

# **Der MrgD-Rezeptor und seine Rolle in der Leberfibrose und deren Komplikationen im transgenen Tiermodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Dominica Vanessa Milczek**

aus Düsseldorf

2020

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jonel Trebicka
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Muders

Tag der Mündlichen Prüfung: 05.11.2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I – Allgemeine Innere Medizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>11</b>
2.1 Die Leberzirrhose	11
2.2 Pathophysiologie der Leberfibrose	14
2.2.1 Die extrazelluläre Matrix	16
2.2.2 Hepatische Sternzellen (HSCs)	18
2.3 Pathophysiologie zu Komplikationen der Leberfibrose	20
2.3.1 Portale Hypertension	20
2.3.2 Hepatische Enzephalopathie	22
2.4 Das Renin-Angiotensin-System	22
2.4.1 Das „klassische“ Renin-Angiotensin-System	22
2.4.2 Das „alternative“ Renin-Angiotensin-System	24
2.4.3 Signalkaskaden	26
2.5 Der MrgD-Rezeptor	28
2.5.1 Liganden	30
2.5.1.1 Alamandine	30
2.6 Fragestellungen	32
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1 Material	33
3.1.1 Antikörper	33
3.1.2 Oligonukleotide	34
3.1.3 Kits	34

3.1.4 Software	35
3.1.5 Versuchstiere	35
3.1.5.1 MrgD-Rezeptor Knock-Out Mäuse	36
3.2 in vivo Methoden	36
3.2.1 Narkosetechnik	36
3.2.2 Induktion einer Leberzirrhose durch Tetrachlorkohlenstoff, (CCl <sub>4</sub> )- Intoxikation	37
3.2.3 Induktion einer Leberzirrhose durch Gallengangsligatur (bile duct ligation, BDL)	37
3.2.4 Einbau osmotischer Pumpen	37
3.2.5 Diäten	38
3.2.6 Hämodynamische Messung und Organentnahme	38
3.2.7 Isolierung muriner HSCs	38
3.3 Molekularbiologische Methoden	39
3.3.1 Isolierung und Reinigung von DNA	39
3.3.2 Isolierung und Reinigung von RNA	40
3.3.3 Horizontale Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	40
3.3.4 Polymerase Kettenreaktion	40
3.3.4.1 Standard PCR	41
3.3.4.2 Reverse Transkription	41
3.3.4.3 Relative Echtzeit-PCR (rtPCR)	41
3.4 Biochemische Methoden	42
3.4.1 Homogenisieren von Leberproben	42
3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	42

3.4.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrilamid Gelelektrophorese, (SDS-Page)	43
3.4.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran	43
3.4.5 Immunologische Detektion der Proteine durch Chemilumineszenz	44
3.4.6 Densitometrische Quantifizierung der Proteinmenge	44
3.4.7 Hydroxyprolinbestimmung der Leber	44
3.5 Zellbiologische Methoden	45
3.5.1 Zellzahlbestimmung	45
3.5.2 Zellkultivierung	46
3.5.3 Inkubation der HSCs mit Alamandine und Ang(1-7)	46
3.5.4 Ernten der HSCs	46
3.5.5 HSC Scratch Assay	46
3.5.6 HSC Kontraktionsversuch	47
3.5.7 HSC cAMP-Messung	47
3.6 Immunhistochemie	48
3.6.1 $\alpha$ SMA-Färbung und picro Siriusrot-Färbung	48
3.6.2 Auswertungen der Immunhistochemie	48
3.7 Statistische Auswertungen	48
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>49</b>
4.1 Erfassung der Leberfibrose	49
4.1.1 Allgemeiner Phänotyp des Tiermodells	49
4.1.2 Hydroxyprolingehalt der Leber	51
4.1.3 picro Siriusrot-Färbungen der Leber	52
4.2 Messung der Portalen Hypertension in der Milz	54

4.3 Aktivierung von HSCs	55
4.3.1 $\alpha$ SMA-Färbungen der Leber	55
4.3.2 HSC Scratch Assay	56
4.3.3 HSC Kontraktionsversuch	58
4.3.4 HSC cAMP-Messung	59
4.4 Darstellung von Signalwegen	60
4.4.1 Proteinexpression der Lebern von Kontrolltieren	60
4.4.2 Proteinexpression der Lebern von CCl <sub>4</sub> -intoxikierten Tieren	61
4.5 Erfassung der zerebralen Inflammation als Ausmaß der hepatischen Enzephalopathie	62
<b>5. Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1 Der MrgDR in der Pathogenese der Leberzirrhose und ihrer Komplikationen	64
5.2 Die Rolle des MrgDR für das RAS und intrazelluläre Vorgänge	66
5.3 Ausblick und Bedeutung der Erkenntnisse	68
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>87</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

7-TM-R	7-trans-Membran Rezeptoren
$\alpha$ SMA	Alpha-Aktin der glatten Muskelzellen
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ACE2	Angiotensin konvertierendes Enzym 2
aHSC	aktivierte hepatische Sternzellen
Akt	Protein Kinase B
Ala	Alamandine
ANGI	Angiotensin I
Ang(1-7)	Angiotensin (1-7)
Ang(1-9)	Angiotensin (1-9)
ANGII	Angiotensin II
ANGIII	Angiotensin III
Ang A	Angiotensin A
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AT1R	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
AT2R	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 2
AT4R	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 4
ATP	Adenosintriphosphat
BDL	Gallengangsligatur ("bile duct ligation")
BSA	Bovines Serumalbumin
BW	Körpergewicht
c	Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenstoff
DNA	Desoxyribonucleinsäure
cDNA	zyklische Desoxyribonucleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col1 $\alpha$ 1	Kollagen 1 $\alpha$ 1
Ctr	Kontrolle
DMEM	Dulbecco's modifizierte Medien

DRG	Hinterstrangwurzelganglion
EC	endotheliale Zellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eNOS	Endotheliale Stickoxidsynthetase
ERK 1/2	Extrazelluläre signalregulierte Kinase 1/2
FAM	6-Carboxyfluorescein
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Salzlösung
HE	Hepatische Enzephalopathie
HET	Haus für experimentelle Tierhaltung
HP	Hydroxyprolin
HSC	Hepatische Sternzellen
IL-1b	Interleukin 1b
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthetase
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositol 1,4,5-Triphosphat
IVC	Vena Cava Inferior
Jak2	Janus-Kinase-2
JNK	c-junctionale NH <sub>2</sub> -terminale Kinasen
Kcna3	spannungsgesteuerter Kalium-Kanal Subfamilie A Typ 3
KCNN4	Kalzium abhängiger Kalium-Kanal Subfamilie N Typ 4
kD	kilo Dalton
KO	Knock-Out
LSEC	Lebersinoidale endotheliale Zellen
LW	Lebergewicht
LZ	Leberzirrhose
M	Molar

MAP	mittlerer arterieller Druck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MasR	Mas-Rezeptor
MCD-D	Methionin-Cholin-defizienten Diät
MELD	Score zur Einstufung der Schwere von Lebererkrankungen ("Model for End-stage Liver Disease")
MLC	Myosin Leichtketten
MLCK	Myosin Leichtketten Kinase
MLCP	Myosin Leichtketten Phosphatase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MrgDR	Mas-Gen verwandte Rezeptoren Subtyp D
MrgDR <sup>-/-</sup>	Mas-Gen verwandte Rezeptoren Subtyp D -Knockout
MrgER	Mas-Gen verwandte Rezeptoren Subtyp E
MrgR	Mas-Gen verwandte Rezeptoren
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NEP	Nepriylisin
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor
p-ERK	phosphorylierte Extrazellulär-Signal regulierte Kinase 1/2
PH	portale Hypertension
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
p-Moes	phosphoryliertes Moesin
Raf-1	C-Raf, Serin/Threonin-Proteinkinase, („rat fibrosarcoma“)
RAS	Renin-Angiotensin-System

RhoA	Ras homologe Genfamilie, Mitglied A
ROCK	Rho-Kinase
ROS	Freie Sauerstoffradikale
rt-PCR	Relative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
s.e.m.	Standardfehlerabweichung vom Durchschnitt
SR	picro Siriusrot
TGF- $\beta$ 1	Wachstumsfaktor („Transforming growth factor- $\beta$ 1“)
TIMP	Inhibitoren von Matrixmetalleproteinasen (“Tissue Inhibitor of Metalloproteinase”)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzellen
WB	Western Blot
WD	Western Diät
wt	Wildtyp

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Leberzirrhose

Bei der Leberzirrhose (LZ) handelt es sich um das Endstadium von Lebererkrankungen (D'Amico et al., 2006a), die durch chronische Schädigung zu einer verminderten Syntheseleistung führen. Histologisch wird die Erkrankung anhand einer Fibrose des Organs sichtbar (Poordad, 2015). Zu den global häufigsten Ursachen der LZ zählen insbesondere die Hepatitiden B und C (Lee and Friedman, 2011), vermehrter Alkoholkonsum und das metabolische Syndrom in Verbindung mit Übergewicht und Fettleibigkeit (Blachier et al., 2013). Die einzelnen Genesen zeigen eine unterschiedliche geographische Verteilung: Während in Afrika die Infektionskrankheiten wie Hepatitis B und C als Ursache dominieren, ist in Ost- und Südosteuropa ein schädigender Alkoholkonsum von pathognomisch größter Bedeutung (Mokdad et al., 2014). In den westlichen Industriestaaten rückt zunehmend die mit dem metabolischen Syndrom assoziierte nicht-alkoholische Fettleber (NASH) als Ursache der LZ in den Fokus. Diese Grunderkrankung zählt zum Formenkreis der sogenannten „Wohlstandserkrankungen“ (Calzadilla Bertot and Adams, 2016).

Im Allgemeinen gelten chronisch verlaufende Lebererkrankungen als Problem globalen Ausmaßes. Sie korrelieren mit häufigen Arztbesuchen und Krankenhausaufenthalten und stellen einen hohen wirtschaftlichen Kostenfaktor dar. Patienten leiden häufig unter langwierigen Verläufen mit einer Vielzahl assoziierter Komplikationen (European Association for the Study of Liver, 2016). Dies spiegelt sich auch in den Zahlen zu Morbidität und Mortalität wider. Allein in Europa geht man von 29 Millionen Erkrankten aus (European Association for the Study of Liver, 2016). Die Leberzirrhose belegt damit weltweit den vierten Platz der häufigsten Todesursachen (Tsochatzis et al., 2014) mit schätzungsweise 2 % aller Tode weltweit (Mokdad et al., 2014).

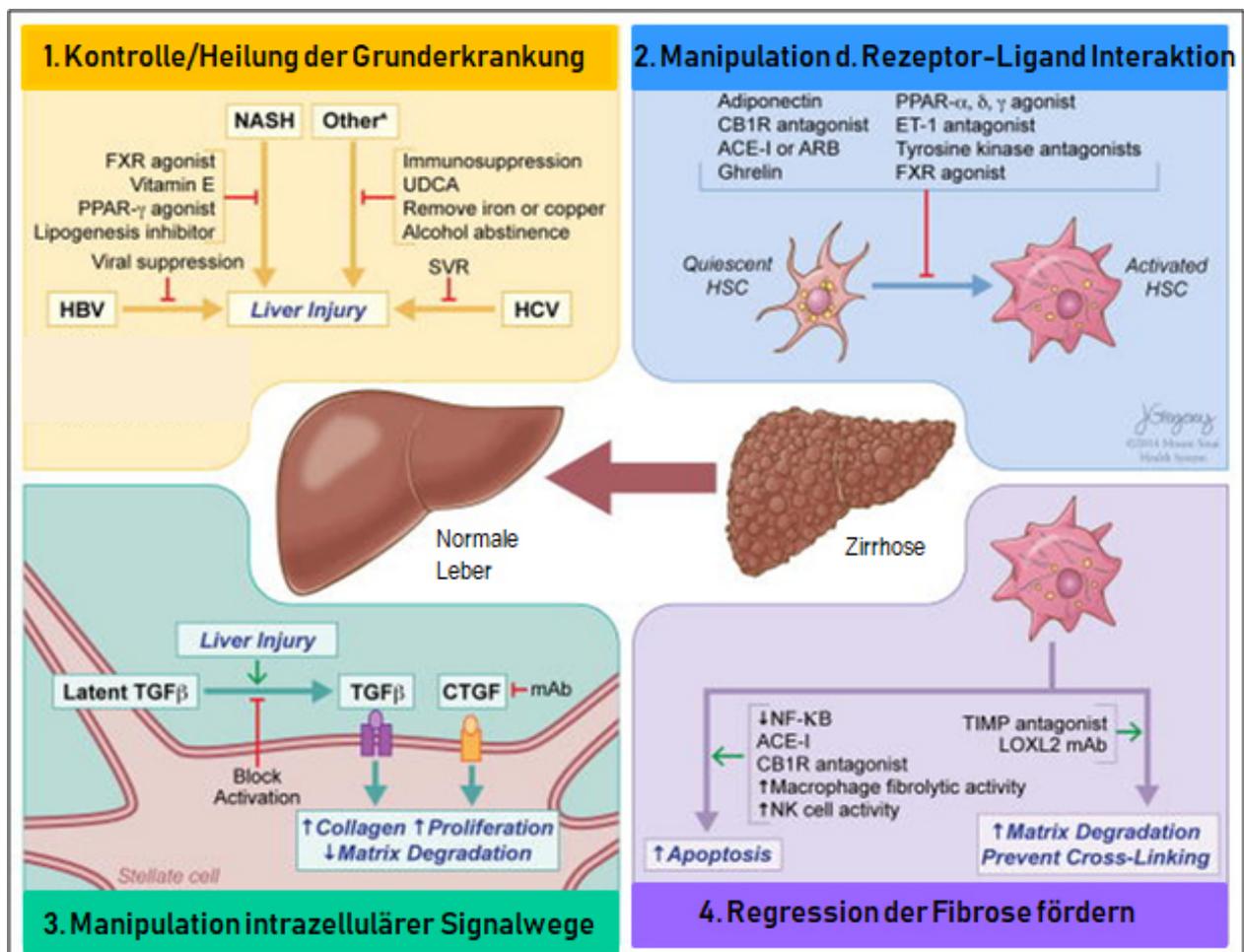
Eine Stadieneinteilung der Leberzirrhose wurde erstmalig 1964 von Child und Turcotte vorgenommen (Child and Turcotte, 1964). Zur Beurteilung des Schweregrads einer LZ wurden Syntheseparameter und klinische Komplikationen anhand eines Scores zusammengefasst, was eine Prognoseeinschätzung und Komplikationsabwägung für

den weiteren Verlauf der Erkrankung ermöglichte. 1973 erfolgte eine Modifikation des Scores durch Pugh, indem er das ursprüngliche Bewertungskriterium „Ernährungszustand“ ausließ und dem Score den Quick-Wert hinzufügte (Pugh et al., 1973). Ein neuerer Score ist der 2001 von Kamath vorgestellte MELD-Score (Kamath et al., 2001), der mittels Syntheseparametern und unter Einbezug von Komplikationsverläufen das Überleben des Patienten bei einer fortgeschrittenen Lebererkrankung einschätzt. Dieser leitet sich ursprünglich aus einem Score zur Prognoseeinschätzung nach einer TIPS-Intervention (transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt) ab, der ein Jahr zuvor von Malinchoc vorgestellt wurde (Malinchoc et al., 2000). Heute findet der Score insbesondere Anwendung in der Lebertransplantationsmedizin (Wedd et al., 2014). Die prognostische Aussagekraft beider Scores ist gleichwertig und durch sie lässt sich grob eine Einteilung in ein kompensiertes und ein dekompensiertes Stadium vornehmen (Papatheodoridis et al., 2005). Das kompensierte Stadium einer Leberzirrhose, das auf rund 40% der Patienten zutrifft, geht lediglich mit Blutwertveränderungen einher (Friedman, 2003). Bei dem dekompensierten Stadium leiden die Patienten unter klinischen Manifestationen wie Ikterus, Ödemen und Aszites (Tsochatzis et al., 2014), die bereits als Komplikationen zu werten sind. Zusätzlich ist bei der LZ das Risiko, an einem hepatozellulären Karzinom zu erkranken, signifikant erhöht (Davis et al., 2003).

Für die Gesamtzahl der Betroffenen wird eine hohe Dunkelziffer vermutet, da sich das klinische Krankheitsbild schleichend manifestiert und die Patienten zunächst über Müdigkeit und geringere Belastbarkeit klagen (Friedman, 2008). Die Umschlagrate von einem kompensierten auf ein dekompensiertes Stadium beträgt jährlich 5-7 %, die Ein-Jahres-Mortalität richtet sich je nach Stadium zwischen 1-57 % (Tsochatzis et al., 2014).

Die Leberzirrhose (LZ) galt zunächst als irreversibles Endstadium einer Leberfibrose. In den letzten Jahrzehnten hingegen wurde von verschiedenen Forschungsgruppen ein enormes Regenerationspotential von Hepatozyten festgestellt. Daher wird die LZ heutzutage als reversible Kondition eingestuft, die unter Therapie Besserung verspricht (Sun and Kisseleva, 2015). Dabei können verschiedene Therapiestrategien bei der Behandlung einer LZ Anwendung finden. Eine davon ist die Behandlung der Ursachen,

welche zu einer deutlichen Besserung der zugrundeliegenden Erkrankung führt. So ist beispielsweise eine Alkoholabstinenz bei toxisch bedingter LZ oder eine Umstellung der Diät bei metabolischer Genese der Regeneration des Leberparenchyms förderlich (Promrat et al., 2010). Eine Abstinenz oder das Weglassen der krankheitsauslösenden Noxe bzw. Schädigung verspricht den deutlichsten Erfolg aller Maßnahmen (Arthur, 2002; Dixon et al., 2004; Hammel et al., 2001). Des Weiteren kann über spezifische Therapieansätze wie z. B. anhand der Bindung von Liganden an Rezeptoren zur Modifikation intrazellulärer Signalwege die Regression der Leberfibrose gefördert werden (Lee et al., 2015).



**Abb. 1:** Lösungsansätze zur Therapie der Leberfibrose (modifiziert nach Lee et al., 2015)

Unter Anwendung dieser Therapieansätze konnte in den letzten Jahren eine deutliche Besserung der Krankheitsverläufe insbesondere für die viralen Hepatitiden der Typen B

und C erzielt werden. Impfprogramme zur Prophylaxe von HBV konnten beispielsweise in Afrika zur regionalen Eindämmung der Verbreitung des Virus beisteuern (Breakwell et al., 2017). Antivirale Therapiestrategien bei chronischer Hepatitis B Infektion mit positivem HBs-Antigen können zur Suppression der Virusreplikation beitragen und somit auch das Auftreten von Komplikationen eindämmen (Liaw et al., 2004). Der fibrotische Umbau der Leber zeigte sich nach der Therapie reversibel (Marcellin et al., 2013). Bei der Infektion mit Hepatitis C Viren konnte durch die Entwicklung neuer antiviraler Substanzen sogar die vollständige Regression der Erkrankung erreicht werden (Morozov and Lagaye, 2018).

Eine weitere wichtige Säule der Behandlung ist wie schon zuvor angeschnitten die medikamentöse Therapie. Bereits etablierte Medikamente, wie die zur Regulation des kardiovaskulären Systems wie Sartane oder ACE-Hemmer (Sauerbruch and Trebicka, 2014), können einen positiven Effekt auf eine bestehende Leberzirrhose haben.

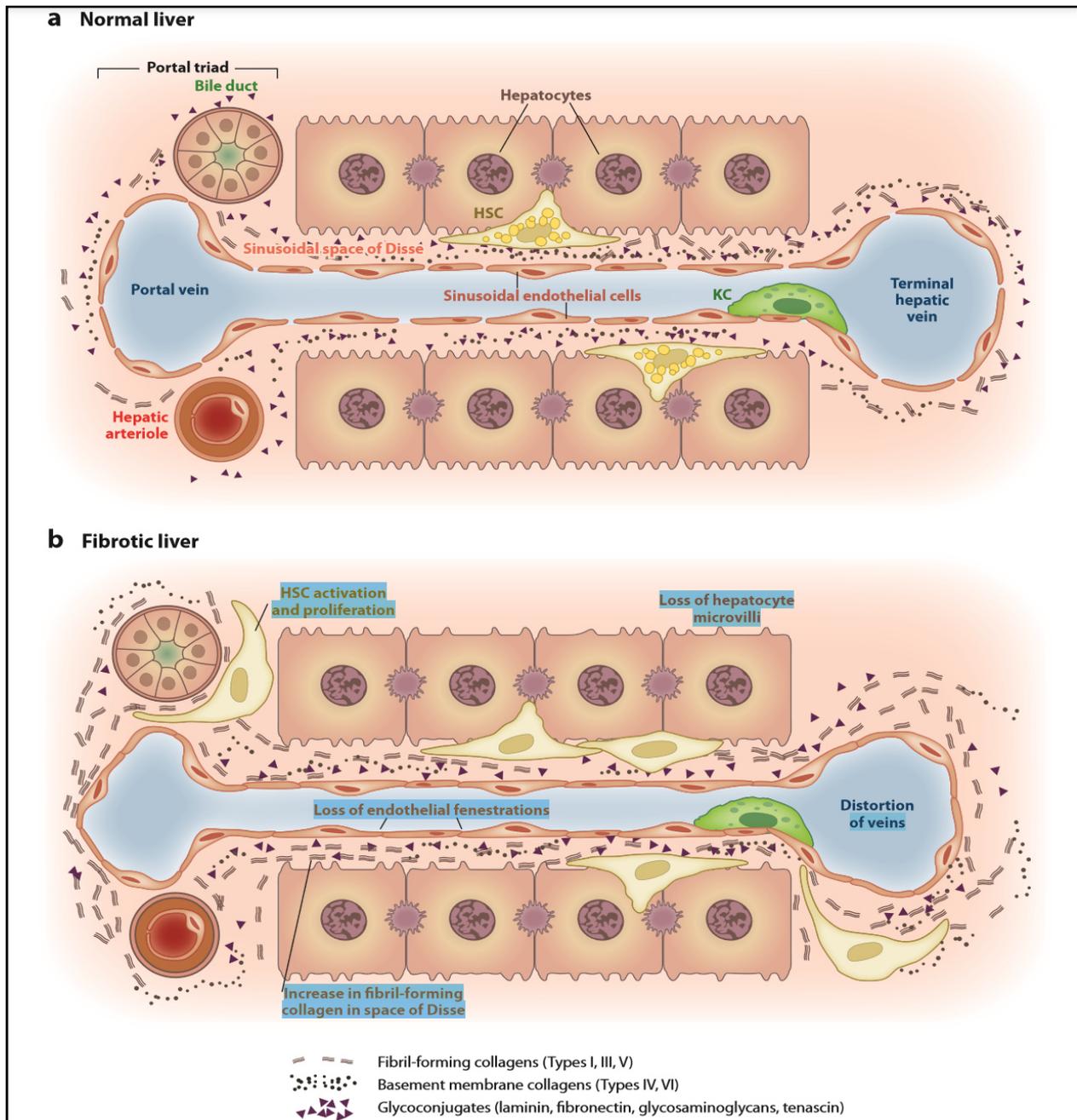
Als Ultima Ratio der Therapie gilt die Lebertransplantation. Die Dringlichkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze wird unter anderem dadurch verdeutlicht, dass die Leberzirrhose mit einer Fallzahl von europaweit mehr als 5500 Transplantationen jährlich den häufigsten Grund einer Lebertransplantation darstellt (European Association for the Study of Liver, 2016).

## **2.2 Pathophysiologie der Leberfibrose**

Die Leber ist mit etwa 1,5 kg die größte Drüse des menschlichen Körpers. Rund 80 % des Lebervolumens nehmen die Hepatozyten ein, die für den Großteil der metabolischen und exokrinen Aufgaben verantwortlich sind. Die nicht-parenchymatösen Zellen beanspruchen rund 6,5 % des Gesamtvolumens, machen jedoch ca. 40 % der gesamten Zellzahl aus (Kmieć, 2001). Die Anordnung der Zellen erfolgt in einer festen Struktur, den sogenannten periportalen Feldern (Elvevold et al., 2008).

Bei dem fibrotischen Umbau unterliegen einzelne Zellreihen im Lebergewebe morphologischen und funktionalen Veränderungen, die zu einer hepatischen Insuffizienz führen (Bataller and Brenner, 2005). Die Hepatozyten weisen eine veränderte

Zusammensetzung ihrer Plasmamembran auf, wodurch sich die Dichte der Membran erhöht. Zudem kommt es zu einem deutlichen Verlust ihrer Mikrovilli, sodass eine verminderte Stoffaustauschfläche resultiert (Zhou, 1990).



**Abb. 2:** schematische Darstellung der Veränderungen der normalen Leber bei einer Fibrose (Hernandez-Gea and Friedman, 2011)

Eine weitere wichtige Zellgruppe für die Entstehung der Leberfibrose sind Lebersinoidale endotheliale Zellen (LSECs). Im physiologischen Zustand sind sie fenestriert und bilden eine diskontinuierliche Begrenzung zwischen Sinus und

Subsinoidalraum (Elvevold et al., 2008). Somit ermöglichen sie einen großzügigen Stoffaustausch. Bei der Fibrose ist diese Fenestrierung vermindert und der Stoffaustausch folglich eingeschränkt. Dieses Phänomen wird mit dem Begriff *Sinusoidales Remodelling* beschrieben (Iwakiri et al., 2014). Eine weitere Zellreihe, die für die Fibrogenese von Bedeutung ist, stellen Kupfferzellen dar. Es handelt sich um organspezifische Makrophagen, die sich resident im sinoidalem Lumen der Leber befinden und bei erhöhtem Widerstand der Leberperfusion aktiviert werden (Bataller and Brenner, 2005). Zusätzlich wandern weitere nicht-residente, inflammatorische Zellen wie Monozyten und Lymphozyten bei der Leberfibrose aus dem Blut in das Parenchym ein, um den Abbau untergegangener Zellen zu unterstützen. Daraus wird ersichtlich, dass es sich bei der Leberfibrose um eine Inflammation des Organs handelt (Maher, 2001). Außerdem sind für die Entstehung der Leberfibrose insbesondere die Hepatischen Sternzellen entscheidend, die im weiteren Verlauf erklärt werden (s. Kapitel 2.2.2 „Hepatische Sternzellen (HSCs“).

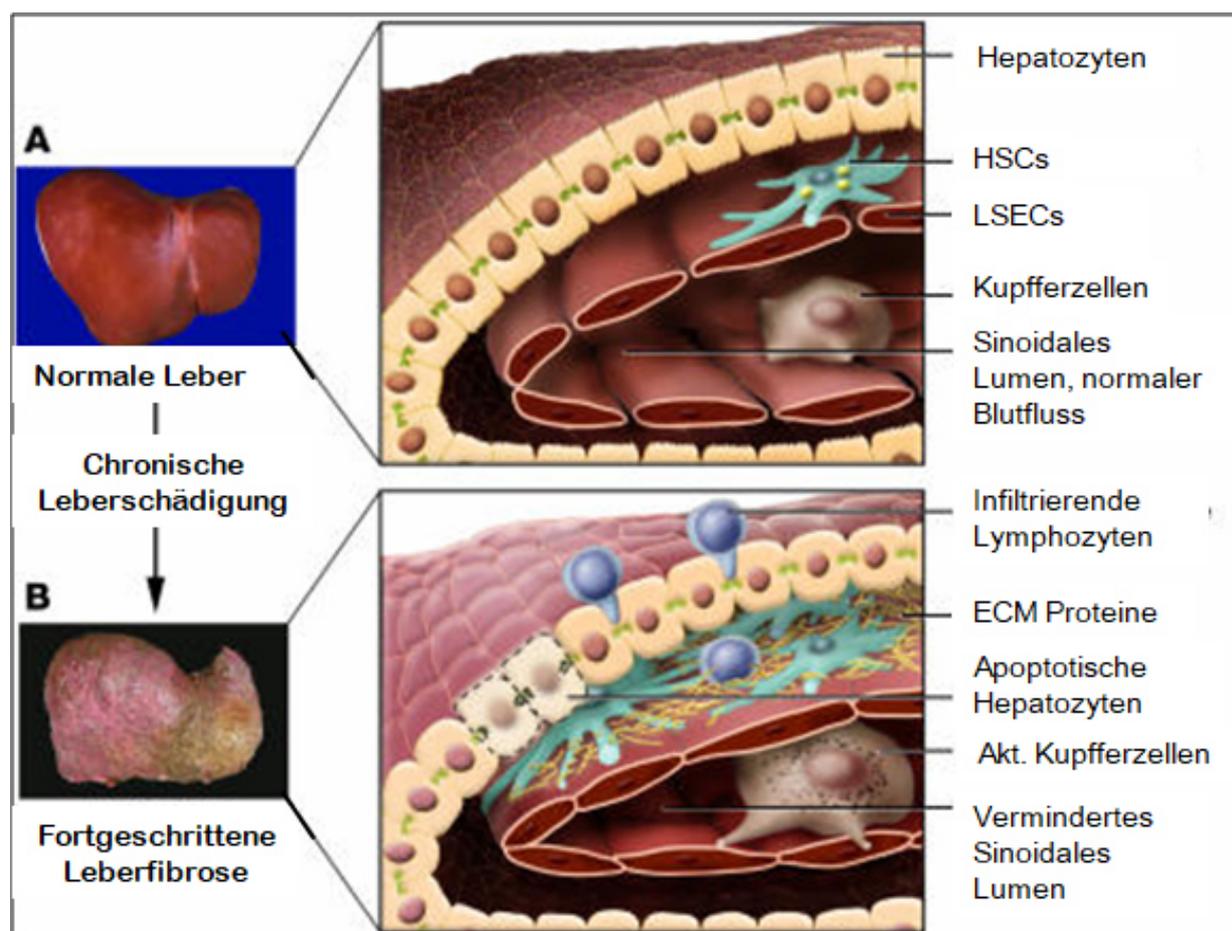
Die Zirrhose ist histologisch als Endstadium einer Fibrose, die mit einem knotigen parenchymatösen Umbaus des Lebergewebes einhergeht, definiert (Friedman, 2003). In Form von bindegewebigen Strängen durchzieht Narbengewebe das Leberparenchym und bildet schließlich Regenerationsknötchen (Tsochatzis et al., 2014). Die Latenzzeit zwischen Fibrose und Zirrhose kann je nach zugrunde liegendem Krankheitsbild im Schnitt zwischen 15 bis 20 Jahren betragen (Bataller and Brenner, 2005).

### **2.2.1 Die extrazelluläre Matrix**

Die extrazelluläre Matrix (ECM) befindet sich interstitiell zwischen den Hepatozyten und den sinoidalen Zellen und wird von HSCs sezerniert. Sie sorgt für mechanische Stabilität und ein homöostatisches Milieu, in welchem Nährstoffe diffundieren, die wiederum die metabolische Versorgung des Gewebes gewährleisten. Anhand von Ablagerung, Zersetzung und Modifizierung der einzelnen Komponenten unterliegt die ECM einem stetigen, dynamischen Umbau, der bei der Leberfibrose gestört ist (Neve et al., 2014).

Physiologisch besteht ein Gleichgewicht zwischen der Produktion und dem Abbau der ECM. Für den Abbau sind extrazelluläre Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs)

verantwortlich, als spezifisch für die Leber gilt MMP2/3 (Bataller and Brenner, 2005). Hierbei handelt es sich allgemein um Endopeptidasen, die an der Lösung der Vernetzung verschiedener Fasertypen wie Kollagen, Elastin und Fibrin beteiligt sind und dadurch die Beschaffenheit der Matrix modifizieren (Giannandrea and Parks, 2014). Ihre Aktivität wird mittels antagonistisch wirkender Proteine, den Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMPs), reguliert (Arthur, 2000). Das Äquilibrium der Prozesse ist bei der Leberfibrose seitens der Produktion und Vernetzung der ECM verlagert: Es sind vermehrt fibrille Fasern wie Elastin sowie Kollagen Typ I, III und IV vorzufinden, deren zusätzlich erhöhtes Crosslinking Einfluss auf die Versteifung der ECM nimmt (Friedman et al., 1985). Schließlich durchstreift die paucicelluläre, verdichtete ECM zunehmend das Leberparenchym und präsentiert das typische Bild von Narbengewebe (Lee et al., 2015).



**Abb. 3:** Zusammenfassende dreidimensionale Darstellung der Komponenten, die zur Leberfibrose führen (modifiziert nach Bataller and Brenner, 2005)

### 2.2.2 Hepatische Sternzellen (HSCs)

1876 wurden erstmals die hepatischen Sternzellen in ihrer aktivierten Form von Prof. von Kupffer beschrieben (Bataller and Brenner, 2005). Embryologisch entspringen sie der Neuralleiste, daher exprimieren sie neurale Markerproteine wie das saure Gliafaserprotein und Nestin (Niki et al., 1999). In der Leber selbst machen sie schätzungsweise 15 % der residenten Leberzellen aus (Friedman, 2000). HSCs sind in ihrem inaktivierten Zustand fettspeichernde, mit Vitamin A beladene Zellen, die sich im subendothelialen Disse-Raum befinden (Bosch et al., 2015). 1901 wurde die inaktivierte Form erstmals von dem japanischem Anatom Ito beschrieben, der fälschlicherweise zunächst von einer eigenen Zellreihe ausging. Diese Entdeckung führte zur synonymen Bezeichnung der hepatischen Sternzellen als Ito-Zellen, die sich auch heute noch in der Literatur findet (Ito et al., 1952). Seit den 1980ern ist bekannt, dass sie für die Fibrose eine Schlüsselrolle einnehmen, da sie verglichen mit den andern Zellreihen die meiste extrazelluläre Matrix (ECM) produzieren (Friedman et al., 1985).

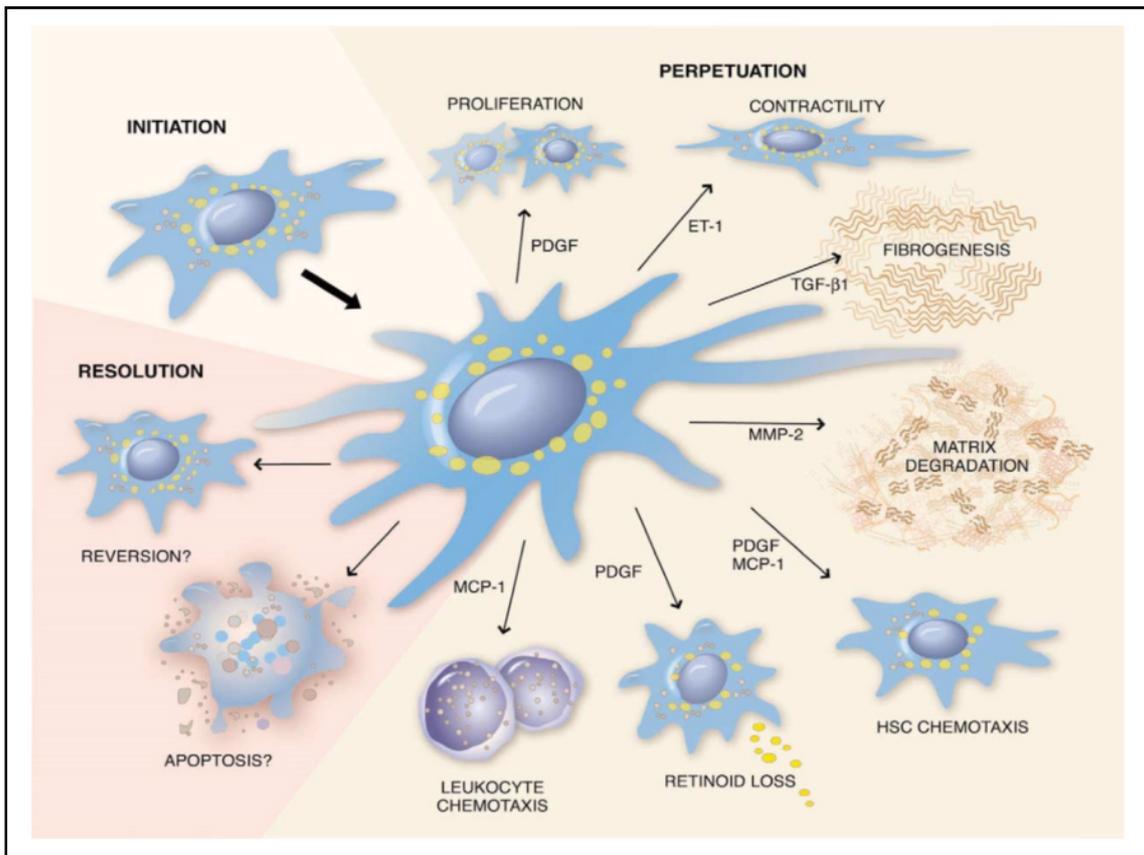
In ihrer aktivierten Form differenzieren sie sich zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen, die proinflammatorische, fibrogene und kontraktile Eigenschaften besitzen. Morphologisch fallen die reduzierten Fettspeicher und die Ausbildung kontraktiler Fortsätze auf (Bosch et al., 2015). Entsprechend werden von ihnen myogenen Marker exprimiert, von denen der bedeutendste  $\alpha$ SMA ist (Morrison et al., 1999). Die kontraktile Ausläufer sind für die Migration entscheidend. Die mitogenen HSCs ersetzen an der Wundnarbe niedergegangene Hepatozyten durch die Produktion von ECM (Bataller and Brenner, 2005; Bosch et al., 2015). Ein wichtiger Stimulus für die Migration und Proliferation ist das Zytokin PDGF, welches in der Leberzirrhose vermehrt vorzufinden ist (Pinzani et al., 1989). Zusätzlich wirkt es chemotaktisch auf Lymphozyten und Monozyten und ist daher proinflammatorisch (Maher, 2001; Marra et al., 1999a).

Zunächst befinden sich die HSCs bei der Aktivierung in einem proinflammatorischen Stadium oder auch der sogenannten Initiationsphase (Friedman, 2000). Auf humoraler Ebene spielen mehrere Zellreihen eine wichtige Rolle. Hepatozyten z.B. entfalten ihre fibrogene Wirkung über deren Apoptose (Canbay et al., 2004), indem Sauerstoffradikale, die über die NADPH-Oxidase produziert werden, freigesetzt werden (Friedman, 1999).

Des Weiteren erfolgt eine verstärkte Chemotaxis proinflammatorischer Zellen durch Zytokine, dessen bedeutendster Vertreter der Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) ist. Es wird von geschädigten endothelialen Zellen sezerniert (Friedman, 1999).

Chronische pathologische Stimuli begünstigen wiederum die Aufrechterhaltung des Aktivierungszustandes der HSCs, auch Perpetuation genannt. Zu den zugrundeliegenden Pathomechanismen zählen die verstärkte Exprimierung von Membranrezeptoren der aHSCs, die erhöhte Proliferation, aber auch die vermehrte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (Friedman, 1999). Das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren führt zur Potenzierung der fibrotischen Effekte. Auf intrazellulärer Ebene werden diese über das RAS und die Ras-Raf-ERK1/2-Signalkaskade vermittelt (Marra et al., 1999b). Der Zusammenhang des RAS und der Signalwege wird im Verlauf genauer erläutert (siehe Kapitel 2.4.3 „Signalkaskaden“). Die Inflammation wird unter anderem durch Lymphozyten und Monozyten aufrecht erhalten, aber auch durch Autoinduktion der aHSCs. Anhand dessen wird ein Ausbrechen aus dem Kreislauf erschwert (Bataller and Brenner, 2005). Eine Möglichkeit des Verlassens des autoinduktiven Zustands stellt letztlich die Apoptose oder die Seneszenz der aHSCs dar (Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Troeger et al., 2012).

Zusammengefasst wird deutlich, dass die aHSCs die entscheidende Rolle in der Fibrogenese der Leber spielen. Dennoch hängt die Fibrogenese der Leber von den Interaktionen und den eigenen Wirkweisen vieler verschiedener Zellreihen ab, was die Komplexität der Pathogenese betont.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Funktionen bei der Aktivierung der HSCs in den verschiedenen Phasen (Friedman, 2003)

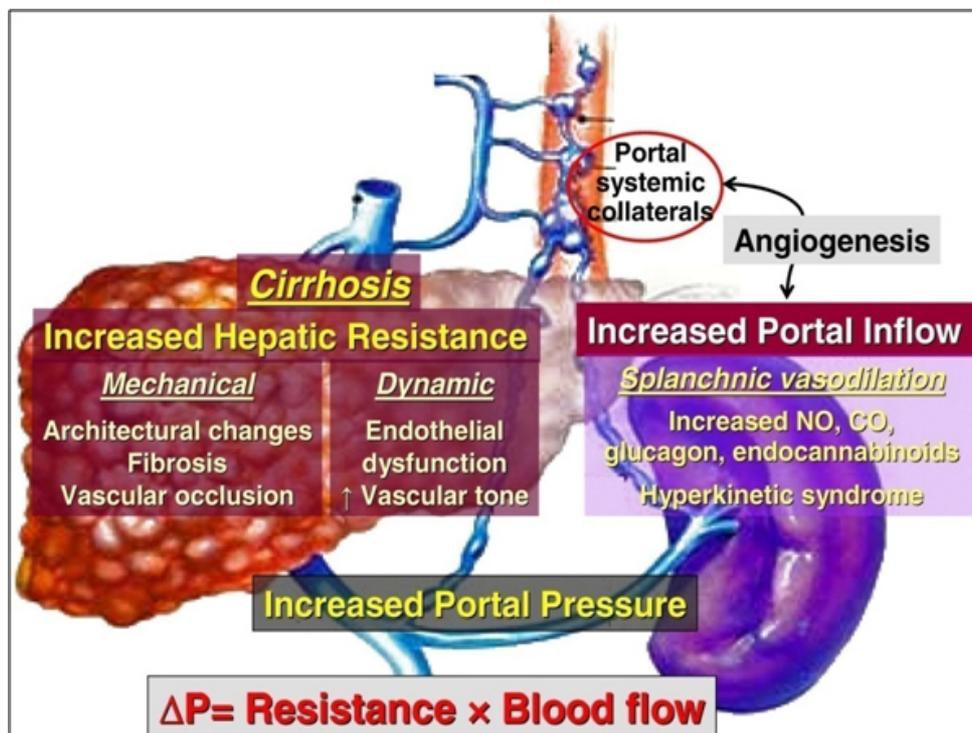
## 2.3 Pathophysiologie zu Komplikationen der Leberfibrose

### 2.3.1 Portale Hypertension

Bei der Portalen Hypertension (PH) handelt es sich um eine Begleitpathologie von Lebererkrankungen (Sauerbruch and Trebicka, 2014). Hierbei ist in westlichen Ländern mit 90 % die dominierende Ursache die Leberzirrhose, weltweit gilt die Schistosomiasis als häufigste Genese einer PH (Bosch et al., 2008). Der normale Pfortaderdruck beträgt beim Gesunden 1-5 mmHg, von einer PH spricht man bei Drücken ab 10 mmHg (Groszmann et al., 2005). Bei Erstdiagnosestellung bestehen bereits bei 60 % der Patienten Symptome (Bosch et al., 2008).

Die PH beschreibt die Anwendung des Ohm'schen Gesetzes auf die hämodynamische Zirkulation des Blutflusses. Der portale Druckgradient ( $\Delta P$ ) ist direkt proportional zur Blutzirkulation durch das portalvenöse System ( $Q$ ) und dem Widerstand des Blutflusssystemes ( $R$ ) ( $\Delta P = Q \times R$ ) (Bosch et al., 2015).

Die in den 1970ern beschriebene splanchnische Vasodilatation, die bei der PH beobachtet wurde, ist zunächst als Folge einer Stauung durch erhöhten intrahepatischen Widerstand verstanden worden und galt als Hauptgrund der Pathogenese einer PH (Groszmann et al., 1972). Nach dieser These wurde die „backward-flow“-Theorie begründet. Dabei besteht die Annahme, dass durch Stase der Gesamtblutfluss vermindert ist und es sich bei der PH um ein hypodynames Syndrom handelt. Für die mechanische Komponente der Widerstandserhöhung sind zum größten Teil die HSCs verantwortlich, da sie durch die gesteigerte Matrixproduktion und Kontraktilität maßgeblich den Blutfluss behindern (Rockey, 2006).



**Abb. 5:** Darstellung der Pathomechanismen zur Entstehung der portalen Hypertension (Bosch et al., 2015)

Mechanismen, die der Aktivität der aHSCs bei der PH entgegenwirken, sind beispielsweise eine Reihe vasodilatatorischer Moleküle, die von endothelialen Zellen sezerniert werden. Das potenteste ist Stickstoffmonoxid (NO), das über die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) gebildet wird (Wiest and Groszmann, 2002). Im Zuge der PH ist die Wirkung von NO durch posttranslationale Vorgänge der Effektoren allerdings gestört.

Zudem entstehen durch den Blutstau gehäuft Mikrothromben im portalen Blutfluss der Leber, die den Gesamtwiderstand des Organs erhöhen (Simonetto et al., 2015).

Neuere Erkenntnisse führen unter Einbezug der erhöhten, durch VEGF vermittelten Angiogenese zu der Annahme eines insgesamt erhöhten Blutflusses. Durch Bildung von Kapillaren und kollateralen Blutabgängen sowie der Nutzung von Umgehungskreisläufen, sogenannten Shunts, findet man einen insgesamt erhöhten Blutfluss vor. Darauf begründet sich die „forward-flow“ Theorie, die von einer hyperdynamen Zirkulation ausgeht (Bosch et al., 2015). Auf lange Sicht führen die beschriebenen Phänomene zu einer erhöhten Perfusion im splanchnischen Gebiet (Groszmann, 1994).

### **2.3.2 Hepatische Enzephalopathie**

Der Begriff hepatische Enzephalopathie beschreibt eine häufige Begleiterscheinung der Leberzirrhose, deren Pathogenese bis heute nicht gänzlich verstanden ist (Cordoba, 2014). Es handelt sich um eine zentrale Neuroinflammationsstörung (Butterworth, 2011). Sie wird durch Substanzen verursacht, die beim Gesunden von der Leber verstoffwechselt werden und zu einem hohen Anteil dem hepatischen First-Pass-Effektes unterliegen (Cordoba, 2014).

Die Mikroglia wird infolge dessen aktiviert und sezerniert neuronale Entzündungsmarker wie die Zytokine IL-1b und TNF- $\alpha$ . Dadurch ist die Permeabilität der Bluthirnschranke erhöht. Dies führt wiederum zu einem Flüssigkeitseinstrom (Butterworth, 2011; Friedman et al., 2009), woraus eine intrakranielle Druckerhöhung mit abnormaler zerebraler Zirkulation und Ödembildung resultiert. Der Patient leidet unter mentaler Eintrübung, Müdigkeit oder Agitiertheit, was sich in der Maximalvariante als Koma äußern kann (Cordoba, 2014).

## **2.4 Das Renin-Angiotensin-System**

### **2.4.1 Das „klassische“ Renin-Angiotensin-System**

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein komplexes System aus multiplen Peptiden und Signalwegen, das der Regulation der fluiden Hämostase dient (Mendoza and Lazartigues, 2015). Unter dem klassischen RAS wird die ANGI/AT1R-Achse verstanden,

welche bei akuter Stimulation mittels Vasokonstriktion und Bilanzierung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes den Blutdruck reguliert (Geisterfer et al., 1988). Bei einer chronischen Aktivierung werden Hypertrophie und Hyperplasie glatter Muskelzellen sowie inflammatorische Prozesse stimuliert (Mehta and Griendling, 2007). Zuerst erfolgt die Synthese von Angiotensinogen, einem Dekapeptid aus den Hepatozyten. Über Spaltprozesse, anfangs durch Renin, wird es zu Angiotensin I (ANGI), welches dann durch die Peptidase ACE zu dem Oktapeptid Angiotensin II (ANGII) konvertiert wird. Dieses gilt als das Haupteffektorhormon des klassischen RAS (Mehta et al., 2014; Nguyen Dinh Cat and Touyz, 2011). Über die Bindung an den G-Protein gekoppelten Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1 (AT1R) werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die letztlich eine Kontraktion der vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) auslösen.

Dem RAS als endokrines System steht die parakrine Aktivierung in lokalen Geweben gegenüber (Lavoie and Sigmund, 2003). Im Gehirn beispielsweise können für den Blutdruck regulatorische Effekte beobachtet werden, die auf ein eigenständiges, organspezifisches RAS schließen lassen. Bei einem Anstieg des Blutdrucks wird die Blut-Hirn-Schranke durchlässiger und lässt ANGII passieren, was wiederum zur Aktivierung der Astrozyten einschließlich morphologischer Änderungen führt (Mendoza and Lazartigues, 2015). Es wird vermutet, dass dieser Pathomechanismus mit zahlreichen neurologischen Erkrankungsbildern in Zusammenhang steht wie z.B. eine eingeschränkte kognitive Funktion oder Migräne (Horiuchi, 2014; Ripa et al., 2014).

In der Leber konnte ein lokales RAS mit hoher Expression von leberspezifischem Renin und ACE sowie die Sekretion von ANGII nachgewiesen werden (Bataller et al., 2003a). Durch Bindung an den AT1R kommt es in der Leber zur Kontraktion und Proliferation (Bataller et al., 2000). Bei exzessiver Gabe von ANGII über eine osmotische Pumpe konnte man in Ratten eine Verdickung der Lebergefäße sowie Thrombenbildung in kleinen hepatischen Gefäßen beobachten (Bataller et al., 2003b). Diese Wirkung beruht auf der Bindung des Effektormoleküls an den AT1R von Endothelialen Zellen (ECs) der Lebergefäße. Zusätzlich führt ANGII in hohen Konzentrationen zu einer Aktivierung der ruhenden HSCs, die mit einer Phänotypveränderung einhergeht und in geschädigtem

Gewebe wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.2.1 „Die extrazelluläre Matrix“) die ECM-Synthese fördert (Bataller et al., 2003a).

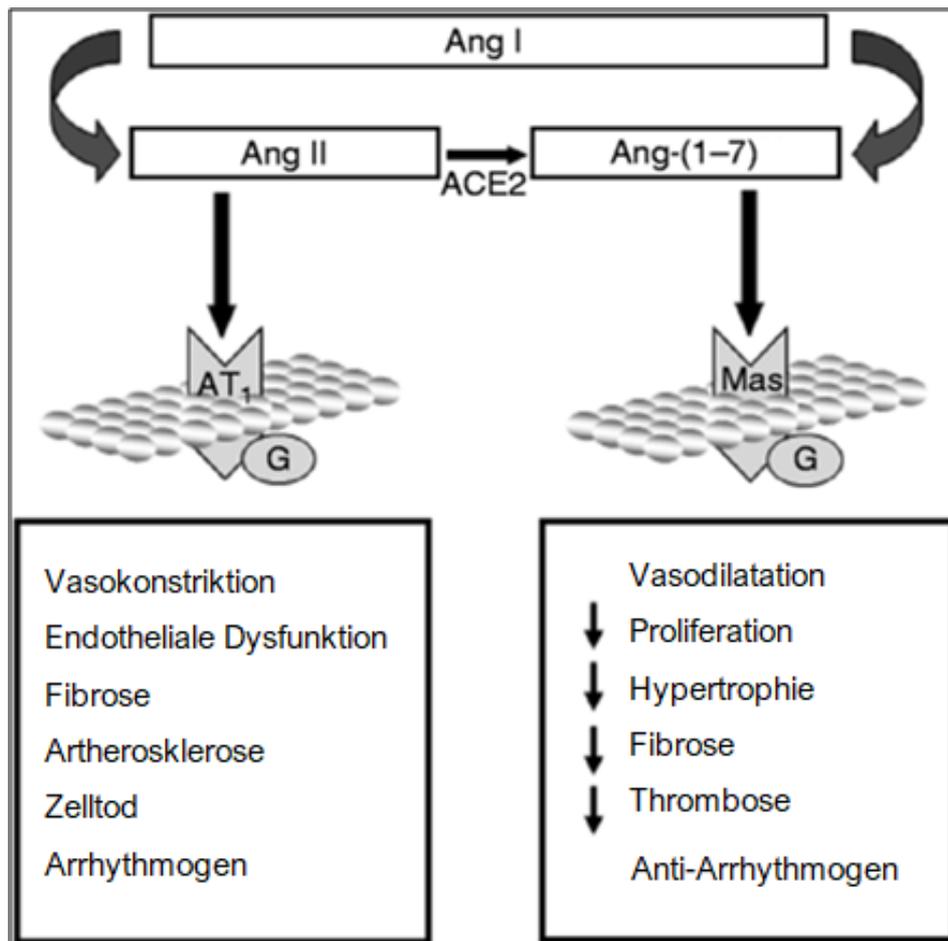
Der AT1R gehört zu der Familie der 7-TM-Rezeptoren (Griendling et al., 1996). Mittels G<sub>q</sub>-gekoppelter Signalwege kommt es über verschiedene Phospholipasen, insbesondere die Phospholipase C, und Second-Messenger wie Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP3) zum Anstieg des intrazellulären Kalziums. Die Myosin-Leichtketten (MLC) werden durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) phosphoryliert, was zur Kontraktion durch Interaktion von Myosin mit Aktinfilamenten führt (Yan et al., 2003). Die MLCK wird von der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) gegengesteuert, die die Lösung des Myosin von den Aktinfilamenten unter Abspaltung einer Phosphatgruppe begünstigt. Eine anhaltende, verlängerte Kontraktion kann folglich mit der Inhibition der MLCP herbeigeführt werden. Diesen Effekt vermitteln Rho-Kinasen (ROCK) (Mehta and Griendling, 2007). Physiologische Wege, einer überschießenden Stimulation des AT1R entgegenzuwirken, sind einerseits die Bildung von Homo- und Heterodimeren, z.B. mit dem AT2R, (Mehta and Griendling, 2007), andererseits die Endozytose des Rezeptors ca. 10 min nach Aktivierung (Gironacci et al., 2011). Anschließend wird er zu 25 % an die Membran zurückverlagert, zu 75 % in Lysosomen abgebaut (Griendling et al., 1987). Außerdem kann eine zellendogene Phosphorylierung des Rezeptors einen Aktivitätsstop bewirken (Oppermann et al., 1996).

#### **2.4.2 Das „alternative“ Renin-Angiotensin-System**

Neben dem bisher beschriebenen „klassischen“ RAS wurde mit der Entdeckung des Mas-Rezeptors (MasR) 1986 von Young et al. der Weg für die Erforschung des sogenannten „alternativen“ RAS geebnet (Young et al., 1986). Die Zuordnung des MasR zum RAS konnte dank Jackson et al. erstmalig 1988 erfolgen, als eine Antwort des Rezeptors bei Bindung der Metabolite ANGI, ANGI<sup>II</sup> und ANGI<sup>III</sup> festgestellt wurde (Jackson et al., 1988). Das alternative RAS ist den Funktionen des klassischen RAS entgegengesetzt und besitzt vasodilatative, antiproliferative und antihypertensive Eigenschaften auf VSMCs. Seitdem bringen immer neuere Erkenntnisse über Metaboliten, Rezeptoren und Enzyme die Komplexität des RAS nahe.

Ein wichtiges Schlüsselenzym in dieser Achse ist das ACE2, eine membrangebundene Hydrolase, welche entweder ANGI zu Ang(1-9) oder ANGI direkt zu Ang(1-7) konvertiert (Pereira et al., 2009; Santos et al., 2000). Im Anschluss kann Ang(1-9) weiter zu Ang(1-7) durch ACE oder Neprilysin umgewandelt werden (Mehta and Griendling, 2007). Die Umwandlung aus Ang(1-9) kann jedoch aufgrund der 400-fach höheren Affinität von ACE2 zu ANGI auf physiologischer Ebene vernachlässigt werden (Vickers et al., 2002). Ang(1-7) wurde 2003 von Santos et al. als spezifischer Ligand für den Mas-Rezeptor identifiziert (Santos et al., 2003). Durch die Abspaltung des Phe an C-terminaler Position von ANGI entfällt bei dem neu entstandenem Ang(1-7) die spezifische Bindungsstelle des ANGI an den AT1R (Pereira et al., 2009). Obwohl Ang(1-7) aufgrund rascher Hydrolisierung nur sehr kurzlebig ist, ist das Verhältnis von dem Liganden und ANGI maßgeblich für die Aktivierung der ERK-Signalkaskade von Bedeutung (Mehta and Griendling, 2007).

Zusätzlich ist bei der Leberzirrhose ein erhöhter ACE2-Spiegel vorhanden. Dieser beeinflusst das ANGI/Ang(1-7)-Gleichgewicht zugunsten des Ang(1-7), wodurch antifibrotische Effekte gefördert werden (Paizis et al., 2002). Der erhöhte Spiegel kann ebenfalls medikamentös durch Blocker des RAS herbeigeführt werden und begünstigt den therapeutischen Effekt (Pereira et al., 2007). Seine Wirkung ist in besonderem Maße durch die Inhibition der ROS bedingt und unterbindet dadurch die von der AT1R-Achse vermittelte Fibrose (Zhang et al., 2016). Der MasR nimmt durch Heterodimerisierung mit dem AT1R zusätzlich regulatorischen Einfluss auf die Vasokonstriktion (Hunyady and Catt, 2006).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des RAS mit der fibrotischen (AT<sub>1</sub>R) und anti-fibrotischen (MasR) Achse einschließlich einer Zusammenfassung ihrer Funktionen (modifiziert nach Santos et al., 2012)

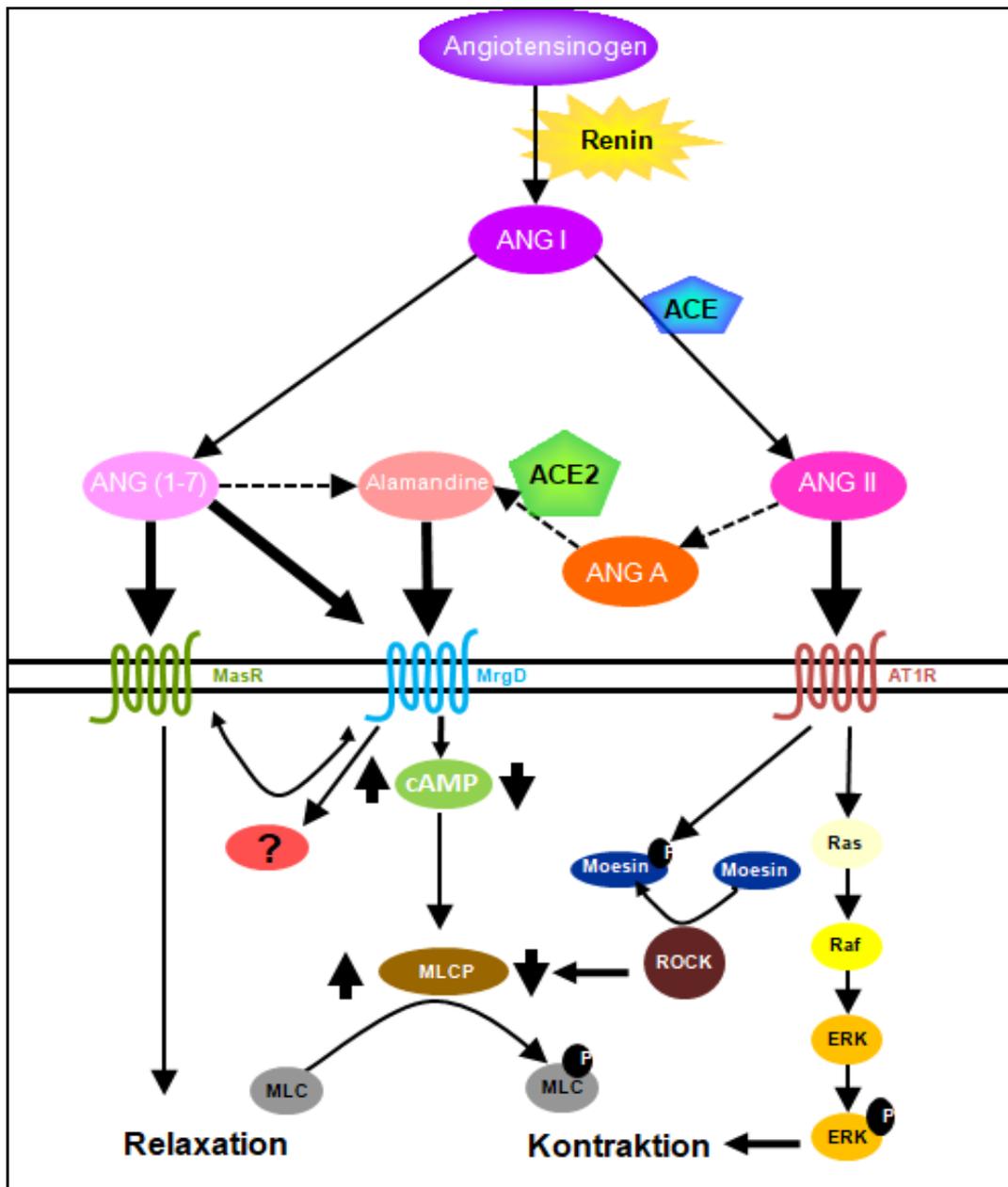
Ferner konnte die Hochregulation des MasR bei Leberzirrhose mit begleitender portaler Hypertension sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten gezeigt werden (Grace et al., 2013). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Wirkung des RAS auf die Leber aus dem Verhältnis von der MasR-Aktivität zur AT<sub>1</sub>R-Aktivität resultiert.

### 2.4.3 Signalkaskaden

Bei Bindung des Liganden ANGII werden durch den AT<sub>1</sub>R verschiedene Signalkaskaden aktiviert. Diese verschiedenen Untergruppen sind die MAP-Kinasen (ERK1/2, JNK (c-junct. NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen), p38MAPK), die Rezeptor Tyrosin-Kinasen (PDGFR, EGFR, Januskinase, Insulin-Rezeptor) und die NADPH-Oxidase (ROS) (Mehta and Griendling, 2007). Die einzelnen Signalkaskaden laufen nicht streng linear ab, sondern interagieren

untereinander. Die Effektormoleküle einzelner Signalwege ermöglichen durch den sogenannten „Crosstalk“ eine gegenseitige Stimulation oder Inhibition über Feedbackschleifen. Des Weiteren kann jede einzelne Signalkaskade durch eine Vielzahl von Wegen und Molekülen aktiviert werden (Mehta and Griendling, 2007; Sparks et al., 2014). Die verschiedenen Effekte treten hingegen mit zeitlichen Differenzen auf: Die G-Protein-gekoppelte Signalwege laufen binnen weniger Sekunden ab, die der MAPK binnen Minuten und der JAK-Signalweg schließlich innerhalb von Minuten bis Stunden. Die Aktivierung einzelner Kaskaden zeigt bezüglich der Affinität deutliche lokale und gewebespezifische Unterschiede (Mehta and Griendling, 2007).

Von den MAPK ist der ERK1/2-Signalweg am besten charakterisiert. Der Signalweg Ras/Raf/MEK/ERK führt zur Zellkontraktion und Zellhypertrophie, ist antiapoptotisch, inflammatorisch und promotogen (Nguyen Dinh Cat and Touyz, 2011). Nach Bindung des AT1R wird die Kaskade innerhalb von 5 Minuten durch DAG aktiviert und nach erfolgter Kontraktion kalziumabhängig blockiert (Hunyady and Catt, 2006). ERK interagiert mit über 150 Substanzen sowohl im Zytosol als auch im Nucleolus und ist im Crosstalk vielen anderen Signalwegen zwischengeschaltet (Matallanas et al., 2011). So kann beispielsweise über  $\beta$ -Arrestin eine G-Protein unabhängige ERK-Stimulierung erfolgen (Kim et al., 2005). Die präzise Aktivierung über die Konzentration und Aktivität von ERK führt zu verschieden stark ausgeprägten Sekretion von Wachstumsfaktoren und damit zu unterschiedlichen Zellantworten (Matallanas et al., 2011).



**Abb. 7:** vereinfachtes Schema der RAS Signalkaskaden

## 2.5 Der MrgD-Rezeptor

Um die Jahrtausendwende ist mit dem Fortschritt in der DNA-Sequenzierung murine cDNA anhand von Gendatenbanken analysiert worden (Dong et al., 2001). Dabei wurden Kodierungen für zahlreiche Peptide entdeckt, die der Gensequenz des Mas-Rezeptors nahe kamen. Es handelte sich um G-Protein gekoppelte 7-TM-R, weshalb man sie als mas-related-gene-receptors, Mrg-Rezeptoren bezeichnete (Bader et al., 2014; Dong et al., 2001). Ihre Einteilung erfolgt in 9 Familien A-H und X, die sich

wiederum in weitere Untergruppen klassifizieren lassen, sodass insgesamt über 40 Rezeptoren zu dieser Gruppe zählen (Solinski et al., 2014).

Es wird geschätzt, dass ca. 30 % aller heutzutage eingesetzten Medikamente bereits auf MrgRs wirken (Overington et al., 2006), daher ist die Erforschung ihrer Wirkmechanismen zur Beurteilung von Therapien von hoher Relevanz. Einer dieser Rezeptoren ist der MrgD-Rezeptor. Er wird sehr stark in den dorsalen Hinterwurzelganglien exprimiert (DRG), wo er zur erhöhten neuronalen Erregbarkeit beisteuert (Dong et al., 2001; Milasta et al., 2006; Zylka et al., 2003). Des Weiteren findet er sich in Mastzellen, den Testes, Blase, Uterus, Arterien, weniger im Cerebellum, dem Gastrointestinaltrakt und Fettgewebe (Milasta et al., 2006). Bei Mastzellen nimmt der MrgDR Einfluss auf deren Aktivierung, weshalb dem MrgDR eine proinflammatorische Wirkung zugesprochen wird (Bader et al., 2014). In der Leber selbst wird er am stärksten von Hepatozyten exprimiert (Proteinatlas, 2018).

Bisher sind nur wenige Pathologien bekannt, in denen der MrgDR unmittelbar beteiligt ist. Man weiß um eine Involvierung des Rezeptors bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (Avula et al., 2013), der Atherosklerose (Habiyaqare et al., 2014) und dem Lungenkarzinom (Nishimura et al., 2012).

Zur Regulierung des Rezeptors sind bislang zwei grundlegende Mechanismen bekannt. Zum einen weiß man um die Internalisierung des MrgDR nach Aktivierung von  $\beta$ -Alanin, zum andern findet bei dem MrgDR eine Heterodimerisierung mit dem MrgE-Rezeptor statt, die zur Inaktivierung des MrgDR führt (Milasta et al., 2006). Durch Bindung von  $\beta$ -Alanin konnte ein erhöhter intrazellulärer Kalziumausstrom in den DRG gemessen werden, der über die Phosphorylierung von ERK1/2 vermittelt war (Milasta et al., 2006). Für den MrgDR gibt es genau ein kodierendes Gen, TG7R, das über  $\beta$ -Alanin aktiviert und daraufhin vermehrt synthetisiert wird (Shinohara et al., 2004).

### 2.5.1 Liganden

Während die meisten der MrgRs heute noch als „Orphan“-Rezeptoren gelten, ihnen demnach kein spezifischer Ligand zugeteilt werden kann (Solinski et al., 2014), wurden hingegen beim MrgDR seit seiner Zuordnung in das RAS diesbezüglich viele neue Erkenntnisse gewonnen.

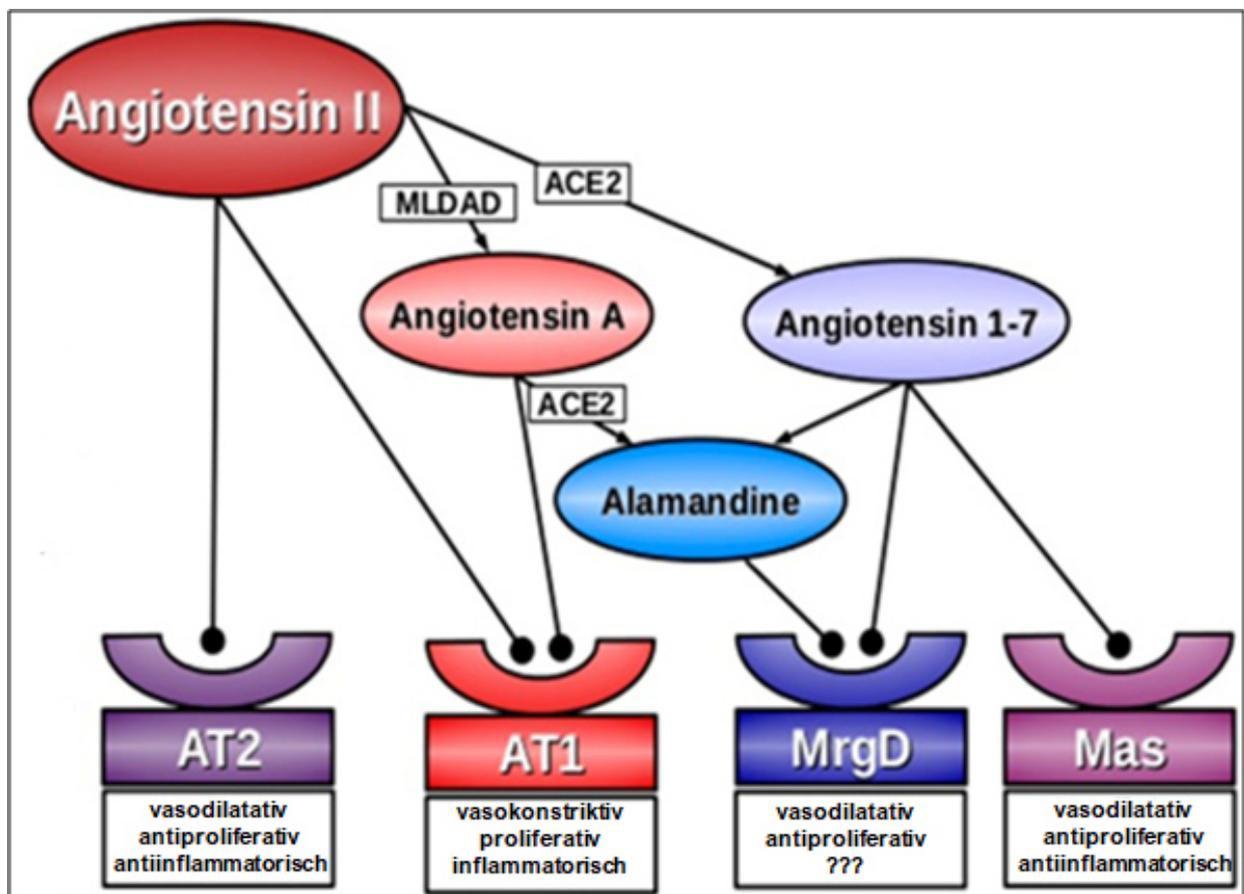
Diverse Liganden können je nach Organsystemen zu unterschiedlichen Effekten führen. Zunächst charakterisierte man  $\beta$ -Alanin als Liganden des MrgDR in DRG. Durch  $\beta$ -Alanin wird Juckreiz, Nozizeption und die Thermosensation reguliert (Bader et al., 2014). Man nimmt an, dass er eine wichtige Rolle in der Modulation neuropathischer Schmerzen spielt. Dabei konnte über die Bindung an den Rezeptor  $G_q$  vermittelt anhand der Synthese von IP<sub>3</sub> die Öffnung von Chloridkanälen beobachtet werden (Hrenak et al., 2016).

Ein weiterer Ligand des MrgDR ist Ang(1-7), durch welches die Verknüpfung zum RAS hergestellt werden konnte. In endothelialen und mesenchymalen Zellen wurde cAMP als second Messenger identifiziert (Tetzner et al., 2016). Man vermutet anhand dessen eine Transduktionskette, die durch Bindung von Ang(1-7) an den MrgDR die Adenylcyclase aktiviert. Diese generiert wiederum cAMP aus ATP. Das cAMP aktiviert im weiteren Verlauf die PKA, welche mittels Stimulation der MLCP eine relaxierende Wirkung auf VSMCs zeigt (Hrenak et al., 2016). Inwiefern die Regulation der cAMP-Generierung mit Interaktionen anderer Signalkaskaden in Verbindung steht, ist für den Rezeptor noch nicht endgültig geklärt. Ein Beispiel für die Regulation der cAMP-Ausschüttung sind die Rho-Kinasen (ROCK), die diese inhibieren und damit eine Kontraktion fördern (Trebicka et al., 2009).

#### 2.5.1.1 Alamandine

Mit der Entdeckung und Charakterisierung von Alamandine wurde ein spezifischer Ligand von Lautner et al. für den MrgDR beschrieben (Lautner et al., 2013), wodurch er nicht mehr als Orphan-Rezeptor zu werten ist. Bei Alamandine handelt sich um ein im menschlichen Blut zirkulierendes Derivat des Angiotensin, (Ala<sup>1</sup>)-Angiotensin/II (1-7), welches über verschiedene Endopeptidasen, unter anderem ACE2, aus Ang(1-7) oder

AngA umgewandelt werden kann (Jankowski et al., 2007; Lautner et al., 2013; Wilson et al., 2015). An der Generierung von Alamandine sind mehrere Regulationsmechanismen beteiligt, von denen allerdings bei weitem noch nicht alle bekannt sind. Ein Beispiel für die Steuerung der Umwandlung von Ang(1-7) zu Alamandine ist die Heterodimerisierung von AT1R und AT2R (Brouwers et al., 2015). Die Bindung von Alamandine vermittelt über eNOS eine NO-Ausschüttung und führt damit zur Relaxation (Lautner et al., 2013). Der relaxierende Effekt konnte an Gefäßwänden jedoch nicht als signifikant beschrieben werden, bei Gabe in einer hohen Dosis wurde aber eine Reduktion von Collagen I, III und Fibronektin beobachtet (Lautner et al., 2013).



**Abb. 8:** Die ANGII-Alamandine-MrgDR-Achse (modifiziert nach Hrenak, 2016)

## 2.6 Fragestellungen

Obwohl mittlerweile über 100 Jahre seit der Entdeckung des RAS vergangen sind, enthüllt die Grundlagenforschung bis heute neue Mitglieder und deren Eigenschaften und Funktionen in der regulären Physiologie und bei Erkrankungen (Sparks et al., 2014). Bei dem MrgDR ist zum großen Teil die biologische und pathologische Relevanz noch unklar (Hrenak et al., 2016). Seine weitere Erforschung im Leberstoffwechsel und den Komplikationen bei Leberfibrose ist für die Entwicklung möglicher Therapiestrategien unumgänglich.

Daher soll in dieser Arbeit folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Welche Veränderungen treten bei MrgDR-defizienten Mäusen im Vergleich zu deren Wildtypen nach Induktion einer Leberfibrose (toxisch, cholestatisch und metabolisch) auch im Hinblick auf assoziierte Komplikationen auf?
2. Welche intrazellulären Signalwege des RAS können durch eine MrgDR-Defizienz verändert sein?
3. Welche Auswirkungen hat die MrgDR-Defizienz auf die zerebrale Inflammation als Maß für die hepatische Enzephalopathie?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Antikörper

**Tab. 1:** Primäre Antikörper

<b>Antigen/Herkunft</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Hersteller/Kat. Nr.</b>	<b>Verdünnung</b>
αSMA aus Kaninchen IgG	WB	Abcam, Cambridge, UK Kat. Nr. ab-5694	1:500
ERK1/2 aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat. Nr. sc-93	1:200
GAPDH aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat. Nr. sc-25778	1:2000
MAS-R aus Ziegen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat. Nr. sc-54848	1:200
p-ERK1 aus Kaninchen IgG	WB	Cell Signaling, Beverly, USA Kat. Nr. #4370P	1:2000
p-Moesin aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz Kat. Nr. sc-12895	1:200
RAS aus Kaninchen	WB	Cell Signaling, Beverly, USA Kat. Nr. #3965	1:1000
RAF-1 aus Maus IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat. Nr. sc-133	1:200
RHO-A aus Maus IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA Kat. Nr. sc-418	1:200
ROCK aus Kaninchen IgG	WB	Santa Cruz, Santa Cruz, USA sc-5561	1:200

**Tab. 2:** Sekundäre Antikörper, gekoppelt an ein Konjugat

Antikörper	Antigen	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
Anti-Rabbit-IgG aus Ziege	Kaninchen IgG	Peroxidase	Calbiochem Kat. Nr. #401315	1:10000
Anti-Mouse-IgG aus Ziege	Maus IgG	Peroxidase	Calbiochem Kat. Nr. #401315	1:10000
Anti-Goat-IgG aus Esel	Ziege IgG	Peroxidase	abcam Kat. Nr. ab97110	1:10000

### 3.1.2 Oligonukleotide

Es wurden Oligonukleotide von der Firma Biomers.net (Ulm) verwendet.

Zur Ermittlung der Schmelztemperatur wurden Pro GC-Paar 4 °C, pro AT-Paar 2 °C berechnet. Die Grundlösung der Konzentration 100 pmol/μl in H<sub>2</sub>O bidest. wurde zu einer Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 pmol/μl in H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt. Die Oligonukleotidsequenzen sind in 5'→3' -Richtung angegeben.

Folgende Oligonukleotide wurden zur Genotypisierung der MrgDR-KO-Mäuse benutzt:

MrgD8	CATGAGATGCTCTATCCATTGGG
MrgD1	CTGCTCATAGTCAACATTTCTGC
rtTA1	GGAGAAACAGCTAAAGTGCG

### 3.1.3 Kits

Ace Glow™ Solution	Kat.Nr. 37-3420	Peqlab, Erlangen
DC Protein Assay Kit		
Reagent A	Kat.Nr. 500-0113	Bio-Rad, München
Reagent B	Kat.Nr. 500-0114	Bio-Rad, München
Reagent S	Kat.Nr. 500-0115	Bio-Rad, München
Protein Standard	Kat.Nr. 500-0007	Bio-Rad, München
ImProm-II™ Reverse Transcription System		
	Kat.Nr. A3800	Promega, Madison, USA
ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System		
	Kat.Nr. Z6112	Promega, Madison, USA

Protease Inhibitor Cocktail	Kat.Nr. S8820	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
REDTaq® ReadyMix™	Kat.Nr. R2523	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TaqMan Gene Expression Master Mix		
	Kat.Nr. 4369016	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents		
	Kat.Nr. 4308329	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
cAMP Enzyme Immunoassay-Kit	Kat.Nr. CA201-1KT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 3.1.4 Software

Bio1D	Peqlab, Erlangen
ChemiSmart	Peqlab, Erlangen
Clone Manager Suite 7, Version 7.01	Scientific & Educational Software
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, USA
ImageJ	Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <a href="http://imagej.nih.gov/ij/">http://imagej.nih.gov/ij/</a> , 1997-2016
Lab Chart 7 Pro v7.2.1 2011	ADInstruments, Spechbach
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, USA
Pannoramic Viewer	3DHistech, Budapest, Ungarn
7300 System SDS Software, Version 1.3	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Triton 5, Triton Technology	Föhr Medical Instruments, Seeheim
Zen 2009	Carl Zeiss Jena, Jena

### 3.1.5 Versuchstiere

Für die im weiteren Verlauf beschriebenen Versuche wurden insgesamt 169 Mäuse verwendet. Die Summe ergibt sich aus einem Kontingent von 80 Wildtyp (wt) Mäusen der Sorte C57BL/6J bezogen von der Firma Charles River und einer Gruppe von 89 MrgDR-KO-Tieren. Die MrgDR<sup>-/-</sup> Mäuse wurden freundlicherweise von Thomas Walther (Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty Mannheim, Universität Heidelberg, Mannheim, Germany; Department of Pharmacology and Therapeutics, University College Cork, Cork, Ireland; Departments of Obstetrics and Pediatric Surgery, Division of Women and Child Health, Universität Leipzig, Leipzig,

Germany) zur eigenen Zucht bereitgestellt. Die Daten der C57BL/6J Wildtypen wurden vom Labor zur Verfügung gestellt, da die Versuche zu diesen Tieren bereits zuvor für andere Arbeiten erhoben wurden. Die einzelnen Methoden unterschieden sich bei den Wildtypen nicht. Die Versuchstiere wurden nach tierschutzrechtlichen Standards im Haus für experimentelle Tierhaltung (HET) der Universität Bonn aufgezogen und gehalten. Die Tiere wurden in Käfigen aus Polycarbonat (Tecniplast, Hohenpeißenberg) gehalten, welche in ein Regalsystem eingearbeitet waren. In diesem war eine Belüftung integriert und es herrschten konstante Umweltbedingungen (20-22 °C Temperatur, 50 % relative Luftfeuchtigkeit bei 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus). Die Mäuse hatten permanenten Zugang zu autoklaviertem Futter und Trinkwasser ad libitum. Die Genehmigung für die Tierversuche erfolgte im Rahmen des GALAXY-Projektes durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV 84-02.04.2015.A491).

### **3.1.5.1 MrgD-Rezeptor Knock-Out Mäuse**

Mittels Rückkreuzung der zur Verfügung gestellten MrgDR<sup>-/-</sup> Mäuse mit C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen entstanden heterozygote Mäuse. Aus anschließend erneuten Verkreuzungen dieser heterozygoten Tiere konnten weitere MrgDR-defiziente Tiere erhalten werden. Ein besonderer Phänotyp ist für die MrgDR<sup>-/-</sup> Tiere in der Literatur nicht beschrieben, ebenso wenig die Auswirkungen des Defizits auf Stoffwechselforgänge in der Leber (Stand November 2018).

## **3.2 In vivo Methoden**

### **3.2.1 Narkosetechnik**

Die Untersuchung der hämodynamischen Parameter einschließlich der Operationen zur Organentnahme erfolgte unter Analosedierung mittels intraperitonealer Ketamin/Xylazin-Injektion. Ketamin besitzt nur einen sehr geringen kreislaufdepressiven Effekt, wodurch bei dieser Anästhesie eine verlässliche Erhebung der Kreislaufparameter möglich ist (vergleichbar mit wachen, nicht narkotisierten Tieren). Es handelt sich um eine sehr häufig angewendete und beschriebene Narkoseform zur invasiven Messung der Hämodynamik bei Mäusen.

### **3.2.2 Induktion einer Leberfibrose durch Tetrachlorkohlenstoff, (CCl<sub>4</sub>)-Intoxikation**

Zur Erzeugung einer Leberzirrhose wurde eine Kohorte von Versuchstieren mit 2 l/min CCl<sub>4</sub> über einen Zeitraum von insgesamt 4 Wochen zweimal pro Woche begast. Es erfolgte eine wöchentliche Steigerung der Begasungszeit von 60, 90 auf 120 Sekunden. Dadurch kam es zu einer gleichmäßigen Fibrosierung der Leber. Das Verfahren beschreibt eine gängige Methode zur Untersuchung zugrunde liegender Pathomechanismen in der Leber.

Die Begasung wurde im HET in den Käfigen vorgenommen. Das im Glaskolben befindliche CCl<sub>4</sub> wurde mit Druckluft über einen Schlauch in die Käfige geleitet. Nach Verstreichen der Begasungszeit wurden die Tiere ebenso lange bei geschlossenem Deckel der mit Tetrachlorkohlenstoff-angereicherten Luft ausgesetzt. Erst danach wurde zum Entweichen des Gasgemisches der Deckel geöffnet. Eine Zugabe von Phenorbital (Luminol 0,5 g/l) in das Trinkwasser diente der Beschleunigung der Leberschädigung (Scholten et al., 2015).

### **3.2.3 Induktion einer Leberfibrose durch Gallengangsligatur, (Bile Duct Ligation, BDL)**

Unter Anästhesie erfolgte bei einer weiteren Gruppe die Ligation des Ductus choledochus. Nach Eröffnung des Abdomens und unter Aufsuchen des Duodenum als Leitstruktur wurde der Gallengang zweifach ligiert und im Anschluss durchtrennt. Als Zeichen der Leberdestruktion gelten bei diesem Vorgehen ein Ikterus und ein ausgeprägter Aszites. Zwei Wochen nach der Operation erfolgte die Beurteilung der Hämodynamik mit anschließender Organentnahme. Bei diesem aggressiveren Vorgehen ist die Zirrhose entlang der intrahepatischen Gallenwege betont (Tag et al., 2015). Als Referenzgruppe dienten Sham-operierte Tiere, die im Anschluss an die mediane Laparotomie wieder zugenäht wurden.

### **3.2.4 Einbau osmotischer Pumpen**

Es wurden osmotisch wirksame Mini-Pumpen (Alzet Pumpe Modell 2002 Kat. Nr. #0000296, Alzet, Cupertino, USA) mit Ang(1-7) (Angiotensin(1-7), Tocris, Kat. Nr. #1562, Cleveland, USA) in der Konzentration 10<sup>-5</sup> M befüllt und subcutan über einen nuchalen

Schnitt von dorsal eingesetzt (Krogman et al., 2016). Nach zwei Wochen erfolgte die hämodynamische Messung und Organentnahme. Als Referenzgruppe dienten Sham-operierte Tiere.

### **3.2.5 Diäten**

Die Mäuse wurden 7 Wochen je nach Gruppe entweder mit einer „Westerndiät“ (WD-Diät: SM R/M-H, 20.85 % Rohfett (Kokosfett) Kat. Nr. S0279-2011, ssniff, Soest, Deutschland) oder mit einer Methionin-Cholin-defizienten Diät (MCD-Diät, Kat. Nr. E15653-94, ssniff, Soest, Deutschland) gefüttert. Darauf folgend wurde die Organentnahme mit hämodynamischer Messung durchgeführt. Als Referenzgruppe diente die Kontrollgruppen, die mit normalem Tierfutter gefüttert wurde (Klein et al., 2017).

### **3.2.6 Hämodynamische Messung und Organentnahme**

Unter Anästhesie wurden die Versuchstiere auf einer Styroporunterlage auf dem Rücken liegend fixiert. Nach medianer Laparotomie und Freilegen zunächst der Milz und im Anschluss der Vena Portae wurden diese mit einem PE-50 Katheter (PE 0,28x0,61; Everhardts, Meckenheim, Deutschland) zur Messung des Portaldrucks katheterisiert. Der Katheter ist an einen Druckmesser (Isotec-Pressure Transducer, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen, dessen messtechnischer Nullpunkt einen Zentimeter über dem reellen Nullpunkt geeicht ist. Nach der Messung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und es folgte die Organentnahme (Klein et al., 2017). Die Leber wurde gewogen und im Anschluss nach festgelegtem Muster in mehrere Stücke zerteilt. Zur Aufbereitung der histologischen Schnitte wurde ein Teil der Leber in 4 % Formaldehyd eingelegt. Die restliche Leber wurde direkt nach der Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung in einen -80 °C Kühlschrank gelagert.

### **3.2.7 Isolierung muriner HSCs**

Die Isolation der HSCs wurde mittels eines in situ Verdaus durchgeführt. Weiterhin erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation, bei welcher man sich die spezifische Dichte der Vitamin-A speichernden HSCs zunutze macht (Friedman et al., 1985). Da Anzahl und Größe Vitamin-A speichernder HSCs im Alter steigen, wurden ausschließlich Mäuse,

die älter als 240 Tage waren, benutzt. Man benötigt mindestens 3 bis 4 Mauslebern. Nach Narkose, Fixierung und Laparotomie der Maus wurde die Pfortader freigelegt. Diese wurde mit einer 27G-Venenverweilkanüle katheterisiert, anschließend folgte eine Durchtrennung der Vena Cava Inferior (IVC). Zur Lösung der HSCs aus dem Parenchym wurde mit einer Flussrate von 5 ml/min dreimalig je mit EGTA, Pronaselösung und Collagenaselösung perfundiert, sodass ein Farbumschlag der Leber von rot nach gelb stattfand. Daraufhin wurde die Leber entnommen und in HBSS +1 % FKS auf Eis unter der sterilen Werkbank in einem Falcon manuell zerkleinert und in eine Rührlösung überführt. Die entstandene Suspension wurde mit einer sterilen Nylongase mit einer Porengröße von 120 µm Durchmesser gefiltert und in drei 50 ml Falcons aufgeteilt und mit HBSS+1 % FKS aufgefüllt. Die Suspension wurde zur Waschung für 7 min bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das resultierende Pellet in 10 ml HBSS+1 % FKS mit 30 µl DNase pro Falcon resuspendiert. Nach wiederholten Waschungen und Überstandspipettierungen zeigte sich eine weiße Bande, die die HSCs enthielt. Zuletzt wurden die Zellen gezählt und in DMEM (4,5 g Glukose, -Pyruvat, +phenol-Red, +L-Glu, +10 % FKS) kultiviert. Die HSC-Aktivierung erfolgt über Kontakt zur unbeschichteten Plastikoberfläche des Kulturgefäßes (Weiskirchen et al., 2017).

### **3.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Isolierung und Reinigung von DNA**

Die DNA wurde aus den Schwanzspitzen der Mäuse isoliert. Hierzu wurden sie über Nacht in 250 µl Lysispuffer unter Zugabe von 50µg Proteinase K bei 55 °C und 800 Ump verdaut. Nachdem das Gemisch bei Raumtemperatur 13.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert wurde, wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Des Weiteren wurde das gleiche Volumen Isopropanol dem Pellet beigemischt. Die ausfallende genomische DNA wurde an der Phasengrenze der beiden Flüssigkeiten sichtbar. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C mit anschließender Waschung durch 500 µl 70 % igen Ethanol (v/v) wurde der Überstand bei 50 °C auf dem Heizblock getrocknet und schließlich in 100 µl H<sub>2</sub>O bidest. für 30 min bei gleicher Temperatur gelöst. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA erfolgte eine photometrische Messung (Nicolaidis and Stoeckert, 1990).

### 3.3.2 Isolierung und Reinigung von RNA

Das ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System wurde zur Isolierung und Reinigung der RNA benutzt. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden die Leberproben mit dem dem Set beiliegendem Puffer und 1-Thioglycerol vermischt. Eine Retsch-Kugel zerkleinerte die Leber und das Gehirn in der Retsch-Mühle innerhalb von 4 min bei 30 Hertz. Die weiteren Schritte wurden getreu dem Protokoll des Kits durchgeführt. Letztlich konnte die Konzentration und Reinheit der RNA photometrisch bestimmt werden (Nicolaidis and Stoeckert, 1990).

### 3.3.3 Horizontale Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die Auftrennung der DNA nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Die Konzentration der Agarosegele konnte zwischen 1 % und 2 % (w/v) gewählt werden. In einem Becherglas mit 200 ml TAE-Puffer und der benötigten Agarosemenge wurde das Gemisch zum Sieden gebracht und dem flüssigen Gel 10 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,05 ‰) beigefügt. Dieses wurde anschließend zum Auskühlen luftblasenfrei in eine Gießkammer gegossen. Die DNA-Probe wurde in TAE-Puffer bei 10 bis 12 V/cm in 0,5 bis 1 Stunde aufgetrennt. Anhand der Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm konnte das interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt werden, wodurch die DNA visualisiert und dokumentiert werden konnte.

### 3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels PCR lassen sich DNA-Abschnitte *in vitro* vervielfältigen. Der zu replizierende DNA-Bereich lässt sich anhand flankierender Oligonukleotide genau anvisieren. Nach Bindung des Oligonukleotids „kopiert“ die DNA-Polymerase den gewählten Abschnitt. Die entstandenen Produkte dienen im nächsten Zyklus wiederum selbst als Vorlage, sodass die Vervielfältigung exponentiell verläuft.

### 3.3.4.1 Standard PCR

Initial erfolgte eine 5 minütige Denaturierung bei 96 °C vor einer 35 -maligen Wiederholung der im Folgenden beschriebenen dreiteiligen Sequenz:

Bei 96°C wurde 30 Sekunden denaturiert, für 30 Sekunden erfolgte das Annealing (Abkühlen) bei 5-10 °C und 1 Minute Elongation bei 72 °C. Die Temperatur für das Annealing ist abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide und wird unter dem Punkt Oligonukleotide erläutert. Zum Abschluss folgte eine 7 minütige Elongationsphase, bevor die Proben letztlich auf 4 °C heruntergekühlt wurden.

### 3.3.4.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription beschreibt die Umschreibung von RNA zu cDNA. Dies wird durch eine reverse Transkriptase ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde das ImProm-II™ Reverse Transcription System verwendet. Der Ansatz wurde im Thermocycler für 5 min bei 70 °C erhitzt und danach für 5 min auf Eis gekühlt. Nachfolgend wurde der Reverse Transkriptions-Mix beigemischt. Die Proben wurden im Anschluss in drei Stufen im Thermocycler erhitzt: 5 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C, 15 min bei 70 °C. Die auf diesem Weg generierte cDNA wurde im Verhältnis 1:10 zu einer Gebrauchslösung verdünnt.

### 3.3.4.3 Relative Echtzeit-PCR (rtPCR)

Mittels rtPCR lassen sich bestimmte Gensequenzen quantifizieren. Bei der TaqMan-Methode werden Oligonukleotide verwendet, die mit einem fluoreszierender Farbstoff (FAM oder VIC) an ihrem 5'-Ende und einem sogenannten „Quencher“ (TAMRA) an ihrem 3'-Ende versehen sind. Sind beide noch am Oligonukleotid gekoppelt, absorbiert der „Quencher“ die Emission des Farbstoffes, sodass kein Signal detektiert wird. Bei Bindung des Oligonukleotid an die cDNA kann die DNA-Polymerase durch ihre 5' → 3' Exonuklease-Aktivität die fluoreszierende Gruppe abspalten, wodurch sich die Fluoreszenz photometrisch messen lässt. Die Intensität der Fluoreszenz ist hierbei proportional zur Menge der synthetisierten DNA.

Bei der rtPCR einer Probe wurde die cDNA von zwei Abschnitten repliziert. Zum einen wurde die Menge der 18S-RNA als Kontrolle, zum andern das gewünschte Gen in Doppelbestimmung gemessen. Der messbare Grenzbereich wurde von der 7300

System SDS Software festgelegt. Anschließend wird zwecks Normierung der 18S-RNA-Wert von dem Wert des Zielgens subtrahiert ( $\Delta\text{ct}$ ). Für den Vergleich aller Proben untereinander wurde von jeder Gruppe der jeweilige Mittelwert gebildet. Die wt Kontrollgruppen wurden gleich eins und die MrgDR<sup>-/-</sup> Gruppen dazu in Relation gesetzt ( $\Delta\Delta\text{ct}$ ) (Wagner, 2013).

### **3.4 Biochemische Methoden**

#### **3.4.1 Homogenisieren der Leberproben**

Die Homogenisierung der Leberproben erfolgte auf Eis, indem ein Stück der tiefgefrorenen Probe mit einem sterilen Einmalskalpell abgetrennt und nach Zugabe von 1 ml Homogenisationspuffer bestehend aus Protease Inhibitor Cocktail (1 % v/v) und Orthovanadat (1 % v/v) in den Homogenisator (Potter S) überführt wurde. Es folgte eine Zentrifugation über 5 min bei 4 °C bei 1400 x g. Nach Abnahme des Überstandes wurde dieser bei -20 °C eingefroren.

#### **3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration der gewonnenen Lysate wurde mit dem Detergent Compatible (DC) Protein Assay Kit quantifiziert. Diese Methode beruht auf einer photometrischen Bestimmung der Farbe von Reagenzien bei 750 nm. Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA) in einer Verdünnungsreihe mit 8 Eichproben von 0 – 1,47 mg/ml. Die Leberlysate wurden in einem 1:25 und 1:50 Verhältnis verdünnt und jeweils in Dreifachbestimmung auf eine Flachboden Mikrotiterplatte aufgetragen. Im Anschluss wurde jeweils 5 µl Proteinlösung hinzugefügt.

Zur Farbdetektion wurde im Verhältnis 1:50 ein Gemisch aus Reagenz S und Reagenz A hergestellt. 25 µl des Reagenz A/S und 200 µl des Reagenz B wurden zu den Proben hinzugefügt. Die Proben wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und deren Absorption bei 750 nm anschließend im ELISAREADER bestimmt.

### **3.4.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Da Proteine eine elektrische Ladung besitzen, können sie im denaturierten Zustand entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die diskontinuierliche SDS-PAGE weist dabei unterschiedliche pH-Werte und Porengrößen in Sammel- und Trenngel auf, wodurch eine höhere Bandenschärfe und eine größere Trennleistung erreicht werden kann. Die Konzentration des Acrylamids im Trenngel konnte bei den Versuchen je nach der Größe der aufzutrennenden Proteine zwischen 8, 10 und 15 % variiert werden. Zunächst wurden die Proteinproben der Lysate im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer (SIGMA, Sample Buffer, Leamli, 2 x Concentrate) verdünnt und dann für 5 min bei 95 °C in einem Thermoblock denaturiert. Anschließend wurden die Proben entsprechend ihrer Proteinkonzentration in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert, wobei ein gefärbter Marker zur Festlegung des Größenstandards die erste Tasche ausfüllte. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 14-20 V/cm durchgeführt.

### **3.4.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot)**

Beim Western Blot findet der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran statt. Dazu wurden drei Gel-Blotting-Papiere, etwa 10 x 7,5 cm, in Transferpuffer getränkt und dann auf die schwarze Seite der Transferkassette gelegt. Das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen wurde ebenfalls kurz in Transferpuffer gewaschen und dann auf die Blotting-Papiere geschichtet. Die Membran wurde mit Transferpuffer befeuchtet und auf das Gel gelegt. Zuletzt wurden zwei weitere, in Transferpuffer getränkte, Gel-Blotting-Papiere oben aufgeschichtet. Der Blot erfolgte in einer Blottingkammer, die mit Transferpuffer aufgefüllt wurde, für 60 Minuten bei 1-3 mA/cm<sup>2</sup>. Zur Kontrolle, ob die Proteinbanden übertragen wurden, färbte man die Nitrozellulosemembran reversibel mit Ponceau-S-Lösung an.

### **3.4.5 Immunologische Detektion der Proteine durch Chemilumineszenz**

Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der Antikörper an die Membranoberfläche wurde die Membran bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 5 % Magermilchlösung blockiert und für 2 min mit PBST gewaschen. Die Antikörper wurden in ihren jeweiligen Blockierungslösungen nach Angabe des Herstellers verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte entweder für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Es folgten weitere Waschungen der Membran zur Lösung unspezifisch gebundener Antikörper. Die jeweiligen sekundären Antikörper wurden für 1 h inkubiert. Durch die Kopplung der sekundären Antikörper an eine Peroxidase, kann unter Zugabe von Ace Glow™ die spezifische Proteinbande anhand einer Lichtreaktion sichtbar gemacht werden. Das Ace Glow™ Solution-Kit besteht aus Solution A und Solution B, welche im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran pipettiert wurden. Das enthaltene Luminol wird oxidiert, was zu einer Lumineszenz führt, die in der Entwicklungsmaschine (ChemiSmart) detektiert werden kann. Hierzu wurde die feuchte Membran unter einer Klarsichtfolie in den ChemiSmart eingeführt. Die Belichtungszeit wurde je nach Signalstärke der Membran gewählt. Zur weiteren Auswertung und Bearbeitung wurde das Ergebnis gespeichert.

### **3.4.6 Densitometrische Quantifizierung der Proteinmenge**

Zur Auswertung der Proteinmenge wurde die Software „Bio-1D“ verwendet. Die detektierten Lichtsignale der Proteinbanden wurden manuell markiert und die Intensität des Signals gemessen. Als abgespeicherte Excel-Datei konnten die Ergebnisse weiter bearbeitet und verglichen werden.

### **3.4.7 Hydroxyprolinbestimmung der Leber**

Hydroxyprolin ist ein Derivat der Aminosäure Prolin und wird in großem Maß zur Stabilisierung des Kollagens in dessen Tripelhelix eingebaut. Da es bei der Leberfibrose zu einer Akkumulation von Kollagen kommt, dient das enzymatisch gemessene HP als indirekter Marker der Fibrosierung.

Hierzu wurden 50-100 mg Leber mit der entsprechenden Menge 6 N HCl vermischt (20 µl HCl / 1 mg Leber). Nach 30 minütiger Inkubation bei 110 °C wurde das Gemisch homogenisiert und dann wiederum für weitere 16 h bei 110 °C inkubiert. Nach Filtration

mit einem Papierfilter wurden jeweils 30 µl Methanol zu 30 µl der Probe hinzugefügt. Die Auftragung der Proben erfolgte in Doppelbestimmung. Die Proben wurden über Nacht im Heizschrank getrocknet. Aus einer Stammlösung (1 mg/µl Hydroxyprolin in 50 % (v/v) Isopropanol) wurde eine Standardverdünnungsreihe mit 10 Proben (0 – 2,6 µg Hydroxyprolin) hergestellt. Die nun getrockneten Proben wurden in 1 ml 50 % (v/v) Isopropanol gelöst. Zu dieser Lösung und den Standardreihen wurde Chloramin-T-Lösung hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Letztlich fügte man 1 ml Ehrlich's Reagenz-Lösung hinzu. Die Lösung schlug nach weiterer Inkubation bei 50 °C im Heizschrank rötlich um. Die Intensität der Färbung ist proportional zur Hydroxyprolinkonzentration der Probe. Die photometrische Messung der Absorption erfolgte bei 558 nm gegen einen Leerwert. Mit Hilfe der Standardreihe konnte nach folgender Formel der HP-Gehalt bestimmt werden:

Absorption / Koeffizient der Standardgerade x 666,7 = µg/g Leber

(Reddy and Enwemeka, 1996).

### **3.5 Zellbiologische Methoden**

Die im weiteren Verlauf erläuterten Methoden wurden bei sterilen Verhältnissen unter einer Werkbank durchgeführt.

#### **3.5.1 Zellzahlbestimmung**

Mit einer Neubauer-Zählkammer wurden die in Lösung gebrachten Zellen ausgezählt und daraus die Konzentration errechnet. Durch eine Färbung mit Trypanblau konnten tote Zellen, die den Farbstoff aufnehmen, von lebendigen Zellen differenziert werden. Die Zählkammer ist in mehrere kleine Quadrate mit 1 mm<sup>3</sup> Volumen eingeteilt. Daraus lässt sich folgende Formel ermitteln:

Durchschnittliche Zellzahl / Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup> = Zellzahl pro ml

### **3.5.2 Zellkultivierung**

Zur Inkubation der Zellen herrschten in dem Brutschrank mit 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konstante Bedingungen. Nach deren Isolation wurden die HSCs in Plastikkulturflaschen mit DMEM kultiviert, welches alle 48 Stunden erneuert wurde.

### **2.5.3 Inkubation der HSCs mit Alamandine und Ang(1-7)**

Die zu inkubierenden Substanzen Ang(1-7) (Angiotensin(1-7), Tocris, Kat. Nr. #1562, Cleveland, USA) und Alamandine (Alamandine Peptid-Nr. 60408,3, Herstellung auf Bestellung, BIOSYNTAN, Berlin, Deutschland) wurden je nach beiliegendem Protokoll in PBS gelöst und zu einer Stammlösung angesetzt, von der 1 ml in 50 ml Medium pipettiert wurde. In weiteren Verdünnungsreihen erstellte man Konzentrationen von 10<sup>-7</sup> mol/l für Angiotensin(1-7) und 10<sup>-4</sup> mol/l sowie 10<sup>-6</sup> mol/l für Alamandine. Nach dreitägiger Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen für die Versuche verwendet werden.

### **3.5.4 Ernten der HSCs**

Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und anschließend den Zellen 40 µl/cm<sup>2</sup> Accutase hinzugefügt. Nach 10 minütiger Inkubation im Brutschrank wurde am Mikroskop überprüft, ob sich alle Zellen eigenständig vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten. Falls nicht wurden sie manuell mit einem sterilen Schaber gelöst. Um die Reaktion der Accutase zu stoppen, wurde wieder Medium in die Flasche gefüllt. Das Gemisch wurde 5 Minuten bei 350 x g und 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet mit sterilem PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml PBS gelöst und für 5 Minuten nun bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

### **3.5.5 HSC Scratch Assay**

Die HSCs wurden in einer 24 -Well Platte verteilt und unter Zugabe von DMEM-Medium solange im Brutschrank inkubiert, bis die Platten zugewachsen waren. Es erfolgte die Zugabe des Mediums mit Alamandine in einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> mol/l und 10<sup>-6</sup> mol/l oder Angiotensin(1-7) in einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> mol/l. Nach einer Inkubationszeit von einem Tag wurde mit einer 10 µl Pipettenspitze in jedem Well ein vertikaler Kratzer

(ca. 1 mm Durchmesser) gezogen. Im Abstand von 0 h, 1 h, 5 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden pro Well 2 Fotos entlang des Kratzers aufgenommen und zur Auswertung des Abstandes mit dem Programm Image J bearbeitet. So lässt sich nach 24h das Migrations- und nach 48h das Proliferationsverhalten der HSCs beurteilen (Justus et al., 2014).

### **3.5.6 HSC Kontraktionsversuch**

Jedes Well einer 24-Well-Platte wurde mit 0,5 ml BSA befüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine zweimalige Waschung mittels 1 x PBS, im Anschluss eine 15 minütigen Trocknungsphase. Die Kollagenplättchen wurden nach festgelegtem Protokoll aus NaOH, 10 x PBS und H<sub>2</sub>O gegossen. Die Zellen wurden aus ihren Wells gelöst, gezählt und auf 50.000 / ml in 2 % FCS DMEM (37 °C) verdünnt. Davon wurden 500 µl auf die einzelnen Kollagenplättchen pipettiert und für 3 Stunden inkubiert. Es folgte eine Waschung mit 1 ml 1 x PBS. Die Gele wurden mit 0,5 ml Medium bedeckt. Dem Medium wurde je nach Versuchsreihe Ang(1-7) oder Alamandine in unterschiedlichen Konzentrationen (s. zuvor Scratch Assay) beigelegt. Die Ränder des Gels wurden vorsichtig mit einer Pipettenspitze vom Rand des Wells gelöst. Nach 12 und 24 Stunden wurde die Kontraktion der Gele photographisch festgehalten (Ngo, 2006). Die Fotos mit der darauf dokumentierten Größenabnahme wurden mit dem Programm Image J analysiert.

### **3.5.7 HSC cAMP-Messung**

Die Bestimmung des cAMP Gehaltes der HSCs wurde mittels des cAMP Enzyme Immunoassay-Kit (Kat.Nr. CA201-1KT, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) durchgeführt. Bei Raumtemperatur wurde der cAMP Standard mit dem dem Kit beigelegten Puffer in den Schritten 200, 50, 12.5, 3.12, und 0.78 pmol/ml verdünnt. Das Acetylierungsreagenz wurde vorbereitet, indem man 0,5 ml acetic anhydride zu 1 ml Triethylamine pipettierte. Zur Herstellung des Reaktionsreagenz wurden die beiden Versuchspuffer 1 und 2 mit je 900 und 750 µl pipettiert. Sowohl zu den Proben als auch zu dem Standard wurden 200 µl des Reagenz hinzugegeben. Dann wurde die Mikrotiterplatte mit den Proben in einer Dreifachbestimmung befüllt und der gelbe Farbumschlag bei 405 nm photometrisch ausgewertet (Sigma Aldrich Technical Bulletin CA 200, 2018).

### **3.6 Immunhistochemie**

Dank immunhistochemischer Färbungen lassen sich gezielt Proteine und Strukturen in Gewebeschnitten darstellen. Ein quantitativer Vergleich der einzelnen Proteine in Sachen Menge und Verteilung kann somit erstellt werden. Die Färbungen wurden an in Paraffin eingebetteten Lebern durchgeführt, zu deren Fixierung Formalin diente.

#### **3.6.1 $\alpha$ SMA-Färbung und picro Siriusrot Färbung**

Die  $\alpha$ SMA-Färbung und die picro Siriusrot-Färbung in Leberschnitten wurde von der Plattform Q1 im Institut für Pathologie an der Uniklinik Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. H.-P. Fischer durchgeführt. Diese wurden im Rahmen des transregionalen Sonderforschungsbereichs 57: "Organfibrose: Von den Mechanismen der Schädigung zur Beeinflussung der Erkrankung" angeboten.

#### **3.6.2 Auswertungen der Immunhistochemie**

Zur quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Leberschnitte mit der Software Pannoramic Midi eingescannt und digitalisiert. Nach manueller Festlegung des Profils und der zu erfassenden Bereiche folgte die quantitative Messung mit der Software Pannoramic Viewer. Der resultierende Messwert stellte dabei die prozentuale Positivfärbung des markierten Bereiches dar. Zusätzlich konnten mit dem Programm repräsentative Schnitte angefertigt werden.

#### **3.6.3 Statistische Auswertungen**

Die Software GraphPad Prism wurde zur statistischen Auswertung der Ergebnisse genutzt. Für die statistische Signifikanz wurde ein parameterfreier statistischer Test, der sogenannte Mann-Whitney-U-Test, durchgeführt. Die Signifikanz wurde wie folgt definiert: p-Werte von  $< 0,05$  (\*) galten als signifikant, p-Werte von  $< 0,005$  (\*\*) und  $< 0,001$  (\*\*\*) als hoch signifikant.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Erfassung der Leberfibrose

#### 4.1.1 Allgemeiner Phänotyp des Tiermodells

**Tab. 3: Gewichtsdaten**

Die statistische Signifikanz zwischen wt und MrgDR<sup>-/-</sup> wird mit \*, die zu deren Kontrollgruppen mit + gekennzeichnet. Sofern eine stat. Signifikanz besteht, wurde der Faktor zur Bezugsgruppe in Klammern angegeben (x-fold). Die Gruppenstärke beträgt mindestens 9 Tiere pro Gruppe. Die Kontrollen und die Sham-operierten Tiere wurden als Kontrollgruppen zusammengefasst dargestellt.

	<b>ΔBW</b> (g ± s.e.m)	<b>ΔLW</b> (g ± s.e.m.)	<b>ΔLW/ΔBW x 100</b> (% ± s.e.m.)
<b>wt Ctr+Sham</b>	22,8 ± 3,1	1,10 ± 0,24	4,97 ± 0,47
<b>MrgDR<sup>-/-</sup> Ctr+ Sham</b>	23,2 ± 4,8	1,25 ± 0,32	5,44 ± 0,90 * (1,1)
<b>wt Ang(1-7)</b>	27,8 ± 1,0 +++ (1,2)	1,31 ± 0,12 + (1,2)	7,71 ± 0,42 +++ (1,6)
<b>MrgDR<sup>-/-</sup> Ang(1-7)</b>	22,1 ± 1,4 *** (0,8)	1,00 ± 0,18 ** (1,3) / + (0,8)	7,00 ± 1,89 ++ (1,3)
<b>wt CCl<sub>4</sub></b>	23,4 ± 3,4	2,09 ± 0,61 +++ (1,9)	8,36 ± 0,83 +++ (1,7)
<b>MrgDR<sup>-/-</sup> CCl<sub>4</sub></b>	25,3 ± 4,1	2,16 ± 0,49 +++ (1,7)	8,57 ± 1,61 +++ (1,6)
<b>wt BDL</b>	22,6 ± 5,8	1,64 ± 0,48 +++ (1,5)	7,00 ± 1,44 +++ (1,4)
<b>MrgDR<sup>-/-</sup> BDL</b>	22,9 ± 7,4	1,65 ± 0,53 ++ (1,3)	7,74 ± 2,52 +++ (1,4)

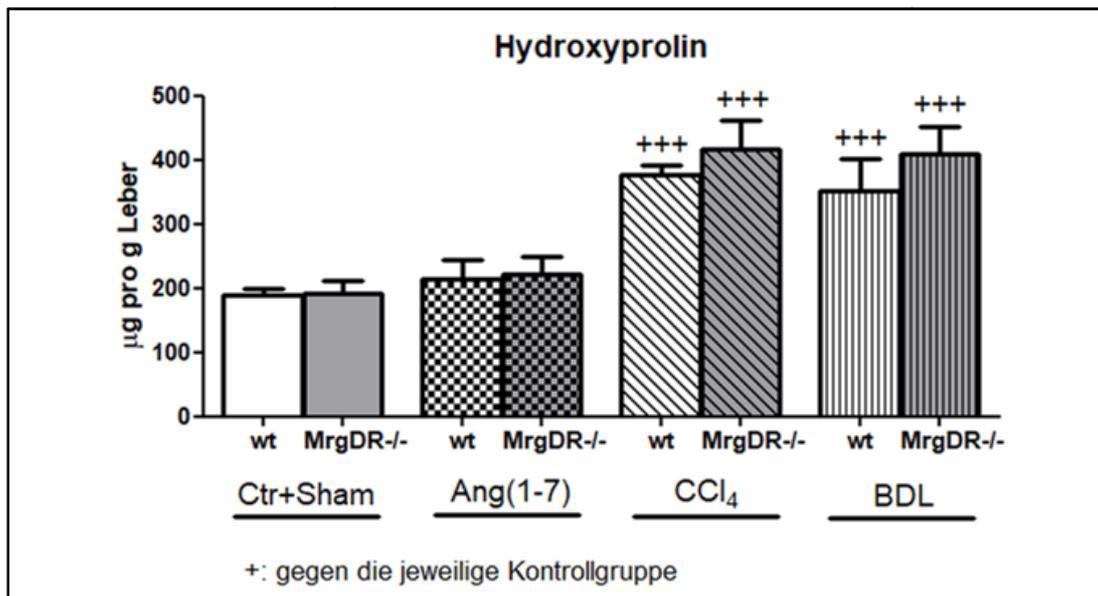
In den wt und MrgDR<sup>-/-</sup> Kontrollgruppen Ctr + Sham ließen sich sehr ähnliche Werte für das Körpergewicht und für das Lebergewicht feststellen (s. Tab.3). Ein spontaner Phänotyp bei Rezeptordefizienz konnte demnach nicht beschrieben werden. Der Quotient für den Anteil der Leber am Gesamtgewicht der Maus war bei den MrgDR<sup>-/-</sup>-Tieren statistisch signifikant um ca. 10 % erhöht (s. Tab. 3), sodass eine Neigung bei MrgDR<sup>-/-</sup> zu vergrößertem Lebervolumen besteht.

Bei den Mäusen mit eingesetzten Ang(1-7)-Pumpen konnte bei den Wildtyptieren je ein um den Faktor 1,2 signifikant erhöhtes Körpergewicht und Lebergewicht zu den wt-Kontrollen gemessen werden, was sich auch in dessen Quotienten um das 1,6-fache widerspiegelte. Bei den MrgDR<sup>-/-</sup>-Mäusen hingegen konnte zur Kontrollgruppe ein signifikant auf das 0,8-fache erniedrigte Körpergewicht und ein auf das 1,3-fache erhöhte Lebergewicht im Vergleich zum wt festgestellt werden. Zu den Kontrollgruppen zeigten die MrgDR<sup>-/-</sup>-Tiere durchweg signifikant reduzierte Werte (Vgl. Tab. 3)

In den Zirrhosemodellen CCl<sub>4</sub> und BDL wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl bei den wt als auch bei den MrgDR-KOs erhöhte Lebergewichte gemessen. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen MrgDR<sup>-/-</sup> und wt (s. Tab. 3).

Die mit einer Westerndiät oder MCD-Diät behandelten wt und MrgDR<sup>-/-</sup> Tiere zeigten in ihren Phänotypen keine signifikanten Unterschiede, weswegen ihre Darstellungen vernachlässigt und die Ergebnisse nicht weiter verfolgt wurden.

#### 4.1.2 Hydroxyprolinegehalt der Leber

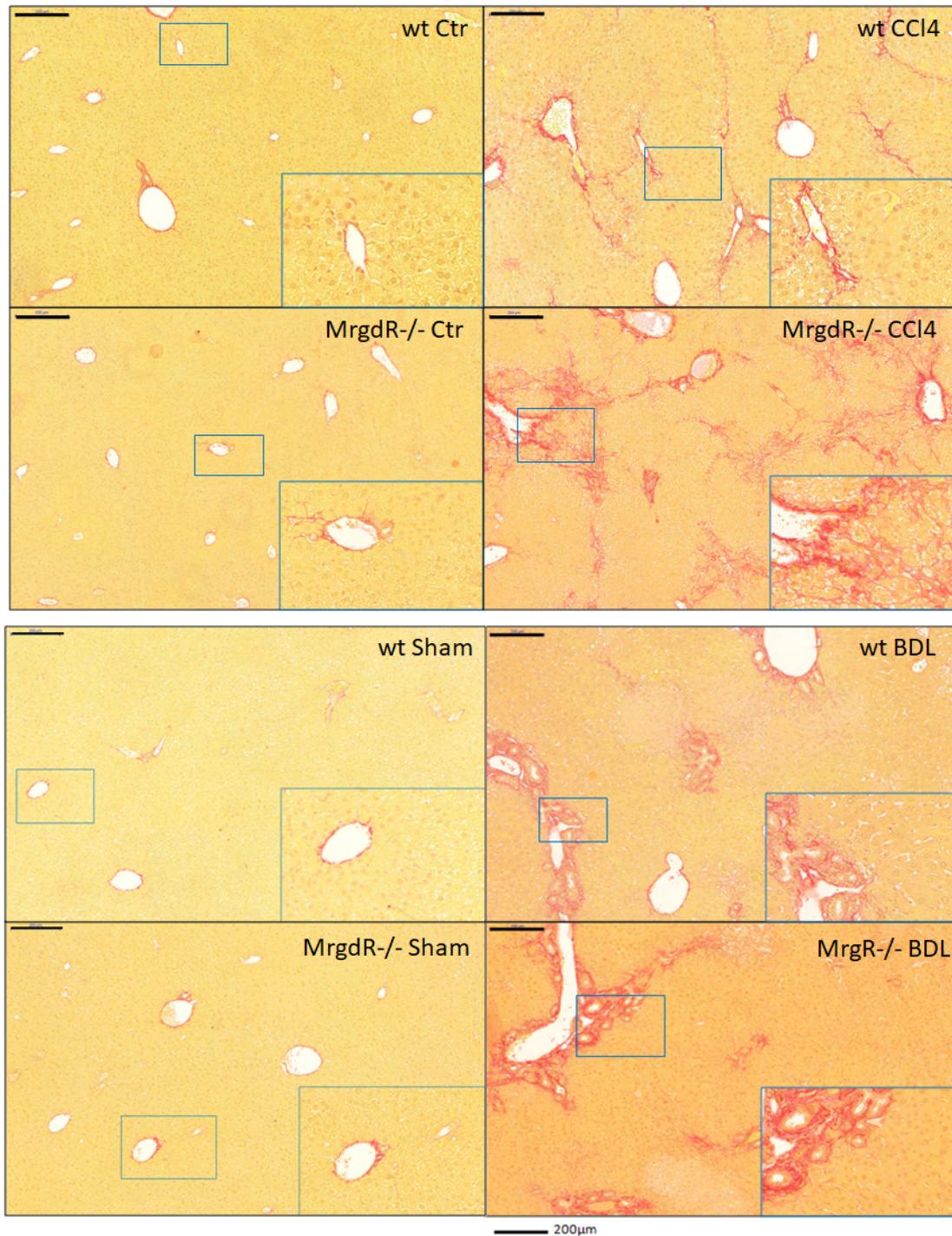


**Abb. 9:** HP-Gehalt der Mauslebern in µg/g Lebergewicht der verschiedenen Gruppen. Der Hydroxyprolinegehalt der Lebern (HP) wurde innerhalb der einzelnen Gruppen zwischen den wt und den MrgDR<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen (\*), der Vergleich der einzelnen Gruppen zu Kontrollgruppe wird graphisch mit + dargestellt.

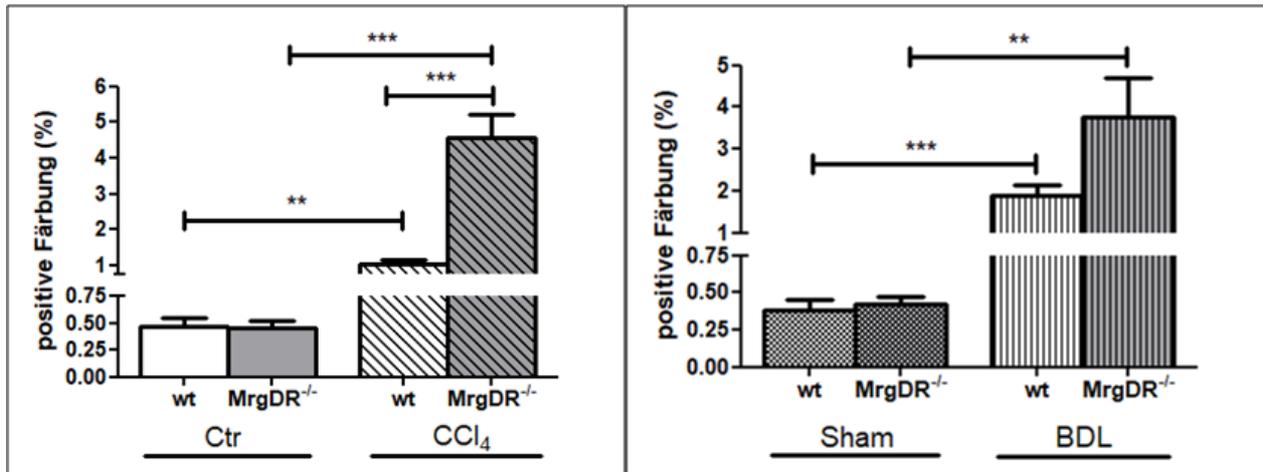
In den Kontrollgruppen wurden sowohl bei den MrgDR<sup>-/-</sup> als auch bei den wt nahezu identische Werte um die 190 µg HP pro g Leber gemessen. Eine leicht erhöhte Tendenz der Hydroxyprolinbildung war nach Einsatz der Ang(1-7)-Pumpen mit Werten von wt 213 µg und MrgDR<sup>-/-</sup> 223 µg zu sehen. Ein signifikanter Unterschied zwischen wt und MrgDR<sup>-/-</sup> oder auch nach Anwendung der Methode war nicht zu beobachten (Vgl. Abb.9).

Nach Fibroseinduktion konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen bei wt und MrgDR<sup>-/-</sup> ein sehr deutlicher Anstieg des Leber-HP-Wertes auf ca. das doppelte des Ursprungwertes gemessen werden. Die Werte beliefen sich bei den wt auf durchschnittlich 377 µg nach CCl<sub>4</sub>-Intoxikation und 351 µg nach BDL, bei den MrgDR<sup>-/-</sup> analog auf 418 µg und 410 µg. Ein signifikanter Unterschied zwischen wt und MrgDR<sup>-/-</sup> ließ sich weder bei der CCl<sub>4</sub> noch bei der BDL-Methode ausmachen, allerdings wurde die Tendenz zur erhöhten Fibrose bei MrgDR<sup>-/-</sup> deutlich (s. Abb. 9).

## 4.1.3 picro Siriusrot-Färbungen der Leber



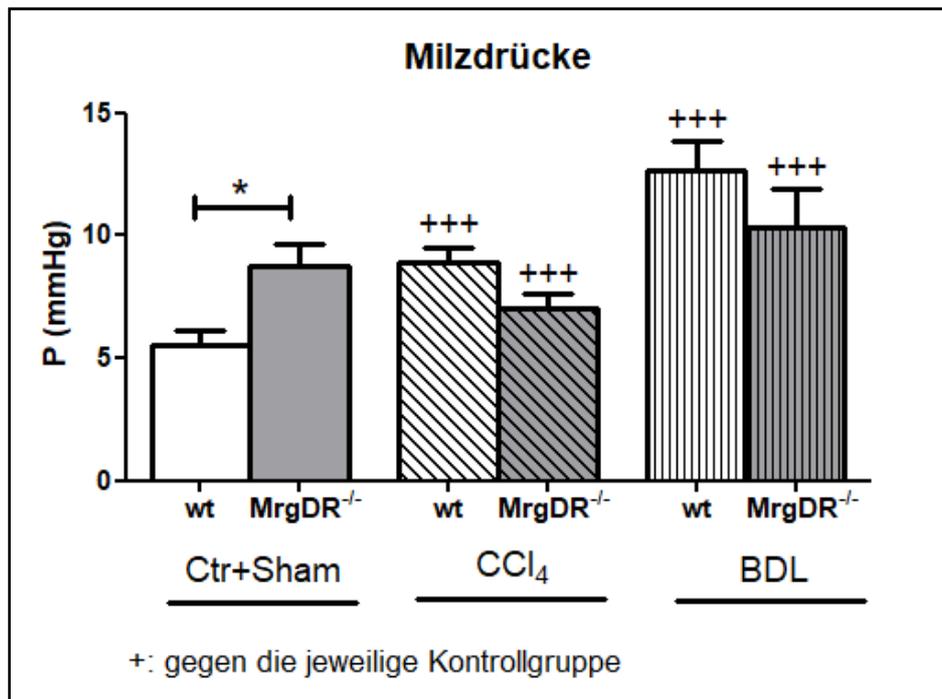
**Abb. 10a:** Exemplar. Abbildungen von picro Siriusrot gefärbten Leberschnitten in 10 - facher Vergrößerung (groß), ca. 20 -fach im Ausschnitt rechts unten.



**Abb. 10b:** Quantifizierung der Gruppen Ctr + CCl<sub>4</sub> und BDL + Sham im wt zu MrgDR<sup>-/-</sup>-Vergleich.

Die histologische Färbung von Geweben mit Siriusrot dient der Darstellung von Kollagen (Rittié, 2017). Bei den ungeschädigten Lebern der Kontrollgruppen belief sich der rot angefärbte Anteil bei wt und MrgDR<sup>-/-</sup> auf fast identische Werte von ca. 0,45 % des Gesamtgewebes. Nach Fibroseinduktion mittels CCl<sub>4</sub> konnte bei den wt ein signifikanter Anstieg um mehr als das doppelte beobachtet werden (auf ca. 1,03 %) und bei den MrgDR<sup>-/-</sup> mit 4,56 % auf ca. das 10-fache (Vgl. Abb.10b links). Bei den Sham-operierten Tieren ließ sich mit Werten von durchschnittlich ca. 0,4 % zwischen wt und MrgDR<sup>-/-</sup> kaum ein Unterschied ausmachen. Nach BDL erfolgte ein signifikanter Anstieg der Zirrhose für wt auf 1,88 % und für MrgDR<sup>-/-</sup> auf 4,37 %. Zwischen wt und MrgDR<sup>-/-</sup> bestand nach BDL eine statistische Signifikanz (Vgl. Abb. 10b rechts).

## 4.2 Messung der Portalen Hypertension in der Milz



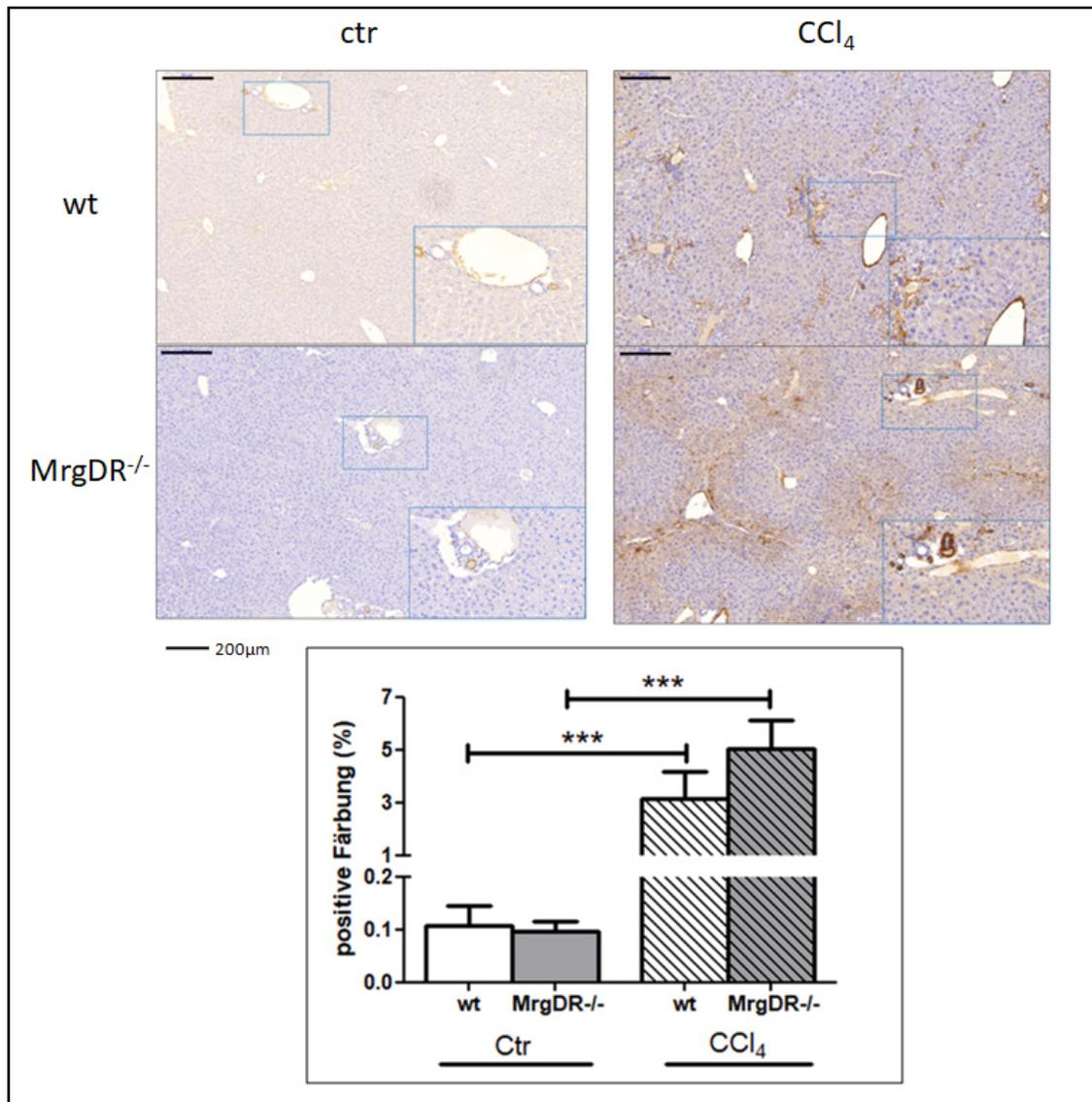
**Abb. 11:** Milzdrücke von verschiedenen Gruppen im Vergleich von wt zu MrgDR<sup>-/-</sup>. Jede Gruppe der MrgDR<sup>-/-</sup> Mäuse wurde mit ihren dazugehörigen Wildtypen verglichen, gekennzeichnet mit \*. Der Vergleich der einzelnen Modelle mit der Kontrollgruppe wurde graphisch mit + dargestellt.

Bei den Kontrollen von wt zu MrgDR<sup>-/-</sup> fiel auf, dass die MrgDR<sup>-/-</sup> Tiere trotz einer breiten Streuung von 5,35 mmHg einen signifikant erhöhten Milzdruck von durchschnittlich 8,8 mmHg hatten. Dieser ist bereits als erhöht zu bewerten. Die wt- Mäuse hatten im Schnitt einen portalen Druck von 5,5 mmHg. Ein signifikanter Unterschied des portalen Drucks zwischen den wt und den MrgDR<sup>-/-</sup> war nur bei den Kontrollen zu beobachten, nach Zirrhoseinduktion war der portale Druck bei MrgDR<sup>-/-</sup> verglichen mit den wt tendenziell niedriger (s. Abb. 11).

Bei den Zirrhosemodellen wurden die höchsten portalen Drücke gemessen. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollen zeigten sich nach BDL mit Werten von durchschnittlich 12,6 mmHg bei wt und 10,3 mmHg bei MrgDR<sup>-/-</sup>. Auch bei den CCl<sub>4</sub> intoxikierten wt stieg der portale Druck um das 1,6-fache mit Werten von durchschnittlich 8,9 mmHg statistisch relevant an. Bei den MrgDR<sup>-/-</sup> war die Tendenz zur Kontrolle allerdings eher gegenläufig mit erniedrigten Milzdrücken von durchschnittlich 7,8 mmHg (s. Abb. 11).

### 4.3 Aktivierung der HSCs

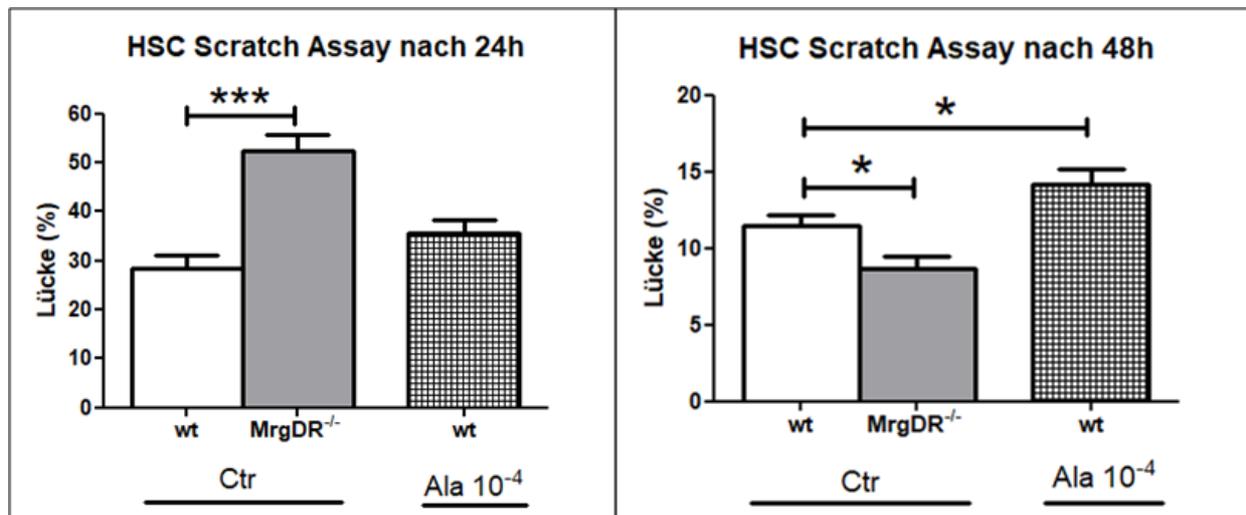
#### 4.3.1 $\alpha$ SMA-Färbungen der Leber



**Abb. 12:** Exemplarische Abbildungen in 10 -facher Vergrößerung (und ca. 20 -fach Fenster), zusätzlich Quantifizierung der mit  $\alpha$ SMA gefärbten Leberschnitten von wt und MrgDR<sup>-/-</sup> Mäusen (Ctr und CCl<sub>4</sub>).

Die Leberfärbungen  $\alpha$ SMA zeigten bei den Kontrollgruppen ähnliche Werte mit wt 0,133 % und MrgDR<sup>-/-</sup> 0,096 %. Die CCl<sub>4</sub>-Intoxikation erhöhte die  $\alpha$ SMA-Anfärbung des Gewebes signifikant auf ca. das 2,4-fache (3,17 %) bei den wt und das 5,3-fache (5,05 %) bei den MrgDR<sup>-/-</sup>. Wegen der breiten Streuung der MrgDR<sup>-/-</sup> (s.e.m.  $\pm$  1,06 %) war aber zwischen den wt und den MrgDR<sup>-/-</sup> keine Signifikanz nachweisbar (Vgl. Abb. 12 unten).

#### 4.3.2 HSC Scratch Assay zur Migration und Proliferation

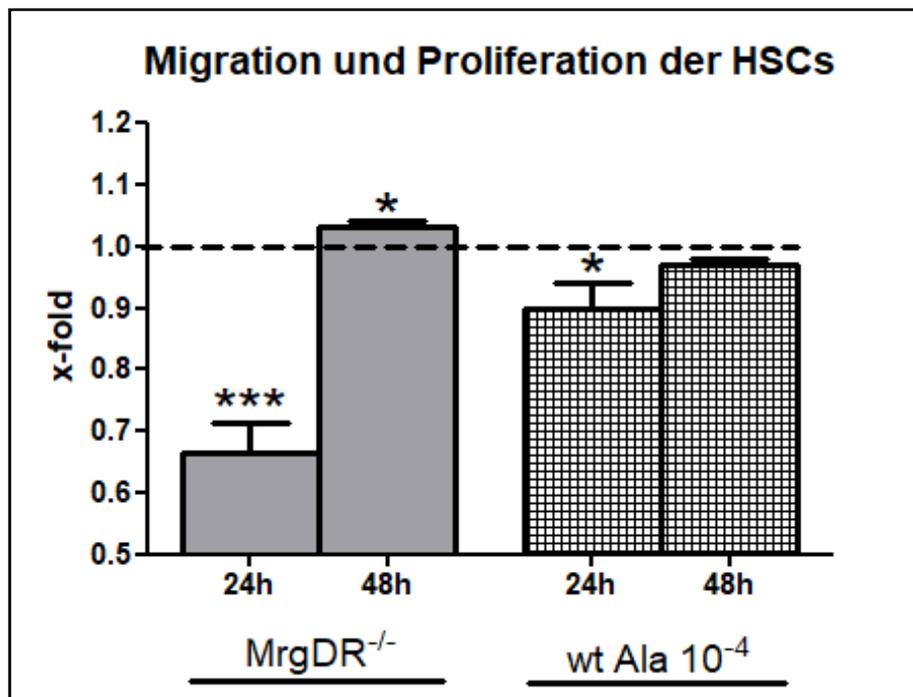


**Abb. 13a:** Das Zuwachsen der Lücke nach 24 h (links) und 48 h (rechts) bei wt und MrgDR<sup>-/-</sup> Ctr sowie nach Inkubation mit wt Alamandine 10<sup>-4</sup> mol/l .

Anhand des Scratch Assays lassen sich Aussagen über die Migration und Proliferation von Zellen treffen, indem der Lückenverschluss eines Kratzers auf dem Zellrasen in definierten Zeitabständen ausgemessen wird. Zunächst erfolgt der Verschluss des Kratzers vorwiegend über Migration (nach 24 h, s. Abb.13a links), im weiteren Verlauf kommen proliferative Effekte zu tragen (nach 48 h, s. Abb. 13a rechts) (Cory, 2011).

Nach 24 h war bei den wt Ctr eine Restlücke von 28,3 % des Ausgangswertes zum Zeitpunkt t = 0 h vorhanden. Bei den MrgDR<sup>-/-</sup> Ctr bestand die Lücke noch zu 52,3 %, was einen hochsignifikanten Unterschied zum wt darstellte. Bei der Inkubation der wt HSCs mit Alamandine mit c = 10<sup>-4</sup> mol/l wurde der Lückenschluss nach 24 h im Vergleich zu den wt Ctr gehemmt (35,5 %) (s. Abb. 13a links).

Nach 48 h hingegen war der Lückenschluss bei den MrgDR<sup>-/-</sup> Ctr mit ca. 8,6 % signifikant stärker ausgeprägt als bei den entsprechenden wt Ctr (11,4 %). Der Lückenschluss der mit Alamandine inkubierten wt HSCs war verglichen mit deren Kontrolle signifikant verzögert mit 14,1 % (Vgl. Abb. 13a rechts).

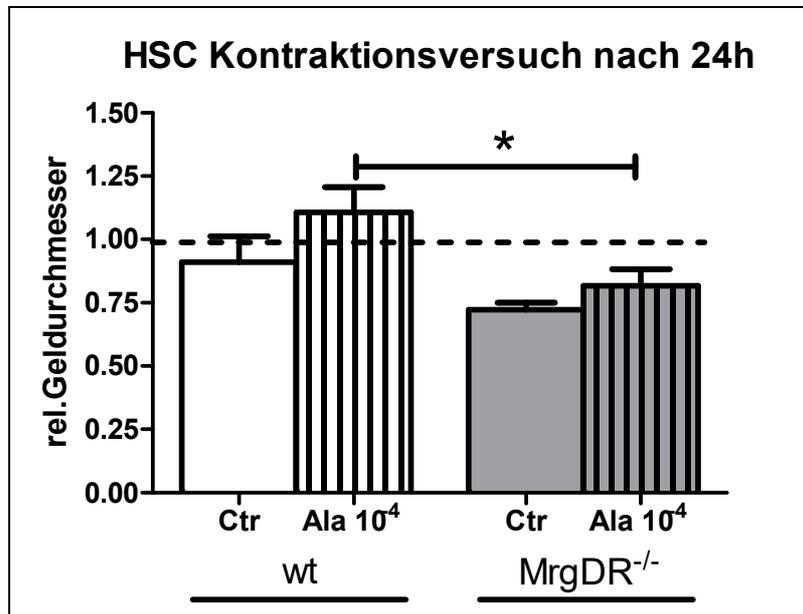


**Abb. 13b:** Migration und Proliferation der MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs und der mit Ala 10<sup>-4</sup> mol/l inkubierten wt je nach 24h und 48 h in Relation zu den wt (bei Signifikanz: \*). Die Balken wurden mit ihren entsprechenden wt Ctr (gestrichelte Linie bei 1,0) verglichen. Es wird das x-fache der Migration zu den wt Ctr angegeben.

Der deutlichste Unterschied zu den wt bestand bei den MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs. Nach 24h sind die MrgDR<sup>-/-</sup> Ctr mit einem relativen Wert von 0,67 verglichen zu den wt Ctr am wenigstens zusammengewachsen. Tatsächlich lag dies aber insbesondere an einem sehr starken Zelluntergang der MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs. Dies deckte sich auch mit den Beobachtungen in der Kultivierung der Zellen, bei welcher die MrgDR<sup>-/-</sup> ca. die doppelte Zeit brauchten, um zu wachsen. Im weiteren Verlauf wird deutlich, dass sofern der Zelluntergang überwunden ist (nach 48 h), die HSCs der MrgDR<sup>-/-</sup> sogar noch stärker zusammenwachsen und migrierten als die entsprechenden wt Ctr. Mit dem 1,04-fachen wuchs diese Gruppe als einzige stärker zusammen als die wt Ctr (s. Abb. 13b).

Die mit Alamandine in der Konzentration 10<sup>-4</sup> mol/l inkubierten wt Zellen wurden durchweg in ihrer Migration gehemmt. Nach 24 h konnte nur das 0,90-fache zu den Ctr erreicht werden, nach 48 h schwindete der Effekt und die Ala 10<sup>-4</sup> inkubierten HSCs glichen sich den Ctr mit einem relativen Wert von 0,97 an (s. Abb. 13b).

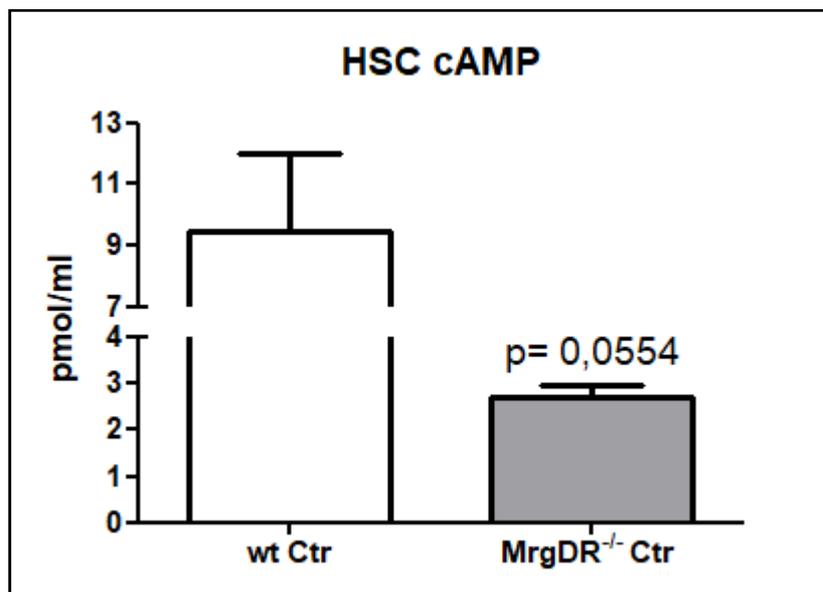
### 4.3.2 HSC Kontraktionsversuche



**Abb. 14:** Darstellung der HSC Kontraktionen auf Kollagengelen nach 24 h von wt und MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs bei Kontrollmedium und Inkubation mit Alamandine  $c = 10^{-4}$  mol/l. Die Ausgangsdurchmesser der Kontraktionsgele zum Zeitpunkt  $t = 0$  h (gestrichelte Linie) wurden auf den relativen Wert 1 bezogen und nach 24 h dazu in Relation gesetzt.

Bei den wt HSCs war nach 24h eine Tendenz zur spontanen Kontraktilität im Kontrollmedium zu sehen (durchschnittlich 0,91), die jedoch nach Zugabe von Ala  $c = 10^{-4}$  mol/l aufgehoben wurde und sogar tendenziell zu einer Relaxation des Gels (rel. Wert 1,11) führte. Die MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs kontrahierten im Kontrollmedium um den relativen Wert 0,72. Bei der Inkubation mit Alamandine mit  $c = 10^{-4}$  mol/l fiel die Kontraktion hingegen schwächer aus mit einem relativen Wert von 0,82. Im Vergleich der wt zu den MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs wurde deutlich, dass die MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs insgesamt eine verstärkte Kontraktilität aufwiesen (Vgl. Abb. 14).

#### 4.3.4 HSC cAMP-Messung



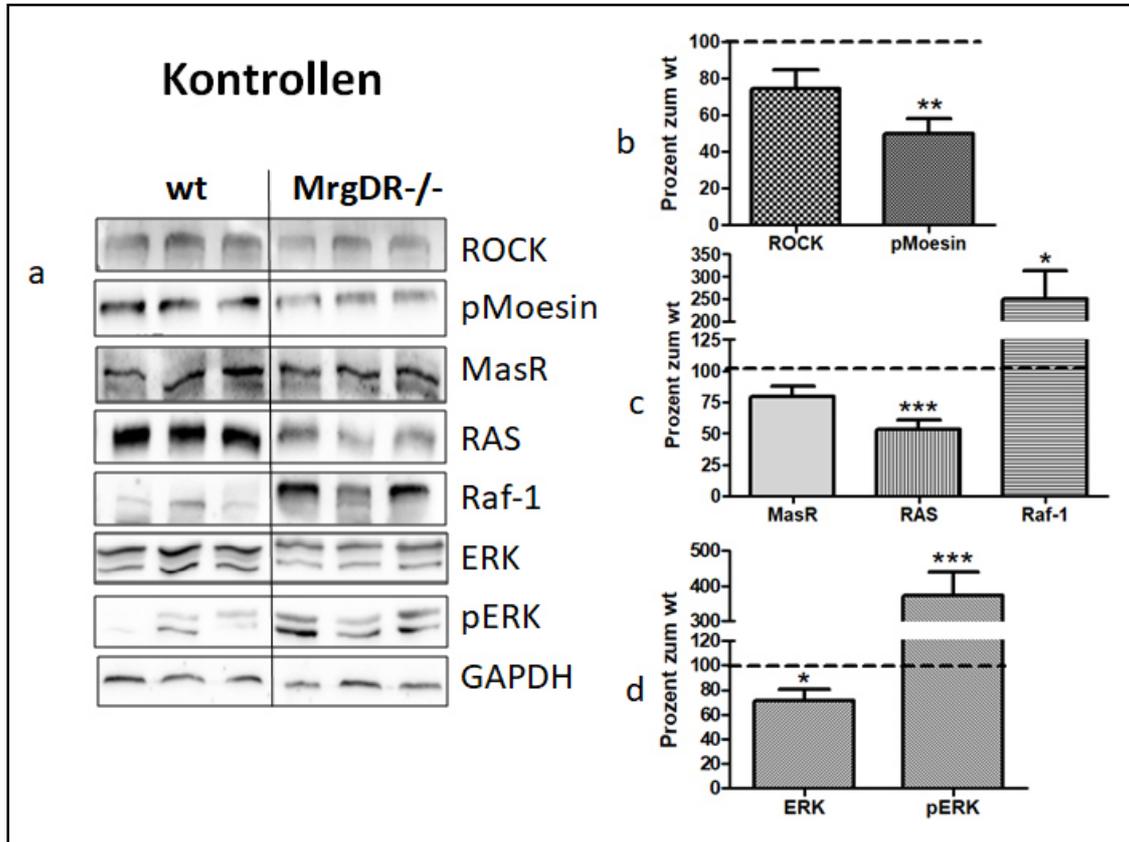
**Abb. 15:** Messung des basalen cAMP-Gehaltes bei wt und MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs

Grundsätzlich konnte man bei den wt Kontrollen einen höheren basalen cAMP-Spiegel der HSCs mit ca. 9,5 pmol/ml messen (s.e.m. ± 2,52). Die MrgDR<sup>-/-</sup>-Zellen hatten eine deutlich geringere cAMP-Expression mit einem durchschnittlichen cAMP Wert von 2,7 pmol/ml (Vgl. Abb.15).

Ang(1-7) und wurde in den folgenden Zellkulturversuchen mit getestet, da es aber keine Unterschiede zwischen wt und MrgDR<sup>-/-</sup> gab, wurde es in den Abbildungen nicht berücksichtigt.

## 4.4 Darstellung von Signalwegen

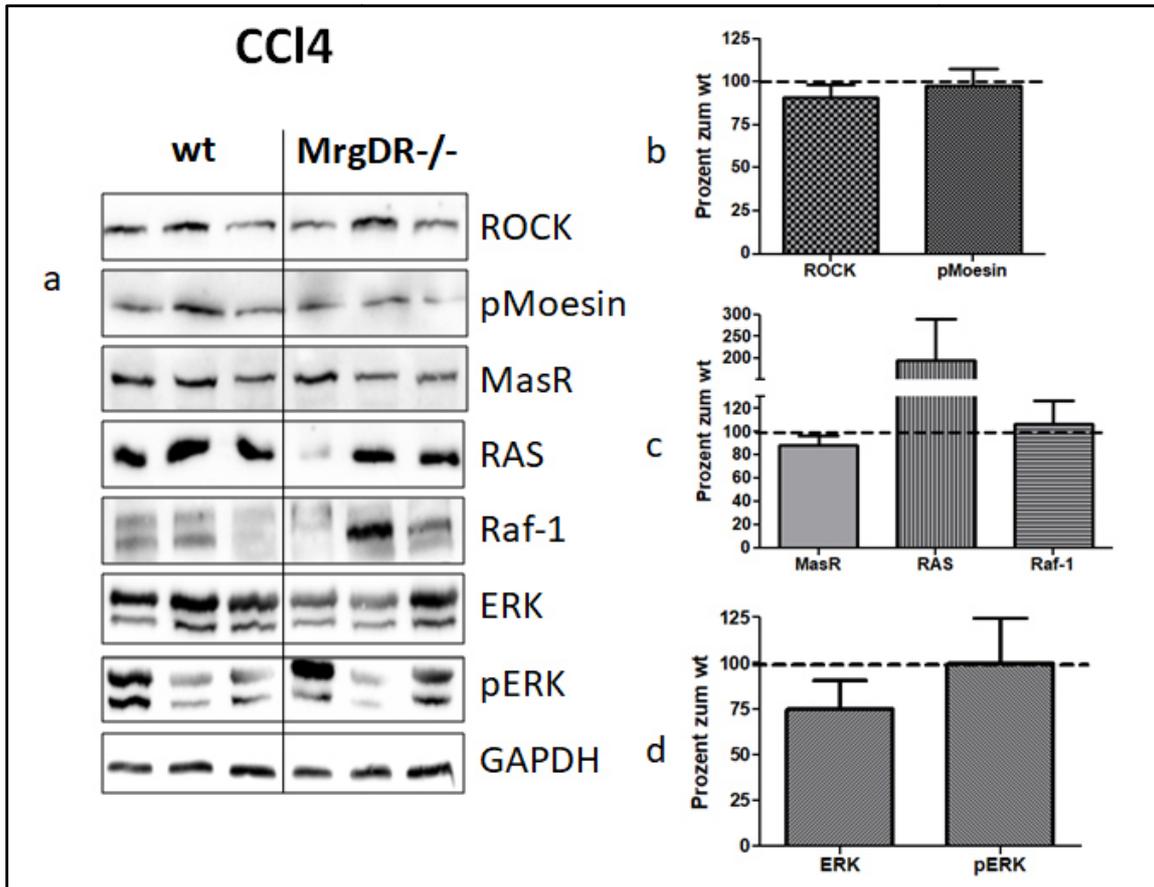
### 4.4.1 Proteinexpression der Lebern von Kontrolltieren



**Abb. 16:** WB der Kontrolltiere a) exemplarische WB mit Proteinexpression der wt und MrgDR<sup>-/-</sup>; b-d) densitometrische Auswertungen der MrgDR<sup>-/-</sup>. Als Bezug wurde die Proteinexpression des wt Ctr = 100 % gesetzt (gestrichelte Linie).

Der MasR zeigte sich tendenziell bei den MrgDR<sup>-/-</sup> weniger stark ausgeprägt als bei den wt (s. Abb. 16 Teil c). Gleiches galt für die Rho-Kinase (ROCK). Das p-Moesin, die durch die Rho-Kinase phosphorylierte Form von Moesin, war bei den MrgDR<sup>-/-</sup> jedoch sehr deutlich um ca. die Hälfte reduziert (s. Abb. 16 Teil b).

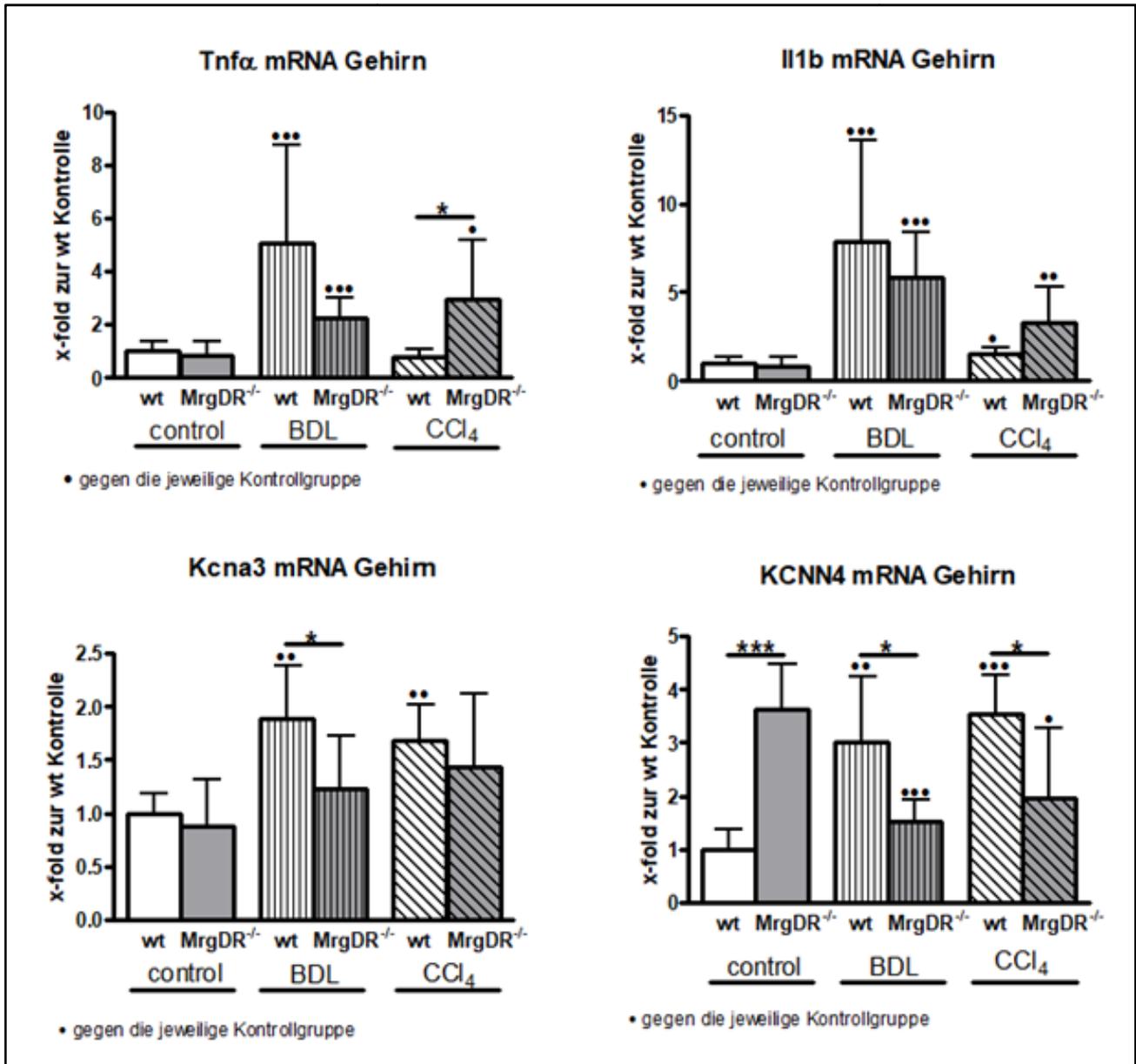
Die auffälligsten Veränderungen ließen sich in der RAS-Raf-1-Signalkaskade finden: Bei den MrgDR<sup>-/-</sup> war die Ras-GTPase (RAS) hochsignifikant auf ca. 50 % verringert, während Raf-1 beim MrgDR<sup>-/-</sup> auf ca. das 2,5 -fache angestiegen war (Abb. 16 Teil c). Auch ERK wurde bei den KO-Mäusen im Vergleich zum wt nur zu 71,3 % exprimiert. Ein maßgeblicher Unterschied bestand im Vergleich des pERK, welches bei den MrgDR<sup>-/-</sup> um das 3,7-fache anstieg (s. Abb. 16 Teil d). Als endogene Kontrolle diente GAPDH.

4.4.2 Proteinexpression von Lebern der CCl<sub>4</sub>-intoxikierten Tieren

**Abb. 17:** a) exemplarische WB mit Proteinexpression bei wt und MrgDR<sup>-/-</sup> in der CCl<sub>4</sub> Gruppe; b-d) densitometrischen Auswertungen der MrgDR<sup>-/-</sup>. Als Bezug wurde die Proteinexpression des wt CCl<sub>4</sub> = 100 % gesetzt (gestrichelte Linie).

Im zirrhotischen CCl<sub>4</sub>-Intoxikationsmodell ließen sich die Unterschiede der Kontrollgruppen nicht mehr nachvollziehen. Lediglich bei der Ras-GTPase war eine Erhöhung zum wt festzustellen, die allerdings nicht signifikant war (s. Abb. 17 Teil c). Die übrigen Proteine der MrgDR<sup>-/-</sup> glichen sich bei einer Zirrhose den CCl<sub>4</sub> wt an (Vgl. Abb. 17). Auch hier diente GAPDH der endogenen Kontrolle.

#### 4.5 Erfassung der zerebralen Inflammation als Ausmaß der Hepatischen Enzephalopathie



**Abb. 18:** Darstellung von Inflammationsmarkern und Kalium-Kanälen aus wt und MrgDR<sup>-/-</sup> Gehirnen anhand von qPCR. Die Werte wurden auf die wt Kontrolle = 1 normiert. Der Vergleich erfolgte zwischen den wt mit der jeweiligen MrgDR<sup>-/-</sup> Gruppe (bei Signifikanz: \*). Zusätzlich wurden nach Induktion einer Zirrhose für die wt bzw. MrgDR<sup>-/-</sup> die entsprechende Kontrollgruppe verglichen (bei Signifikanz: •).

Die Gehirne von wt und MrgDR<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden auf Inflammationszytokine zur Ermittlung der Inflammation und Kaliumkanäle zur Quantifizierung der Ödemausbildung getestet. Diese Symptome gehen mit einer HE einher (Corboda, 2014). Als Entzündungs-

marker dienten die Zytokine TNF $\alpha$  und Il-1b, als Kalium-Kanäle wurden Kcna3 und der Kalium-Kalziumkanal KCNN4 bestimmt. Kcna3 lindert die Ödembildung (Sevelsted Møller et al., 2016) und wirkt neuroprotektiv.

Nach Anwendung einer BDL zeigten sich bei wt und MrgDR $^{-/-}$  signifikant erhöhte Werte der getesteten Inflammationsmarker. Tendenziell waren die Werte bei den MrgDR $^{-/-}$  verglichen zu den wt erniedrigt ( $p_{\text{TNF}\alpha} = 0,076$  und  $p_{\text{Il-1b}} = 0,074$ ). Anders verhielt es sich bei den CCl $_4$ -Gruppen. Auch hierbei war zwar nach Anwendung der Methode (bis auf den wt Il-1b) ein signifikanter Anstieg der Inflammationsmarker zu messen, allerdings waren diese bei den MrgDR $^{-/-}$  verglichen mit den wt erhöht. Bei Il-1b zeigte sich nur eine Tendenz des Anstiegs ( $p = 0,068$ ), bei TNF $\alpha$  war dieser signifikant (Abb. 18 obere Teilabbildungen).

Bei dem Kcna3-Kanal unterschieden sich die Werte zwischen MrgDR $^{-/-}$  und wt kaum. Nach Induktion einer Zirrhose stieg bei den wt die Expression des Kanals signifikant an, bei den MrgDR $^{-/-}$  war nur eine vage Tendenz zu sehen ( $p_{\text{BDL}} = 0,43$  und  $p_{\text{CCl}_4} = 0,19$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen wt und MrgDR $^{-/-}$  war nur bei den BDL auszumachen mit ca. 1,8 (wt) zu 1,3 (MrgDR $^{-/-}$ ) (vgl. Abb.18 unterer Teil links).

Bei den Kontrollgruppen bestand zwischen wt und MrgDR $^{-/-}$  bei dem KCNN4-Kanal ein hochsignifikanter Unterschied um mehr als das 3,7-fache. Bei diesem spannungsabhängigem Kaliumkanal gab es die deutlichsten Unterschiede nach Induktion einer Zirrhose. Sowohl in der CCl $_4$ - als auch in der BDL-Gruppe waren die Werte bei den MrgDR $^{-/-}$  im wt-Vergleich signifikant erniedrigt. Der Vergleich zu den MrgDR $^{-/-}$ -Kontrollen zeigte ebenfalls eine deutliche Abnahme des Kanals nach Anwendung der Methode. Die Ausprägung des KCNN4-Kanals verhielt sich nach Fibroseinduktion bei den wt zu den MrgDR $^{-/-}$  gegenläufig (s. Abb. 18 unterer Teil rechts).

## 5. Diskussion

### 5.1 Der MrgDR in der Pathogenese der Leberfibrose und ihrer Komplikationen

Anhand der gewonnenen Messdaten gelang es unserer Forschungsgruppe erstmalig, Aussagen über die Auswirkungen des MrgDR bei der Leberfibrose und der PH zu treffen. Die Ergebnisse zur Erfassung der Leberfibrose lassen schlussfolgern, dass der MrgDR einen antifibrotischen Effekt bei der Fibrogenese besitzt, wie es auch bereits von Lautner et al. für das kardiovaskuläre System beschrieben wurde. Die Rezeptordefizienz ging dort mit gesteigerter Bildung von Kollagen I, III und Fibronectin einher (Lautner et al., 2013). Wir konnten die antifibrotische Wirkung allerdings nur bei einer vorangegangenen Leberschädigung beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass der MrgDR-KO in der Leber spontan kompensiert werden kann, bei einer Fibrose reichen die Kompensationsmechanismen nicht mehr aus. Die antifibrotische Eigenschaft des MrgDR weist Parallelen zum MasR auf. Der MasR zeigt allerdings im Gegensatz zum MrgDR einen spontanen Phänotypen in der HP-Messung (Pereira et al., 2007), was darauf hindeutet, dass die Auswirkungen des MasR auf den Phänotyp der Fibrose stärker sein könnten als die des MrgDR.

Die HSCs übernehmen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der PH mit ihren Eigenschaften der Proliferation, Kontraktion und Migration (Bosch et al., 2008). Per se konnte man bei den *in vitro* Messungen zur Aktivierung der HSCs nicht von einer verstärkten Rekrutierung von aHSCs durch das Fehlen des MrgDR ausgehen. Deutlichere Auswirkungen der MrgDR-Defizienz ließen sich *in vivo* in der Beurteilung zur portalen Hypertension mit der Ausprägung eines spontanen Phänotyps bei den Kontrollen feststellen. Diese Beobachtung konnte durch die Kontraktionsversuche, in der eine basal gesteigerte Kontraktionsneigung der MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs gemessen werden konnte, bestätigt werden. Die Inkubation der wt HSCs mit Alamandine untermauert die relaxierende Funktion des MrgDR. Unter Einbezug der Ergebnisse aus den WB (s. Kap. 5.2 „Die Rolle des MrgDR für das RAS und intrazelluläre Vorgänge“) ist es gut möglich, dass bei den HSCs die Relaxation die Hauptfunktion des MrgDR darstellt, ähnlich dem MasR (Bataller and Brenner, 2005). Dies weist auf eine stark tonusregulierende Wirkung des MrgDR in der Leber hin.

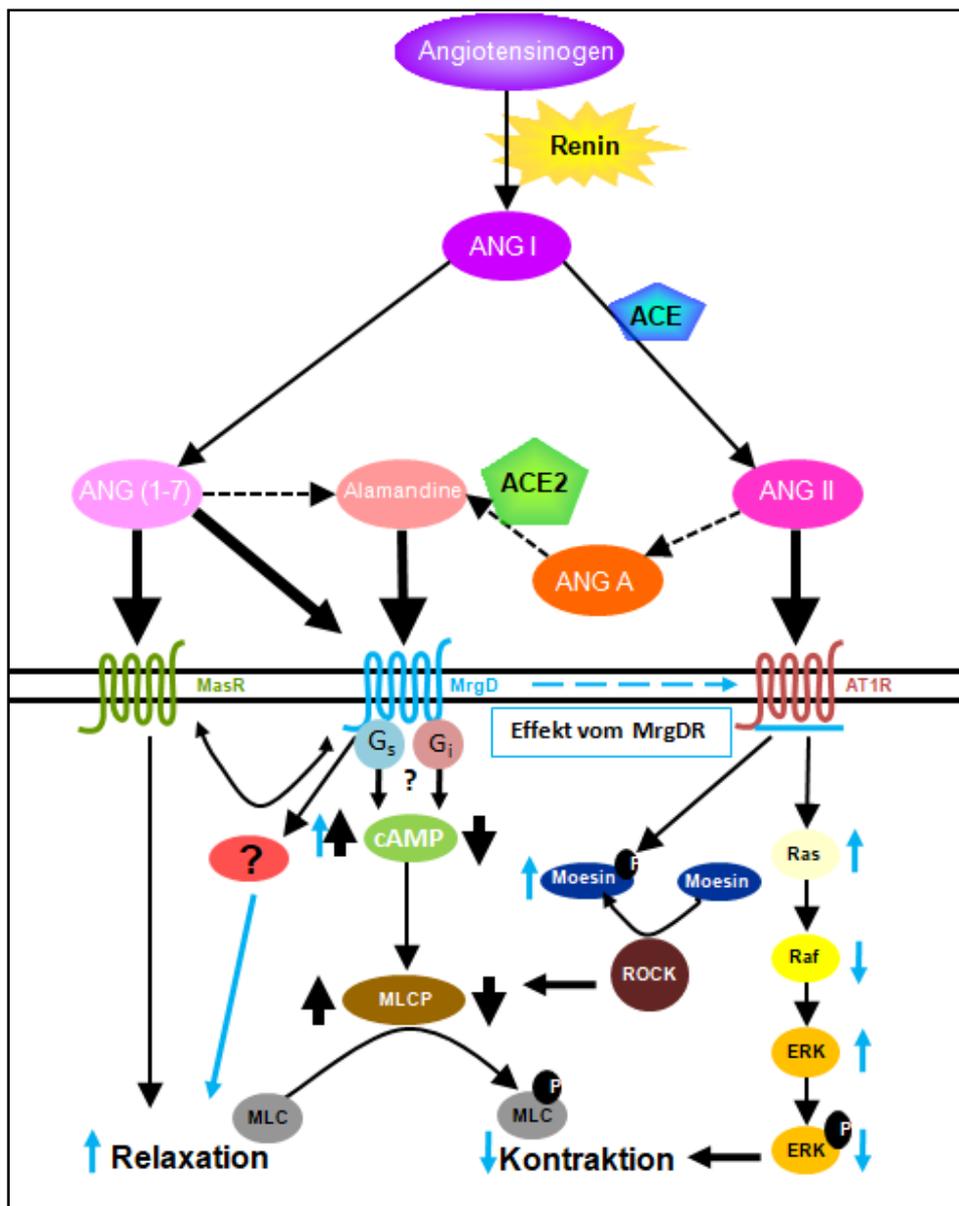
Die zuvor beschriebenen Ergebnisse ließen sich jedoch nach Zirrhoseinduktion nicht weiter reproduzieren. Trotz des sehr deutlichen Spontanphänotyps ist ein erhöhter portaler Hypertonus im Vergleich zu den wt nach CCl<sub>4</sub>-Intoxikation und BDL bei den MrgDR-defizienten Mäusen nicht mehr vorhanden. Auch die kontraktionsfördernden Signalkaskaden waren bei zirrhatischen wt-Tieren angeglichen (Vgl. Kap. 5.2 „Die Rolle des MrgDR für das RAS und intrazelluläre Vorgänge“). Daher ist fraglich, ob die tonusregulierenden Effekte noch Wirkung bei vorhandener Schädigung zeigen, oder ob sie durch die Rolle der HSCs bei Migration und Proliferation überlagert werden und dann eine untergeordnete Stellung einnehmen. Diese These konnten wir bei den Versuchen zur Migration und Proliferation der HSCs bestätigen. Besonders auffällig war die erschwerte Kultivierung der Zellen durch die verminderte Proliferation und einen deutlichen Zelluntergang der MrgDR<sup>-/-</sup> HSCs. Dies führte beim Scratch Assay nach 24h zu der fälschlichen Annahme einer verminderten Kontraktilität. Als das Defizit der Zellproliferation nach 48h ausgeglichen war, war auch hier wieder ein deutlicher Lückenschluss vorhanden, der eine erhöhte Migration und Kontraktilität postuliert.

Weitere Erkenntnisse konnten wir für die zerebrale Inflammation und die Ödembildung als Zeichen der HE gewinnen. Die Erhöhung von Inflammationszytokinen deutet auf eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke hin und der erniedrigte Wert für den Kcna3 und KCNN4 fördert die Ödembildung (Friedman et al., 2009; Selvested Møller, 2016). Bei den Kontrollgruppen konnte keine basale Erhöhung der gemessenen Marker festgestellt werden. Dies verdeutlicht, dass die HE erst als eine Komplikation der Leberzirrhose auftritt (Cordoba, 2014). Nach Induktion einer Fibrose vervielfachten sich die Inflammationsmarker bei allen Gruppen (wt und MrgDR<sup>-/-</sup>). Bei der CCl<sub>4</sub>-Intoxikation könnte dies Hinweise auf eine anti-inflammatorische Wirkung des MrgDR ähnlich dem MasR geben (Santos et al., 2003). Die vermehrte Expression von Kaliumkanälen nach Schädigung könnte für einen regulatorischen Kompensationsmechanismus sprechen, indem durch gesteigerte Kaliumkanäle das Membranpotenzial aufrechterhalten wird. Grundsätzlich war im Fibrosemodell bei den MrgDR<sup>-/-</sup> eine verminderte Expression zu den wt zu erkennen, was auf eine stärker ausgeprägte HE bei den MrgDR-KO hinweist. Daher gehen wir von einer protektiven Funktion des MrgDR für die HE aus.

## 5.2 Die Rolle des MrgDR für das RAS und intrazelluläre Vorgänge

In sensorischen Neuronen wurde anhand der Bindung von  $\beta$ -Alanin eine Aktivierung der ERK1/2-Achse durch den MrgDR festgestellt (Milasta et al., 2006). In den Kontrolllebern konnten wir bei MrgDR<sup>-/-</sup> mittels WB die deutlichsten Unterschiede zum wt bei der Proteinexpression von ERK1/2 und pERK sehen. Dementsprechend liegt auch in der Leber die Involvierung der Enzyme durch den MrgDR nahe. Dieser Signalweg wird in der Leber primär über den AT1R aktiviert und führt letztlich mittels Phosphorylierung von ERK zu pERK zu gesteigerter Fibrose und Kontraktion. Im Umkehrschluss reguliert der MrgDR durch Crosstalk inhibitorisch den AT1R und die ERK/pERK-Signalkaskade und wirkt relaxierend.

Zusätzlich konnte unsere Arbeitsgruppe weitere Veränderungen bei Enzymen und Substraten feststellen, die bislang noch nicht im Zusammenhang zum MrgDR beschrieben wurden. Es handelte sich um die Enzyme der Ras/Raf/ERK-Signalkaskade, die kontraktile, promotogene, inflammatorische und antiapoptotische Wirkung haben (Nguyen Dinh Cat A. and Touyz, 2011). Im MrgDR<sup>-/-</sup> war RAS signifikant erniedrigt, während Raf-1, welches ERK zu pERK phosphoryliert, um das Vierfache erhöht war. Dies deckt sich mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen der Signalkaskade. Insgesamt spricht es für eine erhöhte Aktivität mitogener Kinasen bei dem KO, was mit den Ergebnissen in den Kontraktionsversuchen übereinstimmt. Folgerichtig bestätigt sich auch auf intrazellulärer Ebene eine relaxierende und antifibrotische Wirkung des MrgDR, ähnlich dem MasR. Die beschriebenen Phänomene sind jedoch nach Induktion einer Zirrhose überspielt, sodass diese Unterschiede in der Proteinexpression bei einer zirrhotischen Leber nicht zu detektieren sind.



**Abb. 19:** Schematische Darstellung: Einfluss des MrgDR auf die Signalkaskaden (blau)

Die MLC werden durch die MLCK phosphoryliert, was zur Kontraktion führt. Erst mittels Phosphat-Abspaltung durch die MLCP tritt eine Relaxation ein. ROCK inhibiert die MLCP und begünstigt somit eine verlängerte Kontraktion. In den WB war zwar die Expression von ROCK gleich, jedoch stellte sich die Frage nach der Enzymaktivität, da pMoesin deutlich erhöht war. Ein möglicher Erklärungsansatz hierzu ist die gesteigerte Bildung von cAMP, welches inhibitorisch auf ROCK wirkt (Trebicka et al., 2017). Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass die Aktivierung von ERK1/2 cAMP-abhängig verläuft (Liu et al., 2012). Die Arbeitsgruppe um Tetzner et al. hatte bereits beim MrgDR cAMP als

second Messenger bei VSMCs identifiziert (Tetzner et al., 2016). Die daraufhin von uns durchgeführte cAMP-Messung zeigte in den Kontrollgruppen der HSCs bei den MrgDR<sup>-/-</sup> im Vergleich zum wt eine erniedrigte cAMP-Synthese, was die Ergebnisse von Tetzner et al. auch auf HSCs übertragbar macht. Da eine erhöhte cAMP-Synthese über G<sub>s</sub> stimuliert wird, lässt es die Vermutung zu, dass der MrgDR an G<sub>s</sub> gekoppelt sein könnte und seine relaxierende Wirkung über die Stimulation von MLCP entfaltet, indem es beispielsweise ROCK inhibiert.

### 5.3 Ausblick und Bedeutung der Erkenntnisse

Einige Fragen ließen sich nach Einbezug unserer Erkenntnisse nicht abschließend klären, z.B.: wie genau sind die einzelnen Signalkaskaden in deren Interaktionen miteinander verknüpft? Wieso waren die Unterschiede der Signalkaskaden nur in den Kontrolltieren feststellbar, jedoch nicht mehr nach Induktion einer Zirrhose? Inwiefern beeinflusst der MrgDR den MasR und den AT1R und wie genau ist die Funktion des MrgDR an den MasR gekoppelt?

Aufgrund der Homologie der MrgRs zum Mas-Rezeptor mit 34 – 35 % (Bader et al., 2014) sind die Parallelen und die Unterschiede der Wirkweisen von großem Interesse. Von beiden Rezeptoren ist bekannt, dass sie eine Heterodimerisierung eingehen können, so z.B. der MrgDR mit dem MrgER (Milasta et al., 2006) und der MasR mit dem AT1R (Leonhardt et al., 2017; Maggio et al., 2005; Patel and Hussain, 2018). Die Bildung von Heterodimeren kann Signalkaskaden wie die ERK-Signalkaskade aktivieren (Somvanshi et al., 2011). Bislang bleibt unklar, ob der MrgDR und der MasR miteinander heterodimerisieren und ob dies Auswirkungen auf die Aktivität hat. Die ERK1/2 – Signalkaskade, die maßgeblich durch den MrgDR-Defizit verändert wurde, spielt in der Vermittlung der Endozytose von G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine entscheidende Rolle (Pierce et al., 2000). Des Weiteren sind Internalisierungsvorgänge des MasR nach Aktivierung mit Ang(1-7) bekannt (Gironacci et al., 2011), außerdem wird der MrgDR nach Aktivierung mit Alamandine oder  $\beta$ -Alanin ebenfalls endozytiert (Lautner et al., 2013; Shinohara et al., 2004). Inwiefern die Endozytose der Rezeptoren Auswirkungen auf die Funktion hat und ob sich der MasR und der MrgDR dabei gegenseitig beeinflussen, bleibt unklar. Zudem ist für Ang(1-7) ein Reaktionsgleichgewicht durch

AT1R und MasR bekannt (Paizis et al., 2002), ob es aber auch in Abhängigkeit des MrgDR zu einem solchen Reaktionsgleichgewicht von Alamandine oder Ang(1-7) kommt, ist noch unerforscht. In der Zusammenschau wird die Notwendigkeit weiterer Forschung zur Verknüpfung der einzelnen Teilergebnisse in den Gesamtkontext deutlich.

Bislang wurde bei der Aktivierung der HSCs immer von einem Phänotypwechsel ausgegangen, der eine verstärkte Kontraktilität und eine verstärkte Fibrogenese einschließt (Bosch et al., 2008). Bei dem MrgDR<sup>-/-</sup> ist auffällig, dass je nach Aktivitätszustand der HSCs einzelne Funktionen unterschiedlich stark beeinflusst werden. Spontan dominiert die tonusregulierende Wirkung, bei einer Leberschädigung überwiegen deutlich antifibrotische und proliferative Eigenschaften. Diese Schwankungsbreite des Phänotyps verlässt die klassische Theorie, dass immer die gleichen Wirkungen bei der Aktivierung eines Rezeptors auftreten und zeigt, dass man einzelne Aspekte je nach zugrundeliegender Pathologie differenzieren muss.

Letztlich stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit der Erkenntnisse der Forschungsarbeit aus dem murinen Modell auf den Menschen: Bereits Lautner gesteht ein, dass man zur Beobachtung der Effekte unphysiologische Konzentrationen verwendet hatte (Lautner et al., 2013), Habiyakare et al. haben im Kaninchenmodell keine signifikante Vasodilatation durch Alamandine und somit durch den MrgDR feststellen können (Habiyakare et al., 2014). Zudem konnte die Forschungsgruppe zwar eine Inhibition des vasokonstriktorisches Ang A durch Alamandine und Ang(1-7) beobachten, allerdings keine von ANGII, welches 10-mal potenter als Ang A wirkt (Jankowski et al., 2007). Die Potenz von Alamandine ist bisher noch nicht beschrieben, wodurch die Relevanz der Ergebnisse für den gesamten Organismus nicht abschließend geklärt werden kann.

Für die Leberfibrose könnte die medikamentöse Modulation des MrgDR einen Vorteil bringen, da er vasodilatative, proliferative und antifibrotische Eigenschaften zeigt. Die Stimulation des Rezeptors mit Alamandine in unphysiologisch hohen Konzentrationen hat im Scratch Assay und den Kontraktionsversuchen relaxierende Wirkungen im Vergleich zu den wt Kontrollen gezeigt. Daher könnte diese Überstimulation als ein

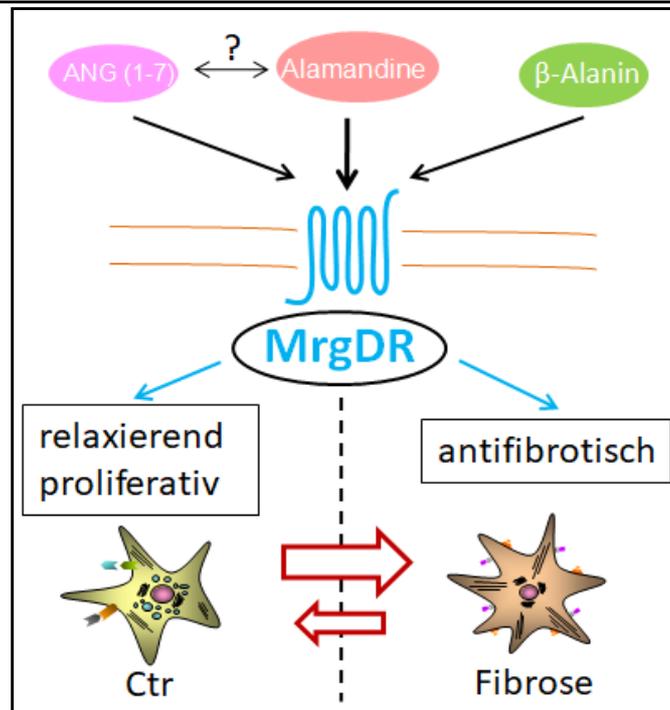
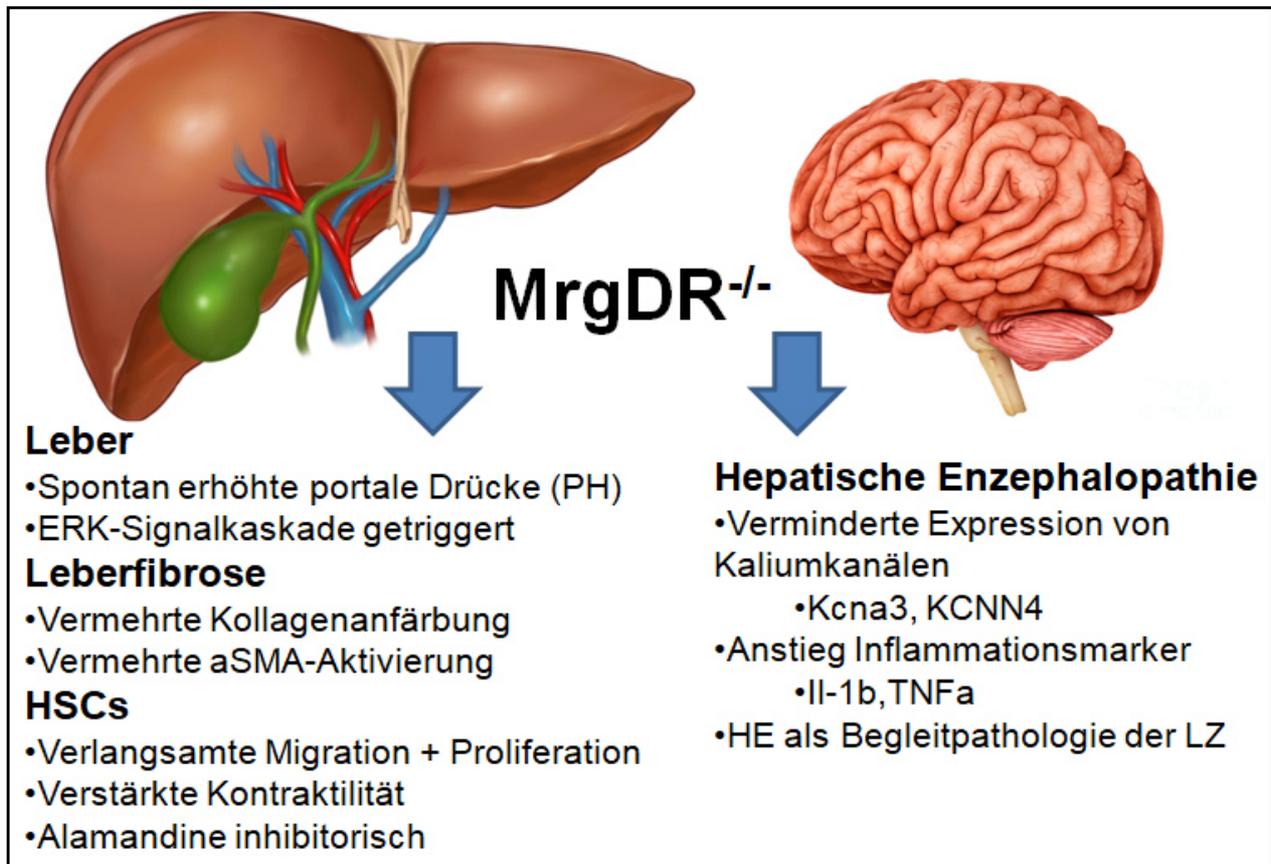
Ansatz für ein Therapiekonzept gesehen werden. Allerdings stellt sich die Frage, wie deutlich die Ausprägung des Phänotyps des MrgDR auf den gesamten Organismus ist. Außerdem bleibt ungeklärt, über welche Mechanismen der MrgDR antifibrotisch wirkt. Eine geringere Aktivierung von HSCs durch den MrgDR konnte in den  $\alpha$ SMA-Färbungen nicht gezeigt werden. Ein anderer Erklärungsansatz wäre ein gesteigerter Abbau von ECM. Denkbar wäre eine MrgDR-vermittelte Aktivierung von MMPs oder Hemmung der TIMPS. Insbesondere im Hinblick auf mit der Leberzirrhose assoziierten Komplikationen wie der HE scheint weitere Forschungsarbeit aufgrund seiner protektiven Eigenschaften vielversprechend. Bis zur Entwicklung potentieller Pharmaka müsste allerdings noch mehr Grundlagenforschung erfolgen, um endgültig die Bedeutung und die Funktionsmechanismen entschlüsseln zu können.

## 6. Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System ist maßgeblich an der Entstehung der Leberzirrhose und der portalen Hypertension beteiligt. Diese Krankheitsbilder können zu extrahepatischen Komplikationen, z.B. der hepatischen Enzephalopathie als Zeichen zerebraler Inflammation, führen. Der Mas-Rezeptor (MasR) ist der Gegenspieler des AT1-Rezeptors und hat einen antifibrotischen und somit protektiven Effekt auf die Leberfibrose. Der MrgD-Rezeptor (MrgDR) weist eine starke Homologie zum Mas-Rezeptor auf, seine Funktion bei Leberfibrose ist allerdings bislang nicht beschrieben.

In dieser Arbeit wurden anhand von MrgDR-Knock-Out-Mäusen die Auswirkungen der Rezeptordefizienz auf die Leberfibrose einschließlich ihrer Komplikationen untersucht. Die Versuche beinhalteten in vivo Messungen des portalen Drucks sowie die Erfassung der Gewichtsdaten. Des Weiteren wurden biochemische und molekularbiologische Methoden sowie immunhistochemische Färbungen angewandt, um die Veränderungen in der Leber und im Gehirn der Tiere zu ermitteln. Die Auswirkungen der Rezeptordefizienz auf hepatische Sternzellen wurden anhand von Zellkulturversuchsreihen detektiert.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der MrgDR ähnliche Eigenschaften wie der MasR besitzt. Er scheint über eine stärker tonusregulierende Wirkung als der MasR zu verfügen, da die MrgDR-KO-Mäuse einen spontanen Phänotyp mit erhöhtem Portaldruck zeigten, was auch im Kontraktionsversuch untermauert werden konnte. Dem MrgDR kann folglich eine relaxierende Wirkung zugeordnet werden. Bei der Fibrose sind die spontanen Effekte überspielt, dennoch kommt es zu einer verstärkten Fibroseakkumulation bei MrgDR-Defizienz. Ähnlich dem MasR weist dies auf eine antifibrotische Komponente hin. Aus den Ergebnissen des Scratch Assays leitet sich eine proliferative Wirkung ab. Im Kontext einer Hepatischen Enzephalopathie scheint der MrgDR insgesamt protektiv zu sein.



**Abb. 20:** Zusammenfassende Darstellung des MrgDR. Oben: Zusammenfassung der Ergebnisse bei MrgDR-KO. Unten: Pathophysiologische Erkenntnisse

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lösungsansätze zur Therapie der Leberfibrose	13
Abb. 2: Normale Leber und Veränderungen bei zirrhotischer Leber	15
Abb. 3: Komponenten der Leberzirrhose	17
Abb. 4: Phasen der Aktivierung von HSCs	20
Abb. 5: Pathomechanismen bei portaler Hypertension	21
Abb. 6: RAS-Darstellung mit AT1R-Achse und MasR-Achse	26
Abb. 7: RAS-Signalkaskaden	28
Abb. 8: ANGII-Alamandine-MrgDR-Achse	31
Abb. 9: Hydroxyprolinegehalt der Mauslebern	51
Abb. 10a: Exemplarische picro Siriusrot-Färbungen	52
Abb. 10b: Quantitative Auswertungen der picro Siriusrot-Färbungen	53
Abb. 11: Milzdrücke	54
Abb. 12: $\alpha$ SMA-Färbungen der Leber	55
Abb. 13a: HSC Scratch Assay im Vergleich nach 24 h und 48 h	56
Abb. 13b: HSC x-fold-Darstellung zum wt	57
Abb. 14: HSC Kontraktionsversuch	58
Abb. 15: HSC cAMP-Messung	59
Abb. 16: Proteinexpression der Leber von Kontrolltieren	60
Abb. 17: Proteinexpression der Leber von CCl <sub>4</sub> -intoxikierten Tieren	61
Abb. 18: qPCR der Gehirne zur Bestimmung hepatischer Enzephalopathie	62
Abb. 19: Beeinflussung der Signalkaskaden durch den MrgDR	67
Abb. 20: Zusammenfassung der Ergebnisse	72

## 8. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Primäre Antikörper	33
Tab.2: Sekundäre Antikörper, gekoppelt an ein Konjugat	34
Tab.3: Gewichtsdaten	49

## 9. Literaturverzeichnis

- Albillos, A., Lario, M., and Álvarez-Mon, M. (2014). Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *J. Hepatol.* *61*, 1385–1396
- Arthur, M.J. (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *279*, G245-249
- Arthur, M.J.P. (2002). Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* *122*, 1525–1528
- Avula, L.R., Buckinx, R., Favoreel, H., Cox, E., Adriaensen, D., Van Nassauw, L., and Timmermans, J.-P. (2013). Expression and distribution patterns of Mas-related gene receptor subtypes A-H in the mouse intestine: inflammation-induced changes. *Histochem. Cell Biol.* *139*, 639–658
- Bader, M., Alenina, N., Andrade-Navarro, M.A., and Santos, R.A. (2014). Mas and Its Related G Protein–Coupled Receptors, *Mrgprs*. *Pharmacol. Rev.* *66*, 1080–1105
- Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* *115*, 209–218
- Bataller, R., Ginès, P., Nicolás, J.M., Görbig, M.N., Garcia-Ramallo, E., Gasull, X., Bosch, J., Arroyo, V., and Rodés, J. (2000). Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* *118*, 1149–1156
- Bataller, R., Sancho-Bru, P., Ginès, P., Lora, J.M., Al-Garawi, A., Solé, M., Colmenero, J., Nicolás, J.M., Jiménez, W., Weich, N., et al. (2003a). Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* *125*, 117–125
- Bataller, R., Gäbele, E., Schoonhoven, R., Morris, T., Lehnert, M., Yang, L., Brenner, D.A., and Rippe, R.A. (2003b). Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *285*, G642-651
- Bataller, R., Sancho-Bru, P., Ginès, P., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid.Redox Signal.* *7*, 1346–1355
- Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D.-C., and Roudot-Thoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *J. Hepatol.* *58*, 593–608
- Bosch, J., Berzigotti, A., Garcia-Pagan, J.C., and Abraldes, J.G. (2008). The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J. Hepatol.* *48*, S68–S92

- Bosch, J., Groszmann, R.J., and Shah, V.H. (2015). Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J. Hepatol.* 62, S121–S130
- Breakwell, L., Tevi-Benissan, C., Childs, L., Mihigo, R., and Tohme, R. (2017). The status of hepatitis B control in the African region. *Pan Afr. Med. J.* 27
- Brouwers, S., Smolders, I., Wainford, R.D., and Dupont, A.G. (2015). Hypotensive and sympathoinhibitory responses to selective central AT<sub>2</sub> Receptor stimulation in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 129, 81–92
- Butterworth, R.F. (2011). Hepatic encephalopathy: A central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* 53, 1372–1376
- Calzadilla Bertot, L., and Adams, L.A. (2016). The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17
- Canbay, A., Friedman, S., and Gores, G.J. (2004). Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology. Baltim. Md* 39, 273–278
- Chen, A., and Davis, B.H. (1999). UV Irradiation Activates JNK and Increases  $\alpha$ 1(I) Collagen Gene Expression in Rat Hepatic Stellate Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 158–164
- Child, C.G., and Turcotte, J.G. (1964). Surgery and portal hypertension. *Major Probl. Clin. Surg.* 1, 1–85
- Cho, J.J., Hocher, B., Herbst, H., Jia, J.D., Ruehl, M., Hahn, E.G., Riecken, E.O., and Schuppan, D. (2000). An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 118, 1169–1178
- Cordoba, J. (2014). Hepatic Encephalopathy: From the Pathogenesis to the New Treatments. *ISRN Hepatol.* 2014
- D'Amico, G., Garcia-Tsao, G., and Pagliaro, L. (2006a). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *J. Hepatol.* 44, 217–231
- D'Amico, G., Garcia-Pagan, J.C., Luca, A., and Bosch, J. (2006b). Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review. *Gastroenterology* 131, 1611–1624
- Davis, G.L., Albright, J.E., Cook, S.F., and Rosenberg, D.M. (2003). Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 9, 331–338
- Dixon, J.B., Bhathal, P.S., Hughes, N.R., and O'Brien, P.E. (2004). Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology. Baltim. Md* 39, 1647–1654

Dong, X., Han, S., Zylka, M.J., Simon, M.I., and Anderson, D.J. (2001). A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 106, 619–632

Elvevold, K., Smedsrød, B., and Martinez, I. (2008). The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G391–G400

Etelvino, G.M., Peluso, A.A.B., and Santos, R.A.S. (2014). New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Curr. Hypertens.Rep.* 16, 433

European Association for the Study of Liver. (2016). Background Media Information: fast facts about liver disease. <http://2016.ilc-congress.eu/wp-content/uploads/2016/04/Liver-disease-background.pdf> (20.08.2018)

Fernandez, M., Vizzutti, F., Garcia-Pagan, J.C., Rodes, J., and Bosch, J. (2004). Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 126, 886–894

Friedman, S.L. (1999). Cytokines and fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.* 19, 129–140

Friedman, S.L. (2000). Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *J. Biol. Chem.* 275, 2247–2250

Friedman, S.L. (2003). Liver fibrosis – from bench to bedside. *J. Hepatol.* 38, 38–53

Friedman, S.L. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol. Rev.* 88, 125–172

Friedman, A., Kaufer, D., and Heinemann, U. (2009). Blood–brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: Novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy Res.* 85, 142–149

Friedman, S.L., Roll, F.J., Boyles, J., and Bissell, D.M. (1985). Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 8681–8685

Geisterfer, A.A., Peach, M.J., and Owens, G.K. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ.Res.* 62, 749–756

Gironacci, M.M., Adamo, H.P., Corradi, G., Santos, R.A., Ortiz, P., and Carretero, O.A. (2011). Angiotensin (1-7) Induces Mas Receptor Internalization. *Hypertension* 58, 176–181

Grace, J.A., Klein, S., Herath, C.B., Granzow, M., Schierwagen, R., Masing, N., Walther, T., Sauerbruch, T., Burrell, L.M., Angus, P.W., et al. (2013). Activation of the MAS

receptor by angiotensin-(1-7) in the renin-angiotensin system mediates mesenteric vasodilatation in cirrhosis. *Gastroenterology* 145, 874-884.e5

Griendling, K.K., Delafontaine, P., Rittenhouse, S.E., Gimbrone, M.A., and Alexander, R.W. (1987). Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 262, 14555–14562

Griendling, K.K., Lassègue, B., and Alexander, R.W. (1996). Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 281–306

Griendling, K.K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ. Res.* 86, 494–501

Groszmann, R.J. (1994). Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology*. Baltimore, Md 20, 1359–1363

Groszmann, R., Kotelanski, B., Cohn, J.N., and Khatri, I.M. (1972). Quantitation of portasystemic shunting from the splenic and mesenteric beds in alcoholic liver disease. *Am. J. Med.* 53, 715–722

Groszmann, R.J., Garcia-Tsao, G., Bosch, J., Grace, N.D., Burroughs, A.K., Planas, R., Escorsell, A., Garcia-Pagan, J.C., Patch, D., Matloff, D.S., et al. (2005). Beta-Blockers to Prevent Gastroesophageal Varices in Patients with Cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 353, 2254–2261

Habiyakare, B., Alsaadon, H., Mathai, M.L., Hayes, A., and Zulli, A. (2014). Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *Int. J. Exp. Pathol.* 95, 290–295

Hammel, P., Couvelard, A., O'Toole, D., Ratouis, A., Sauvanet, A., Fléjou, J.F., Degott, C., Belghiti, J., Bernades, P., Valla, D., et al. (2001). Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N. Engl. J. Med.* 344, 418–423

Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R., and Dagenais, G. (2000). Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.* 342, 145–153

Henriksen, E.J., Jacob, S., Kinnick, T.R., Teachey, M.K., and Krekler, M. (2001). Selective Angiotensin II Receptor Antagonism Reduces Insulin Resistance in Obese Zucker Rats. *Hypertension* 38, 884–890

Herath, C.B., Lubel, J.S., Jia, Z., Velkoska, E., Casley, D., Brown, L., Tikellis, C., Burrell, L.M., and Angus, P.W. (2009). Portal pressure responses and angiotensin peptide production in rat liver are determined by relative activity of ACE and ACE2. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297, G98–G106

- Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 425–456
- Horiuchi, M. (2014). [Brain renin-angiotensin-aldosterone system and cognitive function]. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* 72, 641–647
- Hrenak, J., Paulis, L., and Simko, F. (2016). Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 17
- Hunyady, L., and Catt, K.J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20, 953–970
- Igarashi, M., Hirata, A., Yamaguchi, H., Tsuchiya, H., Ohnuma, H., Tominaga, M., Daimon, M., and Kato, T. (2001). Candesartan Inhibits Carotid Intimal Thickening and Ameliorates Insulin Resistance in Balloon-Injured Diabetic Rats. *Hypertension* 38, 1255–1259
- Ito, T., Okonogi, T., Satsuki, S., Nemoto, M., and Kano, K. (1952). Studien über die “Fettspeicherungszellen” der Leber bei verschiedenen Krankheiten. *Arch. Histol. Jpn.* 4, 103–120
- Iwakiri, Y., Shah, V., and Rockey, D.C. (2014). Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis – Current status and future directions. *J. Hepatol.* 61, 912–924
- Jackson, T.R., Blair, L.A., Marshall, J., Goedert, M., and Hanley, M.R. (1988). The masoncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335, 437–440
- Jankowski, V., Vanholder, R., Giet, M. van der, Tölle, M., Karadogan, S., Gobom, J., Furkert, J., Oksche, A., Krause, E., Tran, T.N.A., et al. (2007). Mass-Spectrometric Identification of a Novel Angiotensin Peptide in Human Plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 297–302
- Justus, C.R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., and Yang, L.V. (2014). In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J. Vis. Exp. JoVE*
- Kamath, P.S., Wiesner, R.H., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T.M., Kosberg, C.L., D’Amico, G., Dickson, E.R., and Kim, W.R. (2001). A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatol. Baltim. Md* 33, 464–470
- Kim, J., Ahn, S., Ren, X.-R., Whalen, E.J., Reiter, E., Wei, H., and Lefkowitz, R.J. (2005). Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for  $\beta$ -arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1442–1447
- Klein, S., Herath, C.B., Schierwagen, R., Grace, J., Haltenhof, T., Uschner, F.E., Strassburg, C.P., Sauerbruch, T., Walther, T., Angus, P.W., et al. (2015). Hemodynamic Effects of the Non-Peptidic Angiotensin-(1-7) Agonist AVE0991 in Liver Cirrhosis. *PLoS ONE* 10

Klein, S., Schierwagen, R., Uschner, F.E., and Trebicka, J. (2017). Mouse and Rat Models of Induction of Hepatic Fibrosis and Assessment of Portal Hypertension. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1627, 91–116

Kmieć, Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 161, III–XIII, 1–151

Krogman, A.L., Chowdhary, V., and Rajagopalan, G. (2016). Mini-Osmotic Pump Infusion Model to Investigate the Systemic Effects of Chronic Continuous Exposure to Staphylococcal Superantigen in Mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1396, 109–114

Lautner, R.Q., Villela, D.C., Fraga-Silva, R.A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., et al. (2013). Discovery and Characterization of Alamandine Novelty and Significance: A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circ. Res.* 112, 1104–1111

Lavoie, J.L., and Sigmund, C.D. (2003). Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144, 2179–2183

Lee, U.E., and Friedman, S.L. (2011). Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25, 195–206

Lee, Y.A., Wallace, M.C., and Friedman, S.L. (2015). Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 64, 830–841

Leonhardt, J., Villela, D.C., Teichmann, A., Münter, L.-M., Mayer, M.C., Mardahl, M., Kirsch, S., Namsolleck, P., Lucht, K., Benz, V., et al. (2017). Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension* 69, 1128–1135

Liaw, Y.-F., Sung, J.J.Y., Chow, W.C., Farrell, G., Lee, C.-Z., Yuen, H., Tanwandee, T., Tao, Q.-M., Shue, K., Keene, O.N., Dixon, J.S., Gray, D.F., Sabbat, J., Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group, 2004. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 1521–1531. doi:10.1056/NEJMoa033364

Liu, G.C., Oudit, G.Y., Fang, F., Zhou, J., and Scholey, J.W. (2012). Angiotensin-(1-7)-induced activation of ERK1/2 is cAMP/protein kinase A-dependent in glomerular mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 302, F784-790

Maggio, R., Novi, F., Scarselli, M., and Corsini, G.U. (2005). The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *FEBS J.* 272, 2939–2946

Maher, J.J. (2001). Interactions between Hepatic Stellate Cells and the Immune System. *Semin. Liver Dis.* 21, 417–426

- Malinchoc, M., Kamath, P.S., Gordon, F.D., Peine, C.J., Rank, J., and ter Borg, P.C. (2000). A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*. Baltimore, Md 31, 864–871
- Marcellin, P., Gane, E., Buti, M., Afdhal, N., Sievert, W., Jacobson, I.M., Washington, M.K., Germanidis, G., Flaherty, J.F., Aguilar Schall, R., Bornstein, J.D., Kitrinov, K.M., Subramanian, G.M., McHutchison, J.G., Heathcote, E.J., 2013. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet Lond. Engl.* 381, 468– 475. doi:10.1016/S0140-6736(12)61425-1
- Marra, F., Romanelli, R.G., Giannini, C., Failli, P., Pastacaldi, S., Arrighi, M.C., Pinzani, M., Laffi, G., Montalto, P., and Gentilini, P. (1999a). Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology*. Baltimore, Md 29, 140–148
- Marra, F., Arrighi, M.C., Fazi, M., Caligiuri, A., Pinzani, M., Romanelli, R.G., Efsen, E., Laffi, G., and Gentilini, P. (1999b). Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology*. Baltimore, Md 30, 951–958
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., and Kolch, W. (2011). Raf Family Kinases. *Genes Cancer* 2, 232–260
- Mehta, P.K., and Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 292, C82–C97
- Mehta, G., Gustot, T., Mookerjee, R.P., Garcia-Pagan, J.C., Fallon, M.B., Shah, V.H., Moreau, R., and Jalan, R. (2014). Inflammation and portal hypertension - the undiscovered country. *J. Hepatology*. 61, 155–163
- Mendoza, A., and Lazartigues, E. (2015). The compensatory renin-angiotensin system in the central regulation of arterial pressure: New avenues and new challenges. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 9, 201–208
- Milasta, S., Padiani, J., Appelbe, S., Trim, S., Wyatt, M., Cox, P., Fidock, M., and Milligan, G. (2006). Interactions between the Mas-Related Receptors MrgD and MrgE Alter Signalling and Trafficking of MrgD. *Mol. Pharmacol.* 69, 479–491
- Mokdad, A.A., Lopez, A.D., Shahrzad, S., Lozano, R., Mokdad, A.H., Stanaway, J., Murray, C.J., and Naghavi, M. (2014). Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med.* 12
- Morozov, V.A., and Lagaye, S. (2018). Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J. Hepatology*. 10, 186–212
- Morrison, S.J., White, P.M., Zock, C., and Anderson, D.J. (1999). Prospective Identification, Isolation by Flow Cytometry, and In Vivo Self-Renewal of Multipotent Mammalian Neural Crest Stem Cells. *Cell* 96, 737–749

- Nadim, M.K., Kellum, J.A., Davenport, A., Wong, F., Davis, C., Pannu, N., Tolwani, A., Bellomo, R., and Genyk, Y.S. (2012). Hepatorenal syndrome: the 8th international consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit.Care* 16, R23
- Neve, A., Cantatore, F.P., Maruotti, N., Corrado, A., and Ribatti, D. (2014). Extracellular Matrix Modulates Angiogenesis in Physiological and Pathological Conditions. *BioMed Res. Int.* 2014
- Ngo, P., Ramalingam, P., Phillips, J.A., and Furuta, G.T. (2006). Collagen gel contraction assay. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 341, 103–109
- Nguyen Dinh Cat, A., and Touyz, R.M. (2011). A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides* 32, 2141–2150
- Nicolaides, N.C., and Stoeckert, C.J. (1990). A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells. *BioTechniques* 8, 154–156
- Niki, T., Pekny, M., Hellemans, K., Bleser, P.D., Berg, K.V., Vaeyens, F., Quartier, E., Schuit, F., and Geerts, A. (1999). Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 29, 520–527
- Nishimura, S., Uno, M., Kaneta, Y., Fukuchi, K., Nishigohri, H., Hasegawa, J., Komori, H., Takeda, S., Enomoto, K., Nara, F., et al. (2012). MRGD, a MAS-related G-protein Coupled Receptor, Promotes Tumorigenesis and Is Highly Expressed in Lung Cancer. *PLoS ONE* 7
- Oppermann, M., Freedman, N.J., Alexander, R.W., and Lefkowitz, R.J. (1996). Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 271, 13266–13272
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 993–996
- Paizis, G., Cooper, M.E., Schembri, J.M., Tikellis, C., Burrell, L.M., and Angus, P.W. (2002). Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 123, 1667–1676
- Papatheodoridis, G.V., Cholongitas, E., Dimitriadou, E., Touloumi, G., Sevastianos, V., and Archimandritis, A.J. (2005). MELD vs Child-Pugh and creatinine-modified Child-Pugh score for predicting survival in patients with decompensated cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 11, 3099–3104
- Patel, S., and Hussain, T. (2018). Dimerization of AT2 and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. *Curr.Hypertens.Rep.* 20, 41
- Pereira, R.M., Dos Santos, R.A.S., Teixeira, M.M., Leite, V.H.R., Costa, L.P., da Costa Dias, F.L., Barcelos, L.S., Collares, G.B., and Simões e Silva, A.C. (2007). The renin-

angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J. Hepatol.* **46**, 674–681

Pereira, R.M., dos Santos, R.A.S., da Costa Dias, F.L., Teixeira, M.M., and Silva, A.C.S. e (2009). Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.* **15**, 2579–2586

Pierce, K.L., Maudsley, S., Daaka, Y., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2000). Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1489–1494

Pinzani, M., Gesualdo, L., Sabbah, G.M., and Abboud, H.E. (1989). Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J. Clin. Invest.* **84**, 1786–1793

Poordad, F.F. (2015). Presentation and complications associated with cirrhosis of the liver. *Curr. Med. Res. Opin.* **31**, 925–937

Promrat, K., Kleiner, D.E., Niemeier, H.M., Jackvony, E., Kearns, M., Wands, J.R., Fava, J.L., and Wing, R.R. (2010). Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol. Baltim. Md* **51**, 121–129

ProteinAtlas, 2018, MRGPRD, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000172938-MRGPRD/tissue/primary+data> (16.07.2018)

Pugh, R.N., Murray-Lyon, I.M., Dawson, J.L., Pietroni, M.C., and Williams, R. (1973). Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br. J. Surg.* **60**, 646–649

Reddy, G.K., and Enwemeka, C.S. (1996). A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin. Biochem.* **29**, 225–229

Ridley, A.J. (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11**, 471–477

Ripa, P., Ornello, R., Pistoia, F., Carolei, A., and Sacco, S. (2014). The renin-angiotensin system: a possible contributor to migraine pathogenesis and prophylaxis. *Expert Rev. Neurother.* **14**, 1043–1055

Rittié, L. (2017). Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1627**, 395–407

Rockey, D.C. (1997). New concepts in the pathogenesis of portal hypertension: hepatic wounding and stellate cell contractility. *Clin. Liver Dis.* **1**, 13–29

Rockey, D.C. (2006). Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin. Liver Dis.* **10**, 459–479, vii–viii

Santos, R.A., Campagnole-Santos, M.J., and Andrade, S.P. (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regul. Pept.* *91*, 45–62

Santos, R.A.S., e Silva, A.C.S., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V.B., Lopes, M.T., Bader, M., et al. (2003). Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8258–8263

Sauerbruch, T., and Trebicka, J. (2014). Future therapy of portal hypertension in liver cirrhosis – a guess. *F1000Prime Rep.* *6*

Schiffrin, E.L., Park, J.B., Intengan, H.D., and Touyz, R.M. (2000). Correction of Arterial Structure and Endothelial Dysfunction in Human Essential Hypertension by the Angiotensin Receptor Antagonist Losartan. *Circulation* *101*, 1653–1659

Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., and Weiskirchen, R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. *Lab. Anim.* *49*, 4–11

Schuchard, J., Winkler, M., Stölting, I., Schuster, F., Vogt, F.M., Barkhausen, J., Thorns, C., Santos, R.A., Bader, M., and Raasch, W. (2015). Lack of weight gain after angiotensin AT1 receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1–7)/ Mas-dependent pathway. *Br J Pharmacol* *172*, 3764–3778

Sevelsted Møller, L., Fialla, A.D., Schierwagen, R., Biagini, M., Liedtke, C., Laleman, W., Klein, S., Reul, W., Koch Hansen, L., Rabjerg, M., et al. (2016). The calcium-activated potassium channel KCa3.1 is an important modulator of hepatic injury. *Sci. Rep.* *6*

Shinohara, T., Harada, M., Ogi, K., Maruyama, M., Fujii, R., Tanaka, H., Fukusumi, S., Komatsu, H., Hosoya, M., Noguchi, Y., et al. (2004). Identification of a G Protein-coupled Receptor Specifically Responsive to  $\beta$ -Alanine. *J. Biol. Chem.* *279*, 23559–23564

Sigma-Aldrich, cAMP Enzyme Immunoassay Kit, Direct Catalogue Number CA 200, Technical Bulletin, <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/ca200bul.pdf> (29.11.2018)

Simonetto, D.A., Yang, H., Yin, M., de Assuncao, T.M., Kwon, J.H., Hilsher, M., Pan, S., Yang, L., Bi, Y., Beyder, A., et al. (2015). Chronic Passive Venous Congestion drives Hepatic Fibrogenesis via Sinusoidal Thrombosis and Mechanical Forces. *Hepatology*. *Baltim. Md* *61*, 648–659

Solinski, H.J., Gudermann, T., and Breit, A. (2014). Pharmacology and Signaling of MAS- Related G Protein–Coupled Receptors. *Pharmacol. Rev.* *66*, 570–597

Somvanshi, R.K., Chaudhari, N., Qiu, X., and Kumar, U. (2011). Heterodimerization of  $\beta$ 2 adrenergic receptor and somatostatin receptor 5: Implications in modulation of signaling pathway. *J Mol Signal* *6*, 9

- Sparks, M.A., Crowley, S.D., Gurley, S.B., Mirotsoy, M., and Coffman, T.M. (2014). Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. *Compr. Physiol.* 4, 1201–1228
- Sun, M., and Kisseleva, T. (2015). Reversibility of Liver Fibrosis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 39, S60–S63
- Tag, C.G., Sauer-Lehnen, S., Weiskirchen, S., Borkham-Kamphorst, E., Tolba, R.H., Tacke, F., and Weiskirchen, R. (2015). Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis. *J. Vis. Exp. JoVE*
- Tetzner, A., Gebolys, K., Meinert, C., Klein, S., Uhlich, A., Trebicka, J., Villacañas, Ó., and Walther, T. (2016). G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 68, 185–194
- Trebicka J, Hennenberg M, Schulze Pröbsting A, Laleman W, Klein S, Granzow M, u. a. Role of beta3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis. *Hepatol Baltim Md.* Dezember 2009;50(6):1924–35
- Troeger, J.S., Mederacke, I., Gwak, G.-Y., Dapito, D.H., Mu, X., Hsu, C.C., Pradere, J.-P., Friedman, R.A., and Schwabe, R.F. (2012). Deactivation of Hepatic Stellate Cells during Liver Fibrosis Resolution in Mice. *Gastroenterology* 143
- Tsochatzis, E.A., Bosch, J., and Burroughs, A.K. (2014). Liver cirrhosis. *Lancet Lond. Engl.* 383, 1749–1761
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., et al. (2002). Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-converting Enzyme-related Carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 277, 14838–14843
- Wagner, E.M. (2013). Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1027, 19–45
- Wedd, J., Bambha, K.M., Stotts, M., Laskey, H., Colmenero, J., Gralla, J., and Biggins, S.W. (2014). Stage of Cirrhosis Predicts Risk of Liver Related Death in Low MELD Patients with Cirrhosis Awaiting Liver Transplant. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 20, 1193–1201
- Weiskirchen, S., Tag, C.G., Sauer-Lehnen, S., Tacke, F., and Weiskirchen, R. (2017). Isolation and Culture of Primary Murine Hepatic Stellate Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1627, 165–191
- Wiest, R., and Groszmann, R.J. (2002). The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatol. Baltim. Md* 35, 478–491
- Wilson, B.A., Cruz-Diaz, N., Marshall, A.C., Pirro, N.T., Su, Y., Gwathmey, T.M., Rose, J.C., and Chappell, M.C. (2015). An angiotensin-(1–7) peptidase in the kidney cortex,

proximal tubules, and human HK-2 epithelial cells that is distinct from insulin-degrading enzyme. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 308, F594–F601

Yan, C., Kim, D., Aizawa, T., and Berk, B.C. (2003). Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 26–36

Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., and Wigler, M. (1986). Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 45, 711–719

Zhang, F., Ren, X., Zhao, M., Zhou, B., and Han, Y. (2016). Angiotensin-(1-7) abrogates angiotensin II-induced proliferation, migration and inflammation in VSMCs through inactivation of ROS-mediated PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways. *Sci. Rep.* 6, 34621

Zhou, X.J. (1990). [Ultrastructural morphometry of liver parenchyma in hepatic cirrhosis]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 19, 254–257

Zylka, M.J., Dong, X., Southwell, A.L., and Anderson, D.J. (2003). Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10043–10048

## 10. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor Dr. med. Jonel Trebicka für die Überlassung des Themas, die gute und engagierte Betreuung und die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit bedanken. Trotz erschwerender Umstände wie der geographischen Distanz war er immer für Anfragen da und hat die Doktorarbeit mit seinen Ideen und Verbesserungsvorschlägen maßgeblich vorangebracht. Zudem möchte ich mich natürlich bei dem gesamten Team der AG Trebicka bedanken. Hervorheben möchte ich Frau Dr. rer. nat. Sabine Klein, die in meiner Laborzeit die Betreuung des experimentellen Teils übernommen und immer ein offenes Ohr für Fragen hatte. Auch Frau Silke Bellinghausen und Frau Gudrun Hack danke ich für ihre Kompetenz, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Experimenten, ohne die ich es wohl nie hinbekommen hätte. Ein großer Dank gilt auch Herrn Frank Erhard Uschner, den guten Freund, der mich ans Labor vermittelt hat und Herrn Dr. med. Winfried Reul, der mit seiner Doktorarbeit den Weg für meine geebnet und mir wo er konnte geholfen hat. Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. M. Hölzel, Herrn Prof. Dr. med. A. J. Becker und Frau Jun.-Prof. Dr. med. D. Wenzel, die mir das BonnNi Stipendium ermöglicht haben und mich in der Zeit als Stipendiatin im Programm betreut haben. Zusätzlich gilt der Dank auch der EKFS (Else-Körner-Fresenius-Stiftung), die das Stipendium finanziert hat. Letztlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken. Sie haben mich nicht nur in diesem Vorhaben, sondern grundsätzlich bei allem, was ich gemacht habe, tatkräftig und bestmöglich unterstützt, wofür ich sie sehr liebe.

Vielen Dank!