

Modulation der antibakteriellen Immunantwort in Blut und Aszites durch von Immunzellen produzierten Katecholamine bei Patienten mit Leberzirrhose

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Christina Nischalke

aus Bad Neuenahr-Ahrweiler

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Philipp Lutz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Steffen Manekeller

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.12.2023

Aus der Klinik und Poliklinik I für Innere Medizin – Gastroenterologie, Hepatologie,
Infektiologie, Nephrologie, Endokrinologie, Diabetologie
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	9
1.1	Leberzirrhose	9
1.1.1	Diagnose einer Leberzirrhose	10
1.1.2	Ursachen der Leberzirrhose	12
1.1.3	Komplikationen der Leberzirrhose: Aszites, spontane bakterielle Peritonitis, Hepatozelluläres Karzinom	14
1.1.4	Kompartiment Peritonealhöhle	16
1.2	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	17
1.3	Beta-adrenerge Rezeptoren	18
1.4	Katecholamine	19
1.5	Die nicht-synonymen Polymorphismen Arg16Gly (rs1042713), Gln27Glu (rs1042712) und Thr164Ile (rs1800888)	21
1.6	Nicht-selektive Beta-Blocker	23
1.7	Zielsetzung	24
2.	Material und Methoden	26
2.1	Patienten, Datenerhebung und statistische Analyse	26
2.2	Material	27
2.2.1	Geräte und Zubehör	27
2.2.2	Chemikalien, Puffer und Reagenzien	28
2.2.3	Kits	29
2.2.4	Medien	29
2.2.5	Verwendete Antikörper und UltraComp eBeads	30
2.2.6	LightSNiP Assays (Tib Molbiol)	31
2.3	Methoden	31
2.3.1	Erythrozyten-Lyse	31
2.3.2	Durchflusszytometrie (FACS)	31
2.3.3	Isolation von mononuklearen Asziteszellen	36
2.3.4	Isolierung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation (Pancoll)	37

2.3.5	DNA-Isolation	38
2.3.6	PCR – Polymerase-Kettenreaktion	38
2.3.6.1	LightCycler-Sonden zur Genotypisierung	39
2.3.7	Zellkultur und -Stimulation	41
2.3.8	ELISA	42
3.	Ergebnisse	44
3.1	Charakteristik der Kohorten	44
3.2	Die Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen im Blut und Aszites	46
3.3	Die Expression von ADRB ₂ auf Immunzellen im Blut und Aszites von Patienten mit Leberzirrhose	48
3.4	Assoziation genetischer Polymorphismen im ADRB ₂ mit SBP bei Leberzirrhose	51
3.5	Noradrenalin- und Adrenalin-Sekretion von Immunzellen bei Patienten mit Leberzirrhose	52
3.6	Der Einfluss von Beta-Blocker auf die Ausschüttung von Zytokinen	55
3.7	Der Einfluss von Beta-Blocker auf die Expression von ADRB ₂ auf den Immunzellen	61
4.	Diskussion	63
4.1	Immunregulation bei Leberzirrhose durch Katecholamine und Zytokine	63
4.1.1	Inflammatorische Zytokine	64
4.1.2	Der Einfluss von Katecholamine auf PBMC	65
4.2	Einfluss von Beta-Blocker auf die Immunregulation	69
4.2.1	Einfluss von Propranolol auf die ADRB ₂ -Expression ex vivo	69
4.2.2	Einfluss von Propranolol auf die Zytokin-Sekretion in vitro	70
4.3	Klinische Bedeutung der unterschiedlichen ADRB ₂ -Genotypen	72
4.4	Spezifität und Sensitivität der Messmethoden	74
4.4.1	FACS	74
4.4.2	PCR zur Genotypisierung mit LightCycler-Sonden	74
4.4.3	ELISA	75
4.5	Einschränkungen der Untersuchungen und Ausblick	75
5.	Zusammenfassung	78
6.	Abbildungsverzeichnis	80

7.	Tabellenverzeichnis	82
8.	Literaturverzeichnis	83
9.	Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

ADRB	Beta-adrenerge Rezeptoren
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
AST	Aspartat-Aminotransferase
AU	Arbitrary Units
BZgA	Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer
FSC	Forward Scatter
GGT	Gamma-Glutamyltransferase

Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCV	Hepatitis-C-Virus
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
INF	Interferon
INR	International normalized ratio
IU	International Unit
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mittelwert
MELD	Model for end-stage Liver Disease
m. H.	mit Hilfe
MSI	mittlere Fluoreszenzintensität
n	Gesamtzahl
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis

NSBB	Nicht-selektive-Beta-Blocker
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGN	Peptidoglykan
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
r	Korrelationskoeffizient
Rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SBP	Spontan Bakterielle Peritonitis
SD	Standardabweichung
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
SSC	Side Scatter
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
Thr	Threonin
UKB	Universitätsklinikum Bonn
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Z. n.	Zustand nach

1. Einleitung

1.1 Leberzirrhose

Leberzirrhose ist das Endresultat verschiedener chronischer Lebererkrankungen und entwickelt sich aus dem Vorstadium der Leberfibrose. Damit wird die Einkapselung oder der Ersatz von beschädigten Gewebe durch eine kollagene Narbe als Versuch einer Wundheilungsreaktion beschrieben. Daraus resultiert eine abnormale Fortführung der Fibrogenese mit Produktion und Ablagerung von Bindegewebe, sodass Leberzellen von Septen eingegrenzt werden. Man unterscheidet eine klein- von einer großknotigen Form (Schuppan und Afdhal, 2008). Diese irreversible, fibröse Umwandlung und Zerstörung des Leberparenchyms finden über eine Zeitdauer von Jahren bis Jahrzehnten statt. Ursachen für eine Leberzirrhose sind u. a. alkoholische und nichtalkoholische Fettlebererkrankungen oder eine Erkrankung durch das Hepatitis-B- bzw. C-Virus (HBV bzw. HCV). Weltweit ist die Prävalenz unbekannt, von Riemann et al. (2008) wurde sie in Deutschland auf zwischen 300.000 bis 400.000 Menschen geschätzt.

In Folge von zunehmender Fibrosierung kommt es zum zunehmenden Funktionsverlust des Parenchyms, was zu einer verminderten Synthese- und Stoffwechselfunktion führt. Daraus resultiert im Verlauf eine Einschränkung der Gerinnungsfunktion und Ansammlung toxischer Stoffe, woraus eine hepatische Enzephalopathie entstehen kann (Amitrano et al., 2002; Wijdicks, 2016). Zusätzlich wird die Gefäßarchitektur des Lebergewebes verändert, wodurch es zur portalen Hypertension kommt. Aszites, Splenomegalie und die Entstehung von Umgehungskreisläufen (z. B. Ösophagusvarizen), die bei Ruptur eine akute Notfallsituation darstellen, gelten als weitere Komplikationen (Iwakiri, 2014; Thalheimer et al., 2011). Patienten mit Zirrhose haben ein erhöhtes Risiko, bakterielle Infektionen und eine Sepsis zu entwickeln. Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung wird eine bakterielle Infektion bei Patienten mit Zirrhose mit einem vier Mal so hohen Sterberisiko in Verbindung gebracht (Arvaniti et al., 2010). Das Endstadium einer vernarbenden Lebererkrankung mit den genannten Komplikationen bezeichnet man auch als dekompensierte Leberzirrhose. Sobald eine Dekompensation bei allen Arten der Lebererkrankungen eingetreten ist, liegt die Sterblichkeitsrate ohne Transplantation bei bis zu 85 % innerhalb von 5 Jahren (Schuppan und Afdhal, 2008). Müssen Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose stationär behandelt werden, überleben 10 – 20 % den Aufenthalt nicht

(Mansour und McPherson, 2018). Alkoholische Lebererkrankungen, chronische Hepatitis, Leberfibrose und -zirrhose führten im Jahr 2020 in Deutschland laut Todesursachenstatistik bei 14.700 Menschen zum Tode, davon waren 4883 Frauen und 9817 Männer (Statistisches Bundesamt, 2022). Diese Zahlen spiegeln auch die Verteilung der Erkrankung in der Bevölkerung wider, die bei Männern doppelt so hoch ist wie bei Frauen.

1.1.1 Diagnose einer Leberzirrhose

Chronische Leberveränderungen verlaufen oft asymptomatisch, was eine frühzeitige Diagnose erschwert. Die Diagnose kann mit Hilfe (m. H.) von klinischen Anzeichen, laborchemischen Untersuchungen sowie mit apparativen Verfahren gestellt werden. Palpatologisch kann in manchen Fällen eine vergrößerte und konsistenzvermehrte Leber getastet werden (Bahr und Manns, 1999). Anamnestisch relevante Hinweise, die erfragt werden sollten, sind ein vermehrter Alkoholkonsum, Risikofaktoren für eine Virushepatitis, das metabolische Syndrom und die Einnahme von hepatotoxischen Substanzen und Medikamenten. Die Frühdiagnostik kann m. H. einer Sonographie erfolgen, in der eine Größenzunahme und die Inhomogenität des Lebergewebes und der -oberfläche ein Anzeichen auf eine Lebererkrankung darstellen (Huber et al., 2001). Da eine frühzeitige Diagnose die beste Möglichkeit für eine Verhinderung des Fortschreitens bzw. Rückbildung ist, sind bei begründeten Verdacht Parameter wie die γ -Glutamyl-Transferase sowie die Alaninaminotransferase zu prüfen (Pratt und Kaplan, 2000). Ein Anstieg der Transaminasen spricht für eine Lebererkrankung, sind die Transaminasen allerdings nicht erhöht, ist das kein Zeichen dafür, dass keine Lebererkrankung vorliegt. In laborchemischen Untersuchungen finden sich aufgrund der eingeschränkten Leberfunktion eine Erniedrigung von Cholinesterase, Quick-Wert, Albumin und der Funktion der hepatischen Entgiftung, die sich in einer Erhöhung von Substanzen widerspiegelt, die aufgrund der Leberschädigung nicht abgebaut werden können (Berg, 2009; Schuppan und Afdhal, 2008). In Folge dessen kann eine Erhöhung des Bilirubins klinische Anzeichen wie das Gelbfärben von Haut und Skleren verursachen. Die verschiedenen Elastographie-Methoden sind eine weitere Möglichkeit, um eine Leberzirrhose im frühen Stadium zu diagnostizieren. Man kann das Ausmaß der Bindegewebsvermehrung und die Steifigkeit der Leber ohne invasiven Eingriff ermitteln und so den Grad einer Leberfibrose bzw. Leberzirrhose beurteilen (Gerber et al., 2015). Die transiente Elastographie (FibroScan®) beruht auf den Grundlagen einer

Sonographie. Sie erfolgt m. H. einer speziellen Sonde mit Schallkopf, die auf der Haut über der Leber angesetzt wird und Impulse (50 Hz) aussendet. Gleichzeitig wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Impulswellen im Gewebe gemessen. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Elastizität des Lebergewebes. Je steifer und fester das Gewebe ist, desto schneller können sich die Impulswellen ausbreiten (Sandrin et al., 2003). Diese Informationen reichen, um den Grad der Fibrosierung/Leberzirrhose abschätzen zu können. Andere, ähnliche Messverfahren sind die 2-D-Scherwellenelastographie und Acoustic Radiation Force Impulselming (ARFI) (Friedrich-Rust et al., 2009). Kann die Diagnose nicht mit den genannten Untersuchungen gestellt werden und liegen nicht zusätzlich zu den laborchemischen eindeutige bildgebende Befunde und Komplikationen der Leberzirrhose vor, ist eine Biopsie Mittel der Wahl (Pratt und Kaplan, 2000). Es gibt verschiedene Modelle wie z. B. den MELD-Score (model for endstage liver disease), um den Schweregrad einer Leberzirrhose im Endstadium einschätzen zu können und so zur Priorisierung bei der Organverteilung im Zusammenhang mit Lebertransplantationen beizutragen (Strassburg und Manns, 2009). Seit 2006 wird dieses System im gesamten Eurotransplant-Verbund als Maß für die Dringlichkeit für eine Organzuteilung verwendet. Der MELD-Score gilt als einfaches und objektives System und beschreibt die 3-Monats-Mortalität von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen. Ein geringer MELD-Score bedeutet ein geringeres Risiko, ein hoher MELD-Score ein größeres Risiko, in den nächsten drei Monaten zu sterben. Die Einschätzung basiert auf den drei Laborwerten Serumbilirubin, Serumkreatinin und der Prothrombinzeit (international normalized ratio, INR) nach folgender Formel:

$$10 \times [0.957 \times \text{Log}_e (\text{Kreatinin mg/dl}) + 0.378 \times \text{Log}_e (\text{Bilirubin mg/dl}) + 1.120 \times \text{Log}_e (\text{INR}) + 0.643].$$

Es gibt eine Werteskala, die von 6 (3-Monats-Mortalität: 1 %) bis 40 (3-Monats-Mortalität: 98 %) reicht (Parscher et al., 2013).

1.1.2 Ursachen der Leberzirrhose

Regelmäßiger Alkoholkonsum oberhalb der Gefährdungsgrenze ist die häufigste Ursache für chronische Lebererkrankungen in Deutschland. Die Leber durchläuft verschiedene Krankheitsstadien. Zu Beginn führt der erhöhte Alkoholkonsum zu einer Steatosis hepatis mit tropfenförmiger Verfettung der Hepatozyten und beginnenden Einzelzellnekrosen. Die alkoholischen Abbauprodukte Acetaldehyd und Acetat haben toxische Wirkung auf die Leber. Dieses Stadium geht in die alkoholische Steatohepatitis (ASH) über, bei der kombiniert Fettleber und Leberentzündung bestehen. Die Leber ist geschwollen, zudem sind läppchenzentrale Leberzellnekrosen vorhanden mit Immunreaktion und Fibrosierung. Das letzte Stadium ist die alkoholbedingte Leberzirrhose. Es kommt zur massiven Verfettung, lymphozytären Infiltration, Bildung von Regeneratknoten und dem zirrhotischem Umbau des Leberparenchyms.

Eine Studie von Bellentani et al. (1997) zeigt auf, dass ein regelmäßiger Konsum von 30 g Alkohol am Tag bei beiden Geschlechtern ausreicht, um einen zirrhotischen oder nicht-zirrhotischen Leberschaden zu entwickeln. Dieser Fakt wird von Poynard et al. (1997) erneut aufgegriffen und weitere Risikofaktoren wie das männliche Geschlecht und ein Erkrankungsalter von über 40 Jahren hinzugefügt. Diese drei Faktoren werden von ihm in Bezug auf eine Fibrosierung als wichtiger eingestuft als virologische Faktoren bei HCV-Infektionen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und die Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) bewerten in der S3 Leitlinie 12 g reinen Alkohol für Frauen pro Tag und weniger als 24 g reinen Alkohol für Männer als risikoarmen Alkoholkonsum (Kiefer et al., 2021).

Bei einer Virus-Hepatitis erfolgt die Leberschädigung meist indirekt. Die Leberentzündung wird in Folge von der Aktivierung des Immunsystems verursacht, welches infizierte Leberzellen eliminiert. Bei Ausbleiben einer spontanen Ausheilung und fehlender Behandlung kann es zur Leberfibrose mit anschließender Leberzirrhose kommen, wenn der Prozess der Hepatitis über mehrere Jahrzehnte andauert. Der natürliche Verlauf der Zirrhose hängt von der Ursache und der Behandlung ab. Jährliche Dekompensationsraten liegen für eine Virushepatitis B bei 10 % und für eine Virushepatitis C bei 4 %. Die Dekompensation bei einer alkoholischen Zirrhose mit fortgesetztem Alkoholkonsum ist sogar noch schneller und häufig mit einer akuten alkoholischen Hepatitis verbunden (Schuppan und Afdhal, 2008). Zu jedem Zeitpunkt sind der absolute Verzicht auf Alkohol, die Vermeidung

von leberschädigenden Substanzen und eine ausgewogene, gesunde Ernährung essenziell. Befindet sich eine Leberschädigung im Anfangsstadium, kann durch die Abstinenz eine vollständige Ausheilung erzielt werden, fibrosierte Bereiche bleiben geschädigt, wobei selbst dann eine funktionelle Erholung möglich ist (Lucey, 2019; Michalopoulos und Bhushan, 2021; Testino et al., 2018).

Die nichtalkoholische Fettleber (NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease) ist eine Erkrankung, bei der sich Fett, vor allem Triglyceride, in den Hepatozyten einlagert. Man spricht von einer Steatose der Leber, wenn der Fettanteil mehr als 5 – 10 % des Lebergewichts beträgt oder die Hepatozyten eine Makrosteatose aufweisen und die Ursache nicht der Konsum von übermäßigem Alkohol ist (Weiß et al., 2014). Eine besondere Form ist die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH, nonalcoholic steatohepatitis). Als Unterform der NAFLD ist sie durch entzündliche Veränderungen mit Schädigung der Hepatozyten charakterisiert. Es kommt zu einer Ballonierung und Nekroapoptose mit in der Regel zunehmender Fibrose (Chalasanani et al., 2012).

Risiken für eine nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) sind Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 2, fortgeschrittenes Alter, Insulinresistenz und ein hoher Anteil der Triglyceride bei wenig HDL im Serum (Clark, 2006). In den letzten Jahren haben Fettlebererkrankungen allerdings auch bei Jugendlichen zugenommen. So wurde in einer australischen Kohorte eine Prävalenz von 12,8 % festgestellt, wovon 16,3 % Mädchen und 10,1 % Jungen waren (Ayonrinde et al., 2011). In der gleichen Untersuchung wurde der Zusammenhang zwischen NAFLD und dem metabolischen Syndrom aufgegriffen, der bei Jungen mit 24 % signifikant höher liegt als bei Mädchen mit 8 %. Durch die stetige Zunahme von Adipositas sowohl in den USA als auch in Europa ist die NAFLD inzwischen mit 14 – 27 % in der Normalbevölkerung die häufigste chronische Lebererkrankung (Weiß et al., 2014). Die Therapie besteht aus der Änderung des Lebensstils bezüglich Bewegung und der richtigen Ernährung.

1.1.3 Komplikationen der Leberzirrhose: Aszites, spontane bakterielle Peritonitis, Hepatozelluläres Karzinom

Aszites ist eine pathologische Ansammlung von freier Flüssigkeit in der Peritonealhöhle. Aszites wird bei Leberzirrhose durch einen zu hohen Druck in der Pfortader (portale Hypertension) verursacht, der durch eine Vasodilatation splanchnischer Gefäße zu einer reduzierten Nierendurchblutung führt. In Folge dessen kommt es zu einer Senkung der Natrium- und der Wasserekkretion (Uriz et al., 2000) und dem Austritt von Flüssigkeit aus den Blutgefäßen des Bauchraumes. Die Ursache von Aszites bei portaler Hypertension ist meist eine Leberzirrhose. In der Studie von Runyon (1992) hatten 81,2 % der untersuchten Patienten mit Aszites eine Zirrhose. Weitere Ursachen der Aszites sind eine fortgeschrittene Tumorerkrankung, Herzinsuffizienz, das nephrotische Syndrom, Peritonitiden oder eine Pankreatitis. Das Auftreten von Aszites ist erst ab größeren Mengen mit Symptomen verbunden. Es kommt zu einem vergrößerten Bauchumfang, einem vorgewölbten Bauch mit eventueller Ausbildung einer Nabelhernie sowie zur Gewichtszunahme. Ungefähr 15 % der Patienten mit Aszites sterben innerhalb eines Jahres und 44 % innerhalb von fünf Jahren (Planas et al., 2006). Die Therapie bei Aszites ist die Reduktion der Natriumaufnahme auf < 2 g pro Tag, die Einnahme von Diuretika wie Spironolacton, Parazentesen, die Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts oder letztlich die Lebertransplantation (Uriz et al., 2000).

Die spontane bakterielle Peritonitis (SBP) ist eine bakterielle Entzündung der Aszitesflüssigkeit bei Fehlen einer intraabdominalen, chirurgisch behandelbaren Infektionsquelle und definiert sich über den Nachweis von > 250 polymorphkernigen Granulozyten pro mm^3 Aszites. Zugrunde liegt eine verminderte Schleimhautbarriere bei Patienten mit Leberzirrhose, wodurch es zu einer Translokation von Bakterien des Darmes (vor allem E. coli und Klebsiella-Arten) kommt (Song, 2018). Symptome sind Unwohlsein, Fieber und das Vorhandensein von Aszites. Als Prophylaxe wird die Einnahme von Norfloxacin laut Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankheiten (DGVS) empfohlen, bei vorhandener SBP ist die Verabreichung von Antibiotika wie Cephalosporinen die Therapie der Wahl (Gerbes et al., 2019). Die SBP ist eine häufige Komplikation bei Leberzirrhose mit Aszites und potenziell lebensbedrohlich. Ihre

Prävalenz liegt bei 11,3 % bei stationären Patienten (Fernández et al., 2019). Bei erstmaliger Beschreibung der SBP lag die Sterblichkeitsrate bei über 90 %. Die Sterblichkeitsrate im Krankenhaus konnte allerdings bei frühzeitiger Diagnose und sofortiger Behandlung auf ungefähr 20 % gesenkt werden (Piano et al., 2016). Während ein Teil der Patienten mit Leberzirrhose ohne antibiotische Prophylaxe rezidivierende Episoden einer SBP entwickeln, leiden andere Patienten nie unter einer SBP (Lutz et al., 2014). Das Risiko für eine SBP wird auch durch genetische Prädisposition mitbestimmt (Lutz et al., 2016; Nischalke et al., 2021).

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist ein maligner Tumor und entwickelt sich direkt aus den Hepatozyten. Es kann solitär oder multilokulär auftreten und entwickelt sich meist in Folge einer Leberzirrhose. Laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten erkranken in Deutschland um die 9.500 Fälle pro Jahr bei fast 8.000 Todesfällen. Im Jahr 2018 gab es 9.510 Neuerkrankungen (davon 2.820 Frauen und 6.690 Männer, Verteilung Männer zu Frauen 2:1). Weltweit ist das HCC die sechsthäufigste diagnostizierte Krebsart und vierthäufigste krebbedingte Todesursache (Rawla et al., 2018). Die Prognose ist eher schlecht und hängt vor allem (v. a.) vom Zeitpunkt der Diagnose ab. Im Mittel liegt die 5-Jahres-Überlebensrate um die 15 Prozent. Die Risikofaktoren für ein HCC sind Infektionen mit HBV oder HCV, Alkoholkonsum sowie Leberstoffwechselerkrankungen, insbesondere die NAFLD und die Exposition gegenüber Ernährungstoxinen wie Aflatoxinen und Aristolochiasäure (Global Burden of Disease Liver Cancer Collaboration et al., 2017; Yang et al., 2019).

Park et al. (2015) hat einen globalen Vergleich über die Hauptursachen für die Entstehung eines HCC m. H. vieler Studienergebnisse durchgeführt. Der häufigste Risikofaktor war HCV in Nordamerika, Europa und Japan und HBV in China, Südkorea und Taiwan. Der zweithäufigste Grund ist Alkoholkonsum. Mindestens 40 % der Patienten in Nordamerika, Europa und Südkorea gaben einen aktuellen oder früheren Alkoholmissbrauch an. Diese Risikofaktoren sind potenziell vermeidbar und verdeutlichen das Potenzial der Risikoprävention zur Verringerung der weltweiten HCC-Belastung. Die HCC-Überwachung und Früherkennung erhöhen die Chance auf kurative Behandlung, allerdings wird sie auch in Ländern mit ausreichenden Ressourcen nicht ausreichend ausgeschöpft (Yang et al.,

2019). Beim Risikokollektiv sollte halbjährlich ein sonographisches Screening durchgeführt werden. In Europa und Nord Amerika liegt das mittlere Erkrankungsalter bei über 60 Jahren. Länder wie Afrika oder Teile von Asien liegen im Kontrast bei 30 – 60 Jahren (Park et al., 2015). Klinisch verläuft die Erkrankung oft asymptomatisch. Erst im Spätstadium können unspezifische Beschwerden wie Oberbauchschmerzen rechtsseitig, eine hepatische Dekompensation oder Aszites auftreten. Die Dekompensationsraten des hepatozellulären Karzinoms liegen bei 2 – 7 % pro Jahr (Schuppan und Afdhal, 2008).

1.1.4 Kompartiment Peritonealhöhle

Die Peritonealhöhle ist ein mit Flüssigkeit gefüllter Spaltraum zwischen der serösen Haut der vorderen und hinteren Bauchwand (Peritoneum parietale) und der Verkleidung der Organe in der Bauchhöhle (Peritoneum viscerale) (Kastelein et al., 2019). Sie umfasst den Bereich unterhalb des Diaphragma bis zur Beckenhöhle. Die Peritonealhöhle bietet für die Bauchorgane einen Schutz vor äußeren Einflüssen, unterstützt die verschiedenen Organfunktionen und enthält zahlreiche Leukozyten. Das Peritoneum hat kleine Perforationen, die Stomata. Diese Poren zwischen den Mesothelzellen ermöglichen beispielsweise das Ableiten von Flüssigkeiten, Partikeln und Zellen aus der Peritonealhöhle zu den regionalen Lymphknoten. Peritoneale Mesothelzellen produzieren Tenside, die die Reibung von Organen in Funktion vermeiden (van Baal et al., 2017) sowie Enzyme, die die Aktivitäten der hämatopoetischen Zellen in der Bauchhöhle regulieren (Isaza-Restrepo et al., 2018). In direkter Nähe liegt das Omentum, ein viszerales Fettgewebe, das für die Immunabwehr im Bauchraum zuständig ist. Es befinden sich sog. „Milky Spots“ auf der Oberfläche, die wie lymphatisches Gewebe organisiert sind. Die darin enthaltenen Leukozyten reagieren auf in der Peritonealhöhle befindliche Krankheitserreger, tragen zur peripheren Immunität durch Antikörper (AK) Produktion bei und schützen die Bauchhöhle und die darin befindlichen Organe vor Infektionen (Okabe, 2021). Die Erhaltung der Gewebemöostase und -reparatur ist eine der Hauptaufgaben der Leukozyten in der Peritonealhöhle. Ist das Gleichgewicht aufgrund von Infektionen, Entzündungen, Fettleibigkeit oder Tumormetastasen beeinträchtigt, werden spezielle Mesothelzellen und Stromazellen des Omentums aktiviert, die anschließend die Rekrutierung von peritonealen Leukozyten steuern (Liu et al., 2021). Die Mechanismen, wie diese Immunnische reguliert wird, sind

noch wenig erforscht. Klinische Bedeutung findet die Peritonealhöhle bei den Pathologien der Aszites und der Peritonitis.

1.2 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) sind einkernige Zellen des Blutes. Dazugehörige Zellen sind Lymphozyten - einschließlich B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen -dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen. Die verschiedenen Subpopulationen der PMBC können durch Marker auf der Zelloberfläche, Cluster of Differentiation (CD) unterschieden werden. PBMC üben vielfältige Funktion innerhalb des Immunsystems aus: Neben der Antikörperproduktion oder Phagozytose auch die Sekretion von verschiedenen Botenstoffen und antimikrobiellen Peptiden (Verhoeckx et al., 2015). Das Immunsystem besteht aus unspezifischen und spezifischen Abwehrmechanismen. Das unspezifische, angeborene Immunsystem ist für die allgemeine Abwehr von v. a. bakteriellen Infektionen zuständig. Es kommt zu einer typischen Entzündungsreaktion des Körpers mit Aktivierung von Akute-Phase-Proteinen, des Komplementsystems und proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon (IFN) und Interleukinen. Zum unspezifischen Immunsystem gehören die polymorphkernigen Leukozyten im Blut, NK-Zellen (CD56+ Zellen) sowie Monozyten und Makrophagen (CD14+ Zellen) (Chaplin, 2010, Hillion et al., 2020). Fremdkörper und Bakterien können nach Eindringen durch Makrophagen phagozytiert werden. NK-Zellen haben bei Virusinfektionen adaptive Eigenschaften wie die Ausbildung eines Gedächtnisses und eine klonale Expansion (Geary und Sun, 2017). Das spezifische, erworbene Immunsystem ist auf bestimmte Erreger spezialisiert und bildet im Verlauf des Lebens ein immunologisches Gedächtnis aus (Saule et al., 2006). Die Immunantwort umfasst die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen, die Antigene verarbeiten und in den sekundär lymphatischen Organen präsentieren, um Lymphozyten zu aktivieren (Kapsenberg, 2003). Es gibt verschiedene Subpopulationen der Lymphozyten wie die T- und B-Lymphozyten. B-Zellen sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. Durch meist körperfremde Antigene (AG) können B-Zellen (CD19+ Zellen) aktiviert werden, wodurch sie zu Gedächtniszellen oder Plasmazellen ausdifferenzieren, die AK ausschütten (Althwaiqeb und Bordoni, 2022). T-Zellen (CD3+ Zellen) sind durch Korezeptoren, CD4+ bei T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) und CD8+ bei zytotoxischen T-Zellen, in Subpopulationen mit andersartigen Funktionen unterteilt. Allgemein haben T-Zellen eine wichtige Rolle bei der

Abwehr von Krankheitserregern und können befallene Zellen durch Apoptose töten. Die aktivierten TH1-Zellen sezernieren Aktivierungsfaktoren für natürliche Killerzellen, zytotoxische T-Zellen und Makrophagen, um die Phagozytose zu fördern. TH2-Helferzellen produzieren Interleukine und sind wichtig für die T- und B-Zellproliferation und damit für die Immunglobulinbildung (Ekkens et al., 2007, Kumar et al., 2018). Zytotoxische T-Zellen induzieren eine Apoptose durch Ausschüttung von zytotoxischen Enzymen wie Perforine und Proteasen wie Granzyme. Bei einer Organtransplantation kann eine als fremd erkannte Zelle des Spenderorgans, durch die zytotoxischen T-Zellen in die Apoptose geführt werden (Shoskes und Wood, 1994). Die T-Gedächtniszellen agieren über CD44+ Oberflächenproteine und können im Falle einer erneuten Infektion mit demselben Erreger eine schnellere Verteidigung erzielen.

1.3 Beta-adrenerge Rezeptoren

Adrenozeptoren sind G-Protein-gekoppelte, transmembranäre Rezeptoren. Sie besitzen charakteristischerweise sieben transmembrane α -Helices mit jeweils drei intra- und extrazellulären Schleifen. Es gibt einen N-Terminus, der extrazellulär liegt und einen C-Terminus, der intrazellulär liegt. Durch Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung am Rezeptor-gekoppelten G-Protein. Generell werden Adrenozeptoren in verschiedene Subtypen unterteilt (Griffin et al., 2004; Johnson, 1998). Das adrenerge System spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Homöostase des Körpers und ist ausschlaggebend für das „Fight or Flight“-Prinzip, welches von dem US-amerikanischen Physiologen Walter Cannon (1915) beschrieben wurde. In einer Gefahrensituation oder bei Stress werden Impulse über das vegetative Nervensystem gesendet, sodass Neurotransmitter wie Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet werden und über die Bindung an Rezeptoren, eine spezifische Reaktion des Körpers auslösen (McCarty, 2016).

Beta-adrenerge Rezeptoren (ADRB) wirken über eine Steigerung der cAMP-Synthese und werden in drei Untergruppen unterteilt: Beta₁-, Beta₂- und Beta₃-Rezeptoren. Die Affinität von Adrenalin und Noradrenalin ist vom Subtyp abhängig (William Tank und Lee Wong, 2014). ADRB spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Stoffwechsels wie z. B. der Lipolyse und im kardiovaskulären System. ADRB₃ finden sich v. a. im weißen und braunen Fettgewebe und beeinflussen die Thermogenese (Bachman et al., 2002; Philipp und Hein, 2004; Susulic et al., 1995). ADRB₁ kommen v. a. im Herzmuskel, aber

auch in der Niere, Speicheldrüsen und dem Fettgewebe vor. Bindet Adrenalin bzw. Noradrenalin an $ADRB_1$ des Herzens, führt dies zu einer positiven inotropen und chronotropen Wirkung (Zheng et al., 2004). Aufgrund der gesteigerten Herzaktivität wird vermehrt Renin ausgeschüttet, wodurch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System stimuliert wird und die Steigerung des peripheren Blutdruckes zur Folge hat. Fehlen $ADRB_1$ im Körper, kann bei Einnahme von Sympathomimetika keine Steigerung der Herzaktivität festgestellt werden (Rohrer et al., 1996). In der Peripherie des Körpers dominieren v. a. die $ADRB_2$. Sie führen zu einer Relaxation und Vasodilatation der glatten Muskulatur der Bronchien, der Blutgefäße und des Uterus. Im Fettgewebe bewirken $ADRB_2$ eine verstärkte Lipolyse (Chruscinski et al., 1999). Beta₂-Adrenozeptoragonisten werden als Dopingmittel verwendet und v. a. in der Therapie von Asthma eingesetzt.

1.4 Katecholamine

Als Katecholamine bezeichnet man bestimmte Hormone wie Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und deren Metabolite. Sie gehören zur Gruppe der biogenen Amine. Katecholamine wirken als Sympathomimetika an den Alpha- und Beta-Rezeptoren im Körper. Zur Biosynthese wird die Aminosäure Tyrosin benötigt. Sie kann über die Nahrung aufgenommen oder m. H. der essenziellen Aminosäure (AS) Phenylalanin in der Leber synthetisiert werden. Die Synthese der Katecholamine findet im Nebennierenmark, zentralen Nervensystem und an den postganglionären sympathischen Nervenzellen statt. Auch Immunzellen spielen eine Rolle bei der Katecholamin-Produktion (Scanzano und Cosentino, 2015). In einer Studie von Diaz-Salazar et al. (2020) wurden Mäuse mit dem Zytomegalievirus infiziert und untersucht. Die Beteiligung von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. IL12 oder STAT4 führten zu einer Hochregulierung der $ADRB_2$ -Expressierung auf den NK-Zellen. Zusätzlich wanderten NK-Zellen in Richtung adrenerger Nervenfasern. Des Weiteren spielt das Nervensystem durch die Freisetzung von Katecholaminen wie Adrenalin und Noradrenalin eine entscheidende Rolle bei der Regulation der angeborenen Immunreaktion bei Pathogenen (Godinho-Silva et al., 2019). Eine Stimulation der Beta₂-Adrenozeptoren auf Immunzellen wie Makrophagen und lymphatischen Zellen führt zu einer reduzierten Barriere bei der Entzündungsreaktion (Gabanyi et al., 2016; Moriyama et al., 2018).

Im Allgemeinen erfolgt im Körper die Speicherung von Katecholaminen in den sympathischen Nervenendigungen oder in den Granula der chromaffinen Zellen. Der Spiegel der zirkulierenden Katecholamine steigt z. B. durch Stress, emotionaler Erregung, Veränderungen in der Umgebung und erhöhter körperlicher Aktivität. Dieser Anstieg ist v. a. auf die Freisetzung der Katecholamine aus dem Nebennierenmark und sympathischen Nervenendigungen zurückzuführen (William Tank und Lee Wong, 2014). Die Katecholamine werden durch Exozytose freigesetzt und gelangen über den synaptischen Spalt zur Effektorzelle. Die Wirkung tritt innerhalb von wenigen Sekunden ein und betrifft alle wichtigen Organsysteme, Muskeln, Drüsen und vor allem das Herz-Kreislauf-System. Die Stimulation erfolgt über neun verschiedene G-Protein-gekoppelte Adrenozeptoren, wobei die Blut-Hirn-Schranke nicht überwunden werden kann (William Tank und Lee Wong, 2014). Das Binden an Alpha-Rezeptoren führt zu einer Vasokonstriktion, während über Beta-Rezeptoren die Herzfrequenz verändert werden kann. Die Messung von Katecholaminen und ihren Metaboliten ist bereits seit Jahrzehnten eine gängige Forschungsmethode. Sie wird in den verschiedensten Bereichen angewandt, wie z. B. bei der Bewertung der Beteiligung des sympathischen Nervensystems an der Pathophysiologie von Komplexerkrankungen, Untersuchungen der Mechanismen und Folgen von Stress und bei zentralen neuronalen Vorgängen, die die Aktivität des Sympathikus bestimmen (Kågedal und Goldstein, 1988). Veröffentlichungen in der Forschung über die Rolle von Katecholaminen bei der Entstehung von Lebererkrankungen wie Leberkrebs, Fettleber und Leberfibrose haben in den vergangenen Jahren zugenommen. Die dazugehörigen Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig untersucht worden. Lelou et al. (2022) fasst viele pathophysiologische Aspekte der Katecholamine im Zusammenhang von Lebererkrankungen zusammen. So greift er die Studie von Eisenhofer et al. (2002) auf, in der das sympathische System und Noradrenalin eine wichtige Rolle bei der Leberfibrose durch den Einfluss auf Sternzellen spielen. Auch wird der Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und einem Anstieg der Noradrenalin-Plasmakonzentration durch eine gesteigerte Katecholamin-Synthese aufgezeigt, mit dem Resultat, dass durch Adrenalin und Noradrenalin Kupfer- und Sternzellen aktiviert werden und infolgedessen ein entzündliches Milieu in der Leber entsteht. Sympathikusfasern durchziehen das ganze Leberparenchym mit Endpunkten der Nerven im Disse-Raum sowie in der Nähe der Blutgefäße, sodass ein direkter

Kontakt mit den Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen ermöglicht wird (Bioulac-Sage et al., 1990; Mann et al., 1991).

1.5 Die nicht-synonymen Polymorphismen Arg16Gly (rs1042713), Gln27Glu (rs1042714) und Thr164Ile (rs1800888) im ADRB₂

Es handelt sich bei allen drei Polymorphismen um einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) im ADRB₂, bei dem am ursprünglichen DNA-Molekül ein einziges Basenpaar verändert ist, wodurch eine Missense Variante entsteht. SNPs sind genetische Varianten, die erblich sind und sich so von spontanen Mutationen unterscheiden.

Bei dem Polymorphismus Arg16Gly (rs1042713) kommt es durch den Tausch des G-Nukleotid mit einem A-Nukleotid an der Position 16 zu einem Austausch der AS Glycin (Gly) und Arginin (Arg). Die geschätzte Häufigkeit der Arg16-Variante beträgt Global 38,7 %, bei Europäern 37,4 %, bei Afrikanern 49,7 %, bei Asiaten 56,2 % und bei Amerikanern 43,7 % (National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, 2021). In vitro Studien haben gezeigt, dass bei Arg16Gly eine Herabregulierung der ADRB₂, die durch Agonisten gefördert wird, am stärksten ist (Small et al., 2003). Bei der homozygoten Arg16-Variante konnte beobachtet werden, dass nach erfolgter sympathischer Erregung, wie z. B. durch einen Handgriff, der Körper als Reaktion darauf mit einem starken Anstieg der Herzfrequenz, des Herzzeitvolumens und einer Tendenz zu einem niedrigeren systemischen Gefäßwiderstand reagiert. Es wird die Vermutung gestellt, dass diese Reaktion auf eine stärkere ADRB₂-vermittelte Vasodilatation durch zirkulierende Katecholamine zurückzuführen ist, was im Einklang mit weiteren Studien steht, die festgestellt haben, dass bei Gly16-Patienten eine größere ADRB₂-vermittelte Stickoxid-abhängige Reaktionsfähigkeit vorhanden ist (Cockcroft et al., 2000; Eisenach et al., 2004; Eisenach und Wittwer, 2010). Die Gly16-Variante zeigt im Vergleich zur homozygoten Arg16-Rezeptorvariante eine erhöhte Hyperaktivität der Atemwege und eine größere Anfälligkeit für eine stressbedingte Erhöhung der viszeralen und somatischen sensorischen Funktionen (Kushnir et al., 2013; Roca et al., 2018).

Der Gln27Glu (rs1042714) Polymorphismus ist durch den Austausch der AS Glutamin (Gln) und Glutaminsäure (Glu) gekennzeichnet. Die geschätzte Häufigkeit der Glu-Variante beträgt Global 39,7 %, bei Europäern 42,4 %, bei Afrikanern 20,3 %, bei Asiaten

14,3 % und bei Amerikanern 21,5 % (National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, 2021). Die Glu27-Variante führt nicht zu einer Herunterregulierung der ADRB₂-Expression (Green et al., 1994). Lokale Infusionen von ADRB₂-Agonisten in die Arteria brachialis führten zu einer erhöhten Vasodilatation bei Glu27-Homozygoten im Vergleich zu Gln27-Homozygoten (Cockcroft et al., 2000), was auf eine höhere Agonisten-vermittelte Reaktionsfähigkeit hinweist. Andere Studien haben einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und Adipositas untersucht, da ADRB₂ im weißen Fettgewebe exprimiert und an der Lipolyse beteiligt sind. In der Studie von Hellström et al. (1999) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Glu27 homozygoten Frauen und Gln27 homozygoten Frauen beim BMI festgestellt. Bei adipösen Männer war die Häufigkeit des Glu27-Allels deutlich verringert, während bei fettleibigen Frauen die Häufigkeit des gleichen Allels erhöht war. In einer anderen Studie wurde die Glu27-Variante auch bei Männern als Risikofaktor für abdominale Adipositas, v. a. bei niedrigem HDL-Cholesterin genannt (Corbalán et al., 2002). Bei heterozygoten Gln27-Glu Patienten mit Hypertonie, die regelmäßig 100 mg Metoprolol über einen Zeitraum von zwei Monaten eingenommen haben oder Propranolol bei gesunden Personen, konnte ein Anstieg der Triglyceridwerte nachgewiesen werden (Isaza et al., 2005). Andere Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen Adipositas und dem Glu27-Allel feststellen (Kortner et al., 1999; Oberkofler et al., 2000). Es gibt viele weitere Studien, die die Auswirkung des Polymorphismus im Bezug zu Kardiovaskulären Erkrankungen wie das Risiko für einen Herzinfarkt, Herzinsuffizienz und dem Koronarsyndrom mit und ohne Beta-Blocker untersucht haben. Die Ergebnisse sind allerdings sehr unterschiedlich, sodass keine gesicherte Aussage hierzu getroffen werden kann.

Thr164Ile (rs1800888) ist ein sehr seltener Polymorphismus, bei dem durch den Einbau des T-Nukleotids anstatt des C-Nukleotids an der Position 164 die AS Isoleucin (Ile) an die Stelle von Threonin (Thr) tritt. Die geschätzte Häufigkeit der Ile164-Variante beträgt Global und bei Europäern 1,3 %, bei Afrikanern 0,4 %, bei Asiaten 0,0 % und bei Amerikanern 0,9 % (National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, 2021). Da bisher nur heterozygote Träger der Isoleucin-Variante gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass die homozygot-mutierte TT-Variante nicht überlebensfähig ist.

Ile164 zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Bindungsaffinität für Adrenalin, Noradrenalin und Isoproterenol und für die funktionelle Kopplung an Gs, wie sie in Adenylzyklase-Assays bestimmt wird; dies gilt nicht für Dopamin, dem Hydroxylgruppen an seinen Beta-Kohlenstoffen fehlen (Green et al., 1993). Die Verminderung der Wirkung kommt nicht durch eine geringere Expression des ADRB₂ zustande (Bruck et al., 2005). Ein weiterer Effekt der Ile164 Variante wird im Bereich des kardiovaskulären Systems deutlich. Heterozygote Trägerinnen zeigen einen signifikant erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruck, sowie ein erhöhtes Risiko an ischämischen Herzerkrankungen zu erkranken. Dieser Effekt konnte bei Männern nicht gefunden werden (Thomsen et al., 2012). Des Weiteren konnte eine verringerte Herzfrequenz, Venodilatation und inotrope Reaktion auf systemisches Terbutalin bei gesunden Thr164/Ile-Heterozygoten festgestellt werden (Brodde et al., 2001). Die EC₅₀ für Terbutalin zeigte bei der Lipolyse eine sechsfache Erhöhung, was auf eine verminderte Rezeptorfunktion hindeutet (Hoffstedt et al., 2001). In einer Untersuchung von Schoiswohl (2022) wurde gezeigt, dass heterozygote Träger ein signifikant erhöhtes Risiko haben, an einer durch Meningokokken verursachten Erkrankung zu sterben und ein erhöhtes Risiko für die Empfänglichkeit für die Erkrankung aufweisen.

1.6 Nicht-selektive Beta-Blocker

Beta-Blocker sind Wirkstoffe aus der Gruppe der Antihypertonika und Sympatholytika. Sie binden an Beta₁- oder Beta₂-Rezeptoren und blockieren so den Rezeptor für Katecholamine. Ihr Einsatzgebiet ist z. B. die Behandlung von arteriellen Hypertonus, chronischer Herzinsuffizienz und koronarer Herzerkrankung. Beta-Blocker bewirken eine Senkung der Herzfrequenz und des Blutdruckes und wirken antiarrhythmisch. Sie reduzieren die Herzarbeit und den Sauerstoffverbrauch des Myokards. Die verschiedenen Wirkstoffe unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Affinität an die Beta-Adrenozeptoren. Nicht-selektive-Beta-Blocker (NSBB) binden nicht selektiv an die Beta-Rezeptoren. Propranolol z. B. wird als nicht-selektiver Beta-Blocker bezeichnet, da er eine gleich hohe Affinität auf Beta₁- und Beta₂-Rezeptoren hat. Bei der Bindung an Beta₂-Rezeptoren kann es in der Lunge zu einer Bronchokonstriktion kommen. Wirkstoffe wie Bisoprolol oder Metoprolol wirken als selektive Beta-Blocker v. a. auf die Beta₁-Rezeptoren, was bei den oben genannten Einsatzgebieten bevorzugt wird (Gelbe Liste, 2021). Villanueva et al. (2019) hat

beschrieben, dass nicht-selektive Beta-Blocker das Auftreten von Komplikationen bei Patienten mit Leberzirrhose und schwerer portaler Hypertension verringern. Primär wird dieser Effekt auf die Senkung des Pfortaderdruckes zurückgeführt. Allerdings fällt ein Abfall der erhöhten Entzündungsparameter unter Beta-Blocker-Therapie bei Patienten mit Leberzirrhose auf (Reiberger et al., 2013) und das Risiko für bakterielle Infektionen wie einer SBP wird gesenkt (Senzolo et al., 2009). Im Einklang dazu sind die Ergebnisse von Hernández-Gea et al. (2012), dass NSBB das Risiko für eine Dekompensation mit Aszites und weitere Komplikationen wie das hepatorenale Syndrom oder den refraktären Aszites reduzieren. Thiele et al. (2015) weist darauf hin, dass NSBB das Potenzial haben, die Inzidenz für ein HCC, mit einer Risikodifferenz von 2,6 % zu senken. Im Zusammenhang dazu stellt er experimentelle Daten, die darauf hinweisen, dass NSBB Katecholamine inhibieren, wodurch die Krebszellmigration, Angiogenese und Proliferation beeinflusst werden. Wie bereits beschrieben exprimieren Immunzellen ADRB₂ (Scanzano und Cosentino, 2015) und steuern über die Katecholamin-Produktion und -Ausschüttung auch Entzündungsprozesse (Flierl et al., 2007). Dadurch ist ein Einfluss der Beta-Blocker-Therapie auf das Immunsystem von Patienten mit Leberzirrhose vorstellbar. Bisher wurde nicht untersucht, inwieweit Immunzellen im Blut im Vergleich zur pathophysiologisch wichtigen Peritonealhöhle bei Patienten mit Leberzirrhose Katecholamine als Botenstoffe einsetzen und ob die pharmakologische oder genetische Modulation von ADRB₂ einen Einfluss auf die Immunreaktion haben.

1.7 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Hypothese, dass inflammatorische Reaktionen auf bakterielle Stimuli von Immunzellen in Blut und / oder in der Peritonealhöhle von Patienten mit Leberzirrhose und Aszites durch Katecholamine beeinflusst werden können und dass Immunzellen durch eigene Katecholamin-Produktion eine solche Modulation beeinflussen. Zudem soll untersucht werden, ob diese Prozesse durch genetische Polymorphismen verändert werden.

Dies wurde m. H. von folgenden vier Fragestellungen in dieser Arbeit abgehandelt:

- 1) Exprimieren Immunzellen im Blut und Aszites von Patienten mit Leberzirrhose ADRB₂?
- 2) Sind genetische Polymorphismen im ADRB₂ mit dem Auftreten von SBP als klassische bakterielle Infektion von Patienten mit Leberzirrhose assoziiert?
- 3) Produzieren Immunzellen aus Blut und Aszites von Patienten mit Leberzirrhose nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Peptidoglykan (PGN) als Zellwandbestandteile von Bakterien Noradrenalin oder Adrenalin?
- 4) Beeinflusst die Gabe von ADRB₂-Blockern die Ausschüttung von Zytokinen von bakteriell stimulierten Immunzellen aus Blut und Aszites von Patienten mit Leberzirrhose als Hinweis auf eine modulierende Funktion endogen produzierter Katecholamine?

2. Material und Methoden

2.1 Patienten, Datenerhebung und statistische Analyse

Für einen Teil der Untersuchungen wurde eine bereits existierende Kohorte von 535 Patienten mit Leberzirrhose und Aszites, bestehend aus DNA-Proben und klinischen Daten verwendet. Als gesunde Kontroll-Kohorte dienten 394 DNA-Proben, die von Teilnehmern eines Krebsvorsorgeprogramms stammen und keine Anzeichen für eine chronische Lebererkrankung in der Anamnese, im klinischen Bild oder bei Laborparametern aufwiesen. Zusätzlich wurden Blut und Aszites frisch von 13 Patienten mit Leberzirrhose und Aszites aus der medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Bonn (UKB) abgenommen, um zusätzlich zur Genotypisierung die Expression von ADRB₂ auf Immunzellen zu messen und funktionelle Untersuchungen durchführen zu können.

Es wurden folgende klinische Daten erhoben: Alter, Geschlecht, Genese der Zirrhose, Aszites, SBP, Ösophagusvarizen, HCC, Beta-Blocker, Thrombozyten, Leukozyten, Natrium, Kreatinin, Albumin, Bilirubin, GOT, GPT, GGT, AP, Hb, INR, CRP, MELD, CHILD, Überleben, Zellzahl und Protein-Gehalt im Aszites etc. (Vgl. Tab. 9 und 10). Alle Patienten haben nach angemessener Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gegeben, sodass die Untersuchungen entsprechend den gesetzlichen Grundlagen und der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) durchgeführt werden konnten. Ein positives Ethikvotum liegt vor (130/18).

Die statistische Analyse wurde mit IBM SPSS® Statistics 27 und GraphPad Prism 9.0.0 durchgeführt. Die Auswertung von quantitativen Daten zweier Gruppen wurde für normal verteilte Daten mit dem ungepaarten oder gepaarten t-Test berechnet. Bei nicht normal verteilten Daten wurde die Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Das Korrelationsverhalten wurde mit Spearman-Rho untersucht. Qualitative Daten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert. Das Signifikanzniveau lag bei 5 %.

2.2 Material

2.2.1 Geräte und Zubehör

Tab. 1: Geräte und Zubehör

Gerät	Typ	Hersteller
Akku-betriebene Pipettierhilfe von 0,1 ml bis 200 ml	Pipetus® 100-240 Volt	Hirschmann
CO ₂ Inkubator	CB160	Binder
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™ II	BD Biosciences
Elektrische Mehrkanalpipette	E1 - CLIPTIP, 10 - 300 µl	Thermo Scientific
Magnetrührer	Speedsafe™	HANNA
Mehrfachdispenser 1	HandyStep® 705012	Brand
Mehrfachdispenser 2	HandyStep® touch	Brand
Mikropipetten	Research® 1-Kanal: 0.5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl, 500 - 5000 µl 8-Kanal: 0,5 - 10 µl, 20 - 200 µl	Eppendorf
Mikroskop	CK2, ULWCD 0.30	Olympus
Minizentrifuge 1	Mini-Centrifuge Sprout®	Heathrow Scientific
Minizentrifuge 2	PlateFuge™	Benchmark Scientific
Photometer	Sunrise	TECAN®
Schüttelapparat	3016	GFL®
Schüttelgerät	Vortex-Genie® 2	Scientific Industries
Sicherheitswerkbank	LaminAir® HB 2436	Heraeus Instruments
Spektralphotometer	NanoDrop 1000 Spectrophotometer	
Thermocycler	LightCycler® 96	Roche
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Instruments
Waage	KC BA 100	Sartorius

Washer für Elisa-Platten	Columbus plus, M12/4R	Tecan
Wasserbad	3047	Köttermann Labor-technik
Zellzähler	EVE™ Automatic cell counter	NanoEntek
Zentrifuge 1	Avanti J-15 Centrifuge	Beckman Coulter
Zentrifuge 2	Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech

2.2.2 Chemikalien, Puffer und Reagenzien

Tab. 2: Chemikalien, Puffer und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Ampuwa®	Fresenius Kabi
Blue Probe qPCR 2x Mix	Biozym
BSA, HS, Protease Free	Europa Bioproducts Ltd
Dimethyl sulfoxide (DMSO), for molecular biology, ≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich
Dociton® Injektionslösung, Propranololhydrochlorid 3,9 mM	Mibe
Ethanol 70 %	Otto Fischar GmbH
Fetal Bovine Serum (FCS)	Carl Roth
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
H ₂ SO ₄ , Schwefelsäure 25 %	Carl Roth
LPS	Sigma-Aldrich
PBS Tablets, Phosphate-Buffered Saline	Gibco
Pancoll human	Pan-Biotech
Penicillin-Streptomycin	Pan-Biotech
PGN	Sigma-Aldrich
RBC Lysis Buffer (10X)	BioLegend®
RPMI-1640 Medium	Gibco

Thermo Scientific™ Proteinase K	Fisher Scientific
TMB, Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich
Tween® 20	RPI
UltraPure™ Distilled Water DNase/RNase Free	Invitrogen by Life Technologies

2.2.3 Kits

Tab. 3: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
ELISA MAX™ Standard Set Human IL-8	BioLegend®
Epinephrine ELISA Kit	Abnova® Corporation
GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Kit	Thermo Scientific
Human IFN γ ELISA Set	Diaclone
Noradrenaline ELISA	DRG Diagnostics

2.2.4 Medien

Tab. 4: Zusammensetzung des Einfriermediums, 250 ml

25 ml	FCS
25 ml	DMSO
200 ml	RPMI

Tab. 5: Zusammensetzung des Mediums für das Aussähen von Zellen

500 ml	RPMI
5 ml	Penicillin-Streptomycin
50 ml	FCS

2.2.5 Verwendete Antikörper und UltraComp eBeads

Tab. 6: Verwendete Antikörper

Anti-human Antikörper	Fluoreszierende Farbe	Klon	Isotyp	Hersteller	Cat
CD3	PerCP	UCHT1	Mouse IgG1	BioLegend®	300430
CD4	PE/Cyanine7	RPA-T4	Mouse IgG1	BioLegend®	300512
CD8	PE	HIT8a	Mouse IgG1	BioLegend®	300908
CD11b	PE	ICRF44	Mouse IgG1	BioLegend®	301306
CD14	Brilliant Violet 421™	M5E2	Mouse IgG2a	BioLegend®	301830
CD14	PerCP			Becton Dickinson	345786
CD16	PE/Cyanine7	3G8	Mouse IgG1	BioLegend®	302015
CD19	Brilliant Violet 421™	HIB19	Mouse IgG1	BioLegend®	302234
CD45	FITC	HI30	Mouse IgG1	BioLegend®	304006
CD45	BV421	HI30	Mouse IgG1	BioLegend®	304032
CD56	PerCP	5.1H11	Mouse IgG1	BioLegend®	362526
TLR2	PE	CB225	Mouse IgG2a	BioLegend®	148603
Human β -2 Adrenergic R/ADRB2	647 / APC	# 586107	Monoclonal Mouse IgG1	R&D SYS-TEMS®	FAB100 401R-100UG

- UltraComp eBeads™ Compensations Beads – Invitrogen (ThermoFisher Scientific)

2.2.6 LightSNiP Assays (Tib Molbiol)

Tab. 7: Positionen der untersuchten Punktmutationen

	Codiertes Protein	Sequenz	Position
Rs1042713	ADRB ₂	GCAGCGCCTTCTTGCTGGCAC- CCAAT[A/G]GAAGCCATGCGCCCGGACCA- CGACGT	16
Rs1042714	ADRB ₂	ATGCGCCGGACCACGACGTCA- CGCAG[C/G]AAAGG- GACGAGGTGTGGGTGGTGGG	27
Rs1800888	ADRB ₂	ATGGTGTGGATTGTGTCA- GGCCTTA[C/T]CTCCTTCTTGCCCATTTCAGAT- GCAC	164

2.3 Methoden

2.3.1 Erythrozyten-Lyse

Mit Hilfe von RBC Lysis Buffer (10X) wurden die Erythrozyten lysiert. Es wurde eine Lösung im Verhältnis von 1:10 mit Lysis Buffer und deionisiertem Wasser (Ampuwa) angesetzt. Vor Gebrauch wurde die verwendete Menge Lysis Buffer auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden 100 µl Vollblut mit 2 ml der Lyse-Lösung vermischt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt. Danach wurde das Röhrchen bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Anschluss durch Vortexen in der Restflüssigkeit resuspendiert. Es erfolgte eine Spülung mit 3 ml PBS sowie die erneute Zentrifugation mit Verwerfung des Überstandes.

2.3.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann man verschiedenste partikuläre Strukturen, wie z. B. Immunzellen untersuchen. Dabei reichen wenige Mikroliter einer Probe aus, um die Granularität, Größe und Beschaffenheit m. H. von Lasern zu ermitteln. Das Licht der Laser

trifft auf die vorbeifließenden Partikel, wobei Streulicht in Abhängigkeit zur Größe und Granularität entsteht. Dieses wird von lichtempfindlichen Sensoren gemessen und verarbeitet. Trifft Licht auf die Detektoren, entsteht eine elektrische Spannung. Diese ist proportional zum Signalimpuls und dem gemessenen Merkmal. Ein Beispiel ist die Größe eines Partikels. Je größer das Partikel, desto größer ist die elektrisch gemessene Spannung. Signale können am besten über die Fläche unter der entstandenen Impulskurve (FSC-Area oder SSC-Area) quantifiziert werden. Vorwärts gestreutes Licht (Forward Scatter, FSC) gibt Aufschluss auf die Größe eines Partikels. Seitwärts gestreutes Licht (Side Scatter, SSC) ist ein Maß für die Lichtbrechung im 90° Winkel und beschreibt die Granularität, Inhomogenität und Form eines Partikels. Zusätzliche Informationen erhält man durch Hinzufügen von farbgebenden Molekülen (Fluorochrome), die an den Zellen binden. Diese Technik haben wir genutzt, um das Vorhandensein von Antigenen, v. a. von ADRB₂ und deren Expressionsmenge auf der Oberfläche von verschiedenen Zelltypen durch fluoreszierende AK zu bestimmen.

Vor der ersten Messung wurde eine Kompensation durchgeführt, damit sich die Messdaten von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen mit sich überlappenden Spektren nicht gegenseitig verfälschen. Für jede verwendete Farbe wurde zur Kompensation jeweils 1 µl markierter AK in ein Reagenzröhrchen gegeben sowie ein Tropfen Compensations Beads. Nach Vortexen erfolgte eine 10 min lange Inkubationsphase der Lösung im Kühlschrank, sodass die AK binden konnten. Danach wurde die Lösung mit PBS gewaschen, damit nicht gebundene AK die Kompensation nicht beeinflussen. Um das Volumen der Lösung zu erhöhen, verdünnte man sie mit 200 µl PBS. FSC und SSC wurden beim Einlesen von neuen Zellproben angepasst. Die Spannungspeaks von jedem Fluorochrom sollten bei der Kompensationseinstellung ungefähr bei 10⁴ V liegen. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde je nach Zelldichte angepasst. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Threshold rate unter 2.000 Events pro Sekunde lag, um Messfehler zu vermeiden.

Die Daten wurden mit dem Programm FlowJo_v10.7.1 ausgewertet. Dabei erfolgte folgende Gating Strategie:

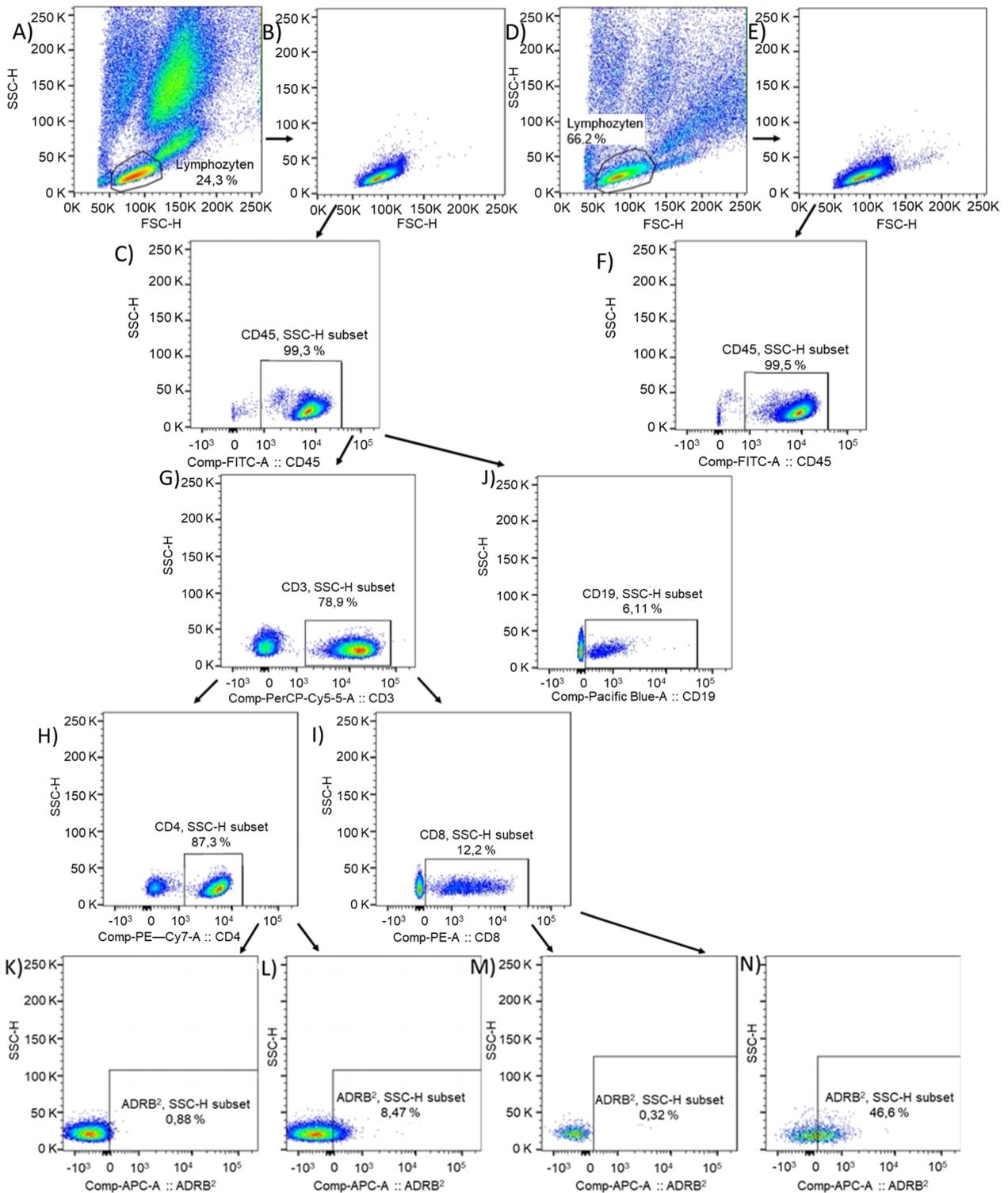


Abb. 1: Gating der verschiedenen Zelltypen aus den Lymphozyten

A) Lymphozyten des Blutes, B) Lymphozyten des Blutes im Einzelgate, C) CD45+ Lymphozyten des Blutes, D) Lymphozyten der Aszites, E) Lymphozyten der Aszites im Einzelgate, F) CD45+ Lymphozyten der Aszites, G) CD3+ T-Lymphozyten, H) CD4+ T-Helfer-Zellen, I) CD8+ Zytotoxische T-Zellen, J) CD19+ B-Lymphozyten, K) T-Helfer-Zellen ohne ADRB₂-AK, L) T-Helfer-Zellen mit ADRB₂-AK, M) Zytotoxische T-Zellen ohne ADRB₂-AK, N) Zytotoxische T-Zellen mit ADRB₂-AK

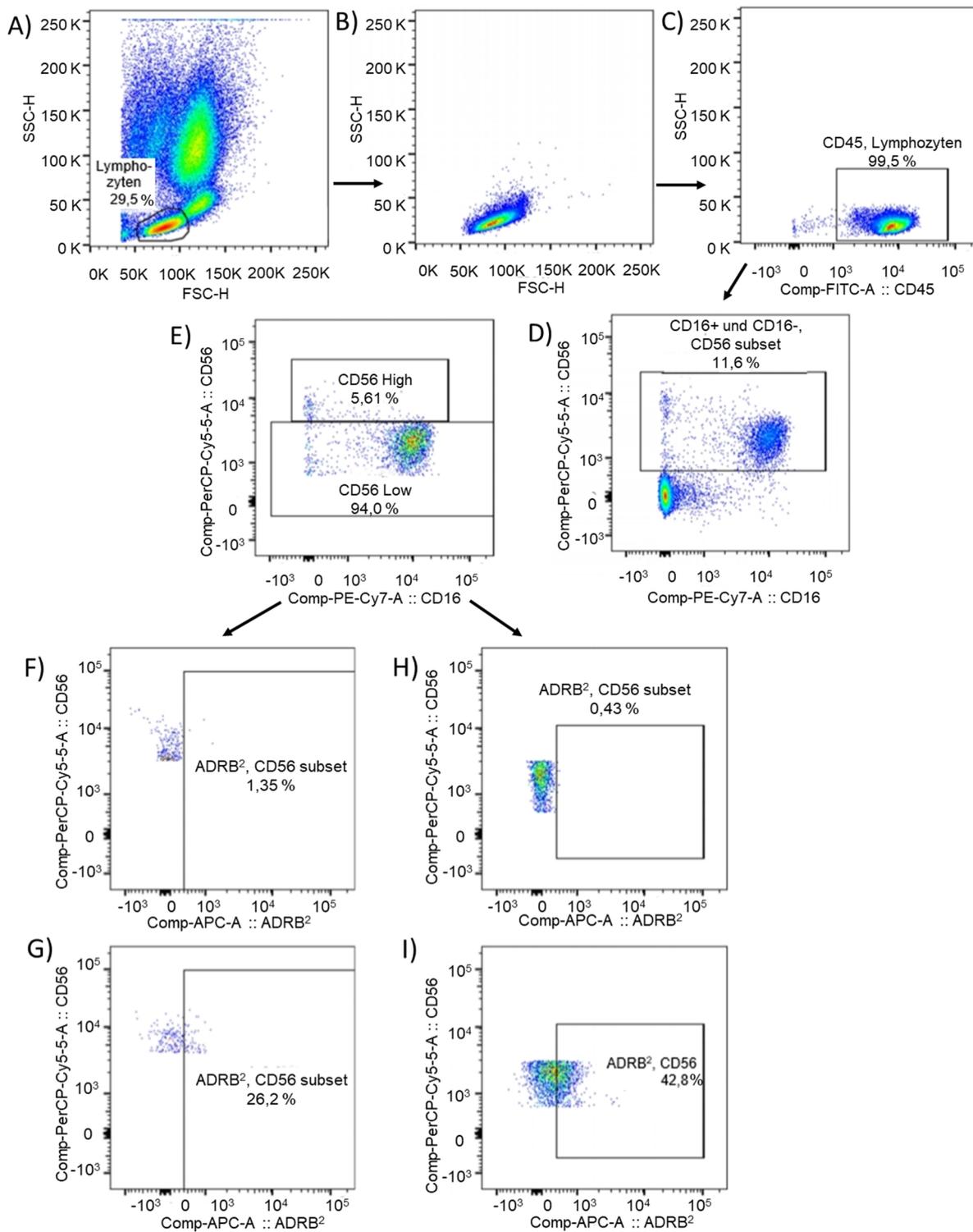


Abb. 2: Gating der NK/NKT-Zellen (CD56+) aus den Lymphozyten

A) Lymphozyten des Blutes, B) Lymphozyten im Einzelgate, C) CD45+ Lymphozyten, D) CD16+/- ,CD56+ NK/NKT-Zellen, E) CD56^{High} und CD56^{Low} NK/NKT-Zellen, F) CD56^{High} NK/NKT-Zellen ohne ADRB₂-AK, G) CD56^{High} NK/NKT-Zellen mit ADRB₂-AK, H) CD56^{Low} NK/NKT-Zellen ohne ADRB₂-AK, I) CD56^{Low} NK/NKT-Zellen mit ADRB₂-AK

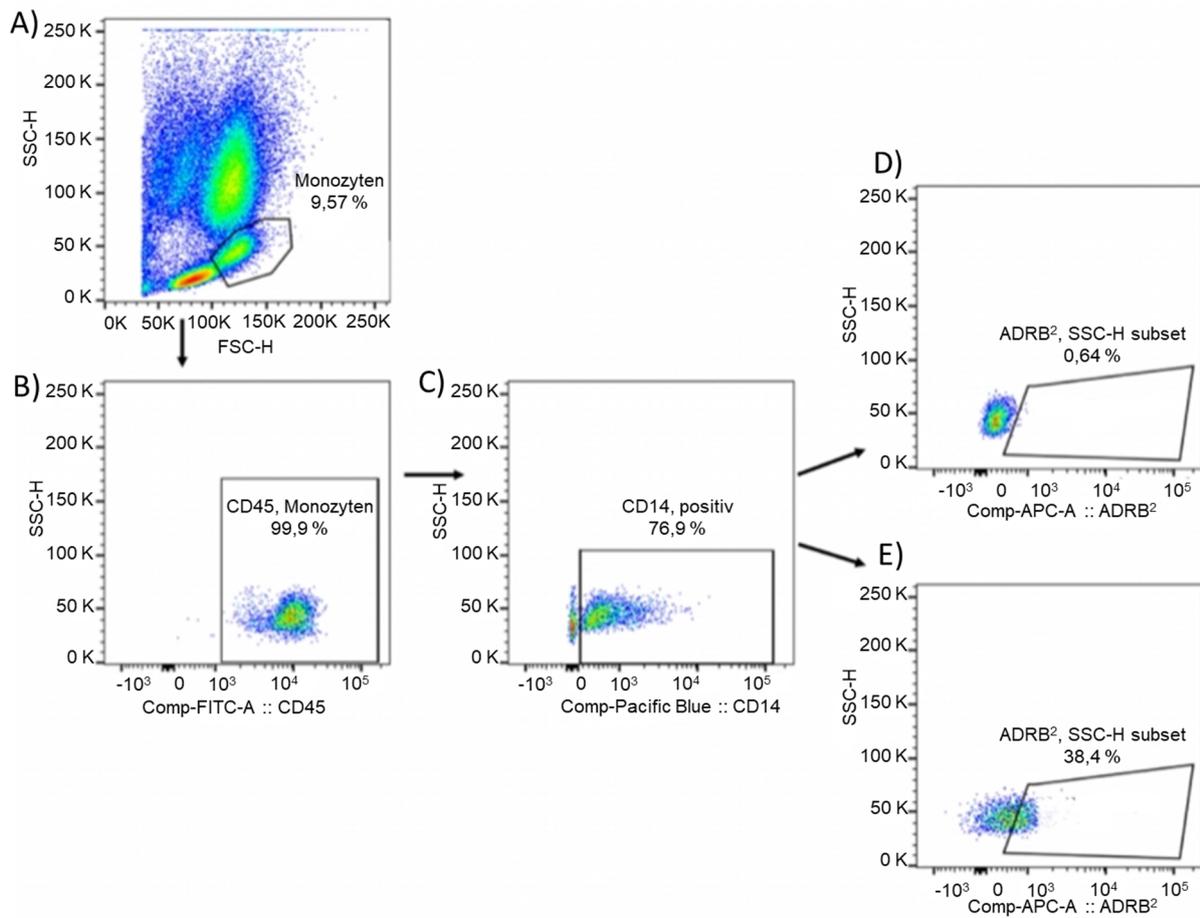


Abb. 3: Gating der Monozyten/Makrophagen mit und ohne ADRB₂

A) Monozyten des Blutes B) CD45⁺ Monozyten/Makrophagen, C) CD14⁺ Monozyten/Makrophagen, D) CD14⁺ Monozyten/Makrophagen ohne ADRB₂-AK, E) CD14⁺ Monozyten/Makrophagen mit ADRB₂-AK

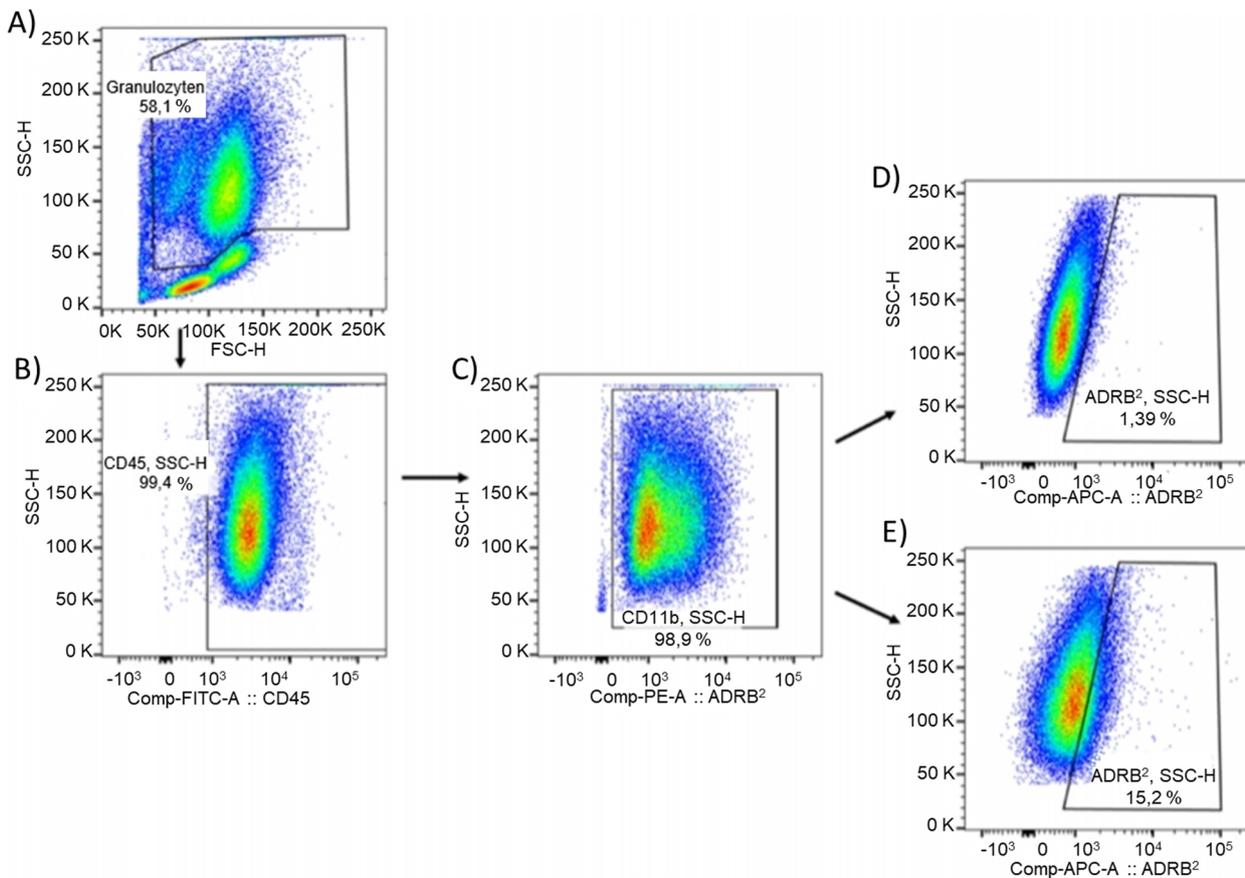


Abb. 4: Gating der Granulozyten mit und ohne ADRB₂-AK

A) Granulozyten des Blutes B) CD45⁺ Granulozyten, C) CD11b⁺ Granulozyten, D) CD11b⁺ Granulozyten ohne ADRB₂-AK, E) CD11b⁺ Granulozyten mit ADRB₂-AK

Die Daten für die TLR2-Expression (siehe Abb. 17) entstammen der gleichen Gating-Strategie, nur das im letzten Schritt TLR2-AK anstatt ADRB₂-AK verwendet wurden.

Um die Blut- und Aszitesproben für die Durchflusszytometrie vorzubereiten, wurden folgende weitere Methoden durchgeführt.

2.3.3 Isolation von mononukleären Asziteszellen

Die Aszitesproben der Patienten hatten ein Volumen zwischen 200 ml und 2500 ml. Zuerst wurde der Aszites der jeweiligen Patienten in 50 ml Falcons für 5 min bei 1300 revolutions per minute (rpm) zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden in einem 50 ml Falcon mit ca. 20 ml Überstand resuspendiert.

Für die Untersuchungen m. H. der Durchflusszytometrie wurden pro benötigtes Reagenzröhrchen eine Erythrozyten-Lyse mit 100 μ l aufkonzentrierte Asziteszellen oder 100 μ l Vollblut durchgeführt. Die restlichen Asziteszellen wurden zur Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Nach dem Lysieren von Aszites und Blut wurden verschiedene Röhrchen mit unterschiedlichen AK angesetzt. Von dem ADRB₂-AK wurden pro Probenröhrchen 5 μ l verwendet, von allen anderen AK sind 1 μ l zur Färbung ausreichend gewesen. Zur Kontrolle gab es immer ein Reagenzröhrchen, indem kein ADRB₂-AK enthalten war.

2.3.4 Isolierung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation (Pancoll)

Für die Isolierung von PBMC des Blutes wurden 2 Heparin-Röhrchen Vollblut (ca. jeweils 5 - 9 ml) in ein 50 ml Falcon überführt und mit PBS aufgefüllt. Für Aszites wurden äquivalent zum Blut ca. 18 ml des konzentrierten Aszites verwendet. Nun wurden 15 ml Pancoll in ein 50 ml Falcon gegeben und mit dem verdünnten Blut bzw. Aszites überschichtet. Anschließend wurde die Probe bei 1000 xg (2400 rpm) für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die weiße Zellschicht, die sich nach dem Zentrifugieren intermediär gebildet hat, wurde mit einer Glaspipette vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon überführt. Danach wurde das Falcon auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 500 xg (1750 rpm) für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 15 ml PBS resuspendiert. Als Zwischenschritt konnten zu diesem Zeitpunkt die Zellen m. H. einer Trypan-blau-Färbung gezählt werden. Trypan-blau ist ein Farbstoff, der vorzugsweise in der Mikroskopie zur Überprüfung der Zellviabilität verwendet wird. Lebende Zellen verfügen über eine intakte Zellmembran, sodass der Farbstoff nicht in das Zellinnere eindringen kann. Im Gegensatz dazu ist die Zellmembran bei toten Zellen beschädigt, wodurch der Farbstoff eindringen und die Zelle blau färben kann (Strober, 2015). Für die Färbung wird eine 1:1 Verdünnung aus 10 μ l Farbstoff und 10 μ l Probe hergestellt. Mit Hilfe des EVE™ Automatic cell counter können die Zellen gezählt und anhand des prozentualen Anteils an blau-gefärbten Zellen die Viabilität berechnet werden. Nach dieser Unterbrechung der Isolierung von PBMC wurde nun die resuspendierte Probe ein letztes Mal bei 350 xg (1350 rpm), für 10 min mit Bremse zentri-

fugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in Einfriermedium resuspendiert. Pro Kryovial, welches befüllt werden sollte, wurden 1000 µl Einfriermedium hinzugefügt und eingefroren (1. Tag in -80 °C, ab 2. Tag in -150 °C).

2.3.5 DNA-Isolation

Damit die untersuchten Patienten genotypisiert werden können, muss die DNA aus Vollblut isoliert werden. Die DNA Isolation wurde mit dem Kit von Thermo Scientific nach folgendem Protokoll durchgeführt: Im ersten Schritt wurden 200 µl Vollblut mit 20 µl Proteinase K in einem Mikroreaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurden 400 µl Lysis Solution hinzugefügt und gevortext. Danach erfolgte die Inkubation bei 56 °C für 10 min. Nun wurden 200 µl Ethanol (96 - 100 %) beigefügt, gevortext und im Anschluss in ein Spin Column überführt. Die Spin Colum wurde für 1 min bei 6000 xg zentrifugiert. Dabei waren zwei Durchgänge mit jeweils 410 µl notwendig, um die Column nicht zu überfüllen. Der Durchfluss wurde verworfen und der Einsatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Jetzt wurden 500 µl des Wash Buffer II, der mit Ethanol versetzt worden war, in die Spin Column gegeben und für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit (≥ 20000 xg) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde sie in ein neues Mikroreaktionsgefäß gesetzt und mit 200 µl Elution Buffer befüllt. Nach zwei min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 8000 xg. Die gewonnene Flüssigkeit enthielt die DNA und wurde m. H. des NanoDrops auf ihre Menge und Reinheit geprüft. Dazu wurden 1,5 µl der Probe benötigt. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm. Das Absorptionsverhältnis 260/280 ist ein Indikator für eine Proteinverunreinigung. Man spricht von einer reinen DNA-Probe, wenn der Wert $\geq 1,8$ ist.

2.3.6 PCR - Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine enzymatische Methode zur Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) in vitro. Die Bezeichnung „Kettenreaktion“ beschreibt, dass Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für folgende Zyklen dienen und sich das gewünschte DNA-Fragment so exponentiell vermehren lässt.

In einem Thermocycler werden 20 - 50 Zyklen mit dem zu vervielfältigenden DNA-Fragment, der DNA-Polymerase, freien Nukleotiden und sequenzspezifischen Primern durchgeführt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung: Zuerst wird die doppelsträngige DNA auf ca. 95 °C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen gelöst werden. Danach liegt die DNA in Einzelsträngen vor.
2. Primerhybridisierung: Im zweiten Schritt lagern sich bei 55 °C bis 65 °C die spezifischen Primer (Oligonukleotide) an das 3'-Ende der komplementären Gensequenz an. Die genaue Temperatur ist von der Nukleinsäuresequenz und der verwendeten Primer abhängig.
3. Amplifikation: Durch die DNA-Polymerase werden an den Primern von 3' nach 5' komplementäre Basen angelagert, sodass zwei Doppelstränge am Ende des ersten Zyklus entstehen. Die Temperatur hängt vom Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase ab (68 - 72 °C). Polymerasen können ungefähr 500 - 1000 Basenpaare pro min polymerisieren.

2.3.6.1 LightCycler-Sonden zur Genotypisierung

Zum Nachweis der drei ausgewählten nicht-synonymen Polymorphismen Thr164Ile (rs1800888), Arg16Gly (rs1042713) und Gln27Glu (rs1042714) im *ADRB₂*-Gen eignen sich Schmelzkurven-basierte real time PCR Tests wie das Light-SNiP Verfahren. Die drei LightSNiP-Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL hergestellt. Die Proben wurden in einem Endvolumen von 10 µl angesetzt. Enthalten waren 1 µl DNA-Lösung, 5 µl qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 3,5 µl destilliertes Wasser und 0,5 µl LightSNiP Reagent Mix (TIB MOLBIOL). Die Durchführung erfolgt in zwei Schritten: PCR Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse. Die LightSNiP-Sonden sind fluoreszenz-markiert und überspannen die zu analysierende DNA-Sequenz, ohne am Amplifikationsprozess teilzunehmen. Nach Hybridisierung nimmt die Fluoreszenz der Sonde stark zu. Diese Änderung der Fluoreszenz, die ausschließlich durch die Sonde zustande kommt, wird durch Schmelzkurvenanalysen nachgewiesen. Jede Fehlpaarung, die sich im überspannten Sequenzbereich der Sonde befindet, reduziert die Wasserstoffbrückenbindungen und in

Folge dessen die Schmelztemperatur. Verschiedene Variationen destabilisieren die Wasserstoffbrückenbindungen unterschiedlich, was zu spezifischen Schmelzpunkten führt, wodurch Polymorphismen identifiziert werden können (Cheli et al., 2015). Dementsprechend dissoziieren die Sonden bei einer mutierten Gensequenz oft zu einem früheren Zeitpunkt. Die perfekt gepaarten Sonden auf der Wildtypsequenz dissoziieren wegen der vielen Wasserstoffbrückenbindungen erst bei einer höheren Schmelztemperatur. Dies wird m. H. von verschiedenen Schmelzkurvenpeaks visualisiert. Die homozygot-mutierte Variante und der homozygote Wildtyp weisen jeweils einen Schmelzkurvenpeak auf, hingegen zeigt der heterozygote Genotyp zwei Peaks. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie beliebige Mutationen detektieren kann. Diese liegen unter der Sonde, wodurch meistens eine Unterscheidung von mehr als nur zwei Varianten bzw. einer Mutation möglich ist. Unerwartete oder neue Mutationen können durch Sonden von TaqMan® wahrscheinlich als falsch homozygote Proben dargestellt werden (TIB MOLBIOL, 2022). Ein weiterer Vorteil des Light-SNiP Verfahrens ist der korrekte Nachweis der Genotypen, die Reproduzierbarkeit und die Einfachheit der Technik.

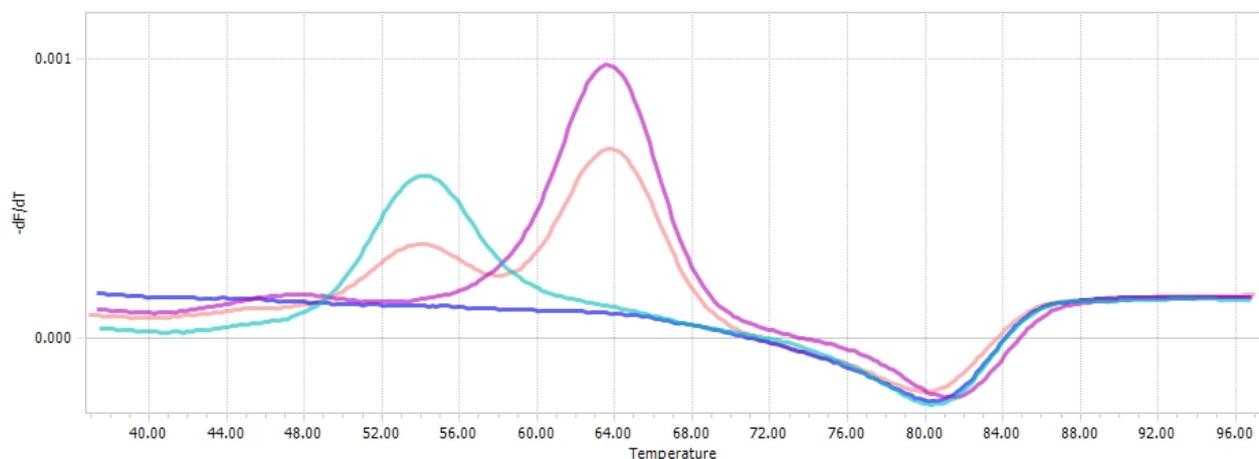


Abb. 5: Beispiel für die verschiedenen Schmelzkurvenpeaks
Sonde ADRB₂, rs1042714; blau = Wasserkontrolle, türkis = homozygot mutierter Genotyp,
orange = heterozygot mutierter Genotyp, pink = homozygoter Wildtyp

Tab. 8: Reaktionsprotokoll für die qPCR

Vorgang	Temperatur in °C	Zeitdauer	Heizrate in °C/s
1. Aufheizen des Deckels	100		
2. Initiale Denaturierung	95	10 min	4,4
3. Denaturierung	95	10 s	4,4
4. Primerhybridisierung	60	10 s	2,2
5. Amplifikation	72	15 s	4,4
6. Schmelzkurve	95	30 s	4,4
	37	10 s	1,5
	97	1 s	-
7. Abkühlung	37	30 s	1,5

Die Schritte 3 - 5 wurden 45 Mal wiederholt.

2.3.7 Zellkultur und -Stimulation

Für die folgenden ELISA wurden die bereits isolierten Zellen, die m. H. der Pancoll-Methode aus Vollblut und Aszites gewonnen werden konnten, verwendet. Zu Beginn wurde ein 15 ml Falcon mit 9 ml des zuvor angesetzten RPMI-Mediums (enthält FCS und Penicillin-Streptomycin) vorbereitet. Die bei -150 °C eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad für 1 - 2 min bei 37 °C aufgetaut. Das gesamte Zellvolumen (1 ml) wurde in das Falcon mit Medium gegeben und anschließend für 5 min bei 700 rpm zentrifugiert. Nachdem die Zentrifugation abgeschlossen war, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und weitere 4 ml hinzugefügt. Die Zellen wurden m. H. des EVE™ Automatic cell counters gezählt. Dazu wurde eine 1:1 Lösung mit Trypan-blau angesetzt. Für die Bestimmung von Interleukin-8 (IL8) und Interferon- γ (IFN γ) wurden auf einer 48-Well Platte 50.000 Zellen in insgesamt 200 μ l Medium pro Well ausgesät. Darin enthalten waren folgende Konzentrationen der Stimulanzen: Propranolol: 5 μ g/ml, PGN: 100 ng/ml und LPS: 100 ng/ml. Die Abb. 2 zeigt ein Schema zur Zellstimulation für die IL8- bzw. IFN γ -Bestimmung. Für die Untersuchungen von Adrenalin und Noradrenalin wurden 100.000 Zellen pro Well auf einer 24-Well Platte in jeweils 500 μ l Medium ausgesät. Neben den Kontrollen, die unstimuliert blieben, wurden die restlichen Zellen mit 100 ng/ml PGN oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Die Stimulation erfolgte über Nacht im Inkubator bei

37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂). Nach dem Ende der Stimulation wurde der Überstand am Folgetag in eine 96-Well Platte mit Rundboden überführt und anschließend bei 810 xg für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand ohne Zellen in eine neue 96-Well Platte überführt. Der Überstand wurde nun für die folgenden Versuche direkt verwendet oder bei - 20 °C gelagert.

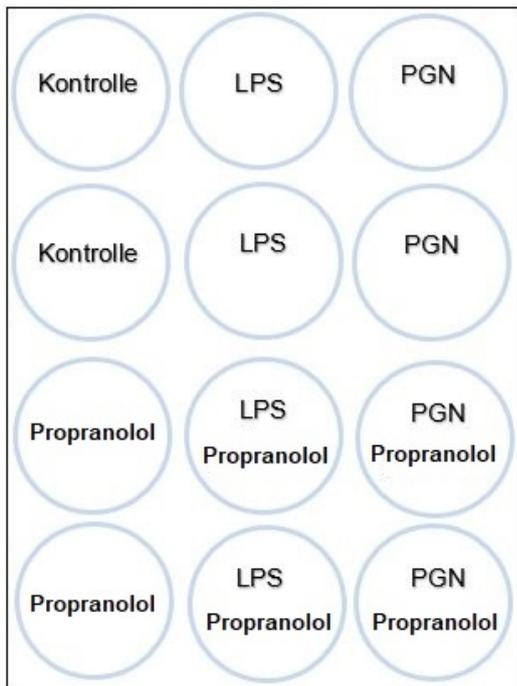


Abb. 6: Schema der Stimulation

2.3.8 ELISA

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ist ein Verfahren, um einzelne Proteine wie beispielsweise Interleukin oder Interferon nachzuweisen. Teil dieser Methode ist die natürliche Reaktion des Immunsystems auf Fremdstoffe, die sogenannte Antikörper-Antigen-Reaktion. Wird eine Substanz als fremd erkannt, werden AK gebildet, die an den Fremdstoffen binden und diese markieren. Zur Detektion von einem bestimmten Protein muss der spezifische AK bekannt sein. Bei einem Sandwich-ELISA werden zwei primäre AK verwendet, die spezifisch an unterschiedlichen Epitopen des Antigens binden. Der erste primäre AK, der sog. Coating Antibody wird m. H. eines speziellen Puffers am Boden einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe bindet das AG-tragende Protein während einer Inkubationsphase an den AK (AK-AG-Komplex). Im

Anschluss wird die Platte gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen. Nun wird ein zweiter primärer AK hinzugegeben, der auch an dem Protein bindet, der sog. Detection Antibody. Nach erneutem Waschen erfolgt die Zugabe eines sekundären Nachweis-AK, der mit einem Enzym konjugiert ist und am zweiten primären AK bindet. Nach Zugabe eines Substrates erfolgt eine enzymatische Reaktion, die zu einer Farbreaktion führt. Die Intensität der Färbung wird über die Absorption bei 450 nm gemessen und stimmt mit der Konzentration des Proteins proportional überein.

Bei einem kompetitiven ELISA benötigt man keinen zweiten markierenden AK. Ein Referenz-AG ist als feste Phase an den Boden der Mikrotiterplatte gebunden. In die Vertiefungen der Platte wird die Probe und der AK hinzugegeben. Bei Vorhandensein des AG in der Probe konkurriert es mit dem Referenz-AG um die vorhandenen Bindungsstellen der AK. Nach einer Inkubationszeit befindet sich das System im Gleichgewicht und nicht gebundene Substanzen werden durch Waschen entfernt. TMB als Substrat verursacht anschließend die Farbreaktion. Das Signal verhält sich gegensätzlich zu der anderen ELISA-Methode. Je mehr AG in der Probe vorhanden ist, desto geringer fällt die Farbreaktion aus, da nur wenige AK-Bindungsstellen vom markiertem Referenz-AG besetzt sind (umgekehrte Proportionalität). Die Konzentrationen können m. H. von einer Standardkurve ermittelt werden.

In den Überständen der Zellkultur-Experimente wurden IL8- und IFN γ m. H. eines Sandwich-ELISA, Adrenalin- und Noradrenalin mit einem kompetitiven ELISA gemessen. Die jeweilige Durchführung erfolgte mit den spezifischen ELISA-Kits nach Herstellerangaben. Die Absorption der Färbungen wurde m. H. des Photometers Sunrise von Tecan[®] und dem Programm Magellan 6 bei 450 nm mit der Referenzwellenlänge bei 620 nm gemessen. Die Verdünnungen des Überstandes wurden anhand von Vorversuchen probenabhängig variiert, um im messbaren Bereich zu liegen. Die Verdünnungen bei dem IL8-ELISA lagen zwischen 1:1 und 1:40. Im Gegensatz zu den Aszitesproben benötigten Blutproben und die Kontrollproben ohne Stimulanz eine geringere Verdünnung, um im Detektionsbereich zu liegen. Der Überstand für die IFN γ -Messung wurde unverdünnt aufgetragen. Für die Untersuchung von Adrenalin und Noradrenalin wurden bei dem kompetitiven ELISA 200 μ l der Überstände unverdünnt verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristik der Kohorten

Für die verschiedenen Untersuchungen wurde auf Kohorten mit insgesamt 929 DNA-Proben und den dazu gehörigen klinischen Daten des UKBs zurückgegriffen, deren Einzelheiten in Tab. 9 aufgeführt sind. Die Kohorte von Patienten mit Leberzirrhose und Aszites wurde in zwei Subgruppen unterteilt: Patienten, die eine SBP erlitten haben und Patienten ohne SBP. Das Durchschnittsalter in den beiden Gruppen der erkrankten Personen war mit 59,5 und 58,2 Jahren nahezu gleich. Die gesunde Kontrollkohorte war etwas älter mit durchschnittlich 65,2 Jahren. Die Verteilung des Geschlechts war dagegen ungleich. Bei den Patienten mit Aszites war die Mehrheit männlich (67,4 % ohne SBP / 69,4 % mit SBP), demgegenüber gestellt war der Anteil des männlichen Geschlechts bei der Kontrollgruppe mit 44,8 % in der Minderheit.

Tab. 9: Demographie, klinische- und Labordaten der genetischen Studienkohorte

	Aszites ohne SBP	Aszites mit SBP	Gesunde Kohorte
Gesamtzahl	n = 338	n = 197	n = 394
Alter, median (range)	59,5 (23-92)	58,2 (23-82)	65,2 (28-94)
Geschlecht (% männlich / weiblich)	67,4 / 32,6	69,4 / 30,6	44,8 / 55,2
Bilirubin [mg/dl], Mittelwert (M) ± SD	3,95 ± 6,02	4,10 ± 5,74	-
ALT [IU/l], (M ± SD)	63,0 ± 133,9	56,3 ± 166,6	-
AST [IU/l], (M ± SD)	95,4 ± 152,3	132,4 ± 410,3	-
GGT [IU/l], (M ± SD)	228,9 ± 229,2	160,5 ± 155,6	-
Thrombozyten [$\cdot 10^3/\mu\text{l}$], (M ± SD)	155,4 ± 138,9	141,7 ± 102,7	-
MELD (M ± SD)	16,0 ± 6,6	18,8 ± 8,0	-

Darüber hinaus wurden 13 Patienten neu in die bestehenden Kohorten aufgenommen, mit deren Einwilligung weitere Untersuchungen m. H. von Blut und Aszites zur weiteren phänotypischen und funktionellen Charakterisierung der Immunzellen durchgeführt werden konnten. In der Tab. 10 sind die Labordaten, demographische und klinische Daten der 13 neu-rekrutierten Patienten aufgeführt. Es gibt eine größere Spannweite beim Alter

(41 bis 78 Jahren) und beim MELD (8 bis 35); manche Patienten nehmen Beta-Blocker ein, andere nicht.

Tab. 10: Demographie, klinische- und Labordaten der 13 neuen Patienten

	Neue Kohorte
Gesamtzahl	n = 13
Alter, median, (range)	60,3 (41-78)
Geschlecht (% männlich / weiblich)	53,8 / 46,2
Z. n. SBP (%), n	23,1 (n = 3)
Ösophagusvarizen (n: 0 / 1 / 2 / 3)	(4 / 6 / 2 / 1)
HCC (%)	0
PPI (%), n	76,9 (n = 10)
Rifaximin (%), n	23,1 (n = 3)
Beta-Blocker (%), n	30,8 (n = 4)
Nierenersatzverfahren	15,4 (n = 2)
Natrium [mmol], (M ± SD)	138,9 ± 21,6
Kreatinin [mg/dl], (M ± SD)	1,7 ± 1,5
Albumin [g/l], (M ± SD)	25,9 ± 4,3
Bilirubin [mg/dl], (M ± SD)	6,7 ± 8,0
GOT [IU/l], (M ± SD)	126,8 ± 158,5
GPT [IU/l], (M ± SD)	63,1 ± 71,8
GGT [IU/l], (M ± SD)	224,6 ± 200,2
AP [IU/l], (M ± SD)	163,3 ± 62,2
Hb [g/dl], (M ± SD)	10,3 ± 2,3
INR, (M ± SD)	1,4 ± 0,4
CRP [mg/l]	33,2 ± 30,4
Leukozyten [$\cdot 10^3/\mu\text{l}$], (M ± SD)	9,6 ± 6,4
Thrombozyten [$\cdot 10^3/\mu\text{l}$], (M ± SD)	139,9 ± 63,7
MELD (M), SD	19 (8-35)
Child (n: A, B, C)	(0 / 6 / 7)
Aszites-Leukos [μl], (M ± SD)	205,9 ± 141,3
Aszites-Neutros [μl], (M ± SD)	60,9 ± 83,0

Aszites-Gesamteiweiß [g/l], (M ± SD)	10,7 ± 4,9
Verstorben innerhalb von 3 Monaten (%), n	30,8 (n = 4)

3.2 Die Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen im Blut und Aszites

Bei der Untersuchung von Zellen m. H. der Durchflusszytometrie (siehe Abb. 1, 2, 3 und 4) konnten Unterschiede zwischen der Verteilung der Zellpopulationen zwischen Blut und Aszites bei den 13 erkrankten Patienten festgestellt werden (siehe Tab. 12). Der durchschnittliche Lymphozyten-Anteil war im Aszites fast dreifach so hoch wie im Blut (62,1 % zu 21,7 %) und auch die Monozyten/Makrophagen-Population betrug das Doppelte (16,1 % zu 7,9 %). Im Blut überwog v. a. die Granulozyten-Population (70,4 %).

Tab. 11: Verteilung der Zellpopulationen der 13 Patienten

Zellpopulation mit Range	Aszites	Blut
Lymphozyten (% der CD45+ Zellen)	62,1	21,7
	(17,2 - 83,6)	(6,2 - 42,7)
Monozyten/Makrophagen (% der CD45+ Zellen)	16,1	7,9
	(1,7 - 50,5)	(2,8 - 12,6)
Granulozyten (% der CD45+ Zellen)	21,9	70,4
	(2,9 - 75,6)	(1,8 - 89,6)
T-Lymphozyten (CD3+) (% im Lymphozyten Gate)	73,1	75,5
	(48,8 - 91,4)	(51,1 - 86,9)
T-Lymphozyten (CD4+) (% der CD3+ Zellen)	61,0	69,6
	(32,9 - 87,2)	(49,6 - 92,4)
T-Lymphozyten (CD8+) (% der CD3+ Zellen)	35,2	24,0
	(12,4 - 65,9)	(7,1 - 50,2)
B-Lymphozyten (CD 19+) (% im Lymphozyten Gate)	4,7	6,3
	(0,95 - 15,6)	(1,7 - 9,7)
NK/NKT-Zellen (% im Lymphozyten Gate)	17,6	16,0
	(7,4 - 35,7)	(6,5 - 37,7)
NK/NKT-Zellen (CD56 ^{High}) (%)	11,8	6,0
	(2,2 - 34,1)	(1,1 - 16,4)

NK/NKT-Zellen (CD56^{Low}) (%)

88,1	94,0
(65,9 - 97,8)	(83,6 - 98,9)

Die Verteilung der verschiedenen Populationen ist in Abb. 7 sowie in Abb. 8 veranschaulicht. Wie bereits beschrieben, unterscheiden sich die Zellpopulationen bezüglich der Lymphozyten ($p = 0,013$) und Granulozyten ($p = 0,001$) signifikant zwischen Blut und Aszites. Bei den Monozyten/Makrophagen ($p = 0,068$) war ein deutlicher Trend zu sehen (siehe Abb. 3).

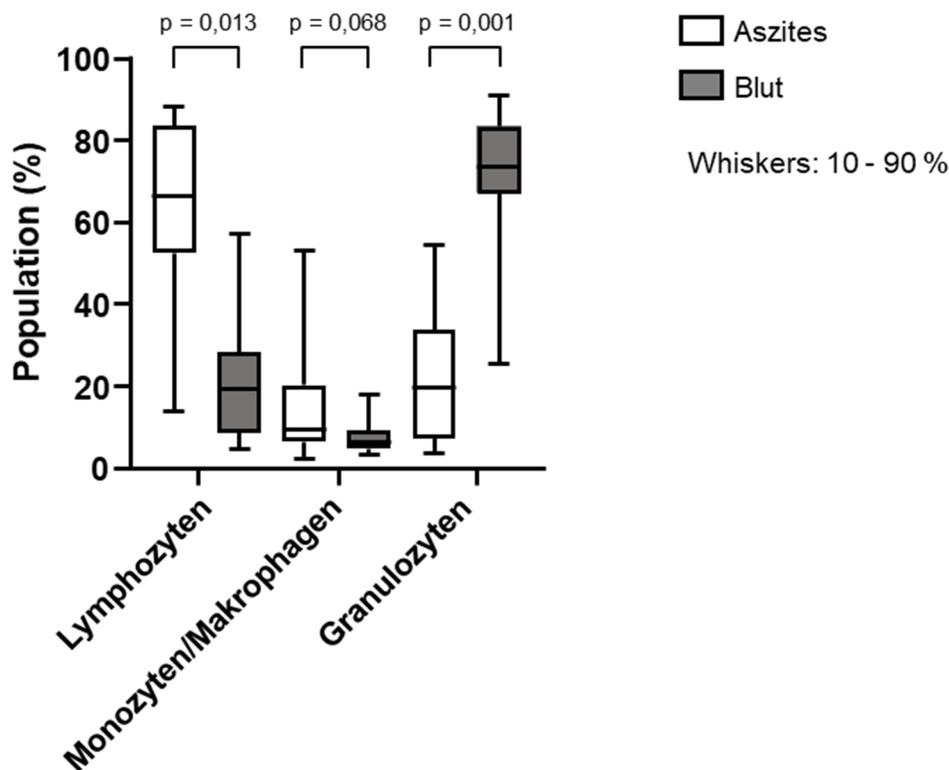


Abb. 7: Verteilung der Zellpopulationen im Blut und Aszites
Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; $n = 13$

Abb. 8 zeigt die verschiedenen Lymphozyten-Populationen und ihre Verteilung im Blut und Aszites. Die zytotoxischen T-Zellen ($p = 0,022$) kommen im Aszites im Vergleich zum Blut viel häufiger vor. Die CD4⁺ T-Helfer-Zellen ($p = 0,052$), CD19⁺ B-Lymphozyten ($p = 0,068$), CD56^{High} ($p = 0,094$) und CD56^{Low} ($p = 0,091$) NK/NKT-Zellen zeigten einen Trend für eine unterschiedliche Verteilung zwischen Blut und Aszites.

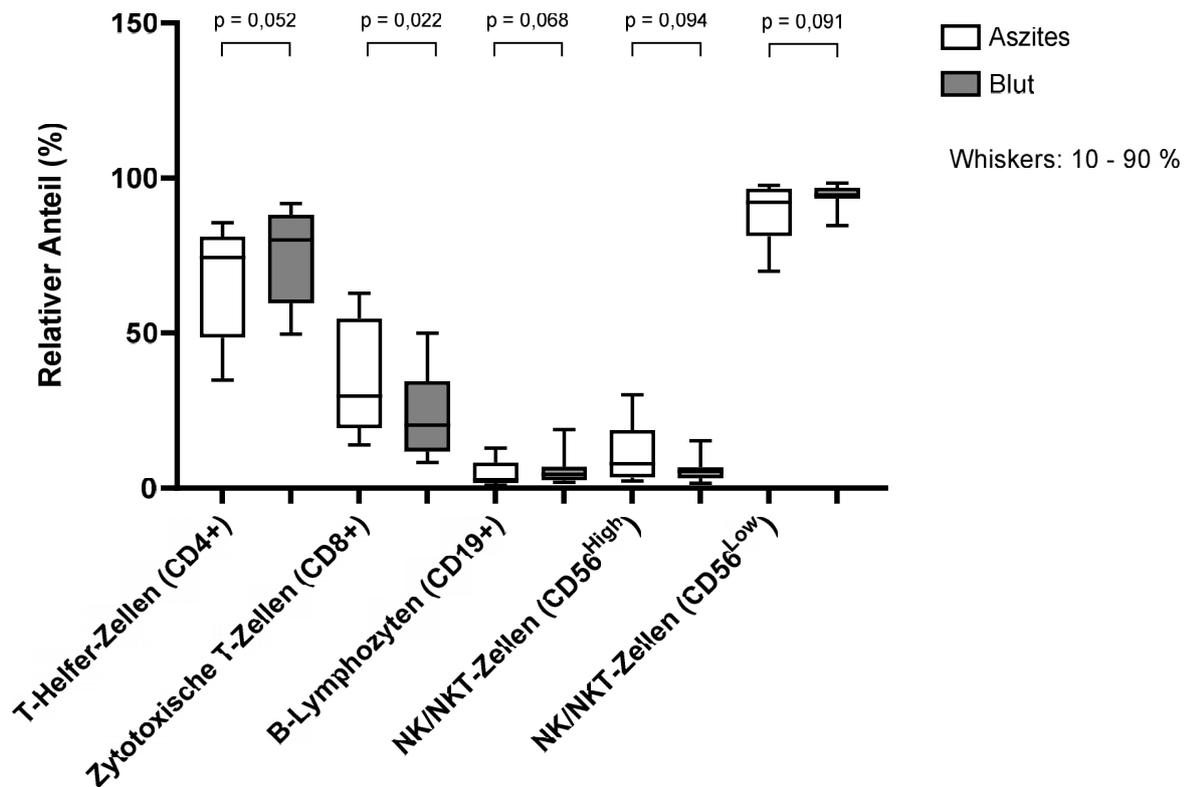


Abb. 8: Die verschiedenen Lymphozyten und ihre Verteilung im Blut und Aszites
Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; n = 13

3.3 Die Expression von ADRB₂ auf Immunzellen im Blut und Aszites von Patienten mit Leberzirrhose

Die Abb. 9 und Abb. 10 zeigen, dass Immunzellen sowohl im Blut als auch im Aszites bei Patienten mit Leberzirrhose ADRB₂ exprimieren. Eine relativ hohe Expression von ADRB₂ fand sich auf den NK/NKT-Zellen, den zytotoxischen T-Zellen und den Monozyten/Makrophagen. In Abb. 9 werden die Zellen des angeborenen Immunsystems und die jeweilige Expression dargestellt. Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der ADRB₂-Expression zwischen den Kompartimenten Blut und Aszites. Im Blut wurde geringgradig mehr ADRB₂ exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 10 signifikante Unterschiede der Expression auf den Immunzellen des erworbenen Immunsystems zwischen den verschiedenen Kompartimenten. Bei allen Zelltypen: T-Lymphozyten ($p = 0,001$), T-Helfer-Zellen ($p = 0,012$), zytotoxische T-Zellen ($p = 0,054$) und den B-Lymphozyten ($p = 0,036$) ist ein deutlicher Trend bzw. das Signifikanzniveau erreicht. Es wird mehr ADRB₂ im Aszites bei Menschen mit Leberzirrhose exprimiert als im Blut.

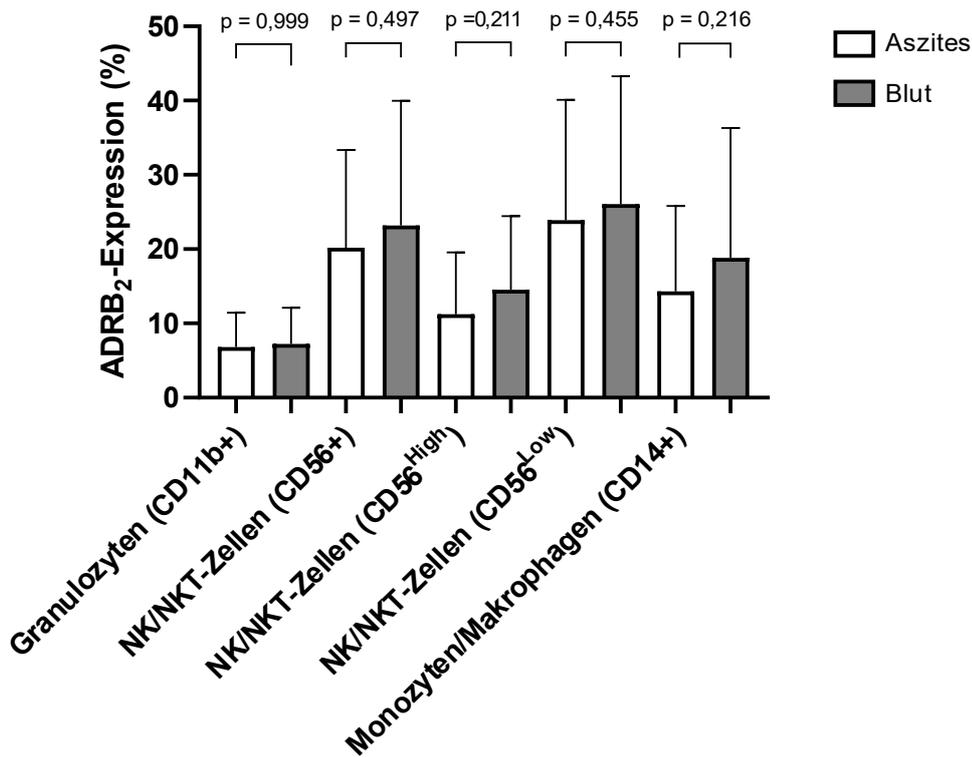


Abb. 9: Die Expression von ADRB₂ als Prozent der angegebenen Zellpopulation des angeborenen Immunsystems
 Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; n = 13

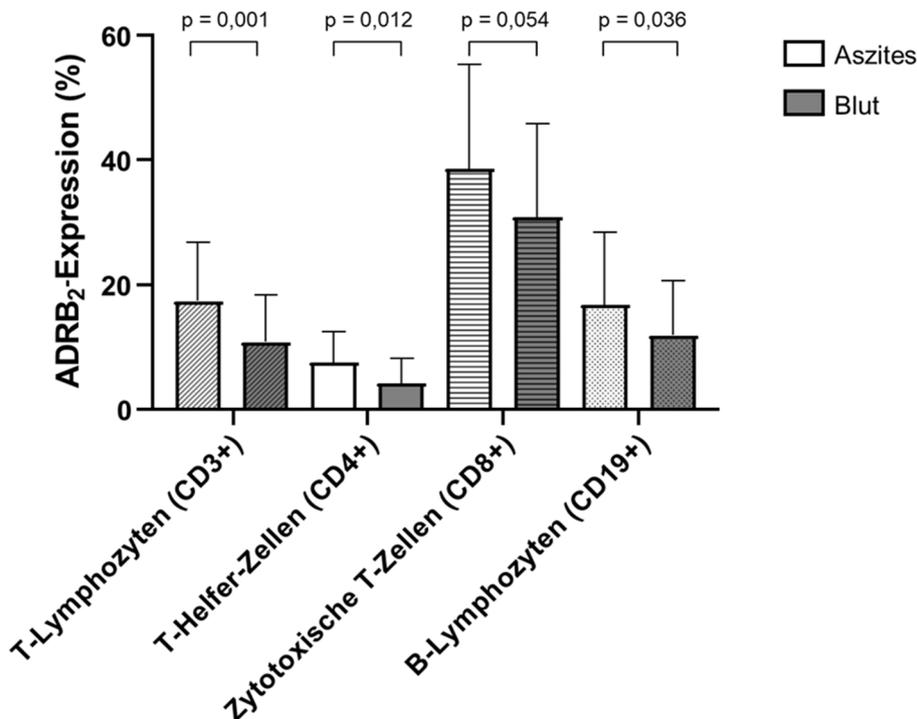


Abb. 10: Die ADRB₂-Expression als Prozent der angegebenen Zellpopulation des erworbenen Immunsystems
 Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; n = 12

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang mit der Expression von ADRB₂ auf den Immunzellen im Blut / Aszites und den verschiedenen Genotypen der nicht synonymen Polymorphismen rs1042713 und rs1042714 gefunden werden. Bei allen Immunzellen ist dieser Zusammenhang zu erkennen, wird aber nur bei wenigen signifikant.

Die Expression auf CD4⁺ T-Lymphozyten korreliert mit den Genotypen des Polymorphismus rs1042713 im Blut ($p = 0,035$) und im Aszites ($p = 0,035$) (Vgl. Abb. 11) sowie für CD8⁺ T-Lymphozyten (Blut $p = 0,035$; Aszites $p = 0,035$). Zirrhotiker mit dem homozygoten Wildtyp (GG) haben eine deutlich höhere ADRB₂-Expression als Patienten mit dem homozygot mutierten Genotyp (AA). Ein Trend zeichnet sich auch bei den NK/NKT-Zellen ($p = 0,071$; $r = 0,517$) und den Monozyten/Makrophagen ($p = 0,098$; $r = 0,478$) im Aszites sowie im Blut bei den B-Lymphozyten ($p = 0,057$; $r = 0,563$) ab.

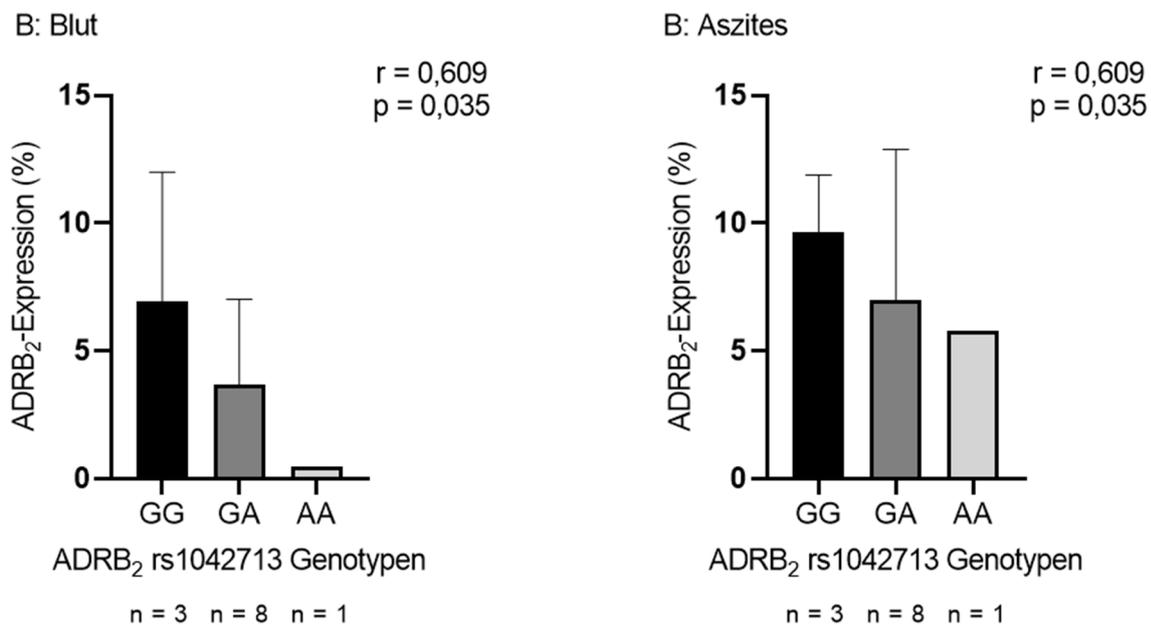


Abb. 11: Prozentuale ADRB₂-Expression bezogen auf die gesamten CD4⁺ T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom ADRB₂-Polymorphismus rs1042713
Statistische Analyse nach Spearman-Rho; r = Korrelationskoeffizient

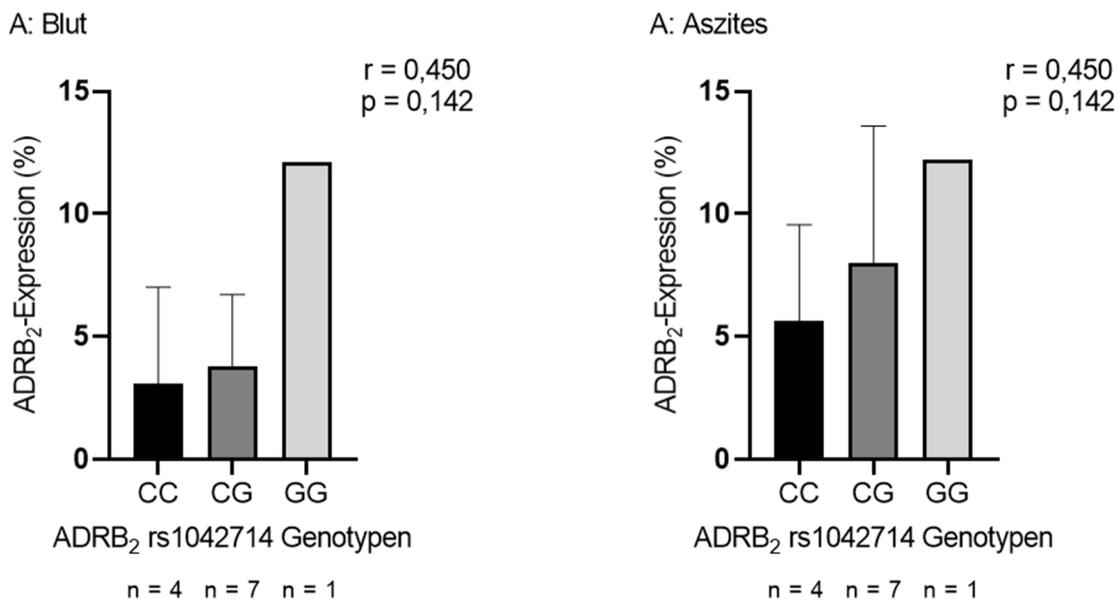


Abb. 12: Prozentuale ADRB₂-Expression bezogen auf die gesamten CD4⁺ T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom ADRB₂-Polymorphismus rs1042714
Statistische Analyse nach Spearman-Rho

In Abb. 12 ist die Korrelation zwischen dem rs1042714 Polymorphismus und der ADRB₂-Expression auf den CD4⁺ T-Lymphozyten im Blut ($p = 0,142$; $r = 0,450$) und im Aszites ($p = 0,142$; $r = 0,450$) dargestellt. Bei diesem Polymorphismus erkennt man eine Steigerung der ADRB₂-Expression bei den mutierten Genotypen CG und GG sowohl im Aszites als auch im Blut. Bei den CD56^{High} NK/NKT-Zellen ist ein leichter Trend vorhanden ($p = 0,098$; $r = 0,479$), wie auch bei anderen Immunzellen, die aber nicht signifikant werden.

3.4 Assoziation genetischer Polymorphismen im ADRB₂ mit SBP bei Leberzirrhose

Zur Feststellung, ob genetische Polymorphismen im ADRB₂ mit dem Auftreten von SBP als prototypische, durch bakterielle Translokation ausgelöste Infektion von Patienten mit Leberzirrhose assoziiert sind, wurden insgesamt DNA-Proben von 535 erkrankten Personen und 394 gesunden Personen, deren Daten in Tab. 9 dokumentiert sind, bezüglich der Polymorphismen rs1042713, rs1042714 und rs1800888 genotypisiert. In der Tab. 11 ist die Genotyp-Verteilung der verschiedenen ADRB₂-Polymorphismen veranschaulicht. Bei den Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung der Genotypen zwischen Patienten mit und ohne SBP bezüglich der drei Polymorphismen im Vergleich zum homozygoten Wildtyp festgestellt werden.

Tab. 12: Genotyp-Verteilung der ADRB₂-Polymorphismen
Statistische Analyse nach Pearson-Chi-Quadrat

Genotyp	Aszites Pati- enten mit SBP	Aszites Pati- enten ohne SBP	Gesunde Kontrollen	p vs. ohne SBP	p vs. Gesund
<i>Gesamtzahl (n)</i>	<i>n = 197</i>	<i>n = 338</i>	<i>n = 394</i>		
ADRB₂					
rs1042713				0,523	0,335
GG	71 (36,0 %)	138 (40,8 %)	154 (39,1 %)		
GA	90 (45,7 %)	146 (43,2 %)	186 (47,2 %)		
AA	36 (18,3 %)	54 (16,0 %)	54 (13,7 %)		
ADRB₂					
rs1042714				0,559	0,347
CC	79 (40,1 %)	120 (35,5 %)	134 (34,0 %)		
CG	86 (43,7 %)	161 (47,6 %)	190 (48,2 %)		
GG	32 (16,2 %)	57 (16,9 %)	70 (17,8 %)		
ADRB₂					
rs1800888				0,320	0,652
CC	193 (98,0 %)	326 (96,4 %)	388 (98,5 %)		
CT	4 (2,0 %)	12 (3,6 %)	6 (1,5 %)		

3.5 Noradrenalin- und Adrenalin-Sekretion von Immunzellen bei Patienten mit Leberzirrhose

Die Abb. 13 und Abb. 14 zeigen das Verhalten von mononukleären Immunzellen aus Blut und Aszites von 13 Patienten mit Leberzirrhose ohne und mit Stimulation durch die bakteriellen Zellwandbestandteile LPS oder PGN bezüglich der Adrenalin bzw. Noradrenalin Sekretion. In Abb. 13 wird die Sekretion von Adrenalin dargestellt. Die Sekretion von nicht stimulierten PBMC ($p = 0,049$) und stimulierten PBMC mit PGN ($p = 0,028$) ist im Blut signifikant höher als im Aszites. Allerdings lassen sich im Aszites die Immunzellen signifikant mehr m. H. von LPS ($p = 0,043$) stimulieren als im Blut. Diese Aussage stimmt auch für Noradrenalin, allerdings wird hier das Signifikanzniveau nicht erreicht (Vgl. Abb. 14).

Der Unterschied bezüglich der Sekretion zwischen Blut und Aszites ist bei Noradrenalin nicht zu erkennen.

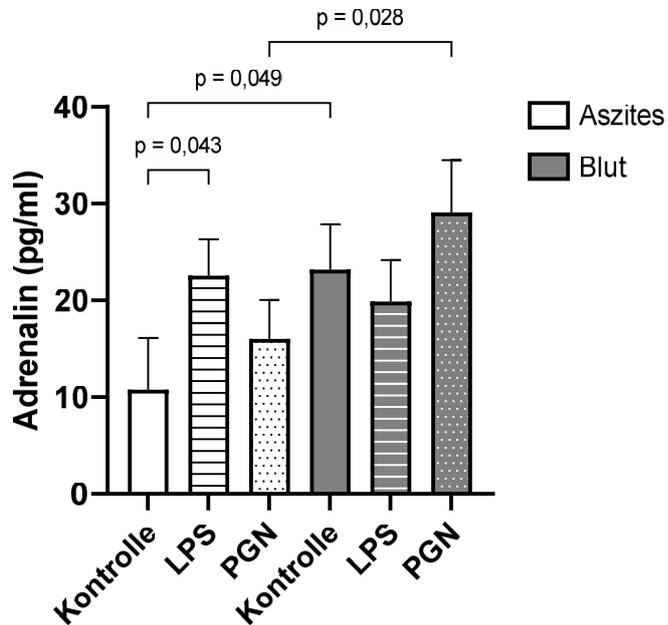


Abb. 13: Sekretion von Adrenalin durch Immunzellen aus Aszites und Blut
 Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; Stimulierte und nicht stimulierte PBMC aus Blut und Aszites von 13 Patienten; Adrenalin-Messung m. H. eines ELISA der Überstände, LPS: 100 ng/ml, PGN: 100 ng/ml

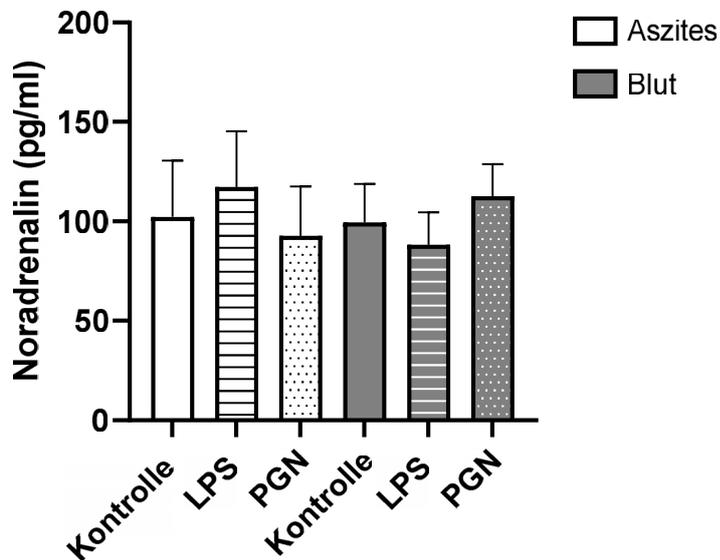


Abb. 14: Sekretion von Noradrenalin von Immunzellen aus Aszites und Blut
 Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; Stimulierte und nicht stimulierte PBMC aus Blut und Aszites von 13 Patienten; Noradrenalin-Messung m. H. eines ELISA aus den Überständen, LPS: 100 ng/ml, PGN: 100 ng/ml

Die Abb. 15 zeigt die Korrelation von der sezernierten Noradrenalin-Menge von PBMC im Blut zum MELD. Je höher die Noradrenalin-Konzentration ist, desto größer ist die Überlebenswahrscheinlichkeit. Dies sieht man auch in Abb. 16, in der die Noradrenalin-Produktion von unstimulierten mononukleären Zellen aus dem Aszites im Zusammenhang zum Überleben dargestellt ist. Patienten mit einer Noradrenalin-Konzentration über 40 pg/ml zeigen einen deutlichen Trend für ein längeres Überleben ($p = 0,054$).

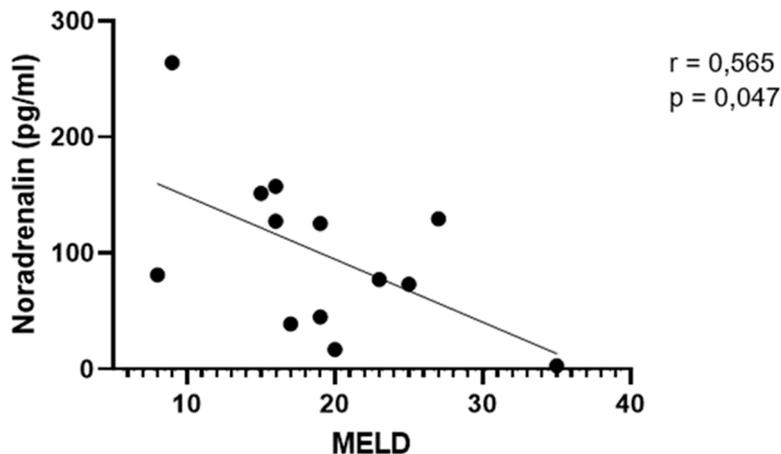


Abb. 15: Korrelation der Noradrenalin-Sekretion und dem MELD-Score
Statistische Analyse mit Spearman-Rho; Noradrenalin-Messung durch ELISA aus dem Überstand der PBMC-Stimulation des Blutes

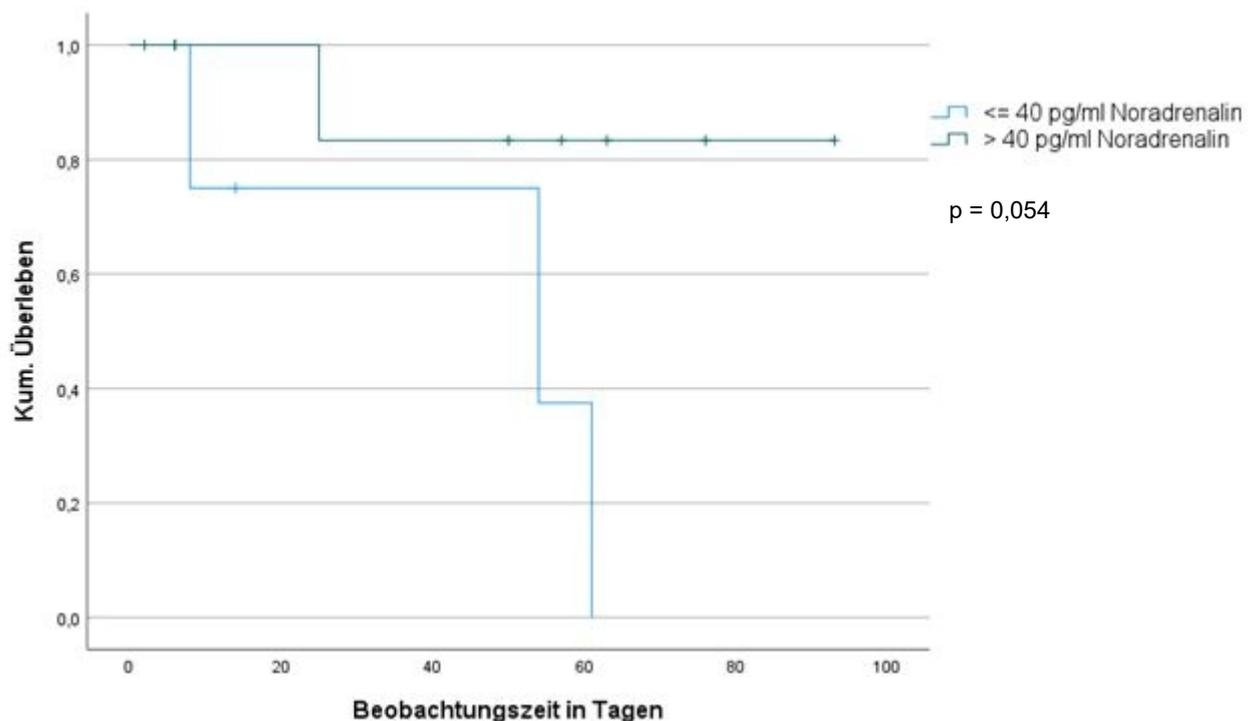


Abb. 16: Überlebenskurven in Abhängigkeit der Noradrenalin-Produktion
Statistische Analyse mit Spearman-Rho; Noradrenalin-Produktion unstimulierter mononukleärer Zellen aus dem Aszites im Zusammenhang zum Überleben (in %)

3.6 Der Einfluss von nicht-selektiven Beta-Blocker auf die Ausschüttung von Zytokinen

In den folgenden Abbildungen wird der Einfluss des Beta-Blocker Propranolol auf die Ausschüttung von Zytokinen durch Immunzellen aus dem Blut und Aszites von Patienten mit Leberzirrhose gezeigt. Beta-Blocker könnten einen Einfluss auf die Sekretion haben. Die meisten Säulenpaare zeigen, dass die Ausschüttung von IFN γ durch die Immunzellen in Anwesenheit von einem Beta-Blocker geringer ausfällt. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Immunzellen nicht, mit LPS oder mit PGN stimuliert wurden (Vgl. Abb. 17). Signifikant wird der Einfluss von Beta-Blockern im Aszites bei der Stimulation durch LPS im Vergleich zu LPS + Beta-Blocker ($p = 0,006$).

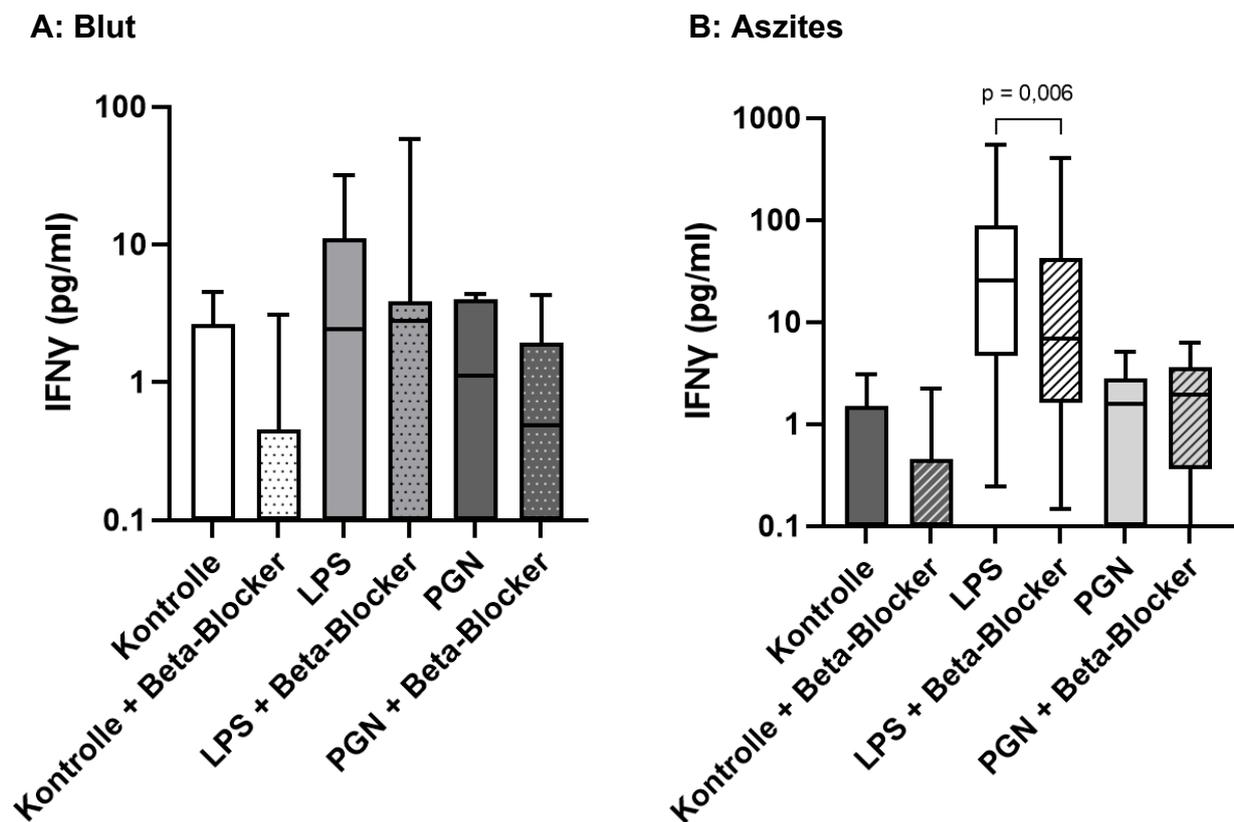


Abb. 17: Beeinflussung der IFN γ -Ausschüttung durch Beta-Blocker im Blut und Aszites
Whiskers 10 – 90 %; Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test;
IFN γ -Werte m. H. der Überstände der Zellstimulation von 10 Patienten mittels ELISA,
Beta-Blocker: 5 μ g/ml Propranolol, LPS: 100 ng/ml, PGN: 100 ng/ml

Die Abb. 18 zeigt den direkten Vergleich der IFN γ -Menge nach Sekretion durch Immunzellen mit und ohne Stimulation von Aszites und Blut. Die unstimulierten Immunzellen reagieren sehr ähnlich, was die Ausschüttung von IFN γ und die Hemmung durch Propranolol betrifft. Ein signifikanter Unterschied ist jedoch bei den stimulierten Immunzellen zu sehen. Die Immunzellen des Aszites haben eine signifikant höhere Ausschüttung an IFN γ nach Stimulation durch LPS ($p = 0,016$). Ein Trend ist bei den stimulierten Immunzellen mit LPS und Propranolol ($p = 0,074$) sowie PGN und Propranolol ($p = 0,078$) zu erkennen.

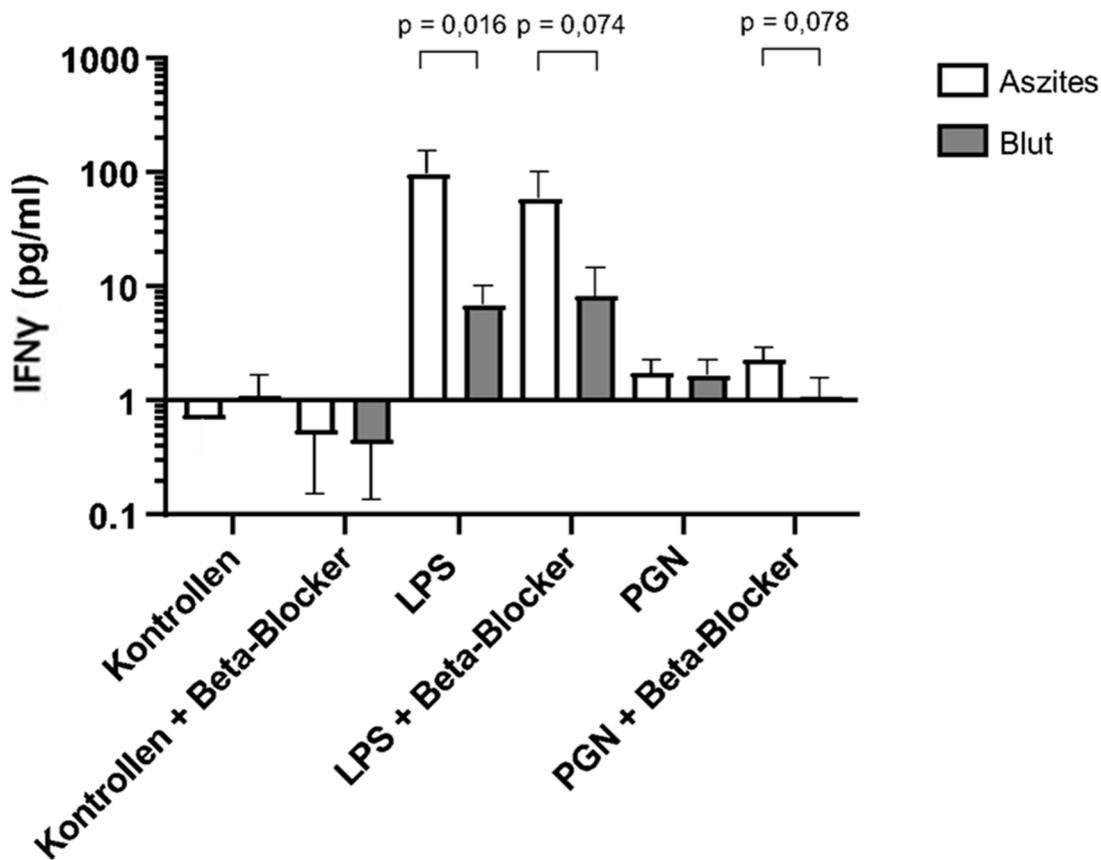


Abb. 18: Vergleich der IFN γ -Ausschüttung von Immunzellen aus Blut und Aszites. Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; IFN γ -Werte m. H. der Überstände der Zellstimulation von 10 Patienten mittels ELISA, Beta-Blocker: 5 μ g/ml Propranolol, LPS: 100 ng/ml, PGN: 100 ng/ml

Bei allen Immunzellen des Blutes und Aszites wird die IL8-Ausschüttung signifikant durch die Stimulation mit Propranolol beeinflusst (siehe Abb. 19). Lediglich im Blut bei den unstimulierten Zellen ist es ein Trend ($p = 0,067$).

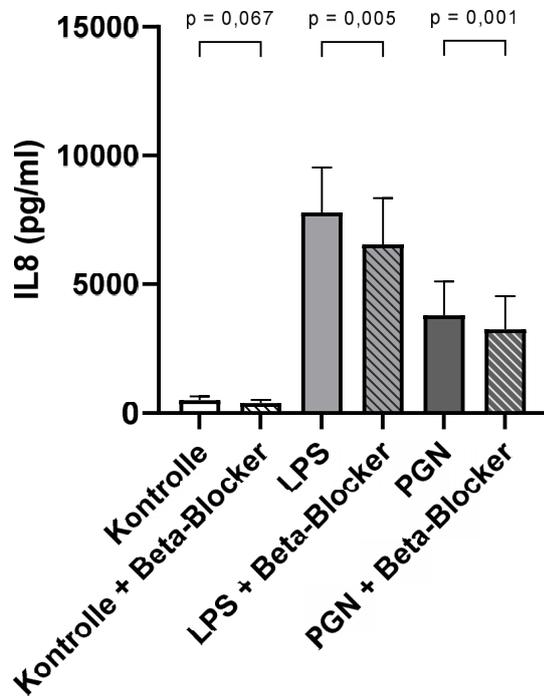
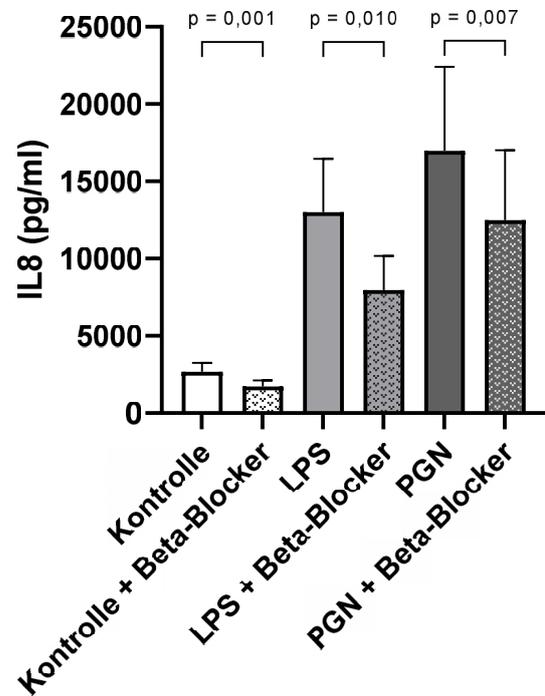
A: Blut**B: Aszites**

Abb. 19: Beeinflussung der IL8-Ausschüttung durch Beta-Blocker in Blut PBMC und Aszites PBMC

Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; IL8-Werte m. H. der Überstände der Zellstimulation von 11 Patienten mittels ELISA, Beta-Blocker: 5 µg/ml Propranolol, LPS: 100 ng/ml, PGN: 100 ng/ml

Vergleicht man in Abb. 20 die IL8-Ausschüttung von Immunzellen im Blut und Aszites miteinander fällt auf, dass im Aszites im Gegensatz zum Blut auch die unstimulierten Immunzellen größere Mengen von IL8 ausschütten ($p = 0,007$). Die mit Propranolol stimulierten Immunzellen erreichen im Vergleich das Signifikanzniveau $p = 0,010$. Generell kann man beobachten, dass die Immunzellen im Aszites deutlich mehr IL8 als im Blut sezernieren. Bei den stimulierten Zellen mit PGN ($p = 0,032$) und bei der Stimulation mit PGN und Propranolol ($p = 0,054$) ist der Unterschied signifikant bzw. ein eindeutiger Trend.

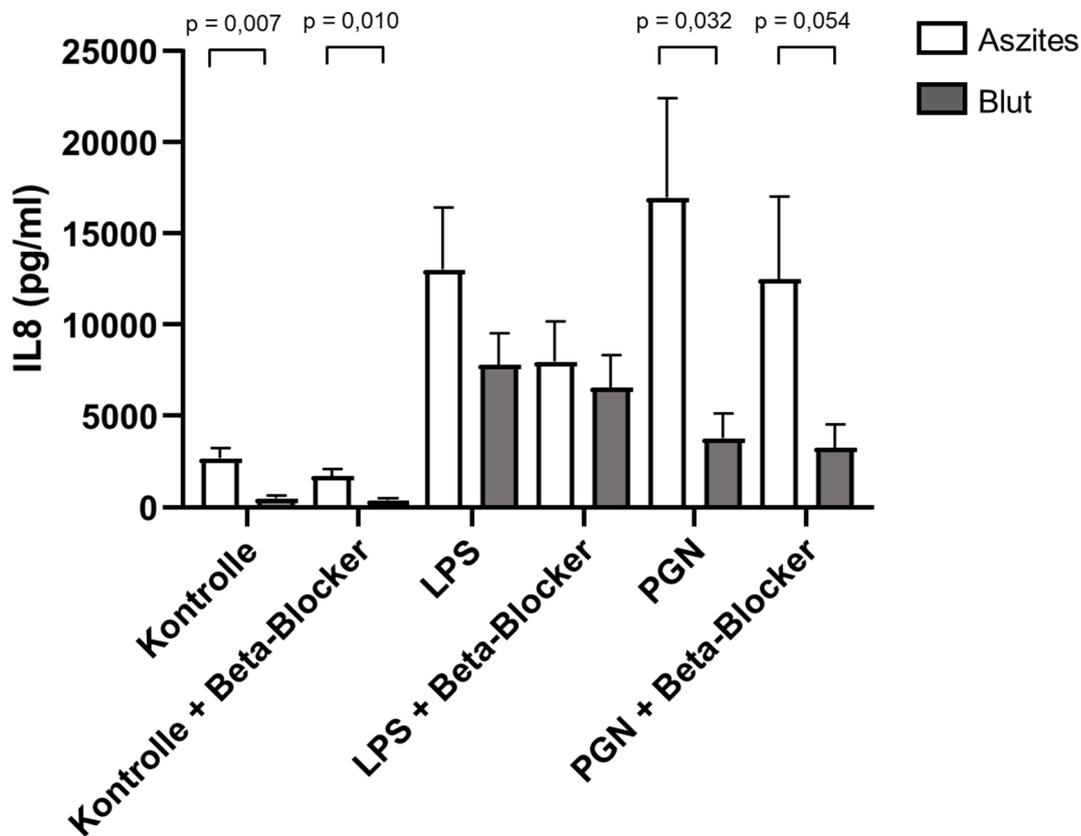


Abb. 20: Vergleich der IL8-Ausschüttung von Immunzellen aus Blut und Aszites
 Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; IL8-Werte m. H. der Überstände der Zellstimulation von 11 Patienten mittels ELISA, Beta-Blocker: 5 µg/ml Propranolol, LPS: 100 ng/ml, PGN: 100 ng/ml

Um für den signifikanten Unterschied der IL8-Sezernierung bei stimulierten Immunzellen durch PGN im Aszites im Vergleich zu Blut eine Erklärung zu finden, wurde die TLR2-Expression, dem Rezeptor für PGN, auf Immunzellen im Blut und Aszites miteinander verglichen. In der Abb. 21 ist zu erkennen, dass die Expression von TLR2 im Aszites signifikant bei den Monozyten/Makrophagen ($p = 0,031$) und den T-Helfer-Zellen ($p = 0,031$) erhöht ist.

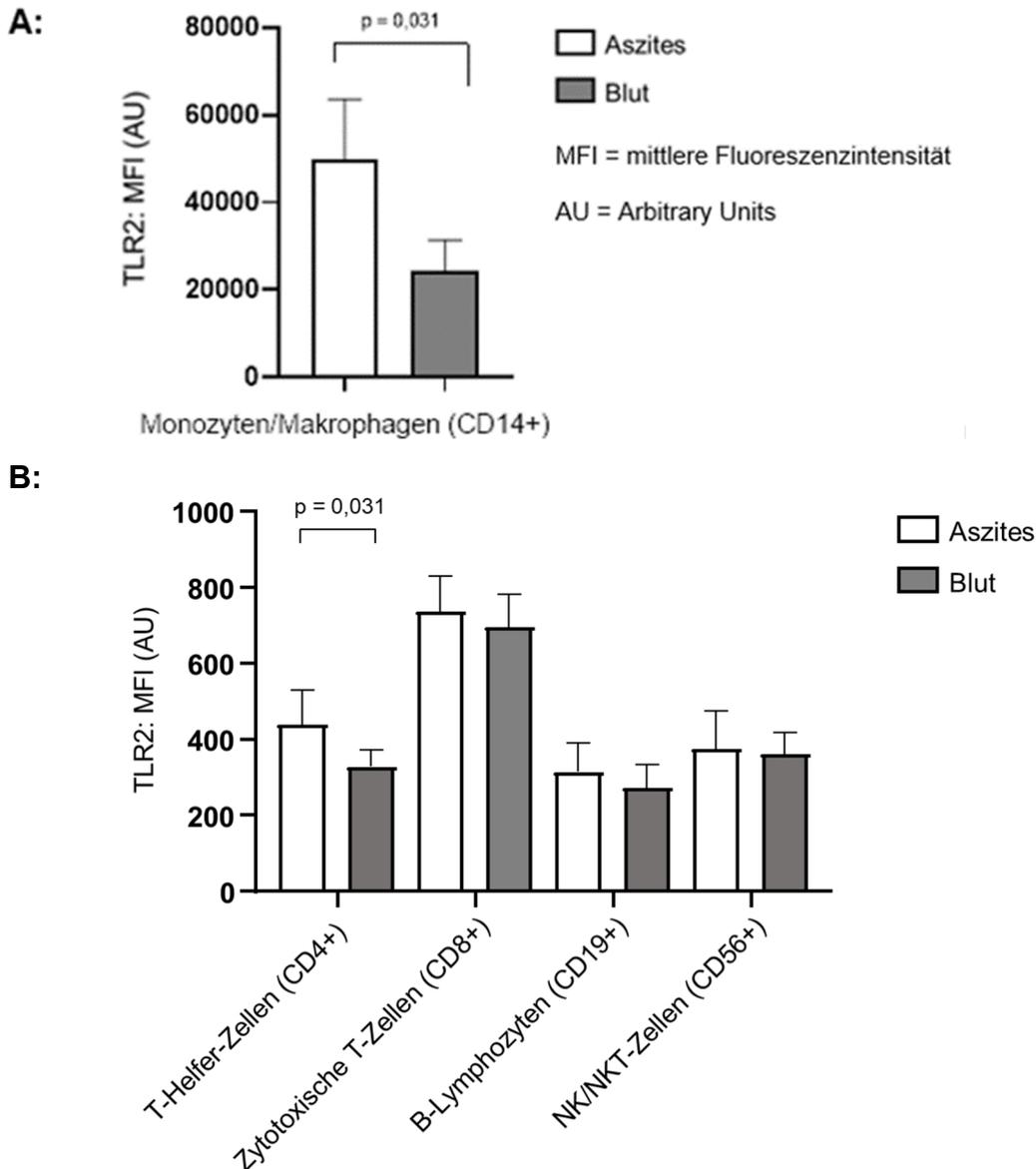


Abb. 21: TLR2-Expression auf den Immunzellen im Blut und Aszites

MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität; TLR2-Werte und Zellpopulationen m. H. der Durchflusszytometrie von mononukleären Zellen von 6 Patienten

Die sezernierte IL8-Menge von Immunzellen des Aszites korrelierte negativ mit dem MELD ($p = 0,048$). Je mehr IL8 von den Immunzellen sezerniert wurde, desto höher war die Überlebenswahrscheinlichkeit in den 90 Tagen nach Studieneinschluss (siehe Abb. 22). Diese Aussage wird durch Abb. 23 A bestätigt, in der ein signifikanter Unterschied ($p = 0,024$) der IL8-Menge bei Überlebenden im Vergleich zu Verstorbenen deutlich wird. Wie zu erwarten, unterschied sich auch der MELD zwischen Patienten, die innerhalb von 90 Tagen verstarben oder überlebten, signifikant ($p = 0,036$) (siehe Abb. 23 B).

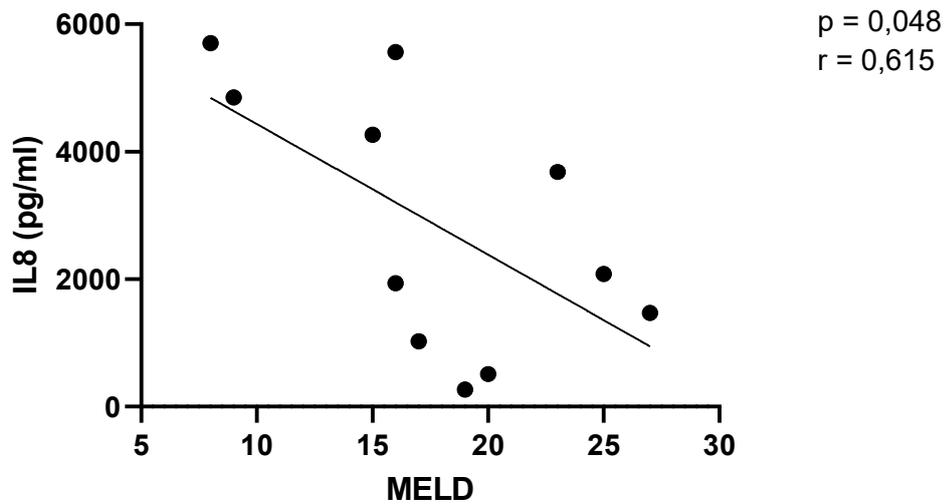


Abb. 22: IL8-Expression von isolierten PBMC aus Aszites nach Pancoll gemessen im Überstand
 Statistische Analyse nach Spearman-Rho; IL8-Messung durch ELISA aus dem Überstand der PBMC-Stimulation des Blutes von 11 Patienten und deren MELD

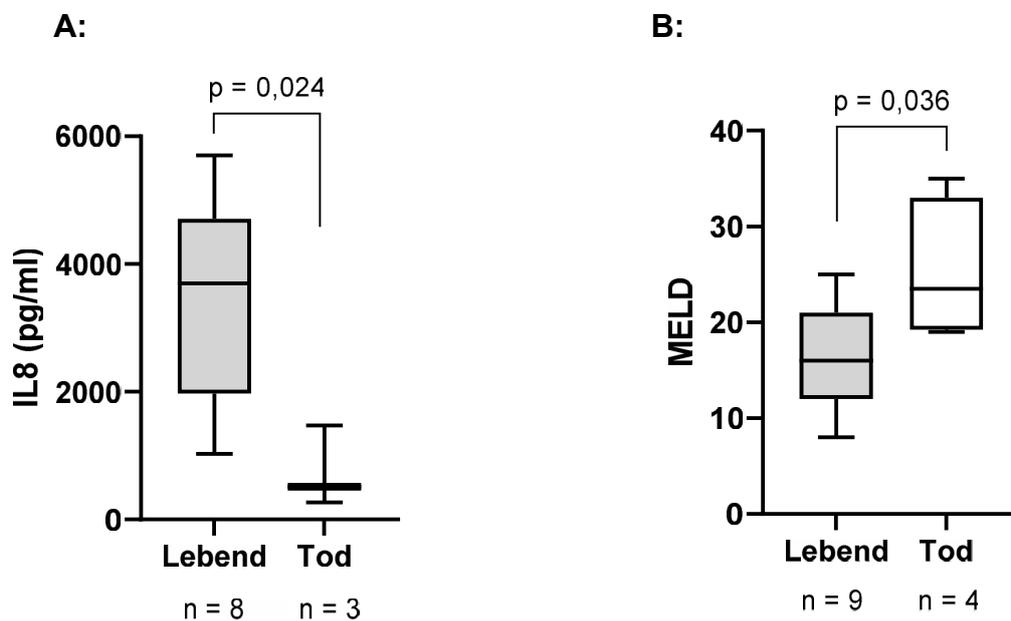
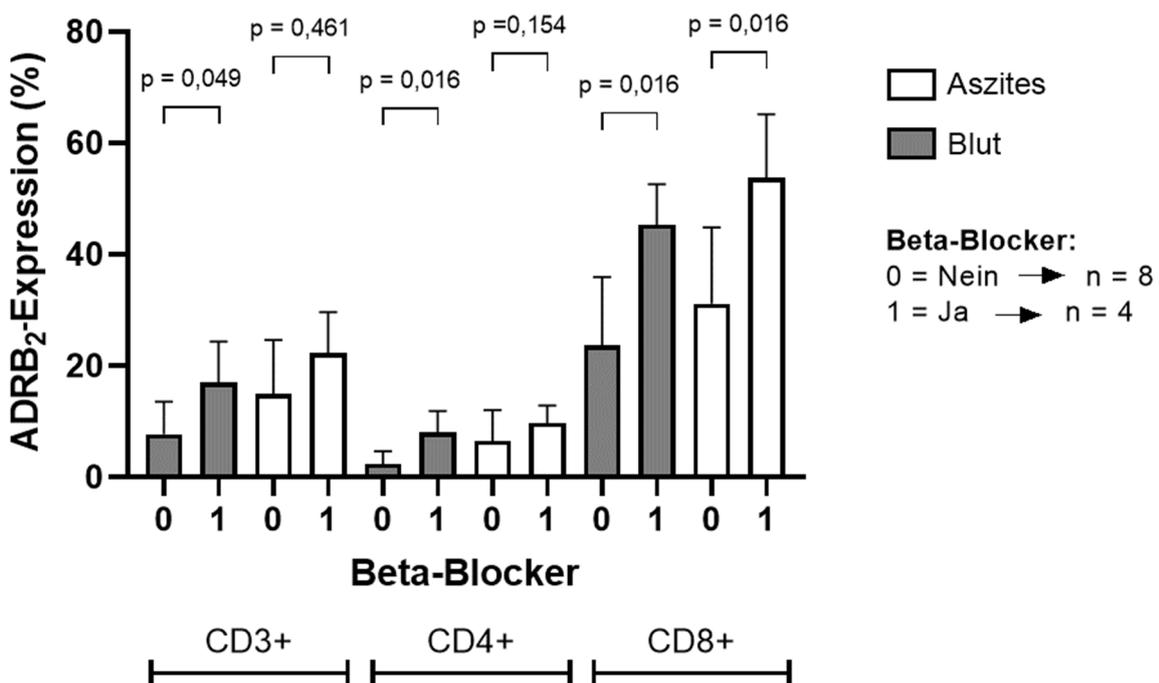


Abb. 23: Zusammenhang zwischen IL8 bzw. MELD und dem Überleben über 90 Tage
 Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; IL8-Messung durch ELISA aus dem Überstand der PBMC-Stimulation des Blutes von Patienten bzw. MELD Werte im Bezug zu dem Überleben

3.7 Der Einfluss von Beta-Blocker auf die Expression von ADRB₂ auf den Immunzellen

Beta-Blocker, die von Patienten mit Leberzirrhose eingenommen werden, haben einen Einfluss auf die Expression von ADRB₂ auf den Immunzellen im Blut und Aszites (Vgl. Abb. 24). Bei Patienten die Beta-Blocker einnehmen, zeigen alle Immunzellen eine erhöhte ADRB₂-Expression. Dabei wird das Signifikanzniveau v. a. bei Immunzellen im Blut erreicht z. B. T-Helfer-Zellen (CD4+) ($p = 0,016$) (siehe Abb. 24 A) und bei Monozyten/Makrophagen (CD14+) ($p = 0,034$) (siehe Abb. 24 B). Das Signifikanzniveau für die Beeinflussung von der ADRB₂-Expression durch Beta-Blocker im Blut und Aszites wird bei den zytotoxischen T-Zellen (CD8+) ($p = 0,016$; $p = 0,016$) sowie bei B-Lymphozyten (CD19+), mit einem Trend im Blut ($p = 0,073$) und einem signifikanten Unterschied im Aszites ($p = 0,016$) erreicht (Vgl. Abb. 24 A und B). Granulozyten (CD11b+) exprimieren signifikant mehr ADRB₂ im Aszites ($p = 0,003$) (siehe Abb. 24 B). In der Abb. 24 C sind die verschiedenen NK/NKT-Zellen (CD56+) und ihre Expressionen abgebildet. Auch hier zeigt sich der Effekt, dass die Expression v. a. im Blut gesteigert wird (CD56⁺: $p = 0,020$; CD56^{High}: $p = 0,018$; CD56^{Low}: $p = 0,011$).

A:



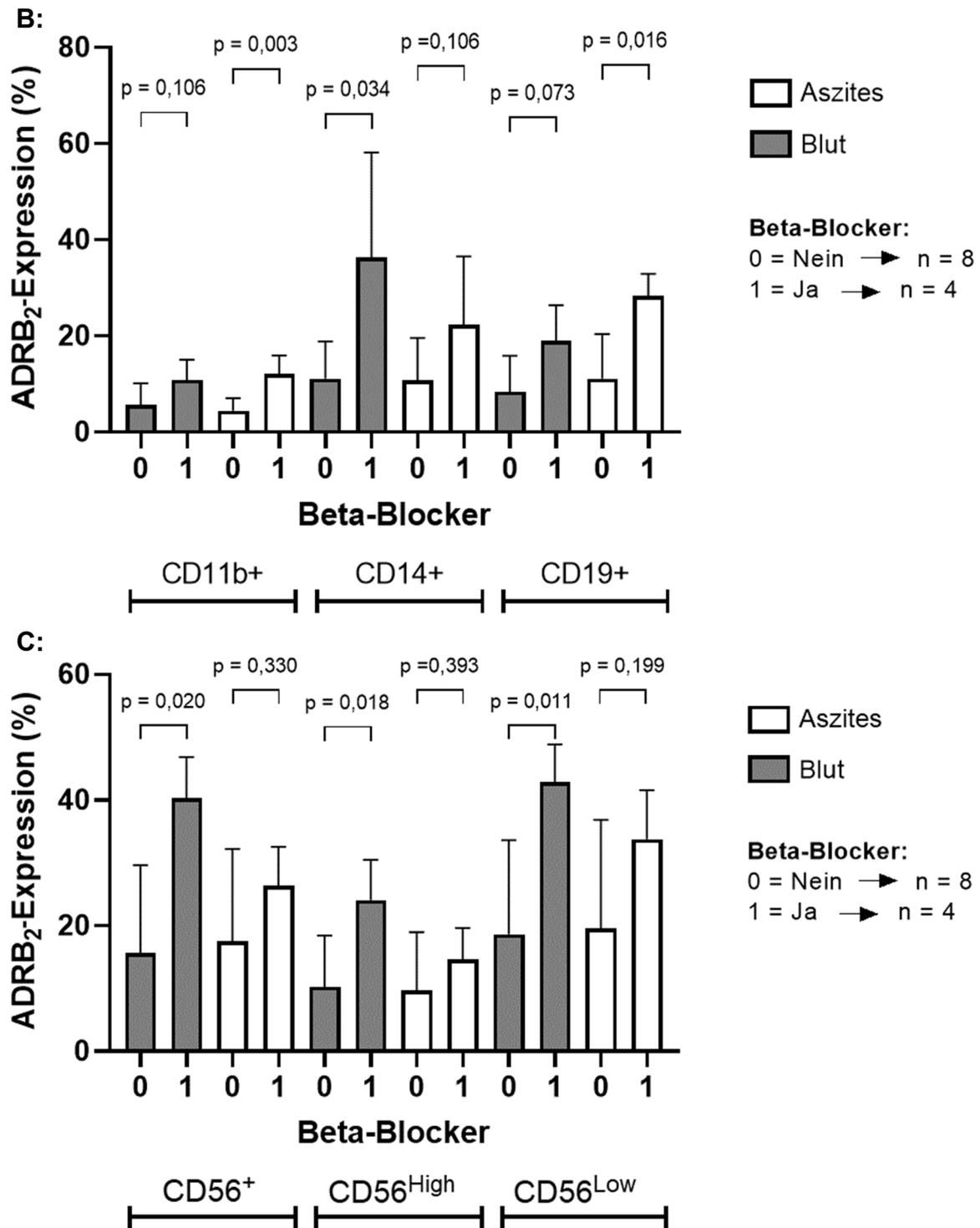


Abb. 24: Der Einfluss von Beta-Blocker auf die ADRB₂-Expression auf den Immunzellen. Statistische Analyse mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test; ADRB₂ Expression der Zellen mittels Durchflusszytometrie bei Zirrhotikern gemessen; T-Lymphozyten (CD3+), T-Helfer Zellen (CD4+), Zytotoxische-T-Zellen (CD8+), Granulozyten (CD11b+), Monozyten/Makrophagen (CD14+), B-Lymphozyten (CD19+), NK-/NKT-Zellen (CD56+), jegliche Art von Beta-Blocker

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klärung der Hypothese, ob Immunzellen im Blut und / oder in der Peritonealhöhle von Patienten mit Leberzirrhose mit Aszites durch Katecholamine in ihrer Funktion beeinflusst werden können und ob Immunzellen durch eigene Katecholamin-Produktion an einer solchen Modulation Teil haben. Im Rahmen dessen soll auch untersucht werden, ob Beta-Blocker auf die Immunzellfunktion in vitro oder genetische Polymorphismen im Beta-2-Adrenozeptor auf die Häufigkeit von Peritonitiden einen Einfluss haben.

4.1 Immunregulation bei Leberzirrhose durch Katecholamine und Zytokine

Die Funktion des Immunsystems ist bei Patienten mit Leberzirrhose deutlich gestört (Wilde und Katsounas, 2019). Wie bereits in der Einleitung erläutert, spielen Katecholamine eine wichtige Rolle bei der Regulation der angeborenen Immunreaktion gegenüber Pathogenen (Godinho-Silva et al., 2019). Eine in vivo Stimulation von Immunzellen wie Makrophagen und lymphatischen Zellen durch bakterielle Bestandteile, die auch bei einer Zirrhose auftreten kann, führt in der Muskulatur des Darms von Mäusen über ADRB₂-Rezeptoren und Noradrenalin zu einem pro-inflammatorischen Zustand (Gabanyi et al., 2016; Moriyama et al., 2018). Auch Untersuchungen zu pathophysiologischen Aspekten der Katecholamine im Zusammenhang von Lebererkrankungen wie hepatozellulären Karzinom, Leberfibrose und der Steatosis Hepatis bekommen zunehmend Beachtung geschenkt (Lelou et al., 2022). Kupffer- und Sternzellen werden z. B. durch Adrenalin und Noradrenalin aktiviert und führen zu einem entzündlichen Milieu in der Leber, das die Entwicklung einer Leberfibrose begünstigt (Bioulac-Sage et al., 1990; Eisenhofer et al., 2002; Mann et al., 1991).

Da es durch Störungen der Immunregulation bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose zu vermehrt auftretenden und potentiell tödlich verlaufenden Infektionen kommt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Katecholamine und inflammatorische Zytokine in den verschiedenen Kompartimenten Blut und Aszites genauer untersucht, um deren Einfluss auf das Immunsystem in den verschiedenen Kompartimenten besser zu charakterisieren.

4.1.1 Inflammatorische Zytokine

Eine weitere Fragestellung war, inwieweit Katecholamine die Sekretion von Zytokine durch mononukleäre Zellen beeinflussen. Dazu wurden mononukleäre Zellen aus den verschiedenen Kompartimenten Blut (entsprechend PBMC) und Aszites sowohl auf die spontane Sezernierung von inflammatorischen Zytokinen untersucht, als auch auf eine Sezernierung, die durch bakterielle Bestandteile (LPS und PGN) stimuliert wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass mononukleäre Zellen sowohl in Blut als auch Aszites spontan oder m. H. eines Stimulus Zytokine wie IL8 und IFN γ sezernieren können (Vgl. Abb. 18, 20). Die klinische Bedeutung der Immunreaktion im Aszites wurde dadurch untermauert, dass die Menge von spontan ex vivo sezerniertem IL8 negativ mit dem MELD korrelierte und umgekehrt passend dazu die Überlebenswahrscheinlichkeit in den 90 Tagen nach Studieneinschluss mit der Menge an sezernierten IL8 durch Immunzellen im Aszites für Zirrhotiker gestiegen ist (siehe Abb. 22 und 23). Auch weitere Ergebnisse legen nahe, dass das Immunsystem in Blut und Aszites funktionelle Unterschiede aufweist:

Die IFN γ -Sekretion im Aszites ist bei Stimulation durch LPS signifikant höher als im Blut (Vgl. Abb. 18). Auch die IL8-Sekretion unterscheidet sich zwischen Blut und Aszites signifikant bei unstimulierten Zellen ($p = 0,007$) sowie durch PGN stimulierte Zellen ($p = 0,032$) (Vgl. Abb. 20). Eine mögliche Erklärung für die deutliche Stimulierbarkeit durch PGN und größere Sezernierungsmenge an IL8 der Zellen im Aszites könnte die Hochregulation von TLR2, dem Rezeptor für PGN, auf den Immunzellen im Aszites sein. Aufgrund dessen wurden die Immunzellen auf die TLR2-Expression untersucht. Dabei konnte tatsächlich eine signifikant höhere Rezeptor-Menge auf den Oberflächen von Monozyten/Makrophagen und T-Helfer-Zellen im Aszites im Vergleich zu Blut gefunden werden (Vgl. Abb. 21). Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig es sein kann, das Immunsystem nicht nur im Kompartiment Blut, sondern z. B. auch in der Peritonealhöhle bei Patienten mit Aszites zu berücksichtigen.

In der Literatur findet man ähnliche Ergebnisse: So sind die proinflammatorischen Zytokine IL8 und TNF α , die u. a. von Makrophagen bzw. natürlichen Killerzellen sezerniert werden können, bei Patienten mit Aszitesinfektion im Aszites erhöht; zusätzlich kann die Produktion und Sekretion nachweislich über T-Zell-Rezeptoren gesteuert werden (Kiyici et al., 2006). In einer prospektiven Studie von Abdel-Razik et al. (2015) wurden die Zyto-

kin-Spiegel in den verschiedenen Kompartimenten bei Patienten mit und ohne SBP miteinander verglichen. Bei Patienten mit SBP war im Vergleich zu Patienten ohne SBP ein signifikanter Anstieg der TNF α und IL6 Spiegel im Serum und im Aszites zu erkennen (TNF- α : Serum 155 ± 19.5 vs. 98 ± 16.5 pg/ml; $p < 0.001$ und Aszites 498 ± 34.5 vs. 242 ± 12.4 pg/ml; $p < 0.001$; IL-6: Serum 132 ± 47.5 vs. 55.5 ± 24.3 ng/ml; $p < 0.001$; Aszites 553 ± 213 vs. 195 ± 62 ng/ml; $p < 0.001$). Zusätzlich war die sezernierte Menge im Aszites deutlich höher als im Serum.

Auch Aszites-NK-Zellen weisen einen besonderen Phänotyp auf und sind an der lokalen Immunabwehr gegen translozierende Bakterien bei SBP und an der Regulation von einer proinflammatorischen Zytokin-Ausschüttung beteiligt und können so zur übermäßigen Immunaktivierung führen (Lutz et al., 2019). Der Einfluss von LPS auf die Zytokin-Produktion von IL8 in den Monozyten wurde u. a. von Röntgen (2005) bestätigt. Die Bedeutung der Regulierung der Zytokine sowie Lymphozyten und Makrophagen findet sich auch im Zusammenhang mit Endometriose. Eine Studie von Krasnyi et al. (2019) zeigt die Bedeutung der Konzentration von Zytokinen in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose. Es wird veranschaulicht, dass eine Entwicklung der Erkrankung im Zusammenhang mit einer unzureichenden entzündlichen und entzündungshemmenden Aktivität der Makrophagen stehen könnte. Die Aktivität von Peritonealmakrophagen und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen kann durch eine erhöhte Produktion von IFN γ stimuliert werden; die Regulierung scheint bei Endometriose beeinträchtigt zu sein, was Veränderungen im Zytokin-Profil verursacht (Sukhikh et al., 2004).

4.1.2 Der Einfluss von Katecholamine auf PBMC

Zur Klärung, ob Immunzellen von Katecholaminen beeinflusst werden können, wurde das Vorhandensein von ADRB₂ als einer der dafür notwendigen Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Immunzellen im Blut und Aszites untersucht. Es konnte in beiden Kompartimenten auf allen untersuchten Zellen des Immunsystems ADRB₂ gefunden werden. Dabei fiel auf, dass die Expression von ADRB₂ im Blut stärker bei Zellen des angeborenen Immunsystems ausgeprägt war und im Gegensatz dazu im Aszites v. a. die Zellen des erworbenen Immunsystems signifikant mehr Rezeptoren für Katecholamine aufwiesen (Vgl. Abb. 9, 10). NK/NKT-Zellen, zytotoxische T-Zellen und Monozyten/Makrophagen wiesen von allen Immunzellen die höchste Expression von ADRB₂ auf ihrer Oberfläche

auf (siehe Abb. 1 - 4, 9, 10). Dagegen ist die mittels FACS gemessene Expression von ADRB² (als Unterschied in der AK-Bindung gegenüber der Kontrolle) bei T-Helfer Zellen oder CD11b⁺ Granulozyten beispielsweise gering (Abb. 1 - 4). Bei The Human Protein Atlas (2023) gibt es eine Übersicht über die ADRB² mRNA-Expression der verschiedenen Zelltypen des Blutes. Hier zeigt sich z. B., dass naive CD4⁺ T-Zellen nur eine marginale ADRB² mRNA-Expression aufweisen, während CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen eine höhere Expression zeigen. Durch diese unterschiedliche Expression auf unterschiedlichen Subtypen kann die Gesamtpopulation weniger positiv erscheinen, obwohl einige Subtypen eine höhere Expression aufweisen. Die ADRB²-Expression schwankt auch von Patient zu Patient. So wurden in der vorliegenden Arbeit z. B. für CD4⁺ T-Zellen des Blutes Werte zwischen < 0,5 % und 12,1 % ADRB² positiver Zellen ermittelt. Eine höhere Schwankungsbreite an biologischen Messwerten zwischen individuellen erkrankten Patienten ist aber ein häufig anzutreffendes Phänomen.

Möglicherweise ist die teils niedrige ADRB²-Expression je nach Zelltyp und bei einzelnen Patienten ein Grund, warum dieser bisher nur wenig Beachtung geschenkt wurde. Eine geringe Expression ist aber nicht mit einer geringen biologischen Relevanz gleichzusetzen. Auch in anderen Studien wurden ADRB₂ auf der Oberfläche von Immunzellen gefunden und zudem deren Bedeutung im Krankheitsverlauf wie beispielsweise bei Brustkrebs und Herzerkrankungen hervorgehoben (Tanner et al., 2021; Wei et al., 2021). Bei Patienten mit chronischen rheumatischen Erkrankungen konnte eine verringerte Menge von ADRB₂ auf PBMC nachgewiesen werden, die negativ mit verschiedenen Parametern der Krankheitsaktivität korrelierte (Wahle et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit ergab sich kein Zusammenhang zwischen der ADRB₂-Expression und klinischen Parametern.

Des Weiteren wurde untersucht, ob Katecholamine durch PBMC produziert und sezerniert werden können. Dazu wurden mononukleäre Immunzellen von Blut und Aszites von Patienten mit Leberzirrhose auf eine Sekretion von Adrenalin und Noradrenalin untersucht. Dabei konnte eine Sekretion von Katecholaminen in beiden Kompartimenten festgestellt werden (siehe Abb. 13, 14). Es ist davon auszugehen, dass die mononukleären Zellen die Katecholamine selber bilden. Für neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen ist gezeigt, dass sie die notwendigen Enzyme inklusive Tyrosin-Hydroxylase, die zur Katecholamin-Synthese benötigt werden besitzen (Barnes et al.,

2015; Bergquist et al., 1994; Flierl et al., 2008, 2007). Katecholamine können auch von Immunzellen aufgenommen werden. Es ist aber nicht bekannt, ob Immunzellen die so aufgenommenen Katecholamine auch wieder sezernieren können (Cosentino et al., 1999; Flierl et al., 2008). Eine Wiederaufnahme spielt allerdings im Rahmen dieser Arbeit vermutlich eine geringe Rolle, da das Kulturmedium, in dem die Zellen resuspendiert wurden, wohl kaum Katecholamine in höherer Menge beinhalten sollte.

Um zu untersuchen, ob bakterielle Infektionen die Katecholamin-Produktion beeinflussen könnten, wurden anschließend die Immunzellen durch die bakteriellen Zellwandbestandteile LPS oder PGN stimuliert. Auch bei diesen Untersuchungen wurden Unterschiede zwischen Blut und Aszites festgestellt. Noradrenalin wurde in beiden Kompartimenten ungefähr gleich produziert und war nicht signifikant durch LPS oder PGN beeinflussbar (Vgl. Abb. 14). Die Sekretion von Adrenalin von unstimulierten und stimulierten PBMC im Blut war bei unstimulierten und PGN-stimulierten Immunzellen signifikant höher als im Aszites. Allerdings ließen sich nur die Immunzellen im Aszites durch LPS signifikant in ihrer Adrenalin-Produktion stimulieren (siehe Abb. 13), sodass als Ergebnis die Fähigkeit von Immunzellen, Katecholamine zu sezernieren wahrscheinlich wird.

Ein möglicher klinischer Zusammenhang fand sich bezüglich Noradrenalin und dem Überleben; je mehr Noradrenalin spontan von den Immunzellen aus dem Aszites produziert wurde, desto höher war die Überlebenschance (siehe Abb. 16). Dementsprechend korrelierte die Noradrenalin-Produktion auch negativ mit dem MELD (Vgl. Abb. 15). Röntgen (2005) untersuchte die Beziehung zwischen Immunsystem und Nervensystem in Bezug auf die proinflammatorische Immunantwort von Monozyten und deren Produktion von proinflammatorischen Interleukinen IL6, IL8 und IFN α , da sie eine besondere Rolle in der Frühphase des Systemic Inflammatory Response Syndrome sowie der Sepsis spielen. Die Zellen wurden wie in unseren Untersuchungen m. H. von LPS stimuliert. Dabei wurde die Zytokin-Expression von Monozyten aus Vollblut von gesunden Probanden m. H. der Durchflusszytometrie gemessen sowie eine Dosis-Wirkungs-Kurve für IL8 und IFN α angefertigt. Zusätzlich wurde der Einfluss von Katecholaminen, die häufig im Rahmen der Intensivtherapie bei einer Sepsis verabreicht werden, im Zusammenhang mit der Zytokin-Produktion von Monozyten untersucht. Röntgen stellte fest, dass es einen hemmenden Einfluss auf die Zytokine durch Noradrenalin bei niedriger LPS-Konzentration im Voll-

blutmodell der Sepsis gibt, davon ausgeschlossen IL8, sodass Noradrenalin sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Monozyten-Funktion bezüglich der Zytokin-Expression haben könnte, die durch die LPS-Konzentration beeinflusst wird. In einer Studie von Kavelaars (1997) wurden menschliche PBMC mittels Pancoll isoliert und im Anschluss kultiviert. Monozyten wurden 18 h mit LPS und verschiedenen Konzentrationen von ADRB₂-Agonisten stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass ADRB₂-Agonisten, die durch LPS und IL-1 β induzierte Produktion von IL8 durch menschliche Monozyten verstärken. Darüber hinaus steigerte die ADRB₂-Aktivierung die Freisetzung von IL8 und die mRNA-Expression für IL8 in der humanen monozytären Zelllinie U937. Die ADRB₂-Aktivierung dieser Zellen führte zusätzlich zu einer erhöhten Produktion des entzündungshemmenden Zytokins IL10, welches nicht an der Regulierung der IL8-Produktion beteiligt ist. Es wird vermutet, dass die IL8-Produktion über eine erhöhte cAMP-Bildung vermittelt wird.

In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von Adrenalin auf die LPS-induzierte IL8-Produktion m. H. von humanen Vollblut untersucht. Adrenalin verursachte einen dosisabhängigen Anstieg der LPS-induzierten IL8-Produktion, der ausschließlich über ADRB-Rezeptoren vermittelt wurde. Auch die Erhöhung der zellulären zyklischen cAMP-Konzentration, verstärkte die LPS-induzierte IL8-Produktion. Die Adrenalin-induzierte Hochregulierung der IL10-Produktion verdeckte eine noch ausgeprägtere stimulierende Wirkung dieses Hormons auf die IL8-Synthese (van der Poll und Lowry, 1997). Dieses Zusammenspiel zwischen ADRB₂-Agonisten und der IL8-Expression könnte ein Indiz für die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse darstellen, dass Noradrenalin und IL8 beide mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Leberzirrhose einhergehen (siehe auch Abb. 15/16, 22/23). So kann die Steigerung der IL8-Produktion ein Weg der ADRB₂-Agonisten wie Katecholamine sein, um Entzündungsreaktionen zu beeinflussen.

In einer Übersichtsarbeit von Benschop et al. (1996) wird beschrieben, dass Katecholamine die Zirkulation von NK-Zellen und Granulozyten beeinflussen. Die Veränderung der Lymphozyten-Zirkulation scheinen v. a. durch die Aktivierung von ADRB₂ vermittelt zu werden. Bei der Krankheitsentwicklung einer Autoimmun-Enzephalomyelitis spielen Noradrenalin und die ADRB₂-Signalübertragung in Immunzellen eine entscheidende Rolle (Araujo et al., 2019). Zur Frage, inwieweit Katecholamine bei Patienten mit Leberzirrhose zur Rekrutierung von Immunzellen in das Blut oder in den Aszites beitragen, kann unsere

Arbeit keine Aussage treffen. Alles zusammen zeigt den großen Einfluss von Katecholaminen auf verschiedene Krankheitsverläufe und deren Bedeutung für die weitere Forschung.

4.2 Einfluss von Beta-Blocker auf die Immunregulation

4.2.1 Einfluss von Propranolol auf die ADRB₂-Expression ex vivo

Es wurde der Einfluss des unselektiven Beta-Blockers Propranolol auf die ADRB₂-Expression ex vivo und auf die Zytokin-Sekretion von Immunzellen in vitro untersucht. Dabei wurde die ADRB₂-Expression auf den Immunzellen im Blut und Aszites von Patienten mit Zirrhose mit und ohne Beta-Blocker Einnahme gemessen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine Beta-Blocker Einnahme mit einer numerisch erhöhten ADRB₂-Expression in beiden Kompartimenten auf verschiedenen Immunzellen assoziiert war (siehe Abb. 24). Ein auch statistisch signifikanter Unterschied war bei den zytotoxischen T-Zellen, im Blut bei Monozyten/Makrophagen, T-Helfer-Zellen und NK/NKT-Zellen sowie im Aszites bei B-Lymphozyten zu finden (Vgl. Abb. 24).

In der Literatur finden sich lediglich andere Studienansätze die m. H. von Mäusen arbeiten und dementsprechend nur indirekt mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit verglichen werden können. Die Studie von Tsai et al. (2020) beschäftigte sich beispielsweise mit der Rolle der erhöhten Anzahl von ADRB in der Milz bei Zirrhosepatienten mit portaler Hypertension, die häufig im Zusammenhang mit einer bakteriellen Translokation, Immundysfunktion und Splenomegalie zu finden ist. Es wurde bei Mäusen, die anschließend in verschiedene Gruppen unterteilt wurden in vivo eine Zirrhose induziert, um Auswirkungen und Mechanismen einer Beta-Blocker-Therapie zu untersuchen. Dabei wurde sowohl das Serum der Mäuse auf Zytokine untersucht, als auch das Milzgewebe in vitro. Bei zirrhatischen Mäusen konnte eine signifikant erhöhte Menge an Zytokinen (INF γ , TNF α und IL35) sowie eine verringerte Menge an IL10 im Serum festgestellt werden, die durch chronische Propranolol-Behandlung umgekehrt wurden. Die Werte zeigten einen ähnlichen Trend im Milzgewebe. Auch die erhöhte ADRB₂-Expression in der Milz bei den an Zirrhose erkrankten Mäusen konnte durch Einnahme von Beta-Blocker reduziert sowie die T-Lymphozyten-Funktion normalisiert werden.

In einer weiteren Untersuchung konnte nach Gabe von Propranolol auf Leberzellen eine verringerte Expression von ADRB₂ festgestellt werden (Wang et al., 2018). Diese Untersuchungen fanden in vitro m. H. von Leberkrebszellen (HepG2 und HepG2.2.15) sowie mit gesunden menschlichen Leberzellen (HL-7702) statt. Die Proliferation sowie der Einfluss von Propranolol wurde durch Western Blotting, Durchflusszytometrie und quantitativer PCR untersucht. Meines Wissens gibt es keine vergleichbaren Daten zur ADRB₂-Expression auf Blut- und Aszites-Immunzellen von Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose, was den Vergleich zur Literatur erschwert.

Insgesamt ist der Einfluss der Einnahme von Beta-Blocker auf die ADRB₂-Expression auf Immunzellen noch wenig untersucht. Eine kompensatorische Hochregulation der Rezeptoren unter Beta-Blocker-Therapie, wie durch die vorliegenden Daten nahegelegt, erscheint plausibel. Die erhöhte Expression unter Beta-Blocker-Therapie auf mehreren Immunzellen in verschiedenen Komponenten ist ein weiterer Hinweis auf die pathophysiologische Relevanz des Katecholamin-Systems für die zelluläre Immunfunktion von Patienten mit Leberzirrhose.

4.2.2 Einfluss von Propranolol auf die Zytokin-Sekretion in vitro

Nicht nur die Ergebnisse der weiter oben genannten Studien, sondern auch die hier erhobenen Daten legen nahe, dass Beta-Blocker einen Einfluss auf die Zytokin-Sekretion von Immunzellen aus Blut und im Aszites bei Patienten mit Leberzirrhose haben. Bezüglich der IFN γ -Sekretion zeigte sich bei mononukleären Zellen aus dem Aszites eine signifikant niedrigere Sekretion nach Stimulation mit LPS unter Propranolol-Gabe. Bei unseren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass IFN γ deutlich weniger von PBMC ausgeschüttet wurde, wenn sie durch Propranolol in vitro beeinflusst wurden. Dabei spielt weder das Kompartiment eine Rolle, noch ob die Immunzellen unstimuliert oder durch LPS oder PGN stimuliert wurden (siehe Abb. 17). Diese Beobachtung traf in deutlich ausgeprägterem Maße auf die IL8-Ausschüttung von mononukleären Zellen aus Blut und Aszites zu; sowohl nach Stimulation mit PGN als auch mit LPS konnte unter Propranolol eine signifikant niedrigere Sekretion gemessen werden (Vgl. Abb. 19).

Die Beobachtung, dass die Sekretion von Zytokine durch Beta-Blocker beeinflusst werden, findet man auch in der Literatur wieder. So konnte bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz festgestellt werden, dass Patienten, die Beta-Blocker bzw. Beta-Blocker

und ACE-Hemmer einnahmen die Noradrenalin-Menge reduziert war und die Produktion an IL6 und TNF α signifikant niedriger ausfiel. Diese Ergebnisse konnte Gage et al. (2004) durch die Untersuchung der Zytokin-Ausschüttung durch PBMC nach Stimulation *in vitro* erlangen. Bei Studien bezüglich der Melanombildung ergab sich, dass Melanomzellen ADRB-Rezeptoren besitzen, die beim Binden von Noradrenalin zu einer verstärkten Bildung von IL8 und IL6 führten, wodurch es zu einer gesteigerten Angiogenese und Metastasierung kam. Dies stagnierte bei Zelllinien, die mit Propranolol behandelt wurden. Patienten, die vor der Melanom-Diagnose bereits eine Beta-Blocker-Therapie erhalten haben, hatten im Vgl. eine reduzierte Melanom- sowie Gesamtsterblichkeitsrate (Hanssen, 2011; Lemeshow et al., 2011; Yang et al., 2009).

Gage et al. (2004) und Gimenez et al. (2018) untersuchten die Einnahme von Beta-Blocker im Zusammenhang bei Patienten mit Leberzirrhose, während einer Dekompensationsphase mit Aszites. Es wurden Blutproben nach 30-minütiger Rückenlage in ruhiger Atmosphäre entnommen. Die Proben wurden auf bakterielle DNA untersucht, deren Vorhandensein sich zwischen Patienten mit und ohne Beta-Blocker-Einnahme nicht unterschied. Bei Patienten mit Beta-Blocker-Einnahme lag eine generell erhöhte basale Entzündungsaktivität vor. Dies äußerte sich in einer erhöhten phagozytischen Aktivität und höheren unstimulierten Produktion von Serum-Zytokine in Gegenwart von bakterieller DNA.

Bei Patienten, die keine Beta-Blocker einnahmen, konnte festgestellt werden, dass bei Vorhandensein bakterieller DNA ein signifikant höherer Serumspiegel von IL6, IL10 und IFN γ vorlag. Bei Patienten mit Beta-Blocker war dieser Zusammenhang beim Vorhandensein bakterieller DNA nicht nachweisbar. Somit legen diese Daten passend zu unseren Ergebnissen nahe, dass Beta-Blocker die Zytokin-Reaktion auf inflammatorische Stimuli abmildern.

Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 zitiert, konnten auch Kavelaars (1997), Röntgen (2005) sowie van der Poll und Lowry (1997) eine Beeinflussung von ADRB₂-Agonisten auf Zytokine in Verbindung mit LPS feststellen. Passend zu den schon publizierten Daten aus Gimenez et al. (2018) und Tsai et al. (2020) zeigt die vorliegende Arbeit, dass zumindest *in vitro* durch die Zugabe des unselektiven Beta-Blockers Propranolol die Sekretion von IL8 und IFN γ durch mononukleäre Zellen aus Aszites und Blut von Patienten mit dekompensierter

Leberzirrhose beeinflusst wird und somit auch nahelegt, dass von Immunzellen produzierte Katecholamine einen Einfluss auf die Zytokinproduktion von Immunzellen haben.

4.3 Klinische Bedeutung der unterschiedlichen ADRB₂-Genotypen

Durch die schon diskutierten Versuche wurde verdeutlicht, dass Katecholamine das Immunsystem bei Zirrhotikern beeinflussen. Im Folgenden wurde die klinische Bedeutung m. H. der Genotypen-Analyse in Bezug auf SBP untersucht. Dabei konnte kein Unterschied in der Verteilung der Genotypen zwischen Patienten mit und ohne SBP gefunden werden (siehe Tab. 11), sodass bisher keine Daten erhoben wurden, die eine Auswirkung der Katecholamine bei der Regulation des Immunsystems in Bezug auf klinische Endpunkte bei Patienten mit Leberzirrhose untermauern. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass genetische Variationen im ADRB₂-Rezeptor eine relevante Rolle spielen. Noch unbekannte Einflussfaktoren oder Regulationsmechanismen könnten eine entscheidende Rolle gespielt haben, wodurch der Zusammenhang mit den Genotypen in der Kohorte verschleiert wurde und so der Effekt der Polymorphismen überspielt werden konnte.

Bei der Untersuchung der ADRB₂-Expression auf der Oberfläche der verschiedenen Immunzellen konnte eine unterschiedliche Ausprägung bei den verschiedenen Genotypen des rs1042713 gefunden werden, sodass eine gewisse klinische Auswirkung denkbar wäre (siehe Abb. 11 und 12). Einen Beweis, dass der Einfluss von Katecholamine auf die Immunfunktion eine bedeutende klinische Auswirkung bei Patienten mit Zirrhose hat, konnten wir nicht finden. Allerdings spricht die Tatsache, dass IL8 deutlich mit dem MELD und dem Überleben korreliert (Vgl. Abb. 22 und 23) und die IL8-Sekretion gleichzeitig durch die Beta-Blocker-Gabe beeinflussbar war dafür (siehe Abb. 19), dass eine klinische Bedeutung möglich ist. Durch die geringe Patientenanzahl (n = 13) ist die Pilot-Studie nicht dafür geeignet, Hypothesen auszuschließen.

In der Literatur gibt es keine vergleichbaren Untersuchungen im Bezug der untersuchten ADRB₂-Polymorphismen und Lebererkrankungen oder derer Komplikationen. Allerdings sind verschiedene Auswirkungen der drei Polymorphismen auf die Wirkung von Katecholaminen und der Bedeutung von ADRB₂ beschrieben, die bereits in der Einleitung beispielhaft wiedergegeben wurden. So kann bei dem Polymorphismus Arg16Gly (rs1042713) passend zu unseren Daten eine Herabregulierung der ADRB₂-Expression

(Small et al., 2003) sowie die Beeinflussung des Herzkreislaufsystems durch eine stärkere ADRB₂-vermittelte Vasodilatation durch zirkulierende Katecholamine festgestellt werden, die sich auf die Herzfrequenz, das Herzzeitvolumen, auf eine erhöhte Hyperaktivität der Atemwege sowie einer größeren Anfälligkeit für eine stressbedingte Erhöhung der viszeralen und somatischen sensorischen Funktionen auswirken kann (Cockcroft et al., 2000; Eisenach et al., 2004; Eisenach und Wittwer, 2010; Kushnir et al., 2013). Der Gln27Glu (rs1042714) Polymorphismus ist bisher nicht als Modulator der ADRB₂-Expression beschrieben (Small et al., 2003), spielt aber eine Rolle bei Adipositas und der Agonisten-vermittelten Reaktionsfähigkeit im Bezug des Herzkreislaufsystems (Cockcroft et al., 2000; Corbalán et al., 2002; Hellström et al., 1999).

Die Thr164Ile (rs1800888) Variante scheint homozygot-mutiert nicht überlebensfähig, da bisher nur heterozygote Träger gefunden wurden. Die Bindungsaffinität für Adrenalin und Noradrenalin ist verringert (Green et al., 1993). Des Weiteren zeigen heterozygote Trägerinnen einen signifikant erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruck sowie ein erhöhtes Risiko, an ischämischen Herzerkrankungen zu erkranken (Thomsen et al., 2012). Einen weiteren Einfluss scheint der Thr164Ile-Polymorphismus bei Meningokokkensepsis zu haben, was in einer Studie von Schoiswohl (2022) untersucht wurde. Die Untersuchungen fanden m. H. von 424 genotypisierten DNA-Proben und den dazu gehörenden klinischen Daten von Kindern mit einer Meningokokkeninfektion sowie einer Kontrollgruppe (500 gesunde Neugeborene) statt. Dabei konnte festgestellt werden, dass heterozygote Träger des Thr164Ile-Polymorphismus ein 3,4-fach erhöhtes Risiko haben, an Meningokokken zu erkranken ($p = 0,011$). Auch das Risiko eines letalen Verlaufes war im Vergleich zum Wildtyp um das 3,6-fache erhöht ($p = 0,043$). Die erhöhte Letalität durch eine Meningokokkenenerkrankung wurden durch die funktionellen Auswirkungen des Polymorphismus erklärt. Er führt beispielsweise zu einer verminderten Venodilatation und Herzfrequenz sowie einer geringeren inotropen Antwort auf Terbutalin. Aufgrund der geringeren Dichte an ADRB₂-Rezeptoren am Myokard könnten die Auswirkungen des Polymorphismus ein entscheidender Faktor für die verminderte Überlebenswahrscheinlichkeit bei einer Infektion sein.

4.4 Spezifität und Sensitivität der Messmethoden

4.4.1 FACS

Die Durchflusszytometrie hat sich zu einem fest etablierten molekularbiologischen und klinisch diagnostischen Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität entwickelt. Ein wesentlicher Störfaktor kann unspezifische Bindung der AK darstellen. Da Zelltod z. B. nach Einfrieren mit zu unspezifischer AK-Bindung führen kann, wurden lediglich frische Zellen für die Durchflusszytometrie verwendet.

Um Störsignale durch die hohe Autofluoreszenz der Erythrozyten zu reduzieren, wurden die Erythrozyten lysiert. Zudem wurden in einem weiteren Schritt nicht gebundene AK durch gründliches Waschen der AK gefärbten Proben minimiert und so weitere Hintergrundsignale reduziert. Entscheidend ist das spezifische Binden der AK an die erwünschte Struktur. Deshalb wurden nur kommerziell erwerbliche AK von namenhaften Herstellern verwendet. Die Validität der Messung der Expression von Beta-Rezeptoren wurde dadurch untermauert, dass diese Rezeptoren in funktionellen Untersuchungen geblockt werden konnten und dass die Höhe der Expression mit der Einnahme von Beta-Blockern und Genotyp korrelierte. Durch den Einsatz einer zweiten Methode, z. B. eine mRNA-Analyse von ADRB²-Expression auf einzelnen Zellpopulationen, hätte eine noch höhere Sensitivität und Spezifität erreicht werden können. Dazu hätten wir allerdings unrealistisch große Zellmengen benötigt, um die Subpopulationen aufzureinigen und dann die mRNA-Expression bestimmen zu können.

4.4.2 PCR zur Genotypisierung mit LightCycler-Sonden

Zur Identifizierung der untersuchten Mutationen benötigt man eine hoch spezifisch und empfindliche Nachweismethode. In dieser Hinsicht hat die PCR mit LightCycler-Sonden die erforderliche analytische Leistung für viele molekulare Analysen bereits erbracht. Durch sequenzspezifische Primer konnten die zu untersuchenden DNA-Fragmente in der PCR sicher vervielfältigt werden. Die Schmelzkurvenanalyse die mit Echtzeit-PCR und spezifisch für die zu untersuchenden Polymorphismen hergestellten LightCycler-Sonden ermöglicht wurde, ist aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität eine hervorragend geeignete Untersuchungsmethode. Unerwartete PCR-Produkte z. B. durch das Vorliegen nicht bekannter Mutationen, fallen durch eine Veränderung der Schmelztemperatur auf. Ein weiterer Vorteil des Light-SNiP Verfahrens ist die Reproduzierbarkeit, die Einfachheit

der Technik und der korrekte Nachweis der Genotypen (Matsuda, 2017; TIB MOLBIOL, 2022).

4.4.3 ELISA

Zur Untersuchung, ob mononukleäre Zellen die Zytokine IL8, IFN γ oder Adrenalin bzw. Noradrenalin sezernieren, wurden ELISA durchgeführt. Der ELISA für IL8 hat laut Hersteller eine hohe Spezifität, da keine Kreuzreaktivität bei Analysen von mehreren rekombinanten Proteinen von Mensch, Maus und Ratte beobachtet werden konnte. Der Standard Range liegt bei 15,6 - 1,000 pg/ml. Für den IFN γ -ELISA liegt diese bei 12,5 pg/ml - 400 pg/ml mit einer Sensitivität von 5 pg/ml. Adrenalin bzw. Noradrenalin können laut Herstellerangaben mittels dem von uns verwandten ELISA bis zu einer Nachweisgrenze von 0,9 ng/ml in Urin, 10 pg/ml in Plasma bzw. 1,7 ng/ml in Urin, 36 pg/ml in Plasma detektiert werden. Mögliche Kreuzreaktionen liegen unter 0,2 %, sodass eine hohe Spezifität vorliegt. Vorteile des ELISA's ist die Objektivität und der geringe Zeitaufwand im Vergleich zur indirekten Immunfluoreszenz. Der Immunoblot gilt häufig noch als Goldstandard und wird häufig nach positiven ELISA als Bestätigungstest durchgeführt. Ein Nachteil ist allerdings, dass die durchführende Person Erfahrung benötigt und der Test deutlich zeitaufwendiger ist. Laut Studien (de Almeida Brito et al., 2016) ist die Spezifität von ELISA Test-Kits erheblich von der Qualität des gewählten AK abhängig, sodass auch hier nur Tests von namenhaften Firmen verwendet wurden. Die Sekretion von Katecholaminen durch Immunzellen ist schon mehrfach in hochrangigen Zeitschriften publiziert worden (Barnes et al., 2015; Flierl et al., 2008, 2007).

4.5 Einschränkungen der Untersuchungen und Ausblick

Insgesamt wurde für den möglichen Einfluss der Polymorphismen eine bestehende Kohorte von 535 Patienten mit Leberzirrhose und Aszites und eine gesunde Kontrollkohorte von 394 Probanden untersucht, was als eine ausreichende Patientengruppe angesehen werden kann, um klinisch relevante Effekte zu finden. Die neu gesammelte Kohorte von 13 Patienten, mit deren Hilfe die weiteren Versuche durchgeführt wurden, ist relativ klein. Für neue Untersuchungen in der Zukunft sollte eine größere Kohorte untersucht werden, um eindeutigere klinische Ergebnisse beispielsweise im Bezug zu der Beeinflussung des

Krankheitsverlaufes durch die Einnahme von Beta-Blockern oder die Rolle von Noradrenalin im Bezug zum Überleben sichern zu können. Es konnten aber erste interessante Erkenntnisse mit dieser Kohorte gesammelt werden, wie das Vorhandensein und die Verteilung von ADRB₂ auf den verschiedenen Immunzellen im Blut und Aszites sowie die Zytokin-Sekretion und deren Beeinflussung durch Katecholamine und Beta-Blocker. Weiterhin konnte in Abhängigkeit von dem Genotyp und der Beta-Blocker-Einnahme unterschiedliche ADRB₂-Expressionsstärken gefunden werden. Insgesamt sind Studien wie die hier beschriebene mit phänotypischer und funktioneller Untersuchung von Immunzellen aus gepaarten Blut- und Aszitesproben von Patienten mit Leberzirrhose selten.

Bezüglich der Katecholamin-Sekretion von Immunzellen haben wir nur zu einem Zeitpunkt gemessen. Es ist gut möglich, dass Werte zu anderen Zeitpunkten anders, vielleicht auch wesentlich deutlicher, ausfallen würden. Allerdings zeigen die Untersuchungen auch so, dass Immunzellen bei Patienten mit Leberzirrhose Katecholamine sezernieren können.

Bezüglich der Untersuchung des Einflusses der Polymorphismen auf das Auftreten einer SBP wäre eine andere Form der Untersuchung genauer. Bei den verwendeten Daten handelt es sich u. a. um retrospektive Daten von Patienten, die früher bereits an einer SBP erkrankt sind sowie zusätzlich von prospektiv gesammelten Daten. Durch die retrospektiv gesammelten Patientendaten kann nicht sichergestellt werden, unter welchen Bedingungen die spontane bakterielle Peritonitis aufgetreten ist und ob die Diagnosestellung in allen Fällen korrekt war. Eine Verwendung von rein prospektiven Daten wäre optimaler. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise die Beobachtung einer Patientenkohorte über fünf Jahre, deren Patienten zu Beginn an Leberzirrhose erkrankt sind und zu ermitteln, wie viele von diesen Patienten in dem Zeitraum eine SBP erleiden. Da zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutigen Ergebnisse zur Beeinflussung der untersuchten Polymorphismen sowie von Beta-Blocker auf den Verlauf der Leberzirrhose bezüglich des Auftretens einer SBP bestehen, aber Katecholamine aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit einen wichtigen modulierenden Einfluss auf die Funktion des Immunsystems haben könnten, sollte in diese Richtung weiter geforscht werden. Interessant wäre die Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Beta-Blocker, da in dieser Arbeit lediglich die Wirkung von Propranolol untersucht wurde. Eventuell wirken selektive bzw. nicht-selektive Beta-Blocker unterschiedlich auf die Immunfunktion und den Verlauf der Lebererkrankung. Zusätzlich wäre der

Einsatz der verschiedenen Beta-Blocker zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Erkrankung untersuchenswert, um die Wirkung besser zu charakterisieren. In einer prospektiv-klinischen interventionellen Studie könnte man Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose in zwei Gruppen aufteilen, eine Gruppe mit und eine ohne die Einnahme von Beta-Blocker und beobachten, ob sich die Infektionsraten zwischen den Gruppen voneinander unterscheiden. Zusätzlich könnte untersucht werden, ob Beta-Blocker zu einer kompensatorischen Hochregulation der $ADRB_2$ führen und welche Auswirkungen dies auf die Funktion der Immunzellen hat.

5. Zusammenfassung

Der Verlauf einer Leberzirrhose mit Aszites kann durch verschiedenste Parameter beeinflusst werden. Viele von diesen sind noch nicht bzw. noch nicht ausreichend erforscht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Immunzellen im Blut und / oder in der Peritonealhöhle von Patienten mit Leberzirrhose mit Aszites durch Katecholamine in ihrer Funktion beeinflusst werden könnten und ob Immunzellen durch eigene Katecholamin-Produktion an einer solchen Modulation Teil haben. Zusätzlich sollte die klinische Relevanz untersucht werden, in dem die Wirkung von Beta-Blockern auf die Immunzellfunktion in vitro oder eine mögliche Assoziation zwischen genetischen Polymorphismen im Beta-2-Adrenozeptor (ADRB₂) und dem Auftreten einer spontanen bakteriellen Peritonitis (SBP) analysiert wurden.

Aus Blut und Aszites von 13 Patienten mit Leberzirrhose aus dem UKB konnten Immunzellen isoliert und im Anschluss das Vorhandensein von ADRB₂ bei allen untersuchten Zellpopulationen mittels FACS bestätigt werden. Die Höhe der ADRB₂-Expression wurde von dem Immunzelltyp, dem Kompartiment und den rs1042713 und rs1042714 ADRB₂-Polymorphismen beeinflusst. Zusätzlich wurden die Immunzellen in vitro mit den bakteriellen Zellwandbestandteilen Lipopolysaccharid (LPS) bzw. Peptidoglykan (PGN) stimuliert, zum Teil unter Zugabe des Beta-Blockers Propranolol. Dabei konnte mittels ELISA festgestellt werden, dass Immunzellen beider Kompartimente Noradrenalin und Adrenalin produzieren. Die sezernierte Adrenalin-Menge war im Blut höher als im Aszites, allerdings ließ sich die Adrenalin-Produktion von Immunzellen aus Aszites signifikant mehr m. H. von LPS stimulieren. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die sezernierte Noradrenalin-Menge von PBMC im Blut mit dem MELD-Score korrelierte. Eine hohe Noradrenalin-Produktion von über 40 pg/ml durch unstimulierte mononukleäre Zellen aus dem Aszites war mit einem längeren Überleben assoziiert. Des Weiteren wurde die Zytokin-Ausschüttung durch bakteriell stimulierte Immunzellen allgemein und nach einer Beta-Blocker-Gabe betrachtet. Die IFN γ -Ausschüttung war im Aszites nach LPS-Stimulation signifikant höher als im Blut. Durch Propranolol wurde die IFN γ -Ausschüttung durch LPS stimulierte Immunzellen aus Aszites signifikant verringert. Die IL8-Ausschüttung, die von Immunzellen aus Aszites v. a. nach Stimulation mit Peptidoglykan deutlich höher als von Immunzellen aus dem Blut war, konnte in beiden Kompartimenten signifikant durch die

Zugabe von Propranolol reduziert werden. Die deutlich stärkere Reaktion auf Peptidoglykan von Aszites-Immunzellen könnte an der Expression des TLR2 liegen. Diese war bei Monozyten/Makrophagen, einer der Hauptproduzenten von IL8 sowie den T-Helfer-Zellen im Aszites im Vergleich zum Blut signifikant erhöht. Außerdem konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der IL8-Produktion und dem MELD festgestellt werden. Je mehr IL8 sezerniert wurde, desto niedriger war der MELD als Maß einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit. Bei Patienten, die Beta-Blocker einnahmen, war die Expression von ADRB₂ der meisten Immunzellen in beiden Kompartimenten höher als bei Patienten ohne Beta-Blocker.

Zur Feststellung, ob die nicht-synonymen Polymorphismen Thr164Ile (rs1800888), Arg16Gly (rs1042713) und Gln27Glu (rs1042714) im ADRB₂-Gen mit dem Auftreten von SBP als prototypische, durch bakterielle Translokation ausgelöste Infektion von Patienten mit Leberzirrhose assoziiert sind, wurden m. H. eines Kollektivs von insgesamt 942 DNA-Proben mittels PCR und speziellen LightCycler-Sonden Genotypisierungen durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung der Genotypen zwischen Patienten mit und ohne SBP im Vergleich zum homozygoten Wildtyp festgestellt werden. Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass Immunzellen auch bei Patienten mit Leberzirrhose Katecholamine produzieren, dass die Katecholamine die Funktion des Immunsystems beeinflussen und dass die Gabe von Beta-Blockern modulierend wirken kann. Zudem sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Wirkung der Katecholamine auf das Immunsystem Einfluss auf klinische Endpunkte haben könnte. Auf Basis der vorgestellten Arbeit sollten weitere Untersuchungen bezüglich der Rolle von Katecholaminen und der Wirkung von Beta-Blockern in Bezug auf eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose durchgeführt werden. Dazu würden sich prospektive Studien besonders eignen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gating der verschiedenen Zelltypen aus den Lymphozyten	33
Abb. 2: Gating der NK/NKT-Zellen (CD56+) aus den Lymphozyten	34
Abb. 3: Gating der Monozyten/Makrophagen mit und ohne ADRB ₂ -AK	35
Abb. 4: Gating der Granulozyten mit und ohne ADRB ₂ -AK	36
Abb. 5: Beispiel für die verschiedenen Schmelzkurvenpeaks	40
Abb. 6: Schema der Stimulation	42
Abb. 7: Verteilung der Zellpopulationen im Blut und Aszites	47
Abb. 8: Die verschiedenen Lymphozyten und ihre Verteilung im Blut und Aszites	48
Abb. 9: Die Expression von ADRB ₂ als Prozent der angegebenen Zellpopulation des angeborenen Immunsystems	49
Abb. 10: Die ADRB ₂ -Expression als Prozent der angegebenen Zellpopulation des erworbenen Immunsystems	49
Abb. 11: Prozentuale ADRB ₂ -Expression bezogen auf die gesamten CD4+ T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom ADRB ₂ -Polymorphismus rs1042713	50
Abb. 12: Prozentuale ADRB ₂ -Expression bezogen auf die gesamten CD4+ T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom ADRB ₂ -Polymorphismus rs1042714	51
Abb. 13: Sekretion von Adrenalin durch Immunzellen aus Aszites und Blut	53
Abb. 14: Sekretion von Noradrenalin von Immunzellen aus Aszites und Blut	53
Abb. 15: Korrelation der Noradrenalin-Expression und dem MELD-Score	54
Abb. 16: Überlebenskurven in Abhängigkeit der Noradrenalin-Produktion	54
Abb. 17: Beeinflussung der IFN γ -Ausschüttung durch Beta-Blocker im Blut und Aszites	55

Abb. 18: Vergleich der IFN γ -Ausschüttung von Immunzellen aus Blut und Aszites	56
Abb. 19: Beeinflussung der IL8-Ausschüttung durch Beta-Blocker in Blut PBMC und Aszites PBCM	57
Abb. 20: Vergleich der IL8-Ausschüttung von Immunzellen aus Blut und Aszites	58
Abb. 21: TLR2-Expression auf den Immunzellen im Blut und Aszites	59
Abb. 22: IL8-Expression von isolierten PBMC aus Aszites nach Pancoll gemessen im Überstand	60
Abb. 23: Zusammenhang zwischen IL8 bzw. MELD und dem Überleben über 90 Tage	60
Abb. 24: Der Einfluss von Beta-Blocker auf die ADRB ₂ -Expression auf den Immunzellen	62

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte und Zubehör	27
Tab. 2: Chemikalien, Puffer und Reagenzien	28
Tab. 3: Verwendete Kits	29
Tab. 4: Zusammensetzung des Einfriermediums, 250 ml	29
Tab. 5: Zusammensetzung des Mediums für das Aussähen von Zellen	29
Tab. 6: Verwendete Antikörper	30
Tab. 7: Positionen der untersuchten Punktmutationen	31
Tab. 8: Reaktionsprotokoll für die qPCR	41
Tab. 9: Demographie, klinische- und Labordaten der genetischen Studienkohorte	44
Tab. 10: Demographie, klinische- und Labordaten der 13 neuen Patienten	45
Tab. 11: Verteilung der Zellpopulationen der 13 Patienten	46
Tab. 12: Genotyp-Verteilung der ADRB ₂ -Polymorphismen	52

8. Literaturverzeichnis

Abdel-Razik, A., Mousa, N., Elbaz, S., Eissa, M., Elhelaly, R., Eldars, W., 2015. Diagnostic utility of interferon gamma-induced protein 10 kDa in spontaneous bacterial peritonitis: single-center study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 27, 1087–1093

Althuwaiqeb, S.A., Bordoni, B., 2022. Histology, B Cell Lymphocyte, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)

Amitrano, L., Guardascione, M.A., Brancaccio, V., Balzano, A., 2002. Coagulation Disorders in Liver Disease. *Semin Liver Dis* 22, 083–096

Araujo, L.P., Maricato, J.T., Guereschi, M.G., Takenaka, M.C., Nascimento, V.M., de Melo, F.M., Quintana, F.J., Brum, P.C., Basso, A.S., 2019. The Sympathetic Nervous System Mitigates CNS Autoimmunity via β 2-Adrenergic Receptor Signaling in Immune Cells. *Cell Reports* 28, 3120-3130.e5

Arvaniti, V., D'Amico, G., Fede, G., Manousou, P., Tsochatzis, E., Pleguezuelo, M., Burroughs, A.K., 2010. Infections in Patients With Cirrhosis Increase Mortality Four-Fold and Should Be Used in Determining Prognosis. *Gastroenterology* 139, 1246-1256.e5

Ayonrinde, O.T., Olynyk, J.K., Beilin, L.J., Mori, T.A., Pennell, C.E., de Klerk, N., Oddy, W.H., Shipman, P., Adams, L.A., 2011. Gender-specific differences in adipose distribution and adipocytokines influence adolescent nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 53, 800–809

Bachman, E.S., Dhillon, H., Zhang, C.-Y., Cinti, S., Bianco, A.C., Kobilka, B.K., Lowell, B.B., 2002. β AR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance. *Science* 297, 843–845

Bahr, M.J., Manns, M.P., 1999. Leberzirrhose. *Der Internist* 40, 1308–1322

Barnes, M.A., Carson, M.J., Nair, M.G., 2015. Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. *Cytokine* 72, 210–219.

- Bellentani, S., Saccoccio, G., Costa, G., Tiribelli, C., Manenti, F., Sodde, M., Croce', L.S., Sasso, F., Pozzato, G., Cristianini, G., Brandi and the Dionysos Study Group, G., 1997. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. *Gut* 41, 845–850
- Benschop, R.J., Rodriguez-Feuerhahn, M., Schedlowski, M., 1996. Catecholamine-Induced Leukocytosis: Early Observations, Current Research, and Future Directions. *Brain, Behavior, and Immunity* 10, 77–91
- Berg, T., 2009. Diagnostik bei erhöhten Leberwerten. *Gastroenterologe* 4, 557–572
- Bergquist, J., Tarkowski, A., Ekman, R., Ewing, A., 1994. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12912–12916.
- Bioulac-Sage, P., Lafon, M.E., Saric, J., Balabaud, C., 1990. Nerves and perisinusoidal cells in human liver. *Journal of Hepatology* 10, 105–112
- Brodde, O.-E., Büscher, R., Tellkamp, R., Radke, J., Dhein, S., Insel, P.A., 2001. Blunted Cardiac Responses to Receptor Activation in Subjects With Thr164Ile β_2 -Adrenoceptors. *Circulation* 103, 1048–1050
- Bruck, H., Leineweber, K., Park, J., Weber, M., Heusch, G., Philipp, T., Brodde, O., 2005. Human β -adrenergic receptor gene haplotypes and venodilation in vivo. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 78, 232–238
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Diehl, A.M., Brunt, E.M., Cusi, K., Charlton, M., Sanyal, A.J., 2012. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 55, 2005–2023
- Chaplin, D.D., 2010. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S3–S23
- Cheli, S., Pietrantonio, F., Clementi, E., Falvella, F.S., 2015. LightSNiP assay is a good strategy for pharmacogenetics test. *Front. Pharmacol.* 6

Chruscinski, A.J., Rohrer, D.K., Schauble, E., Desai, K.H., Bernstein, D., Kobilka, B.K., 1999. Targeted Disruption of the β_2 Adrenergic Receptor Gene. *Journal of Biological Chemistry* 274, 16694–16700

Clark, J.M., 2006. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 40 Suppl 1, S5-10

Cockcroft, J.R., Gazis, A.G., Cross, D.J., Wheatley, A., Dewar, J., Hall, I.P., Noon, J.P., 2000. β_2 -Adrenoceptor Polymorphism Determines Vascular Reactivity in Humans. *Hypertension* 36, 371–375

Corbalán, M.S., Marti, A., Forga, L., Martínez-González, M.A., Martínez, J.A., 2002. β_2 -Adrenergic receptor mutation and abdominal obesity risk: Effect modification by gender and HDL-cholesterol. *Eur J Nutr* 41, 114–118

Cosentino, M., Marino, F., Bombelli, R., Ferrari, M., Lecchini, S., Frigo, G., 1999. Endogenous catechola-mine synthesis, metabolism, storage and uptake in human neutrophils. *Life Sciences* 64, 975–981.

de Almeida Brito, F., Maria Elói Santos, S., Aparecida Ferreira, G., Pedrosa, W., Gradisse, J., Cristina Costa, L., Pretti Figueiredo Neves, S., 2016. Diagnostic Evaluation of ELISA and Chemiluminescent Assays as Alternative Screening Tests to Indirect Immunofluorescence for the Detection of Antibodies to Cellular Antigens. *Am J Clin Pathol* 145, 323–331.

Hanssen, H.P., 2011. Beta-Blocker für Melanom Patienten? *Deutsche Apotheker Zeitung*, Nr. 39, S. 65

Diaz-Salazar, C., Bou-Puerto, R., Mujal, A.M., Lau, C.M., von Hoesslin, M., Zehn, D., Sun, J.C., 2020. Cell-intrinsic adrenergic signaling controls the adaptive NK cell response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine* 217, e20190549

Eisenach, J.H., McGuire, A.M., Schwingler, R.M., Turner, S.T., Joyner, M.J., 2004. The Arg16/Gly β_2 -adrenergic receptor polymorphism is associated with altered cardiovascular responses to isometric exercise. *Physiological Genomics* 16, 323–328

Eisenach, J.H., Wittwer, E.D., 2010. β -Adrenoceptor gene variation and intermediate physiological traits: prediction of distant phenotype: Genetic variation and intermediate physiology. *Experimental Physiology* 95, 757–764

Eisenhofer, G., Åneman, A., Hooper, D., Rundqvist, B., Friberg, P., 2002. Mesenteric Organ Production, Hepatic Metabolism, and Renal Elimination of Norepinephrine and Its Metabolites in Humans. *Journal of Neurochemistry* 66, 1565–1573

Ekkens, M.J., Shedlock, D.J., Jung, E., Troy, A., Pearce, E.L., Shen, H., Pearce, E.J., 2007. Th1 and Th2 Cells Help CD8 T-Cell Responses. *Infect Immun* 75, 2291–2296

Fernández, J., Prado, V., Trebicka, J., Amoros, A., Gustot, T., Wiest, R., Deulofeu, C., Garcia, E., Acevedo, J., Fuhrmann, V., Durand, F., Sánchez, C., Papp, M., Caraceni, P., Vargas, V., Bañares, R., Piano, S., Janicko, M., Albillos, A., Alessandria, C., Soriano, G., Welzel, T.M., Laleman, W., Gerbes, A., De Gottardi, A., Merli, M., Coenraad, M., Saliba, F., Pavesi, M., Jalan, R., Ginès, P., Angeli, P., Arroyo, V., 2019. Multidrug-resistant bacterial infections in patients with decompensated cirrhosis and with acute-on-chronic liver failure in Europe. *Journal of Hepatology* 70, 398–411

Flierl, M.A., Rittirsch, D., Huber-Lang, M., Sarma, J.V., Ward, P.A., 2008. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med* 14, 195–204.

Flierl, M.A., Rittirsch, D., Nadeau, B.A., Chen, A.J., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., McGuire, S.R., List, R.P., Day, D.E., Hoesel, L.M., Gao, H., Van Rooijen, N., Huber-Lang, M.S., Neubig, R.R., Ward, P.A., 2007. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 449, 721–725

Friedrich-Rust, M., Wunder, K., Kriener, S., Sotoudeh, F., Richter, S., Bojunga, J., Herrmann, E., Poynard, T., Dietrich, C.F., Vermehren, J., Zeuzem, S., Sarrazin, C., 2009. Liver Fibrosis in Viral Hepatitis: Noninvasive Assessment with Acoustic Radiation Force Impulse Imaging versus Transient Elastography. *Radiology* 252, 595–604

Gabanyi, I., Muller, P.A., Feighery, L., Oliveira, T.Y., Costa-Pinto, F.A., Mucida, D., 2016. Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell* 164, 378–391

Gage, J.R., Fonarow, G., Hamilton, M., Widawski, M., Martínez-Maza, O., Vredevoe, D.L., 2004. Beta Blocker and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy Is Associated with Decreased Th1/Th2 Cytokine Ratios and Inflammatory Cytokine Production in Patients with Chronic Heart Failure. *Neuroimmunomodulation* 11, 173–180

Geary, C.D., Sun, J.C., 2017. Memory responses of natural killer cells. *Seminars in Immunology* 31, 11–19

Gelbe Liste, Dr. Maucher, 2021: Betablocker. <https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/betablocker> (Zugriffsdatum: 10.08.2022)

Gerber, L., Kasper, D., Fitting, D., Knop, V., Vermehren, A., Sprinzl, K., Hansmann, M.L., Herrmann, E., Bojunga, J., Albert, J., Sarrazin, C., Zeuzem, S., Friedrich-Rust, M., 2015. Assessment of Liver Fibrosis with 2-D Shear Wave Elastography in Comparison to Transient Elastography and Acoustic Radiation Force Impulse Imaging in Patients with Chronic Liver Disease. *Ultrasound in Medicine & Biology* 41, 2350–2359

Gerbes, A.L., Labenz, J., Appenrodt, B., Dollinger, M., Gundling, F., Gülberg, V., Holstege, A., Lynen-Jansen, P., Steib, C.J., Trebicka, J., Wiest, R., Zipprich, A., 2019. Aktualisierte S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) „Komplikationen der Leberzirrhose“: AWMF-Nr.: 021-017. *Z Gastroenterol* 57, 611–680.

Gimenez, P., Garcia-Martinez, I., Francés, R., Gonzalez-Navajas, J.M., Mauri, M., Alfayate, R., Almenara, S., Miralles, C., Palazon, J.M., Carnicer, F., Pascual, S., Such, J., Horga, J.F., Zapater, P., 2018. Treatment with non-selective beta-blockers affects the systemic inflammatory response to bacterial DNA in patients with cirrhosis. *Liver Int* 38, 2219–2227

Global Burden of Disease Liver Cancer Collaboration, Akinyemiju, T., Abera, S., Ahmed, M., Alam, N., Alemayohu, M.A., Allen, C., Al-Raddadi, R., Alvis-Guzman, N., Amoako, Y.,

Artaman, A., Ayele, T.A., Barac, A., Bensenor, I., Berhane, A., Bhutta, Z., Castillo-Rivas, J., Chitheer, A., Choi, J.-Y., Cowie, B., Dandona, L., Dandona, R., Dey, S., Dicker, D., Phuc, H., Ekwueme, D.U., Zaki, M.E.S., Fischer, F., Fürst, T., Hancock, J., Hay, S.I., Hotiez, P., Jee, S.H., Kasaeian, A., Khader, Y., Khang, Y.-H., Kumar, G.A., Kutz, M., Larson, H., Lopez, A., Lunevicius, R., Malekzadeh, R., McAlinden, C., Meier, T., Mendoza, W., Mokdad, A., Moradi-Lakeh, M., Nagel, G., Nguyen, Q., Nguyen, G., Ogbo, F., Patton, G., Pereira, D.M., Pourmalek, F., Qorbani, M., Radfar, A., Roshandel, G., Salomon, J.A., Sanabria, J., Sartorius, B., Satpathy, M., Sawhney, M., Sepanlou, S., Shackelford, K., Shore, H., Sun, J., Mengistu, D.T., Topór-Madry, R., Tran, B., Ukwaja, K.N., Vlassov, V., Vollset, S.E., Vos, T., Wakayo, T., Weiderpass, E., Werdecker, A., Yonemoto, N., Younis, M., Yu, C., Zaidi, Z., Zhu, L., Murray, C.J.L., Naghavi, M., Fitzmaurice, C., 2017. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol* 3, 1683

Godinho-Silva, C., Cardoso, F., Veiga-Fernandes, H., 2019. Neuro–Immune Cell Units: A New Paradigm in Physiology. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 19–46

Green, S.A., Cole, G., Jacinto, M., Innis, M., Liggett, S.B., 1993. A polymorphism of the human beta 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem* 268, 23116–23121

Green, S.A., Turki, J., Innis, M., Liggett, S.B., 1994. Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 33, 9414–9419

Griffin, P.P., Schubert-Zsilavecz, M., Stark, H., 2004. Hemmstoffe von Beta-Adrenozep-toren: Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *Pharmazie in unserer Zeit* 33, 442–449

Hellström, L., Large, V., Reynisdottir, S., Wahrenberg, H., Arner, P., 1999. The different effects of a Gln27Glu β_2 -adrenoceptor gene polymorphism on obesity in males and in females. *Journal of Internal Medicine* 245, 253–259

Hernández-Gea, V., Aracil, C., Colomo, A., Garupera, I., Poca, M., Torras, X., Miñana, J., Guarner, C., Villanueva, C., 2012. Development of Ascites in Compensated Cirrhosis With

Severe Portal Hypertension Treated With β -Blockers. *American Journal of Gastroenterology* 107, 418–427

Hillion, S., Arleevskaya, M.I., Blanco, P., Bordron, A., Brooks, W.H., Cesbron, J.Y., Kaveri, S., Vivier, E., Renaudineau, Y., 2020. The Innate Part of the Adaptive Immune System. *Clinic Rev Allerg Immunol* 58, 151–154

Hoffstedt, J., Iliadou, A., Pedersen, N.L., Schalling, M., Arner, P., 2001. The effect of the beta₂ adrenoceptor gene Thr164Ile polymorphism on human adipose tissue lipolytic function: Beta₂ -adrenoceptor polymorphism and lipolysis. *British Journal of Pharmacology* 133, 708–712

Huber, M., Schwarz, W., Vogl, T., Zeuzem, S., 2001. Klinik der Leberzirrhose und ihrer Komplikationen sowie diagnostische Fragestellungen. *Der Radiologe* 41, 840–851

Isaza, C., Henao, J., Ramírez, E., Cuesta, F., Cacabelos, R., 2005. Polymorphic variants of the beta-2-adrenergic receptor (ADRB2) gene and ADRB2-related propranolol-induced dyslipidemia in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27, 237

Isaza-Restrepo, A., Martin-Saavedra, J.S., Velez-Leal, J.L., Vargas-Barato, F., Riveros-Dueñas, R., 2018. The Peritoneum: Beyond the Tissue – A Review. *Front. Physiol.* 9, 738

Iwakiri, Y., 2014. Pathophysiology of Portal Hypertension. *Clinics in Liver Disease* 18, 281–291

Kapsenberg, M.L., 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984–993

Johnson, M., 1998. The β -Adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 158, S146–S153

Kastelein, A.W., Vos, L.M.C., de Jong, K.H., van Baal, J.O.A.M., Nieuwland, R., van Noorden, C.J.F., Roovers, J.-P.W.R., Lok, C.A.R., 2019. Embryology, anatomy, physiology and pathophysiology of the peritoneum and the peritoneal vasculature. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 92, 27–36

Kavelaars, A., van de Pol, M., Zijlstra, J., Heijnen, C.J., 1997. β 2-Adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes. *Journal of Neuroimmunology* 77, 211–216

Kågedal, B., Goldstein, D.S., 1988. Catecholamines and their metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 429, 177–233

Kiefer, F., Batra, A., Bischof, G., Funke, W., Lindenmeyer, J., Mueller, S., Preuss, U.W., Schäfer, M., Thomasius, R., Veltrup, C., Weissinger, V., Wodarz, N., Wurst, F.M., Aud, L., Hoffmann, S., 2021. S3-Leitlinie „Screening, Diagnose und Behandlung alkoholbezogener Störungen“: Aktualisierung 2021 – Kurzfassung. *SUCHT* 67, 77–103.

Kiyici, M., Nak, S.G., Budak, F., Gurel, S., Oral, B., Dolar, E., Gulden, M., 2006. Lymphocyte subsets and cytokines in ascitic fluid of decompensated cirrhotic patients with and without spontaneous ascites infection. *J Gastroenterol Hepatol* 21, 963–969

Kortner, B., Wolf, A., Wendt, D., Beisiegel, U., Evans, D., 1999. Lack of association between a human β -2 adrenoceptor gene polymorphism (gln27glu) and morbid obesity. *Int J Obes* 23, 1099–1100

Krasnyi, A.M., Sadekova, A.A., Sefihanov, T.G., Vtorushina, V.V., Krechetova, E.G., Khilkevich, E.G., Arakelyan, A.S., Pavlovich, S.V., 2019. The content of cytokines IL-6, IL-8, TNF- α , IL-4 and the level of expression in macrophages CD86 and CD163 in peritoneal fluid has a reverse correlation with the degree of severity of external genital endometriosis. *BIOMED KHIM* 65, 432–436

Kumar, B.V., Connors, T.J., Farber, D.L., 2018. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* 48, 202–213

Kushnir, V.M., Cassell, B., Gyawali, C.P., Newberry, R.D., Kibe, P., Nix, B.D., Sabzpoushan, A., Kanuri, N.D., Sayuk, G.S., 2013. Genetic variation in the beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) predicts functional gastrointestinal diagnoses and poorer health-related quality of life. *Aliment Pharmacol Ther* 38, 313–323

Lelou, E., Corlu, A., Nessler, N., Rauch, C., Mallédant, Y., Seguin, P., Aninat, C., 2022. The Role of Catecholamines in Pathophysiological Liver Processes. *Cells* 11, 1021

- Lemeshow, S., Sørensen, H.T., Phillips, G., Yang, E.V., Antonsen, S., Riis, A.H., Lesinski, G.B., Jackson, R., Glaser, R., 2011. β -Blockers and Survival among Danish Patients with Malignant Melanoma: A Population-Based Cohort Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 20, 2273–2279
- Liu, M., Silva-Sanchez, A., Randall, T.D., Meza-Perez, S., 2021. Specialized immune responses in the peritoneal cavity and omentum. *J Leukoc Biol* 109, 717–729
- Lucey, M.R., 2019. Alcohol-Associated Cirrhosis. *Clinics in Liver Disease* 23, 115–126
- Lutz, P., Jeffery, H.C., Jones, N., Birtwistle, J., Kramer, B., Nattermann, J., Spengler, U., Strassburg, C.P., Adams, D.H., Oo, Y.H., 2019. NK Cells in Ascites From Liver Disease Patients Display a Particular Phenotype and Take Part in Antibacterial Immune Response. *Front. Immunol.* 10, 1838
- Lutz, P., Krämer, B., Kaczmarek, D.J., Hübner, M.P., Langhans, B., Appenrodt, B., Lammer, F., Nattermann, J., Hoerauf, A., Strassburg, C.P., Spengler, U., Nischalke, H.D., 2016. A variant in the nuclear dot protein 52kDa gene increases the risk for spontaneous bacterial peritonitis in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Digestive and Liver Disease* 48, 62–68
- Lutz, P., Parcina, M., Bekeredjian-Ding, I., Nischalke, H.D., Nattermann, J., Sauerbruch, T., Hoerauf, A., Strassburg, C.P., Spengler, U., 2014. Impact of Rifaximin on the Frequency and Characteristics of Spontaneous Bacterial Peritonitis in Patients with Liver Cirrhosis and Ascites. *PLoS ONE* 9, e93909
- Mann, R., Bhathal, P.S., Bell, C., 1991. Sympathetic innervation of the liver in man and dog: An immunohistochemical study. *Clinical Autonomic Research* 1, 141–145
- Mansour, D., McPherson, S., 2018. Management of decompensated cirrhosis. *Clin Med* 18, s60–s65
- Matsuda, K., 2017. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation, in: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 45–72.

McCarty, R., 2016. The Fight-or-Flight Response, in: *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. Elsevier, pp. 33–37

Michalopoulos, G.K., Bhushan, B., 2021. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 40–55

Moriyama, S., Brestoff, J.R., Flamar, A.-L., Moeller, J.B., Klose, C.S.N., Rankin, L.C., Yudanin, N.A., Monticelli, L.A., Putzel, G.G., Rodewald, H.-R., Artis, D., 2018. β_2 -adrenergic receptor-mediated negative regulation of group 2 innate lymphoid cell responses. *Science* 359, 1056–1061

National Library of Medicine National Center for Biotechnology, 2021: Reference SNP (rs) Report. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1042713> (Zugriffsdatum: 01.07.2022)

National Library of Medicine National Center for Biotechnology, 2021: Reference SNP (rs) Report. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1042714> (Zugriffsdatum: 01.07.2022)

National Library of Medicine National Center for Biotechnology, 2021: Reference SNP (rs) Report. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800888> (Zugriffsdatum: 01.07.2022)

Nischalke, H.D., Fischer, J., Klünens, A., Matz-Soja, M., Krämer, B., Langhans, B., Goeser, F., Soyka, M., Stickel, F., Spengler, U., Nattermann, J., Strassburg, C.P., Berg, T., Lutz, P., 2021. A genetic variant in toll-like receptor 5 is linked to chemokine levels and hepatocellular carcinoma in steatohepatitis. *Liver International* 41, 2139–2148

Oberkofler, H., Esterbauer, H., Hell, E., Krempler, F., Patsch, W., 2000. The Gln27Glu polymorphism in the β_2 -adrenergic receptor gene is not associated with morbid obesity in Austrian women. *Int J Obes* 24, 388–390

Okabe, Y., 2021. Immune Niche Within the Peritoneal Cavity, in: Nagasawa, T. (Ed.), *Bone Marrow Niche, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 123–134

Park, J., Chen, M., Colombo, M., Roberts, L.R., Schwartz, M., Chen, P., Kudo, M., Johnson, P., Wagner, S., Orsini, L.S., Sherman, M., 2015. Global patterns of hepatocellular

carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver Int* 35, 2155–2166

Parscher A., Nebrig M., Neuhaus P., 2013. Irreversible Leberversagen: Transplantation als Behandlungsoption. Teil 3 der Serie zu Leberzirrhose. *Dtsch Arztebl Int*, 110, 167-173

Philipp, M., Hein, L., 2004. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics* 101, 65–74

Piano, S., Fasolato, S., Salinas, F., Romano, A., Tonon, M., Morando, F., Cavallin, M., Gola, E., Sticca, A., Loregian, A., Palù, G., Zanusi, G., Senzolo, M., Burra, P., Cillo, U., Angeli, P., 2016. The empirical antibiotic treatment of nosocomial spontaneous bacterial peritonitis: Results of a randomized, controlled clinical trial: *HEPATOLOGY*, Vol. XX, No. X, 2015 PIANO ET AL. *Hepatology* 63, 1299–1309

Planas, R., Montoliu, S., Ballesté, B., Rivera, M., Miquel, M., Masnou, H., Galeras, J.A., Giménez, M.D., Santos, J., Cirera, I., Morillas, R.M., Coll, S., Solà, R., 2006. Natural History of Patients Hospitalized for Management of Cirrhotic Ascites. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 4, 1385-1394.e1

Poynard, T., Bedossa, P., Opolon, P., 1997. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *The Lancet* 349, 825–832

Pratt, D.S., Kaplan, M.M., 2000. Evaluation of Abnormal Liver-Enzyme Results in Asymptomatic Patients. *N Engl J Med* 342, 1266–1271

Rawla, P., Sunkara, T., Muralidharan, P., Raj, J.P., 2018. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. *wo* 22, 141–150

Reiberger, T., Ferlitsch, A., Payer, B.A., Mandorfer, M., Heinisch, B.B., Hayden, H., Lammer, F., Trauner, M., Peck-Radosavljevic, M., Vogelsang, H., 2013. Non-selective beta-blocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 58, 911–921

Riemann, J.F., Fischbach, W., Galle, P.R., Mössner, J. (Eds.), 2008. *Gastroenterologie in Klinik und Praxis: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Roca, R., Esteban, P., Zapater, P., Inda, M., Conte, A., Gómez-Escolar, L., Martínez, H., Horga, J., Palazon, J., Peiró, A., 2018. β_2 -adrenergic receptor functionality and genotype in two different models of chronic inflammatory disease: Liver cirrhosis and osteoarthritis. *Mol Med Report*

Rohrer, D.K., Desai, K.H., Jasper, J.R., Stevens, M.E., Regula, D.P., Barsh, G.S., Bernstein, D., Kobilka, B.K., 1996. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7375–7380

Röntgen, P. K., 2005: Einfluss von Katecholaminen auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Monozyten. https://nanopdf.com/download/pdf-format-online-hochschulschriften-der-universitt-halle_pdf (Zugriffsdatum: 17.09.2022)

Runyon, B.A., 1992. The Serum-Ascites Albumin Gradient Is Superior to the Exudate-Transudate Concept in the Differential Diagnosis of Ascites. *Ann Intern Med* 117, 215

Sandrin, L., Fourquet, B., Hasquenoph, J.-M., Yon, S., Fournier, C., Mal, F., Christidis, C., Ziol, M., Poulet, B., Kazemi, F., Beaugrand, M., Palau, R., 2003. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound in Medicine & Biology* 29, 1705–1713

Saule, P., Trauet, J., Dutriez, V., Lekeux, V., Dessaint, J.-P., Labalette, M., 2006. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: Central and effector memory cells in CD4+ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8+ compartment. *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 274–281

Scanzano, A., Cosentino, M., 2015. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front. Pharmacol.* 6

Schoiswohl, S. G., 2022: Der Thr164Ile-Polymorphismus des humanen β_2 -adrenergen Rezeptorgens bei systemischer Meningokokkenerkrankung. https://online.medu-nigraz.at/mug_online/wbAbs.getDocument?pThesisNr=31927&pAutorNr=&pOrgNr=1 (Zugriffsdatum: 01.07.2022)

Schuppan, D., Afdhal, N.H., 2008. Liver cirrhosis. *The Lancet* 371, 838–851

Senzolo, M., Cholongitas, E., Burra, P., Leandro, G., Thalheimer, U., Patch, D., Burroughs, A.K., 2009. β -Blockers protect against spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a meta-analysis. *Liver International* 29, 1189–1193

Shoskes, D.A., Wood, K.J., 1994. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunology Today* 15, 32–38

Small, K.M., McGraw, D.W., Liggett, S.B., 2003. Pharmacology and Physiology of Human Adrenergic Receptor polymorphisms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 381–411

Song, D.S., 2018. Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Korean J Gastroenterol* 72, 56

Statistisches Bundesamt, 2022: Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen, Geschlecht. [https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=](https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=abruftabelleBearbeiten&levelindex=2&levelid=1658344489672&auswahloperation=abruftabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&code=23211-0002&auswahltext=&werteabruf=Werteabruf#abreadcrumb)

[abruftabelleBearbeiten&levelindex=2&levelid=1658344489672&auswahloperation=abruftabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&code=23211-0002&auswahltext=&werteabruf=Werteabruf#abreadcrumb](https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=abruftabelleBearbeiten&levelindex=2&levelid=1658344489672&auswahloperation=abruftabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&code=23211-0002&auswahltext=&werteabruf=Werteabruf#abreadcrumb) (Zugriffsdatum: 20.07.2022)

Strober, W., 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology* 111

Strassburg, C.P., Manns, M.P., 2009. Lebertransplantation: Indikationen und Ergebnisse. *Internist* 50, 550–560

Sukhikh, G.T., Sotnikova, N.Yu., Antsiferova, Yu.S., Posiseeva, L.V., Veryasov, V.N., Vanko, L.V., 2004. Cytokine Production by Immunocompetent Cells of Peritoneal Fluid in Women with External Genital Endometriosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 137, 568–571

Susulic, V.S., Frederich, R.C., Lawitts, J., Tozzo, E., Kahn, B.B., Harper, M.-E., Himms-Hagen, J., Flier, J.S., Lowell, B.B., 1995. Targeted Disruption of the β 3-Adrenergic Receptor Gene. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29483–29492

Tanner, M.A., Maitz, C.A., Grisanti, L.A., 2021. Immune cell β_2 -adrenergic receptors contribute to the development of heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 321, H633–H649

Testino, G., Leone, S., Fagoonee, S., Pellicano, R., 2018. Alcoholic liver fibrosis: detection and treatment. *Minerva Med* 109

Thalheimer, U., Triantos, C., Goulis, J., Burroughs, A.K., 2011. Management of varices in cirrhosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 12, 721–735

The Human Protein Atlas, 2023. Immune Cell ADRB2. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169252-ADRB2/immune+cell> (Zugriffsdatum: 29.09.2023)

Thiele, M., Albillos, A., Abazi, R., Wiest, R., Gluud, L.L., Krag, A., 2015. Non-selective beta-blockers may reduce risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized trials. *Liver Int* 35, 2009–2016

Thomsen, M., Dahl, M., Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B.G., 2012. β_2 -adrenergic receptor Thr164Ile polymorphism, blood pressure and ischaemic heart disease in 66 750 individuals: ADRB2 Thr164Ile, blood pressure and ischaemic heart disease. *Journal of Internal Medicine* 271, 305–314

TIB MOLBIOL, 2022: LightSNiP Assays und Kontrolltargets. <https://www.tib-molbiol.de/de/produkte-und-loesungen/snip> (Zugriffsdatum: 21.07.2022)

Tsai, H.-C., Hsu, C.-F., Huang, C.-C., Huang, S.-F., Li, T.-H., Yang, Y.-Y., Lin, M.-W., Lee, T.-Y., Liu, C.-W., Huang, Y.-H., Hou, M.-C., Lin, H.-C., 2020. Propranolol Suppresses the T-Helper Cell Depletion-Related Immune Dysfunction in Cirrhotic Mice. *Cells* 9, 604

Uriz, J., Cárdenas, A., Arroyo, V., 2000. Pathophysiology, diagnosis and treatment of ascites in cirrhosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 14, 927–943

van Baal, J.O.A.M., Van de Vijver, K.K., Nieuwland, R., van Noorden, C.J.F., van Driel, W.J., Sturk, A., Kenter, G.G., Rikkers, L.G., Lok, C.A.R., 2017. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue and Cell* 49, 95–105

- van der Poll, T., Lowry, S.F., 1997. Lipopolysaccharide-induced interleukin 8 production by human whole blood is enhanced by epinephrine and inhibited by hydrocortisone. *Infect Immun* 65, 2378–2381
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (Eds.), 2015. *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing, Cham
- Wahle, M., Krause, A., Ulrichs, T., Jonas, D., Wichert, P., Burmester, G.R., Baerwald, C.G.O., 1999. Disease Activity Related Catecholamine Response of Lymphocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. *Annals NY Acad Sci* 876, 287–297
- Wang, Fang, Liu, H., Wang, Fengmei, Xu, R., Wang, P., Tang, F., Zhang, X., Zhu, Z., Lv, H., Han, T., 2018. Propranolol suppresses the proliferation and induces the apoptosis of liver cancer cells. *Mol Med Report*
- Wei, X., Chen, L., Yang, A., Lv, Z., Xiong, M., Shan, C., 2021. ADRB2 is a potential protective gene in breast cancer by regulating tumor immune microenvironment. *Transl Cancer Res TCR* 10, 5280–5294
- Weiß, J., Rau, M., Geier, A., 2014. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. *Deutsches Ärzteblatt international*
- Wijdicks, E.F.M., 2016. Hepatic Encephalopathy. *N Engl J Med* 375, 1660–1670
- Wilde, B., Katsounas, A., 2019. Immune Dysfunction and Albumin-Related Immunity in Liver Cirrhosis. *Mediators of Inflammation* 2019, 1–9
- William Tank, A., Lee Wong, D., 2014. Peripheral and Central Effects of Circulating Catecholamines, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 1–15
- Yang, E.V., Kim, S., Donovan, E.L., Chen, M., Gross, A.C., Webster Marketon, J.I., Barsky, S.H., Glaser, R., 2009. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: Implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain, Behavior, and Immunity* 23, 267–275

Yang, J.D., Hainaut, P., Gores, G.J., Amadou, A., Plymoth, A., Roberts, L.R., 2019. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 589–604

Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021: Leberkrebs IC-10 C22. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leberkrebs/leberkrebs_node.html (Zugriffsdatum: 18.05.2022)

Zheng, M., Han, Q.-D., Xiao, R.-P., 2004. Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance. *Sheng Li Xue Bao* 56, 1–15

9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Philipp Lutz, durch dessen Aufgabengestaltung und hervorragende Betreuung diese Dissertation erst möglich wurde. Ich bedanke mich für die stetigen Bemühungen, Ratschläge und für die hilfreiche Kritik.

Ich danke dir und deinen Kollegen*innen der Station Nasse des Universitätsklinikums Bonn für die Bereitstellung der Blut- und Aszitesproben.

Bei Dr. rer. nat. Hans Dieter Nischalke möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung der Materialien und der DNA-Kohorten bedanken. Vielen Dank für die Arbeitseinweisungen in die verschiedenen Versuche, deine Hilfe bei der statistischen Auswertung und die intensive Betreuung.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors bedanken. Insbesondere bei Christine Möller, Franziska Schmalz und Adrian Goldspink für die gute Einarbeitung in molekulargenetische Methoden, der Hilfe am FACS-Gerät und den vielen Hilfestellungen.

Den größten Dank spreche ich meiner Familie aus, die immer für mich da ist und mir ein erfolgreiches Studium ermöglicht hat.