strukturellen Untereinheiten von KVI. Die Isolation der konstituierenden alpha-Einzelketten 1-3 von KVI-F wurde anhand im Labor etablierter Protokolle durchgeführt [95]. Nach Optimierung der Versuchsbedingungen, inklusive geeigneter Konzentrationen der KVI-F-Untereinheiten auf ein ausreichendes und dennoch ressourcenschonendes Maß, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass KVI-F als starkes Mitogen in CFSC wirkte. Nach Auflösen der intakten Struktur des KVI-F in die individuellen reduzierten/alkylierten alpha-Einzelketten war die mitogene Wirkung stark vermindert. Das Gemisch der drei Einzelketten wirkte bei höheren Konzentrationen sogar proliferationshemmend in CFSC. Diese Daten weisen darauf hin, dass die mitogene Wirkung des KVI-F durch seine intakte originäre Struktur vermittelt wird.

Diese konzentrationsabhängige biologische Wirkung, also einer zunehmenden Proliferationshemmung bei höheren Konzentrationen, wurde auch in eigenen Vorstudien mit anderen Kollagenpeptiden beobachtet [97]. Möglicherweise kommt es bei höheren Peptid- bzw. alpha-Einzelketten-Konzentrationen zu gegenseitigen sterischen Hinderungen an Zielstrukturen auf den Zellen. Dies bedarf aber weitergehender Untersuchungen. Abbildung 24 bildet diese Effekte auf HSZ schematisch ab.

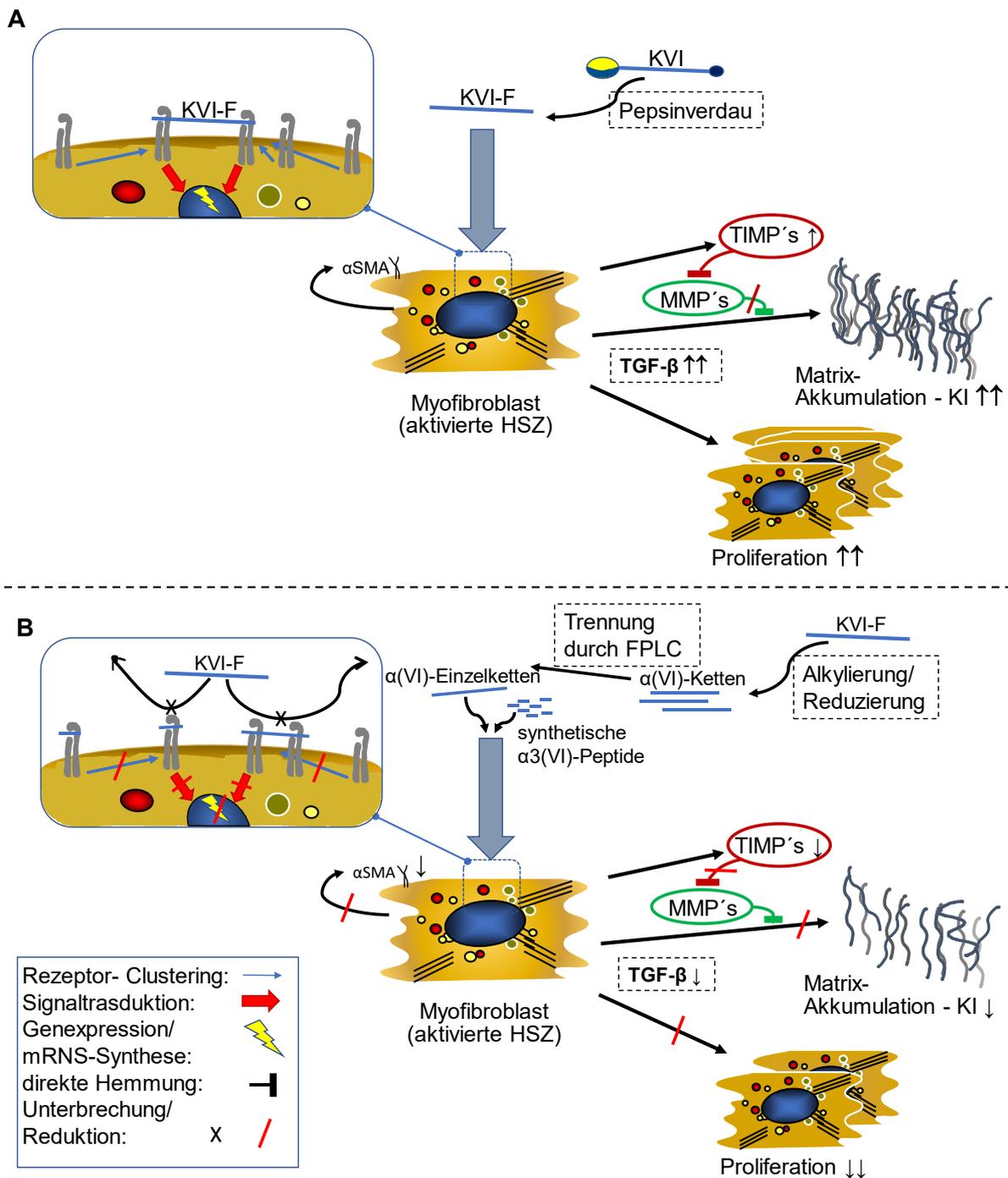


Abbildung 24: (A) Schematische Übersicht der KVI-F Wirkung an Myofibroblasten/ aktivierten HSZ (CFSC) mit gesteigerter Proliferation und Matrixproduktion über TGF- β und TIMP-1 Hochregulation über, noch zu klärende, Rezeptor-Signaltransduktions-Wege (Ausschnitt Zelle). **(B) Schematische Darstellung der durch KVI-F-Untereinheiten** wie $\alpha(VI)$ -Einzelkette oder synthetische Peptide der $\alpha3(VI)$ -Kette (gestrichelte Kästchen) **induzierten Aufhebung der KVI-F-Wirkung** mit Senkung der Proliferationsrate und Kollagen I – Synthese über Senkung von TGF- β – und TIMP-Ausschüttung. Zeichen: \uparrow -Steigerung, \downarrow -Verringerung, weitere Zeichen siehe Legende. Modifiziert nach [38].

Generell gibt es zwei große Gruppen solcher Zielstrukturen bzw. Rezeptoren, mit denen Kollagene oder Kollagen-abgeleitete Peptide auf Zellen interagieren können: die (Kollagen)-Rezeptor Integrine und die Discoidin Domain Rezeptoren (DDR1 und 2) [98]. Integrine gehören zu den Zelladhäsionsrezeptoren und bestehen aus einer großen extrazellulären und einer kleineren intrazellulären Domäne. Sie sind zudem Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche eine nichtkovalente Bindung eingehen.[99]

In den beschriebenen Vorstudien unserer Arbeitsgruppe wurde bei Fibroblasten als KVI-Rezeptor ein Komplex der Integrine $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ zusammen mit dem Transmembran-Proteoglykan *nerve/glia antigen 2* (NG2) vermutet [51]. Ihr Zusammenspiel oder die Aggregation einer Rezeptorart [52] konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Bezüglich der KVI vermittelten DNS-Synthesesteigerung konnten für die Signaltransduktion die Proteine Paxillin, p130CAS, die mitogen aktivierte Proteinkinase erk2 und die *focal adhesion kinase* (FAK) nachgewiesen werden [51].

In jüngerer Zeit konnten für KVI, wie für die meisten bekannten Kollagene, die Integrin-Typen $\alpha 1\beta 1$ sowie $\alpha 10\beta 1$, aber auch $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 11\beta 1$ als Rezeptoren bestätigt werden [100]. Die Aminosäuresequenz GXX'GER (X ist dabei eine Variable und X' ggf. abweichend von dieser) dient dabei als Kollagen-Bindungsmotiv [98]. Als wichtige nachgeschaltete Signalmoleküle dieser Rezeptoren in HSZ wurden *P21-activated Kinase* (PAK)-Proteine und *Yes-associated Protein 1* (YAP-1) speziell für Integrin $\beta 1$, bevorzugt in Verbindung mit $\alpha 11$, identifiziert. Durch Ausschalten dieser Signalmoleküle/des Signalweges konnten profibrotische Eigenschaften, wie Proliferation, Migration und Kollagen-Synthese *in vitro* in HSZ gehemmt werden.[101] Neben dem Integrin $\alpha 11\beta 1$ scheint auch das Integrin αv zusammen mit verschiedenen β -Integrinen (1,3,5,6 und 8) an der Fibrose-Perpetuierung beteiligt zu sein. Über ein RGD-Motiv auf der N-terminalen Domäne aktiviert es latentes TGF- β (1+3), einen zentralen Wachstumsfaktor während der Fibrogenese. Umgekehrt kann dies aber durch einen synthetischen *small molecule RGD peptidomimetic* Antagonisten (CWHM 12) gehemmt werden.[102]

Welche Rezeptoren(komplexe) genau auf den HSZ durch die Einzelketten bzw. Peptide beeinflusst werden, bedarf weiterer Untersuchungen.

Interessanterweise verhielten sich sowohl das Kettengemisch als auch die isolierten alpha-Einzelketten von KVI-F gegenüber dem intakten KVI-F als kompetitive Antagonisten, wodurch der mitogene Effekt von KVI-F bei einer entsprechenden Co-Behandlung mit den Ketten gehemmt wurde. Signifikant war dieser Effekt bei einem fünffachen molaren Überschuss des Kettengemisches gegenüber KVI-F. Bei einem doppelten molaren Überschuss gegenüber KVI-F zeigte das isomolare Gemisch von $\alpha 1(VI)$ - und $\alpha 3(VI)$ -Kette einen deutlichen Trend zur Proliferationshemmung. Dieser Trend konnte bei den isolierten Einzelketten im doppelten molaren Überschuss zunächst nur für $\alpha 1(VI)$ gezeigt werden. Bei einem vierfachen molaren Überschuss gegenüber KVI-F jedoch auch für die $\alpha 3(VI)$ -Kette. Auch hier ergaben sich aufgrund der hohen Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede.

Solch divergente biologische Effekte von intakten Molekülen und entsprechenden Untereinheiten bzw. Einzelketten sind auch für andere Matrixmoleküle beschrieben. So z.B. für die nicht-kollagene C-terminale Domäne 1 (NC 1) von Kollagen XVIII, dem sog. Endostatin. Während Oligomere von Endostatin als Mitogen auf Endothel- und nicht-Endothelzellen wirken, können diese Effekte durch Endostatin-Monomere antagonisiert werden [103]. Ein weiteres Beispiel stellt ein heparinbindendes Fragment des Fibronektins dar, welches im Gegensatz zum intakten Fibronektin ein potenter Angiogenese-Inhibitor ist [104].

Die o.g. Beispiele gehören zu den sog. Matricryptinen und werden natürlicherweise aus der EZM durch proteolytische Spaltung generiert. Über parakrine Prozesse beeinflussen sie physiologische aber auch pathophysiologische Prozesse. Viele Matricryptine entstammen der NCI-Domäne von Kollagenen, so z.B. Arresten ($\alpha 1(IV)$ -Kette), Vastatin ($\alpha 1(VIII)$ -Kette) oder das o.g. Endostatin ($\alpha 1(XVIII)$ -Kette).[105] Eine weitere Möglichkeit zur Entstehung von Molekülen mit möglicher abweichender biologischer Aktivität als die Ursprungsmoleküle ist die posttranslationale Modifikation. Hierbei kommt es zu einer nicht-DNS-kodierten Modifikation in der Zusammensetzung von Molekülen, wie Citrullierung, proteolytische Degradation, Glykosylierung, Vernetzungen oder Alterung (Isomerisierung), wodurch sogenannte Neoepitope entstehen.[106] Diese veränderten Proteine können neben denen, welche durch Proteasen verändert wurden, Krankheits-spezifisch als Marker dienen und wurden z.B. für das HbA1c, CRP oder

Osteocalcin beschrieben [107]. Bei einer Organfibrose sollen z.B. aus KIII durch Isomerisierung und Citrullierung, als spezifische Marker nachweisbare Neoepitope entstehen [106]. Als charakteristischer Marker für die Frühphase der Leberfibrose wurde das Neoepitop CO6-MMP beschrieben, welches proteolytisch durch MMP-2 und MMP-9 aus $\alpha 1(\text{VI})$ entsteht [108].

KVI-F wirkt durch seine stimulierende Wirkung auf HSZ Fibrose-fördernd, während die Einzelketten diese Wirkung von KVI-F antagonisieren. Ein rationaler Schluss daraus wäre eine potentielle therapeutische Anwendung der Einzelketten bei Leberfibrose. Bevor ein solcher Ansatz aber näher untersucht werden kann, ist die Kenntnis der spezifischen Wirkstrukturen auf den isolierten Einzelketten von KVI-F von Interesse.

Angesichts der starken inhibitorischen Wirkung der $\alpha 1(\text{VI})$ - sowie der $\alpha 3(\text{VI})$ -Einzelkette sollten sich nachfolgende Studien auf Fragmente aus der Aminosäuresequenz dieser Ketten fokussieren. Infolge o.g. Vorversuche der Arbeitsgruppe standen uns, für erste dahingehende Experimente zunächst in Gruppen A-C unterteilte, überlappende synthetisierte Peptide aus der Aminosäuresequenz der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette zur Verfügung (Abb. 25). Diese wurden analog zu $\alpha 3(\text{VI})$ alleine und als Co-Behandlung zu KVI-F in Proliferationsassays eingesetzt. Nur die Peptide der C-Gruppe C3 und C4 zeigten signifikante proliferationsfördernde Effekte. Ähnlich wie die Einzelketten, erwiesen sich die drei $\alpha 3(\text{VI})$ -Peptide A3, A4 und C2 als wirksame Antagonisten gegenüber der mitogenen Wirkung von KVI-F.

Ausgehend von den Aminosäuresequenzen dieser Peptide als Leitstrukturen, lassen sich so ggf. stabilere, besser wirksame und wenig immunogene Peptidstrukturen synthetisieren. Interessanterweise stammen die drei antagonistisch wirksamen Peptide aus unterschiedlichen Regionen der $\alpha 3(\text{VI})$ -Aminosäuresequenz (Abb. 25), wobei nur das $\alpha 3(\text{VI})$ -Peptid C2 mit GKKGER eine typische Aminosäuresequenz für Integrin-bindende Kollagene aufweist [98]. Bei den anderen beiden Peptiden fehlt diese Sequenz. Andere $\alpha 3(\text{VI})$ -Peptide dagegen, die ein ähnliches Aminosäuremotiv aufweisen (A5+6: GEKGER; A2: GGPGER; B5-B6: GAPGER), zeigten keine inhibitorische Wirkung in unseren Versuchsreihen. Auch das Integrinbindungsmotiv RGD [109] findet sich zwar in der Aminosäuresequenz der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette, kommt jedoch nicht in den gegenüber KVI-F wirksamen Peptiden vor.



Abbildung 25: Aminosäuresequenz der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette und Zuordnung der Peptide. Grau unterlegt dargestellt sind die 10 Aminosäuren der zentralen Sequenz der Peptide, ohne Unterlegung die jeweiligen Überlappungssequenzen. Unterstrichen dargestellt die „GXX'GER“-, fett gedruckt die RGD- Integrinmotive. Zu beachten ist hier die deutliche Überlappung (Kasten) von C4 und C5 in Gegensatz zu den anderen Peptiden, welche jeweils nur um 10 Aminosäuren überlappen.

Dass mehrere, über die gesamte Aminosäuresequenz der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette verteilte Peptide ähnlich stark (inhibitorisch) wirken, lässt Vermutungen zu den Zielstrukturen, etwa kompetitiv gehemmte Rezeptoren, bzw. Rezeptorkomplexe, zu.

Die Interaktion von Integrinen mit ihren Liganden und die nachfolgend ausgelösten Effekte sind komplex. Im Sinne einer divalenten Kinetik bindet der Ligand zuerst die α -Untereinheit, welche eine höhere Affinität zum Liganden besitzt. Die β -Untereinheit stabilisiert daraufhin diesen Rezeptor-Ligandkomplex. Im Verlauf und abhängig von der Ligandenkonzentration, kommt es zur Gruppierung, dem o.g. Clustering, der aktivierten Rezeptoren an fokalen Adhäsionspunkten [110, 111]. Dabei können Integrine noch weitere Liganden binden. Denn je nach Substratverfügbarkeit sind Integrine zur Bindung vielfältigster Liganden in der Lage und werden deshalb auch

als promiskuitiv bezeichnet.[110] Möglicherweise verhindern die Peptide der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette ein Clustering der Integrinrezeptoren, bzw. verhindern eine, durch die dreidimensionale Struktur des KVI-F vermittelte, Signaltransduktion. Sie unterbinden so eventuell eine Änderung der Positionierung in der Zellmembran und damit die Ligand-Rezeptor-Affinität, wie dies zum Beispiel für die Bindung von synthetischen RGD-Peptiden an einen Integrin-Rezeptor auf Melanomzellen gezeigt wurde [111].

Die antagonistischen Effekte des Einzelkettengemisches sowie der isolierten Einzelketten von KVI-F waren nicht nur auf die mitogene KVI-F-Wirkung in CFSC beschränkt. Hervorzuheben, gerade in Hinblick auf eine potentielle therapeutische Nutzbarkeit, sind auch die inhibitorischen Effekte gegenüber der KVI-F-induzierten Expression von Fibrose-assoziierten Genen wie KI, α -SMA oder TGF- β . Hier bewirkte vor allem die $\alpha 3(\text{VI})$ - und, etwas schwächer, auch die $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette eine signifikante Absenkung der Genexpression. Gegenüber KI und TGF- β war auch $\alpha 1(\text{VI})$ wirksam.

TGF- β , welcher bei einer Leberschädigung hauptsächlich von Kupfferzellen, aber auch von HSZ sekretiert wird, ist, neben PDGF, als der stärkste Vermittler einer HSZ-Aktivierung und -Proliferation bekannt [35, 112]. TGF- β hat zudem einen bedeutenden Einfluss auf die Genexpression in HSZ. So stimuliert TGF- β die Synthese von Matrixproteinen wie KI, KIII sowie des HSZ-Aktivierungsmarkers α SMA. Zugleich hemmt TGF- β indirekt die Matrix-Degradation durch MMPs, indem es deren Inhibitor TIMP-1 hochreguliert.[11] Über Transmembran-Rezeptoren (TGF- β R1 und TGF- β R2) werden die intrazellulären Rezeptor-aktivierten SMADs (R-SMAD), SMAD 2/3 phosphoryliert und binden dann an SMAD 4 (Co-SMAD), welches im Zellkern die Transkription profibrogener Gene aktiviert [113]. In den letzten Jahren wurden viele Arbeiten publiziert, die TGF- β und den SMAD-Signaltransduktionsweg als therapeutischen Angriffspunkt bei Fibrose betrachten. So konnten Davoodian *et al.* zeigen, dass eine Hemmung des TGF- β / SMAD-Signalweges in HSZ durch SMAD4 *short hairpin RNA* (shRNA) zu verminderter Expression von profibrogener *microRNS* (miR) und zu erhöhter Expression von modulierender miR führte [114]. Zhou *et al.* wiesen für Casticin, ein Flavonoid von *Vitex rotundifolia*, eine Hemmung des Signalwegs über eine Reduktion der Phosphorylierung von SMAD 2/3 nach [115]. Ähnliches wurde für Scoparone gezeigt, einem, Auszug aus *Artemisia*

capillaris, welches die Menge von phosphorylierten SMAD3-Proteinen in HSZ deutlich absenken konnte [112].

Nachfolgende Experimente mit den KVI-F-Einzelketten bzw. den daraus generierten synthetischen Peptiden werden zeigen welche Signalwege dabei involviert sind. Denkbar wäre eine Interferenz mit dem TGF- β -Signalweg bzw. eine Blockade der Integrinrezeptoren mit nachfolgendem Ausfall der o.g. Signaltransduktionsmoleküle. Darüber hinaus werden weitere experimentelle Schritte eine Ausweitung der Versuchsreihen sein. Neben synthetischen Peptiden aus den Aminosäuresequenzen der anderen beiden KVI-Einzelketten sollen auch andere Zelltypen der Leber, wie Hepatozyten, hepatische Endothelzellen, Kupfferzellen und NK-Zellen sowie Fibroblasten anderer Gewebe eingesetzt werden. Neben Studien zu Konzentrationen, Toxizität und Kulturbedingungen werden die Experimente ggf. um geeignete 3D-Zellkultur- bzw. Organmodelle erweitert.

Als *read-out* sehr interessant wird auch die Untersuchung der Effekte der Peptide auf die Kollagenbindung und enzymatische Aktivität von MMPs sein, die in dieser Arbeit nicht untersucht worden ist, jedoch eine wichtige Rolle im Rahmen der Fibrogenese spielt. Eigene Vorstudien zeigten, dass das Kettengemisch bzw. $\alpha 2(VI)$ u.a. die Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 beeinflussen können, sowohl stimulierend, als auch hemmend.[95] Beide Enzyme sind an der Fibrogenese beteiligt. Hier ist zu erwarten, dass auch die synthetischen Peptide MMP-spezifische Wirkungen zeigen.

Wie bereits erwähnt, gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine wirksame klinische Therapieoption für die Leberfibrose und -zirrhose, abgesehen von der Lebertransplantation. Ansätze dafür gibt es jedoch reichlich. Im Vergleich zu den beschriebenen Forschungsansätzen (s. Einleitung), würde eine potentielle (therapeutische) Nutzung der hier beschriebenen KVI-F-Untereinheiten einige Vorteile bringen. So sind sie körpereigener Herkunft mit direktem Angriff an den HSZ, welche wie beschrieben der Hauptmotor einer Leberfibrose sind. Da Kollagen VI jedoch ubiquitär vorkommt [47], sind bei einem Antagonisieren auch systemische Nebenwirkungen zu erwarten.

Das vielversprechende Nilotinib zum Beispiel, welches als Tyrosinkinase-Antagonist in den PDGF- und TGF- β -Signalweg eingreift und darüber die Apoptose von HSZ

induzieren sowie deren Proliferation und Migration hemmen soll [69], wurde initial für die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie entwickelt und seit 2011 auch eingesetzt. Es hat jedoch mit u.a. Exanthemen, Veränderungen im Elektrolythaushalt und Thrombopenien ein weites Nebenwirkungsspektrum.[116]

Zur Vermeidung von systemischen Nebenwirkungen ist vor allem ein Angriff möglichst nur auf die Effektorzellen von Bedeutung. Bereits 2001 stellten Beljaars et al. einen HSZ-selektiven Carrier, ein mit Mannose-6-Phosphat modifiziertes Albumin (M₆P₂₈-HSA) vor. Sie konnten die HSZ-Selektivität in vivo sowie in vitro eine Internalisation des Carriers in aktivierten HSZ nachweisen und damit einen Ansatz zur intrazellulären medikamentösen Therapie aufzeigen.[117] Die Selektivität der Kollagen VI-Fragmente gegenüber HSZ sowie die Wirksamkeit in vivo werden ebenfalls Gegenstand zukünftiger Versuchsreihen sein.

Literaturverzeichnis:

- 1 Sterbefälle, Sterbeziffern. Thematische Recherche: Gesundheitliche Lage - Sterblichkeit - Mortalität - Todesursachen; Dokumentart: Tabelle. (Primärquelle: Statistisches Bundesamt [Destatis], Zweigstelle Bonn, Todesursachenstatistik), 2015. (Accessed November 12, 2017, at www.gbe-bund.de.)
- 2 Rentenzugänge wegen verminderter Erwebsfähigkeit. Thematische Recherche: Rahmenbedingungen - Rentenversicherung - Renten wegen Erwerbsminderung - Renten wegen verminderter Erwerbsfähigkeit, Zugänge ab 2010; Dokumentart: Tabelle. Statistik des Rentenzugangs; Deutsche Rentenversicherung Bund, 2015. (Accessed November 17, 2017, at www.gbe-bund.de.)
- 3 Krankheitskosten in Mio. für Deutschland. Thematische Recherche: Ausgaben, Kosten, Finanzierung - Kosten - Kosten allgemein/ sonstiges; Dokumentart: Tabelle. (Primärquelle: Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn; Krankheitskostenrechnung), 2015. (Accessed November 12, 2017, at www.gbe-bund.de.)
- 4 Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. *Homotransplantation of the Liver in Humans*. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 117. 1963:659-76.
- 5 Gutgemann A, Schriefers KH, Esser G, Lie TS, Paquet KJ, Kaufer C. *A case of homologous liver transplantation*. *German medical monthly*. 14(11). 1969:525-8.
- 6 Organtransplantation; Lebertransplantation. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2016. Deutschland: Frankfurt am Main 2016:82-3.
- 7 Opelz G. *President's Address. The Transplantation Society-- Deutschland*, Berlin, 2012. *Transplantation*. 95(1). 2013:4-7.
- 8 Cohen-Naftaly M, Friedman SL. *Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease*. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 4(6). 2011:391-417.
- 9 Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann H-J, Kühnel W, Schiebler TH, Schmidt W, Steininger B, Winckler J, van der Zypen E, Zilles K. *Baucheingeweide: Leber*. In: Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K, eds. *Anatomie*. 8th ed. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1999:581-88.
- 10 Lalor PF, Adams DH. *The liver: a model of organ-specific lymphocyte recruitment*. *Expert reviews in molecular medicine*. 4(2). 2002:1-16.
- 11 Bataller R, Brenner DA. *Liver fibrosis*. *J Clin Invest*. 115(2). 2005:209-18.
- 12 Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. *Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story*. *Gut*. 64(5). 2015:830-41.

- 13 Gressner AM, Yagmur E. Aspekte der Pathogenese, Therapie und Diagnostik der Leberfibrose. *Laboratoriums Medizin*. 27(11-12). 2003:423-30.
- 14 Denk H. Leberfibrose; Leberzirrhose. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, eds. *Pathologie*. 2th ed. München, Jena, Deutschland: Urban & Fischer Verlag, 2001:727-28.
- 15 Schirmacher P, Fleig WE, Tannapfel A, Langner C, Dries V, Terracciano L, Denk H, Dienes HP, *German Society for Dig. Metab. D. [Bioptic diagnosis of chronic hepatitis. Results of an evidence-based consensus conference of the German Society of Pathology, of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases and of Compensated Hepatitis (HepNet)]*. *Der Pathologe*. 25(5). 2004:337-48.
- 16 Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000. Thematische Recherche: Krankheiten/ Gesundheitsprobleme - Krankheiten allgemein - Diagnosedaten der Krankenhäuser; Dokumentart: Tabelle. (Primärquelle: Krankenhausstatistik - Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern, Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn), 2015. (Accessed November 17, 2017, at www.gbe-bund.de.)
- 17 Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, Washington MK, Germanidis G, Flaherty JF, Aguilar Schall R, Bornstein JD, Kitrinis KM, Subramanian GM, McHutchison JG, Heathcote EJ. *Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study*. *Lancet* (London, England). 381(9865). 2013:468-75.
- 18 D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, Ronchi G, Donato MF, Paradis V, Colombo M, Bedossa P. *A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis*. *Hepatology*. 56(2). 2012:532-43.
- 19 Gerok W. Leberzirrhose. In: Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H, eds. *Die Innere Medizin*. 10th ed. Stuttgart, Deutschland: F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 2000:703-14.
- 20 Rimassa L, Santoro A. *Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: the SHARP trial*. *Expert review of anticancer therapy*. 9(6). 2009:739-45.
- 21 Ghiassi-Nejad Z, Friedman SL. *Advances in antifibrotic therapy*. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2(6). 2008:803-16.
- 22 Dannappel M, Vlantis K, Kumari S, Polykratis A, Kim C, Wachsmuth L, Eftychi C, Lin J, Corona T, Hermance N, Zelic M, Kirsch P, Basic M, Bleich A, Kelliher M, Pasparakis M. *RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis*. *Nature*. 513(7516). 2014:90-4.
- 23 Pinzani M, Macias-Barragan J. *Update on the pathophysiology of liver fibrosis*. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 4(4). 2010:459-72.
- 24 Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. *TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis*. *Nat Med*. 13(11). 2007:1324-32.

- 25 Liu C, Chen X, Yang L, Kisseleva T, Brenner DA, Seki E. *Transcriptional repression of the transforming growth factor beta (TGF-beta) Pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) by Nuclear Factor kappaB (NF-kappaB) p50 enhances TGF-beta signaling in hepatic stellate cells.* J Biol Chem. 289(10). 2014:7082-91.
- 26 Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease.* Liver Int. 26(10). 2006:1175-86.
- 27 Tacke F. *Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo.* Fibrogenesis & tissue repair. 5(Suppl 1). 2012:S27.
- 28 Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. *Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury.* Gut. 61(3). 2012:416-26.
- 29 Marra F, Tacke F. *Roles for chemokines in liver disease.* Gastroenterology. 147(3). 2014:577-94.e1.
- 30 Tacke F, Zimmermann HW. *Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis.* Journal of Hepatology. 60(5). 2014:1090-6.
- 31 Friedman SL. *Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver.* Physiological reviews. 88(1). 2008:125-72.
- 32 El Taghdouini A, Najimi M, Sancho-Bru P, Sokal E, van Grunsven LA. *In vitro reversion of activated primary human hepatic stellate cells.* Fibrogenesis & tissue repair. 8. 2015:14.
- 33 Rehermann B, Bahr MJ, Manns MP. Pathophysiologie der Entzündung und der Fibrose (Entzündliche Lebererkrankungen). In: Adler G, Beglinger C, Manns MP, Müller-Lissner S, Schmiegel W, eds. Klinische Gastroenterologie und Stoffwechsel. 1th ed. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000:399-401.
- 34 Li D, He L, Guo H, Chen H, Shan H. *Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging.* EJNMMI research. 5(1). 2015:71.
- 35 Gressner AM, Weiskirchen R. *Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets.* Journal of cellular and molecular medicine. 10(1). 2006:76-99.
- 36 Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. *In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation.* Hepatology. 29(6). 1999:1760-7.
- 37 Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C. *PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury.* Lab Invest. 80(5). 2000:697-707.
- 38 Schuppan D. *Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies.* Clinics and research in hepatology and gastroenterology. 39 Suppl 1. 2015:S51-9.

- 39 Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. *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). 2006:435-52.
- 40 Oakley F, Trim N, Constandinou CM, Ye W, Gray AM, Frantz G, Hillan K, Kendall T, Benyon RC, Mann DA, Iredale JP. *Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis*. *Am J Pathol*. 163(5). 2003:1849-58.
- 41 Ayad S. *The Extracellular Matrix (Facts Book)*. In: Ayad S, Boot-Handford R, Humphries M, Kadler K, Shuttleworth A, eds. *FactsBook Series*. 2th ed. *Great Britain: Academic Press - Harcourt Brace & Company*, 1998:11, 69-75.
- 42 Schuppan D, Ruhlmann T, Hahn EG. *Radioimmunoassay for human type VI collagen and its application to tissue and body fluids*. *Anal Biochem*. 149(1). 1985:238-47.
- 43 Shahin M, Schuppan D, Waldherr R, Risteli J, Risteli L, Savolainen ER, Oesterling C, Abdel Rahman HM, el Sahly AM, Abdel Razek SM, et al. *Serum procollagen peptides and collagen type VI for the assessment of activity and degree of hepatic fibrosis in schistosomiasis and alcoholic liver disease*. *Hepatology*. 15(4). 1992:637-44.
- 44 Arthur MJ. *Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279(2). 2000:G245-9.
- 45 Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. *Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies*. *J Hepatol*. 46(5). 2007:955-75.
- 46 Hulmes DJS. *Collagen Diversity, Synthesis and Assembly*. In: *Fratzl P, editor. Collagen (Structure and Mechanics)*. 1th ed. USA: Springer-Verlag New York, 2008:16.
- 47 Birk DE, Bruckner P. *Collagen Suprastructures*. In: Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK, eds. *Topics in Current Chemistry: Collagen (Primer in Structure, Processing and Assembly)*. 247. 247th ed. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005:187-189.
- 48 Knupp C, Squire JM. *Molecular packing in network-forming collagens*. *Advances in protein chemistry*. 70. 2005:375-403.
- 49 Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P. *Collagen VI at a glance*. *J Cell Sci*. 128(19). 2015:3525-31.
- 50 Luther DJ, Thodeti CK, Shamhart PE, Adapala RK, Hodnichak C, Weihrauch D, Bonaldo P, Chilian WM, Meszaros JG. *Absence of type VI collagen paradoxically improves cardiac function, structure, and remodeling after myocardial infarction*. *Circulation research*. 110(6). 2012:851-6.
- 51 Ruhl M, Johannsen M, Atkinson J, Manski D, Sahin E, Somasundaram R, Riecken EO, Schuppan D. *Soluble collagen VI induces tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase and activates the MAP kinase erk2 in fibroblasts*. *Exp Cell Res*. 250(2). 1999:548-57.

- 52 Atkinson JC, Ruhl M, Becker J, Ackermann R, Schuppan D. *Collagen VI regulates normal and transformed mesenchymal cell proliferation in vitro*. Exp Cell Res. 228(2). 1996:283-91.
- 53 Rühl M, Sahin E, Johannsen M, Somasundaram R, Manski D, Riecken EO, Schuppan D. *Soluble Collagen VI Drives Serum-starved Fibroblasts through S Phase and Prevents Apoptosis via Down-regulation of Bax*. Journal of Biological Chemistry. 274(48). 1999:34361-8.
- 54 Baldock C, Sherratt MJ, Shuttleworth CA, Kielty CM. *The Supramolecular Organization of Collagen VI Microfibrils*. Journal of Molecular Biology. 330(2). 2003:297-307.
- 55 Chu ML, Mann K, Deutzmann R, Pribula-Conway D, Hsu-Chen CC, Bernard MP, Timpl R. *Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones*. Eur J Biochem. 168(2). 1987:309-17.
- 56 Fitzgerald J, Rich C, Zhou FH, Hansen U. *Three novel collagen VI chains, alpha4(VI), alpha5(VI), and alpha6(VI)*. J Biol Chem. 283(29). 2008:20170-80.
- 57 Gara SK, Grumati P, Urciuolo A, Bonaldo P, Kobbe B, Koch M, Paulsson M, Wagener R. *Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain*. J Biol Chem. 283(16). 2008:10658-70.
- 58 Sherratt MJ, Holmes DF, Shuttleworth CA, Kielty CM. *Substrate-dependent morphology of supramolecular assemblies: fibrillin and type-VI collagen microfibrils*. Biophys J. 86(5). 2004:3211-22.
- 59 Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. *Hepatic fibrosis: Concept to treatment*. J Hepatol. 62(1 Suppl). 2015:S15-24.
- 60 Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR, Nash CRN. *Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis*. N Engl J Med. 362(18). 2010:1675-85.
- 61 Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, Abrams SH, Scheimann AO, Sanyal AJ, Chalasani N, Tonascia J, Unalp A, Clark JM, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR, *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research N. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial*. Jama. 305(16). 2011:1659-68.
- 62 Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, Dominguez M, Moreno M, Forns X, Bruguera M, Arroyo V, Brenner DA, Gines P. *Effects of losartan on hepatic expression of nonphagocytic NADPH oxidase and fibrogenic genes in patients with chronic hepatitis C*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 297(4). 2009:G726-34.
- 63 Ishibashi H, Komori A, Shimoda S, Gershwin ME. *Guidelines for therapy of autoimmune liver disease*. Semin Liver Dis. 27(2). 2007:214-26.

- 64 Boetticher NC, Peine CJ, Kwo P, Abrams GA, Patel T, Aqel B, Boardman L, Gores GJ, Harmsen WS, McClain CJ, Kamath PS, Shah VH. *A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of etanercept in the treatment of alcoholic hepatitis*. *Gastroenterology*. 135(6). 2008:1953-60.
- 65 Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. *Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial*. *Gastroenterology*. 119(6). 2000:1637-48.
- 66 Lebrec D, Thabut D, Oberti F, Perarnau JM, Condat B, Barraud H, Saliba F, Carbonell N, Renard P, Ramond MJ, Moreau R, Poynard T. *Pentoxifylline does not decrease short-term mortality but does reduce complications in patients with advanced cirrhosis*. *Gastroenterology*. 138(5). 2010:1755-62.
- 67 Ruddell RG, Oakley F, Hussain Z, Yeung I, Bryan-Lluka LJ, Ramm GA, Mann DA. *A role for serotonin (5-HT) in hepatic stellate cell function and liver fibrosis*. *Am J Pathol*. 169(3). 2006:861-76.
- 68 Moreno M, Chaves JF, Sancho-Bru P, Ramalho F, Ramalho LN, Mansego ML, Ivorra C, Dominguez M, Conde L, Millan C, Mari M, Colmenero J, Lozano JJ, Jares P, Vidal J, Fornis X, Arroyo V, Caballeria J, Gines P, Bataller R. *Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans*. *Hepatology*. 51(3). 2010:974-85.
- 69 Liu Y, Wang Z, Kwong SQ, Lui ELH, Friedman SL, Li FR, Lam RWC, Zhang GC, Zhang H, Ye T. *Inhibition of PDGF, TGF-beta, and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib*. *J Hepatol*. 55(3). 2011:612-25.
- 70 Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, Hoofnagle JH. *Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis*. *Hepatology*. 51(1). 2010:201-9.
- 71 O'Connell MA, Rushworth SA. *Curcumin: potential for hepatic fibrosis therapy?* *British journal of pharmacology*. 153(3). 2008:403-5.
- 72 Siller-Lopez F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, Garcia J, Vera J, Galvez J, Hernandez I, Ramos M, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. *Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis*. *Gastroenterology*. 126(4). 2004:1122-33; discussion 949.
- 73 Ohayon O, Mawasi N, Pevzner A, Tryvitz A, Gildor T, Pines M, Rojkind M, Paizi M, Spira G. *Halofuginone upregulates the expression of heparanase in thioacetamide-induced liver fibrosis in rats*. *Lab Invest*. 88(6). 2008:627-33.
- 74 Sugino H, Kumagai N, Watanabe S, Toda K, Takeuchi O, Tsunematsu S, Morinaga S, Tsuchimoto K. *Polaprezinc attenuates liver fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis*. *J Gastroenterol Hepatol*. 23(12). 2008:1909-16.

- 75 Oakley F, Teoh V, Ching ASG, Bataller R, Colmenero J, Jonsson JR, Eliopoulos AG, Watson MR, Manas D, Mann DA. *Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis*. *Gastroenterology*. 136(7). 2009:2334-44.e1.
- 76 Jeong WI, Park O, Radaeva S, Gao B. *STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity*. *Hepatology*. 44(6). 2006:1441-51.
- 77 Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. *Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy*. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 24(10). 2006:2292-8.
- 78 Somasundaram R, Schuppan D. *Type I, II, III, IV, V, and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB, and AB)*. *J Biol Chem*. 271(43). 1996:26884-91.
- 79 Takasaki S, Fujiwara S, Shinkai H, Ooshima A. *Human type VI collagen: purification from human subcutaneous fat tissue and an immunohistochemical study of morphea and systemic sclerosis*. *The Journal of dermatology*. 22(7). 1995:480-5.
- 80 Greenwel P, Schwartz M, Rosas M, Peyrol S, Grimaud JA, Rojkind M. *Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl4-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6*. *Lab Invest*. 65(6). 1991:644-53.
- 81 Gstraunthaler G, Lindl T. Bestimmung allgemeiner Wachstumsparameter. In: Gstraunthaler G, Lindl T, eds. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7th ed. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013:122-27.
- 82 Mazur P. *Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities*. *Origins of life*. 10(2). 1980:137-59.
- 83 Karow AM, Jr., Webb WR. *Toxicity of various solute moderators used in hypothermia*. *Cryobiology*. 1(4). 1965:270-3.
- 84 Banfalvi G. *Overview of cell synchronization*. *Methods Mol Biol*. 761. 2011:1-23.
- 85 Gstraunthaler G, Lindl T. Zellsynchronisation. In: Gstraunthaler G, Lindl T, eds. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7th ed. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013:209-223.
- 86 Bangsow T, Male DA. Polymerase-Kettenreaktion. In: Gassen HG, Schimpf G, eds. *Gentechnische Methoden*. 2th ed. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1999:333-46.
- 87 Becker-Andre M, Hahlbrock K. *Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATY)*. *Nucleic acids research*. 17(22). 1989:9437-46.

- 88 Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227(5259). 1970:680-5.
- 89 Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. Electrophoresis. 9(6). 1988:255-62.
- 90 Frey A. Protein-Blotting. In: Gassen HG, Schrimpf G, eds. *Gentechnische Methoden*. 2th ed. Heidelberg; Berlin; Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1999:199-224.
- 91 Westermeier R, Görg A. Elektrophoretische Verfahren. In: Lottspeich F, Zorbas H, eds. *Bioanalytik*. 1th ed. Heidelberg, Berlin; Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1998:249.
- 92 Linnemann M, Kühl M, Holletz T, Bredemann S, Bockius U. Aminosäuren, Peptide und Proteine: Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. In: Linnemann M, Kühl M, eds. *Biochemie für Mediziner*. 4th ed. Braunschweig/Wiesbaden, Deutschland: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH 1995:87.
- 93 Petrides PE. Aminosäuren und Polyaminosäuren: Tertiärstruktur/ De- und Renaturierung von Proteinen. In: Löffler G, Petrides PE, eds. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6th ed. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998:63-73.
- 94 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J, Hunt T. *Proteins: The shape and structure of Proteins: Proteins Fold into a Conformation of Lowest Energy*. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., eds. *Molecular Biology of The Cell*. 5th ed. USA and UK: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; New York Abingdon, 2008:130-1.
- 95 Freise C, Erben U, Muche M, Farndale R, Zeitz M, Somasundaram R, Ruehl M. *The alpha 2 chain of collagen type VI sequesters latent proforms of matrix-metalloproteinases and modulates their activation and activity*. Matrix Biol. 28(8). 2009:480-9.
- 96 Löffler G. Proteinbiosynthese, Proteinmodifizierung und Proteinabbau: Das Problem der Raumstruktur von Proteinen. In: Löffler G, Petrides PE, eds. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6th ed. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998:277-79.
- 97 Ruehl M, Muche M, Freise C, Erben U, Neumann U, Schuppan D, Popov Y, Dieterich W, Zeitz M, Farndale RW, Somasundaram R. *Hydroxyproline-containing collagen analogs trigger the release and activation of collagen-sequestered proMMP-2 by competition with prodomain-derived peptide P33-42*. Fibrogenesis & tissue repair. 4(1). 2011:1.
- 98 Heino J, Huhtala M, Kapyla J, Johnson MS. *Evolution of collagen-based adhesion systems*. Int J Biochem Cell Biol. 41(2). 2009:341-8.
- 99 Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. *Integrin ligands at a glance*. J Cell Sci. 119(Pt 19). 2006:3901-3.

- 100 Heino J. *The collagen family members as cell adhesion proteins*. *Bioessays*. 29(10). 2007:1001-10.
- 101 Martin K, Pritchett J, Llewellyn J, Mullan AF, Athwal VS, Dobie R, Harvey E, Zeef L, Farrow S, Streuli C, Henderson NC, Friedman SL, Hanley NA, Piper Hanley K. *PAK proteins and YAP-1 signalling downstream of integrin beta-1 in myofibroblasts promote liver fibrosis*. *Nat Commun*. 7. 2016:12502.
- 102 Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, Pellicoro A, Raschperger E, Betsholtz C, Ruminiski PG, Griggs DW, Prinsen MJ, Maher JJ, Iredale JP, Lacy-Hulbert A, Adams RH, Sheppard D. *Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs*. *Nature Medicine*. 19(12). 2013:1617-24.
- 103 Kuo CJ, LaMontagne KR, Jr., Garcia-Cardena G, Ackley BD, Kalman D, Park S, Christofferson R, Kamihara J, Ding YH, Lo KM, Gillies S, Folkman J, Mulligan RC, Javaherian K. *Oligomerization-dependent regulation of motility and morphogenesis by the collagen XVIII NC1/endostatin domain*. *J Cell Biol*. 152(6). 2001:1233-46.
- 104 Homandberg GA, Kramer-Bjerke J, Grant D, Christianson G, Eisenstein R. *Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth: structure-function correlations*. *Biochim Biophys Acta*. 874(1). 1986:61-71.
- 105 Ricard-Blum S. *The collagen family*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(1). 2011:a004978.
- 106 Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Woodworth T, Vassiliadis E, Bay-Jensen AC. *Novel combinations of Post-Translational Modification (PTM) neo-epitopes provide tissue-specific biochemical markers--are they the cause or the consequence of the disease?* *Clinical biochemistry*. 43(10-11). 2010:793-804.
- 107 Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, Henriksen K, Genovese F, Bay-Jensen AC, Smith V, Adamkewicz JI, Christiansen C, Leeming DJ. *Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases. Possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure*. *Assay Drug Dev Technol*. 11(2). 2013:70-92.
- 108 Veidal SS, Karsdal MA, Vassiliadis E, Nawrocki A, Larsen MR, Nguyen QH, Hagglund P, Luo Y, Zheng Q, Vainer B, Leeming DJ. *MMP mediated degradation of type VI collagen is highly associated with liver fibrosis--identification and validation of a novel biochemical marker assay*. *PloS one*. 6(9). 2011:e24753.
- 109 Huang J, Grater SV, Corbellini F, Rinck S, Bock E, Kemkemer R, Kessler H, Ding J, Spatz JP. *Impact of order and disorder in RGD nanopatterns on cell adhesion*. *Nano Lett*. 9(3). 2009:1111-6.
- 110 Hudson SV, Dolin CE, Poole LG, Massey VL, Wilkey D, Beier JI, Merchant ML, Frieboes HB, Arteel GE. *Modeling the Kinetics of Integrin Receptor Binding to Hepatic Extracellular Matrix Proteins*. *Sci Rep*. 7(1). 2017:12444.

- 111 Guo Z, He B, Jin H, Zhang H, Dai W, Zhang L, Zhang H, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q. *Targeting efficiency of RGD-modified nanocarriers with different ligand intervals in response to integrin alphavbeta3 clustering*. *Biomaterials*. 35(23). 2014:6106-17.
- 112 Liu X, Zhao X. *Scoparone attenuates hepatic stellate cell activation through inhibiting TGF-beta/Smad signaling pathway*. *Biomed Pharmacother*. 93. 2017:57-61.
- 113 Fabregat I, Moreno-Caceres J, Sanchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, Ten Dijke P, Consortium I-L. *TGF-beta signalling and liver disease*. *FEBS J*. 283(12). 2016:2219-32.
- 114 Davoodian P, Ravanshad M, Hosseini SY, Khanizadeh S, Almasian M, Nejati Zadeh A, Esmaili Lashgarian H. *Effect of TGF-beta/smad signaling pathway blocking on expression profiles of miR-335, miR-150, miR-194, miR-27a, and miR-199a of hepatic stellate cells (HSCs)*. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. 10(2). 2017:112-7.
- 115 Zhou L, Dong X, Wang L, Shan L, Li T, Xu W, Ding Y, Lai M, Lin X, Dai M, Bai X, Jia C, Zheng H. *Casticin attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by blocking TGF-beta/Smad signaling pathway*. *Oncotarget*. 8(34). 2017:56267-80.
- 116 Fath R. Chronische myeloische Leukämie: Nilotinib für die Primärtherapie. *Dtsch Arztebl International*. 108(10). 2011:540.
- 117 Beljaars L, Olinga P, Molema G, de Bleser P, Geerts A, Groothuis GM, Meijer DK, Poelstra K. *Characteristics of the hepatic stellate cell-selective carrier mannose 6-phosphate modified albumin (M6P(28)-HSA)*. *Liver*. 21(5). 2001:320-8.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jessica Cziomer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‘Inhibition fibrotischer Prozesse am Beispiel der Leberfibrose mittels Untereinheiten des Kollagen VI-Fragmentes an hepatischen Sternzellen im Zellkulturmodell mit CFSC’ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 6. April 2019

Jessica Cziomer

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeitern der ehemaligen Arbeitsgruppe Hepatologie am Universitätsklinikum Benjamin-Franklin für die stets freundliche und konstruktive Zusammenarbeit, die Einarbeitung, Unterstützung und Denkanstöße. Ich danke Herrn Professor Dr. Rajan Somasundaram und Herrn Dr. Martin Rühl für das Angebot dieser Arbeit im Rahmen des Benjamin Franklin Kollegs sowie für die Überlassung des Themas und das stete Interesse an dessen Fortgang mit zahlreichen zielorientierten Diskussionen und Planungen. Vielen Dank an meinen Sonnenschein für die moralische Unterstützung, an meine liebe Freundin Stefanie Wendlandt für ihre Unterstützung bei der Paperbeschaffung und statistischen Auswertung, sowie stetige Motivation, an Dipl.-Bibl. Denise Page für ihre tatkräftige Unterstützung beim Kartieren der Quellen und an meine Mitstreiterin und beste Studienfreundin Jana Gasse für all die gemeinsamen Nächte und Wochenenden in der Arbeitsgruppe, die ohne sie nur halb so produktiv und lustig gewesen wären.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Ulrike Erben ohne deren, vor allem freundschaftlicher, mentaler aber auch grundlegend wissenschaftlicher Mentorenschaft in den Anfängen der Niederschrift dieser Arbeit mit langen konstruktiven Abenden, abseits des Dienstgeschäftes, diese Arbeit wohl nie geschrieben worden wäre.

Und ebenso mein besonderer Dank an meinen Doktorvater PD Dr. Christian Freise, der mir schon während der experimentellen Phase mit seinem chemischen und wissenschaftlichen Sachverstand zur Seite stand und es auf eine wunderbare Art geschafft hat, meine Motivation aufrecht zu halten und mit konstruktivsten Kritiken diese Arbeit zu einem Gesamtwerk werden lassen.

Abschließend danke ich all den starken Frauen in meinem Leben, die meinen Wissensdrang und meine Neugier daran wie Leben eigentlich funktioniert gefördert und mich als Person geprägt haben. Besonders danke ich meiner Biologie- und Chemieoberstufenlehrerin Gabriele Plischke, welche mein erstes wissenschaftliches Projekt ermöglichte. Meiner Omi Martha Cziomer, weil sie mich immer bestärkt und an mich geglaubt hatte. Du bist unvergessen. Und meiner Mutti Dipl.-Ing. Monika Cziomer, weil sie mich zu dem zielstrebigen und wissensdurstigen Menschen erzogen hat, der ich heute bin.