Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie

Die Rolle der Cholangiozyten bei der Aufnahme von UV-bestrahlten KMCH- und HepG2-Zellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Marcel Touma
aus Osnabrück
2021

DuEPublico
Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN
Offen im Denken

ub | universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/76612
URN: urn:nbn:de:hbz:465-20220915-101002-3

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jan Buer

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Ali Canbay

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Ph. Hilgard

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juni 2022

35th GASL Annual Meeting 2019 in Heidelberg, Deutschland
Cholangiozyten haben einen phagozytische Funktion mit erhöhter metabolischer Aktivität und Anstieg der Proliferationsmarker
Touma Marcel, Wandt Niklas, Schlattjan Martin, Kücükoglu Özlem, Sami Jafoui, Sowa Jan-Peter, Canbay Ali

33th GASL Annual Meeting 2017 in Essen, Deutschland
Zelltod von Cholangiozyten und Hepatozyten führen zu verstärkter Cholangiozyten-Proliferation
Touma Marcel, Wandt Niklas, Schlattjan Martin, Kücükoglu Özlem, Sami Jafoui, Sowa Jan-Peter, Canbay Ali

15. Tag der Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen 2016 in Essen, Deutschland
Zelltod von Cholangiozyten und Hepatozyten führen zu verstärkter Cholangiozyten-Proliferation
Touma Marcel, Wandt Niklas, Schlattjan Martin, Kücükoglu Özlem, Sami Jafoui, Sowa Jan-Peter, Canbay Ali

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 7

1.1 SEKUNDÄR SKLEROSIERENDE CHOLANGITIS 7

1.1.1 Diagnostik 7

1.1.2 Klinik und Verlauf 9

1.1.3 Therapie 12

1.1.4 Molekularbiologische und pathophysiologische Vorgänge 13

1.2 ZELLTOD 15

1.2.1 Apoptose 16

1.2.2 Nekrose 18

1.2.3 Autophagie 18

1.2.4 Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Apoptose, Autophagie und Nekrose 19

1.3 PHAGOZYTOSE 21

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELE 24

3 MATERIAL UND METHODEN 25

3.1 MATERIAL 25

3.1.1 Chemikalien 25

3.1.2 Geräte 25

3.1.3 Kits 26

3.1.4 Medien und Zusätze 27

3.1.5 Puffer und Lösungen 27

3.1.6 Verbrauchsmaterialien 28

3.1.7 Antikörper 29

3.1.8 Oligonukleotide 30

3.1.9 Software 31

3.2 METHODEN 32

3.3 ZELLKULTUR MODELLE 32

3.3.1 Zellkultivierung 32

3.3.2 UV-Bestrahlung 33

3.3.3 Auszählung 33

3.3.4 Behandlung 34

3.4 MTT-VIABILITÄTSTEST 34

3.5 PROTEINE 35

3.5.1 Hintergrundinformation 35

3.5.2 Isolation von Proteinen aus Zellkultur 35

3.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung ... 35
3.5.4 Proteinauftrennung im SDS-Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese ... 36
3.5.5 Western-Blot ... 37
3.6 Scratch assay ... 37
3.7 Elisa M65/M30 ... 38
3.7.1 Bestimmung der Apoptoserate mittels M30-Elisa ... 38
3.7.2 Bestimmung der Gesamtzelltodrate mittels M65-Elisa ... 38
3.8 Immunhistochemie ... 39
3.8.1 DAPI-Färbung ... 39
3.8.2 Annexin V und Propidiumiodidfärbung ... 40
3.8.3 KI-67-Immunzytochemie ... 40
3.8.4 PKH67 und PKH26 Färbung ... 40
3.9 Durchflusszytometrie ... 41
3.10 Live-Cell Imaging ... 41
3.11 Isolation und Detektion von Nukleinsäuren ... 41
3.11.1 RNA-Isolation aus kultivierten KMCH-Zellen ... 41
3.11.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ... 42
3.11.3 Reverse Transkription ... 42
3.12 Quantitative Realtime PCR (Polymerase chain reaction) ... 42
3.13 Statistik ... 44
4 ERGEBNISSE ... 45
4.1 Induktion von Apoptose und Nekrose in Zelllinien ... 45
4.1.1 KMCH- und HepG2-Zellen zeigen nach UV-Bestrahlung typische morphologische Veränderungen ... 45
4.1.2 UV-Bestrahlung führt zu unterschiedlichen Zelltodprozessen bei KMCH- und HepG2-Zellen ... 45
4.2 KMCH-Zellen binden UV-bestrahlte KMCH- und HepG2-Zellen ... 48
4.2.1 Live-Cell Imaging ... 49
4.3 KMCH-Zellen scheinen anti-apoptotisch auf Phagozytose von UV-bestrahlten KMCH-Zellen und apoptotisch auf Phagozytose von UV-bestrahlten HepG2-Zellen zu reagieren ... 53
4.4 KMCH-Zellen zeigen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH- und HepG2-Zellen eine erhöhte metabolische Zellaktivität ... 55
4.5 UV-bestrahlte KMCH- und HepG2-Zellen könnten einen Proliferationsreiz für KMCH-Zellen darstellen ... 59
4.5.1 Erhöhte Expression von KI-67 in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen ... 59
4.5.2 Die Behandlung von KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten KMCH- und HepG2-Zellen haben keinen Einfluss auf die PCNA-Expression und Zellmigration ... 63

4.6 KMCH-Zellen zeigen unterschiedliche Genexpression bei Phagozytose von UV-bestrahlten KMCH-Zellen und HepG2-Zellen 65
4.6.1 Erhöhte Genexpression von SOX9 in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen 65
4.6.2 Erhöhte Genexpression von α-SMA in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen 67
5 DISKUSSION 69
5.1 KMCH- und HepG2-Zellen zeigen unterschiedliche Resistenzen gegenüber UV-Strahlung 70
5.2 Bindung und Aufnahme UV-bestrahlter KMCH- und HepG2-Zellen in KMCH-Zellen 71
5.3 KMCH-Zellen zeigen eine erhöhte metabolische Aktivität mit biliärer Reaktion nach Phagozytose von UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen 74
5.4 KMCH-Zellen weisen Transdifferenzierungszeichen nach Phagozytose von UV bestrahlten HepG2-Zellen und UV-bestrahlten KMCH-Zellen auf 76
6 ZUSAMMENFASSUNG 80
7 LITERATURVERZEICHNIS 81
8 ANHANG 87
8.1 Abbildungsverzeichnis 87
8.2 Tabellenverzeichnis 88
8.3 Abkürzungsverzeichnis 89
8.4 Live-Cell-Imaging 92
8.5 Danksagung 92
8.6 Lebenslauf 93

1 Einleitung

1.1 Sekundär sklerosierende Cholangitis

Die sklerosierende Cholangitis (SC) betrifft die intra- und extrahepatischen Gallengänge und kann durch deren Verschluss zum Gallenaufstau, mit der Folge einer biliären Zirrhose und im Falle einer Progression sogar zum akuten Leberversagen, führen. Die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC), welche idiopathisch oder in Verbindung mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entsteht, ist von der seltenen sekundären sklerosierenden Cholangitis (SSC) zu unterscheiden (Weiss et al., 2016). Die Ursachen sind vielfältig und bedingt durch infektiöse, ischämische, toxische, immunologische und chronisch obstruktive Ereignisse. In vielen Fällen bleibt die Genese jedoch ungeklärt. Eine besondere Form der SSC ist die *secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients* (SC-CIP), auf die im Rahmen dieser Arbeit besonders eingegangen wird. Charakteristisch ist eine zuvor normale Leberfunktion, die sich durch ein lebensbedrohliches Ereignis wie ein Polytrauma und damit verbundenen langen Intensivaufenthalt (ICU) auf unerklärliche Weise verschlechtert (Kirchner und Rümmele 2015).

1.1.1 Diagnostik

Die SSC ist eine neu beschriebene Erkrankung, welche häufig erst im späteren Stadium diagnostiziert wird. Sie stellt eine der wichtigsten Differentialdiagnosen bei PSC typischer Symptomatik und cholangiographischen Veränderungen dar. Aufgrund der schlechten Prognose und der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten ist es wichtig eine frühe Diagnose zu stellen, um schwerwiegende Komplikationen zu vermeiden. Die Diagnostik besteht aus der serologischen, histologischen und radiologischen Untersuchung. Dazu zählt die serologische Bestimmung der Cholestaseparameter (Leonhardt et al., 2015a), Bildgebung der Gallengänge- und Leber, sowie histologische Untersuchungen zum Ausschluss anderer Pathologien (Fan et al., 2013). In SC-CIP Patienten steigen die Cholestaseparameter mit Gamma-Glutamyltransferase (GGT) führend sieben Tage (Median) nach dem lebensgefährlichen Ereignis an. Wenige Tage später folgt die Alkalische Phosphatase (AP) und letztendlich das Bilirubin (Abbildung 1). Die Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) sind bei SC-CIP Patienten hingegen nur leicht erhöht.

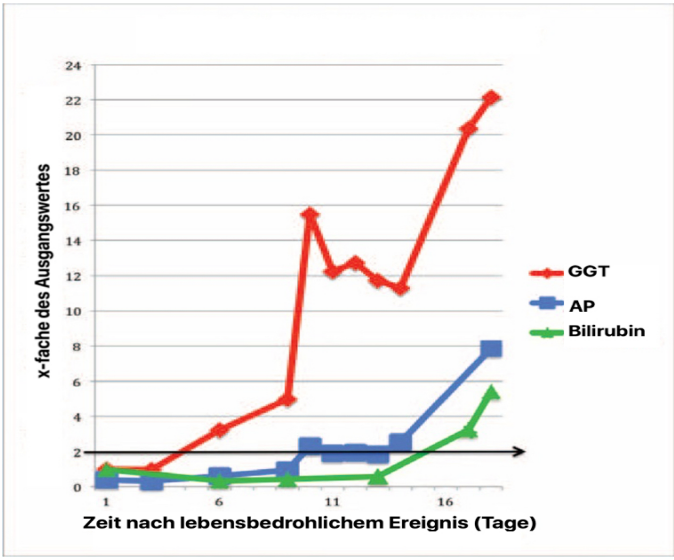


Abbildung 1: Laborwertverlauf von GGT, ALP und Bilirubin in Abhängigkeit der Tage nach dem initialen lebensbedrohlichen Ereignis (Leonhardt et al., 2015a)

Die Bildgebung beinhaltet die abdominelle Ultraschalluntersuchung der Leber, Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) und die invasive Endoskopisch Retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) als Goldstandard. In der abdominellen Ultraschalluntersuchung sind im frühen Stadium Zeichen der intrahepatischen Cholestase mit dilatierten extrahepatischen Gallengängen erkennbar. Bei Progression der Erkrankung kommt es zur Entstehung einer Leberzirrhose und den damit verbundenen sonographischen Merkmalen (Leonhardt et al., 2015a). Aufgrund der schlechten Sensibilität verglichen mit der ERCP, ist die Ultraschalluntersuchung weniger hilfreich und kann daher vernachlässigt werden (Kirchner und Rümmele 2015).

Als nicht invasive Bildgebung rückte die MRCP in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund. Charakteristisch für die SSC ist der stadienhafte Verlauf in Abbildung 2 dargestellt. Ähnlich wie bei der PSC sind im frühen Stadium multiple Strikturen mit dilatierten intra- und extrahepatischen Gallengängen erkennbar. Intraduktal sind vermehrt Füllungsdefekte zu sehen, die den *biliary cast* Formationen der ERCP in der frühen Phase der SSC-CIP entsprechen (Leonhardt et al., 2015a; Gudnason und Björnsson 2017). Betroffen sind vor allem, spezifisch für die SSC, die intrahepatischen Gallengänge mit Aussparung des Ductus choledochus. Nach orthotoper Lebertransplantation können durch eine *ischemic type biliary lesion* (ITBL) ebenfalls *biliary cast* Formationen auftreten. Somit können diese differenzialdiagnostisch als spezifischer Marker für die SSC-CIP verwendet werden (Kwon et al., 2012). In der späten Phase bilden sich rapide Destruktionen bis hin zu epithelialen Nekrosen in den intrahepatischen Gallenwegen aus mit Folge eines rudimentären zentralen Gallengangsystem. Der Gallengang ist teilweise komplett zerstört. (Leonhardt et al., 2015a).

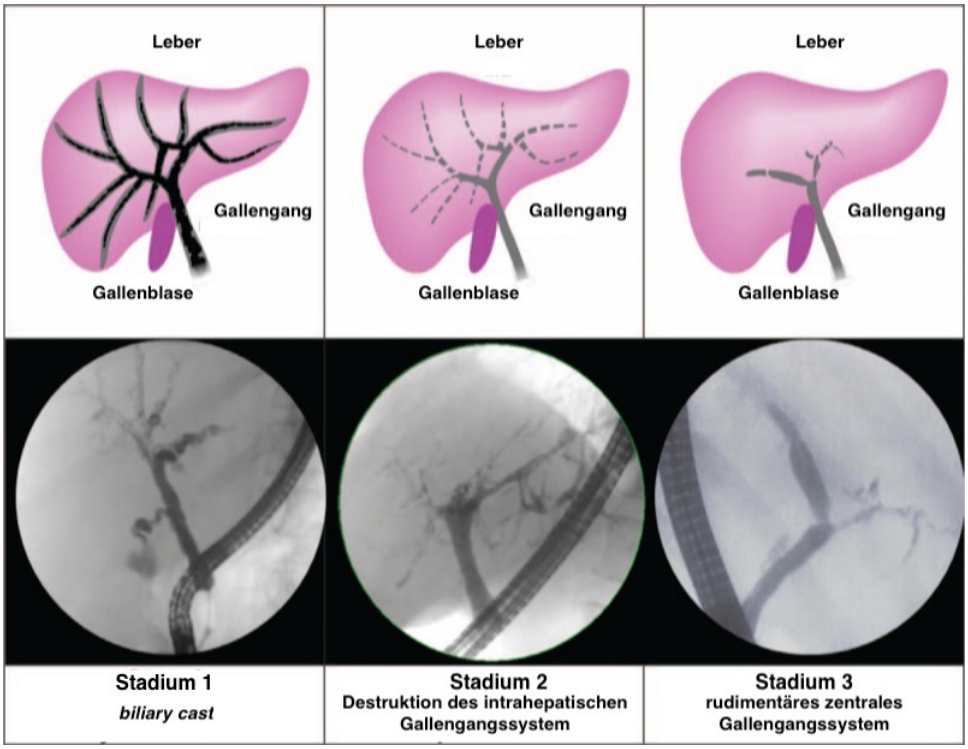


Abbildung 2: Cholangiogram in der ERCP im stadienhaften Verlauf der SSC (Leonhardt et al., 2015a)

Histologisch ist bei der SSC initial eine cholestatische Veränderung zu sehen, die in den ersten ein bis drei Monaten nach dem lebensbedrohlichen Ereignis in milde, unspezifische Veränderungen des Lebergewebes bis hin zu chronischen Gallengangsobstruktionen übergehen kann. In den darauffolgenden vier bis zwölf Monaten entwickelt sich eine progressive Fibrose der intrahepatischen Gallengänge mit Gallengansproliferation, portalen inflammatorischen Infiltraten, periduktale Fibrose, Brückenfibrose und kanalikulärer Cholestase. Im Endstadium nach 12-24 Monaten ist eine beginnende oder schon fortgeschrittene Leberzirrhose sichtbar (Kwon et al., 2012). Die Diagnostik der SSC-CIP beruht auf der ERCP als Goldstandard mit typischen *biliary cast* Formationen der intrahepatischen Gallengänge im frühen Stadium der Erkrankung. Im Endstadium ist das Gallengangssystem zum Teil komplett obliteriert mit Folge einer progressiven Leberzirrhose.

1.1.2 Klinik und Verlauf

Der SC-CIP geht definitionsgemäß einem lebensbedrohlichen Ereignis voraus mit darauffolgender intensivmedizinischer, stationärer Behandlung. In der Vorgeschichte sind keine hepatobiliären Erkrankungen bekannt, welche die späteren Gallengangsobstruktionen erklären könnten (Weiss et al., 2016). Die klinische Manifestation ist unterschiedlich und anfangs meist asymptomatisch mit nur serologisch auffälligen Cholestaseparametern (AP, GGT, Bilirubin). Im Verlauf zeigen sich Zeichen

chronischer Cholestase (Gossard et al., 2005) mit Ikterus, Erbrechen, Übelkeit, rechtsseitigen epigastrischen Schmerzen und Juckreiz (Fan et al., 2013). Im Falle einer Progression entwickeln sich chronische Cholangitiden mit Fieber und Bildung einer Leberzirrhose (K. V. Patel et al., 2014) mit den typischen Komplikationen wie Aszites, Varizenblutung, hepatischer Enzephalopathie und Ikterus (Suk et al., 2012).

Lebensbedrohliche Komplikationen der SSC sind Leberabzesse, Cholangiosepsen und Cholezystitiden im hepatobiliären System. Besonders auffällig ist dabei der hohe Anteil an akalkulösen Cholezystitiden. Bedingt durch ischämische Nekrosen in den tiefen Schichten der Gallengangswand kommt es zu einer hohen Rate an Spontanrupturen der Gallenblase. Wegen dem schlechten Outcome ist meist eine notfallmäßige Cholezystektomie erforderlich. Diese Form der Cholezystitis betrifft vor allem die SC-CIP. Bei der PSC und IgG4 (Immunglobulin-G4)-assoziierten Cholangiopathien wird dies hingegen nicht beobachtet (Leonhardt et al., 2015a).

Die rezidivierenden Cholangitiden in SSC Patienten, bedingt durch intra- und extrahepatische Strikturen, mit Folge einer Sepsis, unterscheiden sich mikrobiologisch zur PSC. Einerseits gibt das entnommene Gallensekret häufiger einen positiven mikrobiologischer Befund, andererseits ist die Mikroflora verändert. Besonders dominant sind multiresistente, E. faecium (Enterococcus faecium), Staphylococcus spp. und Pseudomonas spp.. Ein wichtiger Faktor für die Veränderung der Mikroflora ist eine meist ineffektive Antibiose, welche bei den meisten Patienten während eines Intensivaufenhaltes notwendig sind, und dadurch nosokomiale Keime selektiert werden.

Infektionen mit Pilzen als Ursache für Cholangitiden machen 20 % aller Infektionen in SSC Patienten aus und sind schwerer zu diagnostizieren. Es zeigt sich dabei jedoch ein höherer Anteil an Non-Candida Infektionen im Vergleich zu PSC Patienten. Das Zusammenspiel aus Immunsuppression bei Leberzirrhose, wiederholter Interventionen mit Einlage von Gallengangstents und ineffektiver Antibiosen führen zu vermehrten infektiologischen Komplikationen im Gallengangsystem (Voigtländer et al., 2015). Durch die hohe Mortalitätsrate von 40 % bei Infektionen ist daher eine frühe Prävention mit einer spezifischen Therapie zu denken (R. Patel et al., 1996).

Einen Zusammenhang mit einem höheren Risiko für Cholangiokarzinome (CCA) oder hepatozelluläre Karzinome (HCC) konnte mit der aktuellen Datenlage nicht festgestellt werden. Ein möglicher Grund dafür könnten die kurzen Follow-ups der Studien und die niedrige Lebenserwartung der Patienten sein (Kirchner und Rümmele 2015).

Durch häufige Komplikationen ist die Lebenserwartung bei SSC Patienten stark limitiert. Die wichtigsten Faktoren sind die rezidivierenden Cholangitiden und der initiale biliäre Schaden. Daher ist die Früherkennung ein wichtiger Punkt, um der schnell fortschreitenden Progression der Leberzirrhose entgegenzusteuern. Studien nach zu urteilen kann hochgradige Fibrose oder Leberzirrhose bereits nach 1-16 Monaten auftreten (Kirchner und Rümmele 2015; Leonhardt et al., 2015a).

In einer Studie von Kulaksiz et al. 2008 mit einem Follow-up von 13 Jahren mit 29 Patienten mit SSC traten 19 Todesfälle auf. Davon starben zehn Patienten an einem Leberversagen und der Rest an Multiorganversagen, Zerebralischämie und Herzstillstand. Drei Patienten erhielten aufgrund abnehmender Leberfunktion eine orthotope Lebertransplantation, wovon einer wegen transplantationsassoziierten Komplikationen starb (Tabelle 1).

Tabelle 1: Todesursachen bei Patienten mit SSC

	Anzahl an Patienten (n = 29)
Todesursache:	
• Leberversagen	10
• Multiorganversagen	4
• Herzstillstand	3
• Zerebralischämie	1
• Transplantation assoziiert	1
Endpunkt der Erkrankung:	
• Tod	19
• Lebertransplantation	3

Von den überlebenden Patienten wurden vier für eine Lebertransplantation gelistet. Drei der überlebenden Patienten zeigten Zeichen von schweren Cholestaseformen.

Insgesamt liegt die Prognose ohne Lebertransplantation bei einer Überlebensrate von 55 % nach einem Jahr und bei 14 % nach 6 Jahren. Die mediane Überlebensdauer liegt bei 1,1 Jahren (95 % Konfidenzintervall (KI) 0,06, 6,48) (Abbildung 3).

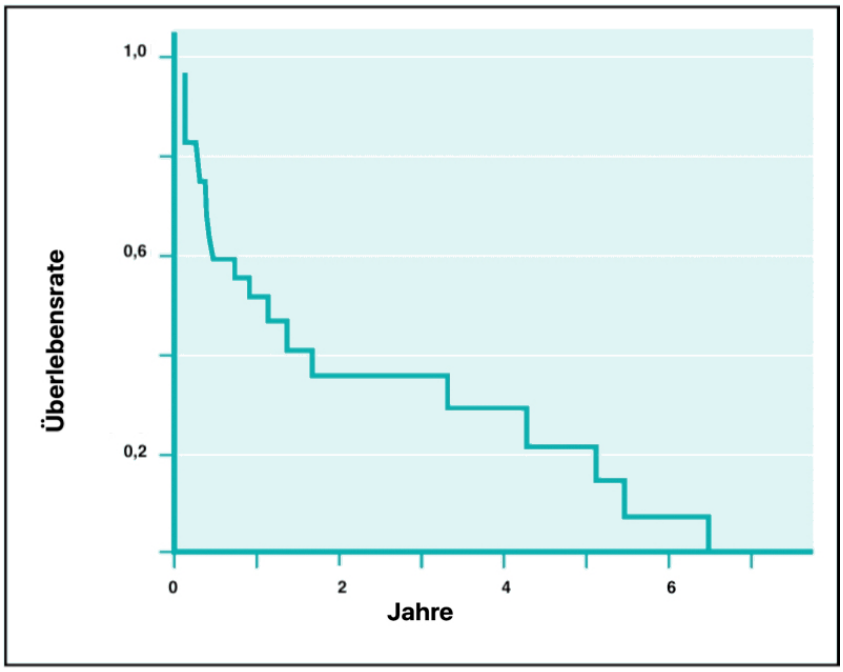


Abbildung 3: Überlebenskurve (Kaplan Meier Kurve) ohne Lebertransplantation bei Patienten mit SSC (Kulaksiz et al., 2008)

Kaplan Meier Kurve mit Überleben in Jahren im Verhältnis zur Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit SSC ohne Lebertransplantation (n = 29).

Bei der PSC, welche ähnliche klinische Symptome zeigt und sowohl mit Cholangiokarzinomen als auch chronischen Darmerkrankungen assoziiert ist, ist die mediane transplantationsfreie Prognose mit 89 Monaten (95 % KI 40,102) angegeben. Somit zeigt sich ein besseres Outcome in der PSC gegenüber der SSC (Gossard et al., 2005).

Die SSC präsentiert sich insgesamt klinisch mit Zeichen einer Cholangitis und einem lebensbedrohlichen Ereignis in der Vorgeschichte. Im späteren Verlauf kommt es zu einer Leberzirrhose mit hoher Mortalitätsrate und einer medianen Überlebensdauer von 1,1 Jahren.

1.1.3 Therapie

Die Therapie der SSC ist limitiert und die Studienlage nicht eindeutig. Aufgrund der schnellen Progression sollte jedoch früh eine effektive Therapie eingeleitet werden. Ein wichtiger Teil der Therapie beinhaltet die Entfernung des okkludierenden Gallengangsmaterial, Dilatation der Gallengangsstenosen mit Stenteinlage und eine erregerspezifische Antibiose (Kulaksiz et al., 2008). Hierfür sollte stets eine spezifische mikrobiologische Untersuchung der in der ERCP entnommenen Gallekultur erfolgen, um eine zielgerichtete Antibiose durchzuführen (Kirchner und Rümmele 2015). Da das Erregerspektrum meist aus Enterococcus spp., E. faecium, Pseudomonas aeruginosa

und Candida spp. besteht, wird eine Kombination von Vancomycin, Piperacillin-Tazobak und Fluconzol empfohlen (Voigtländer et al., 2015).

Die Dilatation der Gallengänge ist ein wichtiger Bestandteil der Therapie, da ansonsten Cholestase und Cholangitiden entstehen können. Die Implantation von Stents ist in einigen Fällen sinnvoll, jedoch mit einem erhöhten Risiko für Okklusionen und konsekutiven Cholangitiden verbunden. Bei Patienten mit einer Sepsis oder Endotoxin induzierter Cholestase fallen die gestiegenen Cholestaseparameter Bilirubin, AP und GGT bei effektiver Therapie wieder ab. Bei der SSC hingegen normalisieren sich die Laborparameter trotz Therapie nicht. In einigen Fällen konnte eine Verbesserung der Symptome durch eine nasobiliäre Sonde mit kontinuierlicher Spülung mit Salzlösung gezeigt werden (Kirchner und Rümmele 2015).

Insgesamt ist eine symptomatische endoskopische und medikamentöse Therapie mit Ursodesoxycholsäure (UDCA) anzustreben. Die progressive Destruktion des Gallengangsystems kann jedoch nicht verhindert werden, wodurch letztlich eine Lebertransplantation die einzige kurative Option darstellt (Kwon et al., 2012).

1.1.4 Molekularbiologische und pathophysiologische Vorgänge

Die pathologischen Vorgänge der SSC sind noch nicht eindeutig geklärt und wahrscheinlich multifaktoriell bedingt (Kirchner und Rümmele 2015). Unklar ist, ob das lebensbedrohliche Ereignis oder die nachfolgende intensiv-medizinische Behandlung zur Erkrankung führen (Leonhardt et al., 2015b).

Einer der wichtigsten Risikofaktoren ist die ischämische Cholangiopathie, die im Rahmen einer mikroangiopathischen oder makroangiopathischen arteriellen Perfusionsstörung auftritt. Bekannte Faktoren sind vor allem Sepsis, hoher Katecholaminbedarf, protektive Lungenbeatmung mit hohem endexspiratorischem Druck und niedrigen Tidalvolumina, sowie Gabe von hepatotoxischen Medikamenten. Alle zusammen führen zu arteriellen Hypotensionen und verminderter Blutoxygenierung. (Patel et al., 2014; Kirchner und Rümmele 2015). Hypoperfusion führt zum Zelltod der Cholangiozyten. Folge ist eine Abnahme der Cholangiozytenfunktion mit veränderter Gallezusammensetzung und Fließeigenschaft. Hauptbestandteile des veränderten Gallensekrets sind Proteine mit hohem Anteil an Kollagen, welches von den nekrotischen Gallengängen stammt (Kirchner und Rümmele 2015). Begünstigt durch Hämolyse und biliären Infektionen kommt es zur Bildung von sogenanntem *biliary cast* (lithogene und nicht-lithogene biliäre Ablagerungen). Bedingt durch die anatomisch spezifische Blutversorgung der Leber sind dabei vor allem die intrahepatischen Gallengänge (IHD) betroffen Wie schon beschrieben treten diese auch nach orthotopen Lebertransplantationen auf, welche durch fehlerhafte Gallengangrekonstruktion oder arterielle Thrombosen zustande kommen. Klinisch kommt es zur progressiven Cholestase mit laborchemischem Anstieg der AP, GGT und Bilirubin. Durch diesen Mechanismus werden

wiederum erneute Infektionen und Gallengangsproliferation mit Leberfibrinogenese gefördert, weshalb die SSC einen chronischen Prozess darstellt (Weiss et al., 2016).

Der genetische bzw. immunologische Hintergrund der unterschiedlichen Patienten könnte ebenfalls zur Progression der SSC beitragen. Bei einer heterozygoten Mutation oder Polymorphismen der kanalikulären Phospholipid Flippase MDR3 kommt es zu niedriger Expression von Phosphatidylcholin (Trauner et al., 2007). Folglich ist die Zusammensetzung der Galleflüssigkeit verändert und es entsteht ein höheres Risiko für die Bildung von *biliary cast.* Dies könnte erklären, weshalb einige Patienten bei einem lebensbedrohlichen Ereignis eine SSC entwickeln und andere dagegen ohne biliären Schaden bleiben (Kirchner und Rümmele 2015).

Neben Hypoperfusion kann auch der thrombotische Verschluss des peribiliären Plexus zu einer fehlenden Blutversorgung der IHDs führen. Bei chirurgischen Eingriffen oder Traumata kommt es zum Gewebeschaden mit vermehrter Freisetzung von Myoglobin und häufig notwendigen Transfusionen von Blutkonserven und kolloidalen Lösungen wie Hydroxyethylstärke (HES). Die roten Blutzellen haften am Epithelium und verlieren ihre Fähigkeit zur Deformierung mit Folge einer Okklusion des Gefäßes. Myoglobin erhöht die Blutviskosität und führt zu einem hyperkoablen Zustand. Beides zusammen erhöht das Risiko für thrombotische Ereignisse.

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist die Toxizität der Galle. Zu den Schutzmechanismen gehört zum einen der oben beschriebene MDR3 Transporter, welcher zu der großen Gruppe der ABC Transporter gehört (Trauner et al., 2007), und zum anderem der Anionen Austauscher 2 (AE2), welcher einen protektiven HCO_3- Film auf der apikalen Membran bildet. Da die Funktion der Cholangiozyten durch die Minderversorgung mit sauerstoffreichem Blut gestört ist, fehlen diese protektiven Mechanismen, was eine Zerstörung der Lipidmembran durch hydrophobe Gallensäuren zur Folge hat. Ein Ungleichgewicht zwischen diesen schützenden Mechanismen begünstigt Schäden des biliären Epithels. Die Regulation dieser hepatobiliären Transporter erfolgt durch proinflammatorische Cytokine wie Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) oder Interleukin-6 (IL-6), die sowohl bei einem Systemisch inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) als auch einer bakteriellen Sepsis ausgeschüttet werden (Leonhardt et al., 2015b).

Durch Fehlfunktion und Zelluntergang von Cholangiozyten werden bakterielle Cholangitiden begünstigt mit fortschreitender Atresie der IHDs (Kulaksiz et al., 2008). Im späten Stadium kommt es zu fehlenden endoskopischen Therapiemöglichkeiten, da die Gallengänge nicht mehr sondierbar sind und vom restlichen Gallengangsystem teilweise abgehängt werden. Eine Antibiotikatherapie ist nur eingeschränkt wirksam, da durch die veränderte Gallengangsanatomie der Wirkungsort nicht erreicht werden kann (Leonhardt et al., 2015b).

Zusammenfassend sind folgende Faktoren, die zur Entwicklung der SC-CIP beitragen, festzustellen: Hypotension, mikrozirkulatorische Durchblutungsstörungen und SIRS/Sepsis. Eine Hypotension kann sowohl einen direkten Schaden der Gallenwege zur Folge haben als auch einen indirekten, durch eine veränderte Regulation der hepatobiliären Transporter. Die Regulation des

Leberzellumbaus besteht aus komplexen Signalwegen zwischen reaktiven Cholangiozyten, Mesenchymalzellen und inflammatorischen Zellen, mit Beteiligung von Zytokinen, Polypeptiden, Wachstumsfaktoren und anderen löslichen Substanzen.
Da die Sepsis/SIRS durch Ausschüttung von inflammatorischen Molekülen einen Einfluss auf die Gallengangstransporter hat, wird angenommen, dass beide Auslöser in Kombination den Effekt potenzieren. Die genaue Pathogenese ist jedoch nicht bekannt und wirft weitere Fragen auf (Leonhardt et al., 2015b).

1.2 Zelltod

Der Zelltod hat eine wichtige physiologische Aufgabe, ist jedoch auch an vielen Erkrankungen beteiligt. Definitionsgemäß stellt er einen Prozess der Zelle dar, welcher irreversibel ist oder den *point of no return* erreicht hat. Hierfür muss eins der drei folgenden Kriterien zutreffen: Verlust der Integrität der Zellmembran, Fragmentation der Zelle in eigenständige Körperchen oder Aufnahme der Fragmente bzw. Körperchen von benachbarten Zellen (Kroemer et al., 2009). Der Mechanismus wird ausgelöst durch verschiedene Stimuli wie Hitze, Strahlung oder Hypoxie mit unterschiedlicher Antwort abhängig vom jeweiligen Gewebe. Weiterhin spielt der Zelltod eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellpopulation, während der embryonalen Entwicklung oder in der Funktion des Immunsystems. Eine Dysregulation kann zur Entwicklung neurodegenerativer, autoimmuner, karzinogener oder ischämischer Erkrankungen führen (Elmore 2007). Der Zelltod kann nach morphologischen, enzymatischen, funktionellen oder immunologischen Kriterien unterteilt werden. Die grobe Unterteilung erfolgt nach morphologischen Kriterien nach *The Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) in Apoptose (Typ 1 Zelltod), Autophagie (Typ 2 Zelltod) und Nekrose (Typ 3 Zelltod) (Galluzzi et al., 2018). Da jedoch überlappende molekulare Signalwege und ähnliche morphologische Charakteristika vorhanden sind, konnten im Laufe der Zeit immer mehr Formen des Zelltodes identifiziert werden (Abbildung 4). Die molekulare Ausführung des Zelltodes ist schließlich stark abhängig von der Art des Zellstimulus und des Zelltyps (Tait et al., 2014; Syntichaki und Tavernarakis 2002).

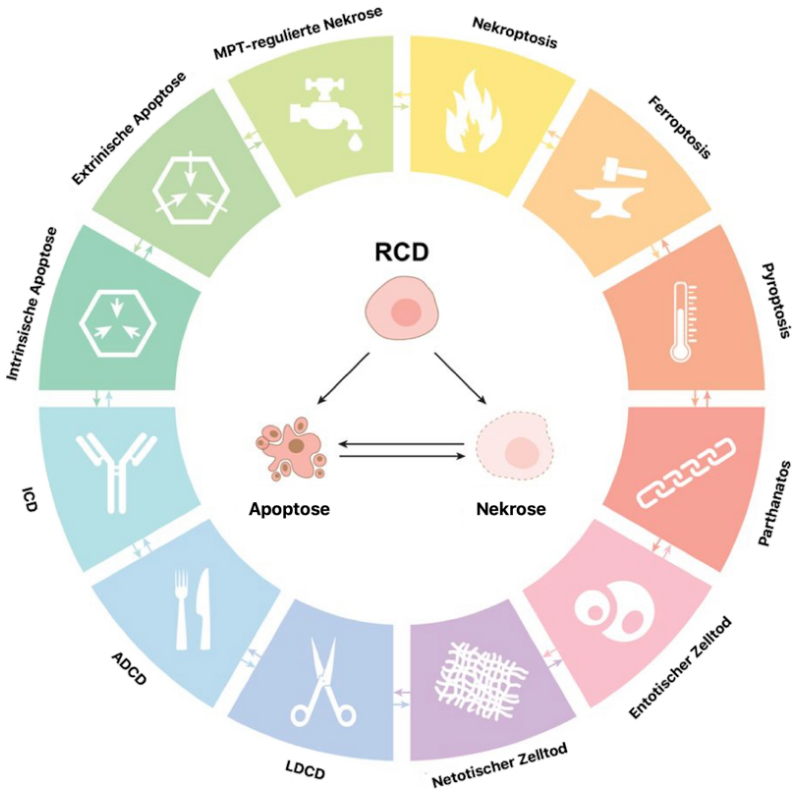


Abbildung 4: Verschiedene Zelltodarten mit überlappenden Entitäten (Galluzzi et al., 2018)
RCD: regulated cell death, ADCD: autophagy-dependent cell death, ICD: immunogenic cell death, LDCD: lysosome-dependent cell death, MPT: mitochondrial permeability transition.

1.2.1 Apoptose

Die Apoptose ist ein programmierter, regulierter Zelltod (RCD), der durch verschiedene morphologische Eigenschaften charakterisiert ist und über energieabhängige biochemische Prozesse gesteuert wird (Galluzzi et al., 2018). Bei alkoholischen und nicht alkoholischen Lebererkrankungen kommt es signifikant zu vermehrten Apoptoseraten der Hepatozyten, welche mit schweren Lebererkrankungen und Leberfibrose korrelieren (Canbay et al., 2004).

Die Induktion der Apoptose erfolgt über zwei Wege: den extrinsischen, ausgelöst durch sezernierte Liganden, und den intrinsischen, welcher durch Zellorganellen aktiviert wird. Der intrinsische bzw. Zellorganellen vermittelte Weg wird durch Proteine der Bcl-2 Familie (B-cell-lymphoma) kontrolliert und mittels Caspase-aktivierenden Proteinen gesteuert. Die Bcl-2 Familie besteht aus proapoptotischen BH3-only Proteinen, proapoptotischen Effektormolekülen und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen. Ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Proteine führen zur Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und Bindung von Apaf-1. Dieses Protein leitet den programmierten Zelltod ein. Dabei kommt es zur Synthese von Procaspase 9 und Aktivierung der zytosolischen Cystein-Caspase 3. Es kommt zur Proteolyse, Fragmentierung der chromosomalen DNA (Desoxyribonukleinsäure) und Membran-Blebbing. Durch Expression von

Phosphatidylserinrezeptoren (PS-R), auch bekannt als *eat-me* Signal, auf der Plasmamembran können Makrophagen diese binden und als apoptotische Körperchen aufnehmen und diese degradieren. Dieser Prozess wird auch als Efferozytose beschrieben (Nagata 2018; Schultz und Harrington 2003).

Der extrinsische Weg ist durch Proteine aus der *tumor necrosis factor* (TNF) Familie, auch Todesfaktoren genannt, und der TNF Rezeptor Familie (Todesrezeptoren), reguliert. Die Tumornekrosefaktoren beinhalten Fas-Ligand, TNF-a und *TNF-related-apoptosis-inducing-ligand*. Durch Bindung an die Todesrezeptoren wird die Tertiärstruktur der Rezeptoren verändert und der Rezeptor aktiviert. Es bildet sich ein *death-inducing signaling complex* (DISC), welcher aus *Fas-associated protein with death domain* (FADD), Fas, Procaspase 8 und *Procaspase 8-like protein* (c-FLIP) besteht. Abhängig vom Zelltyp können nun zwei Signalwege ausgelöst werden. In Typ 1 Zellen (z.B. Thymozyten) wird Caspase 8 vom DISC aktiviert, wodurch Caspase 3 aktiviert wird und Zellproteine degradiert werden. Bei Typ 2 Zellen wie Hepatozyten oder Fibroblasten wird durch die aktivierte Caspase 8 zunächst *BH3-interacting domain death agonist* (Bid) gespalten, welches zur Bcl-2 Familie gehört. Bid induziert die Freisetzung von Cytochrome c aus den Mitochondrien und verstärkt den intrinsischen Weg (Nagata 2018).

Eine weitere Form des regulierten Zelltodes ist der *immunogenic cell death* (ICD). Ausgelöst durch virale Infektionen, Chemotherapeutika, Strahlentherapie und Hypericin basierte photodynamische Therapie werden *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt, welche von Mustererkennungsrezeptoren, sogenannten *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), erkannt werden. Als Teile des angeborenen und erworbenen Immunsystem können diese eine Immunantwort auslösen und den Zelltod auslösen (Galluzzi et al., 2018).

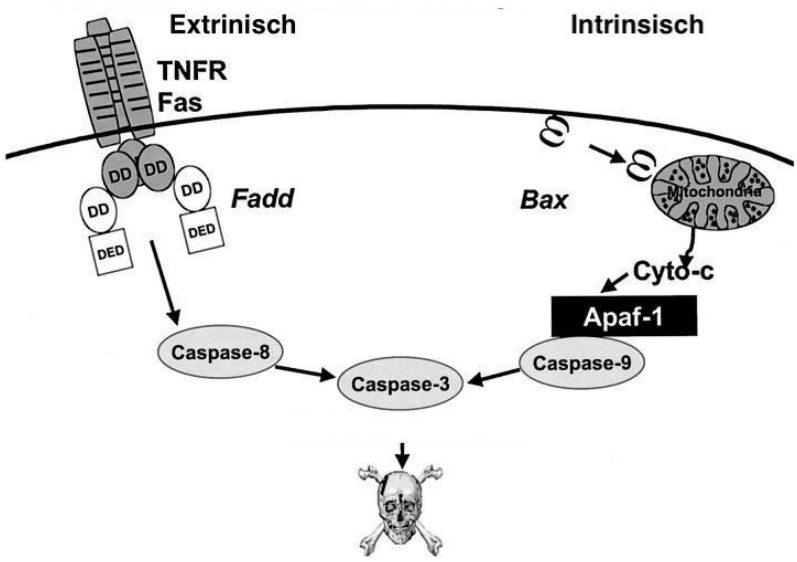


Abbildung 5: Extrinsischer und Intrinsischer Weg der Apoptose (Reed 2000)

Apoptose kann durch den extrinsischen und intrinsischen Weg ausgelöst werden. Der extrinsische wird durch Todesfaktoren aktiviert, der intrinsische durch Zellorganellen mit Beteiligung von Proteinen der Bcl2-Familie und Caspase-aktivierende Proteine (Abbildung 5). Am Ende kommt es zur Fragmentierung der chromosomalen DNA und Proteolyse.

1.2.2 Nekrose

Im Vergleich zur Apoptose wird die Nekrose meist durch einen direkten mechanischen oder physikochemischen Schaden ausgelöst. Charakteristisch für die Nekrose ist die Vakuolenbildung, Karyorrhexis und Karyolyse (Mazzolini et al., 2016). Dabei kommt es häufig zur Induktion einer Inflammation aufgrund der Freisetzung von proinflammatorischen Molekülen und zellulären Bestandteilen (Edinger und Thompson 2004). Die zwei wichtigsten Formen sind *mitochondrial permeability transition* (MPT) regulierte Nekrose und Nekroptosis. Bei der Nekrose ist durch den Mangel an ATP die mitochondriale Funktion gestört. Dabei entsteht eine inflammatorische Antwort mit Ausschüttung von MPT, welches vermehrt Sauerstoffradikale produziert, Phosphatidyloxygenierung verhindert und wiederrum ATP verringert. Endonukleasen aus den geschädigten Mitochondrien führen, ähnlich wie bei der Apoptose, zur Fragmentation der Zelle.
Nekroptosis ist morphologisch ähnlich zur Apoptose. Unter ATP-Mangel kommt es bei Aktivierung der Todesrezeptoren durch Todesliganden im Rahmen der vorbeschriebenen Apoptose zur Ausbildung eines Nekrosom (FADD, cFLIP und Caspase 8). Die Proteine RIPK1 und RIPK3 sind dabei maßgeblich an der Antwort auf TNF-α und Entstehung des Nekrosom involviert. Durch Phosphorylierung von *mixed linage kinase like protein* (MLKL) kommt es zur Membranruptur. Intrazelluläre Komponenten wie *high-mobility group protein B1* (HMGB1) und *heparin binding growth factor* (HDGF) strömen in den extrazellulären Raum und induzieren eine proinflammatorische Antwort (Mazzolini et al.2016).
Insgesamt ist die Nekrose gekennzeichnet durch ATP-Mangel und es kommt zur Degradierung der Zelle mit Auslösung einer proinflammatorischen Antwort.
Auf andere untergeordnete Formen wie Ferroptosis, Pyroptosis, Parthanatos, entotischer oder netotischer Zelltod wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen, sie seien nur Vollständigkeit halber erwähnt.

1.2.3 Autophagie

Autophagie ist ein Lysosomen-abhängiger Prozess für die intrazelluläre Degradierung einzelner Moleküle bis hin zu ganzen Zellorganellen (Tait et al., 2014). Dieser essenzielle Prozess existiert in allen eukaryotischen Zellen. Als physiologischer Prozess entfernt Autophagie überflüssige oder geschädigte Zellorganellen und regelt den Umsatz langlebiger Proteine (Yang und Klionsky 2009).

Es gibt drei unterschiedliche Typen von Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und durch Chaperone vermittelte Autophagie.

Makroautophagie erfolgt durch die Fusion eines Vesikels mit zytosolischen Proteinbestandteilen und einem Lysosom. Die zytosolischen Proteinbestandteile sind dabei von einer doppelten Membran, auch Autophagosom genannt, umgeben. Dieser Komplex wird auch Autolysosom genannt. Im Gegensatz zur Makroautophagie, erfolgt die Mikroautophagie durch direkte Aufnahme der Proteine durch das Lysosom. Sowohl die Makro- als auch die Mikroautophagie sind in der Lage selektiv und nicht selektiv Zellorganellen aufzunehmen und zu degradieren. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden die Proteine durch einen Chaperonkomplex über die lysosomale Membran transloziert und degradiert (Glick et al., 2010).

In erster Linie dient Autophagie durch Abbau geschädigter Proteine zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion und zum Schutz der Zelle vor dem Tod. Allerdings kann unphysiologisch starke Autophagie, insbesondere weitreichende Autophagie von Zellorganellen, zum Zelltod führen. Diese Form wird auch als *autophagy-dependent cell death* bezeichnet. Alle Formen der Autophagie werden durch verschiedene *autophagy related protein* (ATG-Proteine) gesteuert (Tait et al., 2014).

Ferner kann durch Schaden der Lysosomen selbst die Membran permeabel werden und hydrolytischen Proteine in das Zytoplasma freigesetzt werden. Mit der Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege kann der Zelltod ausgelöst werden und wird als *lysosome-dependent cell death* (LDCD) beschrieben (Serrano-Puebla und Boya 2018).

1.2.4 Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Apoptose, Autophagie und Nekrose

Die Zelltodarten Apoptose, Autophagie und Nekrose haben spezifische morphologische Eigenschaften und Unterschiede, welche in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Tabelle 2: Unterschiede zwischen Apoptose, Autophagie und Nekrose

	Apoptose	**Autophagie**	**Nekrose**
Auslöser	Ex- und intrinische Induktion	Ex- und intrinische Induktion	Direkte mechanische oder physikochemische Schädigung, ATP-Mangel
Zellzahl	Einzelzelle	Einzelzelle	Mehrere benachbarte Zellen
Charakteristische Zellveränderungen	Proteolyse und Zellschrumpfung, Fragmentierung der chromosomalen DNA (Pyknose), Membran-Blebbing (apoptotic bodies)	Intrazelluläre Autolysosomen, Chaperonkomplex	Vakuolenbildung, Karyorrhexis und Karyolyse, rupturierte Zellmembran
Inflammation	Anti-inflammatorisch	Anti-inflammatorisch	Pro-inflammatorisch
Molekularchemische Steuerung	Todesliganden (Fas-Ligand, TNF-a und TNF-related-apoptosis-inducing-ligand) und Todesrezeptoren	Autophagy related protein (ATG-Protein)	MPTP, RIPK1 und RIPK3

1.3 Phagozytose

Die Phagozytose ist ein zentraler Mechanismus des angeborenen Immunsystems und ist sowohl an der mikrobiologischen Elimination als auch an der Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase beteiligt. Die wichtigste Aufgabe ist dabei die Aufnahme von apoptotischen Zellen. Phagozytose kann in vier Schritten eingeteilt werden: 1. Zielpartikel identifizieren, 2. Induktion des Signalweges zur Internalisation, 3. Ausbildung eines Phagosoms und 4. Phagolysosomverdauung (Rosales und Uribe-Querol 2017). Unterschieden werden professionelle und nicht-professionelle Phagozyten (Tabelle 3) (Davies et al., 2018).

Tabelle 3: Professionelle und nicht-professionelle Phagozyten

Professionelle Phagozyten:	Nicht-professionelle Phagozyten:
• Monozyten • Makrophagen • Neutrophile • Dendritische Zellen • Osteoklasten • Eosinophile	• Fibroblasten • Hepatozyten • Endotheliale Zellen • Epithelzellen • Humane sinusoidale endotheliale Zellen

Für die Identifikation der Zielpartikel sind verschiedene Rezeptoren auf der Plasmamembran phagozytierender Zellen vorhanden, welche spezifisch Liganden erkennen und binden, die auf der Oberfläche von Partikeln, Pathogenen, etc. gebunden sind. Die Rezeptoren können grob in *pattern-recognition rezeptors*, Opsonic Rezeptoren, CR I Rezeptoren und Rezeptoren für apoptotische Zellen eingeteilt werden. In Tabelle 4 werden Rezeptortypen und deren spezifische Liganden zusammengefasst (Freeman und Grinstein 2014).

Tabelle 4: Plasmamembranrezeptoren mit den dazugehörigen Liganden

Rezeptor	**Ligand**
Pattern-recognition receptors	
Dectin-1	Polysaccharide
Mannose Rezeptor	Mannan
CD14	Lipopolysaccharide (LPS)-bindendes Protein
Scavenger Rezeptor	
CD36	Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten
MARCO	Bakterien
Scavenger Rezeptor A	LPS

Toll-like Rezeptor (TLR)	Toll-like Rezeptor-Ligand
Opsonic Rezeptoren	
FCγRI (CD64) αε	IgG1 = IgG3 > IgG4
FCγRIIa (CD32a)	IgG3 ≥ IgG1 = IgG2
FCγRIIIa (CD16a)	IgG
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2
FCεRI	IgE
CR I (CD35)	Mannan-bindendes Lectin, C1q, C4b, C3b
Integrins	
CR3	iC3b
CR4	iC3b
α5β1	Fibronectin, Vitronectin
Rezeptoren für apoptotische Körperchen	
TIM-1	PS (Phophatidylserin)
TIM-4	PS
Stabilin-2	PS
BAI-1	PS
$a_v\beta3$	MFG-E8
$a_v\beta5$	Apoptotische Zellen
CD36	Oxidierte Lipide

Phagozyten gehören zur angeborenen Immunabwehr und sind in der Lage eine Vielzahl von pathogenen und körpereigenen Partikeln zu unterscheiden. Nachdem die Partikel von den Phagozyten erkannt werden, kommt es zur Ausbildung eines multimolekularen Komplexes. Dieser besteht aus verschiedenen Molekülen und Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität zu den Pathogenen. Das dynamische und komplexe Zusammenspiel ermöglicht den Phagozyten, über *cross-talk* zwischen multiplen Rezeptoren und Pathogenen, eine hohe Diversität an spezifischen Zellantworten über unterschiedliche und zum Teil gemeinsame Signalwegen zu geben. Somit kann die Effektivität und Affinität der Phagozytose gesteigert werden (Stuart und Ezekowitz 2005). Durch die gemeinsame Aktivierung des Aktin Zytoskeletts können neue Lipidmembrane für die Ausbildung von Pseudopodien gebildet werden, mit der die Partikel in Form von Vesikeln, auch Phagosomen genannt, ins Zytoplasma aufgenommen werden. Der Prozess ist sehr komplex mit Beteiligung verschiedener Moleküle und ist noch nicht eindeutig geklärt (Freeman und Grinstein 2014). Im Anschluss kommt es zur Bildung eines Phagolysosoms, mit der die phagozytierenden Zellen am Ende die Partikel verdauen können. Dieser Prozess wird auch als *phagolysosome maturation*

bezeichnet und besteht aus drei Schritten: frühes Phagosom, spätes Endosom und Lysosom. Durch die GTPase Rab5 und andere Proteine wie z.B. *early endosome antigen* 1 (EEA 1) kann das Phagosom mit dem frühen Endosom und zum Teil Vesikeln des Trans-Golgi-Apparat fusionieren. Dabei kommt es zur Änderung der biochemischen Zusammensetzung des Phagosoms mit vermehrter Ausbildung von der Membran-assoziierten Protonenpumpe V-ATPase, die H^+-Ionen in das Lumen transportiert und für den charakteristischen pH von 6,1-6,5 im frühen Phagosom sorgt (Gordon 2016). Daraufhin fusioniert dieses, ebenfalls reguliert mithilfe GTPase Rab5, entlang der Mikrotubuli in zentripetaler Richtung mit Lysosomen und es kommt zum vermehrten Einbau von V-ATPase in die Zellmembran. Der Einstrom von H^+-Ionen senkt den pH-Wert auf 5,5-6 und zeichnet das späte Phagosom aus. Nach Fusion vom späten Endosom mit dem Lysosom ist das Phagolysosom entstanden, welches durch mehrere hydrolytischen Enzymen (Cathepsin, Protease, Lysozyme und Lipasen) in der Lage ist, Mikroorganismen zu degradieren (Rosales und Uribe-Querol 2017). Über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) können die Phagozyten Antigene der aufgenommenen Partikel an der Oberfläche präsentieren. Dies wird auch als MHC Restriktion bezeichnet. T-Lymphozyten, als Teil des erworbenen Immunsystems, können die an der Zelloberfläche präsentierten Antigene erkennen und aktiviert werden (Stuart und Ezekowitz 2005).
Zusammenfassend ist die Phagozytose ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und dient zum einen zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase durch Aufnahme von apoptotischen Zellen und zum anderen zur Erkennung von pathogenen Mikroorganismen. Die Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden spezifische Liganden der Antigene. Nach Internalisierung kommt es zur Bildung eines Phagosoms und durch Fusion mit endoplasmatischen Vesikeln entsteht ein Phagolysosom, welches die Mikroorganismen degradieren und die Antigene über den MHC-Komplex präsentieren.

2 Fragestellung und Ziele

Die SSC ist eine relativ seltene Erkrankung. Sie wird häufig unterdiagnostiziert und verläuft in den meisten Fällen tödlich oder in letzter Option mit einer Lebertransplantation. Verschiedene Ätiologien können zu dieser Erkrankung führen und multiple pathophysiologische Risikofaktoren können zur Progression beitragen. Chronische Lebererkrankungen wie die nicht alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) oder virale Lebererkrankungen sind assoziiert mit hepatischer Apoptose und Aktivierung von hepatischen Sternzellen und Kupfer-Zellen. Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass nach induziertem Zelltod von Hepatozyten, apoptotische Körperchen von Kupffer-Zellen sowie hepatischen Sternzellen aufgenommen werden und die Expression profibrogener Zytokine induzieren. Ob apoptotische Körperchen an der Entstehung einer SSC beteiligt sind, ist jedoch unbekannt. Daher wird in dieser Arbeit die Aufnahme von UV-bestrahlten HepG2 (Modell für Hepatozyten / Hepatomzellen) und KMCH-Zellen (Modell für Cholangiozyten / Cholangiokarzinom-Zelllinie) in KMCH-Zellen untersucht. Dabei wird im Einzelnen auf die Beantwortung folgender Fragen eingegangen:

- Binden oder nehmen KMCH-Zellen die Bestandteile der HepG2 und KMCH-Zellen nach UV-Bestrahlung auf?
- Haben die UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen einen Einfluss auf den Zellmetabolismus oder Zellteilung der KMCH-Zellen?
- Gibt es Unterschiede in der UV-Strahlenresistenz zwischen HepG2 und KMCH-Zellen?
- Ist die Genexpression hinsichtlich Proliferation, Fibrinogenese oder Transdifferenzierung in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen verändert?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Bovines Serum Albumin (BSA), pH 7	PAA; Pasching, Österreich
Ameisensäure (5 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Deoxycholic Acid (mind. 99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut (99,9 % p.a.)	Riedel-de-Haën; Seelze, Deutschland
FCS (Fetal Bovine Serum)	Biochrom; Berlin, Deutschland
Igepal (0,1 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Isopropanol (95 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	PAA; Pasching, Österreich
L- Streptomycin	PAA; Pasching, Österreich
Natriumchlorid (NaCl)	GERBU Biotechnik GmbH; Heidelberg, Deutschland
Non-fat dried milk powder (Magermilch-Pulver)	Applichem; Darmstadt, Deutschland
PBS (Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (1x), ohne $MgCl_2$, ohne $CaCl_2$	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Tris-HCL (99 %, redox titrated)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Trypsin 0,05 % EDTA	ThermoFisher; Darmstadt, Deutschland
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland

3.1.2 Geräte

Absauger	Vacuubrand; Wertheim, Deutschland
Amersham Imager 600	GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg, Deutschland

Analysewaage ABT I20-5DM	Kern&Sohn GmbH; Balingen, Deutschland
BD FACS Aria III	BD Biosciences; California, USA
BioPhotometer	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
CO2 Brutschrank BB15	Thermo-Fischer; Darmstadt, Deutschland
ELISA Reader LAMBDA E	MWG-Biotech; Ebersberg, Deutschland
FLUOstar Omega	BMG Labtech; Ortenberg, Deutschland
iCycler iQ™	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
LaminAir® Sterilwerkbank	Heraeus; Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop, Evos XL Core Cell Imaging System	Thermo-Fischer; Darmstadt, Deutschland
Lichtmikroskop, Primovert	Zeiss; Jena, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories; California, USA
Multipette® 3x, 1 µl – 50 ml	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Pipetus®	Hirschmann; Eberstadt, Deutschland
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories; California, USA
HYBAID OmniGene Heizblock	Thermo HYBAID GmbH; Garching, Deutschland
Pecon Large Chamber Incubation System S	PeCon GmbH; Eickeloh, Deutschland
Safe2020 Sterilwerkbank	Thermo-Fischer; Darmstadt, Deutschland
Schütteltisch, KS125	IKA; Staufen, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories; California, USA
UV-Crosslinker, Spectrolinker™ XL-1000	Spectroline; New York, USA
Vortexer, RS-VA 10	Phoenix Instrument; Garbsen, Deutschland
Wasserbäder GLF und Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH; Seelbach, Deutschland
Workflow AxioObserver Z1 ApoTome	Zeiss; Jena, Deutschland
Workflow LSM 710	Zeiss; Jena, Deutschland
Zentrifugen 5415R, 5424 und 5810R	Eppendorf; Hamburg, Deutschland

3.1.3 Kits

Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit	ThermoFisher; Darmstadt, Deutschland

Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare; München, Deutschland
BCA Protein Assay Kit	Pierce/Thermo Fisher Scientific; Bonn, Deutschland
DAPI Nucleic Acid Stain	ThermoFisher; Darmstadt, Deutschland
Histar Detection Kit	Bio-Rad Laboratories; Oxfordshire, UK
M30 Apoptosense® ELISA	Diapharma Group; New York, USA
M65® ELISA	Diapharma Group; New York, USA
MagicMark XP Western Protein Standard	ThermoFisher; Darmstadt, Deutschland
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x)	ThermoFisher; Darmstadt, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoFisher; Darmstadt, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher; Darmstadt, Deutschland
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Merck; Darmstadt, Deutschland
PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit	Merck; Darmstadt, Deutschland
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland

3.1.4 Medien und Zusätze

Als Medium wurde DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium) mit Zusatz von L-Glutamin, ohne D-Glucose und ohne Natriumpyruvat benutzt (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Das Medium wurde zusätzlich mit 50 ml inaktivem FCS, 5 ml L-Glutamin und 5ml L-Streptomycin versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

3.1.5 Puffer und Lösungen

Blockierlösung (Western-Blot)	5 % (m/v) Magermilchpulver in TBST
MTT-Extraktionslösung	95 % Isopropanol 5 % Ameisensäure
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCL 150 mM NaCl 0,1 % Igepal 1 % Deoxycholic Acid pH auf 7,5 einstellen, steril filtrieren
SDS Probenpuffer	40 % (m/v) Glycerol;

	20 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 12 % (w/v) SDS; 0,4 % Bromphenolblau
TBS (Tris-buffered saline) (10x)	100 mM Tris; 1,5 M NaCl pH 7,4
TBST	1x TBS; 0,1 % (v/v) Tween 20
Tris Glycin SDS-Laufpuffer (Western-Blot)	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

µ-Dish 35 mm Quad	Ibidi GmbH; Martinsried, Germany
Adhäsive Verschlussfolien (Klebefolien) für PCR-Platten	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, California, USA
BD Microlance 3 (0,4 x 19 mm; 0,5 x 25 mm) Einwegkanülen	Becton Dickinson/BD Biosciences; Fraga, Spanien
Deckgläschen (24 x 24 mm; 24 x60 mm)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH; Edermünde, Deutschland
Einwegspritzen, 1 ml. 2 ml, 5 ml und 10 ml	B.Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
Eppendorf Vis Cuvettes	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Falcon, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Hyperfilm™ ECL High Performance Chemiluminescence Film	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg, Deutschland
Mini-PROTEAN®TGX™ Precast Gels	Bio-Rad Laboratories; California, USA
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging; Menasha, USA
PCR-Platten, PP Natur, 96-Well	Bio-Rad Laboratories; California, USA
Petrischalen für die Zellkultur	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
PharmAssure Sterilfilter, 25 µm und 45 µm	Pall medical GmbH; Winsen/Luhe, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1-10 µl, 1-20 µl, 10-100 µl und 101-1000 µl	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 2 µl; 200 µl	Biozym Scientific GmbH; Oldendorf, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 5 ml	Eppendorf; Hamburg, Deutschland

Serologische Einwegpipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml Cellstar®	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs	Bio-Rad Laboratories; California, USA
Zählkammer, Neubauer	Brand GmbH & CO KG; Werthein, Deutschland
Zelldish, 145/20 mm und 60/15 mm	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche, 75 cm^2 und 175 cm^2	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten, 6-Well Format	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten, 96-Well Format	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, gelb	Greiner Bio-one GmbH; Frickenheim, Deutschland

3.1.7 Antikörper

Primärantikörper:

Western Blot:

Anti-ß-Actin: (13E5) HRP Conjugate: #5125, monoclonal Rabbit [Cell Signaling Technology, New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland], Verdünnung 1:1.000 in 5 % BSA in TBST

Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) (); (EPR3821): #ab15497, polyclonal Rabbit [Abcam; Cambridge, Großbritannien], Verdünnung 1:1000 in 5 % BSA in TBST

Immunhistochemie:

Anti-KI67: KI681C01; monoclonal Rabbit [DCS Biogene; Hamburg, Deutschland], Verdünnung 1:200 in PBS

Sekundärantikörper:

Western Blot:

Goat-anti-Rabbit IgG HRP Konjugat: A0545 [Sigma; Saint-Lois, USA], Verdünnung 1:10.000 in Blockierlösung

3.1.8 Oligonukleotide

Alpha-smooth muscle actin (α-SMA) (NM_001613)

α-SMA forward (Tm = 63 °C),

Sequenz: 5′- TTC GTT ACT ACT GCT GAG CGT GAG A - 3′

α-SMA reverse (Tm = 61,8 °C),

Sequenz: 5′- AAG GAT GGC TGG AAC AGG GTC - 3′

B-cell lymphoma 2 (Bcl2) (NM_000633)

Bcl2 forward (Tm = 61,4 °C),

Sequenz: 5′- GGA TAA CGG AGG CTG GGA TG - 3′

Bcl2 reverse (Tm = 58,5 °C),

Sequenz: 5′- CAG GGC CAA ACT GAG CAG A - 3′

Cluster of differentiation 95 (CD95)/Fas (NM_000043)

CD95/FAS forward (Tm = 53,2 °C),

Sequenz: 5′- CAA AGC CCA TTT TTC TTC CA - 3′

CD95/Fas reverse (Tm = 56,5 °C),

Sequenz: 5′-TTT GGT TTA CAT CAG CAG CAC TTG G - 3′

E2F1 (NM_005225)

E2F1 forward (Tm = 61,4 °C),

Sequenz: 5′- CAT CAG TAC CTG GCC GAG AG - 3′

E2F1 reverse (Tm = 59,4 °C),

Sequenz: 5′- CCC GGG GAT TTC ACA CCT TT - 3′

Fatty acid transport protein 5 (FATP-5) (NM_012254)

FATP5 forward (Tm = 59,4 °C),

Sequenz: 5′- GCC CTG CCC TCT TCA TCT AT - 3′

FATP5 reverse (Tm = 59,4 °C),

Sequenz: 5′- CCC CAG ATA AGG ACA GCA TC - 3′

Kollagen (NM_015719)

Kollagen forward (Tm = 59,4 °C),

Sequenz: 5′- AAC AGC CGC TTC ACC TAC AG - 3′

Kollagen reverse (Tm = 57,3 °C),

Sequenz: 5′- GGA GGT CTT GGT GGT TTF GT - 3′

S100A4 (NM_002961)
S100A4 forward (Tm = 55,9 °C)
Sequenz: 5′- TTGGTTTGGTGCTTCTGAGAT - 3′
S100A4 reverse (Tm = 59,4 °C)
Sequenz: 5′- TCACCCTCTTTGCCCGAGTA - 3′

Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A (SDHA) (NM_004168)
SDHA forward (Tm = 61,4 °C),
Sequenz: 5′- ACA CAG ACC TGG TGG AGA CC - 3′
SDHA reverse (Tm = 57,3 °C),
Sequenz: 5′ - CAA AGG GCT TCT TCT GTT GC - 3′

Sex-Determining Region Y-Box 9 (SOX9) (NM_000346)
SOX9 forward (Tm = 59,8 °C),
Sequenz: 5′- GCT CTG GAG ACT TCT GAA CGA - 3′
SOX9 reverse (Tm = 59,4 °C),
Sequenz: 5′- CCG TTC TTC ACC GAC TTC CT - 3′

Transforming Growth Factor beta (TGFb) (NM_000660)
TGFb forward (Tm = 59,4 °C),
Sequenz: 5′- GTA CCT GAA CCC GTG TTG CT - 3′
TGFb reverse (Tm = 57,3 °C),
Sequenz: 5′- GAA CCC GTT GAT GTC CAC TT - 3′

3.1.9 Software

Axiovision Zeiss 4.0
BD FACSDiva
GraphPad PRISM 5.0
iCycler iQ3.1
ImageJ
MARS
Microsoft Office 365
Paint S
ZEN Blue 2012

ZEN System 2012
Zotero 5.0.74

3.2 Methoden

3.3 Zellkultur Modelle

Für diese Arbeit wurden die Zelllinien HepG2 und KMCH benutzt. Bei den HepG2 Zellen handelt es sich um humane Hepatomzellen, die als Alternative zu primären humanen hepatischen Zellen eingesetzt werden können. HepG2 Zellen weichen von nativen humanen Hepatozyten genetisch und in einigen metabolischen Prozessen deutlich ab. Durch den stabilen Phänotyp, hohe Verfügbarkeit, langer Lebenszeit und hohen Proliferationsraten wird die Zelllinie häufig bei Untersuchungen am Medikamentenmetabolismus und zur Hepatotoxizität verwendet und können daher als Annäherungsmodell für die vorliegende Studie eingesetzt werden (Donato et al., 2015).
Die Zelllinie KMCH ist ebenfalls humaner Abstammung und beinhaltet Karzinomzellen mit hepato- und cholangiozellulärer Komponente, welche die morphologischen und funktionellen Charakteristika des originalen Tumors beinhaltet. Die Proliferationsrate ist ebenso hoch und die Kultur wächst in Form von Pflastersteinen (Murakami et al. 1987, Komuta et al., 2012).

3.3.1 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte bei beiden Zelllinien gleich. Zunächst wurden die Zellen in 75 cm^2 und 125 cm^2 Zellkulturflaschen in DMEM ausgesät. Danach wurden diese für 72 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (CO2 Brutschrank BB15). Nachdem sich ein dichter Zellrasen gebildet hatte, wurde das Medium zuerst abgesaugt. Zum Waschen der Zellen, bei dem restliches Medium und Zellbestandteile entfernt wurden, wurde 10 ml (75 cm^2) bzw. 20 ml (125 cm^2) PBS benutzt. Nach dem Waschvorgang wurde 1ml Trypsin für die 75 cm^2 und 2 ml Trypsin für die 125 cm^2 Flaschen hinzugefügt und bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Dabei wurden die adhärenten Zellen vom Boden gelöst. Um die Reaktion zu stoppen und Zelltod zur vermeiden, wurde 10 ml (75 cm^2) bzw. 20 ml (125 cm^2) PBS dazu gegeben. Im Anschluss wurde die Suspension mit den abgelösten Zellen in ein 50ml Falcon pipettiert und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert (5810R, Eppendorf). Hierdurch wurden die Zellen auf dem Boden des Falcons sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellsuspension auf 10ml mit DMEM verdünnt.
Für die Anlage eines neuen Zellstock wurden die 75 cm^2 Flaschen benutzt und mit 1ml der verdünnten Zellsuspension und 10 ml DMEM-Medium gefüllt. Die 125 cm^2 Flaschen wurden für alle weiteren Zellexperimente genutzt. Um eine höhere Zellzahl für die folgenden Experimente zu erzielen, wurden hierbei 2 ml der verdünnten Zellsuspension und 20 ml DMEM-Medium zur

Anzucht eingesetzt. Zellkultur-Flaschen wurden bei 37 °C im Brustschrank inkubiert. Nach 48 h wurde das DMEM-Medium mit 10 ml (75 cm^2) bzw. 20 ml (175 cm^2) gewechselt.

3.3.2 UV-Bestrahlung

Sobald ausreichend KMCH und HepG2 Zellen in den Zellkulturlaschen vorhanden waren, wurden diese gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert (3.3.1). Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt (3.3.3) und auf 4 x 10^6 Zellen je Zelllinie festgelegt. Diese wurden in ein Zell-Dish mit einer Größe von 145/20 mm ausgesät mit Zugabe von 20 ml DMEM-Medium und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurde das DMEM-Medium gewechselt und nach 48 h abgenommen und in einem 50 ml Falcon aufbewahrt. Das Zell-Dish mit dem Zellrasen und ohne Deckel wurde mittels UV-Strahlung (Ultraviolett) mit einer Energie von 1300 µJ/cm^2 bestrahlt (UV-Crosslinker, Spectrolinker ™ XL-1000). Das abgenommene DMEM-Medium wurde wieder auf den UV-bestrahlten Zellrasen gegeben und die Zellplatte mit dem Deckel erneut bei 37 °C inkubiert.
24 h später befanden sich die UV-bestrahlten Bestandteile des Zellrasens im DMEM-Medium an der Oberfläche. Dieses wurde abgenommen und in einem 50 ml Falcon für 10 min bei Raumtemperatur mit 1200 rpm zentrifugiert. Die UV-bestrahlten Zellbestandteile wurden auf den Boden des Falcons sedimentiert und das DMEM-Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 1 ml DMEM-Medium resuspendiert und die Zellzahl der UV-bestrahlten Zellen mittels Neubauer Zählkammer bestimmt (3.3.3).

3.3.3 Auszählung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer benutzt. Die Zählkammer hat 3 x 3 große Quadrate (1 mm^2), welche durch dreifache Grenzlinien mit je 0,2 mm in 4 x 4 Gruppenquadrate aufgeteilt ist. Jedes Gruppenquadrat ist nochmal in 4 x 4 Kleinquadrate (0,0025 mm^2) unterteilt mit je 0,05 mm Kantenlänge. Die Tiefe der Kammer beträgt 0,1 mm (Cardona-Maya et al., 2008). Die Zellsuspension wurde zur vereinfachten Zählung in einem Verhältnis von 1:5 mit DMEM-Medium verdünnt. Mithilfe einer Deckplatte auf der Zählkammer wurde ein Zwischenraum mit bekanntem Volumen gebildet. Liegt das Deckglas korrekt auf den Trägerstegen, sind Newtonsche Ringe zu sehen.
10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden von oben in den Zwischenraum pipettiert und die Zellen in den 16 Kleinquadraten gezählt. Somit ergibt sich folgende Formel für die Berechnung der Zellzahl:

$$Anzahl\ der\ Zellen\ pro\ \mu l\ = \frac{Anzahl\ der\ Zellen}{4}\ x\ 5\ x\ 10.$$

3.3.4 Behandlung

Für die Behandlung wurde im Vorfeld eine KMCH-Zellkultur (3.3) angelegt. Nach Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer, wurde die Zellsuspension, je nach geplantem Versuch, auf die gewünschte Zellzahl und Volumen mit DMEM-Medium verdünnt. Die Zellsuspension wurde in eine 6-Well-Platte ausgesät und bei 37 °C inkubiert. 24 h später wurde die 6-Well-Platte aus dem Inkubator entnommen und das DMEM-Medium abgesaugt. Die UV-bestrahlten HepG2 bzw. KMCH-Zellen (3.3.2) wurden gezählt und mit 1 ml DMEM-Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Im Anschluss wurden diese auf den Zellrasen der vitalen KMCH-Zellen pipettiert. Zur Kontrolle wurde DMEM-Medium ohne Zellbestandteile verwendet und der Versuch dabei doppelt angelegt. Somit ergab sich folgende Versuchsanordnung in Tabelle 5.

Tabelle 5: Versuchsanordnung in einer 6-well Platte

Kontrolle 1: KMCH + 1 ml DMEM-Medium	KMCH + UV-bestrahlte KMCH oder HepG2-Zellen (1 ml)	KMCH + UV-bestrahlte KMCH oder HepG2-Zellen (1 ml)
Kontrolle 2: KMCH + 1 ml DMEM-Medium	KMCH + UV-bestrahlte KMCH oder HepG2 (1 ml)	KMCH + UV-bestrahlte KMCH oder HepG2 (1 ml)

Diese 6-Well-Platten wurden daraufhin bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden abhängig vom Versuch nach 12 h, 24 h, 48 h oder nach 72 h aus dem Inkubator entnommen und für weitere Experimente genutzt.

3.4 MTT-Viabilitätstest

Der MTT-Viabilitätstest bestimmt die metabolische Aktivität von Zellen und beruht auf einem Farbumschlag mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenytetrazoliumbromid. Hierbei wird geprüft ob nach Zugabe einer Testlösung auf eine Zellkultur ein direkter zytotoxischer oder proliferativer Effekt vorliegt (Riss et al., 2004). Diese wird von den Zellen durch Endozytose oder über Proteine aufgenommen und von mitochondrialen Enzymen reduziert. Dabei entsteht Formazan (violett), welches durch eine Lösung aus den Zellen freigesetzt und mittels Photometrie gemessen wird (Maioli et al., 2009).

Für diesen Versuch wurden 2 x 10^4 KMCH-Zellen in eine 96-Well-Platte ausgesät. Dazu wurde 200 µl DMEM-Medium gegeben. Nach dem oben genannten Prinzip der Zellbehandlung (3.3.4) wurden dabei verschiedene Konzentrationen von UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen benutzt (1 x 10^5, 2 x 10^5 und 3 x 10^5) und unterschiedliche Behandlungszeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) festgesetzt. Nach Behandlung wurde das DMEM-Medium abgenommen und 100 µl MTT-Stammlösung hinzugefügt. Die Lösung setzt sich zusammen aus 3,5 mg MTT-Lösung, welche in

1 ml dH_2O gelöst wurde. Dabei wurde die MTT-Lösung abgewogen (Analysewaage ABT I20-5DM) und anschließend durch einen 0,2 µm Sterilfilter in ein neues 50 ml Falcon gefüllt. Die gebrauchsfertige MTT-Lösung wurde bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Nach ca. 50 min. im Brutschrank bei 37°C wurde 100 µl der MTT Extraktionslösung (95 % Isopropanol und 5 % Ameisensäure) zur MTT-Stammlösung gegeben und für 20 min durchmischt (Schütteltisch, KS125). Daraufhin wurde die Absorption bei 555 nm zur Detektion des Formazan (violett) gemessen (FLUOstar Omega) und ausgewertet (MARS).

3.5 Proteine

3.5.1 Hintergrundinformation

Der Western Blot dient für die Identifikation und Separation von verschiedenen Proteinen, welche mittels Gelelektrophorese, abhängig von ihrem molekularen Gewicht und Ladung, aufgeteilt und auf eine Membran transferiert werden. Diese wird mit spezifischen Antikörpern inkubiert, die an die Proteine binden und diese mittels Markierung sichtbar machen. Die Intensität des Signals einer Proteinbande lässt eine ungefähre, Mengenabschätzung des jeweiligen Zielproteins zu (Mahmood und Yang 2012).

3.5.2 Isolation von Proteinen aus Zellkultur

Zunächst wurden 3 x 10^5 KMCH-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und mit je 8 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen, in 1ml DMEM-Medium verdünnt, für 24 h behandelt (3.3.4). Für die Kontrolle wurde 1ml DMEM-Medium verwendet. Daraus ergab sich die Versuchsanordnung wie in Tabelle 5mit den oben genannten Zellkonzentrationen. Zunächst erfolgte die Isolierung der Proteine. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Die Platte wurde auf Eis gestellt und pro 6-well 300 µl RIPA-Puffer hinzugegeben, um die Denaturierung der Proteine so gering wie möglich zu halten. Die Zellkulturplatten wurden für 15 min auf Eis inkubiert und die Zellen mittels Spatel von der Zellplatte gelöst und in ein 5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erneuten 10 min auf Eis wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues 5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

3.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte nach Bradford mithilfe einer 96er-well

Platte und die Konzentration bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen (ELISA Reader LAMBDA E). Die BSA-Eichkurve wurde dabei als Standard benutzt.

3.5.4 Proteinauftrennung im SDS-Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese

Ist eine adäquate Proteinmenge von 30 µg vorhanden, wurden die Proben auf ein Gesamt-Volumen von 20 µl mit RIPA-Puffer verdünnt und mit 5 µl NuPage SDS Sample Buffer versetzt. Danach wurden diese kurz abzentrifugiert und 5 min bei 95 °C für die Denaturierung aufgekocht (HYBAID OmniGene Heizblock). Die Proteine verlieren in dem Vorgang ihre Sekundär- und Tertiärstruktur und werden einheitlich negativ geladen. Nach erneuter Zentrifugation können die Proben auf das Gel aufgetragen werden.

Das Polyacrylamidgel (Mini-PROTEAN®TGXTM Precast Gels) wurde in eine Halterung (Mini-PROTEAN Tetra Cell) eingespannt und die Kammer und der Tank mit 100 ml Tris-Glycin SDS-Laufpuffer und 900 ml dH2O gefüllt. Die Kämme wurden entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer durchgespült. Daraufhin wurden diese mit 25 µl der entsprechenden Probe beladen. In jedem Polyacrylamidgel können bis zu sieben Taschen mit Proben beladen werden. Für die Überwachung des Verlaufes der Gelelektrophorese und Beurteilung der Wirksamkeit der Übertragung des Polyacrylamidgels auf die Membran wurde in die 1. Tasche 5 µl PageRuler gegeben. Dies erscheint auf dem Polyacrylamidgel und der Membran als eine Leiter von 10 Proteinen im Bereich von 10 bis 180 kDA. Die zweite Tasche wurde mit 1 µl MagicMark gefüllt, welches aus 9 rekombinanten Proteinen mit IgG-Bindungsstellen besteht, die primäre und sekundäre Antikörper binden und für die direkte Visualisierung von Molekulargewicht-Standardbanden dient. Dadurch ergab sich folgende Anordnung des Polyacrylamidgels dargestellt in Tabelle 6.

Tabelle 6: Probenanordnung von Proteinisolaten im Gel für Western-Blot

5 µl PageRuler	1 µl MagicMark	KMCH (unbehandelt)	KMCH + UV-bestrahlte HepG2-Zellen	KMCH + UV-bestrahlte KMCH-Zellen	KMCH + UV-bestrahlte HepG2-Zellen	KMCH + UV-bestrahlte KMCH-Zellen

Ist das Polyacrylamidgel beladen, wurde die Elektrophoresekammer an die Stromquelle (PowerPac™ High-Current Power Supply) angeschlossen und für 10 min bei 70 V laufen gelassen. Im Anschluss wurde für weitere 60 min die Stromstärke auf 120 V erhöht bis die Proteine an den unteren Rand des Polyacrylamidgels gelangten.

3.5.5 Western-Blot

Die Übertragung der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulose Membran (Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs) erfolgte mit einem Transfer System (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System). Dabei wurde die Membran und das Polyacrylamidgel mithilfe von in Puffer getränkten Filtern luftblasenfrei in das Transfer-System für 3 min gelegt. Nach der Übertragung der Proteine wurde die Nitrocellulose Membran in 5 % Trockenmilch für 1 h bei 4 °C blockiert. Im nächsten Schritt wurde 4 µl Anti-PCNA in 2 ml Milch verdünnt und auf die Nitrocellulose Membran gegeben. Bei 4 °C auf einem Schütteltisch kann der Antikörper das spezifische Protein binden.

Nach 24 h Inkubationszeit wurde die Nitrocellulose Membran 3x für jeweils 10 min mit 20 ml TBST gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Danach wurde 1,5 µl vom Sekundärantikörper Goat-anti-Rabbit in 2 ml Milch gelöst und auf die Nitrocellulose Membran gegeben. Nach Inkubation für 2 h bei 4 °C auf einem Schütteltisch hat dieser sekundäre Antikörper den primären Antikörper gebunden. Im Anschluss wurde 3x für jeweils 10 min mit ca. 20 ml TBST die Nitrocellulose Membran gewaschen, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Nach abgeschlossenem Waschvorgang wurde diese in einer Zellkulturschale 140/20 mm mit 2 ml Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagent für 5 min inkubiert. Mithilfe der Detektion und Visualisierung von Chemolumineszenz (Amersham Imager 600) wurden die Proteinbanden nach Angaben des Herstellers sichtbar gemacht.

Für eine Proteinkonzentrationsbestimmung und vergleichbare Auswertung zwischen den Proteinbanden wurde eine *loading control* benutzt. Dabei handelt es sich um ein Protein, welches unabhängig von der Behandlung ubiquitär exprimiert wird (sogenannte *Housekeeping* Proteine) und auch als Referenz-Protein für die Quantifizierung verwendet wird. In dieser Arbeit wurde ß-Actin als Referenz-Protein benutzt. Nachdem die Entwicklung der Membran mit dem Zielprotein PCNA abgeschlossen war, wurde die Membran 3 x für jeweils 10 min mit 20 ml TBST gewaschen. Im Anschluss wurde 1 µl Anti-ß-Actin auf die Membran gegeben und bei 4 °C auf einem Schütteltisch inkubiert. Nach 24 h wurde die Membran 3 x für 10 min mit 20 ml TBST gewaschen. Die Entwicklung der Membran und Darstellung der Proteinbande mit ß-Actin benötigte keinen Sekundärantikörper und erfolgte nach dem oben genannten Prinzip. Die Quantifizierung von PCNA konnte nun im Verhältnis zur *loading control* erfolgen.

3.6 Scratch assay

Der Scratch assay ist eine einfache und günstige Methode, Zellmigration zu messen. Dabei wird nach Behandlung der KMCH-Zellen (3.3.4) mit einer Pipettenspitze ein sogenannter *scratch*, eine Beschädigung, im KMCH-Zellrasen verursacht. Hierbei sollte der Zellrasen in einer Monoschicht in der Zellkulturschale vorhanden sein. Dabei entsteht eine Lücke, die von den Zellen durch

Zellmigration oder -proliferation geschlossen wird. Dabei ist der zeitliche Verlauf der Zellmigration unter dem Lichtmikroskop festzuhalten. Zur Kontrolle wird eine unbehandelte Probe mit KMCH Zellen benutzt. Die Durchführung des Experiments erfolgte nach Liang et al. 2007. Dabei wurden zur Kontrolle unbehandelte KMCH-Zellen benutzt und die Behandlung mit jeweils 2×10^5 und 4×10^5 UV-bestrahlten KMCH- und HepG2-Zellen durchgeführt mit der Versuchsanordnung in Tabelle 5.

3.7 Elisa M65/M30

Zytokeratine (CK) sind eine Familie von über 20 verschiedenen Intermediärfilamentenproteinen in epithelialen und endothelialen Zellen. Dabei lassen diese sich in zwei Gruppen aufteilen: Gruppe I (CKs 9-20) und Gruppe II (CKs 1-8). Je nach Zelltod werden spezifische CK freigesetzt und mittels Antikörper detektiert (Malek-Hosseini et al., 2016). Durch die Bindung an verschiedene Epitope der Zytokeratine ist eine gute Differenzierung zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod möglich (de Haas et al., 2008).

3.7.1 Bestimmung der Apoptoserate mittels M30-Elisa

Bei der Apoptose werden Caspasen aktiviert, die durch eine Signalkaskade zur DNA-Fragmentierung, Kernkondensation, zytoskelettalen Reorganisation und Verlust der Zelladhäsion führen. Hervorzuheben sind dabei die Caspasen 3, 6, und 7, auch als Effektorcaspasen beschrieben, welche neben weiteren Aufgaben unter anderem das CK 18 spalten (Elmore 2007). Durch die spezifische Spaltung des CK 18 in der frühen Phase der Apoptose, entsteht das relativ stabile CK-18-Asp396 Neo-Epitop. Der Antikörper M30 bindet spezifisch dieses Neo-Epitop und kann als selektiver Marker für Apoptose benutzt werden (de Haas et al., 2008). Die Bestimmung erfolgt in vitro in einem Immunassay nach den Angaben des Herstellers mit dem M30 Apoptosense ® ELISA Kit.

3.7.2 Bestimmung der Gesamtzelltodrate mittels M65-Elisa

Die Gesamtzelltodrate setzt sich aus den apoptotischen und nekrotischen Zellen zusammen (Ustaalioglu et al., 2012). Die Nekrose zeichnet sich durch frühe Plasmamembranruptur und Dilatation der zytoplasmatischen Organellen aus (Syntichaki und Tavernarakis 2002). Daraufhin werden die zellulären Bestandteile freigesetzt (Edinger und Thompson 2004). Das CK ist hierbei in der kompletten und in der Caspase gespaltenen Form vorhanden. Der Antikörper M65 bindet beide Typen und ist ein Marker für den Gesamtzelltod. In Kombination mit dem M30 Antikörper (3.7.1) lässt sich eine genaue Aussage über die Art des Zelltodes machen. Die Messung erfolgte ebenfalls in vitro in einem Immunassay nach Angaben des Herstellers mit dem Kit M65® ELISA.

3.8 Immunhistochemie

3.8.1 DAPI-Färbung

Für den Nachweis von Apoptose und Nekrose gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine von ihnen ist die Markierung von DNA, bevorzugt an AT-reiche Regionen, mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4′, 6 Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Cummings et al., 2004). Hierbei werden die typischen zellbiologischen Merkmale zu Nutze gemacht. Charakteristisch für die Apoptose ist Zellschrumpfung und Pyknose mit Chromatinkondensation (Nagata 2018). Nekrose zeichnet sich durch Zellschwellung und frühe Lyse der Plasmamembran aus (Mazzolini et al., 2016).

Die Apoptose durchläuft im Gegensatz zur Nekrose typische morphologische Stadien (1.2.1). In der frühen Phase während der Chromatinkondensation aggregiert das nukleäre Material peripher unter der nukleären Membran. Die Zellen werden rund und bilden als erstes erkennbares Merkmal Bläschen. Dieser Prozess wird auch *budding* genannt. Die apoptotischen Zellen haben eine intakte Plasmamembran und bestehen aus dicht gepackten Zellorganellen mit nuklearen Fragmenten (Nagata 2018). Die Bläschenbildung ist ebenfalls bei mitotischen Zellen während der Zytokinese zu beobachten. Daraufhin wird die Mobilität der Zellen eingestellt und es kommt zur Ausbildung dünner *microspikes* mit Abschnürung apoptotischer Körperchen. DAPI ist in der Lage die intakte Zellmembran zu durchdringen und die DNA innerhalb der nukleären Membran blau anzufärben. Im späteren Zeitpunkt kommt es zur Lyse, welche auch als sekundäre Nekrose bezeichnet wird, welches der Nekrose ähnelt (Abbildung 6).

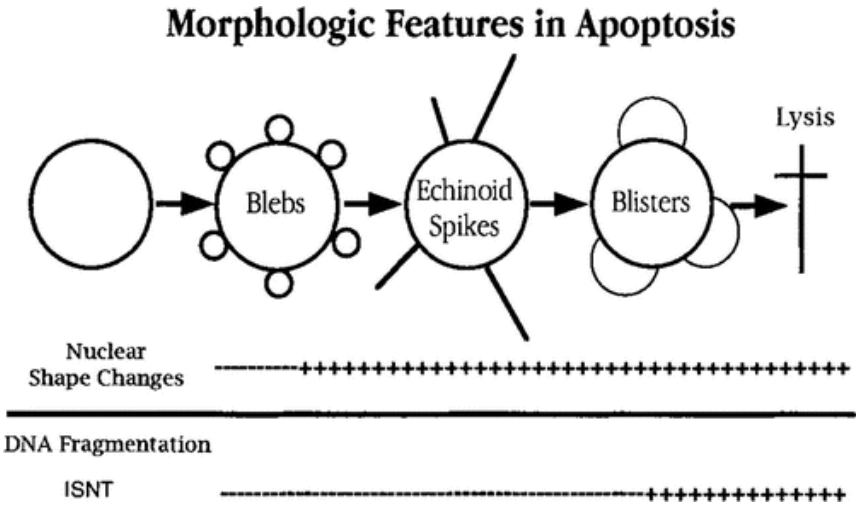


Abbildung 6: Morphologische Veränderungen der Zelle in Abhängigkeit der Zeit bei Apoptose (Jae A. Collins et al., 1997)

Die Anfärbung der UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen erfolgte mit dem DAPI Nucleic Acid Stain Kit nach den Angaben des Herstellers. Die apoptotischen Zellen wurden bei einem Emissionsmaximum von 460 nm sichtbar gemacht (Workflow LSM 710).

3.8.2 Annexin V und Propidiumiodidfärbung

Die zwei Farbstoffe Annexin V und Propidium (PI) nutzen die morphologischen Veränderungen bei der Apoptose und Nekrose. Die Fluoreszenz beider Farbstoffe ist mittels Durchflusszytometrie detektierbar. In vitalen Zellen ist PS auf der zytoplasmatischen Oberfläche der Zellmembran vorhanden. Durchläuft die Zelle die Apoptose transloziert PS auf die Außenseite der Zellmembran. Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit grüner Fluoreszenz, welches eine hohe Affinität zu PS besitzt und als Marker für Apoptose genutzt werden kann. Die Maxima für Exzitation/Emission liegt bei 488/499 nm. Nekrose zeichnet sich durch Lyse der Zellmembran aus. Der Farbstoff PI kann die intakte Zellmembran bei lebenden Zellen und apoptotischen Körperchen nicht passieren und dient somit als Marker für Nekrose. Der rote Farbstoff passiert die intakte Zellmembran und bindet nukleäre Zellbestandteile. Hierbei liegen die Maxima für Exzitation und Emission bei 535 nm und 617 nm. Die UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit angefärbt und unter dem Workflow LSM 710 sichtbar gemacht.

3.8.3 KI-67-Immunzytochemie

Die Expression des Ki-67 Protein korreliert stark mit der Zellproliferation und hat einen hohen diagnostischen Wert für verschiedene Tumorerkrankungen. Da das Protein während allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G-, S- und M-Phase) vorhanden ist und in ruhenden Zellen (G0-Phase) fehlt, zeichnet es sich als guten Marker für die Bestimmung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation aus. Mithilfe von Anti-KI67 kann das Ki-67 Antigen gebunden und farblich markiert werden (braun). Der Anteil an KI67-positiven Zellen wurde sichtbar gemacht (Lichtmikroskop, Primovert) und prozentual zur Gesamtzellzahl berechnet (ImageJ und CellCounter) (Scholzen und Gerdes 2000).

3.8.4 PKH67 und PKH26 Färbung

Der PKH67 und PKH26 Fluoreszenzfarbstoff besteht aus langen aliphatischen Ringen, welche sich in die Zellmembran integrieren können. Die Zellviabilität bleibt dabei unbeeinflusst und ist pH-unabhängig. Die zwei Farbstoffe sind gut miteinander kompatibel und auch für zytotoxische Teste einsetzbar. Das Spektrum bei PKH26 für die Exzitation liegt bei maximal 551nm und für die Emission bei maximal 567nm. Für PKH67 liegt die Exzitation bei maximal 490nm und für die Emission bei 502nm. Die Behandlung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit und dem PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit.

3.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein häufig eingesetztes Verfahren sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der Forschung. Diese Methode wird zur Analyse und Zellsortierung genutzt. Das Prinzip erfolgt auf Basis von Fluoreszenz markierten Zellen und Lichtstreuung. Die UV-bestrahlten KMCH- und HepG2-Zellen wurden mit Annexin V und PI (3.8.2) angefärbt und jeweils 1 ml in eine kleine Küvette gegeben. Als Kontrolle wurden nicht behandelte KMCH- und HepG2-Zellen eingesetzt. Insgesamt wurden je Probe 10000 Zellen nach Angaben des Herstellers ausgezählt (BD FACS Aria™ III). Dabei wurden diese unter einer laminären Strömung fokussiert, damit die Zellen einzeln entlang einer Objektivlinse fließen konnten. Durch einen Laserstrahl wurde das emittierte Licht (Annexin V Emission bei 499 nm; PI Emission bei 617 nm) von den mit Fluoreszenz markierten Zellen erkannt und ausgewertet (BD FACSDiva ™). Die Signale der Lichtstreuung korrelieren mit der Zellmorphologie, Oberfläche und intrazellulärer Proteinexpression, Genexpression und der zellulären Physiologie (Ibrahim und Engh 2007).

3.10 Live-Cell Imaging

Im Live-Cell Imaging ist es möglich die Dynamik von Zellprozessen zu beobachten. Hierfür wurden 2 x 10^4 unbehandelte KMCH-Zellen mit dem roten Farbstoff PKH26 (3.8.4) angefärbt und in eine 4-Well-Platte (µ-Dish 35 mm Quad) in einem Volumen von 400 µl DMEM-Medium ausgesät. Hierbei wurde sich bewusst für eine niedrige Konzentration entschieden, um die Dynamik der einzelnen KMCH-Zellen besser beurteilen zu können. Nach 24 h wurden diese jeweils mit 1 x 10^5 PKH67 grün gefärbten UV-bestrahlten KMCH und HepG2-Zellen (3.8.4) in einem Volumen von 400 µl DMEM-Medium behandelt. Zur Kontrolle wurde eine Probe mit unbehandelten PKH26 rot gefärbten KMCH-Zellen mit 400 µl DMEM-Medium angelegt. Der Versuch wurde unter optimalen Kulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO_2 durchgeführt (Pecon Large Chamber Incubation System S). Insgesamt wurden die behandelten KMCH-Zellen für 24 h beobachtet (Workflow AxioObserver Z1 ApoTome). Dabei wurden jeweils vorher vier Punkte pro Kammer, insgesamt 16 Punkte, festgesetzt, welche alle 20 min fotographisch festgehalten wurden. Mit dem Programm ZEN Blue 2012 wurden die Einzelbilder zu einem Zeitrafferfilm zusammengefügt (8.4).

3.11 Isolation und Detektion von Nukleinsäuren

3.11.1 RNA-Isolation aus kultivierten KMCH-Zellen

Die KMCH-Zellen wurden hierbei mit 1 x 10^6 in 6-Well-Platten ausgesät. Die Konzentrationen der UV-bestrahlen HepG2-und KMCH-Zellen wurden mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (3.3.3).

Die unbehandelten Zellen wurden im Anschluss mit UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen behandelt (3.3.4). Die RNA-Isolation (Ribonukleinsäure) der KMCH-Zellen nach Behandlung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem RNeasy Kit von Qiagen®.

3.11.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA erfolgte photometrisch über die optische Dichte (OD). Das Prinzip beruht auf der Streuung eingestrahlten Lichtes bei einer spezfischen Wellenlänge, wobei die Extinktion im Spektralphotometer bei 260 nm und 280 nm im BioPhotometer gemessen wird. Dafür wurde die vorprogrammierte Methode im BioPhotometer (260 nm/280 nm) verwendet. Die Messung wurde zunächst für den Nullwertabgleich mit Wasser, ohne RNA, durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Messung der RNA-Proben. Die benutzte RNA-Küvette hat eine Schichtdicke von 1 cm. Daraus lässt sich schließen, dass eine OD von 0,1 bei 260 nm gemessen, ca. 40 µg RNA pro ml entspricht. Jedoch kommt es durch Alkohol und Proteine in der Nukleinsäurelösung zu Verunreinigungen. Mit der zusätzlichen Bestimmung der OD280 und dem daraus resultierenden Verhältnis von OD260 zur OD280, ließ sich die Reinheit der Probe ermitteln. Ein Richtwert von 1,8-2,0 spiegelt eine reine Lösung wider. Um eine gleiche RNA-Konzentration in allen Proben zu erhalten, wurden diese mit RNase-freiem Wasser auf 125 ng/µl RNA eingestellt.

3.11.3 Reverse Transkription

Die PCR erfolgte mit einer cDNA, die aus der vorhandenen RNA mit Hilfe einer reversen Transkription synthetisiert wurde. Die cDNA ist stabiler als die RNA und kann bei -20 °C gelagert, sowie mehrmals aufgetaut und eingefroren werden. Dafür wurde das QuantiTect Reverse Transkription Kits® von Qiagen benutzt. Insgesamt wurde dafür 1 µg der RNA als Matrize verwendet.

3.12 Quantitative Realtime PCR (Polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur in vitro Vervielfältigung von bestimmten Abschnitten der DNA. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotid-Primern kann komplementär das 3´ Ende des kodogenen und nicht kodogenen Strang der cDNA gebunden werden und mit der taq DNA-Polymerase synthetisiert werden. Dieser Vorgang besteht aus drei verschiedenen Abschnitten, die sich zyklisch ca. 20-50 x wiederholen und in einem iCycler iQ System durchgeführt und gemessen. Im Vorfeld wurde der gesamte PCR-Ansatz einmalig für 15 min bei 95 °C erhitzt. Im ersten Schritt erfolgte die Denaturierung, bei der die doppelsträngige DNA-Helix in Einzelstränge getrennt wurde. Dafür wurde der PCR-Ansatz für 30 sec auf 95 °C erhitzt. Der zweite Schritt

beinhaltete das *primer annealing*. Dafür wurde die Temperatur, abhängig von dem ausgewählten Primer, auf 50-60 °C für 30 sec gesenkt. Dies hängt von der Länge und Beschaffenheit des Primers ab. In der Regel beträgt diese 5 °C unter der jeweiligen Schmelztemperatur, damit keine unspezifischen Bindungen an die DNA zu Stande kommen. Der dritte Schritt beschreibt die Elongation. Die Temperatur wurde wieder auf 72 °C für 30 sec erhöht und die Taq-Polymerase in 5´-3´Richtung synthetisierte den komplementären Strang. Alle PCRs wurden in einem Thermocycler (C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 Real-Time System) gemessen und ausgewertet (iCycler iQ3.1). Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zyklusschritte der PCR im Thermocycler

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Primer annealing	50-60 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec

Die Proben wurden in einer 96-Well-Platte angesetzt mit einem Gesamtvolumen von 15 µl. Dies setzte sich folgendermaßen zusammen: 2 µl cDNA, 0,5 µl forward Primer, 0,5 µl reverse Primer (jeweils 10 pmol/µl), 7,5µl QuantiTect Sybr Green Master Mix und 4,5 µl Nuklease-freiem Wasser. Die Proben wurden jeweils doppelt aufgetragen. Der Nachweis der amplifizierten DNA-Stränge basierte auf Fluoreszenz. Der Sybr Green Master Mix enthält einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich an den DNA-Strang bindet. Nach der Bindung wurde der Farbstoff aktiviert und bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Mit Zunahme der DNA-Replikation bei jedem Zyklus wurde mehr Fluoreszenzfarbstoff gebunden, wodurch die Intensität der Fluoreszenz stieg. Somit war die Anzahl der DNA-Stränge proportional zur gemessenen Fluoreszenz. Für die Quantifizierung wurde ein geeigneter Punkt in der Fluoreszenzkurve, der sogenannte ct-Wert (*cycle threshold*), gewählt. Dieser gibt den Schwellenwert für unspezifische Fluoreszenzemissionen an und weist eindeutige Fluoreszenzsignale nach. Da der Farbstoff sich auch in unspezifischen PCR-Produkten bzw. Nebenprodukten z. B. Primer-Dimere einlagern kann, wurde nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Die Temperatur wurde langsam und kontinuierlich in 0,5 Grad Schritten von 55 °C auf 95 °C erhitzt, wodurch die DNA denaturierte. Eine Fluoreszenzabnahme entsteht durch die Fluoreszenzfreisetzung bei der Auftrennung des Doppelstranges und wurde in einer Schmelzkurve des DNA-Fragment dargestellt. Der Schmelzpunkt der spezifischen PCR-Produkten ist jedoch höher als die der unspezifischen, womit eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Gruppen möglich ist.

Die Expression des Zielgenes wurde relativ quantifiziert, indem es mit einem zweiten, ubiquitär und homogen exprimierten Gen verglichen wurde. Dadurch wurde die Varianz des Experiments verringert. In diesem Versuch wurde als *Housekeeping*-Gen Succinat Dehydrogenase SDHA benutzt. Hierbei wurde der ct- bzw. CP-Wert (*crossing point*) der behandelten Probe auf eine Kontrollprobe bezogen:

$$\Delta CP \; = \; CP\; Zielgen - CP\; Referenzgen$$

Nach Normierung wurde der ΔCP einer Kontrolle vom ΔCP der experimentell behandelten Probe abgezogen. Somit ergibt sich die Formel für die Berechnung des *fold change*, welche in einer Arbeit von Pfaffl beschrieben wird (Pfaffl 2014):

$$\Delta\Delta\mathrm{CP} \; = \; \Delta\mathrm{CP}\ \mathrm{Behandlung} - \Delta\mathrm{CP}\ \mathrm{Kontrolle}$$

oder

$$Ratio \; = \; 2^{-\Delta\Delta\mathrm{CP}}\,.$$

3.13 Statistik

Die Anzahl der durchgeführten Versuche wurde in dieser Arbeit mit *n* angegeben. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM (*standard error of mean*) angegeben. Falls Abweichungen vorhanden sind, werden diese in den jeweiligen Versuchen genannt. Die Berechnung der Unterschiede zwischen zwei Gruppen erfolgte mit einem ungepaartem Student´s T-Test. Die Welch´s-Korrektur wurde angewandt, falls ein signifikanter Unterschied der Varianz zwischen den Gruppen vorlag. Für die Berechnungen und Graphiken wurden die Programme Graph Pad Prism 5, Microsoft Excel und Paint S verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Induktion von Apoptose und Nekrose in Zelllinien

4.1.1 KMCH- und HepG2-Zellen zeigen nach UV-Bestrahlung typische morphologische Veränderungen

Die Apoptose durchläuft verschiedene Stadien, die morphologische Unterschiede aufweisen. Diese zeichnen sich durch Bläschenbildung, sogenanntes *budding*, Abschnürung von apoptotischen Körperchen und im späteren Verlauf Lyse aus. Der Fluoreszenz-Farbstoff DAPI bindet DNA und färbt sie blau ein. Da sich Nukleinsäuren während der Apoptose durch Chromatinkondensation peripher unter der nukleären Membran befinden, erscheinen apoptotische Zellen in der Peripherie blau. Nach UV-Bestrahlung und Einfärbung der KMCH- und HepG2-Zellen ist die Phase der Bläschenbildung auf Abbildung 7 zu erkennen. Vereinzelt sind hier auch apoptotische Körperchen detektierbar.

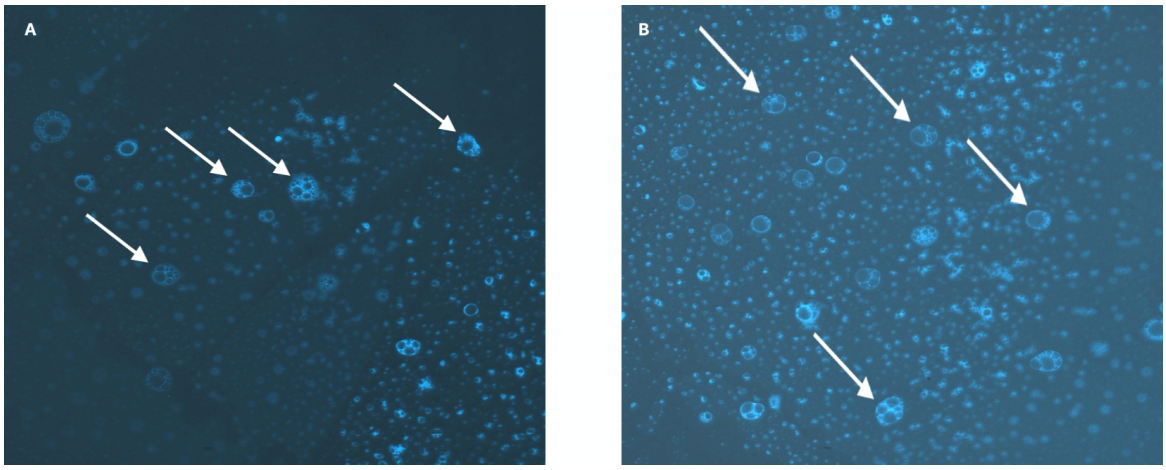


Abbildung 7: UV-bestrahlte KMCH-Zellen (A) und UV-bestrahlte HepG2-Zellen (B); DAPI
KMCH-Zellen (A) und HepG2-Zellen (B) wurden mit 1300µJ/cm^2 bestrahlt. Einfärbung von apoptotischen Zellen mit DAPI nach 24h (weißer Pfeil). Aufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop LSM 710.

4.1.2 UV-Bestrahlung führt zu unterschiedlichen Zelltodprozessen bei KMCH- und HepG2-Zellen

Für den weiteren Nachweis von Apoptose und Nekrose und die genauere Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Körpern ist die Annexin V und PI-Färbung verwendet worden. PI kann die intakte Membran der apoptotischen Körperchen nicht überwinden und Annexin V bindet spezifisch PS, das während der Apoptose an die äußere Zellmembran transloziert. Somit sind Zellen vital, die für Annexin V und PI negativ sind. Zellen mit Annexin V positiver und PI negativer Färbung durchlaufen den apoptotischen Zelltod und Zellen mit positiver Färbung auf PI den

nekrotischen Zelltod. Bei Übergangsformen zwischen Apoptose und Nekrose sind die Zellen für Annexin V und PI positiv. Auf Abbildung 8 sind KMCH-Zellen und HepG2-Zellen nach UV-Bestrahlung zu sehen, die sich gerade im *budding* befindet, da sich mehrere Bläschen von der Zelle abschnüren. Die intakte Zellmembran in der Apoptose erscheint durch das Annexin V grün. Da die nukleären Zellbestandteile mit PI rot angefärbt werden, kann von Nekrose ausgegangen werden. Annexin V und PI positive Zellen sind in einem späten apoptotischen Zelltod mit Übergangsform zur Nekrose.

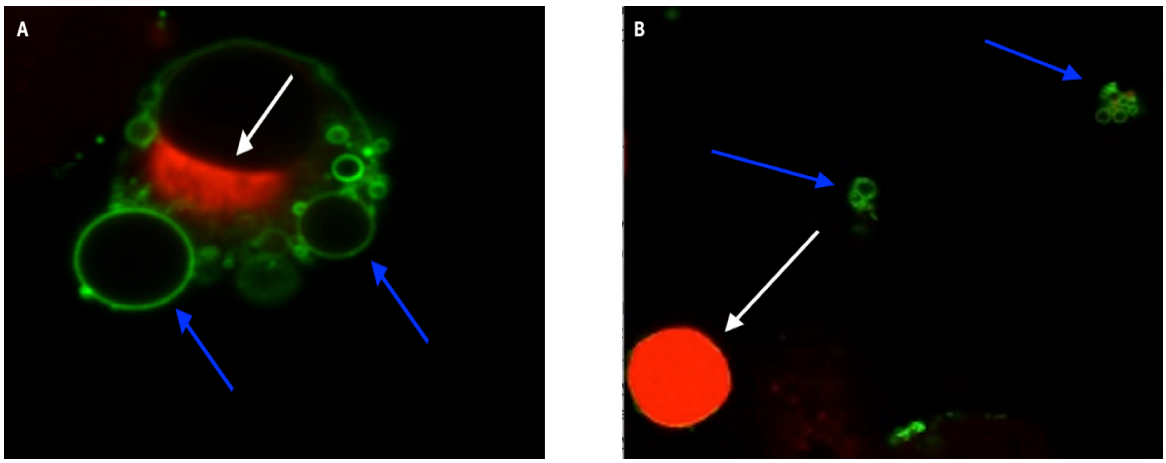


Abbildung 8: UV-bestrahlte KMCH-Zellen (A) und UV-bestrahlte HepG2-Zellen (B); Annexin V und PI

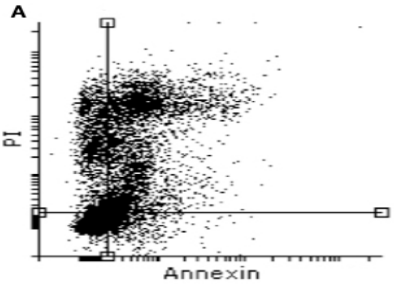
KMCH-Zellen (A) und HepG2-Zellen (B) wurden mit 1300 µJ/cm^2 bestrahlt. Einfärbung nah 24 h einer spät apoptotischen KMCH-Zelle (A) mit Übergangsform zur Nekrose mit PI (rot, weißer Pfeil) und einer apoptotischen KMCH-Zelle mit Annexin V (grün, blauer Pfeil) (A) und HepG2-Zellen (B) mit apoptotischen Bläschen (blauer Pfeil) und Nekrose (weiß). Aufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop LSM 710.

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, um die Rate an Apoptose und Nekrose zu messen. Hierbei wurden 10000 Zellen der UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen ausgewertet und mit unbehandelten HepG2-und KMCH-Zellen verglichen. Dabei wurde die Färbung mit Annexin V und PI (3.8.2) geprüft. Aufgrund eines technischen Fehlers wurden von den unbehandelten KMCH-Zellen statt 10000 nur 8992 ausgezählt. In den restlichen drei Experimenten wurden jeweils 10000 Zellen ausgewertet. Sind die Zellen für PI und Annexin V doppelt negativ, sind diese vital. Einfach positive Zellen für Annexin V stellen die früh apoptotischen Zellen dar und einfach positiv für PI die nekrotischen Zellen. Liegt hingegen eine doppelte Färbung mit Annexin V und PI vor, ist von Zellen im Zwischenstadium von Apoptose und Nekrose auszugehen.

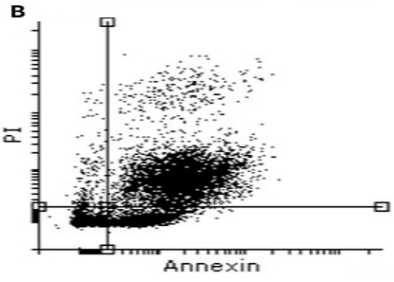
In der Kontrollgruppe sind 75 % der KMCH-Zellen abgestorben. Von diesen fallen 62 % auf im Zwischenstadium befindliche Zellen, 25 % auf nekrotische und 13 % auf apoptotische Zellen. Nach UV-Bestrahlung der KMCH-Zellen liegt der Gesamtzelltod bei 82 %, von denen 62 % im Zwischenstadium, 35 % apoptotisch und 3 % nekrotisch sind. Von den 10000 unbehandelten

HepG2-Zellen sind 32 % in den Zelltod gegangen. Diese Fraktion besteht aus 68 % im Zwischenstadium befindlichen HepG2-Zellen und 22 % in Nekrose. 10 % befinden sich in Apoptose. Nach Bestrahlung mit UV-Licht steigt der Anteil an Zelltod deutlich auf 59 %. Der Zwischenstadium Anteil ist bei 71 % und der apoptotische liegt bei 25 %. Wie bei den UV-bestrahlten KMCH-Zellen befinden sind nach UV-Bestrahlung nur 3 % der HepG2-Zellen in Nekrose (Abbildung 9, Abbildung 10). Die Durchflusszytometrie eignet sich in der Regel vor allem für Zellen ohne Zelladhäsionskontakt. Da die KMCH-und HepG2-Zellen in einer adhärenten Zellkultur wachsen, kann hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass allein durch die für die Quantifizierung notwendige Ablösung der Zellen ein Anteil in den Zelltod getrieben werden. Ein bestimmtes Protokoll für die Präparation der HepG2-und KMCH-Zellen bei der Anwendung in der Durchflusszytometrie besteht nicht. Die Zellen wurden lediglich wie in 3.3.4 beschrieben behandelt. Somit ist das Ergebnis nur eingeschränkt bei der Auswertung beurteilbar.

Die UV-Bestrahlung führt in beiden Zelllinien zu vermehrtem Zelltod. Anscheinend wird durch UV-Bestrahlung vermehrt apoptotischer Zelltod ausgelöst, dessen Anteil bei beiden Zelllinien nach UV-Behandlung zunimmt, wohin Zwischenstadien nur noch einen geringen Anteil ausmachen. Durch die niedrige Vitalität unbehandelter KMCH wurde das Experiment nur einmalig durchgeführt, daher kann auch keine statistische Auswertung dieses Experiments erfolgen.



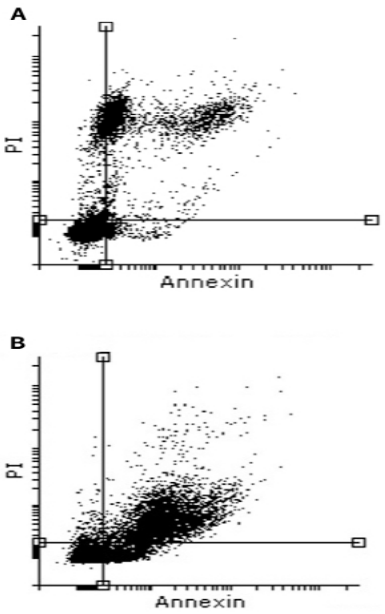
	Events	% of Vis
All events	8.992	100,00
Left Bottom	2.237	24,88
Right Bottom	876	9,74
Left Top	1.690	18,79
Right Top	4.189	46,59



	Events	% of Vis
All events	10.000	100,00
Left Bottom	1.827	18,27
Right Bottom	2.772	27,72
Left Top	209	2,09
Right Top	5.192	51,92

Abbildung 9: Durchflusszytometrie von nicht behandelten (A) und UV-bestrahlten KMCH-Zellen (B)

Der Zelltod wurde in den KMCH-Zellen mit UV-Bestrahlung von 1300 µJ/cm2 induziert. Die Zellen wurden 24 h nach Behandlung mit Annexin V und PI eingefärbt und in einer Durchflusszytometrie sortiert und gezählt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte KMCH-Zellen benutzt. Left Bottom = Annexin V und PI negativ, Right Bottom = Annexin V positiv, Left Top = PI positiv, Right Top = Annexin V und PI positiv (n = 1).



	Events	% of Vis
All events	10.000	100,00
Left Bottom	6.753	67,53
Right Bottom	316	3,16
Left Top	717	7,17
Right Top	2.214	22,14

	Events	% of Vis
All events	10.000	100,00
Left Bottom	4.144	41,44
Right Bottom	1.468	14,68
Left Top	228	2,28
Right Top	4.160	41,60

Abbildung 10: Durchflusszytometrie von nicht behandelten (A) und UV-bestrahlten HepG2-Zellen (B)

Der Zelltod wurde in den HepG2-Zellen mit UV-Bestrahlung von 1300 µJ/cm2 induziert. Die Zellen wurden 24 h nach Behandlung mit Annexin V und PI angefärbt und in einer Durchflusszytometrie sortiert und gezählt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte HepG2-Zellen benutzt. Left Bottom = Annexin V und PI negativ, Right Bottom = Annexin V positiv, Left Top = PI positiv, Right Top = Annexin V und PI positiv (n = 1).

4.2 KMCH-Zellen binden UV-bestrahlte KMCH- und HepG2-Zellen

Die Immunzytochemie ermöglicht die Färbung bestimmter Zellstrukturen. In dieser Arbeit wurden die Farbstoffe PKH26 und PKH67 (3.8.4) verwendet, die sich unabhängig vom Zellmetabolismus in die Zellmembran integrieren und spezifisch anfärben. Die immunzytochemische Färbung ist sowohl mit vitalen als auch sterbenden bzw. toten Zellen möglich. Die Zellmembran der unbehandelten KMCH-Zellen wurde mit PKH26 rot und die Zellmembran der UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen mit PKH67 grün angefärbt. Zuvor unbehandelte KMCH-Zellen wurden dann mit den UV-bestrahlten KMCH-Zellen 24 h inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer Z1 Apo Tome) ist erkennbar, dass Partikel, Zellfragmente bzw. apoptotische Körperchen der UV-bestrahlten KMCH-Zellen an der Zellmembran intakter KMCH-Zellen binden und sich zum Teil nach Phagozytose im Zytoplasma befinden (Abbildung 11).

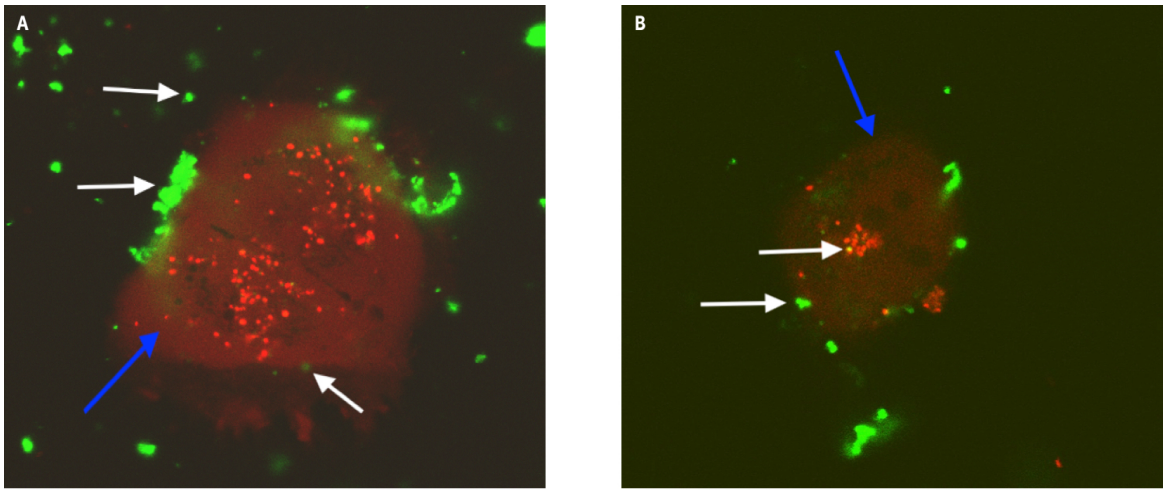


Abbildung 11: KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen (A) und UV-bestrahlten HepG2-Zellen (B); PKH26 und PKH67

Die KMCH-Zelle wurde mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen (A) und UV-bestrahlten HepG2-Zellen (B) für 24 h behandelt. Einfärbung der KMCH-Zelle mit PKH26 (rot, blauer Pfeil) und UV-bestrahlte KMCH-Zellen (A) und UV-bestrahlten HepG2-Zellen (B) mit PKH67 (grün, weißer Pfeil). Aufnahme mit Workflow LSM 710.

4.2.1 Live-Cell Imaging

Das Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 Apo Tome ist in der Lage unter Inkubationsbedingungen KMCH-Zellen unter Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2- und KMCH über einen Zeitverlauf von 24 h alle 20 min ein Bild aufzuzeichnen (8.4). Die Färbung der Zellmembran der unbehandelten KMCH-Zellen erfolgte hierbei ebenfalls mit PKH26 und die UV-bestrahlten HepG2-und KMCH-Zellen mit PKH67. In Abbildung 12 ist eine KMCH-Zelle im zeitlichen Verlauf von 24 h unter Inkubation mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen dargestellt. In den Abschnitten A-C werden die UV-bestrahlten HepG2-Zellen an die intakte Zellmembran der KMCH-Zellen gebunden. Zum Teil werden diese von der KMCH-Zelle aufgenommen und befinden sich im Zytoplasma. In der Peripherie sind noch apoptotische Körperchen zu erkennen. Die KMCH-Zelle nimmt eine runde Form an (D) und es sind Zellabschnürungen erkennbar (E, F).

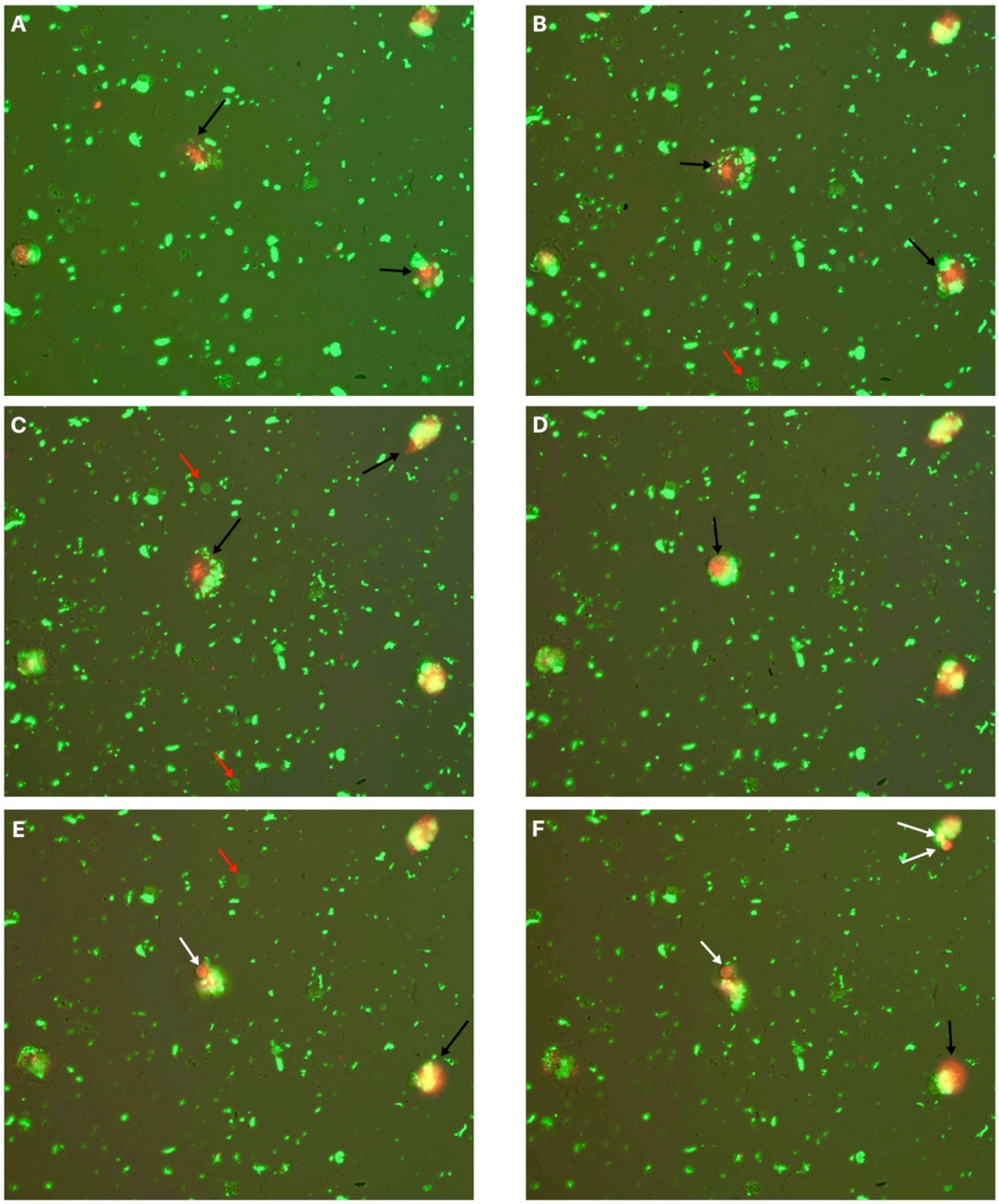


Abbildung 12: KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen über 24 h
Färbung der KMCH-Zellen mit PKH26 in rot und der UV-bestrahlten HepG2-Zellen mit PKH67 in grün. Vereinzelte Darstellung von apoptotischen Körperchen (roter Pfeil). UV-bestrahlte HepG2-Zellen werden an die intakte Membran der KMCH-Zellen gebunden (A-C, schwarzer Pfeil) und nimmt eine runde Form an (D-E). Vereinzelt kommt es zu Zellabschnürungen (E-F, weißer Pfeil). Aufnahme der KMCH-Zellen über 24 h unter Inkubationsbedingung mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 ApoTome.

In Abbildung 13 ist die 24h Live-Cell Aufnahme der KMCH-Zelle unter Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen mit ähnlichen Beobachtungen wie oben beschrieben zu sehen. Nach Bindung und Aufnahme von Fragmenten der UV-bestrahlten KMCH-Zellen (A-B) nimmt die

KMCH-Zelle ebenfalls eine runde Form an (C). Es kommt zu Zellabschnürungen (D), angedeutet durch eine geteilte Zelle, und die KMCH-Zelle nimmt wieder ihre ursprüngliche längliche Zellform an. Jedoch enthält diese nun mehrere UV-bestrahlten KMCH-Zellen (E, F)

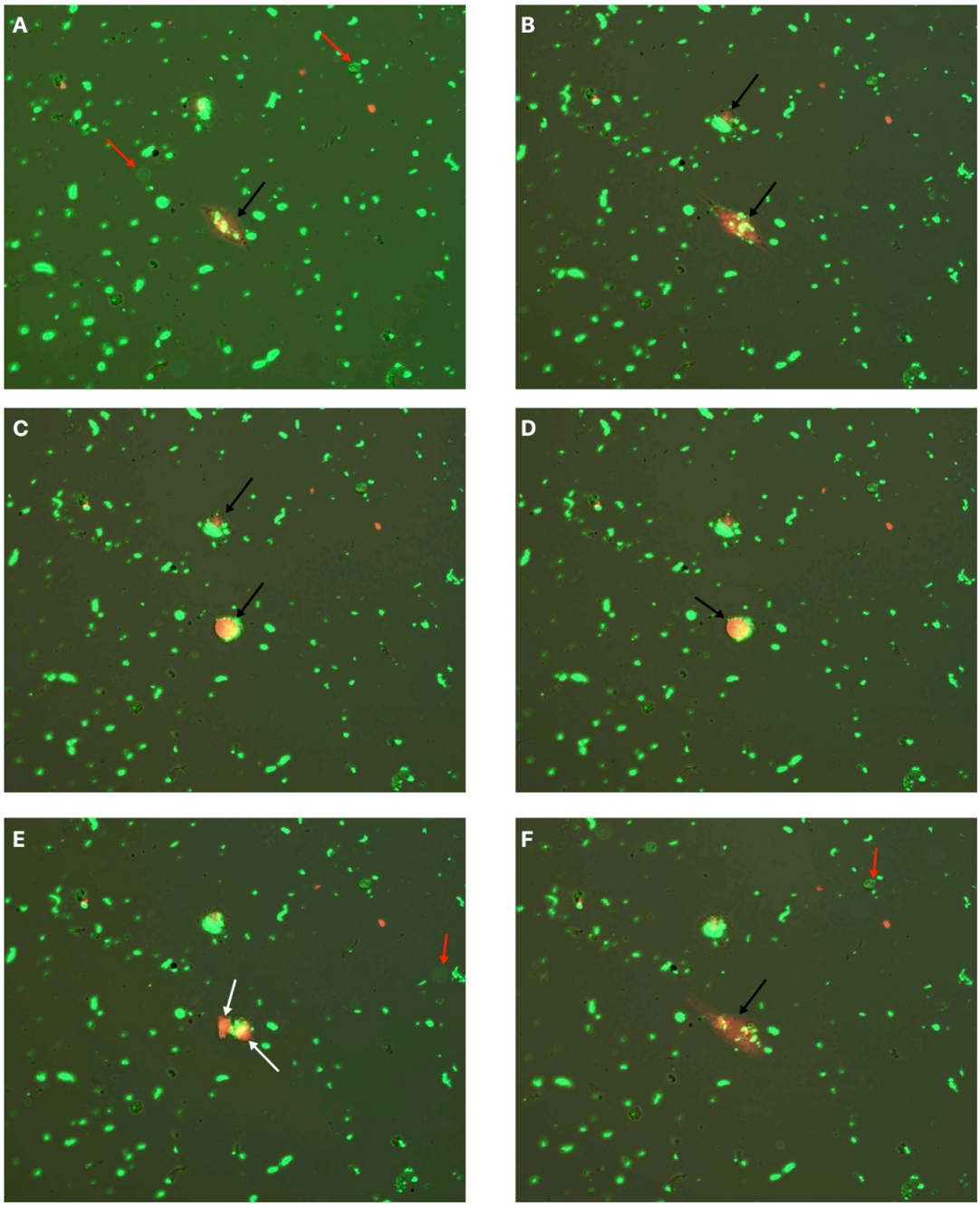


Abbildung 13: KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen über 24 h

Färbung der KMCH-Zellen mit PKH26 in rot und der UV-bestrahlten KMCH-Zellen mit PKH67 in grün. Vereinzelte Darstellung von apoptotischen Körperchen (roter Pfeil). UV-bestrahlte KMCH-Zellen werden an intakte Membran der KMCH-Zellen gebunden (A-B, schwarzer Pfeil) und nimmt eine runde Form an (C). Es kommt zur Zellabschnürungen (D, weißer Pfeil) und Ausbildung der ursprünglichen länglichen Zellform (F). Aufnahme der KMCH-Zellen über 24 h unter Inkubationsbedingung mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 ApoTome.

4.3 KMCH-Zellen scheinen anti-apoptotisch auf Phagozytose von UV-bestrahlten KMCH-Zellen und apoptotisch auf Phagozytose von UV-bestrahlten HepG2-Zellen zu reagieren

Um die Frage zu klären, ob die Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen Einfluss auf den Zelltod in den KMCH-Zellen hat, wurden die Apoptoserate mittels M30®-ELISA und die Gesamtzelltodrate mittels M65®-ELISA quantifiziert. Dafür wurden die KMCH-Zellen jeweils in geringer Zelldichte von 2,5 x 10^5 bestrahlten HepG2 oder KMCH-Zellen bzw. einer hohen Zelldichte von 5 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2 oder KMCH-Zellen behandelt. Die KMCH-Zellen wurden entweder 24 h oder 48 h mit den bestrahlten Zellen inkubiert und die Ergebnisse in Abbildung 14 zusammengefasst. Die Freisetzung von gesamtem CK18 (M65) bzw. Caspase-gespaltenem CK18 (M30) wurde anschließend im Überstand der Zellkultur bestimmt.

Bezogen auf die Kontrollgruppe zeigt sich ein signifikanter Abfall der M65-Werte von 79 % in den KMCH-Zellen nach 24 h Behandlung mit 2,5 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen und eine Verdopplung in den KMCH-Zellen, die mit 5 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2-Zellen für 48 h behandelt wurden. Ansonsten besteht kein Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten KMCH-Zellen. Im Gegensatz dazu ist der Gesamtzelltod in den KMCH-Zellen, die mit 2,5 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2 für 24 h behandelt wurden, um das 6,3-fache höher als in KMCH-Zellen, die mit 2,5 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen behandelt wurden und um das 3-fache höher als in KMCH-Zellen mit einer Behandlung von 5 x 10^5 UV-bestrahlten-KMCH-Zellen. Nach 48 h Inkubation der KMCH-Zellen mit 2,5 x 10^5 UV-bestrahlten-HepG2-Zellen ist die M65 Rate um das 7,5-fache höher als in KMCH-Zellen, die mit 2,5 x 10^5 UV-bestrahlten-KMCH-Zellen behandelt wurden, und um das 3,4-fache höher als in den KMCH-Zellen, die mit 5 x 10^5 UV-bestrahlten-KMCH-Zellen inkubiert wurden. KMCH-Zellen unter Behandlung mit 5 x 10^5 UV-bestrahlten-HepG2-Zellen wiesen nach 24 h eine 8 x höhere M65 Konzentration als in den KMCH, die mit 2,5 x 10^5 UV-bestrahlten-KMCH-Zellen behandelt wurden, und eine 3,8 x höhere M65 Konzentration als in den KMCH, die mit 5 x 10^5 UV-bestrahlten-KMCH-Zellen behandelt wurden auf. Ähnliche Konzentrationsunterschiede wurden bei einer Behandlungsdauer von 48 h beobachtet. Der Gesamtzelltod in KMCH-Zellen unter Behandlung mit 5 x 10^5 UV-bestrahlten-HepG2-Zellen ist um das 8,3-fache erhöht im Vergleich zu den KMCH-Zellen unter Behandlung mit 2,5 x 10^5 UV-bestrahlten-KMCH-Zellen und um das 3,8-fach höher als in KMCH-Zellen, die mit 5 x 10^5 UV-bestrahlten-KMCH-Zellen behandelt wurden. In der M30-Konzentration im Zellkulturüberstand bzw. in der Apoptoserate ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h unabhängig von der Behandlung oder dem Zelltyp kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Da dieser Versuch nur einmalig durchgeführt wurde, ist er statistisch in dieser Arbeit nicht zu verwerten und wird nur der Vollständigkeit aufgeführt. Jedoch ergeben sich Hinweise, dass eine Behandlung der KMCH-Zellen mit niedrig konzentrierten UV-bestrahlten KMCH-Zellen für 24 h

eine verminderte Gesamtzelltodrate zur Folge hat. Eine Behandlung mit hoch konzentrierten UV-bestrahlten HepG2-Zellen für 48 h hat jedoch eine erhöhte Gesamtzelltodrate in KMCH-Zellen zur Folge. Ebenfalls kommt es unabhängig von der Behandlungsdauer sowohl bei niedrig konzentrierten als auch bei hoch konzentrierten Behandlungen mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen zu einer höheren Gesamtzelltodrate in den KMCH-Zellen als bei der Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen. Da die M30 Rate nicht erhöht ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hauptsächlich um nekrotischen Zelltod handelt.

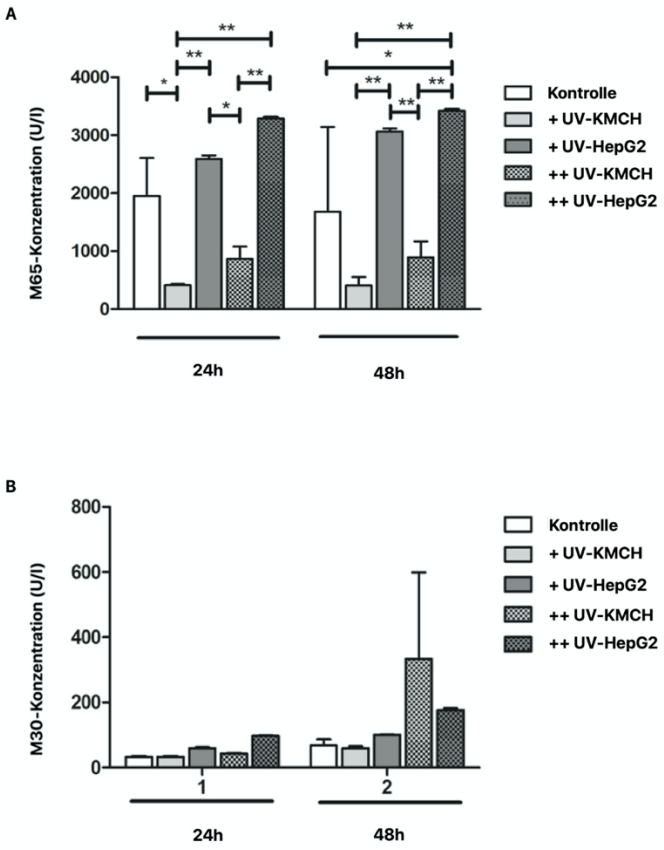


Abbildung 14: Quantifizierung von M65 (A) und M30 (B) in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen

Die KMCH-Zellen wurden mit einer Konzentration von 2,5 x 10^5 (+) und 5 x 10^5 (++) UV-bestrahlten KMCH und HepG2-Zellen behandelt. Die Behandlung erfolgte 24 h und 48 h. Messung der M65 (A) und M30 (B) Konzentrationen in U/l mit M65®-ELISA und M30-Apoptosense ®. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, (Mittelwert ± SEM, n = 1).

4.4 KMCH-Zellen zeigen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH- und HepG2-Zellen eine erhöhte metabolische Zellaktivität

Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität der KMCH-Zellen nach Behandlung wurde ein MTT-Viabilitätstest (3.4) durchgeführt. Nach Zugabe der Testlösung MTT und Aufnahme durch die Zellen wird diese durch mitochondriale Enzyme reduziert. Dabei entsteht Formazan (violett), welches nach Freisetzung mittels Photometrie detektiert wird und als Surrogat Marker für metabolische Aktivität in Zellen verwendet werden kann. Hierfür wurde die Konzentration der UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt (3.3.3) und auf 1 x 10^5, 2 x 10^5 und 3 x 10^5 eingestellt. Die Dauer der Behandlung wurde auf 24 h, 48 h oder 72 h festgesetzt. In Abbildung 15 ist die metabolische Aktivität der KMCH-Zellen unter Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen dargestellt.

Unter einer Behandlungsdauer von 24 h ist kein Anstieg der metabolischen Aktivität in KMCH-Zellen zu verzeichnen. Bei der Behandlung der KMCH-Zellen mit 3 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2-Zellen für 48 h steigt die metabolische Aktivität, angegeben in *arbitrary unit* (a. u.), von 1 auf 1,43 an. Die mit 1 x 10^5 und 2 x 10^5 behandelten KMCH-Zellen zeigen keinen signifikanten Anstieg. Dieser ist erst nach 72 h von 1 auf 1,47 in KMCH-Zellen bei einer Behandlung mit 1 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2-Zellen und von 1 auf 1,54 in KMCH-Zellen, die mit 2 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2-Zellen behandelt wurden, zu verzeichnen. KMCH-Zellen mit einer Konzentration von 3 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2-Zellen weisen keine erhöhte metabolische Aktivität auf.

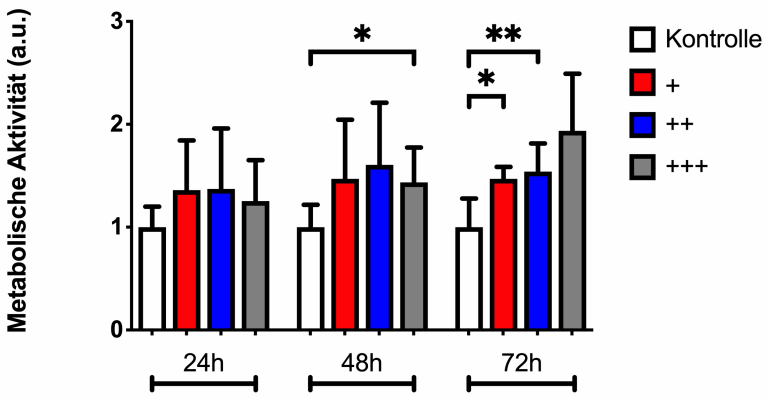


Abbildung 15: Metabolische Aktivität der KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen

KMCH-Zellen wurden mit Konzentrationen von 1 x 10^5 (+), 2 x 10^5 (++) und 3 x 10^5 (+++) UV-bestrahlten HepG2-Zellen behandelt. Zur Kontrolle wurden nicht behandelte KMCH-Zellen benutzt. Die metabolische Aktivität (a.u.) der KMCH-Zellen wurde nach 24 h, 48 h und 72 h mit dem MTT-Viabilitätstest gemessen. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ (Mittelwert ± SEM, n = 3).

Bei der Behandlung der KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen (Abbildung 16) wurden dieselben Konzentrationen und Behandlungszeiträume gewählt, wie bei der Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2 Zellen. Die metabolische Aktivität der KMCH-Zellen ist zu jedem Zeitpunkt und bei jeder Konzentration gegenüber unbehandelten KMCH-Zellen signifikant erhöht. Dabei ist ein Anstieg von 1 auf 1,58 in der Behandlung mit 1 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen und ein doppelt so hoher Anstieg in der Behandlung mit 2 x 10^5 und 3 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen erkennbar. Bei einer Behandlungsdauer von 48 h ist der größte Anstieg der metabolischen Aktivität vorhanden. Bei der Behandlung mit 1 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen steigt die metabolische Aktivität von 1 auf fast 2, mit 2 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen von 1 auf 2,3 und mit 3 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen von 1 auf 2,6. Nach 72 h Behandlungsdauer weisen die KMCH-Zellen einen Anstieg der metabolischen Aktivität von 1 auf 1,66 nach Behandlung mit 1 x 10^5, von 1 auf 2,08 mit 2 x 10^5 und von 1 auf 2,2 mit 3 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen auf. Wie bei der Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen treten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlich gewählten Konzentrationen an UV-bestrahlten KMCH-Zellen auf.

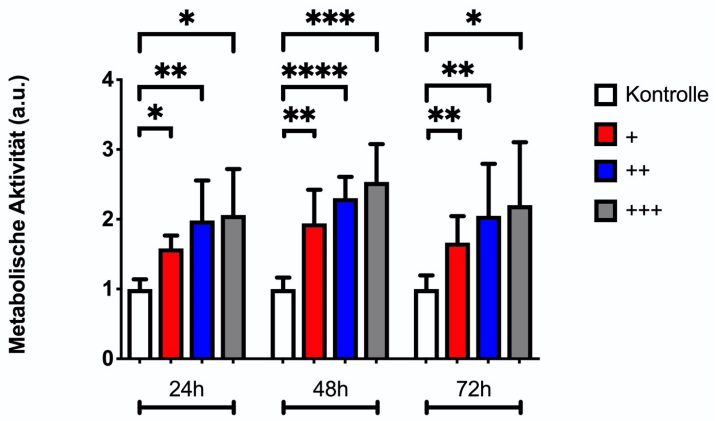


Abbildung 16: Metabolische Aktivität der KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen

KMCH-Zellen wurden mit Konzentrationen von 1 x 10^5 (+), 2 x 10^5 (++) und 3 x 10^5 (+++) UV-bestrahlten KMCH-Zellen behandelt. Zur Kontrolle wurden nicht behandelte KMCH-Zellen benutzt. Die metabolische Aktivität (a.u.) der KMCH-Zellen wurde nach 24 h, 48 h und 72 h mit dem MTT-Viabilitätstest gemessen. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$ (Mittelwert ± SEM, n = 3).

Zusammenfassend scheint die Behandlung von KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten Zellen die Metabolisierung bestimmter Substanzen zu steigern. Es besteht dabei kein Zusammenhang zwischen der Konzentration der UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen. Die Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen hat einen stärkeren Einfluss auf den Zellmetabolismus als UV-bestrahlte HepG2-Zellen. Zudem zeigte sich ein Anstieg der metabolischen Aktivität der KMCH bei Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen erst nach einer Inkubationszeit von 48 h und 72 h im Vergleich zu den KMCH-Zellen, die mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen inkubiert wurden. Da in der Durchflusszytometrie auch ein gewisser Anteil an KMCH- und HepG2-Zellen nach UV-Bestrahlung nicht der Zelltod ausgelöst wurde, erfolgte der MTT-Test nur mit UV-bestrahlten Zellen, ohne diese auf unbehandelte KMCH-Zellen zu überführen. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass die erhöhte metabolische Aktivität der KMCH-Zellen nach Behandlung durch die hinzugefügten lebenden Zellen zustande kommt. Hierfür wurden Konzentrationen von 0,5 x 10^5, 1 x 10^5 und 2 x 10^5 UV-bestrahlte KMCH oder HepG2-Zellen verwendet. Als Zeitdauer der Behandlung wurden 24 h, 48 h und 72 h gewählt. Außerdem wurde die Hintergrundaktivität der MTT-Lösung ohne Zellen bestimmt. Als Referenz wurde zusätzlich die metabolische Aktivität von unbehandelten KMCH und als zusätzliche Kontrolle von KMCH-Zellen, die mit 0,5 x 10^5, 1 x 10^5 und 2 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH- oder HepG2-Zellen behandelt wurden, bestimmt. In Abbildung 17 und Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die metabolische Aktivität der UV-bestrahlten KMCH-und HepG2-Zellen niedriger ist als in der Kontrolle. Ebenfalls hat die MTT-Lösung selbst auch eine vergleichbare metabolische

Aktivität, obwohl keine Zellen vorhanden sind. Dies lässt vermuten, dass der Anstieg metabolischer Aktivität bei KMCH-Zellen mit Zugabe UV-bestrahlter KMCH oder HepG2-Zellen nicht auf verbliebene lebende Zellen zurückzuführen ist. Da das Experiment nur als Orientierung diente, wurde das Experiment nur einmalig durchgeführt und es kann auch keine statistische Auswertung erfolgen.

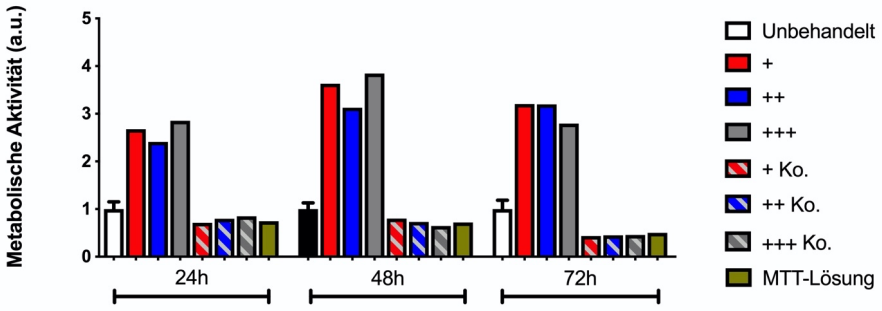


Abbildung 17: Metabolische Aktivität von unbehandelten KMCH-Zellen, KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen und MTT-Lösung nach 24 h, 48 h und 72 h

KMCH-Zellen wurden mit Konzentrationen von 0,5 x 10^5 (+), 1 x 10^5 (++) und 2 x 10^5 (+++) UV-bestrahlten KMCH-Zellen behandelt. Zusätzlich wurde als Kontrolle (Ko.) die metabolische Aktivität (a.u.) nur von UV-bestrahlten KMCH-Zellen in Konzentrationen von 0,5 x 10^5 (+), 1 x 10^5 (++) und 2 x 10^5 (+++) und der MTT-Lösung bestimmt. Zum Vergleich wurden nicht behandelte KMCH-Zellen benutzt. Die Messung erfolgte nach 24 h, 48 h und 72 h mit dem MTT-Viabilitätstest (n = 1).

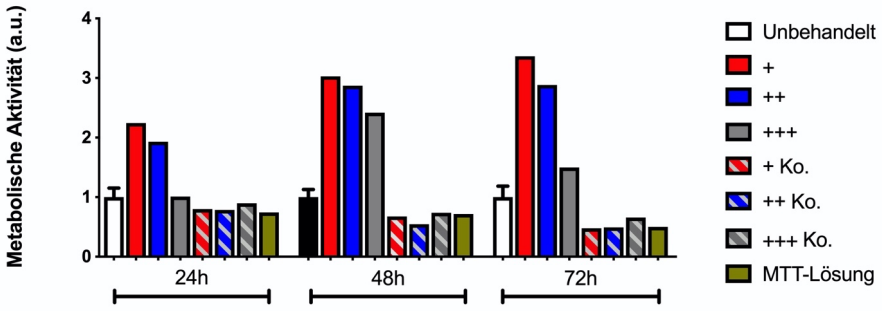


Abbildung 18: Metabolische Aktivität von unbehandelten KMCH-Zellen, KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen und MTT-Lösung nach 24 h, 48 h und 72 h

KMCH-Zellen wurden mit Konzentrationen von 0,5 x 10^5 (+), 1 x 10^5 (++) und 2 x 10^5 (+++) UV-bestrahlten HepG2-Zellen behandelt. Zusätzlich wurde als Kontrolle (Ko.) die metabolische Aktivität (a.u.) nur von UV-bestrahlten HepG2-Zellen in Konzentrationen von 0,5 x 10^5 (+), 1 x 10^5 (++) und 2 x 10^5 (+++) und der MTT-Lösung bestimmt. Zum Vergleich wurden nicht behandelte KMCH-Zellen benutzt. Die Messung erfolgte nach 24 h, 48 h und 72 h mit dem MTT-Viabilitätstest (n = 1).

Zusätzlich wurde geprüft, ob aus UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen Zellkolonien bilden können. Dafür wurden HepG2-Zellen und KMCH-Zellen mit UV-Licht bestrahlt und in eine 6-Well-Platte ausgesät und für 24 h beobachtet. Exemplarisch zeigt Abbildung 19 nur schwimmende, abgestorbene Zellbestandteile von UV-bestrahlten HepG2-Zellen ohne jegliche Zelladhäsion an den Boden der Platte zu erkennen. Bei UV-bestrahlten KMCH-Zellen konnte ebenfalls keine Zelladhäsion in der lichtmikroskopischen Aufnahme festgestellt werden.

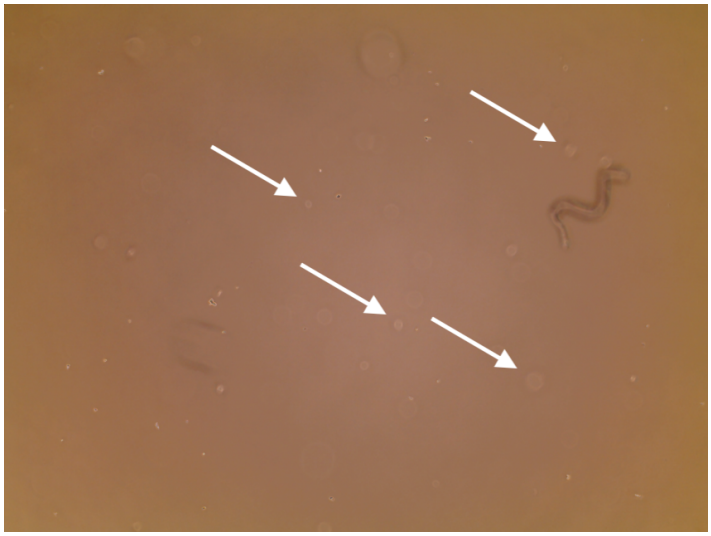


Abbildung 19: UV-bestrahlte HepG2-Zellen nach 24h

Darstellung von UV-bestrahlten schwimmende HepG2-Zellen ohne Zelladhäsion (Pfeil) nach 24 h Inkubationszeit. Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 20x) (n = 1).

Zusammenfassend haben die UV-bestrahlten Zellen noch einen gewissen Anteil an lebendigen Zellen, von denen auch eine restliche metabolische Aktivität ausgeht. Jedoch reicht dieser Anteil nicht aus, um eine Zellkultur zu bilden und stellt vermutlich keinen Faktor dar, der die erhöhte metabolische Aktivität der KMCH-Zellen erklären könnte, die mit UV-bestrahlten Zellen behandelt wurden.

4.5 UV-bestrahlte KMCH- und HepG2-Zellen könnten einen Proliferationsreiz für KMCH-Zellen darstellen

4.5.1 Erhöhte Expression von KI-67 in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen

Da die Behandlung von KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten KMCH-oder HepG2-Zellen zu Phagozytose mit morphologischen Zeichen von Zellabschnürungen, sowie einer erhöhten

metabolischen Aktivität führte, wurde die Hypothese geprüft, ob die Behandlung mit UV-behandelten Zellen bei KMCH-Zellen einen Proliferationsreiz ausübt. Hierzu wurde in KMCH-Zellen KI67-Antigen, ein Proliferationsmarker, mittels Immunzytochemie quantifiziert. Dabei werden durch die Bindung eines markierten Antikörpers an das KI-67 Antigen sich teilende Zellen in der Interphase farblich markiert (Abbildung 20) und quantitativ ermittelt. Die gewählte Konzentration der UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen betrug 2×10^5 und 4×10^5 und die Behandlung erfolgte über 12 h. Zuvor wurden 1×10^6 KMCH-Zellen ausgesät.

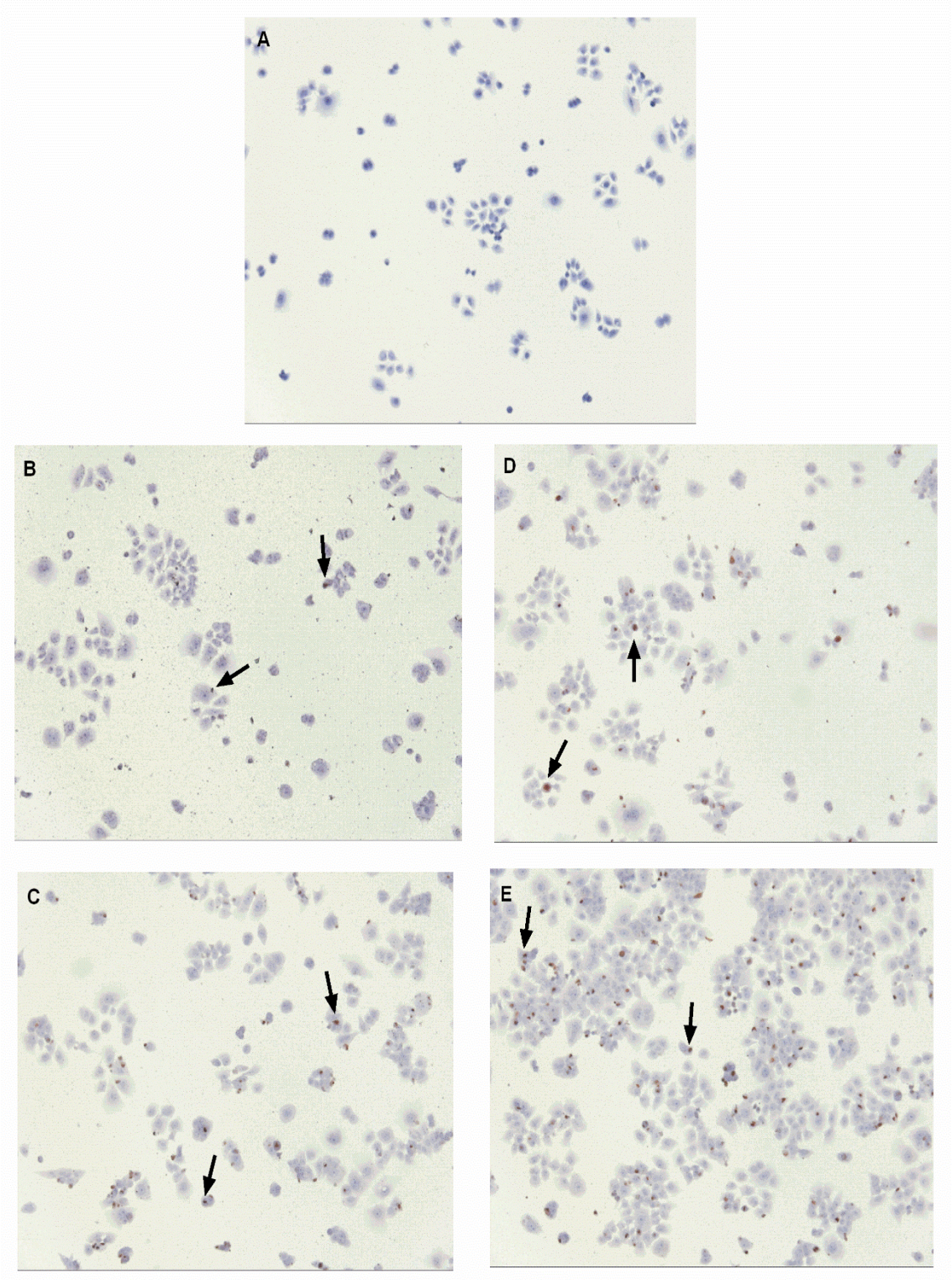


Abbildung 20: KI-67 Immunzytochemie von unbehandelten und behandelten KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten HepG2 (B, C) - und KMCH-Zellen (D, E)

Darstellung von KI-67 Antigen mittels Bindung von farblich markierten Antikörpern (braun, Pfeil) von unbehandelten KMCH-Zellen (A) und behandelten KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten HepG2 (B, C) und KMCH-Zellen (D, E) nach 12 h Behandlungsdauer. Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 10x).

Zur Quantifizierung wurden farblich markierte KI-67 Antigen positive KMCH-Zellen ausgezählt und ein Quotient zu den KI-67 Antigen negativen Zellen gebildet. In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass in der Kontrollgruppe nur wenig KI-67 Antigen in den KMCH- Zellen mit dem KI-67 Antikörper angefärbt im Gegensatz zu den KMCH-Zellen, die mit UV-bestrahlten Zellen behandelt wurden. In den KMCH-Zellen, die mit 2 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2-Zellen behandelt wurden, ist ein 6-facher und bei Behandlung mit 4 x 10^5 ein 7,8-facher Anstieg der KI-67 Antigen Expression zu den unbehandelten KMCH-Zellen vorhanden. Bei der Behandlung der KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen zeigen sich ähnliche Ergebnisse. In den KMCH-Zellen mit einer Konzentration von 2 x 10^5 ist eine 4,9-fache und von 4 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen eine 9,5-fache Zunahme zu den nicht behandelten KMCH-Zellen zu verzeichnen. Zwischen der Behandlung mit 2 x 10^5 und 4 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen ist ein Anstieg der KI67-Antigenexpression um das Doppelte zu erkennen. Die Expression des Proliferationsmarker ist in der Probe mit 4 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2-Zellen ebenfalls um 1,6-fache höher als in der Behandlung mit 2 x 10^5 UV-bestrahlte KMCH-Zellen.

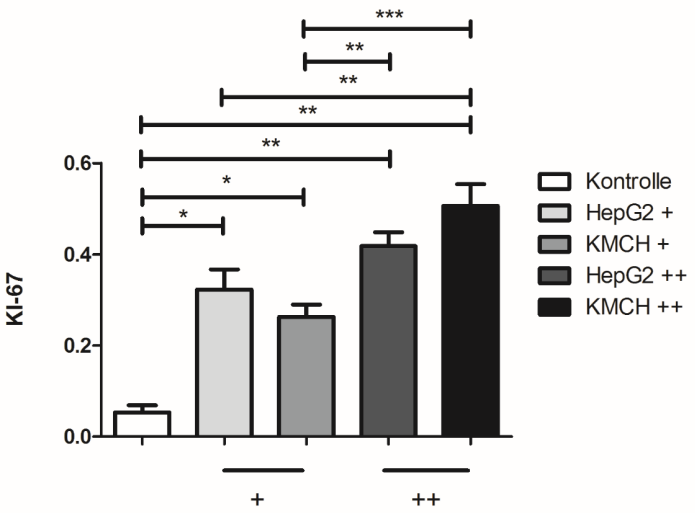


Abbildung 21: Quantifizierung der KI-67 Antigenexpression mittels immunzytochemisch gefärbten KMCH-Zellen

Anzeige im Quotienten zwischen KI-67 Antigen positiven und negativen KMCH-Zellen. Behandlung mit 2 x 10^5 (+) und 4 x 10^5 (++) UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen. Quantifizierung der KI-67 positiven KMCH-Zellen pro Gesamtzellzahl von n (Kontrolle) = 4 Gesichtsfelder, n (UV-bestrahlte HepG2 oder KMCH-Zellen +) = 4 Gesichtsfelder, n (UV-bestrahlte HepG2 oder KMCH-Zellen ++) = 4 Gesichtsfelder. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$ (Mittelwert ± SEM, n = 3).

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass sowohl die Behandlung mit niedrig konzentrierten ($p<0,05$) als auch mit hoch konzentrierten UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen ($p<0,01$) zu einer signifikanten Erhöhung des KI-67 Proteins im Vergleich zu den unbehandelten KMCH-Zellen führt. Dabei scheint es einen linearen Zusammenhang, eine Dosisabhängigkeit, zwischen Konzentration der UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen und KI-67-Konzentration zu geben. Da KI-67 ein sensitiver Proliferationsmarker ist, hat die Behandlung der KMCH-Zellen anscheinend Einfluss auf den aktiven Zellzyklus in der G1, G2, S und M-Phase.

4.5.2 Die Behandlung von KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten KMCH- und HepG2-Zellen haben keinen Einfluss auf die PCNA-Expression und Zellmigration

Anschließend wurde die Proliferationsrate auf Proteinebene mittels Western-Blot mit Darstellung des Proliferationsmarkers PCNA geprüft (4.3). PCNA ist ein Proliferationsmarker, welcher spezifisch für die S-Phase des Zellzyklus ist. Dabei wurden Protein-Isolate aus unbehandelten und behandelten KMCH-Zellen auf ein Acryl-Amid-Gel aufgetragen. Mittels Gelelektrophorese wurden die enthaltenen Proteine nach ihrem molekularen Gewicht und ihrer Ladung aufgetrennt. Anhand der Auftrennung der Proteinbanden lassen sich mittels spezifischer Antikörper gezielt Proteine detektieren. Hierfür wurde die Expression des Proteins PCNA geprüft und als Referenzprotein ß-Actin verwendet. Die Behandlung der KMCH-Zellen erfolgte 24h und zur Vereinfachung mit einer Konzentration von 8×10^5 UV-bestrahlten KMCH bzw. HepG2-Zellen. Es zeigte sich kein signifikanter Anstieg der PCNA Expression in den KMCH-Zellen sowohl mit Behandlung von UV-bestrahlen KMCH-als auch mit HepG2-Zellen (Abbildung 22).

Abschließend kann davon ausgegangen werden, dass die Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen keinen Einfluss auf die PCNA-Expression und der damit verbundenen S-Phase des Zellzyklus hat.

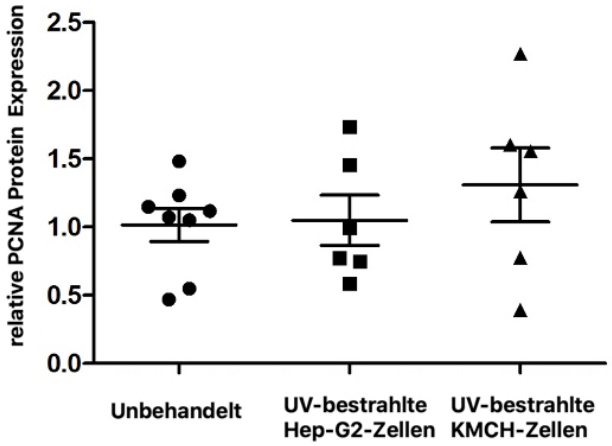


Abbildung 22: Relative PCNA Expression in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen und KMCH-Zellen für 24 h im Vergleich zu nicht behandelten KMCH-Zellen

Anzeige der Rohdaten der relativen PCNA Expression in KMCH-Zellen nach 24 h Behandlung mit 8 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen. Als Referenzgen wurde ß-Actin und zur Kontrolle unbehandelte KMCH-Zellen eingesetzt (n = 4).

Zusätzlich wurde die Zellmigration und Proliferation mit dem *Scratch assay* geprüft (3.6). Dabei wird angenommen, dass die entstandene Lücke im Zellrasen durch Zellproliferation und nicht unbedingt durch Zellmigration geschlossen wird. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Behandlung der KMCH-Zellen weder mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen noch mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen nach 12 h (Abbildung 23).

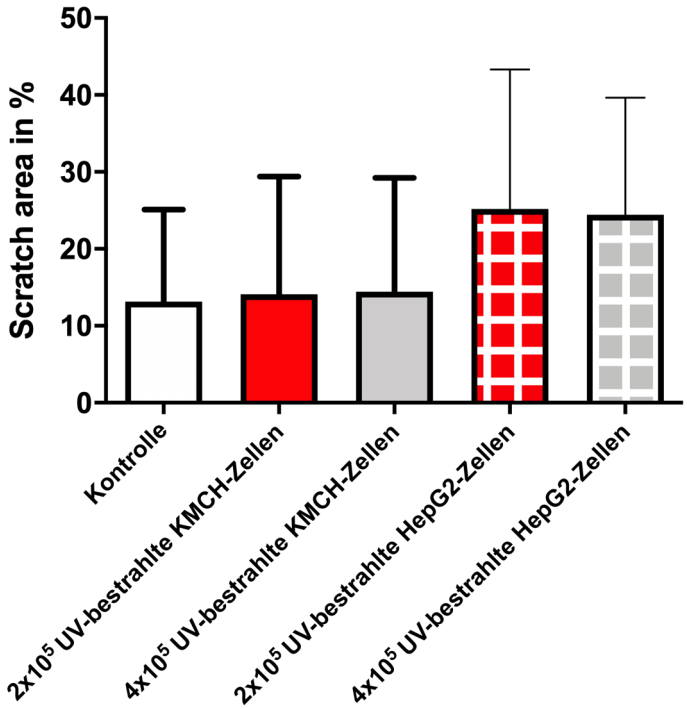


Abbildung 23: *Scratch assay* mit Darstellung der *scratch area* in Prozent

Darstellung der *Scratch area* des KMCH-Zellrasen nach 12 h Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von UV-bestrahlten KMCH-und HepG2-Zellen (T0/T1). Als Kontrolle wurden unbehandelte KMCH-Zellen benutzt (n = 3).

4.6 KMCH-Zellen zeigen unterschiedliche Genexpression bei Phagozytose von UV-bestrahlten KMCH-Zellen und HepG2-Zellen

Da die KMCH-Zellen bei Behandlung mit UV-bestrahlten Zellen Zeichen von Proliferation und gesteigerter metabolischer Aktivität zeigen, sollte ein Einfluss der Behandlung auf die Expression von Zielgenen verschiedener Signalwege und Prozesse untersucht werden. Hier wurde mittels qRT-PCR vor allem die mRNA-Expression von Genen untersucht, die an der Fibrinogenese, Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und dem Fetttransport beteiligt sind. Hierzu zählen: α-SMA, Bcl2, CD95/FAS, COl1-a, E2F1, FATP5, SOX9, S100A4 und TGF-b. Als Referenzgen wurde SDHA benutzt.

4.6.1 Erhöhte Genexpression von SOX9 in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen

In Abbildung 24 ist die Genexpression der oben genannten Gene in den KMCH-Zellen nach Behandlung von 24 h mit 2 x 10^5 und 4 x 10^5 UV-bestrahlten HepG2-Zellen dargestellt. Dabei ist keine signifikante Steigerung der Expression in den Genen vorhanden, mit Ausnahme des SOX9. Hierbei liegt ein relativer Anstieg von 1 auf 2,57 in den KMCH-Zellen nach Behandlung mit 4 x 10^5

UV-bestrahlten HepG2-Zellen vor. SOX9 spielt dabei eine Rolle bei der Zelldifferenzierung in mesenchymalen Zellen.

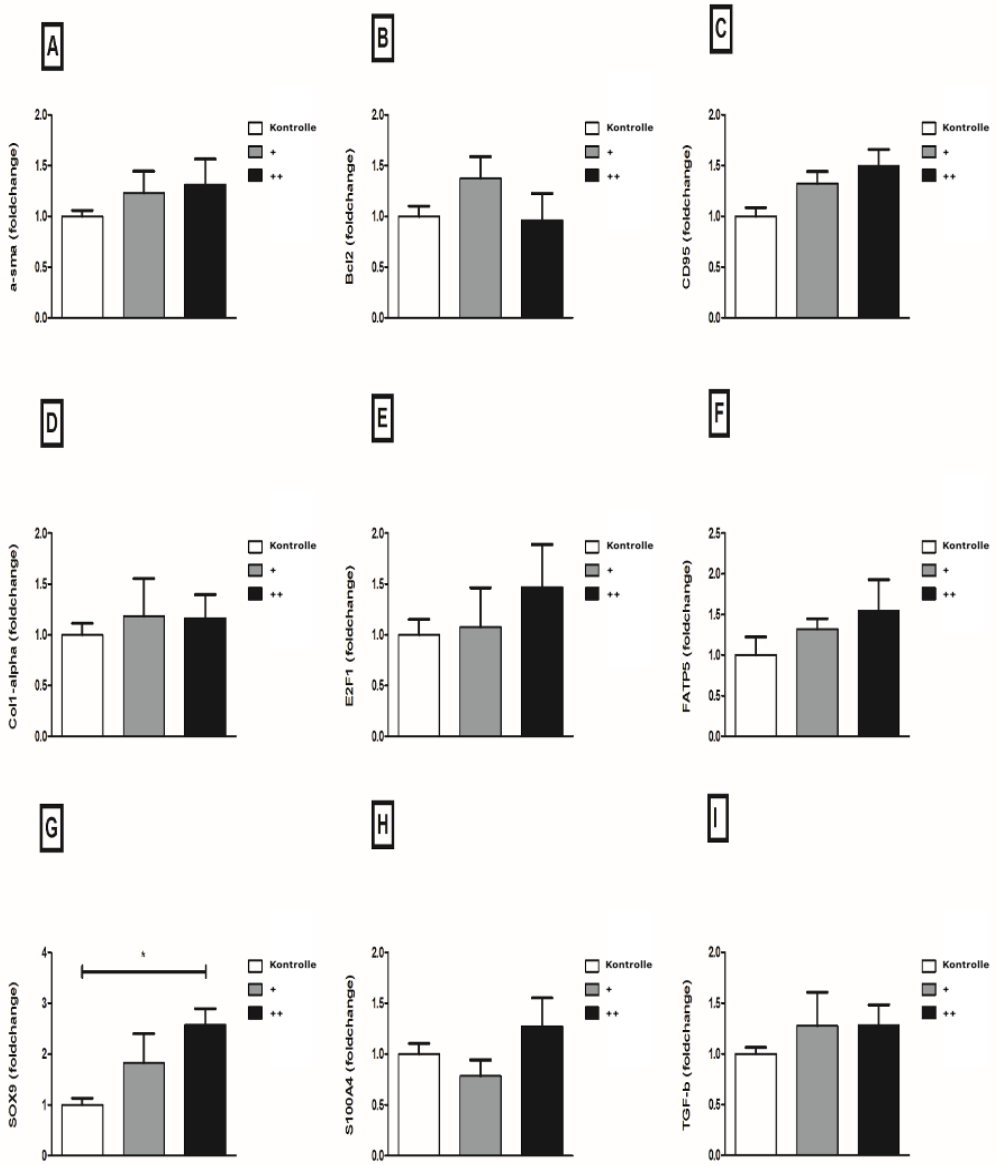


Abbildung 24: Expression von α-SMA, Bcl-2, CD95, Col1-alpha, E2F1, FATP5, SOX9, S100A4 und TGF-b in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen für 24 h

Relative Expression von α-SMA (A), Bcl-2 (B), CD95 (C), Col1-alpha (D), E2F1 (E), FATP5 (F), SOX9 (G), S100A4 (H) und TGF-b (I) in KMCH-Zellen nach Behandlung mit + (2 x 10^5) und ++ (2 x 10^5) UV-bestrahlten HepG2-Zellen für 24 h. Als Kontrolle wurden unbehandelte KMCH-Zellen benutzt. Gesamtauswertung der qRT-PCR (Mittelwert ± SEM, n = 4).

4.6.2 Erhöhte Genexpression von α-SMA in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen

Abbildung 25 zeigt die Genexpression der in 4.6 genannten Gene in KMCH-Zellen nach Behandlung mit 2 x 10^5 und 4 x 10^5 UV- bestrahlten KMCH-Zellen für 24 h. Die Expression von α-SMA in den KMCH stieg signifikant von 1 auf 1,73 bei einer Behandlung mit 4 x 10^5 UV-bestrahlten KMCH-Zellen. Ein Anstieg der SOX9 Genexpression, wie bei der Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen, zeigte sich nicht. α-SMA ist Bestandteil des Mikrofilamentsystems der Zytoskelettproteine und wird auch in Myofibroblasten und Myoepithelzellen exprimiert. Daher spielt es eine wichtige Rolle beim fibrotischen Umbau der Leber. Die restlichen Gene zeigten unter der Behandlung keine signifikanten Expressionänderungen.

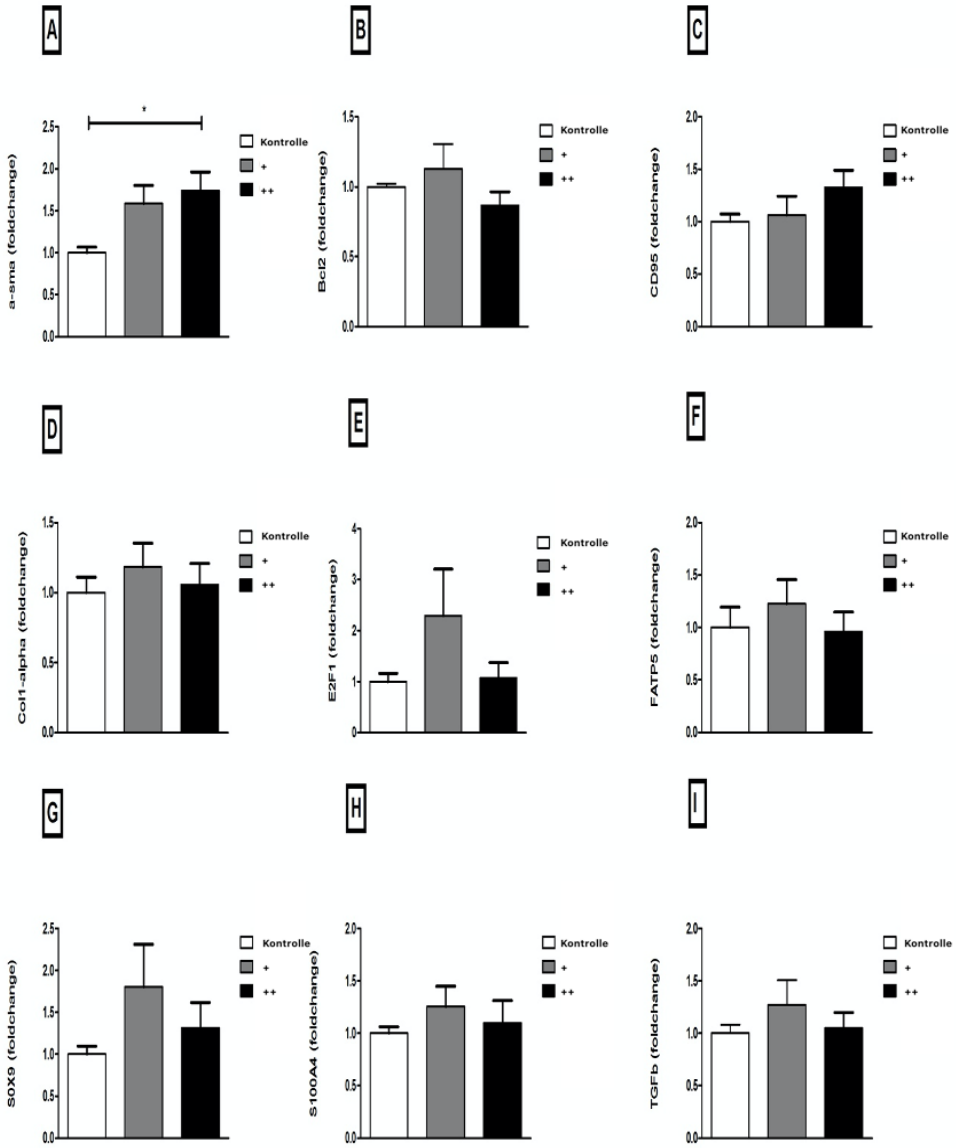


Abbildung 25: Expression von α-SMA, Bcl-2, CD95, Col1-alpha, E2F1, FATP5, SOX9, S100A4 und TGF-b in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen für 24 h

Relative Expression von α-SMA (A), Bcl-2 (B), CD95 (C), Col1-alpha (D), E2F1 (E), FATP5 (F), SOX9 (G), S100A4 (H) und TGF-b (I) in KMCH-Zellen nach Behandlung mit + (2 x 10^5) und ++ (2 x 10^5) UV-bestrahlten KMCH-Zellen nach 24 h. Als Kontrolle wurden unbehandelte KMCH-Zellen benutzt. Gesamtauswertung der qRT-PCR (Mittelwert ± SEM, n = 4).

5 Diskussion

Die SC-CIP ist eine seltene Erkrankung und betrifft die intra-und extrahepatischen Gallengänge. Ähnlich wie die PSC ist sie durch Inflammation, Fibrose und Strikturen charakterisiert (Gudnason et al., 2015; Kulaksiz et al., 2008). Typischerweise zeichnet sich die Erkrankung bei Patienten mit Polytrauma, Sepsis, großen chirurgischen Operationen oder einem Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) aus, die im Anschluss einen langen Intensivaufenthalt (ICU) benötigen. Kennzeichnend ist eine normale Leberfunktion, die sich im Rahmen der ICU Therapie verschlechtert und im Gegensatz zur Sepsis nicht regredient ist. Dabei steigen vor allem die Cholestaseparameter (AP, g-GT, Bilirubin) an. Klinisch zeigt sich ein Ikterus, rechtsseitige Oberbauchschmerzen, Juckreiz und Übelkeit. Die Diagnose erfolgt mittels Bildgebung (ERCP oder MRCP) und Leberhistologie. Dabei zeigt sich in der ERCP abhängig vom Stadium ein intraduktaler Füllungsdefekt mit *biliary cast* Formation und anschließender progressiven Destruktion der intrahepatischen Gallengänge. Im Endstadium sind diese obliteriert und es ist nur noch ein zentrales Gallengangssystem erkennbar. Die Leberhistologie zeigt Zeichen von Gallengangsproliferation, inflammatorische Infiltration der Portalfelder, periduktale und portale Fibrose und kanalikuläre Cholestase (Kirchner und Rümmele 2015; Leonhardt et al., 2015a; Weiss et al., 2016; K. V. Patel et al., 2014).

Pathophysiologisch kommen verschiedene Ursachen in Frage, die im Rahmen von ICU auftreten können. Dazu gehört vor allem die ischämische Cholangiopathie, die durch eine arterielle Minderversorgung bei Hypotension, Ventilation mit hohem PEEP und Hochdosistherapie mit Vasopressoren zu Stande kommt. Ein anderer wichtiger Faktor ist das Konzept der toxischen Galle bedingt durch Sepsis mit fehlerhaftem hepatobiliären Transportsystem, bei der protektive Mechanismen der Cholangiozyten gegenüber der Gallensäure verloren gehen (Leonhardt et al., 2015b).

Weiterhin spielt eine veränderte Mikroflora in den Gallengängen mit Multiresistenzen und nicht ausreichend abgedeckter Antibiose eine Rolle (Voigtländer et al., 2015). Aufgrund der schnellen Progression der Erkrankung mit fortschreitender Leberzirrhose ist die Prognose sehr schlecht und die einzige kurative Therapie ist die Lebertransplantation (Kwon et al., 2012; Kirchner und Rümmele 2015; Leonhardt et al., 2015a).

Im Rahmen der pathophysiologischen ischämischen Cholangiopathie werden *in vivo* die abgestorbenen Hepatozyten und Cholangiozyten durch die intra-und extrahepatischen Gallengänge in das Duodenum abgegeben und treten dabei in Kontakt mit den vitalen Cholangiozyten, die das Epithel der Gallengänge bilden. Dabei binden die abgestorbenen Zellen an die Cholangiozyten, werden von diesen phagozytiert und induzieren Leberfibrinogenese mit Ausbildung einer klinischen Leberzirrhose im Verlauf. Dieser Mechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* anhand eines Zellexperimentes imitiert, indem der Zelltod in Cholangiozyten und Hepatozyten induziert und

zuvor unbehandelte Cholangiozyten *in vitro* mit diesen Zellbestandteilen inkubiert wurden. Dabei wurden der Zelltod der unterschiedlichen Zelllinien unter UV-Bestrahlung, Phagozytenfunktion, Zellmetabolismus, Proliferationsreiz und Genexpression von Cholangiozyten untersucht. Abgestorbene KMCH-und HepG2-Zellen weisen unterschiedliche Resistenzen gegenüber UV-Strahlung auf und werden von KMCH-Zellen aufgenommen mit Induktion eines Proliferationsreiz. Ferner gibt es Hinweise auf Transdifferenzierung der KMCH-Zellen zu Hepatozyten und Myofibroblasten im Rahmen von Leberzellregeneration.

5.1 KMCH- und HepG2-Zellen zeigen unterschiedliche Resistenzen gegenüber UV-Strahlung

Der Zelltod der KMCH-und HepG2-Zellen wurde in dieser Arbeit durch UV-Strahlung ausgelöst. Dabei wurde eine Intensität von 130 mJ/cm^2 für beide Zelltypen benutzt. Die Anzahl der abgestorbenen Zellen wurde dabei durch Auszählung bestimmt, um stets eine in etwa gleiche Anzahl zu erreichen. In der DAPI-Färbung zeigten sich sowohl in den HepG2 als auch in den KMCH-Zellen typische Merkmale der Apoptose wie Bläschenbildung und Chromatinkondensation. Diese klassischen Zeichen haben sich in der Annexin V und PI Färbung bestätigt. Jedoch zeigten sich hierbei zusätzliche Anzeichen von apoptotischen und nekrotischen Übergangsformen und auch rein nekrotische Zellen. Da es jedoch eine ganze Reihe verschiedener Arten von Zelltod (1.2) gibt, kann eine exakte Klassifizierung des Zelltod-Modus rein lichtmikroskopisch und immunzytochemisch nicht erfolgen. Eine genaue Differenzierung ist in dieser Arbeit nicht erfolgt, da der Fokus auf die Phagozytose von UV-bestrahlten KMCH- und HepG2-Zellen und die damit verbundene Antwort der KMCH-Zellen lag.

In früheren Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe von Canbay et al. 2003 wurden durch UV-Bestrahlung generierte apoptotische Körperchen von HepG2-Zellen mit DAPI spezifisch angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und quantifiziert. Dabei wird unter UV-Bestrahlung von HepG2-Zellen mit 100mJ/cm^2 von einem Zelltod von 80% berichtet. Dabei durchlaufen 79% der Zellen den apoptotischen und 21% den nekrotischen Zelltod (Zhan et al., 2006). In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung die Durchflusszytometrie verwendet. Es wurde in den HepG2-Zellen zu einem geringeren Anteil Zelltod in Form von Apoptose (25 %) und zum anderen Nekrose mit einem Anteil von 3% % nach UV-Bestrahlung ausgelöst. Gründe hierfür könnten vor allem die unterschiedlich benutzte Intensität der UV-Bestrahlung (130 mJ/cm^2 im Vergleich zu 100 mJ/cm^2) und das Stadium des Teilungszyklus der Zellen sein, auf den die individuelle Strahlungsdosis wirkt. Bei der Bestrahlung von KMCH-Zellen ist die Datenlage unklar. Popov et al. 2010 bestrahlte 603B Cholangiozyten mit 200 mJ/cm^2. Dabei zeigte sich in der FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) nach 3 h eine Apoptoserate von 80 %, welche widersprüchlich zu der in dieser Arbeit beschriebenen mittels Durchflusszytometrie bestimmten Apoptoserate von 35 % der KMCH-Zellen

nach UV-Bestrahlung ist. Dieser Unterschied könnte jedoch darin begründet sein, dass die 603B Cholangiozyten von der Maus abstammen und die KMCH-Zellen humane Karzinomazellen sind.
Wie Salucci et al. 2012 schon an anderen Zelltypen beschrieb, reagieren verschiedene Zellen bei gleichen Bedingungen der Bestrahlung mit unterschiedlichen Formen des Zelltodes. Weiterhin kann, wie Wörner et al. 1996 feststellte, bei UV-Bestrahlung nicht sicher gesagt werden, welcher Signalweg die Zelle zum Zelltod führt.
Zusammenfassend sind die unterschiedlich benutzte Intensität der UV-Bestrahlung und das benutzte Verfahren zur Quantifizierung wichtige Faktoren für die Diskrepanz der Zelltodausbeute. Wie in 4.1.2 beschrieben, ist das Ergebnis nur eingeschränkt beurteilbar, da die HepG2-und KMCH-Zellen Adhäsionskontakte aufweisen und sich nicht optimal für eine Durchflusszytometrie eignen. Zudem kann keine statistische Aussage getroffen werden, da der Versuch nur probatorisch durchgeführt wurde.
Abschließend ist zu sagen, dass ein großer Teil der KMCH-und HepG2-Zellen nach UV-Bestrahlung sterben bzw. einen regulierten Zelltod durchlaufen. Die zwei Zelllinien weisen unterschiedliche Resistenzen gegenüber UV-Strahlung mit unterschiedlichem Anteil an nekrotischen und apoptotischen Zellen auf und ein gewisser Anteil an resistenten bzw. überlebenden Zellen ist nicht auszuschließen. Dieser wurde bei den Experimenten jedoch so gering wie möglich gehalten, indem wie bei Canbay et al. 2003 stets der nicht-adhärente Anteil der Zellen nach UV-Bestrahlung für die weitere Behandlung eingesetzt wurde. Im MTT Test schien kein relevanter Anstieg der metabolischen Aktivität in den KMCH-Zellen durch verbliebene lebendige Zellen vorhanden zu sein. Ebenfalls konnte lichtmikroskopisch keine Neuanzucht nachgewiesen werden, weder von UV-bestrahlten KMCH-Zellen noch von UV-bestrahlten HepG2-Zellen (4.4). Somit ist der Anteil an KMCH-Zellen und HepG2-Zellen, die nach UV-Bestrahlung nicht den Zelltod durchlaufen insgesamt vermutlich sehr gering und für die nachfolgenden Versuche zu vernachlässigen.

5.2 Bindung und Aufnahme UV-bestrahlter KMCH- und HepG2-Zellen in KMCH-Zellen

Die Phagozytose stellt die Bindung von Partikeln größer als 0,5 µm und deren Aufnahme durch Makrophagen oder andere Zellen des angeborenen Immunsystems dar. Phagozytose spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem für die Entwicklung und Homöostase von Gewebe. Es werden professionelle (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und Osteoklasten) von nicht-professionellen Phagozyten, die die epithelialen Zellen beinhalten, unterschieden (Gordon 2016). Eine andere Bezeichnung für diese Art von Zellen sind Efferozyten (Davies et al., 2018). Damit eine Zelle eine phagozytische Funktion ausführen kann, benötigt sie verschiedene Rezeptoren, um die Oberflächenmoleküle der *apoptotic bodies* zu erkennen und zu binden. Dazu zählen vor allem PS und Scavenger Rezeptoren, die das PS auf der

Außenmembran der apoptotischen Zellen binden (Freeman und Grinstein 2014). Wie die Aufnahme und Detektion von nekrotischen Zellen auf molekularer Ebene abläuft ist unklar. Es wird jedoch angenommen, dass verschiedene Rezeptoren, Opsonine und Zell-assoziierte Liganden beteiligt sind. Dazu zählen CRP (C-reaktives Protein), SAP (Serum Amyloid P), PTX3 (Pentraxin-3), HRG (Histidinreiches Glykoprotein), Ficolin-2, Ficolin-3, MBL (Mannose-bindendes-Lektin) und C1q. (Poon et al., 2010). Die am besten beschriebenen Efferozyten der Leber, die zu den professionellen Phagozyten gehören, sind die Kupffer-Zellen als residente Makrophagen. Sie sind entlang der Sinusoide angeordnet und beseitigen Pathogene aus dem Darm. Neben vielen anderen Aufgaben haben sie eine wichtige Funktion bei chronischen Lebererkrankungen, wie z.B. der NAFLD durch Regulierung der immunologischen Antwort (Tosello-Trampont et al., 2012).

In der hier präsentierten Arbeit zeigte sich in der PKH-26 und PKH-67 Färbung, dass die vitalen KMCH-Zellen *in vitro* die UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen an die Zellmembran binden und phagozytieren (4.2). Im Live-Cell-Imaging ist zusätzlich der zeitliche Ablauf in insgesamt 24 h Beobachtungszeit zu erkennen. Hier ist gut erkennbar, dass die UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen an die KMCH-Zellmembran binden, ins Zytoplasma translozieren und sich Zellabschnürungen bilden. Eine vollständige Mitose ist rein morphologisch nicht eindeutig nachweisbar.

Canbay et al. 2003 zeigte *in vitro* die Aufnahme von hepatischen *apoptotic bodies* in Kupffer-Zellen, welche aus Maus generiert wurden. Die an der Phagozytose beteiligten Rezeptoren waren PS-R und MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8 protein). In einer Arbeit von Willekens et al. 2005 exprimierten die Kupffer-Zellen Fc- und verschiedene Scavenger-Rezeptoren, die für die Eliminierung von defekten Erythrozyten, Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex und Hämoglobin enthaltende Vesikel zuständig sind.

Rong et al. 2013 untersuchte im Rahmen der primären biliären Zirrhose primäre humane intrahepatische Cholangiozyten auf Phagozytosefunktion und stellte mittels Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie fest, dass diese apoptotische Körperchen von benachbarten Cholangiozyten aufnehmen. Weiterhin konnten mittels PCR die Phagozytose-relevanten Rezeptoren CD51 (integrin aV), CD61 (integrin b3), CD93 (C1q Rezeptor) und PS-R in den Cholangiozyten identifiziert werden. Zusätzlich wurde demonstriert, dass die Cholangiozyten nicht alle Phagozytose-relevanten Oberflächenmoleküle (Scavenger Rezeptor A, CD31, CD34, CD344, CD14 und CD11b), die in professionellen Phagozyten nachweisbar sind, exprimieren. Weitere Unterschiede zu den professionellen Phagozyten ergaben sich bei der Antigenpräsentation. Dabei haben z.B. die Makrophagen die Möglichkeit nach Phagozytose als Antigen präsentierende Zelle (APC) Antigene über den MHC II-Komplex und Rezeptoren (z.B. TLR) auf der Zellmembranoberfläche zu präsentieren und die Phagozytose triggern (1.3). Dadurch können z.B. T-Lymphozyten als Teil des erworbenen Immunsystem aktiviert werden und spezifische Liganden (z.B. TLR-Ligand) nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip gebunden und eliminiert werden. Relevante Marker wie CD40, CD80,

CD86 und HLA- DR, die als Kostimulatoren und Trigger für die APC Funktion eine Rolle spielen, waren in den biliären Epithelzellen nach Phagozytose nicht erhöht. Ebenso konnte keine vermehrte Phagozytose nach Stimulation mit TLR-Liganden nachgewiesen werden.

In einer Arbeit von Allina et al. 2006 wurde die Phagozytenfunktion von biliären epithelialen Zellen aus Rattengewebe und humanem Lebergewebe von PBC-Patienten untersucht. Dabei wurde klar, dass in beiden Fällen eine efferozytische Funktion von apoptotischen Zellen vorliegt. Dabei wurde das Lebergewebe von Patienten mit chronischer Hepatitis C, PBC, PSC und akuter Abstoßungsreaktion bei Lebertransplantation mit gesundem Lebergewebe verglichen. Interessanterweise konnte die phagozytische Funktion der biliären Epithelzellen nur in den genannten Erkrankungen nachgewiesen werden. Im gesunden Lebergewebe war keine Efferozytose zu verzeichnen.

Da es sich bei den KMCH-Zellen um Epithelzellen handelt, gehören diese zu den nicht-professionellen Phagozyten. In der Literatur sind weitere Epithelzellen beschrieben, wie bronchiale und alveoläre sowie retinale Epithelzellen, die eine efferozytische Funktion haben (Davies et al., 2018). Die Funktion liegt in der Aufnahme von abgestorbenen Nachbarzellen mit antiinflammatorischer Antwort und Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase (Juncadella et al., 2013; Kaarniranta et al., 2013). Hepatischen Sternzellen sind Perizyten der Sinusoide und gehören nach Definition ebenfalls zu den nicht-professionellen Phagozyten. Sie sind unter anderem für die Speicherung von Vitamin A zuständig und spielen eine große Rolle bei chronischen Erkrankungen, wie alkoholische Steatohepatitis oder Virushepatitiden (Kawada 2006). Diese haben eine efferozytische Funktion und können *apoptotic bodies* aufnehmen. Dafür ist ein gut funktionierender mikrotubulärer Apparat essentiell und, wie in den Kupffer-Zellen und biliären Epithelzellen, die Expression des PS-Rezeptors (Canbay et al., 2003a; Jiang et al., 2009; Zhan et al., 2006).

Die dargestellten Arbeiten spiegeln das Ergebnis der vorliegenden Arbeit wider mit dem Unterschied, dass es sich bei den KMCH-Zellen um Karzinomazellen mit cholangiozellulären und hepatozellulären Eigenschaften handelt. Ein Nachweis für das Vorhandensein von für die Phagozytenfunktion wichtigen Rezeptoren wie PS-R in KMCH-Zellen erfolgte in dieser Arbeit nicht.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass KMCH-Zellen nekrotische und apoptotische HepG2- und KMCH-Zellen phagozytieren. Die Funktion der Kupffer-Zellen und hepatischen Sternzellen in chronischen Lebererkankungen sind bereits gut beschrieben, jedoch gibt es wenig Daten über die genaue Funktion der biliären Epithelzellen. Im Hinblick auf andere Epithelzellen scheint es, dass Cholangiozyten eine wichtige Rolle sowohl bei chronischen Lebererkrankungen wie auch autoimmunen Lebererkrankungen spielen, die ähnlich der SSC sind. In den letzten Jahren konnten eine Reihe Rezeptoren und Liganden in Endothel- und Epithelzellen identifiziert und charakterisiert werden, die bei nicht-professionellen Phagozyten funktionell bedeutsam sind. Wichtige nachgewiesene Rezeptoren der biliären Epithelzellen für die Phagozytose sind CD51 (integrin aV),

CD61 (integrin b3), CD93 (C1q Rezeptor) und PS-R. Weitere Experimente sind nötig, um den genauen Mechanismus der komplexen Efferozytose in dieser Gruppe zu verstehen. Eine detaillierte Aufklärung der benötigten Liganden und Rezeptoren in den KMCH-Zellen ist nötig, die zur Phagozytose von nekrotischen und apoptotischen Cholangiozyten und Hepatozyten beitragen. Im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten der SSC könnte sich hierbei ein medikamentöser Ansatzpunkt ergeben, indem eine Rezeptor-Liganden Bindung unterbrochen wird.

5.3 KMCH-Zellen zeigen eine erhöhte metabolische Aktivität mit biliärer Reaktion nach Phagozytose von UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen

Welche physiologischen und immunologischen Prozesse durch die Phagozytose ausgelöst werden, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu zählen vor allem die involvierten Rezeptoren, Liganden und Zelltyp. Makrophagen haben beispielweise Hydrolasen, die in der Lage sind, die aufgenommenen Zellbestandteile zu verdauen. Die dendritischen Zellen präsentieren Antigene auf der Zelloberfläche für die Aktivierung von T-Lymphozyten.

Als nicht-professionelle Phagozyten nehmen KMCH-Zellen die apoptotischen und nekrotischen Bestandteile der UV-bestrahlten HepG2-und KMCH-Zellen auf und weisen eine erhöhte metabolische Aktivität im MTT-Test auf. Diese war besonders stark bei der Phagozytose von UV-bestrahlten KMCH-Zellen zu beobachten. Dabei spielte die Konzentration der UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen keine Rolle. Vereinfacht gesagt wird der MTT-Test dafür verwendet, ob eine Testsubstanz einen proliferativen oder zytotoxischen Effekt hat. Ferner gibt er indirekt Hinweise auf Rezeptorbindungsaktivität und Zellsignalwege, die in der Genexpression oder Zellorganellenfunktion beteiligt sind. Die metabolische Aktivität ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig, wie die Konzentration von MTT, Länge der Inkubationszeit und die Anzahl der vitalen Zellen mit deren metabolischer Aktivität. Daher ist dieser Test sehr unspezifisch und gibt keine genaue Aussage über Zellproliferation (Riss et al., 2004).

Die Kernteilung bzw. Mitose ist ein wichtiger Bestandteil bei der Zellproliferation und ist eingeteilt in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Dabei weisen die unterschiedlichen Phasen charakteristische Veränderungen der Chromosomen auf. Für die genaue Beurteilung, ob eine vollständige Teilung der KMCH-Zellen nach Aufnahme von UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen vorliegt, ist eine Fluoreszenzfärbung der Chromosomen bzw. Histone notwendig (Sivakumar et al., 2014). Da im Live-Cell Imaging lediglich die Zellmembran mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 und PKH67 eingefärbt wurde, kann rein morphologisch keine genauere Aussage in Bezug auf Mitose getroffen werden. Im Hinblick auf Zellproliferation und den Beobachtungen im Live-Cell Imaging mit Zellabschnürungen erfolgte eine immunzytochemische Bestimmung der Expression des KI-67 Proteins und PCNA, welche sensitive Marker zur Bestimmung von Zellproliferation sind, und ein Scratch Assay. Immunzytochemisch zeigte sich in

den KMCH-Zellen ein starker Anstieg der KI-67 Expression in Abhängigkeit der Konzentration, sowohl nach Aufnahme von UV-bestrahlten HepG2-Zellen als auch von KMCH-Zellen. Dies konnte auf Proteinebene mittels Quantifizierung von PCNA und histologisch im *Scratch assay* nicht bestätigt werden.

PCNA ist nur in der S-Phase aktiv und KI-67 in jeder aktiven Phase des Zellzyklus (G1 und G2-, S- und M-Phase). In der G0 Phase ist die Zelle in einer nicht teilenden Phase, der sogenannten Ruhephase, und exprimiert kein KI-67. Während der G1-Phase steigt die Konzentration von KI-67 an und ist in der M-Phase am höchsten (Sun und Kaufmann 2018).

Ein möglicher Grund für den negativen PCNA Nachweis im Western-Blot und positiven KI-67 Expression als Marker für Zellproliferation sind die verschiedenen Zeitpunkte der Expression der Proteine. Vorab ist zu sagen, dass biliäre Epithelzellen insgesamt im Vergleich zur Hepatozyten eine geringe Proliferationsaktivität haben. Bei der Untersuchung der Regeneration von biliären Epithelzellen in Mäusen nach Hemihepatektomie zeigte sich in den Cholangiozyten erst 48h nach Hemihepatektomie ein Anstieg der PCNA Expression und bereits 2h nach Hemihepatektomie eine KI-67-Expression (Fukuda et al., 2016). Die hier verwendeten Zeiträume für die Behandlung der KMCH-Zellen wurden bei der Bestimmung der PCNA Expression auf 24 h und der KI-67 Expression auf 12 h festgesetzt. Ein weiterer limitierender Faktor ist das Limit an möglichen Zellteilungen in einer angelegten Zellkultur. Durch die allmähliche Verkürzung der Telomere, aufgrund fehlender replikativer Polymerasen für die DNA Synthese am Chromosomenende, sind mit der Zeit weitere Zellteilungen nicht mehr möglich (Burton und Krizhanovsky 2014). Der *Scratch assay* hat eine hohe Fehlerquote und die Ergebnisse haben eine Varianz von bis zu 25% abhängig vom ausgewählten Bildanalyseverfahren. Wie bereits beschrieben, ist zudem nicht sicher zu sagen, ob mit dem Verfahren ausschließlich Zellproliferation oder auch Zellmigration gemessen werden kann. Möglichweise könnte hierbei, wie bei der PCNA Quantifizierung, ebenfalls eine längere Behandlung der KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten KMCH- oder HepG2-Zellen notwendig sein (Treloar und Simpson 2013).

Ähnliche Reaktionen in biliären Epithelzellen wurden bereits beschrieben in PBC, PSC, biliärer Atresie und ferner bei Cholangiokarzinomen und als biliäre Reaktion definiert. Sie wird ausgelöst durch Leberzellschaden und ist durch Proliferation oder Hyperplasie von Gallengangszellen charakterisiert. Ferner zeichnet sie sich durch Infiltration inflammatorischer Zellen in die Portalfelder mit Induktion von Leberfibrinogenese aus. Weiterhin ist diese unter anderem mit Transdifferenzierung in Hepatozyten während der Leberregeneration assoziiert. Die aktivierten Leberzellen können dabei sowohl von Cholangiozyten, Hepatozyten oder hepatischen Progenitorzellen stammen. beschrieben (He et al., 2014; Körner et al., 2006; Sato et al., 2019; Xiao et al., 2015).

Zusammenfassend können die hier dargestellten Ergebnisse als biliäre Reaktion der KMCH-Zellen nach Phagozytose gedeutet werden mit Anzeichen von Induktion eines Proliferationsreiz, was ferner

auf die SSC übertragen werden kann. Zur genaueren Aussage von Proliferation sollten längere Zeiträume für die Behandlung der KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen gewählt werden mit Analyse von weiteren Proliferationsmarkern. Da biliäre Reaktionen zunehmend eine Rolle bei der Leberregeneration spielen, könnte diese als weiterer Therapieansatzpunkt dienen mit Unterdrückung der biliären Reaktion und Induktion von Inflammation und Fibrinogenese.

5.4 KMCH-Zellen weisen Transdifferenzierungszeichen nach Phagozytose von UV bestrahlten HepG2-Zellen und UV-bestrahlten KMCH-Zellen auf

In der qPCR wurde die Genexpression von mehreren Proteinen untersucht, die im Zusammenhang mit Zelltod, Inflammation, Transdifferenzierung und Fibrinogenese stehen. Hierzu zählen: α-SMA, Bcl2, CD95/FAS, COl1-α, E2F1, FATP5, SOX9, S100A4 und TGF-b. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von SOX9 in den KMCH-Zellen nach Aufnahme von abgestorbenen HepG2-Zellen. SOX9 ist ein Transkriptionsfaktor und sorgt für die Geschlechtsentwicklung, Zelldifferenzierung bzw. Homöstase und wird in Stammzellen exprimiert (Sato et al., 2019).
He et al. 2014 untersuchte die hohe Regenerationskapazität der Leber und Transdifferenzierung von Hepatozyten in Zebrafischen nach Leberzellschaden. Dabei konnte in der qPCR eine erhöhte Genexpression in den biliären Epithelzellen von SOX9 nachgewiesen werden. Zudem verlieren biliäre Epithelzellen in Zebrafischen nach Leberzellschaden ihre tubuläre Morphologie, proliferieren und exprimieren Hepatozyten spezifische Marker wie mCherry mit Folge von Hepatozytenregeneration. Diese Hepatozyten stammen dabei von transdifferenzierten biliären Epithelzellen ab, welche typische Merkmale von Progenitorzellen und Dedifferenzierung aufweisen. Umgekehrt konnte eine andere Gruppe *in vitro* die direkte Transdifferenzierung von Hepatozyten in Cholangiozyten nach Leberzelluntergang anhand von spezifischen biliären Markern wie Zytokeratin 7 und OV6 zeigen. Dabei wird angenommen, dass bei größerem Leberzellschaden die Proliferationskapazität der Cholangiozyten ausgeschöpft sind und Hepatozyten als fakultative Stammzelle dient mit Transdifferenzierung in Cholangiozyten (Michalopoulos et al., 2002; Michalopoulos et al., 2005). In dieser Arbeit zeigte sich eine erhöhte Genexpression von SOX9 in den KMCH-Zellen nach Aufnahme von HepG2-Zellen. Dies gibt Hinweise darauf, passend zu den oben genannten Arbeiten, dass KMCH-Zellen nach Phagozytose von UV-bestrahlten HepG2-Zellen im Rahmen einer biliären Reaktion zu Hepatozyten transdifferenzieren und zur Leberregeneration beitragen können. Bei der Aufnahme von UV-bestrahlten KMCH-Zellen war keine erhöhte SOX9 Expression zu verzeichnen, was auf unterschiedlich ausgelöste Signalwege in den KMCH-Zellen abhängig der phagozytierten Zellen deuten kann.
Im Gegensatz dazu war eine erhöhte α-SMA Genexpression in den KMCH-Zellen nach Aufnahme von UV-bestrahlten KMCH-Zellen nachweisbar, aber nicht bei Aufnahme von UV-bestrahlten HepG2-Zellen. α-SMA zählt zu den profibrogenen Proteinen und ist ein Marker für die Aktivität

von Myofibroblasten. Dabei werden vermehrt extrazelluläre Matrixproteine exprimiert und die Fibrinogenese in der Leber gefördert (Canbay et al., 2004). Xiao et al. 2015 untersuchte die epitheliale mesenchymale Transition von biliären Epithelzellen bei der biliären Atresie. CK-7 ist ein spezifischer Marker für biliäre Epithelzellen, welcher bei zunehmender Leberfibrinogenese geringere Genexpressionslevel zeigt und den Verlust von biliären Epithelzellen beinhaltet. Im Gegenzug steigt die α-SMA Expression an, was auf eine Differenzierung der biliären Epithelzellen zu α-SMA exprimierenden Myofibroblasten deuten kann.

Ähnlichkeiten bestehen in anderen Phagozyten, wie die HSC, bei denen nach Phagozytose über den MAPK und PI3-K Signalweg profibrogene Proteine wie collagen α1, α-SMA und transforming growth factor β (TGF-β) gebildet werden. HSC transformieren in Myofibroblasten und produzieren kontraktile Mediatoren (Endothelin-1, mitogene Mediatoren wie PDGF (Platelet-derive growth factor), insulin-like-growth factor, vascular endothelial growth factor, Chemokine und extrazelluläres Matrixmaterial (Kollagen Typ 1, Fibronectin, Lamin und Proteoglykane), was in Kombination zum Progress einer Leberzirrhose beiträgt. Zusätzlich kommt es durch Aktivierung der NADPH Oxidase in phagozytierenden HSC zu einer erhöhten Freisetzung von Sauerstoffradikalen (ROS). Der damit verbundene Zellschaden in benachbarten Zellen führt zu einem wiederkehrenden Prozess aus Apoptose, Phagozytose und Fibrinogenese (Canbay et al., 2003a; Zhan et al., 2006). Da Myofibroblasten maßgeblich an der Leberzirrhose beteiligt sind, könnte die erhöhte α-SMA Expression der KMCH-Zellen nach Phagozytose von UV-bestrahlten KMCH-Zellen eine Differenzierung der KMCH-Zellen in Myofibroblasten indizieren. In Kombination mit Transdifferenzierung in Hepatozyten mit erhöhter SOX9 Expression, könnte dies einen Teil der Pathophysiologie der chronischen Leberfibrinogenese bei SSC erklären.

Als professionelle Phagozyten mit ebenfalls wichtiger Funktion bei der Fibrinogenese zählen die Kupffer-Zellen. Bei der Phagozytose kommt es zur Expression von TNF-α und den Todesliganden TRAIL und Fas Liganden, die zu einer proinflammatorischen Antwort und Leberfibrinogenese führen (Canbay et al., 2003b). Zusätzlich werden, abhängig von der Genese der chronischen Lebererkrankungen, verschiedene Cytokine, Chemokine, Prostaglandine, Leukotriene und Komplementfaktoren sekretiert. Dazu zählen vor allem CXC-Chemokine Liganden, MCP-1 und IP-10, die unter anderem für die Infiltration von Neutrophilen, natürlichen Killer-Zellen und Monozyten sorgen sowie eine proinflammatorische Antwort triggern (Tosello-Trampont et al., 2012).

Eine Untersuchung von Chemokinen erfolgte in dieser Arbeit nicht, jedoch konnte Rong et al. 2013 die Expression von den Chemokinen CXCL8 und CCL2 in biliären Epithelzellen mit humaner Abstammung nach Aufnahme von apoptotischen Zellen nachweisen. Eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1β, IL-12p70 und TNF-α konnte dagegen nicht bestätigt werden. CXCL8 und CCL2 sind proinflammatorische Chemokine, welche die Migration von Monozyten und Makrophagen in das Gewebe fördern und die biliären Epithelzellen bei der

Phagozytose unterstützen können. Eine erhöhte Expression von profibrogenen Proteinen COl1-α, E2F1, S100A4 und TGF-b war in KMCH-Zellen nach Phagozytose nicht nachweisbar und ist vor allem in fibrotischem Lebergewebe mit vermehrter extrazellulärer Matrix vorhanden. Daher sind diese profibrogenen Proteine nur begrenzt in den hier verwendeten Zellmonokulturen anwendbar (Chen et al., 2015).

Phagozytose ist ein komplexes Verfahren und kann bei der Leberregeneration auch antiinflammatorisch verlaufen. Das Zusammenspiel von multiplen Chemokinen, Interleukinen und Cytokinen bestimmt die jeweilige Antwort der beteiligten Zelle (Davies et al., 2018, Gordon 2016). Jiang et al. 2009 zeigte in HSC nach Phagozytose die Aktivierung von den antiapoptotischen Signalwegen JAK/STAT und Akt/NF-kB. A1-Protein, ein Mitglied der antiapoptotischen Bcl-2 Familie, wird von NF-kB aktiviert und trägt zum Überleben der HSC bei. Hepatozyten scheinen ebenfalls eine antiapoptotische Funktion zu haben. Takehara et al. 2004 demonstrierte die erhöhte Epression von Bcl-x_L, ebenso Mitglied der antiapoptotischen Bcl-2 Familie, und TGF-β in Hepatozyten nach Phagozytose von apoptotischen Hepatozyten.

Kuppfer-Zellen sind beispielsweise in der Lage in der NASH und ASH anti-inflammatorische Cytokine wie IL-10 produzieren und somit den Zelltod von pro-inflammatorischen Monozyten fördern (Krenkel und Tacke 2017; Tosello-Trampont et al., 2012). In der Literatur ist bisher keine erhöhte IL-10 Expression von biliären Epithelzellen beschrieben und auch hier nicht weiter untersucht. Eine erhöhte Expression der antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und TGF-β und apoptotischen Protein CD95/FAS war in den KMCH-Zellen nach Phagozytose nicht zu verzeichnen. In Zusammenschau der Ergebnisse wird in den KMCH-Zellen nach Phagozytose von UV-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen im Rahmen der biliären Reaktion ein Proliferationsreiz ausgelöst. Nach Phagozytose von UV-bestrahlten KMCH-Zellen tritt in KMCH-Zellen eine vermehrte Expression von α-SMA und nach Phagozytose von UV-bestrahlten HepG2-Zellen Expression von SOX9 auf. Ein Expressionsanstieg von profibrogenen oder Zellzyklus regulierenden Proteinen wurde nicht nachgewiesen. Eine Aussage über Karzinogenese kann mit den vorliegenden Daten nicht getroffen werden. Eine erhöhte Assoziation von CCA bei SSC-Patienten ist in der Literatur nicht beschrieben worden und könnte an dem kurzen Beobachtungszeitraum bei schlechtem Outcome zusammenhängen. Die Funktion von biliären Epithelzellen bei Leberzelluntergang wurde bisher nicht genauer untersucht. Jedoch ergeben sich in dieser Arbeit Hinweise auf mögliche Transdifferenzierung der KMCH-Zellen in hepatische Progenitorzellen oder Hepatozyten, die an der Leberfibrinogenese teilhaben können. Weitere Untersuchungen von Hepatozyten spezifischen Markern in biliären Epithelzellen sind notwendig zur genaueren Aussage der Leberzelldifferenzierung bei Leberregeneration. Eine genaue Aufschlüsselung der unterschiedlich ausgelösten Signalwege und beteiligten Proteinen ist notwendig, um neue Therapieansatzpunkte bei SSC-Patienten zu finden. Versuche mit längeren Beobachtungszeiträumen und Übertragung des

Zellkulturmodells auf ein Tiermodell *in vivo* sind notwendig, um die immunologische Zellantwort in KMCH-Zellen auf Leberzelluntergang zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Die sekundäre sklerosierende Cholangitis (SSC) ist eine Erkrankung der intra- und extrahepatischen Gallengänge mit Cholestase, die bei zuvor normaler Leberfunktion zur Leberfibrinogenese führt. Die Diagnostik basiert auf der serologischen Bestimmung der Cholestaseparameter, Leberhistologie und endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) als Bilddiagnostik. Die mediane Überlebensdauer beträgt 1,1 Jahre und die einzige kurative Therapie ist die Lebertransplantation. Ursache ist eine ischämische Cholangiopathie mit Induktion von Apoptose und Nekrose in den Leberzellen bei infektiöser, toxischer, ischämischer oder traumatischer Genese. Professionelle und Nicht-Professionelle Phagozyten nehmen diese abgestorbenen Leberzellen auf und induzieren eine inflammatorische oder antiinflammatorische Immunantwort in der Leber und sind maßgeblich an der Leberfibrose beteiligt. Biliäre Epithelzellen gehören zu den nicht-professionellen Phagozyten und sind durch Phagozytose-relevanten Rezeptoren (*Cluster of Differentiation* (CD) 51, CD61, CD93 und Phosphatidylserin (PS)) zur Phagozytose in der Lage. In dieser Arbeit konnte im Zellmodell in humanen KMCH-Zellen die Phagozytose von Ultraviolett (UV)-bestrahlten HepG2- und KMCH-Zellen mit Proliferationsinduktion bei erhöhter Expression von KI-67 Protein gezeigt werden. Des Weiteren konnte nach Phagozytose von UV-bestrahlten HepG2-Zellen eine erhöhte Expression von SOX9 und nach Phagozytose von UV-bestrahlten KMCH-Zellen eine erhöhte Expression von *alpha smooth muscle actin* (α-SMA) nachgewiesen werden. Diese ist mit Transdifferenzierung von Leberzellen assoziiert und könnte eine biliäre Reaktion der KMCH-Zellen auf den Zelluntergang darstellen, welche bereits bei der primär biliären Cholangitis (PBC), primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) und biliärer Atresie beschrieben wurden. Da das hier verwendete Zellmodell die pathophysiologischen Vorgänge der SSC imitiert, gibt es Hinweise darauf, dass biliäre Epithelzellen durch Transdifferenzierung in Hepatozyten und Myofibroblasten nach Phagozytose von untergegangenen Leberzellen an der Leberregeneration beteiligt sein könnten. Ferner könnte dies im späteren Verlauf zur Leberzirrhose beitragen. Da die SSC bisher lediglich durch eine Lebertransplantation kurativ therapiert werden kann, sollten weitere *in vivo* Versuche und immunhistochemische Untersuchungen von Lebergewebe von SSC-Patienten erfolgen, um diese komplexe Zellantwort von nicht professionellen Phagozyten wie die biliären Epithelzellen zu verstehen. Diese Arbeit ermöglicht neue Aspekte bei der Suche nach therapeutischen Ansatzpunkten zur Verhinderung der schnell fortschreitenden Leberfibrose der SSC.

7 Literaturverzeichnis

1. Allina, J., Hu, B., Sullivan, D. M., Fiel, M. I., Thung, S. N., Bronk S. F., Huebert, R. C., van de Water, J., LaRusso, N. F., Gershwin, M. E., Gores, G. J., Odin, J. A. (2006): T cell targeting and phagocytosis of apoptotic biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis. Journal of Autoimmunity 27, 232–241.

2. Benseler, V., Warren, A. Vo, M., Holz, L. E., Tay, S. S., Couteur, D. G. L., Breen, E., Allison, A. C., Rooijen, N. V., McGuffog, C., Schlitt, H. J., Bown, D. G. McCaughan, G. W., Bertolino, P. (2011): Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. PNAS 108, 16735–16740.

3. Burton, D. G. A., Krizhanovsky, V. (2014): Physiological and pathological consequences of cellular senescence. Cellular and Molecular Life Sciences 71, 4373–4386.

4. Canbay, A., Friedman, S., Gores, G.J. (2003a): Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. Lab. Invest. 83, 655–663.

5. Canbay, A., Feldstein, A. E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S. F., Gores, G. J. (2003b): Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. Hepatology 38, 1188–1198.

6. Canbay, A., Friedman, S., Gores, G. J. (2004): Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. Hepatology 39, 273–278.

7. Cardona-Maya, W., Berdugo, J., Cadavid, A. (2008): Comparing the sperm concentration determined by the Makler and the Neubauer chambers. Actas Urol Esp 32, 443–445.

8. Chen, L., Li, J., Zhang, J., Dai, C., Liu, X., Wang, J., Gao, Z., Guo, H., Wang, R., Lu, S., Wang, F., Zhang, H., Chen, H., Fan, X., Wang, S., Qin, Z. (2015): S100A4 promotes liver fibrosis via activation of hepatic stellate cells. Journal of Hepatology 62, 156–164.

9. Cummings, B. S., Wills, L. P., Schnellmann, R. G. (2004): Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. Curr Protoc Pharmacol 56, 12.8.1-12.8.24.

10. Davies, S. P., Reynolds, G. M., Stamataki, Z. (2018): Clearance of Apoptotic Cells by Tissue Epithelia: A Putative Role for Hepatocytes in Liver Efferocytosis. Front. Immunol. 9.

11. de Haas, E. C., di Pietro, A., Simpson, K. Meijer, C., Suurmeijer, A. J. H., Lancashire, L. J., Cummings, J., de Jong, S., de Vries, E. G. E., Dive, C., Gietama, J. A. (2008): Clinical Evaluation of M30 and M65 ELISA Cell Death Assays as Circulating Biomarkers in a Drug-Sensitive Tumor, Testicular Cancer. Neoplasia 10, 1041–1048.

12. Donato, M. T., Tolosa, L., Gómez-Lechón, M. J. (2015): Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. Methods Mol. Biol. 1250, 77–93.

13. Edinger, A. L., Thompson, C. B. (2004): Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Curr. Opin. Cell Biol. 16, 663–669.

14. Elmore, S. (2007): Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol 35, 495–516.

15. Fan, D. S., Sorser, S. A., Gamarra, R. M. (2013): Secondary Sclerosing Cholangitis due to Gallbladder Adenocarcinoma. Case Rep Gastroenterol 7, 134–139.

16. Freeman, S. A., Grinstein, S. (2014): Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. Immunol. Rev. 262, 193–215.

17. Fukuda, T., Fukuchi, T., Yagi, S., Shiojiri, N. (2016): Immunohistochemical analyses of cell cycle progression and gene expression of biliary epithelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy of the mouse. Exp. Anim. 65, 135–146.

18. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Ceconni, F., Chan, F. K.-M., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Czabotar, P. E., D´Angiolella, V., Dawson, T. M., Dawson, V., L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., DeBerardinis, R. J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Dixit, V. M., Dixon, S. J., Duckett, C. S., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Elrod, J. W., Fimia, G. M., Fulda, S., Garcia-Saez, A. J., Garg, A. D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D. R., Greene, L. A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Harris, I. S., Hengartner, M. O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P. J., Juin, P. P., Kaiser, W. J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R. N., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lee, S. W., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., Lopez-Otin, C., Lowe, S. W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, W., Manic, G., Marine, J.-C., Medema, J. P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E. A., Molkentin, J. D., Moll, U. M., Munoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nunez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J. M., Pereira, D. M., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H. M., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M. P., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Ryan, K. M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.-U., Sistigu, A., Stockwell, B. R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S. W. G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M. G., Villunger, A., Virgin, H. W., Vousden, K. H., Vucic, D., Wagner, E. F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J. A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., Kroemer, G. (2018): Molecular mechanisms of cell death:

recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. 25, 486–541.

19. Glick, D., Barth, S., Macleod, K. F. (2010): Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J. Pathol. 221, 3–12.

20. Gossard, A. A., Angulo, P., Lindor, K. D. (2005): Secondary Sclerosing Cholangitis: A Comparison to Primary Sclerosing Cholangitis. Am J Gastroenterol 100, 1330–1333.

21. Gordon, S. (2016): Phagocytosis: An Immunobiologic Process. Immunity 44, 463–475.

22. Gudnason, H. O., Björnsson, H. K., Gardarsdottir, M., Thorisson, H. M., Olafsson, S., Bergmann, O. M., Björnsson, E. S. (2015): Secondary sclerosing cholangitis in patients with drug-induced liver injury. Digestive and Liver Disease 47, 502–507.

23. Gudnason, H. O., Björnsson, E. S. (2017): Secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients: current perspectives. Clin Exp Gastroenterol 10, 105–111.

24. He, J., Lu, H., Zou, Q., Luo, L. (2014): Regeneration of Liver After Extreme Hepatocyte Loss Occurs Mainly via Biliary Transdifferentiation in Zebrafish. Gastroenterology 146, 789-800.e8.

25. Ibrahim, S. F., Engh, G. v. d., (2007): Flow Cytometry and Cell Sorting. In: Kumar, A., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. (Eds.): Cell Separation; S. 19-39, Berlin, Heidelberg: Springer.

26. Jae A. Collins, Cynthia A. Schandl, Kristy K. Young, Josef Vesely, Mark C. Willingham. (1997): Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis. J Histochem Cytochem. 45, 923–934.

27. Jiang, J. X., Mikami, K., Venugopal, S., Li, Y., Török, N. J. (2009): Apoptotic body engulfment by hepatic stellate cells promotes their survival by the JAK/STAT and Akt/NF-κB-dependent pathways. J Hepatol 51, 139–148.

28. Juncadella, I. J., Kadl, A., Sharma, A. K., Shirm, Y. M., Hochreiter-Hufford, A., Borish, L., Ravichandran, K. S. (2013): Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. Nature 493, 547–551.

29. Kaarniranta, K., Sinha, D., Blasiak, J., Kauppinen, A., Vereb, Z., Salminen, A., Boulton, M. E., Petrovski, G. (2013): Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. Autophagy 9, 973–984.

30. Kawada, N. (2006): Human hepatic stellate cells are resistant to apoptosis: implications for human fibrogenic liver disease. Gut 55, 1073–1074.

31. Kirchner, G. I., Rümmele, P. (2015): Update on Sclerosing Cholangitis in Critically Ill Patients. Viszeralmedizin 31, 178–184.

32. Koerner, M., Hayes, G. M., Rehmann, R., Zimmermann, A., Scholz, A., Wiedenmann, A., Scholz, A., Wiedenmann, B., Miller, L. J., Reubi, J. C. (2006): Secretin receptors in the human liver: Expression in biliary tract and cholangiocarcinoma, but not in hepatocytes or hepatocellular carcinoma. Journal of Hepatology 45, 825–835.

33. Komuta, M., Govaere, O., Vandecaveye, V., Akiba, J., Van Steenbergen, W., Verslype, C., Laleman, W., Pirenne, J., Aerts, R., Yano, H., Nevens, F., Topal, B., Roskams, T. (2012): Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. Hepatology 55, 1876–1888.

34. Krenkel, O., Tacke, F. (2017): Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. Nature Reviews Immunology 17, 306–321.

35. Kroemer, G., Galuzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunes G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. (2009): Classification of cell death. Cell Death Differ 16, 3–11

36. Kulaksiz, H., Heuberger, D., Engler, S., Stiehl, A. (2008): Poor outcome in progressive sclerosing cholangitis after septic shock. Endoscopy 40, 214–218.

37. Kwon, O., Cho, S. H., Park, C. K., Mun, S. H. (2012): Biliary Cast Formation with Sclerosing Cholangitis in Critically Ill Patient: Case Report and Literature Review. Korean J Radiol 13, 358–362.

38. Leonhardt, S., Veltzke-Schlieker, W., Adler, A., Schott, E., Eurich, D., Faber, W. Neuhaus, P. Seehofer, D. (2015a): Secondary Sclerosing Cholangitis in Critically Ill Patients: Clinical Presentation, Cholangiographic Features, Natural History, and Outcome. Medicine (Baltimore) 94.

39. Leonhardt, S., Veltzke-Schlieker, W., Adler, A., Schott, E., Hetzer, R. Schaffartzik, W., Tryba, M., Neuhaus, P., Seehofer, D. (2015b): Trigger mechanisms of secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients. Crit Care 19.

40. Liang, C.-C., Park, A. Y., Guan, J.-L. (2007): In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nature Protocols 2, 329-333.

41. Maioli, E., Torricelli, C., Fortino, V., Carlucci, F., Tommassini, V., Pacini, A. (2009): Critical Appraisal of the MTT Assay in the Presence of Rottlerin and Uncouplers. Biol Proced Online 11, 227–240.

42. Michalopoulos, G. K., Barua, L., Bown, W. C. (2005): Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. Hepatology 41, 535-544

43. Michalopoulos, G. K., Bowen, W. C., Mule, K., Lopez-Talavera, J. C., Mars, W. (2002): Hepatocytes undergo phenotypic transformation to biliary epithelium in organoid cultures. Hepatology 36, 278-283

44. Mahmood, T., Yang, P.-C. (2012): Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. N Am J Med Sci 4, 429–434.

45. Malek-Hosseini, Z., Khezri, A., Amirghofran, Z. (2016): Circulating Levels of M30 and M65 Molecules in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder and Their Relation to Tumor Progression. Iran J Cancer Prev 9.

46. Mazzolini, G., Sowa, J.-P., Canbay, A. (2016): Cell death mechanisms in human chronic liver diseases: a far cry from clinical applicability. Clin. Sci. 130, 2121–2138.

47. Murakami, T., Yano, H., Maruiwa, M., Sugihara, S., Kojiro, M. (1987): Establishment and characterization of a human combined hepatocholangiocarcinoma cell line and its heterologous transplantation in nude mice. Hepatology 7, 551–556.

48. Nagata, S. (2018): Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. Annual Review of Immunology 36, 489–517.

49. Patel, R., Portela, D., Badley, A. D., Harmsen, W. S., Larson, J., Ilstrup, D. M., Keating, M. R., Wiesner, R. H. Krom, R. A., Paya, C. V. (1996): Risk factors of invasive Candida and non-Candida fungal infections after liver transplantation. Transplantation 62, 926–934.

50. Patel, K. V., Zaman, S., Chang, F., Wilkinson, M. (2014): Rare case of severe cholangiopathy following critical illness. BMJ Case Rep 2014.

51. Pfaffl, M. W. (2004): Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. BIOspektrum. 04, 92-95.

52. Poon, I. K. H., Hulett, M. D., Parish, C. R. (2010): Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. Cell Death & Differentiation 17, 381–397.

53. Popov, Y., Sverdlov, D. Y., Bhaskar, K. R., Sharma, A. K., Millonig, G., Patsenker, E., Krahenbuhl, S., Krahenbuhl, L., Schuppan, D. (2010): Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 298, G323–G334.

54. Reed, J. C. (2000): Mechanisms of Apoptosis. Am J Pathol 157, 1415–1430.

55. Riss, T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink, H. A., Worzella T. J., Minor L. (2004): Cell Viability Assays. In: Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Bejcek, B., Caaveiro, J. M. M., Chung, T., D. Y., Dahlin, J. L., Glicksmann, M., Hall, M. D., Haas, J. V., Inglese, J., Iversen, P. W., Kahl, S. D., Kales, S. C., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Trask, O. J., Weidner, J. R., Wildey, M. J., Xia, M., Xu, X. (Eds).: Assay Guidance Manual; Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

56. Rong, G.-H., Yang, G.-X., Ando, Y., Zhang, W., He, X.-S., Leung, P. S. C., Coppel, R. L., Ansari, A. A., Zhong, R., Gershwin, M. E. (2013): Human intrahepatic biliary epithelial cells engulf blebs from their apoptotic peers: Phagocytic ability of intrahepatic biliary epithelial cells. Clinical & Experimental Immunology 172, 95–103.

57. Rosales, C., Uribe-Querol, E. (2017): Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. Biomed Res Int 2017, 1-18.

58. Salucci, S., Burattini, S., Battistelli, M., Baldassarri, V., Maltarello, M. C., Falcieri, E. (2012): Ultraviolet B (UVB) Irradiation-Induced Apoptosis in Various Cell Lineages in Vitro. Int J Mol Sci 14, 532–546.

59. Sato, K., Marzioni, M., Meng, F., Francis, H., Glaser, S., Alpini, G. (2019): Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances: Liver Injury and Regeneration. Hepatology 59, 420–430.

60. Scholzen, T., Gerdes, J. (2000): The Ki-67 protein: From the known and the unknown. J. Cell. Physiol. 182, 311–322.

61. Schultz, D. R., Harrington, W. J. (2003): Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. Semin. Arthritis Rheum. 32, 345–369.

62. Serrano-Puebla, A., Boya, P. (2018): Lysosomal membrane permeabilization as a cell death mechanism in cancer cells. Biochem. Soc. Trans. 46, 207–215.

63. Sivakumar, S., Daum, J. R., Gorbsky, G. J. (2014): Live Cell Fluorescence Imaging for Phenotypic Analysis of Mitosis. Methods Mol Biol 1170, 549–562.

64. Stuart, L. M., Ezekowitz, R. A. B. (2005): Phagocytosis: elegant complexity. Immunity 22, 539–550.

65. Sun, X., Kaufman, P. D. (2018): Ki-67: more than a proliferation marker. Chromosoma 127, 175–186.

66. Suk, K. T., Baik, S. K., Yoon, J. H., Cheong, J. Y., Paik, Y. H., Lee, C. H., Kim, D. J., Cho, S. W., Hwang, S. G., Sohn, J. H., Kim, M. Y., Kim, Y. B., Kim, J. G., Cho, Y. K., Choi, M. S., Kim, H. J., Lee, H. W., Kim, S. U., Kim, J. K., Choi, J. Y., Jun, D. W., Tak, W. Y., Lee, B. S., Jang, B. K., Chung, W. J., Kim, H. S., Jang, J. Y., Jeong, S. W., Kim, S. G., Kwon, O. S., Jung, Y. K., Choe, W. H., Lee, J. S., Kim, I. H., Shim, J. J., Cheon, G. J., Bae, Y. S., Choi, D. H., Jang, S. J. (2012): Revision and update on clinical practice guideline for liver cirrhosis. Korean J Hepatol 18, 1–21.

67. Syntichaki, P., Tavernarakis, N. (2002): Death by necrosis. EMBO Rep 3, 604–609.

68. Tait, S. W. G., Ichim, G., Green, D. R. (2014): Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. J Cell Sci 127, 2135–2144.

69. Takehara, T., Tatsumi, T., Suzuki, T., Rucker, E. B., Henninghausen, L., Jinushi, M., Miyagi, T., Kanazawa, Y., Hayashi, N. (2004): Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. Gastroenterology 127, 1189–1197.

70. Tosello-Trampont, A.-C., Landes, S. G., Nguyen, V., Novobrantseva, T. I., Hahn, Y. S. (2012): Kuppfer Cells Trigger Nonalcoholic Steatohepatitis Development in Diet-induced Mouse Model through Tumor Necrosis Factor-α Production. J Biol Chem 287, 40161–40172.

71. Trauner, M., Fickert, P., Wagner, M. (2007): MDR3 (ABCB4) Defects: A Paradigm for the Genetics of Adult Cholestatic Syndromes. Seminars in Liver Disease 27, 077–098.

72. Treloar, K. K., Simpson, M. J. (2013): Sensitivity of Edge Detection Methods for Quantifying Cell Migration Assays. PLoS ONE 8, e67389.

73. Ustaalioglu, B. O., Bilici, A., Ercan, S., Orcun, A., Seker, M., Ozkan, A., Ustaalioglu, R., Gumus, M. (2012): Serum M30 and M65 values in patients with advanced stage non-small-cell lung cancer compared with controls. Clin Transl Oncol 14, 356–361.

74. Voigtländer T., Leuchs E., Vonberg R.-P., Solbach P., Manns M. P., Suerbaum S., Lankisch, T. O. (2015): Microbiological analysis of bile and its impact in critically ill patients with secondary sclerosing cholangitis. Journal of Infection 70, 483–90.

75. Weiss, K. E., Willmann, J. K., Jeffrey, R. B., Desser, T. S. (2016): Secondary sclerosing cholangitis in a critically ill patient. Quant Imaging Med Surg 6, 224–228.

76. Willekens, F. L. A., Were, J. M., Kruijt, J. K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Döpp, Y. A. M., Bos, A. G. v. d., Bosman, G. C. G. M., Berkel, T. J. C. v. (2005): Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell–derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. Blood 105, 2141–2145.

77. Woerner, W., Schrenk, D. (1996): Influence of Liver Tumor Promoters on Apoptosis in Rat Hepatocytes Induced by 2-Acetylaminofluorene, Ultraviolet Light, or Transforming Growth Factor β1. Cancer Res 56, 1272–1278.

78. Xiao, Y., Zhou, Y., Chen, Y., Zhou, K., Wen, J., Wang, Y., Wang, J., Cai, W. (2015): The expression of epithelial–mesenchymal transition–related proteins in biliary epithelial cells is associated with liver fibrosis in biliary atresia. Pediatric Research 77, 310–315.

79. Yang, Z., Klionsky, D. J. (2009): An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. Curr Top Microbiol Immunol 335, 1–32.

80. Zhan, S.-S., Jiang, J. X., Wu, J., Halsted, C., Friedman, S. L., Zern, M. A., Torok, N. J. (2006): Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. Hepatology 43, 435–443.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Laborwertverlauf von GGT, ALP und Bilirubin in Abhängigkeit der Tage nach dem initialen lebensbedrohlichen Ereignis (Leonhardt et al., 2015a) 8

Abbildung 2: Cholangiogram in der ERCP im stadienhaften Verlauf der SSC (Leonhardt et al., 2015a)..... 9

Abbildung 3: Überlebenskurve (Kaplan Meier Kurve) ohne Lebertransplantation bei Patienten mit SSC (Kulaksiz et al., 2008)..... 12

Abbildung 4: Verschiedene Zelltodarten mit überlappenden Entitäten (Galluzzi et al., 2018).... .. 13

Abbildung 5: Extrinsischer und Intrinsischer Weg der Apoptose (Reed 2000)..... 17

Abbildung 6: Morphologische Veränderungen der Zelle in Abhängigkeit der Zeit bei Apoptose (Jae A. Collins et al., 1997) 36

Abbildung 7: UV-bestrahlte KMCH-Zellen (A) und UV-bestrahlte HepG2-Zellen (B); DAPI..... 45

Abbildung 8: UV-bestrahlte KMCH-Zellen (A) und UV-bestrahlte HepG2-Zellen (B); Annexin V und PI 46
Abbildung 9: Durchflusszytometrie von nicht behandelten (A) und UV-bestrahlten KMCH-Zellen (B) 47
Abbildung 10: Durchflusszytometrie von nicht behandelten (A) und UV-bestrahlten HepG2-Zellen (B) 48
Abbildung 11: KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen (A) und UV-bestrahlten HepG2-Zellen (B); PKH26 und PKH67 49
Abbildung 12: KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen über 24 h 50
Abbildung 13: KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen über 24 h 52
Abbildung 14: Quantifizierung von M65 (A) und M30 (B) in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2 und KMCH-Zellen 54
Abbildung 15: Metabolische Aktivität der KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen 56
Abbildung 16: Metabolische Aktivität der KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen 57
Abbildung 17: Metabolische Aktivität von unbehandelten KMCH-Zellen, KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen und MTT-Lösung nach 24 h, 48 h und 72 h 58
Abbildung 18: Metabolische Aktivität von unbehandelten KMCH-Zellen, KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen und MTT-Lösung nach 24 h, 48 h und 72 h 58
Abbildung 19: UV-bestrahlte HepG2-Zellen nach 24h 59
Abbildung 20: KI-67 Immunzytochemie von unbehandelten und behandelten KMCH-Zellen mit UV-bestrahlten HepG2 (B, C) - oder HepG2-Zellen (D, E) 61
Abbildung 21: Quantifizierung der KI-67 Antigenexpression mittels immunzytochemisch gefärbten KMCH-Zellen 62
Abbildung 22: Relative PCNA Expression in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen und KMCH-Zellen für 24 h im Vergleich zu nicht behandelten KMCH-Zellen 64
Abbildung 23: *Scratch assay* mit Darstellung der *scratch area* in Prozent 62
Abbildung 24: Expression von α-SMA, Bcl-2, CD95, Col1-alpha, E2F1, FATP5, SOX9, S100A4 und TGF-b in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen 63
Abbildung 25: Expression von α-SMA, Bcl-2, CD95, Col1-alpha, E2F1, FATP5, SOX9, S100A4 und TGF-b in KMCH-Zellen nach Behandlung mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen 68

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Todesursachen bei Patienten mit SSC 11
Tabelle 2: Unterschiede zwischen Apoptose, Autophagie und Nekrose 17

Tabelle 3: Professionelle und nicht-professionelle Phagozyten 21
Tabelle 4: Plasmamembranrezeptoren mit den dazugehörigen Liganden 21
Tabelle 5: Versuchsanordnung in einer 6-well Platte 34
Tabelle 6: Probenanordnung von Proteinisolaten im Gel für Western-Blot 36
Tabelle 7: Zyklusschritte der PCR im Thermocycler 43

8.3 Abkürzungsverzeichnis

a. u. ..... arbitrary units
ADCD ..... autophagy-dependent cell death
AE2 ..... Anionen Austauscher 2
ALT ..... Alanin-Aminotransferase
AP ..... Alkalische Phosphatase
APC ..... Antigen präsentierende Zelle
ARDS ..... *Acute Respiratory Distress Syndrome*
ASGP-R ..... Asialoglykoprotein-Rezeptor
AST ..... Aspartat-Aminotransferase
ATG-Proteine ..... *autophagy related protein*
ATP ..... Adenosintriphosphat
Bcl-2 ..... B-cell-lymphoma
Bid ..... *BH3-interacting domain death agonist*
BSA ..... Bovines Serum Albumin
bzw. ..... *beziehungsweise*
ca. ..... *circa*
CCA ..... Cholangiokarzinome
CD95 ..... *Cluster of differentiation 95*
c-FLIP ..... *Procaspase 8-like protein*
CP ..... *crossing point*
CRP ..... C-reaktives Protein
ct ..... *cycle threshold*
DAMPs ..... *Damage-associated molecular patterns*
DAPI ..... *4´, 6 Diamidin-2-phenylindol*
DC ..... Dendritische Zelle
DISC ..... *death-inducing signaling complex*

DMEM ..... *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*

DNA ..... *Desoxyribonukleinsäure*

E. faecium ..... Enterococcus faecium

EEA 1 ..... *early endosome antigen*

ERCP ..... Endoskopisch Retrograde Cholangiopankreatikographie

FACS ..... *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FADD ..... *Fas-associated protein with death domain*

FATP-5 ..... *Fatty acid transport protein 5*

FCS ..... Fetal Bovine Serum

GGT ..... Gamma-Glutamyltransferase

h ..... Stunde

HCC ..... Hepatozelluläres Karzinom

HDGF ..... *heparin binding growth factor*

HES ..... Hydroxyethylstärke

HMGB1 ..... *high-mobility group protein B1*

HRG ..... Histidinreiches Glykoprotein

ICD ..... immunogenic cell death

ICU ..... Intensivaufenthalt

IgG4 ..... Immunglobulin-G4

IHD ..... *Intrahepatische Gallengänge*

IL-6 ..... Interleukin-6

ITBL ..... Ischemic type biliary lesion

KI ..... Konfidenzintervall

LDCD ..... lysosome dependent cell death

MFG-E8 ..... *Milk fat globule-EGF factor 8 protein*

MHC ..... *Haupthistokompatibilitätskomplex*

min ..... Minute

MLKL ..... mixed linage kinase like protein

MPT ..... mitochondrial permeability transition

MRCP ..... Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie

NaCl ..... Natriumchlorid

NAFLD ..... nicht alkoholische Fettlebererkrankung

NCCD ..... The Nomenclature Committee on Cell Death

OD ..... *Optische Dichte*

PCNA ..... *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR ..... Polymerasekettenreaktion

PDGF ..... *Platelet-derive growth factor*

PI ..... *Propidiumiodid*

PRRs ..... *Pattern Recognition Receptors*

PS ..... *Phosphatidylserin*

PSC ..... Primär sklerosierende Cholangitis

PS-R ..... Phosphatidylserinrezeptoren

PTX3 ..... Pentraxin-3

RCD ..... regulated cell death

RNA ..... *Ribonukleinsäure*

SAP ..... Serum Amyloid P

SC ..... Sklerosierende Cholangitis

SC-CIP ..... secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients

SDHA ..... *Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A*

sec. ..... *Sekunde*

SEM ..... *standard error of mean*

SIRS ..... Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom

SOX9 ..... *Sex-Determining Region Y-Box 9*

spp. ..... Spezies

SSC ..... Sekundär Sklerosierende Cholangitis

TBS ..... Tris-buffered saline

TGFb ..... *Transforming Growth Factor beta*

TNF ..... Tumornekrosefaktor

TNF-α ..... Tumornekrosefaktor alpha

UDCA ..... Ursodesoxycholsäure

UV ..... *Ultraviolett*

z. B. ..... *zum Beispiel*

ZK ..... *Zytokeratine*

α-SMA ..... *Alpha-smooth muscle actin*

µl ..... Mikroliter

8.4 Live-Cell-Imaging

CD (Buchrücken), 24h Live-Cell-Imaging KMCH-Zellen (3.10)

0:00 – 1:59 min: Kontrolle unbehandelte KMCH-Zellen (PKH26, rot) mit jeweils 4 Betrachtungspunkten für 24h mit 1 Bild alle 20min

1:59 – 3:57 min: Behandlung KMCH-Zellen (PKH26, rot) mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen (PKH67, grün) mit jeweils 4 Betrachtungspunkten für 24h mit 1 Bild alle20min

1:59 – 3:57 min: Behandlung KMCH-Zellen (PKH26, rot) mit UV-bestrahlten HepG2-Zellen (PKH67, grün) mit jeweils 4 Betrachtungspunkten für 24h mit 1 Bild alle 20min

5:56 – 7:55 min: Behandlung KMCH-Zellen (PKH26, rot) mit UV-bestrahlten KMCH-Zellen (PKH67, grün) mit jeweils 4 Betrachtungspunkten für 24h mit 1 Bild alle 20min

8.5 Danksagung

Zunächst geht ein großer Dank an Herr Prof. Dr. med. Ali Canbay, Direktor der Medizinischen Klinik am Universitätsklinikum Knappschaftskrankenhaus Bochum, für die hervorragende Betreuung, Unterstützung und Förderung meiner Promotion.

Ein ganz besonderer Dank geht an PD Dr. rer. nat. Jan-Peter Sowa für die intensive und tatkräftige Betreuung mit stets höchster fachlicher Kompetenz.

Des Weiteren möchte ich einen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Guido Gerken, ehemaliger Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikum Essen, für die finanzielle Unterstützung und Bereitstellung der Forschungslaboratorien für die Durchführung der Experimente.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Svenja Sydor, Herrn Jan Martin Schlattjan, Herrn Sami Jafoui und den restlichen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Gastroenterologie des Universitätsklinikum Essen für die Bereitstellung, Durchführung und Hilfe bei den Experimenten.

Ein weiterer Dank geht an Dr. rer. nat. Anthony Squire und Alexandra Brenzel aus dem Imaging Center Essen für die Bereitstellung des Labors und Unterstützung bei der Anfertigung der hervorragenden Zellaufnahmen.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und Freunden für die Motivation und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation.

8.6 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.