

Effecten van lipopolysachariden op hepatische stellaatcellen bij leverfibrose

Door: Marc van Ooijen

Datum: 12 mei 2020

Basiseenheid: FTT

Begeleider: Klaas Poelstra

Samenvatting

Er wordt gespeculeerd dat lipopolysachariden (LPS) een rol kunnen spelen bij het ontstaan van leverfibrose. Als er een verband kan worden aangetoond tussen LPS en het ontstaan van leverfibrose dan kan dit leiden tot nieuwe aangrijpingspunten voor potentiële medicatie hiertegen. In dit artikel wordt er gekeken naar de effecten van LPS op hepatische stercellen HSCs bij het ontstaan van leverfibrose.

LPS kan herkend worden door een samenspel tussen verschillende receptoren (TLR4, CD14, en MD2). Uit de resultaten blijkt dat HSCs expressie vertonen van deze receptoren en dus in staat zijn om LPS te herkennen.

Verder blijkt uit de resultaten dat LPS voor verschillende effecten kan zorgen in HSCs. Allereerst kan LPS een ontstekingsreactie mediëren in HSCs, wat kan resulteren in schade aan cellen in de lever. Dit wordt gedaan doordat activatie van een aantal transcriptiefactoren; NF- κ B, JNK en LITAF. Deze transcriptiefactoren zorgen voor de productie van pro-inflammatoire cytokines.

Hiernaast heeft LPS het vermogen om inactieve HSCs actief te maken. Dit kan op twee verschillende manieren; direct en indirect. LPS kan HSCs direct activeren via een activatie van de transcriptiefactor Smad2/3. Bij de indirecte activatie zorgt LPS ervoor dat de TGF- β pseudoreceptor BAMBI gedownreguleerd wordt waardoor de HSCs gevoeliger worden TGF- β .

In tegenstelling tot voorgaande bevindingen kan LPS ook anti-fibrotische effecten teweeg brengen. Als actieve HSCs worden blootgesteld aan LPS dan zorgt dit juist voor een vermindering van de fibrose.

De conclusie is dat LPS pro- of anti-fibrotische effecten heeft afhankelijk van de activiteit van HSCs. Deze bevindingen geven een nieuw inzicht in de rol van LPS bij leverfibrose.

Inhoudsopgave

Samenvatting	2
Inhoudsopgave	3
Inleiding	4
Hepatische stellaatcellen en de herkenning van LPS	5
Effecten van LPS op de productie van pro-inflammatoire stoffen in hepatische stellaatcellen.	6
Effecten van LPS op de activatie van hepatische stellaatcellen	9
Effecten van LPS op geactiveerde hepatische stellaatcellen.....	12
Discussie/Conclusie	14
Literatuurlijst.....	15

Inleiding

Leverfibrose is een excessieve ophoping van littekenweefsel in de lever. Dit wordt veroorzaakt door leverschade gepaard met de productie van extracellulaire matrix door de levercellen. Geavanceerde leverfibrose is irreversibel en kan leiden tot cirrose, leverfalen, en portale hypertensie. De hoofdoorzaken van leverfibrose zijn chronische ontsteking (voornamelijk als gevolg van Hepatitis B en C infecties), overmatige alcoholconsumptie, en vetophoping in de lever. (1) In Nederland komt leverfibrose steeds vaker voor, ook overlijden steeds meer mensen aan de gevolgen hiervan. In 2018 zijn er 468 mensen overleden als gevolg van leverfibrose/cirrose, in 1996 waren dit nog maar 292 (2). Ook nemen de ziekenhuisopnames als gevolg hiervan met het jaar toe (3). De enige behandeling van leverfibrose is een levertransplantatie, het nadeel hiervan is dat dit een zeer intensieve ingreep is. Hierdoor is er in de loop der jaren veel onderzoek gedaan naar mogelijke medicatie voor leverfibrose maar tot dusver zonder succes.

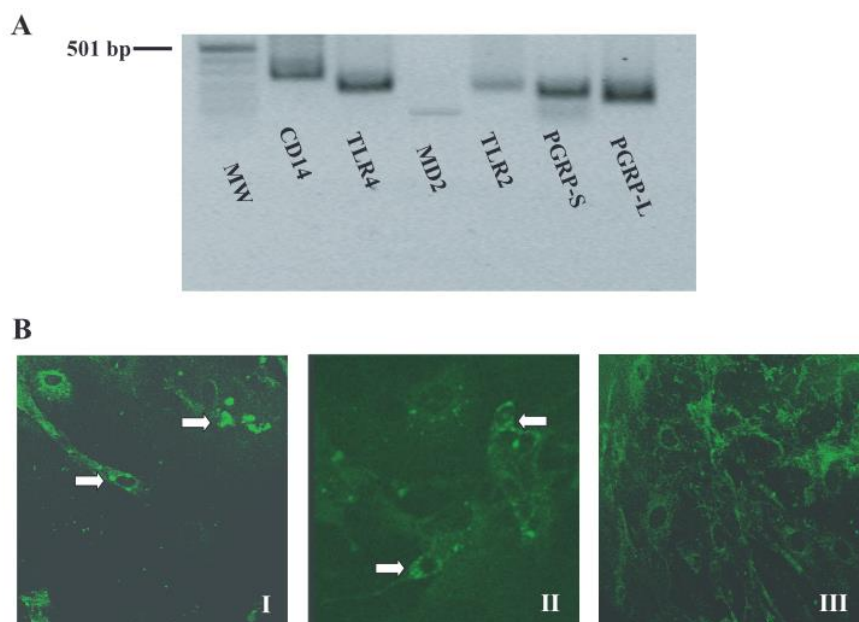
Zoals eerder aangegeven wordt leverfibrose veroorzaakt door productie van extracellulaire matrix. De cellen die hierbij de belangrijkste rol spelen zijn de hepatische stellaatcellen (HSCs). In de normale lever worden deze cellen gebruikt als opslag voor vitamine A. Na blootstelling aan chronische leverschade worden deze cellen actief, en transformeren ze in myofibroblast-achtige cellen waarbij ze fibrogenetische eigenschappen verkrijgen. Na activatie migreren deze cellen zich naar de plek waar leverschade heeft plaatsgevonden, en produceren ze extracellulaire matrix. Belangrijke markers die worden gebruikt om HSC activiteit te meten zijn α -smooth muscle actin (α -SMA) en collageen type 1 (Col1). α -SMA zorgt voor migratie van stellaatcellen en Col1 is een belangrijke component van extracellulaire matrix. (1)

Lipopolysachariden (LPS) zijn componenten van de celwand van gram negatieve bacteriën, en ze staan bekend als de grootste veroorzakers van ontstekingsreacties (4). De biologische effecten van LPS worden gemedieerd door toll-like receptoren (TLRs). TLRs hebben verschillende subtypen, de TLR4 receptor is vooral erg gevoelig voor LPS. Voordat LPS herkend kan worden door TLR4 moet het eerst binden aan LPS bindend eiwit (LBP). Vervolgens faciliteert LBP de presentatie van LPS aan de CD14 receptor. Hierna kan LPS worden overgedragen aan een TLR4/MD2 receptorcomplex. MD2 bindt aan LPS en zorgt ervoor dat LPS zo geconformeerd wordt dat de TLR4 receptor er ook aan kan binden. Na herkenning van LPS kan de TLR4 receptor zijn intracellulaire effecten teweeg brengen. (5,6)

Voorgaande studies hebben onderzoek gedaan naar de effecten van LPS op de HSC, en er wordt gespeculeerd dat LPS een belangrijke rol kan spelen in het ontstaan van leverfibrose. Als er een verband kan worden aangetoond tussen LPS en het ontstaan van leverfibrose dan kan dit leiden tot nieuwe aangrijpingspunten voor potentiële medicatie hiertegen. Maar voordat dit gedaan kan worden, is het belangrijk dat de pathologie en bijbehorende mechanismen volledig duidelijk worden gemaakt. In dit artikel zal er worden gekeken naar de effecten van LPS op HSCs bij leverfibrose. Er wordt hierbij gekeken naar de betrokken receptoren, signaalcascades, en mRNA/eiwitproductie. Belangrijke resultaten uit voorgaande studies zullen worden besproken en met elkaar vergeleken om zo tot een weloverwogen eindconclusie te komen.

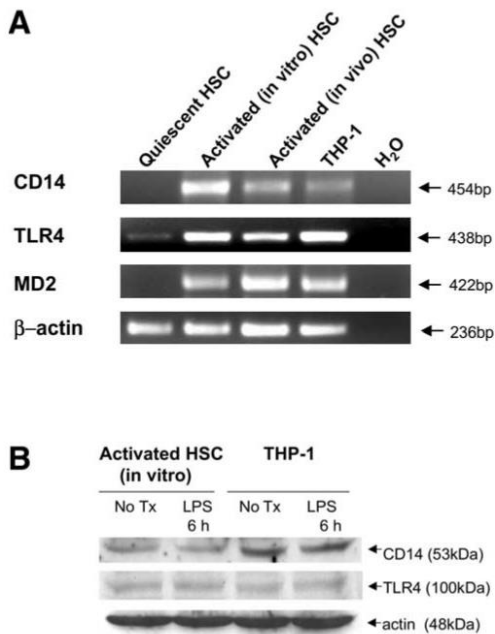
Hepatische stellaatcellen en de herkenning van LPS

Om de effecten van LPS op HSCs te bekijken moet er eerst bepaald worden of deze cellen LPS wel kunnen herkennen. Een studie (7) heeft gekeken naar de expressie van receptoren die een belangrijke rol spelen bij de herkenning van bacteriële celwandproducten op HSCs in muizen. RNA werd geïsoleerd van ongestimuleerde HSCs van muizen. Dit werd vervolgens onderzocht met behulp van reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) en immunocytochemie. In figuur 1A is te zien dat CD14- en TLR4-mRNA duidelijk aanwezig is. Ook is het mRNA van peptidoglycaan herkennende eiwitten (PGRP-S en PGRP-L) aanwezig. Deze eiwitten zijn in staat om peptidoglycaanfragmenten van gram positieve bacteriën te herkennen, en spelen dus geen rol bij het identificeren van LPS. TLR2- en MD2-mRNA is in mindere mate ook aanwezig. TLR2 is net als PGRP-S en PGRP-L niet van belang voor het herkennen van LPS. In figuur 1B is de aanwezigheid van het mRNA van CD14 en TLR4 nogmaals bevestigd doormiddel van immunocytochemie. (7)



Figuur 1. Hepatische stellaatcellen van muizen bezitten bacteriële endotoxine receptoren. (A) Het totale RNA was geïsoleerd van HSCs van muizen en RT-PCR werd uitgevoerd met behulp van specifieke primers. Amplificatieproducten werden geïsoleerd met behulp van agarose gel gekleurd met ethidium bromide en zichtbaar gemaakt met een ultraviolet transilluminator. (B) Hepatische stellaatcellen geplaatst op dekglasjes werden gefixeerd en geïncubeerd met anti-CD14 (I) of anti-TLR4 (II) polyclonaal antilichaam. De aanwezigheid van specifieke immunocomplexen werd gedetecteerd met confocale microscopie. Controle cellen waren geïncubeerd met een irrelevant antilichaam van een muis (III). (7)

Een andere studie (8) heeft ook gekeken naar de aanwezigheid van LPS herkennende receptoren op HSCs, maar in tegenstelling tot vorig onderzoek is er getest op humane HSCs. Ook zijn zowel inactieve en actieve HSCs met elkaar vergeleken. CD14-, TLR4-, en MD2-mRNA expressie is gemeten met behulp van RT-PCR, en CD14- en TLR4-eiwit expressie is gemeten met behulp van Western blotting. In figuur 2A is te zien dat bij inactieve HSCs lage levels van TLR4-mRNA is waargenomen, CD14 en MD2 mRNA is niet aanwezig. mRNA voor CD14, TLR4 en MD2 is verhoogd bij actieve HSCs zowel in vivo als in vitro. In figuur 2B is te zien dat CD14- en TLR4-eiwitten aanwezig zijn in actieve humane hepatische stellaatcellen. Een LPS stimulatie van 6 uur had geen invloed op de eiwitexpressie van CD14 en TLR4. (8)

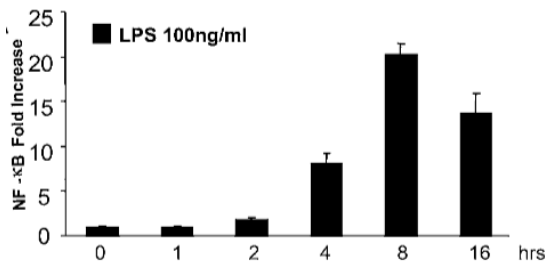


Figuur 2. Expressie van LPS receptoren in humane HSCs. (A) CD14, TLR4 en MD2 mRNA expressie werd bepaald doormiddel van RT-PCR. Het totale RNA werd verkregen van inactieve stellaatcellen, in vitro geactiveerde HSCs (uit normale lever), in vivo geactiveerde HSCs (uit HCV-geïnduceerde cirrotische lever), of van gedifferentieerde THP-1 cellen. Data is representatief voor HSCs van 3 normale humane levers en 2 humane cirrotische levers. THP-1 cellen werden gedifferentieerd door behandeling met 10 ng/mL PMA voor 18 uur en werden gebruikt als positieve controle. (B) CD14 en TLR4 eiwit expressie werd gedaan met Western blotting in in vitro stellaatcellen en THP-1 cellen met en zonder LPS (100ng/mL) voor 6 uur. Actine expressie werd gemeten om gelijke eiwit loading vast te stellen. (8)

Effecten van LPS op de productie van pro-inflammatoire stoffen in hepatische stellaatcellen

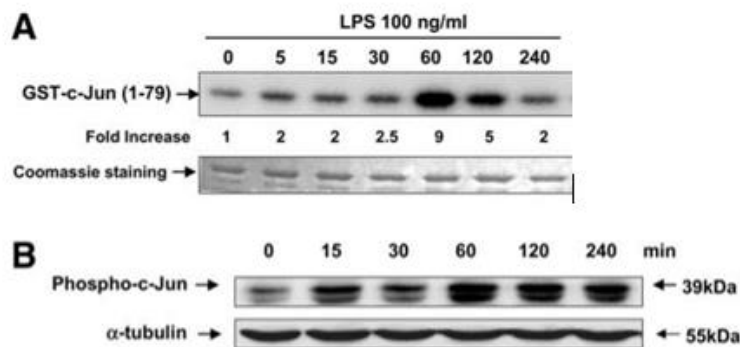
Chronische ontsteking is een belangrijke voorloper van leverfibrose (1). Het is algemeen bekend dat LPS zorgt voor de productie van pro-inflammatoire stoffen. Deze productie van pro-inflammatoire stoffen speelt een belangrijke rol bij de immunreactie, maar overmatige productie hiervan kan leiden tot celschade en in het ernstigste geval septische shock (9). Cellen die hierbij een belangrijke rol bij spelen bij de productie van pro-inflammatoire stoffen in de lever zijn Kupffer cellen (10), maar er is ook veelvuldig onderzoek gedaan naar de rol van HSCs bij de productie van deze stoffen na blootstelling aan LPS.

Allereerst is er onderzoek gedaan naar het effect van LPS op de activatie van NF-κB en JNK (8). NF-κB is een transcriptiefactor die zorgt voor de expressie van een breed scala aan pro-inflammatoire genen (11). In figuur 3 is te zien dat blootstelling van HSCs aan LPS zorgt voor een stijging van NF-κB transcriptie op een tijds- en dosis afhankelijke manier.



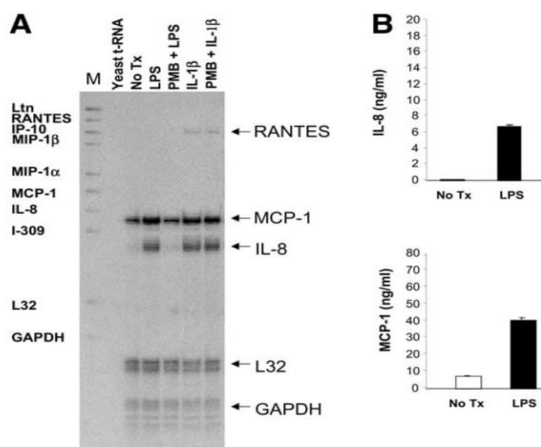
Figuur 3. NF-κB activiteit in Humane HSCs na blootstelling aan LPS. HSCs werden gestimuleerd met LPS (100 ng/ml) voor de aangegeven tijdstippen. De cellen werden gelyseerd en NF-κB afhankelijke luciferase activiteit werd gekwantificeerd. (8)

JNK is een kinase die onderdeel is van een signaalcascade die wordt geassocieerd met de upregulatie van verschillende cytokines (12). In figuur 4 is te zien dat LPS ook zorgt voor een verhoging van JNK-activiteit. Ook is te zien dat LPS de fosforylering van JNK induceert.



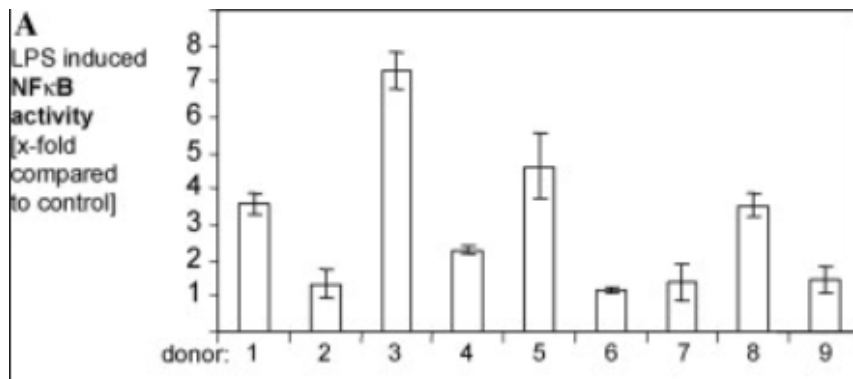
Figuur 4. LPS activeert JNK in humane HSCs. HSCs werden gekweekt en blootgesteld aan LPS (100ng/mL) voor de aangegeven tijdstippen. (A) Een in vitro kinase assay werd gedaan voor JNK met GST-c-Jun als substraat. Coomassie kleuring werd gebruikt om gelijke eiwit loading vast te stellen. (B) Western blotting werd gebruikt met een antilichaam specifiek voor gefosforyleerde c-Jun. (8)

Ook is in dit onderzoek gekeken naar de effecten van de activatie van NF-κB en JNK op de productie van bepaalde cytokines en adhesiemoleculen. De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 5. Er is te zien dat LPS zorgt voor een verhoging van zowel het mRNA als de eiwitsecretie van de cytokines IL-8 en MCP-1. Deze cytokines zijn belangrijk bij het ontstaan van een ontstekingsreactie. (8)



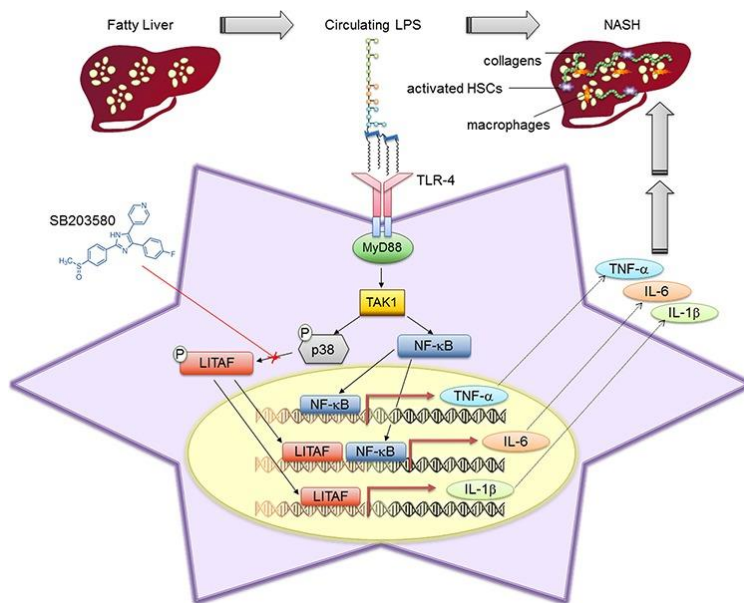
Figuur 5. LPS verhoogde de secretie van IL-8 en MCP-1 in humane HSCs. (A) RNase protection assay is uitgevoerd om IL-8 en MCP-1 mRNA expressie te bepalen onder invloed van verschillende factoren waaronder LPS. (B) Eiwitsecretie van IL-8 en MCP-1 werd uitgevoerd met behulp van ELISA. (8)

Dit onderzoek is verder aangevuld met een andere studie (13) waarbij ook gekeken is naar het effect van LPS op de activatie van NF- κ B in humane HSCs. In figuur 6 is te zien dat LPS geïnduceerde NF- κ B activiteit sterk varieerde tussen HSCs van verschillende donoren.



Figuur 6. LPS geïnduceerde NF- κ B activiteit varieert tussen HSCs van verschillende donoren. Humane HSCs van 9 verschillende donoren werden gekweekt en gestimuleerd met LPS (100 ng/ml) voor 1 uur. Nucleaire concentratie van NF- κ B werd geanalyseerd met ELISA. (13)

Naast onderzoek naar LPS gemedieerde activatie van NF- κ B en JNK is er ook onderzoek gedaan naar andere manieren van LPS om pro-inflammatoire stoffen te produceren in HSCs. Een studie (14) heeft gekeken naar de rol van LPS geïnduceerde TNF- α factor (LITAF) in humane HSCs. LITAF is een eiwit dat zich vooral in macrofagen bevindt en het speelt een belangrijke rol in de activatie van pro-inflammatoire moleculen na stimulatie van LPS (15). In figuur 7 is schematisch de rol van LITAF in de humane HSC weergegeven. Er is te zien dat binding van LPS aan de TLR-4 receptor leidt tot rekrutering van adapter eiwitten zoals MyD88. Dit leidt tot betrokkenheid van verschillende andere eiwitcomplexen wat resulteert in een activatie van TAK1. Als TAK1 geactiveerd is dan kan deze zorgen voor: 1) de fosforylering en activatie van p38MAPK wat leidt tot LITAF afhankelijke productie van cytokines als IL-1 β en IL-6; 2) nucleaire translocatie en activatie van NF- κ B wat zorgt voor productie van TNF- α en IL-6. Deze cytokines kunnen op hun beurt weer zorgen voor een ontstekingsreactie. (14)



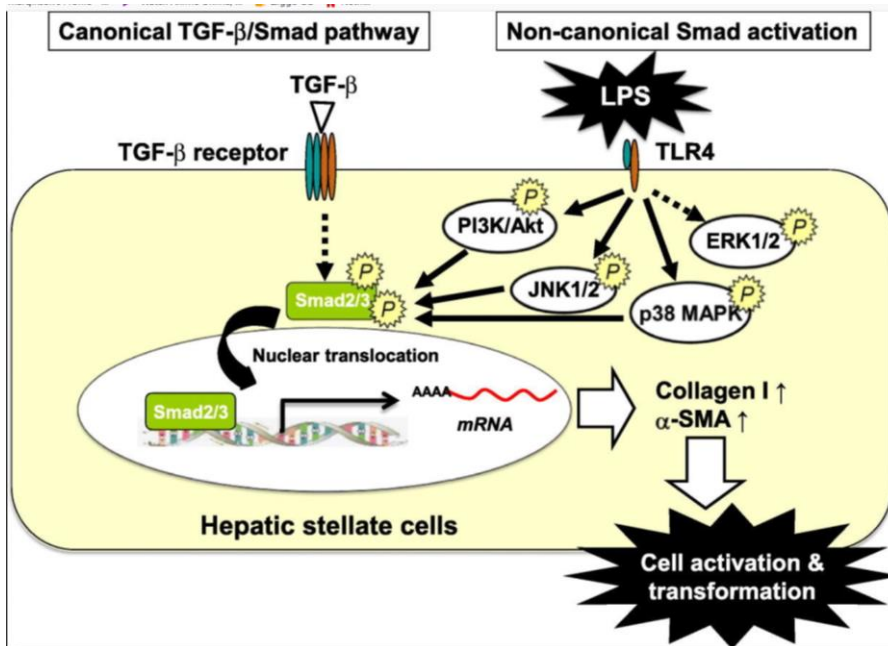
Figuur 7. Schematische representatie van de rol van LITAF in een humane HSC. (14)

Effecten van LPS op de activatie van hepatische stellaatcellen

Activatie van HSCs is de kenmerkende stap bij leverfibrose. Welke rol LPS hierbij speelt is nog niet geheel duidelijk. Recente studies hebben gekeken naar de invloed van LPS op de activatie van HSCs. Om de activatie van de stellaatcellen te meten wordt er vooral gekeken naar de markers α -SMA en Coll1.

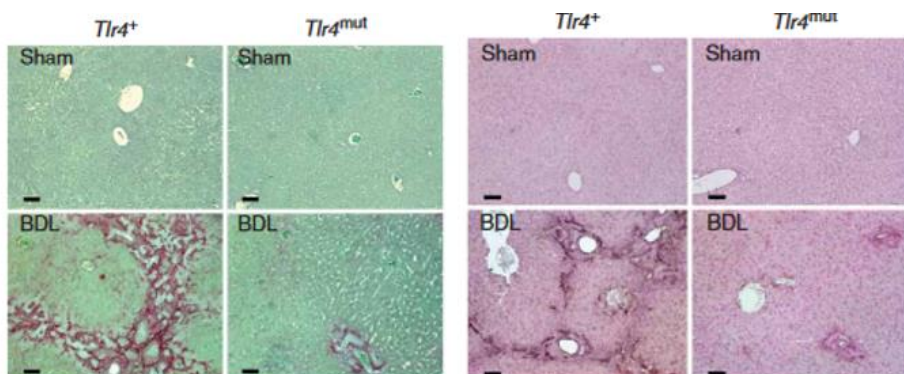
Een studie (16) heeft onderzoek gedaan naar het fibrogenetische effect van LPS doormiddel van activatie van HSCs. Dit onderzoek is in vitro uitgevoerd op HSCs van ratten. Er is gekeken naar de productie van Coll1 en α -SMA, en de bijbehorende signaal cascades. In figuur 8 is een schematische weergave te zien van de bevindingen.

Allereerst is te zien dat na binding van LPS aan de TLR4 receptor er verschillende kinases worden gefosforyleerd. PI3K/Akt, JNK1/2, en p38 MAPK zijn signaaleiwitten die in dit geval zorgen voor de fosforylering van Smad2/3. Smad2/3 is een eiwit dat invloed kan hebben op de expressie van bepaalde genen. Normaal gesproken wordt dit eiwit geactiveerd door de TGF- β receptor. In de celkern zorgt Smad2/3 voor een verhoogde expressie van Coll1 en α -SMA. (16)



Figuur 8. Schematische weergave van LPS afhankelijke signaalcascades in HSCs van ratten. (16)

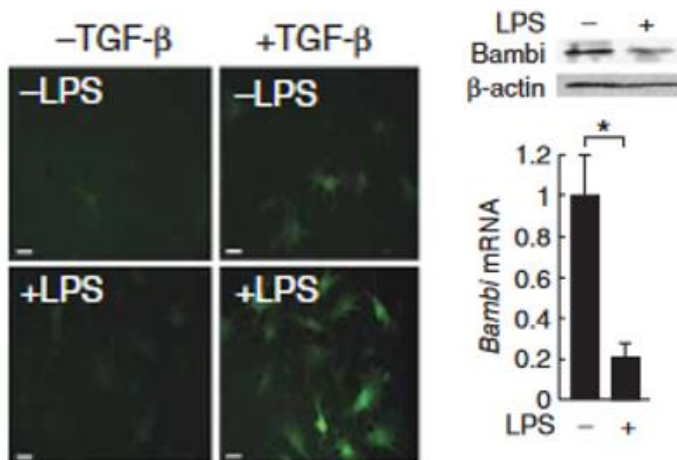
Een andere studie (17) heeft ook gekeken naar het ontstaan van leverfibrose als gevolg van activatie van HSCs door LPS. Dit onderzoek werd gedaan door TLR4-wildtype muizen (muizen die TLR4 receptoren bezitten) te vergelijken met TLR4-KO muizen (muizen die geen TLR4 receptoren bezitten). Uit de resultaten blijkt dat na inductie van fibrose doormiddel van galweg ligatie (BDL) zowel Coll1 als α -SMA in hogere mate aanwezig zijn in de levers van TLR4-wildtype muizen (figuur 9). Dit betekent dat binding van LPS aan TLR4 zorgt voor een verhoging van Coll1 en α -SMA en dus een activatie van HSCs. (17)



Figuur 9. Reductie van hepatische fibrogenese in TLR4-KO muizen. TLR4-wildtype muizen ($Tlr4^+$, $n=8$) en TLR4-KO muizen ($Tlr4^{mut}$, $n=8$) ondergingen BDL voor 21 dagen. (Links) Collageen depositie is bepaald met behulp van Sirius rood kleuring en hydroxyproline meting. (Rechts) α -SMA expressie is bepaald met immunohistochemie. (17)

Hiernaast is in dit onderzoek nog gekeken naar de mechanismen die betrokken zijn bij de activatie van de HSCs. In tegenstelling tot vorig onderzoek waarbij er werd gedacht dat de TLR4 een directe invloed had op de genexpressie van Coll1 en α -SMA, wordt er hier gedacht dat de TLR4 receptor de HSCs op een indirecte manier activeert. Dit wordt ondersteund door de resultaten die te zien zijn in figuur 10. In deze figuur is weergegeven (links) dat in aanwezigheid van alleen LPS geen Coll1 aanwezig is, terwijl in aanwezigheid van zowel LPS als TGF- β wel Coll1 aanwezig is. TGF- β is een cytokine die wordt erkend als een van de belangrijkste mediators bij het ontstaan van leverfibrose (18). In figuur 10 (rechts) is ook te

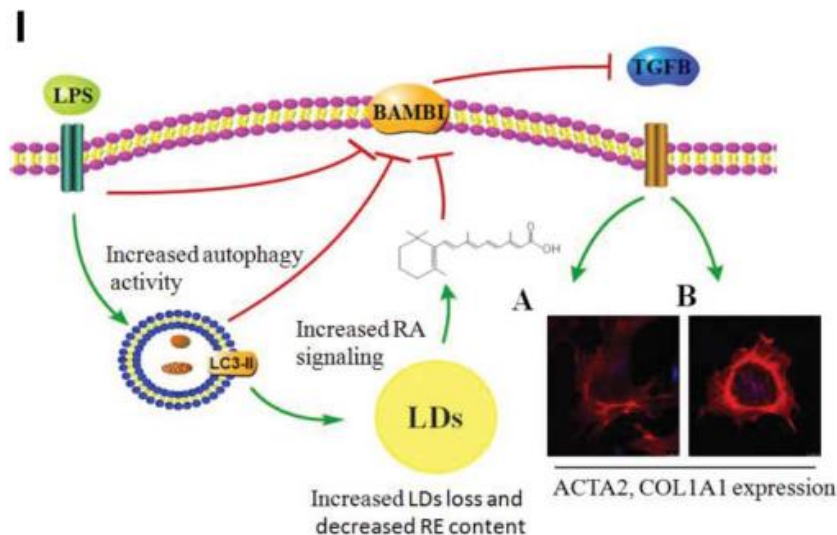
zien dat LPS zorgt voor een vermindering van de TGF- β pseudoreceptor Bambi. Dit betekent dat de TLR4 receptor na blootstelling aan LPS zorgt voor een afname in de aanmaak van Bambi waardoor de HSCs gevoeliger worden voor TGF- β . (17)



Figuur 10. LPS verlaagt de aanmaak van Bambi waardoor TGF- β signalering en HSC activatie versterkt wordt. (Links) Collageen depositie bij inactieve HSCs van muizen bij wel of geen aanwezigheid van LPS (100 ng/ml, 24 uur) en TGF- β 1 (100 pg/ml, 8 uur) bepaald met behulp van colGFP (green fluorescent protein aan collageen) en fluorescerende microscopie. (Rechts) eiwitexpressie van Bambi gemeten met western blotting bij wel of geen aanwezigheid van LPS. (17)

De bevindingen in het vorige onderzoek worden ondersteund en uitgebreid door een wat recentere studie (19). Bij deze studie is er gekeken naar de invloed van LPS op autofagie en retinoïne zuur signalering (retinoïne zuur is een metaboliet van vitamine A). Autofagie is een proces waarbij bestanddelen van het cytoplasma (beschadigde organellen en dysfunctionele eiwitten) worden bezorgd aan lysozomen zodat ze kunnen worden afgebroken (20). Er is al bewijs dat autofagie zich bemoeit met vetafbraak in hepatocyten (lipofagie) en dat dit een belangrijke rol speelt bij fibrose (21).

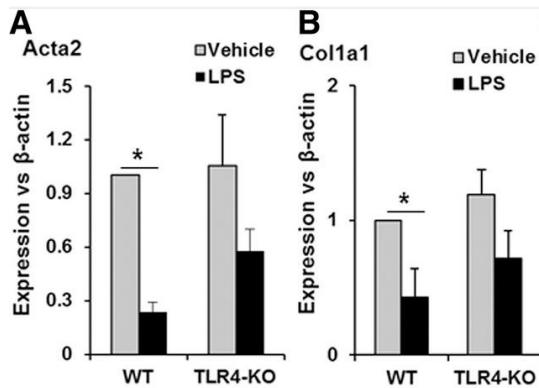
Uit dit onderzoek bleek dat blootstelling van HSCs aan LPS zorgt voor een inductie van de autofagie in HSCs van muizen. Deze verhoging van de autofagie zorgt ervoor dat het vetgehalte in de cel (uitgedrukt in Lipid Droplets, LD) omlaag gaat. Deze verlaging van LDs zorgt voor een vermindering van de retinoïne zuur signalering wat resulteert in een downregulatie van de TGF- β pseudoreceptor Bambi en een verhoging van de gevoeligheid van de HSC voor TGF- β . Tot slot is er nog bepaald dat LPS zorgt voor een verhoging van Col1 mRNA expressie, en Col1/ α -SMA eiwitexpressie. De bevindingen van dit onderzoek zijn schematisch weergegeven in figuur 11. (19)



Figuur 11. Signaaltransductie in de HSCs van muizen na blootstelling aan LPS. (19)

Effecten van LPS op geactiveerde hepatische stercelaten

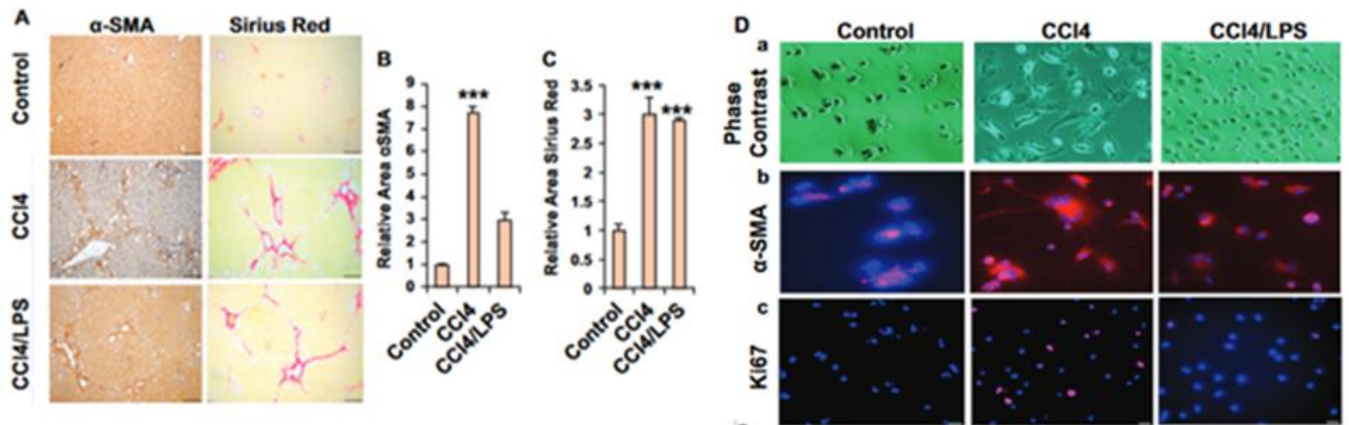
Op basis van voorgaande resultaten kan worden gezegd dat LPS een belangrijke rol speelt bij de activatie van HSCs. Er is ook onderzoek gedaan naar de effecten van LPS op HSCs die al actief zijn. Bij de eerste studie (22) werden wildtype en TLR4-KO muizen geïnduceerd met leverfibrose en vervolgens blootgesteld aan LPS. In figuur 12 is te zien dat bij zowel wildtype muizen als TLR4-KO muizen de expressie van α -SMA en Col1 omlaag gaat. Bij wildtype muizen gaat deze expressie sterker omlaag dan bij TLR4-KO muizen. Dit suggereert dat LPS juist zorgt voor een vermindering van het fibrotische proces. (22)



Figuur 12. LPS stimulatie van HSCs verminderd de expressie van fibrotische markers. Geïsoleerde HSCs van wildtype (WT) en TLR4-KO muizen werden behandeld met LPS (100 ng/mL, 24 uur) en vergeleken met de controle. A = Acta2 (gen dat staat voor expressie van α -SMA). B = Col1a1 (gen dat staat voor expressie van collageen). (22)

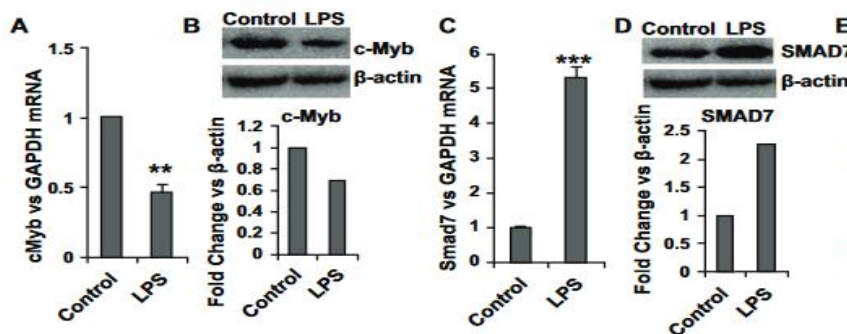
Deze resultaten worden verder aangevuld met een vervolgstudie (23) waarbij er onderzoek is gedaan naar de moleculaire mechanismen waarop LPS zijn anti-fibrotische effecten op actieve HSCs medieert. Allereerst werd er nogmaals gekeken naar de effecten van LPS op het fibrotische proces. HSCs van ratten werden in vivo geactiveerd door toediening van CCl₄ (stof die fibrose induceert). Vervolgens werden ze blootgesteld aan LPS. Hierna werden de HSCs geïsoleerd en onderzocht. In figuur 13A-C is te zien dat α -SMA kleuring sterk verminderd is na blootstelling aan LPS. Sirius rood kleuring (gebruikt om de hoeveelheid collageen te bepalen) veranderde niet na blootstelling aan LPS. Zelfs na 8 weken CCl₄

behandeling wanneer er extensieve fibrose ontstond kon LPS nog voor een vermindering zorgen van de α -SMA expressie. In figuur 13 is te zien dat HSCs van controle ratten een morfologie van inactieve HSCs vertonen met een lage α -SMA expressie en een lage ki67 kleuring (mate van celproliferatie). HSCs van ratten die behandeld zijn met CCl₄ vertonen een actief fenotype en hebben een verhoogde α -SMA expressie en celproliferatie. HSCs van ratten die zowel behandeld zijn met CCl₄ als LPS lieten een inactieve morfologie zien (ronde vorm), hiernaast waren de α -SMA expressie en celproliferatie verlaagd. Hieruit volgt ook dat LPS een anti-fibrotisch effect heeft op actieve HSCs. (23)



Figuur 13. In vivo behandeling van fibrotische ratten met LPS. (A) α -SMA en sirius rood kleuring van de leversecties. (B, C) kwantificatie van α -SMA en sirius rood kleuring. (D) Fase contrast beelden (a) werden verkregen, en α -SMA (b) of ki67 (c) immunokleuring werd toegepast. Beelden zijn verkregen met behulp van een fluorescentiemicroscoop. (23)

Vervolgens is ook nog gekeken naar de moleculaire mechanismen waarop LPS zijn effect uitoefent op actieve HSCs. In figuur 14 is te zien dat LPS de expressie van cMyb (een transcriptiefactor van α -SMA) verlaagd. Ook is te zien dat LPS voor een verhoging van Smad7 (transcriptiefactor die Col1 expressie verlaagt) zorgt. (23)



Figuur 14. LPS induceert veranderingen in de expressie van transcriptiefactoren van HSC- (van ratten) activatie en fibrogenese. (A) mRNA expressie van cMyb gecorrigeerd met behulp van GAPDH, bepaald met qRT-PCR. (B) Eiwitexpressie van cMyb gecorrigeerd met behulp van β -actine, bepaald met western blotting. (C) mRNA expressie van Smad7 gecorrigeerd met behulp van GAPDH, bepaald met qRT-PCR. (D) Eiwitexpressie van Smad7 gecorrigeerd met behulp van β -actine, bepaald met western blotting. (23)

Discussie/Conclusie

Hepatische stellaatcellen en herkenning van LPS

Zoals in de inleiding is aangegeven kan LPS binden aan de TLR4 receptor in samenspel met CD14 en MD2. Uit de resultaten blijkt dat al deze receptoren aanwezig zijn op zowel HSCs van muizen als actieve humane HSCs. Hieruit kan geconcludeerd worden dat deze HSCs in staat zijn om LPS te herkennen. Ook is gebleken uit de resultaten dat actieve HSCs een veel grotere TLR4 expressie hebben dan inactieve HSCs. Dit suggereert dat actieve humane HSCs een sterkere respons geven op LPS dan inactieve humane HSCs. Dit wordt verder aangevuld met het feit dat inactieve humane HSCs helemaal geen mRNA expressie van CD14 en MD2 hebben. Dit hoeft niet te betekenen dat inactieve humane HSCs helemaal geen LPS kunnen herkennen, ze kunnen bijvoorbeeld afhankelijk zijn van andere cellen voor de productie van MD2 en CD14. In mijn ogen is dit bewijs genoeg dat er met zekerheid gezegd kan worden dat HSCs van muizen en actieve humane HSCs het vermogen hebben om LPS te herkennen. (7,8)

Effecten van LPS op de productie van pro-inflammatoire stoffen in hepatische stellaatcellen

Om het effect van LPS te bepalen op de productie van pro-inflammatoire stoffen in HSCs te bepalen is er gekeken naar de activatie van verschillende transcriptiefactoren en de productie van verschillende cytokines. Uit de resultaten kan worden opgemaakt dat LPS verschillende manieren heeft om een ontstekingsreactie te veroorzaken in HSCs. LPS kan zorgen voor een activatie van de transcriptiefactoren NF- κ B, JNK en LITAF. Activatie van deze transcriptiefactoren leidt tot de productie van verschillende cytokines; IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 en MCP-1. Wel is het zo dat activatie van NF- κ B door LPS sterk lijkt te verschillen tussen HSCs van verschillende donoren. De mate van ontstekingsreactie is dus persoonlijk en kan variëren tussen individuen.

In conclusie, humane HSCs gebruiken componenten van de TLR4 signaaltransductie cascade om NF- κ B, JNK en LITAF te stimuleren, en de expressie van bepaalde cytokines te verhogen. Dus HSCs zijn een potentiële mediator van LPS geïnduceerde leverschade. Het bewijs van deze studies is sterk vanwege het feit dat deze allemaal zijn uitgevoerd op humane HSCs en dus een goed beeld geven van de werkelijke situatie. (8,13,14)

Effecten van LPS op de activatie van hepatische stellaatcellen

Uit de resultaten blijkt dat LPS HSCs op verschillende manieren kan activeren. Er kan worden gesproken van een directe activatie en een indirecte activatie. Bij de directe activatie zorgt LPS doormiddel van binding aan TLR4 ervoor dat verschillende kinases worden geactiveerd. Vervolgens wordt de transcriptiefactor Smad2/3 geactiveerd waardoor de genexpressie van α -SMA en Coll1 omhoog gaat. Deze verhoogde expressie van α -SMA en Coll1 kenmerkt de activatie van de HSC. (16) De indirecte activatie van HSCs door LPS wordt gemedieerd door een downregulatie in de expressie van de TGF- β pseudoreceptor BAMBI. Doordat er minder expressie van BAMBI is, wordt de HSC gevoeliger voor TGF- β . Een hogere gevoeligheid voor TGF- β resulteert in de activatie van HSCs. De downregulatie van BAMBI wordt veroorzaakt door een toename van autofagie en een afname van de retroïne zuur signalering. (17,19) Een nadeel van deze studies is dat ze alleen zijn uitgevoerd in HSCs van ratten of muizen. Hoewel de resultaten wel een beeld kunnen schetsen van hoe het er aan toe kan gaan in humane HSCs, is het natuurlijk geen garantie dat humane HSCs op dezelfde manier reageren op LPS dan HSCs van ratten en muizen. Om erachter te komen wat de effecten van LPS op de activatie van humane HSCs zijn, zal er vervolgonderzoek moeten worden uitgevoerd.

Effecten van LPS op geactiveerde hepatische stellaatcellen

Uit de resultaten kan opgemaakt worden dat als actieve HSCs worden blootgesteld aan LPS, dit zorgt voor een vermindering van het fibrotische effect van de HSCs op de lever. Dit effect wordt gemedieerd doordat LPS zorgt voor een remming de transcriptiefactor cMyb waardoor de genexpressie van α -SMA geremd wordt. Ook zorgt LPS voor een remming van Coll expressie via een activatie van de transcriptiefactor Smad7. (22, 23) Ook deze studies zijn niet uitgevoerd op humane HSCs, dus om er zeker van te zijn welke effecten LPS heeft op geactiveerde humane HSCs moet er vervolgonderzoek worden uitgevoerd.

Al met al is de conclusie dat LPS verschillende effecten heeft op HSCs bij het ontstaan van leverfibrose. LPS medieert een ontstekingsreactie in HSCs wat kan resulteren in schade aan cellen in de lever. Leverschade is een belangrijke factor bij het ontstaan van fibrose en LPS kan dit dus veroorzaken. Ook heeft LPS het vermogen om inactieve HSCs actief te maken. Maar in tegenstelling tot deze bevindingen kan LPS ook anti-fibrotische effecten teweeg in actieve HSCs. Op basis van de tot nu toe beschikbare literatuur is het naar mijn mening niet mogelijk om LPS te zien als een mogelijk aangrijpingspunt voor nieuwe medicatie tegen leverfibrose, vanwege het feit dat LPS tegenovergestelde effecten heeft afhankelijk van de activiteit van HSCs,

Literatuurlijst

- 1) Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-18.
- 2) Centraal Bureau voor de Statistiek (2019, 19 december). Overledenen; doodsoorzaak (uitgebreide lijst), leeftijd, geslacht. Geraadpleegd op 11 mei 2020.
<https://opendata.cbs.nl/statline/#/CBS/nl/dataset/7233/table?ts=1587654082495>
- 3) Centraal Bureau voor de Statistiek (2020, 24 maart). Ziekenhuisopnamen en -patiënten; diagnose-indeling ICD-10 (3-teken niveau). Geraadpleegd op 11 mei 2020.
<https://opendata.cbs.nl/statline/#/CBS/nl/dataset/84069NED/table?ts=1587654103660>
- 4) Ulevitch, R. J., & Tobias, P. S.. Receptor-Dependent Mechanisms of Cell Stimulation by Bacterial Endotoxin. *Annual Review of Immunology*, 1995;13(1), 437–457.
- 5) Muta T, Takeshige K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur J Biochem*. 2001;268(16):4580-9.
- 6) Płóciennikowska A, Hromada-judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(3):557-581.
- 7) Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, Palù G, Martines D. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(3):G571-8.
- 8) Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2003;37(5):1043-55.
- 9) Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:437-57.
- 10) Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(46):7413-20.

- 11) Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002;3(3):221-7.
- 12) Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol.* 2001;166(11):6812-9.
- 13) Mühlbauer M, Weiss TS, Thasler WE, et al. LPS-mediated NFkappaB activation varies between activated human hepatic stellate cells from different donors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(1):191-7.
- 14) Ceccarelli S, Panera N, Mina M, et al. LPS-induced TNF- α factor mediates pro-inflammatory and pro-fibrogenic pattern in non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget.* 2015;6(39):41434-52.
- 15) Tang X, Metzger D, Leeman S, Amar S. LPS-induced TNF-alpha factor (LITAF)-deficient mice express reduced LPS-induced cytokine: Evidence for LITAF-dependent LPS signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(37):13777-82.
- 16) Kao YH, Chen PH, Wu TY, et al. Lipopolysaccharides induce Smad2 phosphorylation through PI3K/Akt and MAPK cascades in HSC-T6 hepatic stellate cells. *Life Sci.* 2017;184:37-46.
- 17) Seki E, De minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007;13(11):1324-32.
- 18) Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2247-50.
- 19) Chen M, Liu J, Yang W, Ling W. Lipopolysaccharide mediates hepatic stellate cell activation by regulating autophagy and retinoic acid signaling. *Autophagy.* 2017;13(11):1813-1827.
- 20) Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(8):461-72.
- 21) Deng J, Huang Q, Wang Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates autophagy to activate hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;454(2):328-34.
- 22) Kumar S, Wang J, Shanmukhappa SK, Gandhi CR. Toll-Like Receptor 4-Independent Carbon Tetrachloride-Induced Fibrosis and Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Injury in Mice: Role of Hepatic Stellate Cells. *Am J Pathol.* 2017;187(6):1356-1367.
- 23) Sharma A, Verma AK, Kofron M, et al. Lipopolysaccharide Reverses Hepatic Stellate Cell Activation via Modulation of cMyb, SMADs and C/EBP Transcription Factors. *Hepatology.* 2020;