

Fibrozyten: Fibrogene Zellen des Knochenmarks und ihr Beitrag im Mausmodell der Thioacetamid- induzierten Leberfibrose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Felix Hempel**
aus Herford

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie

Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, MHAC
Gutachter: Prof. Dr. med. Joachim Teichmann

Tag der Disputation: 15.01.2024

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Erkrankungen der Leber	1
1.1.1 Ätiologie	1
1.1.2 Natürlicher Verlauf chronischer Lebererkrankungen	2
1.2 Leberfibrose	3
1.2.1 Bindegewebe und extrazelluläre Matrix	3
1.2.2 Fibrose als dysregulierter Wundheilungsprozess	3
1.2.3 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Leberfibrose	4
1.2.4 Diagnostik	10
1.2.5 Therapie.....	10
1.3 Fibrozyten	11
1.3.1 Definition und Abgrenzung	12
1.3.2 Identifizierung	12
1.3.3 Herkunft und Differenzierung	13
1.3.4 Chemotaxis.....	14
1.3.5 Funktionen	14
1.3.6 Fibrozyten als Mediatoren von Wundheilung, Entzündung und Krebs	15
1.3.7 Beteiligung an der hepatischen Fibrose.....	16
1.4 Forschungshypothese und Zielsetzung	17
1.5 Versuchsaufbau.....	18
1.5.1 Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase/Ganciclovir-Suizidgenstrategie	18
1.5.2 Fibroseinduktion durch Thioacetamid	19
1.5.3 Zielparameter	19
1.5.4 Operationale Hypothesen	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Mausmodell.....	21
2.1.1 Versuchstiere	21
2.1.2 Knochenmarktransplantationen	24
2.1.3 Behandlung mit Thioacetamid und Valganciclovir	24
2.1.4 Tötung und Organentnahme	24
2.2 Klinische Chemie	25
2.3 Histologie	25
2.3.1 Probenvorbereitung.....	25
2.3.2 Konventionelle Färbungen	25
2.3.3 Immunhistochemie.....	26
2.3.4 Konservierung und Auswertung	26
2.4 Histopathologische Begutachtung.....	26

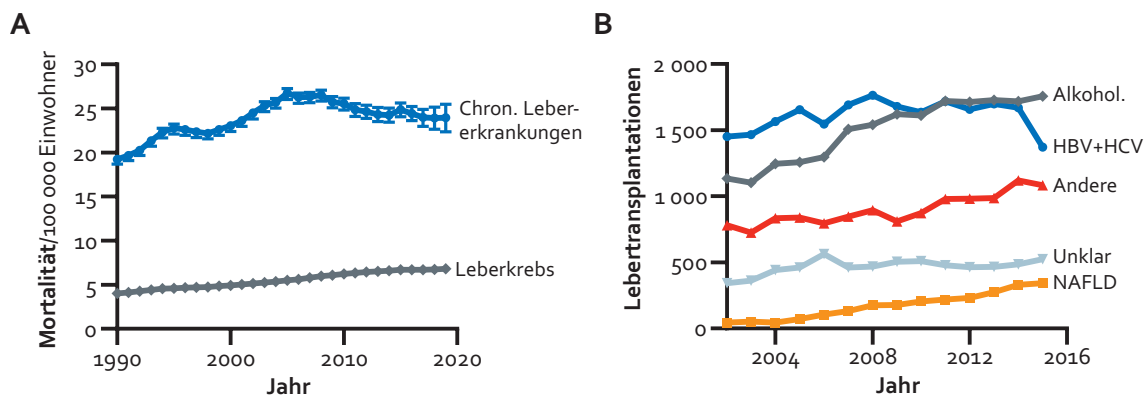
2.5	Morphometrische Auswertung	28
2.5.1	Sirius Red/Fast Green-Färbung	28
2.5.2	Immunhistochemische Anfärbung von CD45	28
2.6	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	29
2.7	Bestimmung des hepatischen Hydroxyprolinegehalts.....	30
2.7.1	Herstellung eines Aminosäuregemisches	30
2.7.2	Nachweisreaktion	30
2.7.3	Auswertung	31
2.8	Bestimmung hepatischer Eicosanoide	31
2.9	Western Blot	31
2.9.1	Herstellung von Gewebelysaten.....	31
2.9.2	Auftrennung der Proteine	32
2.9.3	Proteintransfer	32
2.9.4	Proteinnachweis	32
2.9.5	Auswertung	33
2.10	Proteom-Profilung.....	33
2.10.1	Lysatherstellung	33
2.10.2	Durchführung und Auswertung	34
2.11	Multiplex-ELISA.....	34
2.12	Quantitative <i>real time</i> Polymerasekettenreaktion	36
2.12.1	RNA-Isolierung aus Lebergewebe	36
2.12.2	Synthese komplementärer DNA	37
2.12.3	Durchführung der Polymerasekettenreaktion	38
2.12.4	Primervalidierung	38
2.12.5	Validierung von Referenzgenen.....	40
2.12.6	Auswertung	40
2.13	<i>High-Troughput</i> Genexpressionsanalyse	41
2.14	Statistik	41
3.	Ergebnisse	43
3.1	Beobachtung des Tierversuchs.....	43
3.2	Visualisierung von <i>Col1a1</i> ⁺ / <i>Ptprc</i> ⁺ -Fibrozyten	44
3.3	Hepatische Fibrose	45
3.3.1	Histologische Beurteilung	45
3.3.2	Hepatischer Hydroxyprolinegehalt	48
3.3.3	Expression Fibrose-assoziiierter Gene.....	49
3.4	Hepatische Myofibroblasten	49
3.5	Fibrolytische Mediatoren	51
3.6	Hepatische Inflammation.....	52
3.6.1	Histologische Beurteilung	52
3.6.2	Inflammatorische Zytokine	54
3.7	Leberzellschädigung.....	56

4. Diskussion	59
4.1 Einsatz des Mausmodells der Thioacetamid-induzierten Leberfibrose	59
4.1.1 Erfolg der Fibroseinduktion.....	59
4.1.2 Verträglichkeit	60
4.1.3 Limitationen	60
4.2 Einsatz der Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase/Ganciclovir- Suizidgenstrategie ..	61
4.2.1 Potenzielle Schwachstellen	61
4.2.2 Validierung der Fibrozytenausschaltung	63
4.2.3 Verträglichkeit	66
4.3 Beitrag von Fibrozyten zur hepatischen Fibrogenese	66
4.3.1 Hepatischer Nachweis von Fibrozyten in Thioacetamid-behandelten Tieren ..	66
4.3.2 Verminderte Fibrose infolge der Fibrozytenausschaltung.....	67
4.3.3 Reduktion der Alanin-Aminotransferase-Aktivität im Serum.....	69
4.4 Mechanismen und Mediatoren des Beitrags zur hepatischen Fibrose.....	69
4.4.1 Aufbau von Matrixbestandteilen	70
4.4.2 Expansion und Aktivierung hepatischer Myofibroblasten	71
4.4.3 Fibrolyse	72
4.4.4 Hepatische Inflammation.....	74
4.4.5 Leberzellschädigung	76
4.5 Einordnung in die bestehende Forschung	77
4.5.1 Untersuchungen zur Leberfibrose	77
4.5.2 Weitere fibrotische Entitäten	79
4.6 Ausblick	79
4.6.1 Fibrozyten in antifibrotischen Therapien	80
4.6.2 Diagnostische Bedeutung zirkulierender Fibrozyten	86
4.6.3 Fibrozyten in der Ära der Einzelzell-Transkriptomik.....	87
4.6.4 Offene Fragen und Perspektiven	89
5. Zusammenfassung	91
Abkürzungsverzeichnis	93
Abbildungsverzeichnis	97
Tabellenverzeichnis.....	98
Referenzen.....	99
Anhang	109
Publikationsverzeichnis.....	149
Erklärung zur Dissertation	151

1. Einleitung

1.1 Erkrankungen der Leber

Lebererkrankungen sind eine große Belastung für die Gesundheit in Europa und der Welt. Eine Kommission der europäischen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber und der Fachzeitschrift *The Lancet* zeigte jüngst beunruhigende Entwicklungen: Zwischen 1990 und 2019 stieg der Anteil von Lebererkrankungen an den Todesfällen in Europa um 25 % (Abbildung 1A).¹ Dabei sind oftmals Menschen mittleren Alters betroffen, der Höhepunkt der Mortalität liegt in der fünften und sechsten Lebensdekade. Einzig ischämische Herzerkrankungen führten zu mehr verlorenen Jahren der Erwerbstätigkeit in Europa. Eine Modellierung prognostiziert, dass Lebererkrankungen die durchschnittliche gesunde Lebenserwartung in Europa bis 2050 um bis zu 1,3 Jahre verkürzen werden.



▲ **Abbildung 1 | Lebererkrankungen in Europa.** (A) Die *Global Burden of Disease*-Studie zeigte den Anstieg der Mortalität infolge von Leberzirrhose und anderen chronischen Lebererkrankungen (blau) und Leberkrebs (grau) in Europa zwischen 1990 und 2019. *Datenquelle: Institute for Health Metrics and Evaluation. Genehmigte Nutzung, alle Rechte vorbehalten. Methodik siehe 2.* (B) Die Aufschlüsselung der Grunderkrankungen von Patienten, die zwischen 2002 und 2015 innerhalb des europäischen Lebertransplantationsregisters eine Lebertransplantation bei Zirrhose oder hepatozellulärem Karzinom erhielten, zeigte die Zunahme Alkohol-assoziiierter Lebererkrankungen (grau) und gesicherter oder vermuteter NAFLD (orange) bei gleichzeitigem Rückgang von HBV- und HCV-Infektionen (dunkelblau). Die Zahl anderer Ätiologien (rot) unterstreicht die kumulative Relevanz seltener Lebererkrankungen. *Modifiziert aus 3. Creative Commons Namensnennung 4.0 International-Lizenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).* © 2019 Europäische Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Alkohol., Alkohol-assoziierte Lebererkrankung; HBV, Hepatitis B-Virus; HCV, Hepatitis C-Virus, NAFLD, Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung.

1.1.1 Ätiologie

Die Ursachen von Lebererkrankungen sind vielfältig und dynamisch. Weltweit kann etwa die Hälfte der leberspezifischen Mortalität auf den Konsum von Alkohol zurückgeführt werden.⁴ Für die meisten europäischen Länder zeigte sich eine positive Korrelation der leberspezifischen Mortalität mit dem Alkoholkonsum auf Bevölkerungsebene.¹ Alkohol-assoziierte Lebererkrankungen

waren 2015 die häufigste Indikation zur Lebertransplantation im *Eurotransplant*-Verbund (Abbildung 1B).⁵ Chronische Infektionen mit dem Hepatitis B-Virus (HBV), Hepatitis C-Virus (HCV) und Hepatitis D-Virus (HDV) stellen die wichtigsten übertragbaren Lebererkrankungen dar. Die Entwicklung effektiver antiviraler Therapien für die HCV-Infektion ermöglichte in den letzten Jahren bahnbrechende Behandlungserfolge, der zusätzliche Einsatz der HBV-Impfung sowie verbesserte Therapiemöglichkeiten der chronischen HBV- und HBV/HDV-Koinfektion führten zu einem deutlichen Rückgang der Morbidität und Mortalität. Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist heute die häufigste Lebererkrankung weltweit. Zwei Metaanalysen schätzten die globale Prävalenz der NAFLD nach 2016 auf 38 %.^{6,7} Die NAFLD steht in enger Wechselwirkung mit anderen Komponenten des metabolischen Syndroms wie Übergewicht und Insulinresistenz und umfasst Phänotypen wie die einfache Fettleber und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH).^{8,9} In den vergangenen Jahren ließ sich ein dramatischer Anstieg der Prävalenz sowie der Lebertransplantationen bei NAFLD in Europa und den USA beobachten (Abbildung 1B)^{3,10}, der sich nach aktuellen Modellierungen parallel zu dem Anstieg von Übergewicht und Diabetes mellitus in der Bevölkerung weiter exponentiell fortsetzen und bis 2030 eine Verdoppelung der Mortalität in Deutschland zur Folge haben wird.¹¹ Seltene Lebererkrankungen wie die autoimmune Hepatitis oder primär sklerosierende Cholangitis tragen darüber hinaus zur Mortalität bei und stellen aufgrund ihrer Zahl und Komplexität eine Herausforderung dar.

1.1.2 Natürlicher Verlauf chronischer Lebererkrankungen

Kennzeichen praktisch aller chronischen Lebererkrankungen ist ein charakteristischer natürlicher Verlauf. In der Regel verläuft die Leberschädigung zunächst über Jahre bis Jahrzehnte symptomarm und oftmals unbemerkt. Hier steht weniger die leberspezifische Mortalität als die Wechselwirkungen mit anderen Erkrankungen im Vordergrund. In einem Teil der Betroffenen schreitet die Leberschädigung zu einer Leberzirrhose fort, die mit dem Verlust der regulären hepatischen Architektur, der Ausbildung dysfunktionaler parenchymaler Regeneratknoten und konsekutiv eingeschränkter Leberfunktion einhergeht.¹² Es wird hier zwischen dem Stadium der kompensierten Zirrhose, das ebenfalls symptomarm verläuft, und der dekompenzierten Zirrhose unterschieden. Hepatische Dekompensationen können sich klinisch durch Aszites, hepatische Enzephalopathie, Ösophagusvarizenblutungen oder akut-auf-chronisches Leberversagen präsentieren und gehen mit einer äußerst schlechten Prognose einher.¹² In einer Kohortenstudie mit 10 000 zufällig rekrutierten Versuchspersonen aus Deutschland war das Vorliegen einer Leberzirrhose der stärkste Prädiktor für ein Versterben innerhalb des im Median 6,4-jährigen Beobachtungszeitraums.¹³ Darüber hinaus stellen das hepatozelluläre Karzinom (HCC) und das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom wichtige Komplikationen fortgeschrittener Lebererkrankungen dar.¹⁴ Das HCC betrifft fast ausschließlich Patientinnen und Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und geht mit einer hohen Sterblichkeit einher: Mit einer Fallsterblichkeit von 91 % war das HCC 2020 der dritt-tödlichste Tumor weltweit.¹⁵ Zwischen 1990 und 2019 stieg die Mortalität durch lebereigene Tumoren in Europa um 70 % (Abbildung 1A).¹

1.2 Leberfibrose

Gemeinsamer Mechanismus des Fortschreitens chronischer Lebererkrankungen und maßgeblich für die Morbidität und Mortalität ist die zunehmende Fibrose der Leber. Diese bezeichnet im Allgemeinen die krankhafte Vermehrung des Bindegewebes eines Organs.

1.2.1 Bindegewebe und extrazelluläre Matrix

Das Bindegewebe umfasst die extrazelluläre Matrix (EZM, auch Extrazellulärmatrix oder Matrix), Zellen des Bindegewebes sowie die im Gewebe verlaufenden Leitungsbahnen des Nerven-, Blut- und Lymphsystems. Die EZM setzt sich aus Fasern sowie der wässrigen Grundsubstanz, die verschiedene Proteoglykane und Glykoproteine enthält, zusammen. Kollagene stellen die dominierenden Faserproteine der EZM dar, in geringerem Ausmaß kommen elastische Fasern vor. In Säugetieren bilden insgesamt etwa 300 Proteine, in ihrer Gesamtheit auch als Matrisom bezeichnet, die EZM.¹⁶ Ihre Zusammensetzung und Eigenschaften werden dynamisch durch konstanten Aufbau, Modifikation und Abbau reguliert. Dieser konstante Umbau der EZM wird als *matrix remodeling* bezeichnet und ist entscheidend für die Homöostase von Geweben.¹⁷ Neben ihren strukturbildenden Eigenschaften ist die EZM ein bioaktives Kompartiment, das über Zell-Matrix-Wechselwirkungen Differenzierung, Proliferation, Überleben und Migration von Zellen reguliert.^{17,18} Die zellulären Akteure des Bindegewebes sind bislang nur unvollständig verstanden. In vielen adulten Geweben finden sich in geringer Zahl Fibroblasten mit Ursprung im embryonalen Mesenchym im Bindegewebe verteilt. Klassischerweise galten diese gewebeeigenen Fibroblasten als exklusive Quelle der Proteine des Matrisoms. Zahlreiche Arbeiten, insbesondere in pathologischen Kontexten, zeigten jedoch über verschiedene Organsysteme hinweg eine große Heterogenität matrixproduzierender Zellen, zu denen auch epitheliale Zellen sowie Zellen aus der Zirkulation beitrugen.¹⁹

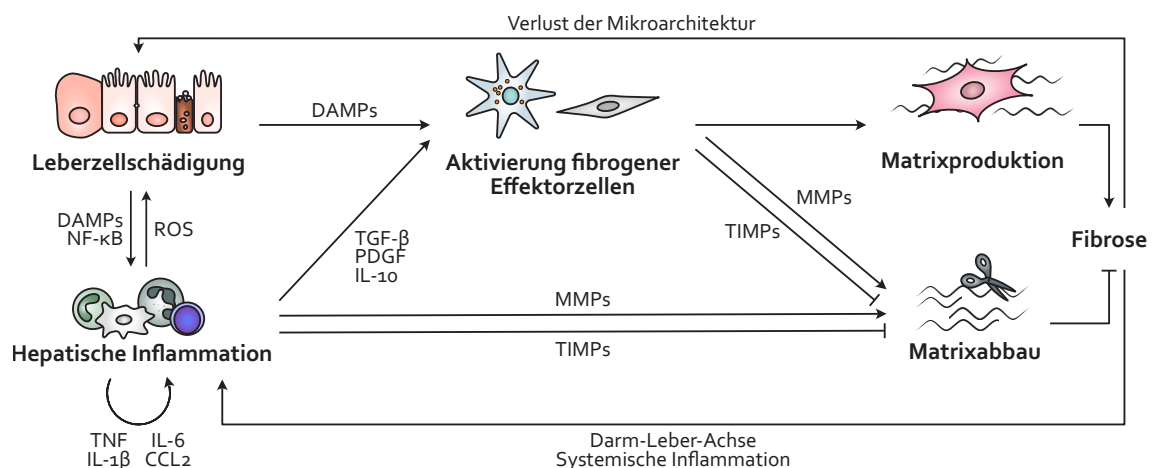
1.2.2 Fibrose als dysregulierter Wundheilungsprozess

Fibrose ist ein universeller, pathologischer Prozess, der überall dort auftreten kann, wo sich Gewebeschädigung ereignet und in einer Vielzahl von Organsystemen wie Herz, Lunge und Niere zu fortschreitendem Funktionsverlust führt.²⁰ Es wird geschätzt, dass bis zu 45 % aller Todesfälle in den USA auf fibrotische Erkrankungen zurückgeführt werden können.²¹ Fibrose ist keine Krankheitsentität im engeren Sinne, sondern geht vielmehr auf physiologische, evolutionär konservierte Wundheilungsprozesse zurück.¹⁹ Grundsätzlich verfügen alle mehrzelligen Lebewesen über die Fähigkeit, auf epitheliale Schädigungen zu reagieren und Gewebe zu reparieren.²² Dies umfasst sowohl die Wundheilung im engeren Sinne, also die Reparatur von Schäden der Haut und Schleimhäute, als auch die Reparatur innerer Organe. Die Wundheilung folgt dabei einem hochkonservierten Muster, das Hämostase, Inflammation und Zellproliferation umfasst. Integraler Bestandteil sind hierbei Umbauprozesse der EZM: Während der Reparatur von Geweben kommt es zu einer transienten quantitativen Expansion der EZM durch die Neubildung von Matrixproteinen.²² Damit effiziente Wundheilung gelingt, muss diese engmaschig reguliert werden. Eine effiziente Antwort auf epitheliale Schädigung beinhaltet ein konsekutiv verändertes

matrix remodeling, in dem schlussendlich die Neubildung von EZM zurückgeht und das gebildete Narbengewebe um- und abgebaut wird, um funktionelles Parenchym zu regenerieren.^{22,23} Gelingt die Begrenzung der Reparaturprozesse nicht, entsteht ein *Circulus vitiosus* aus Zellschädigung, Inflammation und Matrixaufbau (in Kapitel 1.2.3 am Beispiel der Leberfibrose näher erläutert), der sich den Regulationsmechanismen der Wundheilung entzieht und zu Fibrose führt. Eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst die Regulation des *matrix remodelings* negativ. Vordergründig ist hier die Schwere und Wiederholung der Schädigung.^{12,17} Auch Alterungsprozesse, Entzündungsreaktionen, Wechselwirkungen mit Mikroorganismen und genetische Prädispositionen können beitragen.¹⁹

1.2.3 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Leberfibrose

Zahlreiche Mechanismen und Mediatoren der Leberfibrose wurden in den vergangenen Jahrzehnten identifiziert. Die Wechselwirkungen von Leberzellschädigung und chronischer Inflammation schaffen ein profibrotisches hepatisches Milieu, in dem fibrogene Zellpopulationen aktiviert werden und große Mengen EZM produzieren (Fibrogenese; vergleiche im Folgenden Abbildung 2). Gleichzeitig bleibt eine adäquate reziproke Aktivierung fibrolytischer Faktoren aus oder diese werden gehemmt, sodass das Gleichgewicht des *matrix remodelings* verloren geht. Fibrose ist die Folge. Zahlreiche autokrine und parakrine Regelkreise verstärken die Reaktion.



▲ **Abbildung 2 | Mechanismen der hepatischen Fibrogenese.** Chronische Lebererkrankungen führen über die Wechselwirkung von Leberzellschädigung (oben links) und Inflammation (vermittelt unter anderem durch Monozyten, Kupffer-Zellen, Neutrophile und T-Zellen, unten links) zu der Ausbildung eines profibrotischen Milieus, das durch hohe Konzentrationen von DAMPs, ROS, inflammatorischen Zytokinen sowie profibrogenen Mediatoren wie TGF-β gekennzeichnet ist. Es kommt zur Aktivierung fibrogener Zellen (Bildmitte), die nachfolgend Komponenten der extrazellulären Matrix produzieren (oben rechts). Die Zusammensetzung fibrogener Effektorzellen ist bislang unklar. Gleichzeitig wird der Matrixabbau über die Sekretion und Aktivierung von MMPs und TIMPs gefördert beziehungsweise gehemmt (unten rechts). Es ergibt sich ein Ungleichgewicht zwischen Matrixproduktion und Matrixabbau, Fibrose ist die Folge. Referenzen siehe Kapitel 1.2.3. CCL, C-C-Motif Chemokinligand; DAMP, danger-associated molecular pattern; IL, Interleukin; MMP, Matrix-Metalloproteinase; NF, nukleärer Faktor; PDGF, platelet-derived growth factor; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; TGF, transforming growth factor; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase; TNF, Tumornekrosefaktor.

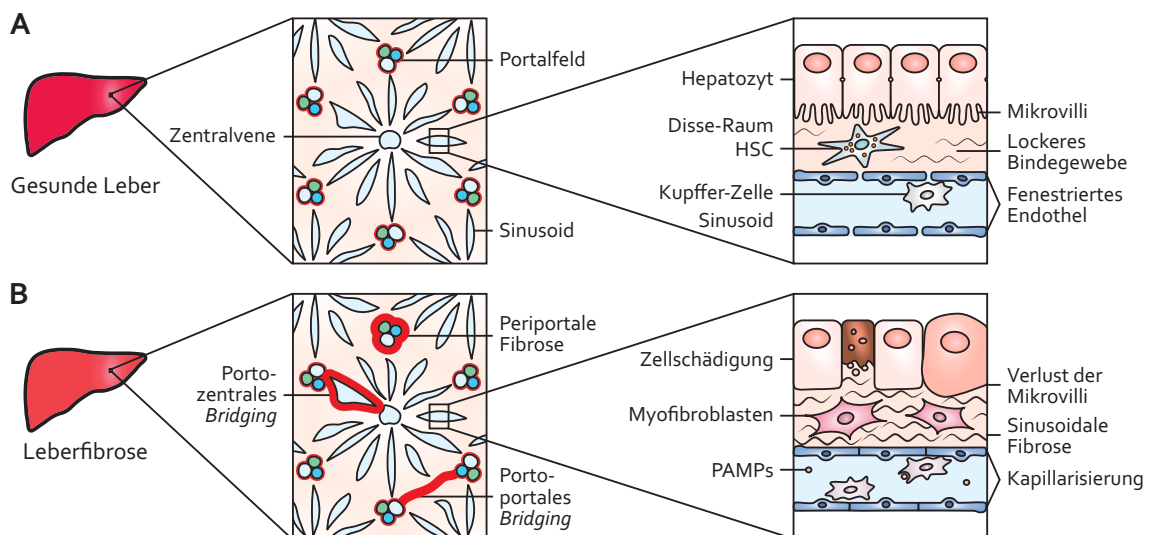
Leberzellschädigung

Unter physiologischen Bedingungen zeigt das hepatische Parenchym nur einen geringen Zellsatz, sodass nur in geringem Ausmaß Zelltod beobachtet werden kann. Praktisch allen Ätiologien der hepatischen Fibrose ist hingegen die Schädigung von Hepatozyten gemein. Klinisch spiegelt sich dies in der Erhöhung der Serumaktivität hepatozytärer Enzyme wie der Alanin-Aminotransferase (ALT) oder der Konzentration struktureller Hepatozytenbestandteile wie Keratin 18-Fragmenten im Blut wider. Während chronische Infektionen oftmals zu einer direkten hepatozytären Schädigung führen, gehen toxisch- oder metabolisch-bedingte Lebererkrankungen vielfach mit einer indirekten Schädigung durch oxidativen Stress einher.²⁴ Eine Ausnahme stellen biliäre Erkrankungen dar. Hier steht die cholestatische Schädigung biliärer Epithelzellen, etwa durch die direkte Toxizität von Gallensäuren, im Vordergrund.²⁵ Zelluläre Stressreaktionen gehen in Hepatozyten mit einer veränderten Genexpression einher. Es kommt beispielsweise zu der Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B), der die Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine reguliert.²⁶ Darüber hinaus führt die Schädigung oder der Tod von Hepatozyten zu der Freisetzung von *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), die eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems auslösen.^{24,26} Es können verschiedene Formen des Zelltods wie Nekrose, Apoptose, Nekroptose, Pyroptose und Ferroptose beobachtet werden, die sich hinsichtlich ihrer Immunogenität unterscheiden.²⁷ Ob und mit welcher Konsequenz diese Stressreaktionen bei chronischen Leberschädigungen auftreten, ist bislang nur unvollständig aufgeklärt. Klar scheint zum jetzigen Zeitpunkt jedoch, dass auch Apoptose als regulierte und streng kontrollierte Form des Zelltods eine inflammatorische Reaktion auslösen und zur Pathogenese der Fibrose beitragen kann.²⁴

Hepatische Inflammation

Inflammation als Antwort auf Leberzellschädigung ist ein zentrales Moment in der Pathogenese der hepatischen Fibrose. Inflammation nimmt eine duale Rolle ein, deren kontextspezifische Regulation für das Ergebnis entscheidend ist. Auf der einen Seite ist Inflammation ein notwendiger Bestandteil der physiologischen Wundheilungsreaktion, insbesondere auch der Termination und Resolution der transient gesteigerten Matrixproduktion.²⁸ Auf der anderen Seite erhält und verstärkt die Inflammation die Leberschädigung in vielen chronischen Lebererkrankungen und stellt die funktionelle Verbindung zwischen Leberschädigung und Fibrogenese dar.²⁶ Verschiedene Leukozytenpopulationen tragen zur Inflammation bei. Neutrophile Granulozyten stellen zumeist die ersten infiltrierenden Immunzellen nach hepatischer Schädigung dar. Durch die Sekretion reaktiver Sauerstoffspezies und inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin (IL)-1 β verstärken sie die inflammatorische Antwort und hepatische Schädigung.²⁹ Auch das adaptive Immunsystem kann kontextspezifisch pro- oder antifibrotische Effekte vermitteln. Monozyten und Makrophagen gelten jedoch als die zentralen Regulatoren der hepatischen Inflammation. Es kann hier zwischen Kupffer-Zellen und infiltrierenden Monozyten unterschieden werden. Kupffer-Zellen repräsentieren die gewebeständigen Makrophagen der Leber. Sie sind im Lumen der hepatischen Sinusoide lokalisiert und stehen so in direktem Kontakt mit dem portalvenösen Blut aus der enteralen Zirkulation (Abbildung 3A). Kupffer-Zellen erkennen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) von Bakterien des enteralen Mikrobioms über Toll-like-Rezeptor (TLR)-4 und bilden damit einen wichtigen Teil der Darm-Leber-Achse.

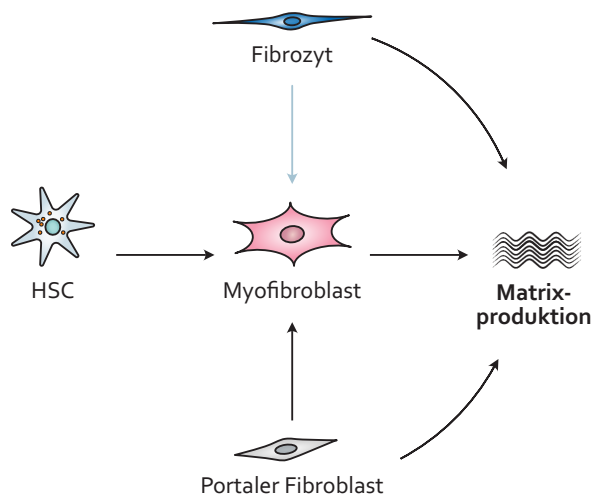
Während sie unter physiologischen Bedingungen zur Immuntoleranz der Leber beitragen, führen viele Lebererkrankungen zu einer gesteigerten Permeabilität der Darmschleimhaut und damit erhöhten Konzentrationen von PAMPs in der portalen Zirkulation, woraufhin Kupffer-Zellen einen inflammatorischen Phänotyp annehmen.^{26,29,30} Zusätzlich infiltrieren Monozyten aus dem Knochenmark die geschädigte Leber und differenzieren im Gewebe zu Makrophagen. Entscheidend für die Rekrutierung von Monozyten sind hierbei die C-C-Motif Chemokinligand (CCL)2/ C-C-Motif Chemokinrezeptor (CCR)2- und CCL1/CCR8-Achsen.^{31,32} Makrophagen sezernieren je nach biologischem Kontext und aktivierenden humoralen Faktoren sowohl prototypische proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1 β und IL-6 als auch antiinflammatorische, fibrogene Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-10, *transforming growth factor* (TGF)- β und *platelet-derived growth factor* (PDGF).²⁶ Darüber hinaus können Makrophagen ebenso einen antifibrotischen Phänotyp annehmen, der in der Regel erst nach Beendigung der Leberschädigung beobachtet werden kann und zum Abbau von Matrixbestandteilen beiträgt. Die selektive Ausschaltung von Makrophagen im Mausmodell demonstrierte diese außergewöhnliche, kontextabhängige Plastizität: Während zunächst eine verminderte Fibrose gezeigt worden war, behinderte die Ausschaltung der Makrophagen den Heilungsprozess nach Ausbleiben des schädigenden Agens.³³



▲ **Abbildung 3 | Architektur der gesunden und fibrotischen Leber.** (A) Die Leber gliedert sich histologisch in Leberläppchen (linker Bildausschnitt). Diese werden durch die Portalfelder, in denen mindestens ein Ast der Portalvene, der Leberarterie und des Gallenwegsystems (*Glisson-Trias*) verlaufen, begrenzt. Die Gefäße sind in Bindegewebe (rot) eingebettet, außerhalb der Portalfelder finden sich nur geringe Mengen Bindegewebe. Über die Sinusoide fließt das portalvenöse und arterielle Blut zur Zentralvene im Zentrum des Leberläppchens. Innerhalb der Sinusoide (rechter Bildausschnitt) ermöglichen das fenestrierte Endothel und das lockerere Bindegewebe im subendothelialen Disse-Raum den ungehinderten Kontakt der mit Mikrovilli besetzten basolateralen Hepatozytenmembran mit dem sinusoidalen Blut. (B) Im Rahmen der Leberfibrose kommt es zu einer Expansion des Bindegewebes der Portalfelder (periportale Fibrose, linker Bildausschnitt) sowie einer Septenbildung zwischen Portalfeldern (portozentrales *Bridging*) beziehungsweise zwischen benachbarten Portalfeldern (portoportales *Bridging*). Diese Merkmale können parallel auftreten, ihr relatives Ausmaß variiert je nach Ätiologie. Die Aktivierung fibrogener Effektorzellen (rechter Bildausschnitt) führt zu einer subendothelialen Fibrose der Sinusoide, es kommt zu dem Verlust der endothelialen Fenestrierung sowie der hepatozytären Mikrovilli. Dies führt zu einer Einschränkung der Leberfunktion und –in Folge des erhöhten intrahepatischen Gefäßwiderstandes– portaler Hypertension. *Referenzen siehe Kapitel 1.2.3.* HSC, *Hepatische Sternzelle*; PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*.

Aktivierung fibrogener Effektorzellen

Die Wechselwirkung von Leberzellschädigung und Inflammation ist Voraussetzung für die Initiation und Aufrechterhaltung der Fibrogenese. Zur Produktion der Fibrose kennzeichnenden Matrixbestandteile ist jedoch die Aktivierung anderer Zellpopulationen vonnöten. In der Leber findet sich eine Vielzahl von Zellen, die die Fähigkeit besitzen, EZM zu produzieren. Als dominierende Effektorzellen in der hepatischen Fibrose wurden Myofibroblasten identifiziert.²⁵ Myofibroblast beschreibt einen zellulären Phänotyp, der durch kontraktile Elemente und die starke Produktion von EZM-Komponenten charakterisiert wird. Marker der Myofibroblasten ist α -smooth muscle actin (α -SMA). Während in der gesunden Leber keine Myofibroblasten nachweisbar sind, können unter pathologischen Bedingungen verschiedene Zellpopulationen zu Myofibroblasten transdifferenzieren, das heißt einen Myofibroblasten-artigen Phänotyp annehmen (Abbildung 4).^{34,35}



◀ **Abbildung 4 | Fibrogene Effektorzellen der Leberfibrose.** Myofibroblasten (Bildmitte) gelten als die potentesten Produzenten von Matrixbestandteilen in der Leberfibrose. Sie zeigen einen kontraktilen Phänotyp und exprimieren α -SMA. In der gesunden Leber sind keine Myofibroblasten nachweisbar. Verschiedene Zellen können jedoch zu Myofibroblasten transdifferenzieren: Im Kontext der Leberfibrose wurde dies für HSCs und portale Fibroblasten gezeigt. Ihr relativer Anteil ist bislang unklar. Inwieweit Fibrozyten *in vivo* zur hepatischen Myofibroblastenpopulation beitragen (hellblauer Pfeil) ist umstritten. Fibrozyten und portale Fibroblasten können jedoch auch unabhängig von der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten zur Matrixproduktion in der Leber beitragen. HSC, Hepatische Sternzelle; α -SMA, α -smooth muscle actin.

Hepatische Sternzellen (engl. *hepatic stellate cells*, HSCs) gelten als Schlüsselzellen in der Pathogenese der hepatischen Fibrose. Schon 1876 beschrieb Kupffer erstmals „Sternzellen“ der Leber.³⁶ Während er zunächst nicht vermochte, HSCs von den heute als Kupffer-Zellen bekannten lebereigenen Makrophagen abzugrenzen, knüpften zahlreiche Arbeiten an seine Entdeckung an und beschrieben HSCs als Fettspeicherzellen, perisinusoidale Zellen, Ito-Zellen oder Lipozyten. Knapp ein Jahrhundert später konnten die Überschneidungen identifiziert und HSCs von Makrophagen abgegrenzt werden.³⁷ HSCs sind im Disse-Raum, zwischen dem sinusoidalen Endothel und der basolateralen Membran der Hepatozyten, lokalisiert (Abbildung 3A). Unter physiologischen Bedingungen zeigen sie einen ruhenden, nicht-proliferativen Phänotyp und speichern große Mengen Retinylester in zytoplasmatischen Fetttropfen. Sie nehmen eine zentrale Rolle im Vitamin A-Stoffwechsel ein und fungieren als Perizyten des sinusoidalen Endothels.³⁸ Werden HSCs aktiviert, verlieren sie ihre Vitamin-speichernden Eigenschaften und tragen zum Wundheilungs-

prozess bei.³⁹ Sie proliferieren, produzieren inflammatorische Zytokine und Chemokine und beeinflussen das *matrix remodeling* über die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs, siehe unten) und deren Inhibitoren. HSCs können außerdem einen Myofibroblasten-artigen Phänotyp annehmen (Abbildung 4). Sie produzieren dann zahlreiche Proteine des Matrisoms, vor allem Kollagen Typ I und -III, und beeinflussen die mechanischen Eigenschaften der EZM durch kontraktile Elemente.³⁸ Es wurden zahlreiche Faktoren identifiziert, die zur Aktivierung von HSCs beitragen. Während in der Frühphase insbesondere parakrine Signale epithelialer und inflammatorischer Zellen sowie Zell-Matrix-Interaktionen zur Aktivierung beitragen, zeigen HSCs nachfolgend autokrine Aktivierungsmuster, die die fibrotische Antwort aufrechterhalten.^{40,41} PDGF fördert die Proliferation von HSCs.⁴² TGF- β ist der potenteste fibrogene Mediator in der Leberfibrose und von zentraler Bedeutung für die Aktivierung von HSCs. Die EZM dient als Depot für TGF- β , das von einer Vielzahl von Zellen in latenter Form sezerniert und im Zuge des *matrix remodelings* freigesetzt wird.⁴³ Weiterhin exprimieren HSCs wie Kupffer-Zellen TLR-4 und sind Ziel PAMP-vermittelter Wechselwirkungen zwischen dem enteralem Mikrobiom und der Leber. Die Aktivierung von TLR-4 durch die Translokation bakterieller Bestandteile potenziert in HSCs die Wirkung von TGF- β und trägt so zu deren Aktivierung bei.⁴⁴

Der Anteil von HSCs an der hepatischen Myofibroblastenpopulation wurde in verschiedenen Mausmodellen der Leberfibrose untersucht. In Modellen toxischer Leberschädigung durch Tetrachlormethan (Summenformel CCl₄) oder Thioacetamid (TAA; siehe Kapitel 1.5.2) stellten HSCs den Ursprung von > 90 % der Myofibroblasten dar.⁴⁵⁻⁴⁷ Inwieweit diese dominante Rolle der HSCs als Effektorzelle der Fibrogenese unabhängig von der Ätiologie der Leberschädigung ist, wird kontrovers diskutiert. Insbesondere für Modelle cholestatischer Leberschädigungen finden sich widersprüchliche Ergebnisse: In den ersten Tagen nach operativem Gallengangsverschluss (engl. *bile duct ligation*, BDL) beobachteten einige Autoren nur einen geringen Beitrag von HSCs zur hepatischen Myofibroblastenpopulation.^{46,47} Im *Abcb4*^{-/-}-Modell, in dem die fehlende Ausscheidung von Phospholipiden in die Gallenflüssigkeit durch Ausschaltung eines hepatozytären Transportproteins zu spontaner Fibrose führt⁴⁸, waren HSCs Quelle etwa der Hälfte aller hepatischen Myofibroblasten.⁴⁹ Mederacke *et al.* berichteten hingegen, dass HSCs auch in drei Modellen cholestatischer Leberschädigung (BDL, *Abcb4*^{-/-}, 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidin-Diät) über 80 % der Myofibroblastenpopulation ausmachten.⁴⁵

Portale Fibroblasten (auch periduktuläre Fibroblasten, mesenchymale Zellen ohne sinusoidalen Bezug oder [peri-]portale mesenchymale Zellen) umgeben in der gesunden Leber die Portalvenenäste und Gallengänge und tragen zur strukturellen Integrität der Portalfelder bei.^{25,50} Die Biologie der portalen Fibroblasten, insbesondere die Mechanismen der Aktivierung im Kontext chronischer Leberschädigung ist weit weniger erforscht als die der HSCs. Die Aktivierung portaler Fibroblasten durch TGF- β wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, während PDGF *in vitro* keinen Einfluss auf die Transdifferenzierung ausübte.^{46,51} Die Gallensäure Taurocholsäure stimulierte die Bildung von Kollagen in portalen Fibroblasten.⁴⁶ Während in Mausmodellen der CCl₄- und TAA-induzierten Leberfibrose kaum Transdifferenzierung portaler Fibroblasten zu Myofibroblasten nachgewiesen worden war⁴⁵⁻⁴⁷, waren sie in einem *Abcb4*^{-/-}-Mausmodell Ursprung von bis zu 50 % der Myofibroblasten.⁴⁹ In BDL-Modellen wurden portale Fibroblasten als dominante Quelle hepatischer Myofibroblasten identifiziert.^{46,47,51}

Fibrozyten stellen eine weitere Quelle hepatischer Myofibroblasten dar (Abbildung 4). Auf ihre Biologie sowie die bisherigen Erkenntnisse zu ihrer Rolle in der hepatischen Fibrose geht Kapitel 1.3 ausführlich ein.

Inadäquater Matrixabbau

Die Struktur der EZM ist das Ergebnis dynamischer, bidirektionaler Prozesse. Der Produktion und Modifikation von Komponenten der EZM steht ein kontinuierlicher Abbau durch eine Vielzahl von Enzymen gegenüber. Die pathologische Akkumulation von Matrixproteinen stellt somit stets das Ergebnis einer Dysbalance pro- und antifibrotischer Faktoren dar. MMPs sind die maßgeblichen Enzyme, die den Abbau von Matrixbestandteilen vermitteln. Es wurden bislang 28 MMPs identifiziert, die sich in ihren Substraten und ihrer Lokalisation unterscheiden. 23 MMPs wurden im humanen System nachgewiesen.^{52,53} Weiterhin sind Adamalysine, Urokinase und Gewebs-Plasminogenaktivator am Abbau von EZM beteiligt.¹⁷ Im Rahmen der Fibrogenese zeigt sich eine Induktion einiger dieser Mediatoren, deren Regulation und Relevanz bislang nur unvollständig aufgeklärt ist.^{52,54} Gleichzeitig kommt es zur Expression spezifischer Inhibitoren der MMPs (engl. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinase*, TIMPs). Es sind vier TIMPs bekannt, die das gesamte Spektrum von MMPs inhibieren können. TIMP-1 gilt als zentraler Mediator des *matrix remodelings*, der in der hepatischen Fibrogenese, unter anderem durch HSCs, exprimiert wird.^{54,55} Obwohl sich im Kontext der hepatischen Fibrose zumeist eine insgesamt gesteigerte fibrolytische Aktivität zeigt, ist diese inadäquat, um die Homöostase der EZM aufrecht zu erhalten.

Verlust der hepatischen Mikroarchitektur

Die Aktivierung fibrogener Effektorzellen bei ausbleibender adäquater Fibrolyse führt zur Vermehrung der intrahepatischen Matrixproteine, insbesondere Kollagen Typ I. Physiologischerweise zeigen sich intrahepatisch nur geringe Mengen EZM im Bereich der Portalfelder (Abbildung 3A). In der fibrotischen Leber kommt es von hier aus zunächst zu einer lokalen Expansion des Bindegewebes. Später bilden sich fibrotische Septen aus, die das Portalfeld mit einem angrenzenden Portalfeld (portoportales *Bridging*) oder der Zentralvene (portozentrales *Bridging*) verbinden (Abbildung 3B).⁴⁰ Weitere Veränderungen zeigen sich im subendothelialen Disse-Raum der hepatischen Sinusoide. In der gesunden Leber liegen hier ruhende HSCs in lockerem Bindegewebe (Abbildung 3A). Gemeinsam mit dem fenestrierten Endothel der Sinusoide erlaubt dies den großflächigen und unmittelbaren Kontakt der Hepatozyten mit dem portalvenösen Blut, der für die Stoffwechselfunktion der Leber entscheidend ist. In der fibrotischen Leber zeigt sich eine Expansion der subendothelialen EZM und der Verlust der Fenestrierung des Endothels (Abbildung 3B) – es kommt zu der sogenannten Kapillarisation der Sinusoide. Dies schränkt die Stoffwechselkapazität der Leber erheblich ein und führt zu einem erhöhten hepatischen Gefäßwiderstand.⁴⁰ Infolgedessen kommt es zu einem veränderten intrahepatischen Blutfluss, der den Untergang weiterer Hepatozyten begünstigt. Auch extrahepatisch steigt der Druck im portalvenösen System (portale Hypertension). Neben Komplikationen wie Aszites und Ösophagusvarizenblutungen (siehe Kapitel 1.1.2) zeigt sich infolge der zunehmenden portalen Hypertension eine vermehrte Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen des enteralen Mikrobioms in die portalvenöse Zirkulation, die die hepatische Inflammation aufrechterhalten.¹²

1.2.4 Diagnostik

Die Diagnostik der hepatischen Fibrose stellt klinisch eine Herausforderung dar. Goldstandard in der Diagnose und Beurteilung der Leberfibrose ist die histopathologische Beurteilung einer Leberbiopsie. Es wurden verschiedene Klassifikationssysteme entwickelt, um das Ausmaß der Fibrose anhand histologischer Kriterien zu kategorisieren (*Staging*). Gebräuchlich sind das fünfstufige METAVIR-System (F0-F4)⁵⁶ und das siebenstufige System nach Ishak *et al.* (0-6 Punkte).⁵⁷ Während diese Klassifikationssysteme vorrangig im Kontext der HCV-Infektion entwickelt wurden, gewinnen krankheitsspezifische Systeme der NAFLD und Alkohol-assoziierten Lebererkrankung zunehmend an Relevanz. Obwohl viele Lebererkrankungen, die mit einer Leberfibrose einhergehen, grundsätzlich unabhängig von dieser diagnostiziert werden können, liefert das Ausmaß der Fibrose wertvolle Informationen über deren Verlauf sowie Prognose: Das histologische Fibrosestadium stellte sich als zentraler Prädiktor für die Gesamt- und krankheitsspezifische Mortalität Alkohol-assoziiierter Lebererkrankungen⁵⁸ und der NAFLD heraus.⁵⁹ Eine entscheidende Rolle kommt dem histologischen Fibrosestadium heute außerdem als regulatorischer Studienendpunkt antifibrotischer Therapien zu.⁶⁰ Bei unklaren Lebererkrankungen können neben der Bestimmung des Fibrosestadiums oftmals Hinweise auf die zugrundeliegende Ätiologie gefunden werden. Die histologische Diagnostik mittels Leberbiopsie birgt jedoch diverse Unzulänglichkeiten. Es zeigten sich ein beträchtlicher Stichprobenfehler aufgrund der inhomogenen Verteilung von Narbengewebe in der Leber sowie eine bestenfalls mäßige Reliabilität der histopathologischen Beurteilung.⁶¹⁻⁶³ Verfügbarkeit, Komplikationsrisiken und die Kosten der Gewinnung einer Biopsie schränken darüber hinaus den klinischen Einsatz ein. In der klinischen Routine haben sich daher mit der Bestimmung direkter und indirekter Fibrosemarker im peripheren Blut sowie der physikalischen Messung der Lebersteifigkeit nicht-invasive Fibrosemarker etabliert. Obwohl eine genaue Abbildung des Ausmaßes der Fibrose hiermit zumeist nicht gewährleistet werden kann, erlauben sie im Rahmen multimodaler Diagnosealgorithmen den Ausschluss einer fortgeschrittenen Lebererkrankung beziehungsweise die Identifizierung von Risikopopulationen. Die Weiterentwicklung dieser und weiterer Modalitäten wie der Magnetresonanz-Elastographie oder Positronen-Emissions-Tomographie ist Gegenstand aktueller Forschung.¹⁹

1.2.5 Therapie

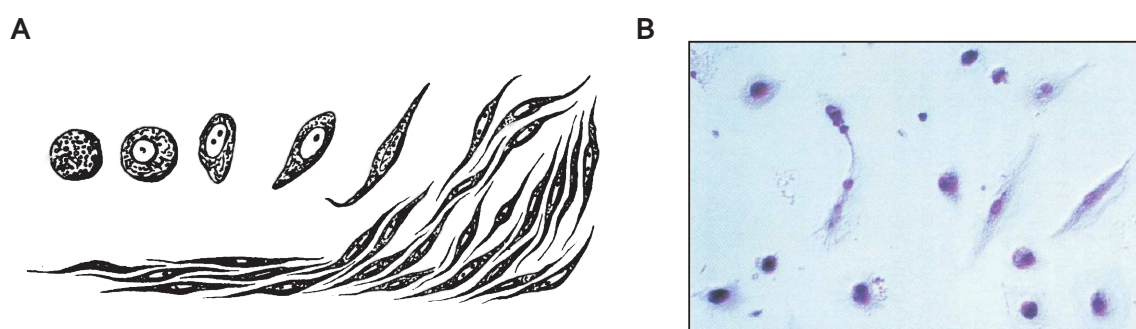
Die Therapie der Leberfibrose bleibt aktuell auf die Behandlung der zugrundeliegenden Lebererkrankung, das Management von Komplikationen sowie die Lebertransplantation beschränkt. Gelingt die Beseitigung des schädigenden Agens, kann das Fortschreiten der Fibrose zumeist verhindert und eine Regression des pathologischen EZM-Umbaus erreicht werden. Gut belegt ist dies beispielsweise für Menschen mit NAFLD, die durch konservative Maßnahmen oder bariatrische Chirurgie ihr Körpergewicht reduzieren.⁹ Gleichsam kann die erfolgreiche Therapie einer chronischen HCV-Infektion oder die dauerhafte Alkoholabstinenz das Fortschreiten der Fibrose verhindern und eine Regeneration ermöglichen.^{64,65} Nur ein Teil der Betroffenen kann jedoch rechtzeitig identifiziert und kausalen Therapieansätzen zugeführt werden. In fortgeschrittenen Stadien kann lediglich das Auftreten hepatischer Dekompensationen durch präventive Maßnahmen reduziert werden. Eine potenziell kurative Lebertransplantation steht nicht zuletzt aufgrund

des Mangels an Spenderorganen nur in ausgewählten Fällen zur Verfügung.⁵ Weitere antifibrotische Therapien werden dringend benötigt.¹

Bislang steht keine medikamentöse Therapie der Leberfibrose zur Verfügung. Studien zum Einsatz von Interferon (IFN) zeigten widersprüchliche Ergebnisse, die schlechte Verträglichkeit der Therapie schränkt den klinischen Einsatz darüber hinaus stark ein.^{66,67} Nachdem in den vergangenen Jahren die Entwicklung zahlreicher neuartiger Wirkstoffe in der fortgeschrittenen klinischen Erprobung eingestellt worden war, wurden zuletzt vielversprechende Ergebnisse für die Wirkstoffe Obeticholsäure und Resmetirom präsentiert, die eine Zulassung denkbar erscheinen lassen.^{68,69} Beide Wirkstoffe adressieren jedoch vornehmlich die auslösenden metabolischen Veränderungen der NAFLD, eine spezifische Therapie des pathologischen *matrix remodelings* ist weiter nicht in Sicht. Abseits der Leberfibrose sind mit Pirfenidon und Nintedanib bislang lediglich zwei antifibrotische Wirkstoffe für fibrotische Erkrankungen der Lunge zugelassen.⁷⁰⁻⁷³

1.3 Fibrozyten

Fibrozyten stellen einen einzigartigen Zelltyp dar, der Eigenschaften von Leukozyten und Fibroblasten vereint. Hinweise auf zirkulierende fibrogene Zellen lassen sich bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts zurückverfolgen (Abbildung 5A).⁷⁴ 1994 identifizierten Bucala *et al.* schließlich eine Leukozytenpopulation, die EZM-Bestandteile sezerniert (Abbildung 5B).⁷⁵ Sie bezeichneten diese Zellen aufgrund der Fibroblasten-artigen Fähigkeit Matrix zu produzieren (*Fibro-*) und des Auftretens in der Zirkulation (*-zyt*) als Fibrozyten.⁷⁶ Fibrozyten sind regelhaft im peripheren Blut des Menschen sowie zahlreicher weiterer Spezies, unter ihnen Maus und Ratte, nachweisbar und machen hier 0,5-5 % aller Leukozyten aus.^{77,78} Abseits der Zirkulation sind sie unter physiologischen Bedingungen nur vereinzelt in peripheren Geweben zu beobachten. Es wird zunehmend deutlich, dass Fibrozyten an physiologischen und pathologischen Wundheilungsprozessen in einer Vielzahl von Geweben beteiligt sind.



▲ **Abbildung 5 | Historische Identifizierung von Fibrozyten.** (A) Paget beschrieb und illustrierte in seinen „*Lectures on Surgical Pathology*“ zwischen 1847 und 1852 die Entwicklung spindelförmiger Bindegewebszellen aus zunächst kugelförmigen Zellen in Wundsekreten. Dies wird heute als die am weitesten rückverfolgbare Beschreibung von Fibrozyten angesehen. *Abbildung aus* ⁷⁴. *Gemeinfreier Inhalt, digitalisiert von Google Books.* (B) 1994 bemerkten Bucala *et al.*, dass in subkutan implantierten Wundkammern bereits nach 24 Stunden spindelförmige, Fibroblasten-artige Zellen auftraten. Sie stellten die Hypothese auf, dass eine solch schnelle Rekrutierung nur durch einen Ursprung in der Zirkulation zu erklären sei und konnten nachfolgend die Existenz von Fibrozyten als zirkulierende Bindegewebszellen zeigen. *Abbildung aus* ⁷⁵. *Reproduziert mit Genehmigung von Springer Nature. Alle Rechte vorbehalten.*

1.3.1 Definition und Abgrenzung

Bucala *et al.* beschrieben den Fibrozyt zunächst als „*blood-borne fibroblast-like cell in the host repair response to tissue injury*“, eine Fibroblasten-artige Zelle aus dem Blut, die an Wundheilungsprozessen beteiligt ist.⁷⁵ Während die Herkunft zunächst unklar blieb, identifizierten spätere Arbeiten hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark als den wahrscheinlichsten Ursprung dieser Zellen (siehe Kapitel 1.3.3). Wie in den meisten nachfolgenden Untersuchungen werden Fibrozyten in der vorliegenden Arbeit daher als Matrix-produzierende Zellen mit Ursprung im Knochenmark definiert. Abgegrenzt werden müssen Fibrozyten hier von mesenchymalen Stromazellen, Monozyten und Makrophagen. Mesenchymale Stromazellen (auch mesenchymale Stammzellen) stellen neben hämatopoetischen Stammzellen die zweite Stammzellpopulation des Knochenmarks dar, aus der Zellen des Fett-, Knorpel- und Knorpelgewebes hervorgehen können.⁷⁹ Sie sind unter bestimmten Umständen ebenfalls zur Matrixproduktion fähig und regulieren lokal das Stroma des Knochenmarks. Anders als Fibrozyten treten sie nicht in der Zirkulation auf und zeigen keine direkte Beteiligung am *matrix remodeling* außerhalb des Knochenmarks.⁸⁰ Fibrozyten zeigen darüber hinaus große Ähnlichkeiten mit Monozyten und Makrophagen, denen entscheidende Rollen im *matrix remodeling* zukommen und die eine große Plastizität zeigen. Nichtsdestotrotz stellen Fibrozyten keine Subpopulation von Monozyten oder Makrophagen, sondern einen eigenständigen Zelltyp dar, der klar abgegrenzt werden kann und ein einzigartiges Genexpressionsprofil zeigt.^{81,82} Zuletzt wird der Begriff Fibrozyt in der Literatur mehrdeutig verwendet. Neben der von Bucala *et al.* geprägten Bedeutung werden von einigen Autoren auch gewebsständige Fibroblasten, die morphologische Zeichen der Inaktivität zeigen, als Fibrozyten bezeichnet. Die vorliegende Arbeit schließt sich der Terminologie von Bucala *et al.* an, Fibroblasten werden ungeachtet ihres Aktivitätszustandes als solche bezeichnet.

1.3.2 Identifizierung

Trotz intensiver Bemühungen wurde bis heute kein Marker identifiziert, dessen alleiniger Nachweis die spezifische Identifizierung von Fibrozyten nach der oben genannten Definition gewebsunabhängig über alle Differenzierungs- und Aktivierungsstufen hinweg erlaubt. Fibrozyten tragen auf der einen Seite zahlreiche leukozytäre Oberflächenantigene wie den Panleukozytenmarker *cluster of differentiation* (CD)45 und den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34. Sie tragen außerdem Marker der monozytären Linie wie CD11b und CD68 beziehungsweise in der Maus Lymphozytenantigen 6C (Ly-6C) und das F4/80-Antigen.^{81,83-85} Auf der anderen Seite exprimieren Fibrozyten Matrixproteine wie Kollagen Typ I und -III oder Vimentin.^{75,83} Da weder andere fibrogene Zellen leukozytäre Marker noch andere Leukozyten die Produktion von Matrixproteinen aufweisen, erlaubt der Nachweis beider Eigenschaften in einer Zelle, etwa durch die Kombination von CD45 und Kollagen Typ I, die Identifizierung von Fibrozyten.

1.3.3 Herkunft und Differenzierung

Der Nachweis des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 in der Erstbeschreibung der Fibrozyten legte einen hämatopoetischen Ursprung dieser Zellen nahe.⁷⁵ Untersuchungen mit Knochenmarkchimären zeigten weiterhin, dass Fibrozyten durch die Ablation hämatopoetischer Stammzellen und anschließende Transplantation genetisch veränderten oder fehlgeschlechtlichen Reporter-Knochenmarks markiert werden können.^{86,87} Da die zweite Stammzellpopulation des Knochenmarks, mesenchymale Stammzellen, als nicht in gleichem Maße strahlensensibel gilt und außerdem zu keinem Zeitpunkt CD45 exprimiert, kann konkludiert werden, dass der Ursprung von Fibrozyten auf hämatopoetische Stammzellen zurückzuführen ist.⁸⁸ Nachdem Bucala *et al.* *in vitro* die spontane Differenzierung von Fibrozyten aus isolierten Leukozyten zeigen konnten, erfolgten weitere Untersuchungen, um die Vorläuferzellen der Fibrozyten, die in der Differenzierungslinie zwischen hämatopoetischen Stammzellen und differenzierten Fibrozyten stehen, zu charakterisieren. Die Ausschaltung von Zellen, die CD11b, -14, -16, -32 und -115 sowie Gr1 tragen, dezimierte die Vorläuferzellpopulation der Fibrozyten, sodass eine Differenzierung aus der myeloisch-monozytären Linie des Knochenmarks angenommen wird.^{89,90} Die in der Folge etablierte experimentelle Kultivierung von Fibrozyten aus isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) unterstützt diese Hypothese. Die exakte Differenzierungslinie der Fibrozyten bleibt jedoch weiter ungeklärt. Auch eine Fibrozyten-eigene Differenzierungslinie im Knochenmark, die gemeinsame Oberflächenantigene mit der myeloisch-monozytären Linie trägt, ist denkbar.⁹¹

Die Kultivierung von Fibrozyten *in vitro* erlaubte die Identifizierung zahlreicher Faktoren, die die Differenzierung regulieren. Es wurde gezeigt, dass die Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen essenziell für die Differenzierung von Fibrozyten aus PBMCs ist^{89,90} und TGF- β die Ausreifung induziert.^{89,92,93} Außerdem förderten IL-4^{94,95}, IL-13⁹⁴, Tryptase⁹⁶, Thrombin⁹⁶, Lumican⁹⁷, SLIT2⁹⁸, hochmolekulare Hyaluronsäure⁹⁹ und die Aktivierung des Thrombopoetinrezeptors¹⁰⁰ die Differenzierung. TNF⁹⁰, IFN- γ ^{90,94}, IL-2^{89,90}, IL-4⁹⁰, IL-12⁹⁴, niedermolekulare Hyaluronsäure⁹⁹ und TLR-2-Agonisten¹⁰¹ hemmten hingegen die Differenzierung von Fibrozyten *in vitro*. Gegenstand intensiver Forschung in der Regulation der Fibrozytendifferenzierung ist die Rolle der Pentraxine. Pentraxine sind phylogenetisch alte, hochkonservierte humorale Bestandteile des angeborenen Immunsystems.¹⁰² Pilling *et al.* beobachteten, dass Serum schon in geringer Konzentration die Differenzierung von Fibrozyten aus isolierten PBMCs hemmt und identifizierten Pentraxin-2 (PTX-2, auch Serum Amyloid P) als den verantwortlichen Faktor.¹⁰³ PTX-2 bildet mit dem C-reaktiven Protein (CRP, auch PTX-1) die Familie der kurzen Pentraxine. Es erkennt DAMPs und PAMPs und trägt zur Aktivierung des Komplementsystems, der Opsonierung und Phagozytose bei.^{102,104-107} Die Bindung von PTX-2 an Fc γ -Rezeptoren und CD209 vermittelt die Inhibition der Ausreifung von Fibrozyten über einen bislang ungeklärten Mechanismus.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ CRP hat keinen Einfluss auf die Fibrozytendifferenzierung, das lange Pentraxin PTX-3 fördert hingegen die Ausreifung von Fibrozyten.^{103,110,111}

1.3.4 Chemotaxis

Die Migration von Fibrozyten wird analog zu anderen Immunzellen vornehmlich über Gradienten von Chemokinen reguliert. Im Zentrum stehen hierbei die C-C- und C-X-C-Motif Chemokinfamilien, aus denen Fibrozyten zahlreiche Rezeptoren exprimieren, hierunter CCR1, -2, -3, -5 und -7 und CXCR3, -4 und -6.^{89,112-114} Die detailliertesten Untersuchungen liegen bislang für die Migration entlang der CCL2, -12/CCR2-Achse vor. Die Expression von CCR2 scheint nicht maßgeblich für den Übertritt von Fibrozyten aus dem Knochenmark in die Zirkulation¹¹⁵, die Ausschaltung von CCR2 inhibierte aber die Infiltration der Lunge, Niere und Leber durch Fibrozyten.^{113,115-119} Abseits der klassischen Chemokine wurde außerdem eine chemotaktische Wirkung von PDGF auf Fibrozyten gezeigt.¹²⁰

1.3.5 Funktionen

Zahlreiche potenzielle biologische Funktionen der Fibrozyten wurden, zumeist durch die Analyse der sezernierten Proteine (Sekretom) oder intrazellulären mRNA-Transkripte (Transkriptom) *in vitro*, identifiziert. Diese lassen sich analog zu den zellulären Markern schematisch in mesenchymale Prozesse des *matrix remodeling*s und hämatopoetische Prozesse der Immunantwort unterteilen.

Matrix remodeling

Fibrozyten stellen eine potenzielle Quelle von Myofibroblasten dar. Während *ex vivo* kultivierte Fibrozyten zunächst eine spindelförmige Zellmorphologie zeigen und kein α -SMA exprimieren, nehmen sie nach einigen Tagen bis Wochen in Kultur einen kontraktilen, α -SMA⁺-Phänotyp an.^{89,112,121} Unabhängig von ihrem Phänotyp sind Fibrozyten in der Lage, zahlreiche Bestandteile des Matrisoms zu sezernieren. Die Expression von Kollagen Typ I, III, V und VI, Vimentin, Fibronectin und Proteoglykanen wie Perlecan oder Versican wurde *in vitro* nachgewiesen.^{75,122} Das Ausmaß der Matrixproduktion ist umstritten. Kürzlich trugen zwei Arbeiten durch die umfassende Charakterisierung des Transkriptoms kultivierter Fibrozyten im Vergleich mit Monozyten und dermalen beziehungsweise pulmonalen Fibroblasten zu der Debatte bei. Erwartungsgemäß zeigten sich zahlreiche für Matrixproteine kodierende Gene in Fibrozyten gegenüber Monozyten verstärkt exprimiert.⁸² Es zeigte sich jedoch keine mit anderen Fibroblasten vergleichbare Genexpressionssignatur, vielmehr wiesen Fibrozyten ein einzigartiges Profil auf, das einen intermediären, mesenchymal-hämatopoetischen Phänotyp widerspiegelt: Die Stoffwechselwege Kollagenbiosynthese und EZM-Organisation der *Reactome*-Datenbank waren in Fibroblasten klar überexprimiert, Fibrozyten zeigten hingegen aktivierte Stoffwechselwege in den Kategorien Metabolismus, Immunsystem und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.¹²³ Neben der direkten Produktion von Matrixproteinen tragen Fibrozyten auch durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Proteasen zum *matrix remodeling* bei. Fibrozyten sezernieren TGF- β , PDGF und *fibroblast growth factor* (FGF).^{82,124} Im Vergleich mit Monozyten zeigten Fibrozyten eine signifikant höhere Sekretion von PDGF und FGF.⁸² Fibrozyten produzieren darüber hinaus MMP-2, -7, -8 und -9, aber auch den MMP-Inhibitor TIMP-1.^{125,126}

Immunantwort

Das Sekretom der Fibrozyten umfasst eine Vielzahl humoraler Faktoren des Immunsystems. Neben inflammatorischen Zytokinen stimuliert auch die TLR-vermittelte Signaltransduktion die Sekretion von Entzündungsmediatoren durch Fibrozyten.¹²⁷ Sie produzieren die inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF, entzündliche Mediatoren des Arachidonsäurestoffwechsels wie Cysteinyl-Leukotriene und Leukotrien B₄ (LTB₄), aber auch das antiinflammatorische IL-10.^{124,128} Weiterhin produzieren Fibrozyten Chemokine und Adhäsionsproteine, die die Leukodiapedese fördern, darunter CCL2, -3 und -4, C-X-C-Motif Chemokinligand (CXCL)1, -2 und -8 sowie das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül (ICAM)-1.^{77,124}

Fibrozyten fungieren als antigenpräsentierende Zellen, die zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort beitragen können. Sie exprimieren *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Komplexe sowie die kostimulatorischen Oberflächenantigene CD80 und CD86 und können so CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen stimulieren.^{77,129} Fibrozyten sind darüber hinaus auch direkt an der Immunantwort auf bakterielle Infektionen beteiligt. Nach Verabreichung vitaler Bakterien des Stammes *Listeria monocytogenes* oder bakterieller Lipopolysaccharide zeigte sich eine Expansion der Fibrozytenpopulation in Knochenmark und Milz.¹³⁰ Es wurde die Sekretion antimikrobieller Peptide wie Lysozyme, Myeloperoxidase oder Komplementfaktor C3 und die Ausbildung von *extracellular traps* nachgewiesen. Letztere bezeichnen extrazelluläre Netze freier DNA, die ursprünglich als Abwehrmechanismus neutrophiler Granulozyten identifiziert wurden. Die von Fibrozyten erzeugten *extracellular traps* waren zusätzlich durch Cathelicidine und Kollagen verstärkt.¹³⁰ Kürzlich wurde die Phagozytose abgetöteter Bakterien durch Fibrozyten beschrieben.¹³¹ Die Relevanz dieser antimikrobiellen Effekte wurde in einem Mausmodell der Sepsis nach intestinaler Obstruktion und Perforation gezeigt: Die Verabreichung kultivierter Fibrozyten führte zu einer Verminderung der Keimzahl in der peritonealen Lavage und verlängertem Überleben.^{131,132}

1.3.6 Fibrozyten als Mediatoren von Wundheilung, Entzündung und Krebs

Fibrozyten sind in Mausmodellen der dermalen Wundheilung und humanen Wunden nachweisbar, sodass eine Beteiligung an physiologischen Wundheilungsprozessen angenommen wird.^{75,87,133} Darüber hinaus wurde das Auftreten von Fibrozyten in einer Vielzahl von fibrotischen und entzündlichen Krankheitsentitäten in beinahe allen Geweben des menschlichen Körpers beschrieben. Beispielsweise konnte die Präsenz von Fibrozyten in der Fibrose des Herzens¹³⁴, der Niere¹³⁵ und des Knochenmarks gezeigt werden.¹³⁶ Die umfangreichsten Untersuchungen liegen zu Erkrankungen der Lunge vor. Hier sind Fibrozyten an der Fibrogenese im Rahmen interstitieller Lungenerkrankungen^{112,137}, dem Umbau der Atemwege im Rahmen von obstruktiven Lungenerkrankungen¹³⁸ und dem Umbau der Gefäße in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie beteiligt.^{139,140} Fibrozyten können im Rahmen von Krebserkrankungen außerdem als Krebs-assoziierte Fibroblasten die Tumormikroumgebung regulieren und so potenziell Tumorüberleben, Tumorwachstum und Metastasierung beeinflussen.¹⁴¹ Eine Beteiligung in Mausmodellen des Lungenkrebs wurde gezeigt.^{85,142} In Patientinnen und Patienten mit metastasierten pädiatrischen Sarkomen zeigte sich eine Expansion von Fibrozyten im peripheren Blut, die zur Immunevasion des Tumors beitrug.¹⁴³

1.3.7 Beteiligung an der hepatischen Fibrose

Bislang liegt nur wenig Evidenz für eine Beteiligung von Fibrozyten an der hepatischen Fibrose vor. Eine Arbeit adressierte die Frage nach einem möglichen Knochenmarksursprung hepatischer Myofibroblasten im Menschen.¹⁴⁴ Es ergeben sich direkte Implikationen für eine Beteiligung von Fibrozyten, da diese die einzige bekannte Zellpopulation des Knochenmarks darstellen, die in der Leber zu Myofibroblasten transdifferenzieren können (Abbildung 4). Forbes *et al.* untersuchten in dieser Arbeit Leberbiopsien sieben männlicher Patienten, denen jeweils die Leber einer weiblichen Spenderin transplantiert worden war. Sechs der sieben Patienten litten an einer chronischen Virushepatitis, einer der Patienten an Morbus Wilson. Nach erfolgter Lebertransplantation ließen sich in 14-45 % der hepatischen Myofibroblasten das Y-Chromosom nachweisen. Dies deutet auf einen extrahepatischen Ursprung der Myofibroblasten hin, da lebereigene Zellpopulationen aufgrund des weiblichen Geschlechts der Spenderin kein Y-Chromosom tragen. Ein Hinweis, dass das Knochenmark die Quelle dieser Myofibroblastenpopulation ist, wurde in derselben Arbeit aus dem Fall einer weiteren Patientin abgeleitet: Zehn Jahre nachdem sie eine Knochenmarkstransplantation ihres Bruders erhalten hatte, benötigte sie infolge einer chronischen HCV-Infektion eine Lebertransplantation. Die Untersuchung der Explantatleber der Patientin ergab, dass in 25 % der Myofibroblasten das Y-Chromosom nachweisbar war. In der Zusammenschau legen Forbes *et al.* damit Indizien vor, dass Zellen des Knochenmarks – mutmaßlich Fibrozyten – Ursprung eines Teils der Myofibroblastenpopulation in der humanen Leber sind.

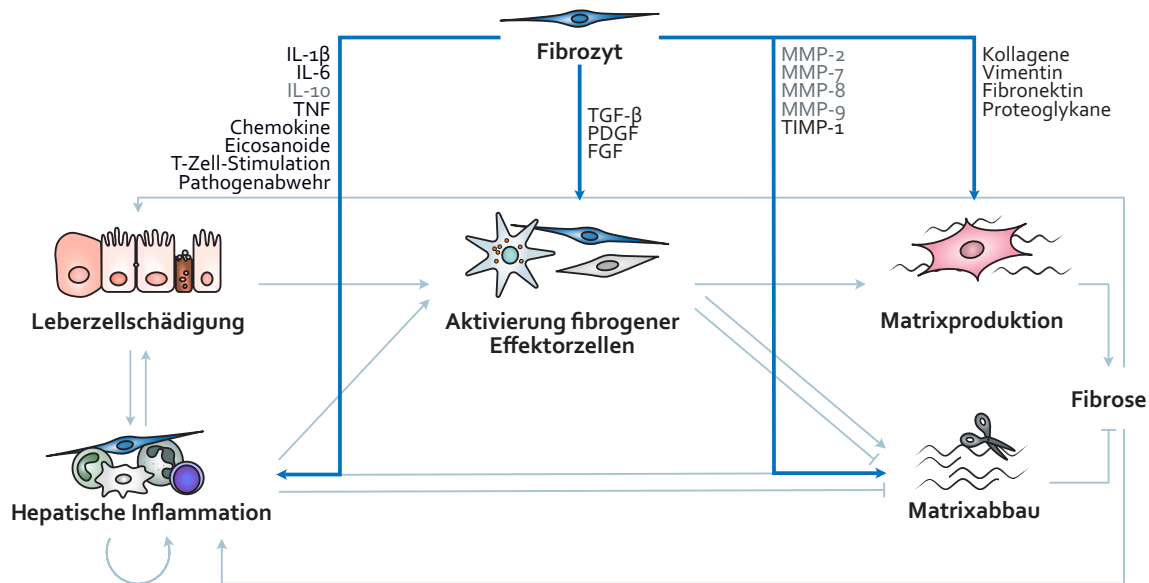
Die Rolle von Fibrozyten in der hepatischen Fibrose wurde infolgedessen in Mausmodellen weiter charakterisiert. Aufgrund des Fehlens eines spezifischen Fibrozytenmarkers (siehe Kapitel 1.3.2) stammt der Großteil der Erkenntnisse aus sogenannten *fate-tracing*-Untersuchungen, die das Schicksal Kollagen-produzierender Zellen des Knochenmarks (der Definition von Fibrozyten in der vorliegenden Arbeit entsprechend, siehe Kapitel 1.3.1) verfolgen. Es wird hierzu Knochenmark aus genetisch veränderten Mäusen, die ein Reportermolekül in Abhängigkeit eines Kollagen-Promotors exprimieren, in Wildtyp-Mäuse transplantiert. Der Nachweis des Reportermoleküls in Zellen der Empfängermäuse ermöglicht dann den direkten Nachweis von Fibrozyten. Kisseleva *et al.* setzten dieses Vorgehen in einem BDL-Modell cholestatischer Leberschädigung ein.¹⁴⁵ Anhand des Reportermoleküls grün-fluoreszierendes Protein (GFP) identifizierten sie 5-10 % der Kollagen-produzierenden Zellen der Leber als Fibrozyten. Auch im Knochenmark und in der Milz zeigte sich eine korrespondierende Expansion der Fibrozytenpopulation. In zwei weiteren Untersuchungen wurde das Auftreten von Fibrozyten auch in einem Modell der CCl₄-induzierten, chronisch-toxischen Leberschädigung gezeigt.^{119,130} Der Einsatz einer Leuchtkäfer-Luciferase als Reportermolekül ermöglichte, die hepatische Migration von Fibrozyten im Zeitverlauf der CCl₄-induzierten Leberschädigung *in vivo* zu verfolgen: Das erste Signal ließ sich sieben Tage nach der ersten Injektion detektieren, erreichte nach 14 Tagen sein Maximum und blieb bis zum Ende des achtwöchigen Versuchs nachweisbar.¹¹⁹ Auch in einem *Abcb4*^{-/-}-Mausmodell ergaben sich Indizien für die Präsenz von Fibrozyten, etwa 4 % der Kollagen-produzierenden Zellen zeigten die Koexpression von CD45.⁴⁹ Higashiyama *et al.* konnten diese Beobachtungen nicht reproduzieren.¹⁴⁶ Sie berichteten, dass in Kollagen-GFP- und Kollagen-Luciferase-Knochenmarkchimären nur wenige Fibrozyten nach BDL- und CCl₄-induzierter Leberschädigung nachweisbar gewesen seien.

Kontrovers diskutiert wird der Beitrag von Fibrozyten zur hepatischen Myofibroblastenpopulation (Abbildung 4). Nachdem von Kisseleva *et al.* zunächst keine Transdifferenzierung beschrieben worden war¹⁴⁵, wurden später α -SMA⁺-Zellen mit Knochenmarksursprung in einem BDL-Mausmodell nachgewiesen.¹⁴⁷ Auch in einem CCl₄-Modell wurden etwa 4 % der Myofibroblasten als Fibrozyten identifiziert.⁴⁶ Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten in einem *Abcb4*^{-/-}-Mausmodell, dass Zellen aus dem Knochenmark in fibrotischem Gewebe einen kontraktilen Desmin⁺-Phänotyp annehmen.¹⁴⁸ Diese Beobachtungen deuten auf eine Transdifferenzierung von Fibrozyten zu Myofibroblasten *in vivo* hin. Demgegenüber stehen umfassende und akribische Untersuchungen, die HSCs und portale Fibroblasten als praktisch exklusive Quellen hepatischer Myofibroblasten demonstrierten.^{45,47,49}

1.4 Forschungshypothese und Zielsetzung

Aufgrund der großen Bedeutung von Lebererkrankungen gilt es, die Leberfibrose als gemeinsamen pathologischen Mechanismus in ihren molekularen und zellulären Mechanismen zu erschließen. Trotz großer Fortschritte im Verständnis der hepatischen Fibrogenese bleiben insbesondere die zellulären Akteure nur unvollständig verstanden. Fibrozyten wurden als fibrogene Mediatoren in einer Vielzahl von Geweben und Schädigungsmustern identifiziert. *Fate-tracing*-Untersuchungen zeigten, dass Fibrozyten *in vivo* spezifisch die geschädigte Leber infiltrieren, sodass ein Beitrag zur hepatischen Fibrose möglich erscheint. Die Aussagekraft der *fate-tracing*-Untersuchungen bleibt jedoch auf die schiere Präsenz der Fibrozyten beschränkt. Inwieweit sie am Ort der Schädigung funktionell zur Fibrogenese beitragen, ist bislang unklar. Die Gegenüberstellung der einzigartigen Eigenschaften und Funktionen der Fibrozyten mit den molekularen und zellulären Mechanismen der Leberfibrose (Abbildung 6) verdeutlicht, dass Fibrozyten die hepatische Fibrogenese über eine Vielzahl von Mechanismen potenziell beeinflussen können. Über die direkte Matrixproduktion und die Aktivierung anderer Effektorzellen durch inflammatorische Zytokine und fibrogene Wachstumsfaktoren können Fibrozyten zur Fibrogenese beitragen. Es scheint gleichwohl aber plausibel, dass Fibrozyten über antiinflammatorische und fibrolytische Mediatoren eine antifibrotische Wirkung ausüben.

Die Forschungshypothese der vorliegenden Arbeit besagt, dass Fibrozyten einen funktionellen Beitrag zur hepatischen Fibrogenese leisten. Es wird angenommen, dass ein funktioneller Beitrag vorliegt, wenn das Fehlen von Fibrozyten das Ausmaß der Fibrose beeinflusst. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, den Effekt der Ausschaltung der gesamten Fibrozytenpopulation auf die hepatische Fibrogenese zu untersuchen. Hieraus ergeben sich bedeutende Implikationen für das Verständnis der zellulären Akteure der Leberfibrose und die potenzielle Entwicklung antifibrotischer Therapien. Da ein Versuch am Menschen nicht infrage kommt, ein *in vivo*-Versuch aber unerlässlich ist, ergibt sich das vorgelagerte Ziel, ein Mausmodell, das die Ausschaltung von Fibrozyten erlaubt, im Kontext eines Mausmodells der Leberfibrose zu adaptieren. Die Erkenntnisse des Tierversuchs für zukünftige Arbeiten im Sinne der Forschung und des Tierschutzes nutzbar zu machen, ist ein wichtiges Anliegen der vorliegenden Arbeit. Weiterhin soll untersucht werden, ob und inwiefern Mechanismen der hepatischen Fibrose von der Ausschaltung der Fibrozyten betroffen sind.



▲ **Abbildung 6 | Potenzielle Beteiligungen von Fibrozyten in der hepatischen Fibrogenese.** Es konnte gezeigt werden, dass Fibrozyten die geschädigte Leber infiltrieren. Sie stellen damit sowohl einen weiteren Mediator der hepatischen Inflammation (unten links) als auch eine weitere potenziell fibrogene Zellpopulation (Bildmitte) in der schematisch gezeigten hepatischen Fibrogenese dar. Fibrozyten können zahlreiche Prozesse der Fibrogenese potenziell beeinflussen (dunkelblaue Pfeile). Es kann dabei zwischen indirekten, parakrinen Effekten durch die Sekretion inflammatorischer und fibrogener Mediatoren und direkten Effekten durch eine Beteiligung an der Matrixproduktion und ihrem Abbau unterschieden werden. Einige Mediatoren (grau) können antiinflammatorische beziehungsweise antifibrotische Effekte vermitteln. Referenzen siehe Kapitel 1.3.5. *IL*, Interleukin; *FGF*, fibroblast growth factor; *MMP*, Matrix-Metalloproteinase; *PDGF*, platelet-derived growth factor; *TGF*, transforming growth factor; *TIMP*, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase; *TNF*, Tumornekrosefaktor.

1.5 Versuchsaufbau

Um den funktionellen Beitrag von Fibrozyten in der Leberfibrose zu erfassen, soll in der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell zur selektiven, induzierbaren Ausschaltung von Fibrozyten etabliert werden. Zeitgleich mit der Ausschaltung wird eine Leberfibrose induziert, um nach Ende des Versuchs das Ausmaß der Fibrose zu erfassen und auszuwerten.

1.5.1 Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase/Ganciclovir-Suizidgenstrategie

Sogenannte Suizidgenstrategien erlauben die induzierbare Ausschaltung von Zellen, die durch das Einbringen eines Gens (Suizidgen) in die Lage versetzt wurden, zunächst unschädliche Substrate zu toxischen Metaboliten zu verstoffwechseln, die den eigenen Zelltod induzieren. Die Thymidinkinase (TK) des Herpes-simplex-Virus 1 (HSV) wurde 1988 erstmals als potenzielles Suizidgen beschrieben und stellt seitdem das meistgenutzte Modell dar.¹⁴⁹ Es stehen verschiedene Substrate zur Verfügung, die größte zytotoxische Wirkung wurde für Ganciclovir (GCV), beziehungsweise dessen Prodrug Valganciclovir (VCV), gezeigt.^{149,150} GCV wird intrazellulär zunächst von der HSV-TK zu GCV-Monophosphat phosphoryliert. GCV-Monophosphat wird anschließend von zellulären Guanylylcyclasen zu toxischem GCV-Triphosphat verstoffwechselt, das als Nukleotidanalogen in die zelluläre DNA integriert wird und konsekutiv zu DNA-Schäden, Zellzyklusarrest und dem Tod der Zelle führt.^{150,151}

Die Möglichkeiten der gezielten Transfektion von Zielzellen, der konditionellen Expression des Suizidgens und des koordinierten Angebotes des Substrats ermöglichen vielfältige Einsatzszenarien der HSV-TK/GCV-Suizidgenstrategie. Neben experimentellen Versuchsanordnungen *in vitro* und *in vivo* werden in der Onkologie tumorspezifische Suizidgentherapien in klinischen Studien erprobt. Um die spezifische und induzierbare Ausschaltung von Fibrozyten zu erreichen, soll in der vorliegenden Arbeit die Expression der HSV-TK auf Fibrozyten beschränkt werden. Dazu kommt eine transgene Mauslinie zum Einsatz, die die HSV-TK unter Kontrolle eines Kollagen-Promotors exprimiert.¹⁵² Diese etablierte Modifikation hat bei Substratexposition die gezielte Ausschaltung Kollagen-produzierender Zellen zur Folge. Durch die Transplantation von transgenem Knochenmark in Wildtyp-Mäuse soll die Expression des Suizidgens schließlich auf Kollagen-produzierende Zellen des Knochenmarks beschränkt werden, sodass Fibrozyten spezifisch für die GCV-vermittelte Ausschaltung sensibilisiert werden.

1.5.2 Fibroseinduktion durch Thioacetamid

Es stehen zahlreiche Mausmodelle zur Verfügung, die Aspekte der humanen Leberfibrose abbilden, hierunter die wiederholte Exposition gegenüber TAA.^{48,153} Nachdem TAA zunächst als Pflanzenschutzmittel evaluiert worden war, zeigten Langzeitversuche in Ratten 1948 hepatotoxische Effekte: Während geringe Dosierungen eine Leberzirrhose und gelegentlich Lebertumoren hervorriefen, führten höhere Dosierungen zu einem vorzeitigen Versterben, mutmaßlich durch akutes Leberversagen.¹⁵⁴ TAA zeigt selbst keine inhärente Hepatotoxizität. Erst die Biotransformation zu dem hochreaktiven Metaboliten TAA-S,S,-dioxid in Hepatozyten führt zu der dysfunktionalen Modifikation hepatischer Proteine. Es kommt zum oxidativen Abbau von Lipiden, erhöhten Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies und Depletion des intrazellulären Glutathions, die mit mitochondrialer Schädigung und Zytotoxizität an Hepatozyten und Cholangiozyten einhergeht.^{155,156} Obwohl einige dieser pathophysiologischen Aspekte in humanen Lebererkrankungen beobachtet werden können, existiert keine Krankheitsentität als direktes Korrelat der TAA-induzierten Leberschädigung. Als chronisch-toxische Leberschädigung und in ihrem histologischen Bild spiegelt sie am ehesten die Alkohol-assoziierte Lebererkrankung des Menschen wider. Die wiederholte intraperitoneale oder kontinuierlich perorale Gabe von TAA über 4 bis 18 Wochen induziert in Nagetieren dosisabhängig eine fortgeschrittene Fibrose oder Zirrhose. Entsprechende Protokolle auf Basis zahlreicher Vorversuche, auch unserer Arbeitsgruppe, liegen für den genutzten Mausstamm vor.¹⁵⁷

1.5.3 Zielparameter

Die Erfassung der hepatischen Fibrose ist angesichts der komplexen Wechselwirkungen einer Vielzahl dysregulierter Prozesse vielschichtig. Da die Expansion der EZM den maßgeblichen Vorgang darstellt, steht die quantitative Analyse der Matrisoms im Zentrum. Kollagene stellen hier die quantitativ bedeutsamsten Proteine dar. Charakteristisches Merkmal aller Kollagene sind tripelhelikale Domänen, die in ihrer Aminosäuresequenz das sich wiederholende Motiv Glycin-X-Y aufweisen, wobei X und Y überwiegend Prolin darstellen. Posttranslational werden

praktisch alle Prolinreste in der Y-Position des Triplets hydroxyliert, sodass die Aminosäure Hydroxyprolin entsteht. Hydroxyprolin kommt abseits der Kollagene in tierischen Geweben ausschließlich in Elastin vor, sodass ihr Auftreten in Geweben exzellent mit dem Gehalt Fibrose-spezifischer EZM-Proteine korreliert.^{158,159} Die Quantifizierung des Hydroxyprolinegehalts gilt daher als Goldstandard in der Erfassung des Ausmaßes der Fibrose in präklinischen Modellen. Die histologische Darstellung von EZM-Proteinen und deren histopathologische Auswertung (*Staging*) oder Computer-gestützte Analyse stellen Alternativen dar. Es herrscht Konsens, dass komplementäre Auswertungen, die die Darstellung der Gewebsarchitektur mittels Histologie sowie Expressionsanalysen Fibrose-assoziiierter Gene umfassen, für die umfassende Charakterisierung der hepatischen Fibrose infolge einer Intervention notwendig sind.¹⁵³ Analysen der hepatischen Inflammation und Zellschädigung, etwa über die ALT, können wichtige ergänzende Beobachtungen ermöglichen.

1.5.4 Operationale Hypothesen

Auf Basis der allgemeinen Forschungshypothese der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 1.4) und den zur Verfügung stehenden experimentellen Methoden wird ein operationales Hypothesenpaar formuliert, das empirisch geprüft werden soll. Die hypothetische Wirkvariable (oder unabhängige Variable) ist die Präsenz von Fibrozyten, operationalisiert durch den Genotyp des transplantierten Knochenmarks. Während eine Gruppe von Versuchstieren (Kontrollgruppe Ko.) Wildtyp-Knochenmark erhält, tragen die Zellen des Knochenmarks in der anderen Gruppe (Versuchsgruppe FZ-Abl.) das Suizidgen, das zur Ausschaltung der Fibrozyten führt. Die abhängige Variable und primärer Zielparameter ist das Ausmaß der Fibrose, operationalisiert durch den hepatischen Hydroxyprolinegehalt. Die Forschungshypothese, dass Fibrozyten funktionell zur Leberfibrose beitragen lässt sich somit in folgende Alternativhypothese (H_1) übersetzen:

$$H_1: \mu_{\text{Hydroxyprolin}}(\text{FZ-Abl.}) \neq \mu_{\text{Hydroxyprolin}}(\text{Ko.}),$$

mit μ als arithmetischem Mittel der Population. Die korrespondierende Nullhypothese (H_0) lautet:

$$H_0: \mu_{\text{Hydroxyprolin}}(\text{FZ-Abl.}) = \mu_{\text{Hydroxyprolin}}(\text{Ko.}),$$

mit μ als arithmetischem Mittel der Population. Als sekundärer Zielparameter der vorliegenden Arbeit wird die ALT als Marker der Leberzellschädigung festgelegt. Das statistische Hypothesenpaar bildet sich analog zu den Annahmen bezüglich des primären Zielparameters. Alle weiteren Untersuchungen, die die Auswirkungen der Fibrozytenablation auf die hepatische Fibrose charakterisieren, erfolgen in einem explorativen Ansatz.

2. Material und Methoden

Für die im Folgenden genannten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Puffer, Antikörper und Oligonukleotide siehe Anhang 1 bis -6.

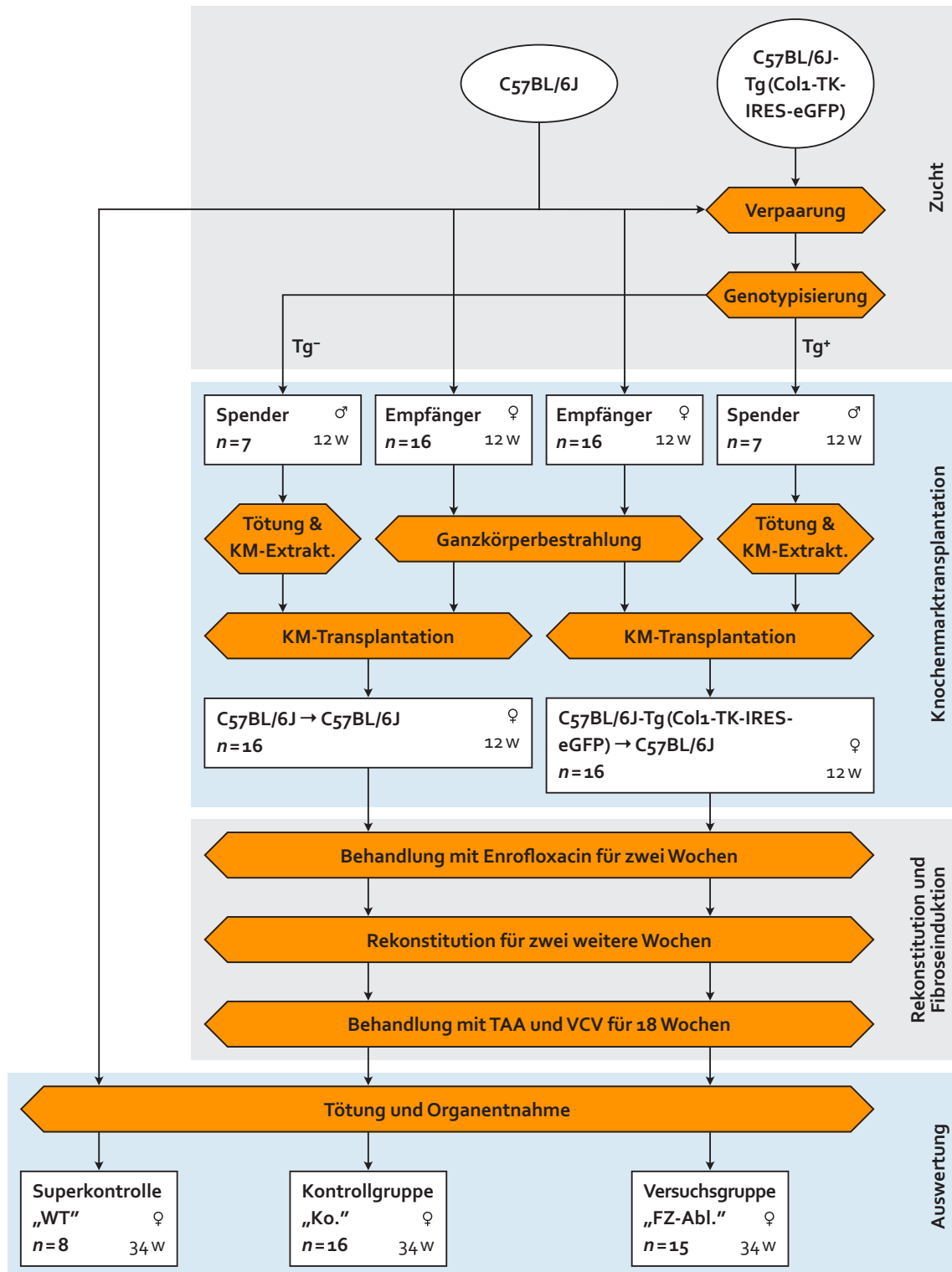
2.1 Mausmodell

Ein Tierversuch wurde für die Prüfung eingangs beschriebener Hypothesen als unerlässlich und in Anbetracht des zu erwartenden Erkenntnisgewinns als ethisch vertretbar angesehen. Das Tierversuchsvorhaben steht im Einklang mit der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere¹⁶⁰ und wurde durch die Tierschutzbeauftragte der Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU Nr. 532_M) sowie das zuständige Regierungspräsidium Gießen (GI20/10 Nr. 21/2016) genehmigt. Im Sinne einer möglichst transparenten Darstellung des durchgeführten Tierversuchs orientiert sich die Arbeit an den international etablierten *ARRIVE*-Richtlinien (siehe Anhang 7).¹⁶¹ Abbildung 7 zeigt schematisch den Versuchsablauf sowie Details zu Zahl, Alter, Geschlecht und genetischem Hintergrund der eingesetzten Tiere.

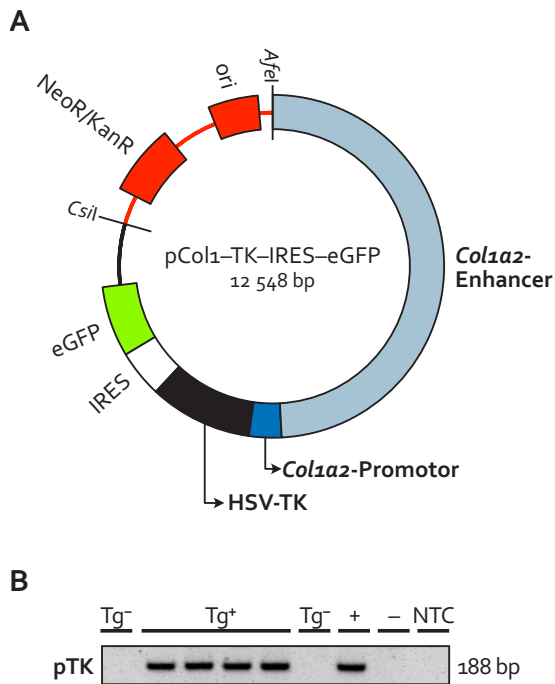
2.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden in Gruppen von zwei bis fünf Mäusen unter den Standardbedingungen der zentralen Versuchstierhaltung der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Es wurde Futter (*Standard Chow*) und Wasser *ad libitum* gestellt. Bei einer Temperatur von 20-24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 45-65 % wurde ein konstanter Tag/Nacht-Rhythmus (14/10 h) gewährleistet. Neben ausreichend Nistmaterial wurde den Mäusen ein Kunststoffhäuschen als Rückzugsmöglichkeit zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen des Tierversuchsvorhabens kamen zwei Mauslinien zum Einsatz. Neben Mäusen des C57BL/6J-Inzuchtstammes (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) standen zu Versuchsbeginn transgene Mäuse des Stammes C57BL/6J-Tg (Col1-TK-IRES-eGFP) aus einer Kooperation mit Prof. Dr. Rajkumar Savai (Justus-Liebig-Universität Gießen, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung) und Prof. Dr. Robert Voswinckel (Justus-Liebig-Universität Gießen, Gesundheitszentrum Wetterau) zur Verfügung. Per Pronukleusinjektion war hier die Integration des in Abbildung 8A gezeigten, ursprünglich von Tian *et al.* beschriebenen, Plasmidvektors in das Genom von C57BL/6-Mäusen erreicht worden, sodass die Mäuse des Stammes die HSV-TK unter Kontrolle eines Kollagen Typ I, $\alpha 2$ (*Col1a2*)-Promotors exprimieren.¹⁵² Das experimentelle Vorgehen unserer Kooperationspartner wurde publiziert.¹⁴⁰



▲ **Abbildung 7 | Schematischer Ablauf des Tierversuchs.** Insgesamt wurden 91 Tiere für den Versuch eingesetzt. Aufgrund eines unklaren, erheblichen Gewichtsverlustes wurde eine Maus der Versuchsgruppe (FZ-Abl.) im Alter von 14 Wochen vorzeitig getötet. *KM-Extrakt.*, Knochenmarkextraktion; *TAA*, Thioacetamid; *Tg⁺*, transgen; *Tg⁻*, nicht-transgen; *VCV*, Valganciclovir.



.....
 ◀ **Abbildung 8 | pCol1a2-TK-IRES-eGFP-Plasmid.** (A) Das schematisch gezeigte Plasmid wurde durch Kooperationspartner bakteriell vervielfältigt, aufgereinigt und linearisiert. Die rot dargestellten Bereiche wurden durch Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen (*CsiI*, *AfeI*) entfernt. Durch Mikroinjektion in den Pronukleus befruchteter Eizellen wurde die Sequenz zufällig in das Genom von C57BL/6J-Mäusen integriert. *Modifiziert aus Vorveröffentlichung*¹⁶², siehe S. 149. (B) Nach Verpaarung mit Wildtyp-Mäusen konnten hemizygoter Tiere (Tg⁺), die als Knochenmarkspender für die Versuchsgruppe dienen, anhand der Expression der in dem Plasmid enthaltenen Thymidinkinase (pTK) identifiziert werden. Nichttransgene Tiere (Tg⁻) wurden als Spender für die Kontrollgruppe herangezogen. DNA-Isolate bekannt transgener Tiere dienten als Positivkontrolle (+), Isolate von Wildtypen als Negativkontrolle (-). Eine exemplarische Gelelektrophorese ist gezeigt. *HSV-TK*, *Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase*; *IRES*, *interne ribosomale Eintrittsstelle*; *eGFP*, *enhanced green fluorescent protein*; *NeoR/KanR*, *Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen*; *ori*, *Replikationsursprung*; *NTC*, *no template control*; *bp*, *Basenpaare*

Es wurden ausschließlich hemizygoter Träger des Vektors als Knochenmarkspender der Versuchsgruppe genutzt (Abbildung 7). Um dies sicherzustellen, wurden transgene Mäuse zunächst mit C57BL/6J-Wildtypen verpaart und anschließend genotypisiert. Dazu wurde DNA aus den Stanzproben, die bei der in der zentralen Versuchstierhaltung routinemäßig durchgeführten Ohrlochung anfallen, isoliert. Die Proben wurden für eine Stunde in je 75 µl Lysepuffer (Anhang 4) auf 95 °C erhitzt, anschließend mit 75 µl Neutralisationspuffer (Anhang 4) versetzt und mit 500 µl Isopropanol (Anhang 3) ausgefällt. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, ein Milliliter Ethanol zugegeben, die Zentrifugation wiederholt und der Überstand erneut abgenommen. Das getrocknete Pellet wurde schließlich in 50 µl Wasser aufgenommen. Mithilfe eines spezifischen Primerpaares (Anhang 6) wurde die im Plasmid enthaltene Thymidinkinase (pTK) in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt und mit einer Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Durchführung der PCR erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *TopTaq DNA Polymerase* Kit (Katalognummer 200205; QIAGEN, Hilden, Deutschland) unter Zugabe von 2,5 µl DNA-Isolat und einem Mikroliter Deoxynukleotidmischung (Katalognummer N0447S; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Die PCR-Produkte der Proben wurden gemeinsam mit einer DNA-Leiter sowie einer bekannt transgenen Kontrolle, einer Wildtypkontrolle und einer *no template control*, in der die DNA-Probe durch Aqua bidest. ersetzt wurde, auf ein 1,5%iges Agarosegel in TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (Anhang 4) aufgetragen. Nach Auftrennung der DNA und Darstellung mit einem Geldokumentationssystem, ließen sich hemizygoter Träger des Transgens anhand der pTK identifizieren. Eine exemplarische Gelelektrophorese ist in Abbildung 8B gezeigt.

2.1.2 Knochenmarktransplantationen

Zahl, Alter, Geschlecht und genetischer Hintergrund der für die Knochenmarktransplantationen herangezogenen Versuchstiere kann Abbildung 7 entnommen werden. Es erfolgten fünf zeitlich versetzte Transplantationen mit jeweils fünf bis neun Empfängertieren. Es wurde hierbei jeweils nach Genotyp des Spenderknochenmarks stratifiziert, nachfolgend erfolgte keine weitere Randomisierung oder Verblindung hinsichtlich der Gruppenzuteilung. Die Spendertiere wurden durch Inhalationsnarkose mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation mit vollständiger Durchtrennung des Rückenmarks im Genick getötet. Es erfolgte die Gewinnung von Knochenmark aus Ober- und Unterschenkelknochen unter sterilen Kautelen. Die Zellen wurden vereinzelt, mithilfe eines Durchflusszytometers (FACSCalibur™) gezählt und durch *magnetic activated cell sorting* um CD3⁺ T-Lymphozyten bereinigt.

Um einen vollständigen Austausch des Knochenmarks zu gewährleisten, erfolgte in Kooperation mit der zentralen Strahlenschutzgruppe der Justus-Liebig-Universität Gießen am Tag der Transplantation eine Ganzkörperbestrahlung der Empfängertiere. Dazu wurden die Versuchstiere in Bestrahlungskäfigen in einem Abstand von 95 cm zu einer ⁶⁰Cobalt-Quelle positioniert und bis zum Erreichen einer Gesamtdosis von 11 Gy bestrahlt. Nach Rücktransport und Akklimatisierung in der zentralen Versuchstierhaltung wurden anschließend mit einer 26 G-Kanüle 5×10^6 Zellen der Spendertiere in 0,1 ml steriler Kochsalzlösung (0,9 %) in die seitliche Schwanzvene der Empfängertiere injiziert. Auf die Knochenmarktransplantation folgte eine Rekonstitutionsphase von 28 Tagen. Aufgrund der besonderen Infektanfälligkeit der Tiere infolge der Bestrahlung wurden sie für die ersten 14 Tage mit dem Breitbandantibiotikum Enrofloxacin behandelt. Durch die Zugabe von 50 mg Enrofloxacin pro Liter Trinkwasser konnte, ausgehend von einer artspezifischen täglichen Trinkmenge von 0,15 ml/g Körpergewicht¹⁶³, die empfohlene Zieldosis von 0,05-0,1 mg Enrofloxacin/g Körpergewicht erreicht werden. Die Lösung wurde in abgedunkelten Trinkgefäßen *ad libitum* angeboten und spätestens alle 48 h erneuert.

2.1.3 Behandlung mit Thioacetamid und Valganciclovir

Im Alter von 16 Wochen wurde die Behandlung mit TAA und VCV begonnen. Beide Substanzen wurden über 18 Wochen dem Trinkwasser zugesetzt. Dazu wurden 300 mg/l TAA und 8,3 mg/l VCV in Leitungswasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend mit Calciumglycerophosphat bei einem pH von 7,3 stabilisiert und steril filtriert. Die Lösung wurde *ad libitum* angeboten und zweimal pro Woche erneuert. Erneut ausgehend von einer täglichen Trinkmenge von 0,15 ml/g Körpergewicht wurde so die Aufnahme von 45 µg TAA/g Körpergewicht und 1,245 µg VCV/g Körpergewicht pro Tag provoziert.

2.1.4 Tötung und Organentnahme

Am Ende der 34. Lebenswoche erfolgte die Tötung der Versuchstiere wie oben beschrieben. Das Abdomen wurde per Laparotomie eröffnet und das Retroperitoneum zügig freipräpariert. Die untere Hohlvene wurde kanüliert und das gewonnene Blut in ein Reagiergefäß überführt. Nach

erfolgreicher Blutgerinnung bei Raumtemperatur wurde das Serum aliquotiert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ asserviert. In der Zwischenzeit wurde die Leber freipräpariert, vollständig entnommen und gewogen. Ein Teil des rechten Leberlappens wurde abgesetzt und zur histologischen Aufarbeitung (siehe Kapitel 2.3) fixiert. Die restliche Leber sowie weitere Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die gefrorenen Leberproben wurden anschließend für die weitere Verwendung homogenisiert und zerkleinert. Dazu wurden Mörser, Pistill und Löffel auf Trockeneis gekühlt. Anschließend wurden die Leberproben in flüssigem Stickstoff mit dem Pistill zu einem homogenen, feinen Pulver zerstoßen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung erneut bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2 Klinische Chemie

Die Konzentration der ALT im Serum wurde mithilfe des *Reflotron® Plus*-Systems bestimmt. Dieses basiert auf einer reflektionsphotometrisch quantifizierten Nachweisreaktion spezifischer Enzyme auf proprietären Teststreifen. Nach erfolgreicher Systemprüfung wurden die Serumproben gemäß der Herstellerangaben auf Raumtemperatur gebracht, auf die Teststreifen appliziert, in das Analysegerät gegeben und die Ergebnisse dokumentiert.

2.3 Histologie

Es wurden Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Leberschnitte angefertigt, die anschließend mit konventionellen histologischen Färbungen, immunhistochemischen Methoden und deren digitaler Auswertung untersucht werden konnten.

2.3.1 Probenvorbereitung

Die Leberproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in eine Paraformaldehyd-Lösung (1 %) gegeben, über Nacht ($> 12\text{ h}$) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert und anschließend mittels eines Gewebeeinfiltrationsautomaten entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Rotationsmikrotom wurden Schnitte mit einer Dicke von $3\text{-}5\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Unmittelbar vor der Färbung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 10 min Xylol, 2x 5 min Ethanol 99,6 %, 5 min Ethanol 96 %, 3 min Ethanol 70 %) gefolgt von Leitungswasser deparaffiniert und rehydriert.

2.3.2 Konventionelle Färbungen

Für die Sirius Red/Fast Green-Färbung wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Färbelösung (Anhang 4) inkubiert und anschließend für 45 s in Essigsäure (1 %) differenziert. Hämatoxylin-Eosin- und Masson-Goldner-Färbungen sowie Versilberungen nach Gordon und Sweets wurden nach Standardprotokollen durch das Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

2.3.3 Immunhistochemie

Abhängig von den Empfehlungen des Herstellers des eingesetzten Primärantikörpers und eigenen Vorversuchen wurde zunächst eine Wiederherstellung der Immunreaktivität der durch die Formalinfixierung potenziell veränderten Antigenstrukturen vorgenommen (Antigendemaskierung, *epitope retrieval*). Dazu wurden die Schnitte in Citrat- oder Tris-EDTA-Puffer (Anhang 4) bei 600 W für 10 min in einer Mikrowelle erhitzt (*heat-induced epitope retrieval*). Das jeweilige antikörper-spezifische Vorgehen kann Anhang 5 entnommen werden. Nach Abkühlen und Waschen der Schnitte in *phosphate-buffered saline* (PBS) wurde die Aktivität gewebseigener Peroxidasen mit 15 % Wasserstoffperoxid in PBS blockiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurde zur Minimierung unspezifischer Bindungen für eine Stunde eine 1:1-Mischung aus 2,5 %iger Serumlösung der Spezies des Sekundärantikörpers (*Normal Horse Blockung Solution* bzw. *Normal Goat Blocking Solution*; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) und bovinem Serumalbumin (BSA, 0,1 g/ml) in PBS aufgetragen. Nach erneuten Waschschritten mit PBS wurden die Schnitte mit dem in BSA verdünnten Primärantikörper (Anhang 5) über Nacht (> 12 h) bei 4 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte auf Raumtemperatur gebracht, vier Mal in PBS gewaschen und für eine Stunde mit einem gegen Immunglobulin G der Spezies des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper versetzt. Nach erneutem Waschen in PBS erfolgte die Entwicklung, basierend auf der Enzymkopplung des Sekundärantikörpers mit Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) oder alkalischer Phosphatase (AP), mit entsprechenden Substraten (*DAB Substrate Kit*; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA bzw. *HIGHDEF® red IHC chromogen*; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) gemäß des Herstellerprotokolls. Nach Waschen in Leitungswasser und PBS wurde eine Kernfärbung angeschlossen. Die Schnitte wurden hierzu für 5 min in gebrauchsfertiger Hämatoxylin-Lösung nach Mayer inkubiert und anschließend für weitere 5 min in Leitungswasser gebläut.

2.3.4 Konservierung und Auswertung

Nach Abschluss der jeweiligen Färbungen wurden die Schnitte durch kurze Inkubationen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (bestehend aus Ethanol 96 % und zwei Schritten Isopropanol) und drei Schritten Xylol dehydriert und mit einem Eindeckmittel auf Xylol-Basis (Pertex®, Medite, Burgdorf, Deutschland) und Deckgläsern blasenfrei eingedeckt.

Nach Aushärten des Eindeckmediums wurden die Schnitte unter einem Lichtmikroskop begutachtet. Mit einer am Fototubus des Mikroskops installierten digitalen Spiegelreflexkamera, die mithilfe der Canon EOS Utility Software (Version 2.14; Canon, Tokio, Japan) angesteuert wurde, konnten Bildaufnahmen angefertigt werden.

2.4 Histopathologische Begutachtung

Es wurde eine Einschätzung der hepatischen Fibrose (*Staging*) und Inflammation (*Grading*) durch Dr. Kernt Köhler (Institut für Veterinärpathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) vorgenommen. Dazu wurden ungefärbte, wie im Kapitel 2.3 beschrieben vorbereitete, Schnitte aller

Versuchstiere für die Gruppenzugehörigkeit verblindet an das Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen übergeben. Nach Färbung der Schnitte erfolgte die histopathologische Beurteilung nach Ishak *et al.*⁵⁷ Die zugrunde gelegten Kriterien sind in Tabelle 1 gezeigt.

▼ **Tabelle 1 | Kriterien der histopathologischen Begutachtung.**

Kategorie	Grad	Beschreibung	
Staging	0	Keine Fibrose	
	1	Faservermehrung einiger Portalfelder mit oder ohne kurze Septen	
	2	Faservermehrung der meisten Portalfelder mit oder ohne kurze Septen	
	3	Portale Faservermehrung mit portoportal Septen	
	4	Portale Faservermehrung mit ausgeprägten portoportal oder portozentralen Septen	
	5	Ausgeprägte Septenbildung (portoportal oder portozentral) mit einzelnen Knoten (inkomplette Zirrhose)	
	6	Wahrscheinliche oder definitive Zirrhose	
Grading	Periportale oder periseptale Grenz-zonenhepatitis (sog. Mottenfraßnekrosen)	0	Keine
		1	Fokal, wenige Portalfelder
		2	Fokal, Mehrzahl der Portalfelder
		3	Kontinuierlich um weniger als 50% der Portalfelder
		4	Koninuierlich um über 50% der Portalfelder
	Konfluente Nekrosen	0	Keine
		1	Fokal
		2	Zone 3-Nekrosen, wenige
		3	Zone 3-Nekrosen, zahlreiche
		4	Zone 3- und einzelne portozentrale Brückennekrosen
		5	Zone 3- und multiple portozentrale Brückennekrosen
	Fokale kleinherdige lytische Nekrosen, Apoptosen und fokale Entzündungsherde	0	Keine
		1	Bis 1 Herd pro Gesichtsfeld (10x Objektiv)
2		2 bis 4 Herde pro Gesichtsfeld (10x)	
3		5 bis 10 Herde pro Gesichtsfeld (10x)	
Portale Entzündung	0	Keine	
	1	Gering, wenige oder alle Portalfelder	
	2	Mäßig, wenige oder alle Portalfelder	
	3	Mäßig/ausgeprägt, alle Portalfelder	
	4	Ausgeprägt, alle Portalfelder	

Das histopathologische *Staging* und *Grading* erfolgte nach Ishak *et al.*⁵⁷, Übersetzung nach Tannapfel¹⁶⁴ und Schirmacher *et al.*¹⁶⁵

2.5 Morphometrische Auswertung

Zur objektiven Quantifizierung des fibrotischen Materials beziehungsweise der CD45⁺-Zellen in histologischen Schnitten mehrerer biologischer Replikate wurde eine computergestützte morphometrische Auswertung mittels ImageJ (Version 1.52a) vorgenommen.¹⁶⁶ Dazu wurden *a priori* das experimentelle Vorgehen sowie Ein- und Ausschlusskriterien für Bildaufnahmen definiert und unter standardisierten Bedingungen (Mikroskop- und Kameraeinstellungen, Raumbelichtung) mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Folgende Ausschlusskriterien wurden angewendet:

- Schnittränder oder natürliche Organgrenzen im Bild
- Schnittartefakte jeglicher Art (gefaltete Schnitte, Fixierungsfehler etc.) im Bild
- Fremdkörper (Luftblasen, Haare etc.) im Bild
- Duplikate

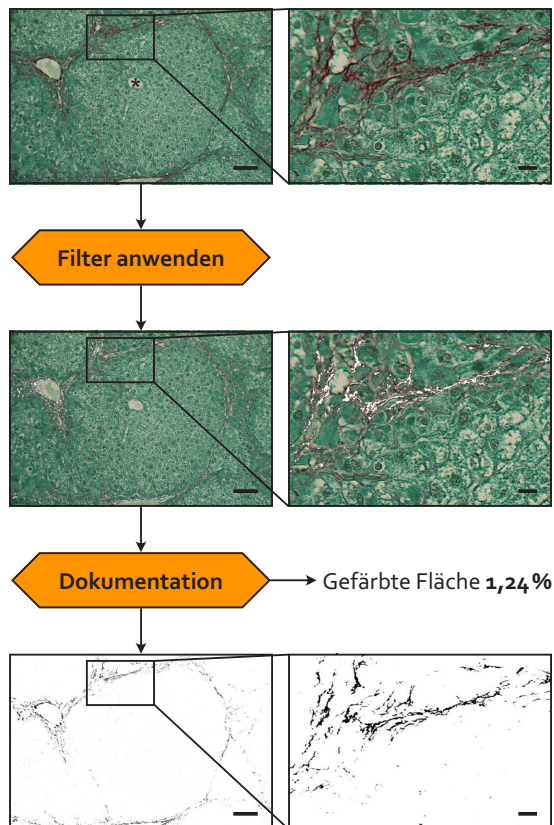
Das jeweilige experimentelle Vorgehen unterschied sich je nach Färbung der zu untersuchenden Schnitte.

2.5.1 Sirius Red/Fast Green-Färbung

Von jeweils zwei Sirius Red/Fast Green-gefärbten Leberschnitten jedes Versuchstieres wurden, wie zuvor beschrieben, lichtmikroskopische Bilder möglichst aller in einem Schnitt erfassten Leberläppchen angefertigt. Dazu wurde in 200-facher Vergrößerung manuell die Zentralvene eines erkennbaren oder aufgrund der umgebenden Anatomie vermuteten Leberläppchens, ungeachtet der umgebenden Strukturen, in der Bildmitte eingestellt und fokussiert. Jedes Leberläppchen wurde einfach fotografiert. Alle Bildaufnahmen wurden durch einen einzigen, für die Gruppenzugehörigkeit des jeweiligen Schnittes verblindeten, Untersucher angefertigt. Nach Anwendung der oben genannten Ausschlusskriterien wurde in den verbleibenden Bildern die rot-gefärbten Fasern, wie in Abbildung 9 exemplarisch gezeigt, mittels eines Farbfilters (*Color Threshold*) spezifisch angewählt. Hierfür wurden im HSB (*hue, saturation, brightness*)-Farbraum Filter gesetzt, sodass Pixel mit einem Farbwert im roten Spektrum (*hue*) und einer gewissen absoluten Helligkeit (*brightness*) die Bedingungen erfüllten. Ausgegeben wurde der prozentuale Anteil der als gefärbt markierten Pixel an der Gesamtfläche. Diese Auswertung erfolgte mit identischen Einstellungen für jede Aufnahme automatisiert mithilfe einer eigens erstellten Befehlsfolge (Makro) in ImageJ. Der vollständige Quelltext des Makros inklusive der Filtereinstellungen findet sich in Anhang 8.

2.5.2 Immunhistochemische Anfärbung von CD45

Für die Bestimmung der Fläche der immunhistochemisch mit einem gegen den Panleukozytenmarker CD45 gerichteten Antikörper angefärbten Bereiche, wurden an einem motorisierten Fluoreszenz-Phasenkontrastmikroskop im Hellfeld-Modus möglichst viele nicht-überlappende Bildaufnahmen – ungeachtet der beobachteten Morphologie – in 200-facher Vergrößerung angefertigt. Nach Anwendung der prädefinierten Ausschlusskriterien wurde erneut ein Makro entwickelt und angewendet. Der Quelltext ist Anhang 9 zu entnehmen.



.....
 ◀ **Abbildung 9 | Exemplarischer Ablauf der morphometrischen Auswertung.** Die Zentralvene (*) eines Leberläppchens wurde in der Bildmitte positioniert und der sich ergebende Bildausschnitt fotografiert. Anschließend wurden die sich in der Sirius Red/Fast Green-Färbung rot darstellenden fibrillären Kollagene über einen Farbfilter in ImageJ angewählt. Der Anteil der so ausgewählten Bereiche (weiß markiert) an der Gesamtfläche wurde für jede Aufnahme dokumentiert. Die binäre, schwarz-weiße Darstellung der als rot-gefärbt identifizierten Bereiche diente der Überwachung und Plausibilitätskontrolle der automatisiert durchgeführten Auswertung. Eine repräsentative Aufnahme ist gezeigt. Vergrößerung 200x, Balken 100 und 20 μm .

2.6 RNA *in situ* Hybridisierung

Boten (engl. *messenger*)-RNA (mRNA)-Transkripte von Kollagen Typ I, $\alpha 1$ (*Coll1a1*) und CD45 (Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C, *Ptpnc*) wurden in histologischen Schnitten mittels des kommerziell erhältlichen *RNAscope*[®] 2.5 *HD Duplex RNA in situ hybridization assay* (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) visualisiert.¹⁶⁷ Für die jeweiligen Transkripte spezifische Gensonden wurden simultan hybridisiert und mit getrennten Farbreaktionen (HRP- und AP-basiert) nachgewiesen. Die Versuchsdurchführung erfolgte mit wenigen Modifikationen unter Einsatz der im Kit enthaltenen Reagenzien und des proprietären Hybridisierungsofens gemäß des Herstellerprotokolls.

Hierbei wurden 5 μm dicke Schnitte, die wie im Kapitel 2.3 beschrieben angefertigt wurden, für eine Stunde auf 60 °C erhitzt, deparaffiniert, rehydriert und getrocknet. Endogene Peroxidasen wurden mit einer Wasserstoffperoxid-Lösung blockiert. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min bei 98 °C auf einer Heizplatte in dem mitgelieferten Puffer erhitzt (*Manual Target Retrieval*), in Aqua bidest. gewaschen und anschließend für 15 min in Ethanol (99,6 %) gegeben. Des Weiteren erfolgte ein Protease-Verdau für 30 min bei 40 °C. Proprietäre Gensonden zur Detektion von *Coll1a1*- (*Mm-Coll1a1*; Katalognummer #319379) und *Ptpnc*-mRNA (*Mm-Ptpnc*; #318651) wurden für 2 h bei 40 °C gebunden. Für Positiv- und Negativkontrollen wurden Gensonden für ubiquitär exprimierte murine Gene (*Mm-Ppib/Mm-Polr2a*; #321651) beziehungsweise ein bakterielles Gen (*dapB*, #320751; alle Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) hybridisiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Schnitte über Nacht in *standard citrate saline* (SSC)-Puffer (fünffach konzentriert) gelagert.

Am darauffolgenden Tag erfolgten die Amplifizierungs- und Detektionsschritte gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Lediglich die Inkubationszeit des vorletzten Schrittes zur Amplifizierung des Signals des HRP-Kanals (*Amp 9*) wurde von 30 auf 60 min ausgedehnt. Es erfolgte eine Kernfärbung in Hämatoxylin-Lösung nach Gill (50 %), anschließend wurden die Schnitte bei 60 °C für circa 25 min getrocknet. Abschließend erfolgte das Eindecken der Schnitte mit einem nicht-wässrigen Eindeckmedium (*VectaMount® Permanent Mounting Medium*; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

2.7 Bestimmung des hepatischen Hydroxyprolinegehalts

Die quantitative Bestimmung der Aminosäure Hydroxyprolin nach Woessner, Stegemann und Stalder in Mäuselebern stellt ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Standardverfahren dar, welches nach einer entsprechenden Standardarbeitsanweisung durchgeführt wird.^{168,169} Die zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung gültige Fassung (Anhang 10) diene als Grundlage der nachfolgend beschriebenen Experimente, wurde in einigen Teilschritten aber modifiziert.

2.7.1 Herstellung eines Aminosäuregemisches

Zunächst wurden die Gewebeprobe durch saure Hydrolyse in ihre Aminosäurebestandteile zerlegt. Dazu wurde Lebergewebe auf Trockeneis mit durch flüssigen Stickstoff gekühlten Instrumenten in Verkochungsröhrchen eingewogen und mit 20 µl/mg Lebergewebe Salzsäure (6 mol/l) versetzt. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur mit einem Dispergierer homogenisiert. Die Röhrchen wurden abgedichtet, verschlossen und über Nacht (> 16 h) bei 110 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Probe mit einer Spritze aufgenommen, durch einen 0,45 µm Polyethersulfon (PES)-Spritzenvorsatzfilter gegeben und zu je 15 µl in zwei neue Reagiergefäße überführt. Alle nachfolgenden Schritte wurden mit diesen Duplikaten durchgeführt. Es wurden 15 µl Methanol zugegeben und die Proben unter Stickstoffbegasung in einem Heizblock bei 50 °C vollständig eingengt. Die Proben wurden anschließend in Isopropanol (50 %) aufgenommen und gemischt. Außerdem wurden eine Standardreihe durch serielle Verdünnung von Hydroxyprolin in Isopropanol (fünf Schritte, 12,8-0,8 µg/ml) und eine Leermessung aus Isopropanol ohne die Zugabe von Hydroxyprolin erstellt und in allen nachfolgenden Versuchsschritten mitgeführt.

2.7.2 Nachweisreaktion

In jedes Reagiergefäß wurden 100 µl frisch angesetzte Chloramin-T-Lösung gegeben. Nach kurzem Vermischen, Vortexen und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 µl ebenfalls frisch angesetzte Ehrlich-Reagenz-Lösung hinzugefügt. Nach erneutem Vortexen wurden die Proben für 60 min bei 50 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis gestellt und in eine Mikrotiterplatte überführt. In einem Platten-Reader wurde photometrisch die Absorption bei 570 nm als Doppelmessung für jede Probe bestimmt.

2.7.3 Auswertung

Die Absorptionen wurden aus der Magellan™ Software (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) exportiert und in Microsoft® Excel (Version 16.44; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) weiterverarbeitet. Nach Abzug der Absorption der Leermessung wurden die bekannten Konzentrationen der Standardkurve sowie die gemessenen Absorptionen zur Basis zehn logarithmiert. Mithilfe der Funktionen *STEIGUNG* und *ACHSENABSCHNITT* erfolgte eine lineare Regression. Anhand der so ermittelten Standardkurve wurden die Hydroxyprolinkonzentrationen für die gemessenen Absorptionen der Proben interpoliert und anschließend auf die Menge des eingesetzten Lebergewebes normalisiert.

2.8 Bestimmung hepatischer Eicosanoide

Die Konzentrationen hepatischer Eicosanoide wurden über eine mit Flüssigchromatographie gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie bestimmt. In dem eingesetzten Versuchsaufbau können hiermit bis zu 44 Derivate der Arachidonsäure mit großer Sensitivität quantitativ in Geweben bestimmt werden. Die Versuchsdurchführung und -auswertung erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Ladislau Kiss und Jens Bier (Zentrum für Innere Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen), das experimentelle Vorgehen wurde publiziert.¹⁷⁰ Die Wiederfindung (*Recovery*) der Analyte wurde analog zu dem dort beschriebenen Vorgehen anhand von Leberproben unbehandelter C57BL/6-Mäuse bestimmt. Anschließend wurden gepoolte Leberhomogenisate der drei experimentellen Gruppen in je drei technischen Replikaten untersucht.

2.9 Western Blot

Hepatische Proteine wurden mittels Western Blot immunologisch nachgewiesen und quantifiziert. Hierzu wurden Gewebelysate hergestellt, Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt und durch Bindung und Visualisierung spezifischer Antikörper dargestellt.

2.9.1 Herstellung von Gewebelysaten

Lebergewebe wurde auf Trockeneis mit durch flüssigen Stickstoff vorgekühlten Instrumenten und Reagiergefäßen eingewogen und mit 40 µl/mg Lebergewebe Lysepuffer nach Lämmli (Anhang 4) versetzt. Anschließend wurde die Suspension bei Raumtemperatur für circa 30 s bis zur sichtbaren Auflösung des Lebergewebes gevortext. Die Proben wurden auf Trockeneis für 10 min eingefroren, bei 95 °C für 15 min aufgekocht und erneut gevortext. Nach Zentrifugation bei 14 000 rpm für 5 min wurde der Überstand aliquotiert in neue Gefäße überführt. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Alternativ wurde ein Radioimmunopräzipitationsassay (RIPA)-Puffer (Anhang 4) zur Lyse des Gewebes eingesetzt und die Proben vor Gebrauch mit vierfach konzentriertem Lysepuffer nach Lämmli versetzt. Ausgehend von einem Verhältnis von 3:1 wurde die jeweilige Menge der mittels RIPA-Puffer lysierten Probe in Folgeexperimenten anhand der Ladekontrolle (α -Tubulin oder β -Aktin) angepasst.

2.9.2 Auftrennung der Proteine

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese diente der Auftrennung des Proteingemisches anhand der Proteingröße. Je nach Molekulargewicht des Zielproteins wurden Lösungen für zehn beziehungsweise 15 %-ige Acrylamidtrenngele (Anhang 4) vorbereitet. Direkt nach der Zugabe des Katalysators Tetramethylethyldiamin sowie des Polymerisationsinitiators Ammoniumperoxidisulfat wurde die Polymerisationslösung in die vorbereitete Gießkammer gegeben und mit Isopropanol bedeckt. Nach 20 min wurde das Isopropanol entfernt und die Polymerisationslösung für das Sammelgel sowie ein Kamm zur Erstellung von Geltaschen hinzugegeben. Nach der vollständigen Polymerisation wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laufpuffer bedeckt. Die Lysate wurden für circa 5 min auf 95 °C erhitzt und gemischt. Mithilfe einer Mikroliterspritze wurden 15-20 µl Gewebelysat sowie 7 µl einer vorgefärbten Proteinleiter in die Taschen des Sammelgels eingebracht. Die Elektrophorese wurde für die gleichzeitige Auftrennung von zwei Gelen mit einer Spannung von 100 V gestartet, nach 10 min wurde diese auf 130 V erhöht.

2.9.3 Proteintransfer

Für den Proteintransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mittels *Semi-Dry-Blotting* wurden Filterpapiere in Transferpuffer getränkt und in der Blotkammer positioniert. Auf diesen wurde eine beschriftete, kurz in Methanol geschwenkte und mit Aqua dest. abgespülte, PVDF-Membran platziert. Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen und vorsichtig aus dem Rahmen gelöst. Das Trenngel wurde von dem Sammelgel getrennt, in Transferpuffer getränkt und anschließend auf der PVDF-Membran positioniert. Zum Abschluss wurden weitere, in Transferpuffer getränkte, Filterpapiere auf das Gel gelegt, Luftblasen entfernt und die Blotkammer verschlossen. Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 60 mA pro Membran für eine Stunde.

2.9.4 Proteinnachweis

Zur Minimierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran im Anschluss auf einem Wippschüttler für eine Stunde mit einer Lösung aus Milchpulver (0,05 g/ml) oder BSA (0,05 g/ml) in einem Puffer aus *TRIS-buffered saline* und Polysorbat 20 (TBS-T, Anhang 4) versetzt. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TBS-T-Puffer gewaschen und über Nacht (> 12 h) bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Details zu den genutzten Antikörpern, deren Verdünnungen sowie das Lösungsmittel (Milch oder BSA) können Anhang 5 entnommen werden. Nach drei Waschvorgängen mit TBS-T-Puffer wurde die Membran für eine Stunde mit einem gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten, HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneuten Waschvorgängen mit TBS-T-Puffer wurde die Membran in die Chemilumineszenz-Entwicklungslösung überführt und die Chemilumineszenzreaktion anschließend mithilfe einer *charge-coupled device*-Kamera visualisiert. Alternativ wurde die Membran in Folie mit einem Röntgenfilm in eine Röntgenkassette gegeben. Die anschließend maschinell entwickelten Röntgenfilme wurden dann mit einem Flachbettscanner digitalisiert.

Zum Nachweis weiterer Proteine auf derselben Membran wurde die Membran anschließend dreimal für je 10 min in TBS-T-Puffer gewaschen und mit einem weiteren Primärantikörper einer anderen Spezies inkubiert. Für die als Ladekontrollen genutzten Primärantikörper (α -Tubulin oder β -Aktin) wurde die Inkubationszeit auf eine Stunde verkürzt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben. Alternativ wurden die gebundenen Antikörper chemisch von der Membran entfernt (*Stripping*). Hierzu wurde die Membran nach dem Waschen für 30 min in *Stripping*-Puffer (Anhang 4) inkubiert. Das weitere Vorgehen war wie zuvor beschrieben, beginnend mit der Blockierung unspezifischer Bindungen.

2.9.5 Auswertung

Die gleichmäßige Beladung der Membran wurde anhand der Darstellung von α -Tubulin oder β -Aktin überprüft. Die Betrachtung des Molekulargewichtes unterstützte die korrekte Darstellung des Zielantigens. Über den ordinalskalierten Vergleich der Proteinexpression von biologischen Replikaten eines Blots hinausgehend wurden densitometrische Analysen vorgenommen, um mehrere Blots einem objektivierte, semiquantitativen Vergleich zuführen zu können. Hierzu wurden in ImageJ die Proteinbanden als Zielregionen (*Regions of Interest*, ROIs) definiert und die mittleren Grauwerte exportiert. Nach Normalisierung auf den durchschnittlichen Grauwert aller Banden einer Membran und Invertierung der Werte wurde der Quotient eines jeden Zielproteins eines biologischen Replikates mit dessen korrespondierender Ladekontrolle gebildet. Da die Intensität der Ladekontrolle von der Beladung der Membran abhängt, kontrolliert die Quotientenbildung diesen Faktor. Unterschiede in der relativen Intensität gegenüber der Ladekontrolle zeigen damit Konzentrationsunterschiede des Zielantigens in den Gewebelysaten an.

2.10 Proteom-Profiling

Zur Untersuchung von inflammatorischen Mediatoren wurde ein kommerzieller *Proteome Profiler*TM Array (*Mouse XL Cytokine Array Kit*, Katalognummer ARY028, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) eingesetzt. Mithilfe vorgefertigter Nitrozellulosemembranen, auf die Antikörper punktförmig im Sinne eines *Dot Blots* aufgebracht sind, konnten 111 Zielantigene simultan untersucht werden.

2.10.1 Lysatherstellung

Ein Lysepuffer, bestehend aus einem Prozent Octoxinol 9 in PBS, wurde hergestellt und eine kommerziell erhältliche Mischung von Proteaseinhibitoren (Anhang 3) nach Angaben des Herstellers hinzugefügt. Lebergewebe wurde unter kontinuierlicher Kühlung durch Trockeneis und flüssigen Stickstoff eingewogen und mit 20 μ l/mg Lebergewebe Lysepuffer versetzt. Die Suspension wurde mit einem Dispergierer homogenisiert, auf Trockeneis eingefroren, aufgetaut und bei 4 °C mit 10 000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung aliquotiert bei -80 °C gelagert.

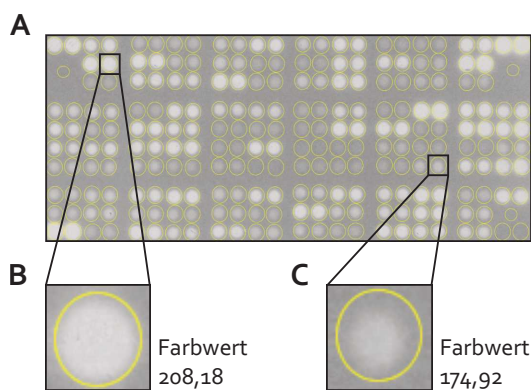
2.10.2 Durchführung und Auswertung

Der Array wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als Proben wurden homogene Pools individueller Gewebelysate von Versuchs- und Kontrollgruppe eingesetzt. Die Entwicklung und Digitalisierung erfolgte mit Röntgenfilmen wie in Kapitel 2.9 beschrieben. Es wurden Filme mit Expositionszeiten zwischen einer und zehn Minuten angefertigt.

Zwei Filme, auf denen die Areale des Antikörperauftrags mittlere Grauwerte ohne Extreme im Sinne voller Schwärzung oder Transparenz zeigten, wurden für die weitere Analyse ausgewählt, als 8-Bit Graustufenbild in ImageJ importiert, zugeschnitten und die Farbwerte invertiert. Für jeden Punkt der Membran, auf dem ein Antikörper aufgebracht war, wurde eine kreisförmige ROI definiert (Abbildung 10). Es wurden außerdem ROIs zur Erfassung des Hintergrunds erstellt. Die durchschnittlichen Farbwerte aller ROIs wurden bestimmt und in Microsoft Excel importiert. Nachfolgend wurden für beide Filme die mittleren Farbwerte der jeweils zwei einem Antigen duplikat (Analyt_x) zugeordneten ROIs gemittelt und die Signalintensitäten (Norm. Signal), relativ zu dem ROI-Paar mit dem geringsten (Analyt_{\min}) und höchsten (Analyt_{\max}) mittleren Farbwert, auf einen Wert zwischen 0 und 100 normiert:

$$\text{Norm. Signal}(\text{Analyt}_x) [\%] = \frac{\overline{\text{Farbwerte}}(\text{Analyt}_x) - \overline{\text{Farbwerte}}(\text{Analyt}_{\min})}{\overline{\text{Farbwerte}}(\text{Analyt}_{\max})} \times 100$$

Zuletzt wurden die normierten Signale der zwei analysierten Filme jeweils gemittelt.

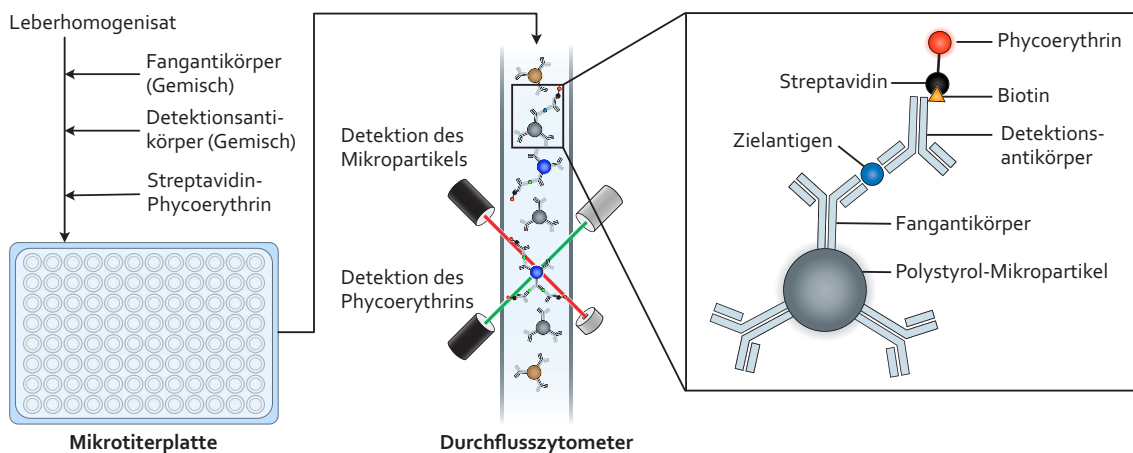


.....
 ◀ **Abbildung 10 | Densitometrische Auswertung der Proteome Profiler™ Arrays.** (A) In ImageJ wurden Zielregionen (*regions of interest*, ROIs; gelb eingezeichnet) in den Arealen des Antikörperauftrags und zur Hintergrunderfassung definiert und der durchschnittliche Farbwert für jede ROI bestimmt. *Modifiziert aus Vorveröffentlichung*¹⁶², siehe S. 149. (B-C) Auf der 8-Bit Farbskala kann jeder Pixel einen Farbwert zwischen 0 und 255 annehmen. Aufgrund der vorgenommenen Umkehrung heller und dunkler Bildareale (Invertierung) ist der mittlere Farbwert im vorliegenden Fall proportional zu der Größe und Intensität des Dots der jeweiligen ROI auf der ursprünglichen Membran.

2.11 Multiplex-ELISA

Für die gleichzeitige Konzentrationsbestimmung verschiedener MMPs, deren spezifischer Inhibitoren und inflammatorischer Zytokine in Leberhomogenisaten wurden proprietäre, kommerziell erhältliche Multiplex-enzyme-linked immunosorbent assays (Multiplex-ELISAs, *Magnetic Luminescence® Assays*) eingesetzt. Neben der schnellen Versuchsdurchführung mussten so nur geringe Mengen Lebergewebe eingesetzt werden, um die absoluten Konzentrationen mehrerer Zielantigene

zu bestimmen. Die Assays basieren auf vorgefertigten magnetischen Polystyrol-Mikropartikeln, die analytenspezifische Primärantikörper (Fangantikörper) gebunden haben (Abbildung 11). Nachdem diese an die jeweiligen Antigene der Probe gebunden haben, werden biotinylierte Antikörper gegen das gleiche Antigen zugegeben (Detektionsantikörper, *Sandwich-ELISA-Prinzip*) an welche das Chromophor Phycoerythrin über konjugiertes Streptavidin bindet. In der Durchflusszytometrie werden die entstehenden Komplexe dann vereinzelt und zeitgleich durch zwei Laserbasierte Detektionssysteme untersucht: Der erste Laser regt mit einer Wellenlänge von 635 nm den im Polystyrol-Mikropartikel enthaltenen Farbstoff an. Anhand der von einer Avalanche-Photodiode erfassten Lichtemission können die Mikropartikel unterschieden und der Komplex einem Analyt zugeordnet werden. Ein zweiter Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm regt parallel das Phycoerythrin an. Ein Photomultiplier mit einer Detektionsbandbreite von 565-585 nm erfasst die Intensität des emittierten Lichts, die proportional zur Menge des gebundenen Antigens ist.



▲ **Abbildung 11 | Prinzip des *Magnetic Luminex*® Assays.** In einer Mikrotiterplatte werden neben einer Standardreihe Leberhomogenisate nach Herstellerangaben mit Fangantikörpern, biotinylierten Detektionsantikörpern sowie einem Streptavidin-Phycoerythrin-Reportersystem versetzt. In einem geeigneten Durchflusszytometer werden die Mikropartikel-Antikörper-Antigen-Komplexe (Bildausschnitt rechts) vereinzelt und mit zwei Laserbasierten Detektionssystemen untersucht (Bildmitte). Es wird die Färbung des jeweiligen Mikropartikels analysiert, um den gebundenen Fangantikörper zu identifizieren. Zeitgleich wird der Reporter Phycoerythrin und damit die Menge des gebundenen Antigens quantifiziert. Im vorliegenden Experiment wurden über farbkodierte Mikropartikel bis zu sieben Analyte parallel untersucht, es wurden jeweils mindestens 50 Komplexe durchflusszytometrisch analysiert. *Eigene Darstellung nach Herstellerinformationen (<https://www.rndsystems.com/resources/technical/luminex-assay-principle>, zuletzt abgerufen am 10.07.2023).*

Individuell zusammengestellte *Mouse Magnetic Luminex*® Assays (Katalognummer LXSAMSM; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) für die Analyte MMP-2, -8, -9, -12, TIMP-1, -4 und Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 sowie CXCL1, TNF, IFN- γ , IL-1 β , -6 und -10 wurden gemäß des oben dargestellten Versuchsprinzips nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden die in Kapitel 2.10 beschriebenen Gewebelysate im Verdünnungsverhältnis 1:2 eingesetzt. Außerdem wurde eine Verdünnungsreihe der im Kit enthaltenen Antigen-Mischung angelegt. Die Analyse

per Durchflusszytometrie erfolgte in Kooperation mit dem Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (Direktor Prof. Dr. Gregor Bein), das freundlicherweise ein Luminex® 200™ Durchflusszytometer bereitstellte. Wartung, Kalibrierung und Analyseeinstellungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden mindestens 50 Mikropartikel-Antikörper-Antigen-Komplexe pro Analyt untersucht. Die Interpolation der Konzentrationen anhand der Standardkurve erfolgte in der xPONENT® Software (Version 3.1; Luminex Corporation, Austin, TX, USA) über eine 5-Parameter logistische Regression.

2.12 Quantitative *real time* Polymerasekettenreaktion

Mit der quantitativen *real time* Polymerasekettenreaktion (qPCR) können schnell und sensitiv mRNA-Transkripte, beziehungsweise komplementäre DNA-Transkripte, nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber stellen etablierte Verfahren der Arbeitsgruppe dar und sind in einer entsprechenden Standardarbeitsanweisung beschrieben. Die zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung gültige Fassung (Anhang 11) und die *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*-Richtlinien dienten als Grundlage für die im Folgenden beschriebenen Experimente.¹⁷¹

2.12.1 RNA-Isolierung aus Lebergewebe

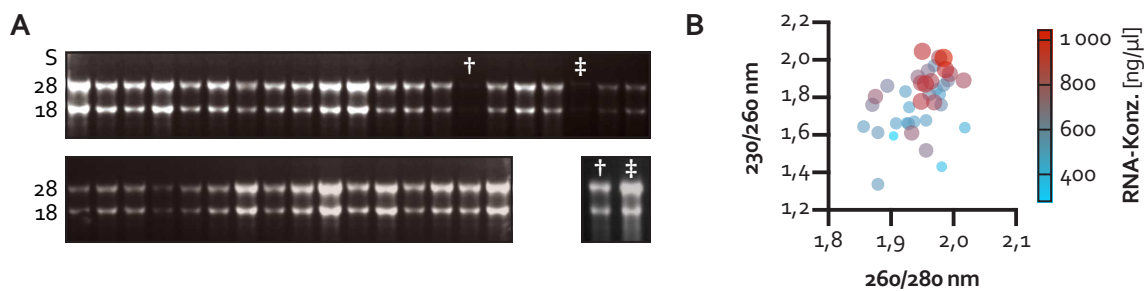
Die Extraktion von RNA wurde an einem separaten, nicht für RNA-nachweisende Experimente genutzten, Arbeitsplatz nach sorgfältiger Reinigung aller Flächen und Instrumente mit Dekontaminationslösung zur Elimination von RNAsen durchgeführt. Es wurde das Kit *RNEasy® Mini* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) eingesetzt. Basierend auf der Lyse durch Guanidiniumthiocyanat und RNA-Bindung einer Siliziumdioxid-Membransäule werden hiermit teilselektiv Ribonukleinsäuren mit mehr als 200 Nukleotiden isoliert und so mRNA gegenüber anderen RNA-Molekülen relativ angereichert.

Durchführung

Unter ständiger Kühlung durch Trockeneis und flüssigen Stickstoff wurde bis zu 30 mg Lebergewebe eingewogen, mit 600 µl Lysepuffer versetzt und mit einem Dispergierer homogenisiert. Die weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll *Purification of Total RNA from Animal Tissues* des Herstellers unter Einsatz des *QIAshredder Kits* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die optionale *on-column* DNase-Behandlung zur Minimierung der Kontamination genomischer DNA mit dem *RNAse free DNase Set* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurde gemäß des Herstellerprotokolls ergänzt. Die gebundene RNA wurden im finalen Schritt mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Nachdem Kontrollen ohne reverse Transkriptase (siehe unten) in Vorversuchen eine weiterhin bestehende Kontamination mit genomischer DNA zeigten, wurde die gewonnene RNA zusätzlich nach Herstellerangaben mit dem *TURBO DNase™ Kit* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) behandelt.

Qualitätssicherung und Konzentrationsbestimmung

Zunächst wurde das Vorhandensein und die Integrität von RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese geprüft (Abbildung 12A). Hierzu wurden 1,8 g Agarose in 138,75 ml Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Puffer (Anhang 4) aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Es wurden 11,25 ml Formaldehyd zugegeben und die Lösung in die Gießvorrichtung gegeben. Jeweils einem Mikroliter RNA wurden 4 µl mit Ethidiumbromid versetzter Formaldehyd-Ladepuffer zugegeben und für 10 min auf 65 °C erhitzt. Nach Aushärten des Gels wurden die Proben vollständig aufgetragen, bei 130 V für 40 min aufgetrennt und anschließend in einem Geldokumentationssystem unter UV-Licht dargestellt. Für zwei Proben war hierbei kein Signal detektiert worden. Nach erneuter RNA-Isolierung beziehungsweise erneutem Auftrag ließen sich für alle inkludierten Subjekte gut abgrenzbare Banden, korrespondierend mit den 18 S- und 28 S-Untereinheiten ribosomaler RNA, nachweisen. Nachfolgend wurden die RNA-Konzentrationen spektralphotometrisch bestimmt. Außerdem wurden die Quotienten der Extinktionen bei Wellenlängen von 230 und 260 sowie 260 und 280 nm bestimmt, um Rückschlüsse auf mögliche Kontaminationen der Proben zu erhalten. Die Messwerte der final eingesetzten RNA sind in Abbildung 12B dargestellt.



▲ **Abbildung 12 | Prüfung der RNA-Integrität und -Konzentration.** (A) In der Agarose-Gelelektrophorese ließen sich Banden der 18S und 28S-Untereinheit ribosomaler RNA abgrenzen, ein Indiz für die erfolgreiche Isolierung intakter RNA. In zwei Proben (+, ‡) war kein Signal zu erkennen. Nach erneuter RNA-Isolierung (+) beziehungsweise erneutem Auftrag (‡) konnten in einer wiederholten Gelelektrophorese für beide Proben intakte Banden nachgewiesen werden. (B) Neben dem RNA-Gehalt der Proben wurden die Quotienten der Extinktionen bei Wellenlängen von 230 nm und 260 nm beziehungsweise 260 nm und 280 nm spektralphotometrisch bestimmt. Die Messung wurde zweimal durchgeführt, jeder Punkt repräsentiert ein biologisches Replikat.

2.12.2 Synthese komplementärer DNA

Zur weiteren Verwendung in qPCR-Experimenten wurde zu der isolierten RNA komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) synthetisiert. Dazu wurde das *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte gemäß des Herstellerprotokolls. Es wurde ein Mikrogramm RNA pro 20 µl Reaktionsvolumen zugegeben. Neben individuellen cDNA-Umschreibungen wurde ein homogener Pool aller Proben angefertigt, ein Teil hiervon wurde für spätere Effizienzbestimmungen (siehe unten) ebenfalls in cDNA umgeschrieben. Außerdem wurde hieraus eine Kontrolle, in der die reverse Transkriptase durch Nuklease-freies Wasser ersetzt wurde, erstellt (*reverse transcription control*).

2.12.3 Durchführung der Polymerasekettenreaktion

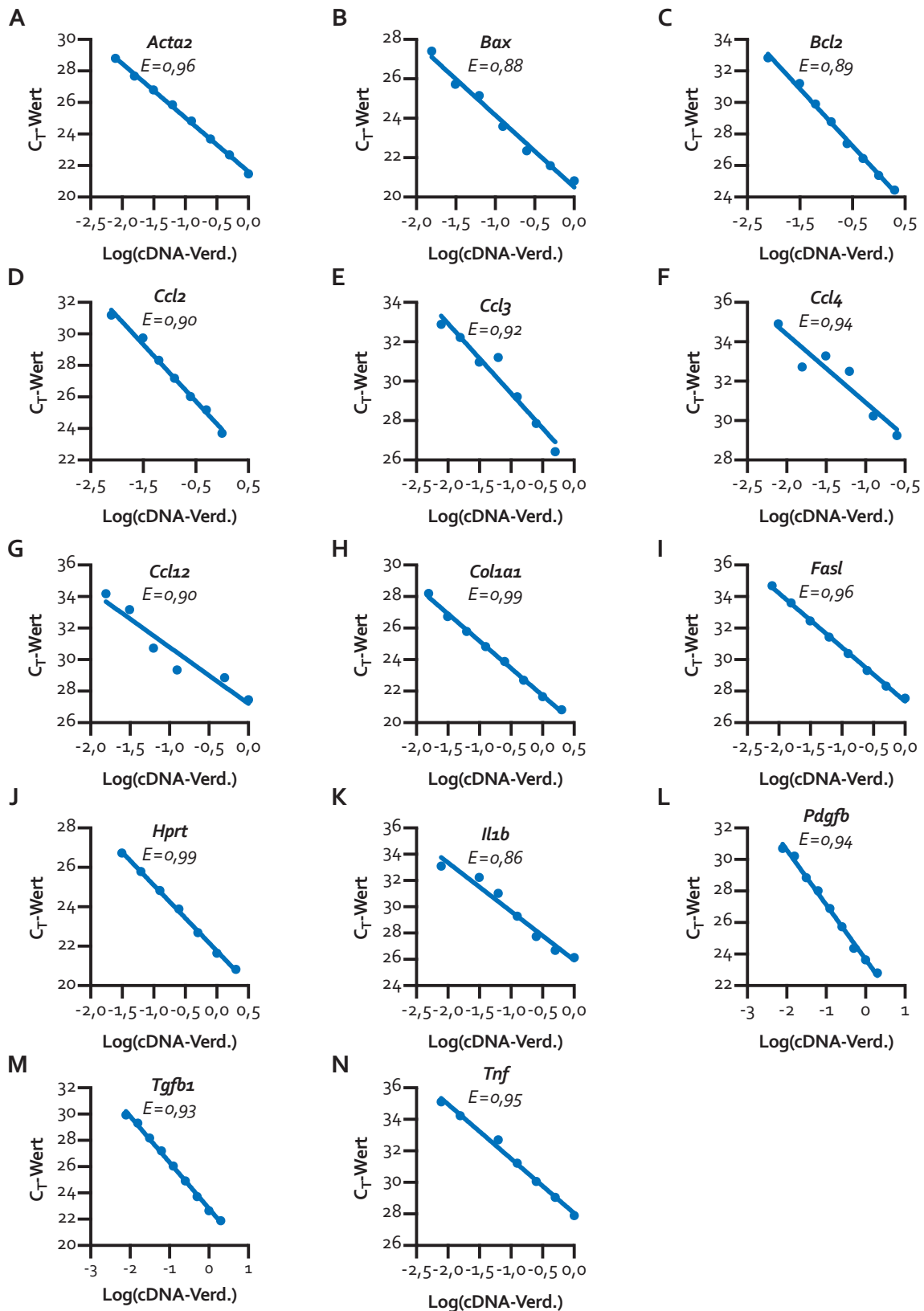
Die Reaktionsansätze für die qPCR wurden an einem separaten Arbeitsplatz nach sorgfältiger Dekontamination von Flächen und Instrumenten auf Eis vorbereitet. Messungen erfolgten immer in Duplikaten (zwei Reaktionsansätze pro Versuchssubjekt). Es wurden jeweils 6,3 µl des kommerziell erhältlichen *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Anhang 3), 5,2 µl Aqua bidest., 0,5 µl cDNA, 0,25 µl *forward* Primer und 0,25 µl *reverse* Primer in einem Reagiergefäß eingesetzt. Die Sequenzen der als Primer verwendeten Oligonukleotide können Anhang 6 entnommen werden. Neben der *reverse transcription control* zur Kontrolle genomischer DNA-Kontaminationen wurde stets eine *no template control* mitgeführt, in welcher cDNA durch Aqua bidest. ersetzt wurde, um Verunreinigungen in der Vorbereitung der Reaktionsansätze zu detektieren. Zur Amplifizierung und Messung wurden die Reagiergefäße kurz zentrifugiert und in ein *StepOne-Plus™* qPCR-Gerät gegeben. Nach einer 10-minütigen Initiationsphase bei 95 °C wurde die cDNA über 40 Zyklen (10 s Denaturierung bei 95 °C, 60 s *Annealing*, 10 s Elongation bei 72 °C) amplifiziert und in jedem Zyklus das Fluoreszenzsignal erfasst. Die primerspezifischen *Annealing*-Temperaturen sind in Anhang 6 aufgeführt. Im Anschluss an die Amplifizierung wurde der temperaturabhängige Zerfall der PCR-Produkte bestimmt (Schmelzkurve).

2.12.4 Primervalidierung

Für jedes eingesetzte Primerpaar wurde zunächst die Spezifität *in silico* mittels Primer-BLAST verifiziert.¹⁷² Nachfolgend wurde die experimentell erhaltene Schmelzkurve geprüft: Eine eingipflige Kurve mit einem konzentrierten Maximum an einer von dem spezifischen Amplifikationsprodukt abhängigen Temperatur (meist 75-85 °C) wies auf eine spezifische Amplifikation des gewünschten cDNA-Abschnitts hin. Bei suboptimalen Versuchsbedingungen konnten hybridisierte Primer (engl. *primer dimer*) als zusätzlicher Ausschlag der Schmelzkurve bei deutlich niedrigeren Temperaturen detektiert werden. Beobachtungen dieser Art führten zur Reevaluation der Versuchsbedingungen und Versuchswiederholung mit optimierten Konditionen.

Um valide relative Quantifizierungen vornehmen zu können, ist eine vergleichbare Amplifikationseffizienz der in der Berechnung inkludierten Primerpaare unbedingt erforderlich.¹⁷¹ Unter optimalen Bedingungen beträgt diese 1 (beziehungsweise 100 %) – die Zahl von Genprodukten verdoppelt sich in jedem Zyklus. Da in der Auswertung (siehe unten) keine effizienzkorrigierte Berechnung relativer Unterschiede vorgenommen wird und nicht-ideale Effizienzen oft mit weiteren suboptimalen Versuchsbedingungen korreliert sind, wurde für alle Primerpaare eine solche Effizienz angestrebt. Es wurden die *Cycle of Threshold* (C_T)-Werte (siehe unten) für eine serielle Verdünnungsreihe (0,5 bis 64-fache Verdünnung gegenüber der Ausgangskonzentration) des cDNA-Pools aller beteiligter Versuchstiere in Duplikaten bestimmt und gegen den Logarithmus des Verdünnungsfaktors aufgetragen (Abbildung 13). Aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden (m), die mithilfe der Funktion *STEIGUNG* in Microsoft Excel bestimmt worden war, konnte anschließend mit folgender Formel die Effizienz (E) berechnet werden:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$



▲ **Abbildung 13 | Bestimmung von Primereffizienzen.** (A-N) Es wurde ein homogener Pool von cDNA aller in den qPCR-Experimenten verwendeten Proben angelegt. Anhand einer seriellen Verdünnungsreihe wurden die Effizienzen E der Amplifikation bestimmt. Berechnung siehe Kapitel 2.12.4. Alle Messungen erfolgten in Duplikaten. cDNA, komplementäre DNA; C_T , Cycle of Threshold; qPCR, Quantitative real time Polymerasekettenreaktion.

Die in Abbildung 13 gezeigten Effizienzen stellen die Ergebnisse der Versuchsoptimierungen dar. Es muss bedacht werden, dass diese Bestimmung der Primereffizienz experimentellen Ungenauigkeiten unterworfen ist. Die letztendliche Entscheidung, die Hypothese einer idealen Effizienz anzunehmen oder zu verwerfen, wurde im Einzelfall in der Zusammenschau von Effizienzberechnung, Schmelzkurve, Vorversuchen und gegebenenfalls Produktgelen getroffen.

2.12.5 Validierung von Referenzgenen

Referenzgene (auch *housekeeping genes*) werden in der relativen Quantifizierung von Genexpressionen eingesetzt, um die Differenzen der in den Einzelreaktionen eingesetzten cDNA-Mengen, die beispielsweise durch Ungenauigkeiten der spektralphotometrischen Messung, der Effektivität der einzelnen cDNA-Synthesereaktion oder Pipettierfehler entstehen, zu kontrollieren. Dafür wird ein Transkript benötigt, dessen Konzentration proportional zur cDNA-Konzentration der jeweiligen Probe ist. Die Menge des Transkriptes darf insbesondere nicht durch die experimentellen Eingriffe verändert werden, da dies eine systematisch fehlerhafte Interpretation von Genexpressionen zur Folge hätte.

Es wurde *in silico* mittels *Genevestigator* (Version 7.14; NEBION, Zürich, Schweiz) eine Vorauswahl von in Mausmodellen der hepatischen Fibrose stabil exprimierten Genen getroffen und in der Arbeitsgruppe verfügbare Primerpaare hinzugezogen. Es wurden daraufhin *Actb*, *Gapdh*, *Rpl32* und *Hprt* untersucht. In der paarweisen Korrelationsanalyse mit der Microsoft Excel-basierten Anwendung BestKeeper¹⁷³ zeigte sich, dass keine Kombination dieser Referenzgene einen signifikanten Vorteil gegenüber der Einzelnutzung bot, sodass *Hprt*, welches eine nahezu ideale Amplifikationseffizienz und Schmelzkurve zeigte, als Referenzgen gewählt wurde.

2.12.6 Auswertung

Es erfolgten ausschließlich relative Quantifizierungen der Ausgangskonzentrationen der cDNA-Transkripte. Aufgrund der Zugabe des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR*TM *Green* steigt das gemessene Fluoreszenzsignal proportional zur Amplifikation des PCR-Produktes mit jedem PCR-Zyklus an. An einer willkürlich im Bereich exponentiellen Wachstums der Amplifikationskurve gesetzten Schwelle (engl. *Threshold*), kann für jede Probe die benötigte Zahl von Zyklen (engl. *Cycles*), die zum Erreichen der Schwelle nötig war, abgelesen werden (C_T). Je höher die Ausgangskonzentration in der Probe, desto weniger Zyklen werden zum Erreichen dieser Schwelle benötigt. Der C_T -Wert ist also invers mit der gesuchten Ausgangskonzentration des nachzuweisenden Transkripts korreliert. Hierbei muss die logarithmische Natur der C_T -Werte beachtet werden: Verdoppelt sich das PCR-Produkt in jedem Zyklus, entspricht ein C_T -Unterschied von 1 einer verdoppelten beziehungsweise halbierten Ausgangskonzentration.

Die mithilfe der *Automatic C_T Threshold*-Funktion der StepOneTM Software (Version 2.2.2; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) generierten C_T -Werte wurden exportiert und um nicht-amplifizierte Proben, die unzureichende Signale in der Amplifikations- und Schmelzkurve zeigten, bereinigt. Anschließend wurde auf den cDNA-Gehalt der Probe normalisiert, indem die relative

Konzentration (ΔC_T) des Zielgens gegenüber einem zweifach gemessenen Referenzgen (siehe oben) für jede Probe berechnet wurde:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Referenzgen}) - C_T(\text{Zielgen})$$

Gruppenunterschiede in der relativen Konzentration eines Gens (ΔC_T), die als relative Expression interpretiert werden kann, wurden in statistischen Testungen geprüft. Bei bekannter Effizienz lässt sich die intuitiv schwer zu erfassende, logarithmische Natur der C_T -Werte auflösen, indem – wie beispielsweise von Livak und Schmittgen in der verbreiteten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode propagiert – n-fache Änderungen (engl. *fold-change*) zwischen Gruppen berechnet werden.¹⁷⁴ Dazu wurden die Mittelwertsunterschiede der relativen Konzentrationen (ΔC_T) der Gruppen sowie gegebenenfalls die Grenzen der jeweiligen Konfidenzintervalle zur Basis zwei potenziert.

2.13 High-Troughput Genexpressionsanalyse

Die relativen Konzentrationen Fibrose-assoziiierter Gene wurden außerdem mittels eines kommerziell erhältlichen, qPCR-basierten Arrays (*RT² ProfilerTM PCR Array Mouse Fibrosis*, Katalognummer PAMM-10ZC; QIAGEN, Hilden, Deutschland) bestimmt. Aus den zuvor beschriebenen RNA-Proben wurden homogene Pools für Versuchs- und Kontrollgruppe hergestellt und mit dem *RT² First Strand Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gemäß des Herstellerprotokolls cDNA synthetisiert. Nachfolgend wurde je eine 96-Well Mikrotiterplatte nach Angaben des Herstellers unter Einsatz des *RT² SYBR[®] Green qPCR Mastermix* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) vorbereitet und die C_T -Werte bestimmt. Die Datenanalyse erfolgte mittels des proprietären *RT² Profiler PCR Array Data Analysis* Webportal (Version 3.5; QIAGEN, Hilden, Deutschland). Hieraus wurden n-fache Regulationen exportiert, für negative Regulationen wurde anschließend der absolute Betrag des jeweiligen Kehrwerts berechnet.

2.14 Statistik

Die statistische Vorbereitung und Auswertung des Versuchs wurde von Dr. Jörn Pons-Kühnemann vom Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen begleitet.

Zur Determinierung der Anzahl der eingesetzten Versuchstiere wurde vor Beantragung des Tierversuchsvorhabens die benötigte Stichprobengröße berechnet. Hierzu wurde die *power.t.test*-Funktion in R genutzt.¹⁷⁵ Es wurde für die Auswertung des Hauptzielparameters ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test bei einem Signifikanzniveau α von 0,05 zugrunde gelegt. Die Teststärke wurde mit 80 % definiert, Mittelwertsunterschied und Standardabweichung für Versuchs- und Kontrollgruppe wurden anhand eigener Vorversuche jeweils auf 0,2 geschätzt.¹⁷⁶ Die Gruppe unbehandelter Mäuse (Superkontrolle, WT) geht nicht in die statistische Auswertung ein, sie dient lediglich der Normierung und/oder Plausibilitätskontrolle der in den anderen Gruppen erhobenen Daten. Bei einem berechneten n von 16,71 wurde ein Stichprobenumfang von 16 Tieren pro Gruppe (Abbildung 7) gewählt.

Während der Versuchsdurchführung wurden die Daten mit IBM SPSS Statistics (Version 25; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) und Microsoft Excel verwaltet und organisiert. Um zu prüfen, ob die Bedingungen für den initial geplanten t-Test zur Analyse der Hauptzielparameter hinreichend erfüllt sind, wurden die Verteilungen anhand von Histogrammen und Quantil-Quantil-Diagrammen evaluiert. Da sich keine Anhalte ergaben, eine Normalverteilung der Daten für den primären Zielparameter hepatischer Hydroxyprolinegehalt abzulehnen, wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test angewendet. Für den sekundären Zielparameter, ALT im Serum, konnte nach oben genannten Auswertungen hingegen nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden. Es wurde daher der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test gewählt.

Alle weiteren Analysen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, in einem explorativen Ansatz analog zur Auswertung des primären Zielparameters. Es wurde keine Korrektur für multiples Testen implementiert. Abweichungen hiervon ergaben sich beispielsweise in der Auswertung ordinalskalierteter Daten, hier kam ebenfalls der Mann-Whitney U-Test zum Einsatz. Zur explorativen Auswertung der Gewichtsentwicklung der Versuchstiere im Zeitverlauf kam darüber hinaus ein gemischtes Modell (adjustiert für Messwiederholungen, unter Einsatz der Geisser-Greenhouse Korrektur und Šidáks Post-hoc-Test), vergleichbar mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse, zur Anwendung.

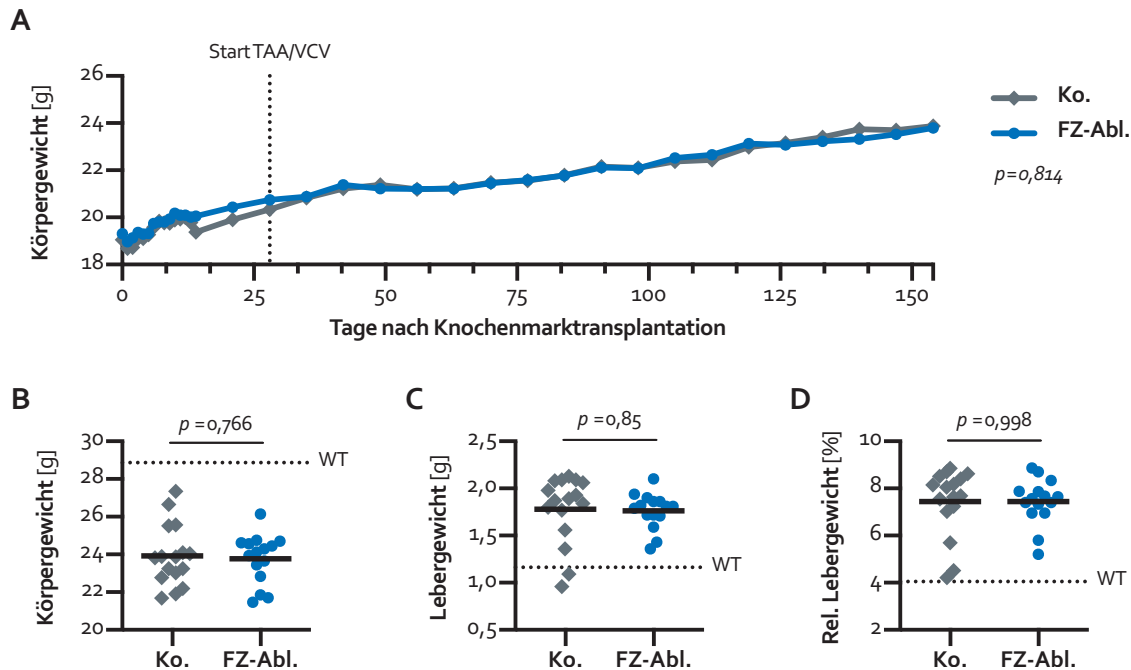
Alle statistischen Tests und Visualisierungen kontinuierlicher Daten wurden mit Prism 9 für macOS (Version 9.0.2; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) ausgeführt. Alle Dezimalzahlen wurden auf zwei, p -Werte auf drei Nachkommastellen gerundet. Wenn nicht anders angegeben, repräsentieren einzelne Symbole biologische Replikate und ein Balken deren arithmetisches Mittel. Lag mehr als ein technisches Replikat vor, wurde stets das arithmetische Mittel gebildet.

3. Ergebnisse

3.1 Beobachtung des Tierversuchs

Das zuvor beschriebene und in Abbildung 7 zusammengefasste Tierversuchsvorhaben wurde durch qualifiziertes und autorisiertes Personal des Zentrums für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie und der zentralen Versuchstierhaltung der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Zur Sicherstellung größtmöglichen Tierwohls erfolgte während der Versuchsdurchführung eine engmaschige Überwachung der Versuchstiere. Im Rahmen dessen kam es zu einem relevanten Zwischenfall: Aufgrund eines unklaren, erheblichen Gewichtsverlustes, der die *a priori* definierten Abbruchkriterien erfüllte, wurde eine Maus der Versuchsgruppe (FZ-Abl.) im Alter von 14 Wochen vorzeitig getötet. Eine anschließende veterinärpathologische Begutachtung des Kadavers erbrachte keine wegweisenden Befunde zu der Ätiologie des Gewichtsverlustes. Nach Abschluss des Tierversuchs standen somit insgesamt 31 Mäuse zur Verfügung, die mit dem fibrogenen TAA und dem Suizidgensubstrat VCV behandelt wurden (Abbildung 7). Hiervon erhielten 16 Tiere eine Transplantation von Knochenmark eines genetisch identischen Tieres (C57BL/6J → C57BL/6J; Kontrollgruppe; Ko.), 15 Tieren wurde transgenes Knochenmark, das das Suizidgen enthielt, mit dem Ziel der Fibrozytenablation transplantiert (C57BL/6J-Tg (Coll1-TK-IRES-eGFP) → C57BL/6J; Versuchsgruppe; FZ-Abl.). Acht gleichaltrige, unbehandelte Wildtypmäuse mit identischem genetischem Hintergrund dienten darüber hinaus als Referenz (Superkontrolle; WT).

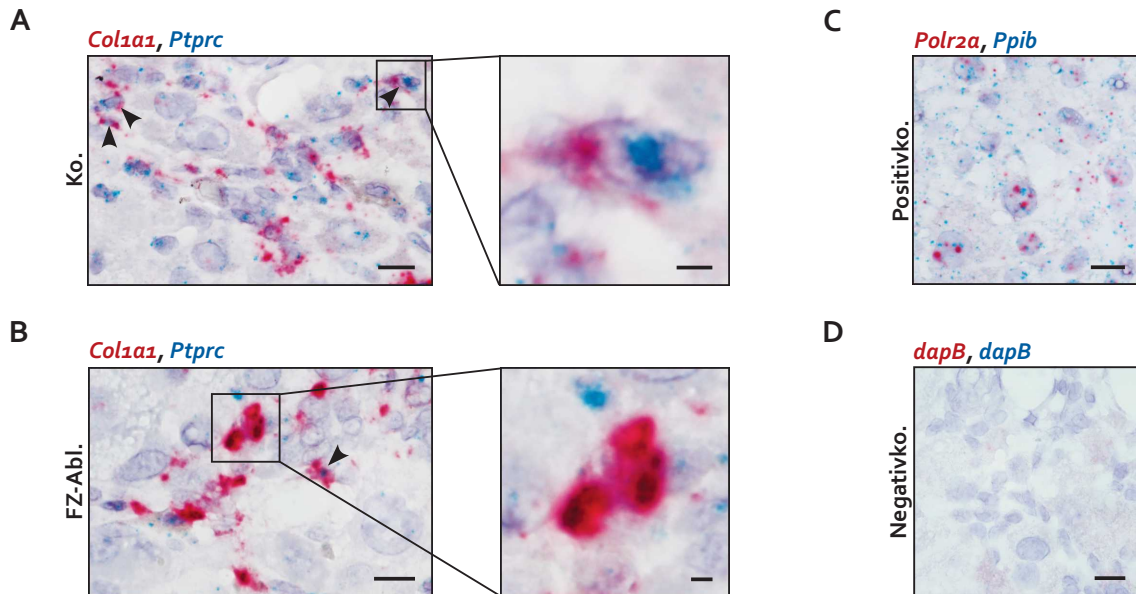
Nach Beendigung der Versuchsdurchführung wurden die Daten der Versuchsbeobachtung herangezogen, um mögliche Rückschlüsse auf die Verträglichkeit und Effektivität des Versuchsaufbaus sowie mögliche Unterschiede infolge der spezifischen Knochenmarktransplantationen zu eruieren. Im Anschluss an die Knochenmarktransplantation im Alter von zwölf Wochen nahmen die Versuchstiere kontinuierlich an Gewicht zu (Abbildung 14A). Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe feststellen ($p = 0,814$). Während das Körpergewicht der unbehandelten Superkontrollen zum Ende des Tierversuchs im Mittel deutlich höher war als das der Versuchs- und Kontrollgruppe, zeigte sich kein signifikanter Mittelwertsunterschied zwischen letzteren Gruppen ($p = 0,766$; Abbildung 14B). Das Lebergewicht unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe ($p = 0,85$), übertraf im Mittel aber jeweils deutlich das Lebergewicht der Superkontrollen (Abbildung 14C). Auffällig erschien die schiefe Verteilung der Werte in Versuchs- und Kontrollgruppe: In beiden Gruppen fanden sich Mäuse, deren Lebergewicht im Bereich der Superkontrollen lag. Es ergaben sich keine abweichenden Befunde nach Normalisierung des Lebergewichts auf das Körpergewicht (Relatives Lebergewicht; $p = 0,998$; Abbildung 14D).



▲ **Abbildung 14 | Biometrische Daten der Versuchstiere.** (A) Das durchschnittliche Körpergewicht von Kontroll- und Versuchsgruppe nahm nach Knochenmarktransplantation stetig zu. Die Rauten und Punkte repräsentieren das jeweilige arithmetische Mittel aller Tiere einer Gruppe für den jeweiligen Zeitpunkt. Gemischtes Modell mit Messwiederholungen, korrigiert nach Geisser-Greenhouse. $n=16$ (Ko.) bzw. $n=15$ (FZ-Abl.). (B) Im Alter von 34 Wochen zeigten Superkontrollen (WT) im Mittel (gepunktete Linie) ein höheres Körpergewicht als TAA-behandelte Tiere der Kontroll- und Versuchsgruppe. Rauten und Punkte repräsentieren biologische Replikate, der Balken zeigt das arithmetische Mittel. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). $n=8$ (WT). Weder (C) das absolute, noch (D) das relativ zum Körpergewicht berechnete Lebergewicht unterschied sich im Alter von 34 Wochen signifikant zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe. Während beide Parameter im Mittel gegenüber den Superkontrollen erhöht waren, fielen in beiden Gruppen Mäuse auf, deren Lebergewicht im Bereich der Superkontrollen lag. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). *Modifiziert aus Vorveröffentlichung*¹⁶², siehe S. 149. TAA, Thioacetamid; VCV, Valganciclovir.

3.2 Visualisierung von *Col1a1*⁺/*Ptprc*⁺-Fibrozyten

Um den Erfolg der Fibrozytenablation zu verifizieren, wurden *Col1a1*- und *Ptprc*-mRNA mittels einer RNA *in situ* Hybridisierung in Leberschnitten visualisiert (Abbildung 15). Überwiegend perivaskulär sowie in den Bereichen fibröser Narbenbildung war eine starke Expression von *Col1a1* in einer Vielzahl von Zellen zu erkennen. Auch *Ptprc* war in fibrösen Septen lokalisiert, darüber hinaus aber auch in Lebersinusoiden nachzuweisen. Fibrozyten, als Kollagen-produzierende Zellen mit Knochenmarksursprung, ließen sich anhand der charakteristischen Koexpression beider Transkripte identifizieren. In Mäusen der Kontrollgruppe zeigten sich hierbei zahlreiche Fibrozyten, die zumeist in periportal Arealen sowie in interportal Septen lokalisiert waren (Abbildung 15A). In der Versuchsgruppe waren Fibrozyten nicht regelhaft nachweisbar (Abbildung 15B). Eine mögliche Koexpression von *Col1a1* und *Ptprc* in einzelnen Zellen und somit das Vorhandensein weniger verbleibender Fibrozyten war jedoch nicht sicher auszuschließen.

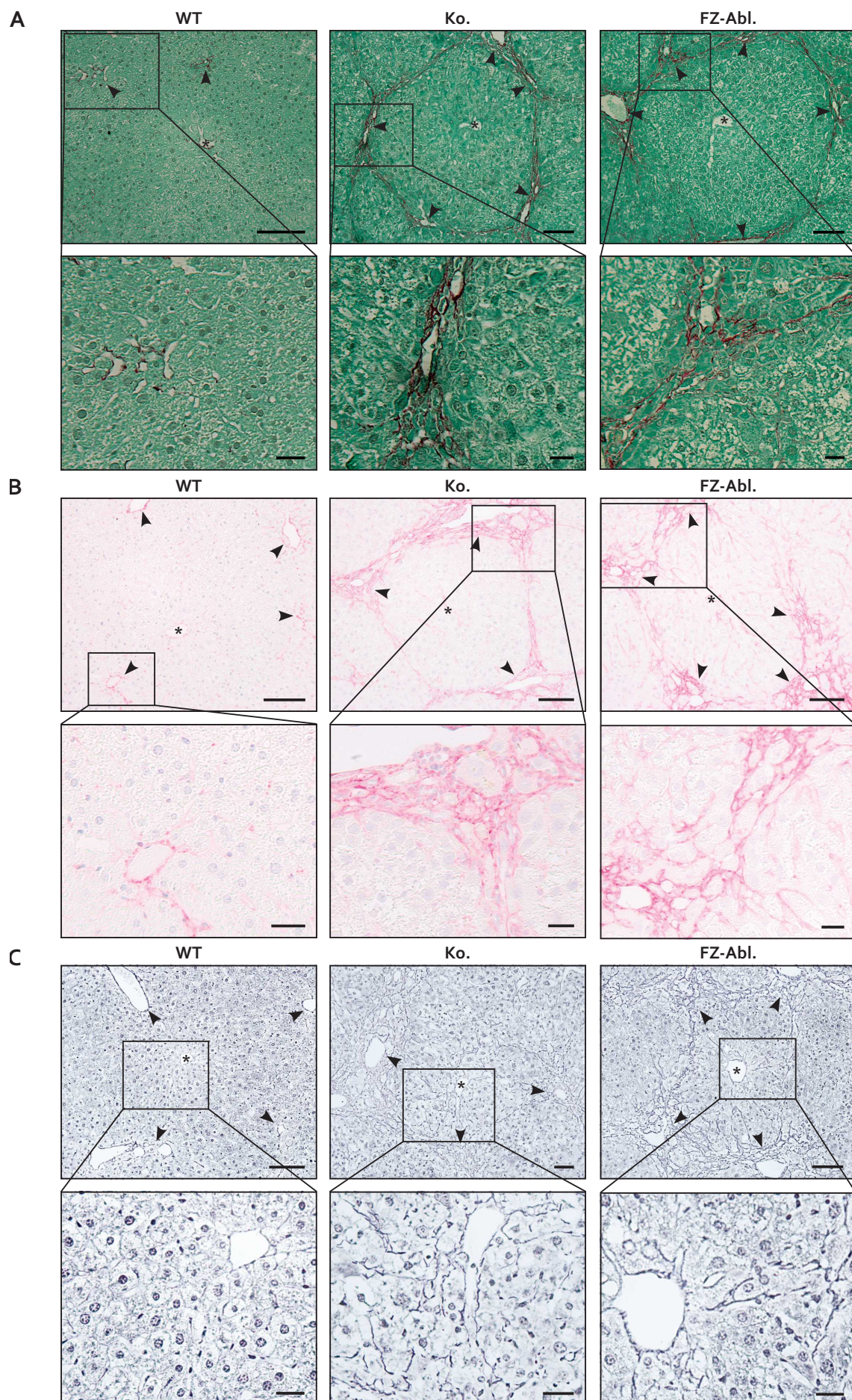


▲ **Abbildung 15 | RNA *in situ* Hybridisierung von *Ptprc* und *Col1a1*.** (A) In Mäusen der Kontrollgruppe ließen sich in portalen Septen zahlreiche Fibrozyten (Pfeilspitzen), definiert durch die simultane Expression von *Col1a1* (rote Punkte) und *Ptprc* (blau-grüne Punkte), abgrenzen. (B) Die Suizidgenstrategie führte zur Ablation von Fibrozyten, Kollagen-produzierende Zellen zeigten keine Koexpression von *Ptprc*. Eine mögliche Koexpression in einzelnen Zellen (Pfeilspitze) konnte jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Es wurden eine (C) Positivkontrolle mit zwei konstitutiv exprimierten Genen sowie (D) eine Negativkontrolle mit einem bakteriellen Gen zur Validierung des Assays angefertigt. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Vergrößerung 1000x, Balken 10 und 2 μm . *Modifiziert aus Vorveröffentlichung*¹⁶², siehe S. 149.

3.3 Hepatische Fibrose

3.3.1 Histologische Beurteilung

Histologische Färbungen ermöglichten, die Morphologie, Verteilung und Menge des fibrotischen Materials in Lebern der Versuchstiere zu untersuchen. Die Sirius Red/Fast Green-Färbung (Abbildung 16A) sowie die immunhistochemische Anfärbung von Kollagen Typ I (Abbildung 16B) zeigten eine Akkumulation von fibrillären Kollagenen in TAA-behandelten Tieren, insbesondere in (peri)portalen Bereichen mit Septenbildung zwischen benachbarten Portalfeldern (portoportales *Bridging*). Superkontrollen zeigten eine regelhafte Leberarchitektur mit geringen Mengen kollagener Fasern, die überwiegend perivaskulär lokalisiert waren. Die Versilberung nach Gordon und Sweets (Abbildung 16C) erlaubte darüber hinaus die Darstellung retikulärer Fasern. Neben den vorgenannten Befunden war hier in geringerem Ausmaß auch eine perisinusoidale Fibrose mit Fasersträngen, die von den Portalfeldern zu der Zentralvene eines Leberläppchens verlaufen (portozentrales *Bridging*), abzugrenzen.



.....
 ▲ **Abbildung 16 | Histologische Darstellung des fibrotischen Lebergewebes.** Fibrilläre Kollagene wurden mittels (A) Sirius Red/Fast Green (rot) und (B) einer immunhistochemischen Anfärbung von Kollagen Typ I (rot) dargestellt. Während die Superkontrolle (WT) eine regelhafte Leberarchitektur zeigte, stellte sich in der Kontroll- sowie der Versuchsgruppe ein fibrotischer Gewebsumbau mit Septenbildung zwischen benachbarten Portalfeldern (Pfeilspitzen) dar. *Modifiziert aus Vorveröffentlichung¹⁶², siehe S. 149.* (C) Die Anfärbung retikulärer Fasern (grau-schwarz) in der Versilberung nach Gordon und Sweets zeigte außerdem eine geringgradige sinusoidale sowie portozentrale Fibrose, gekennzeichnet durch Faserstränge zwischen Portalfeldern und Zentralvene (*). Der untere, vergrößerte Bildausschnitt zeigt jeweils ein exemplarisches Portalfeld. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Vergrößerung 200x, Balken 100 und 25 µm.

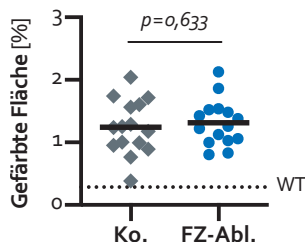
Das Ausmaß der Fibrose wurde auf Grundlage der histologischen Aufarbeitung der Proben zunächst mit verschiedenen Methoden semiquantitativ erfasst. Die Ergebnisse der histopathologischen Beurteilung (*Staging*), basierend auf dem Score nach Ishak *et al.*, sind in Tabelle 2 dargestellt. Um den unterschiedlichen Qualitäten der Fibrose in den Färbungen fibrillärer Kollagene und retikulärer Fasern Rechnung zu tragen, wurde ein jeweils separates *Staging* anhand entsprechender Färbungen vorgenommen. Der Großteil der TAA-behandelten Tiere zeigte eine Fibrose der Grade 3 bis 5, einer deutlichen Fibrose bis beginnenden Zirrhose entsprechend (Tabelle 1). Es ergaben sich in beiden Färbungen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe.

▼ **Tabelle 2 | Ergebnisse des *Staging*.**

	Gruppe	Grad							Median	p
		0	1	2	3	4	5	6		
Fibrilläre Kollagene	WT	3	5	0	0	0	0	0	1	0,476
	Ko.	0	0	0	8	6	2	0	3,5	
	FZ-Abl.	0	0	0	6	5	4	0	4	
Retikuläre Fasern	WT	2	6	0	0	0	0	0	1	0,75
	Ko.	0	0	1	2	6	6	1	4	
	FZ-Abl.	0	0	0	1	7	7	0	4	

.....
 Die Anzahl von Versuchstieren, denen die entsprechende Graduierung in der histopathologischen Begutachtung zugewiesen wurde, ist gezeigt. Qualitative Beschreibungen der Grade sind Tabelle 1 zu entnehmen. Mann-Whitney U-Test. Färbungen: Masson-Goldner (fibrilläre Kollagene) und Versilberung nach Gordon und Sweets (retikuläre Fasern). Die Masson-Goldner Färbung (siehe Anhang 12) zeigt ein Färbeverhalten analog zur Sirius Red/Fast Green-Färbung. *Modifiziert aus Vorveröffentlichung¹⁶², siehe S. 149.*

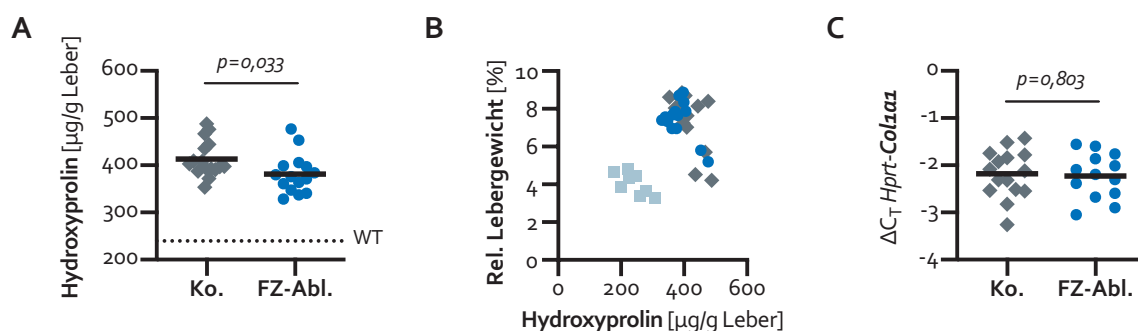
Auch die digitale morphometrische Auswertung der histologischen Schnitte zeigte keinen signifikanten Unterschied der Fläche gefärbter Fasern in der Sirius Red/Fast Green-Färbung zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ($p = 0,633$; Abbildung 17).



◀ **Abbildung 17 | Morphometrische Analyse der fibrotischen Areale.** Die Fläche rot-gefärbter fibrillärer Kollagene in Sirius Red/Fast Green-gefärbten Leberschnitten wurde computergestützt erfasst. Dazu wurden nach vordefinierten Kriterien 1961 Leberläppchen fotografiert. Nach qualitätsbedingten Ausschlüssen konnten 1361 Bilder (2-134 pro Maus) ausgewertet werden. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe. Punkte repräsentieren die mittlere prozentual gefärbte Fläche aller inkludierten Bilder eines biologischen Replikates. $n=7$ (WT). Ungepaarter t-Test (zweiseitig). *Modifiziert aus Vorveröffentlichung*¹⁶², siehe S. 149.

3.3.2 Hepatischer Hydroxyprolinegehalt

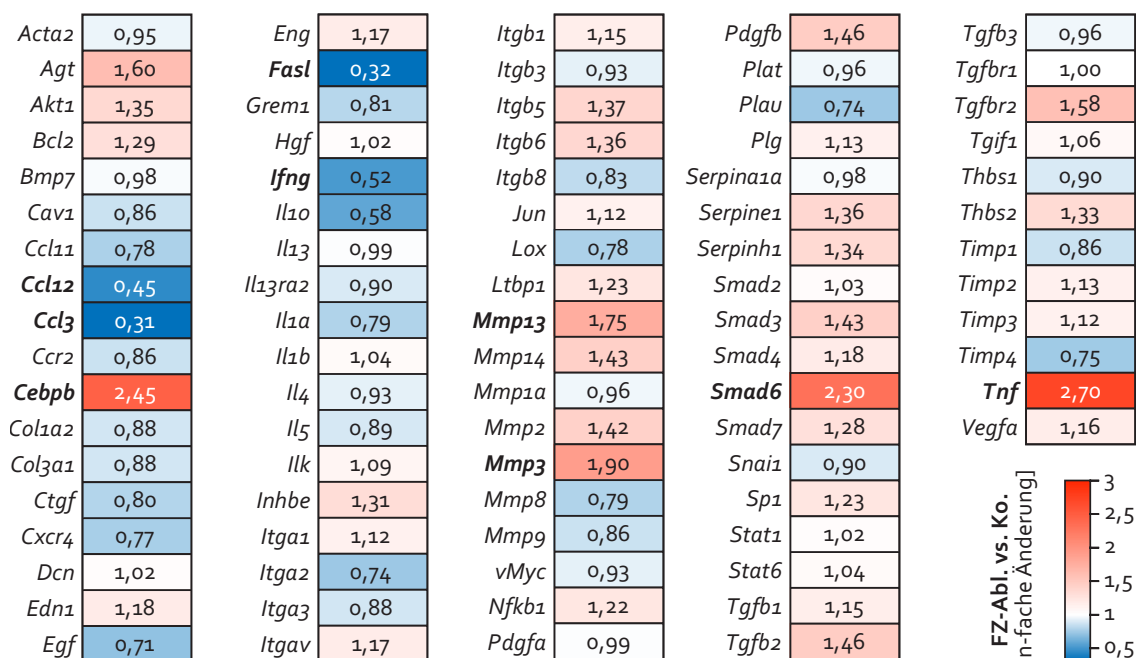
Zentraler Analyseparameter für die Beurteilung der hepatischen Fibrogenese war die quantitative Erfassung von Kollagenen über die Bestimmung des hepatischen Hydroxyprolinegehalts. Dieser zeigte sich in den TAA-behandelten Gruppen gegenüber den Wildtypkontrollen deutlich erhöht (Abbildung 18A). In der Ablationsgruppe war der Hydroxyprolinegehalt gegenüber den Kontrollen statistisch signifikant verringert ($p = 0,033$; $\eta^2 = 0,15$). Die Reduktion betrug im Mittel 7,8 %, das 95 % Konfidenzintervall (95 % KI) überspannte Werte, die einer Reduktion von 0,7 bis 14,8 % entsprechen. Die grafische Auftragung des hepatischen Hydroxyprolinegehalts gegen das relative Lebergewicht (Abbildung 18B) zeigte darüber hinaus, dass die in einigen Versuchstieren beobachteten niedrigen Lebergewichte (siehe oben) nicht mit verringerten Hydroxyprolinwerten, die auf eine fehlgeschlagene Fibroseinduktion hindeuten könnten, einhergingen.



▲ **Abbildung 18 | Quantifizierung des hepatischen Hydroxyprolinegehalts.** (A) Die Bestimmung des hepatischen Hydroxyprolinegehalts zeigte die signifikant verminderte Akkumulation fibrillärer Kollagene infolge der Fibrozytenablation. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, Mittelwerte für jedes biologische Replikat sind gezeigt. $n=8$ (WT). Ungepaarter t-Test (zweiseitig). (B) Das beobachtete niedrige Lebergewicht einiger Versuchstiere war nicht mit einem niedrigen hepatischen Hydroxyprolinegehalt assoziiert. Hellblaue Quadrate repräsentieren Superkontrollen (WT). (C) Die Expression von *Col1a1*, relativ zu dem Referenzgen *Hprt*, war in Versuchs- und Kontrollgruppe vergleichbar. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). *Modifiziert aus Vorveröffentlichung*¹⁶², siehe S. 149. C_T Cycle of Threshold.

3.3.3 Expression Fibrose-assoziiierter Gene

Die hepatische Expression von *Colla1* war in Tieren der Ablationsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe unverändert (0,97-fache Expression; 95 % KI: 0,74- bis 1,26-fach; $p = 0,803$; Abbildung 18C). Zur Beurteilung weiterer Effekte auf transkriptioneller Ebene, wurde ein Panel von 84 Fibrose-assoziierten Genen in einer gepoolten Transkriptionsanalyse untersucht. Abbildung 19 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse. Neben Wachstumsfaktoren, fibrolytischen Mediatoren und inflammatorischen Zytokinen (siehe unten) wurden Gene analysiert, die für strukturelle Bestandteile der EZM kodieren. Die für Kollagen Typ I (*Colla2*) und -III (*Col3a1*; jeweils 0,88-fach exprimiert) sowie das Proteoglykan Decorin (*Dcn*; 1,02-fach exprimiert) kodierenden Gene zeigten keine relevante Regulation in fibrozytenabladierten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe. Auch das Enzym Lysyloxidase (*Lox*; 0,78-fach exprimiert) präsentierte sich auf transkriptioneller Ebene unverändert.

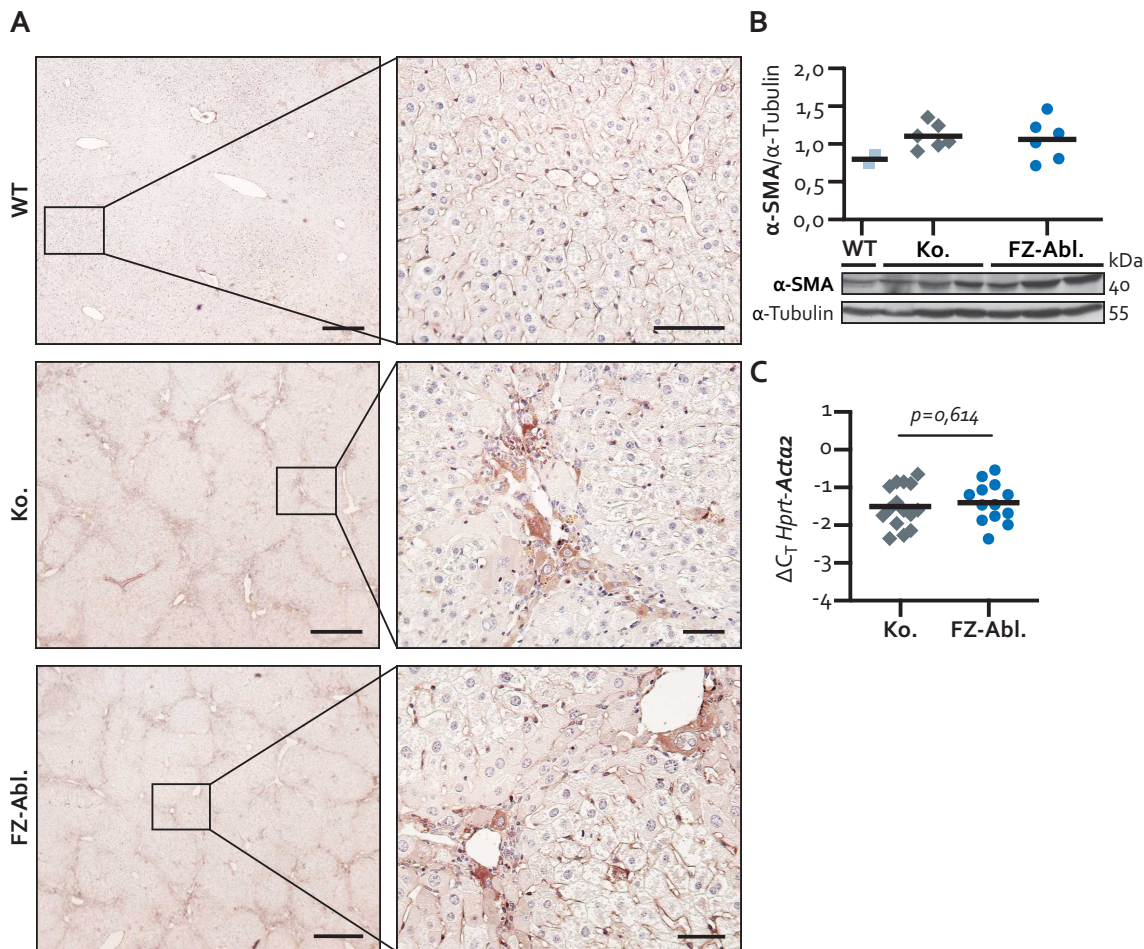


▲ **Abbildung 19 | Gepoolte Transkriptionsanalyse Fibrose-assoziiierter Gene.** Die n -fachen Änderungen der Expression von 84 Zielgenen in der Versuchs- gegenüber der Kontrollgruppe sind gezeigt. Die Intensität der Färbung kodiert für die Hoch- (rot) beziehungsweise Herunterregulation (blau) des Zielgens. Änderungen um den Faktor 1,75 (einer 0,57-fachen Expression entsprechend) und mehr wurden im Kontext der vorliegenden Arbeit als relevant angesehen (fettgedruckte Gensymbole). Gepoolte Proben der Ablations- und Kontrollgruppe (jeweils $n=15$) wurden analysiert, alle Expressionen wurden relativ zu dem Referenzgen *Gusb* bestimmt

3.4 Hepatische Myofibroblasten

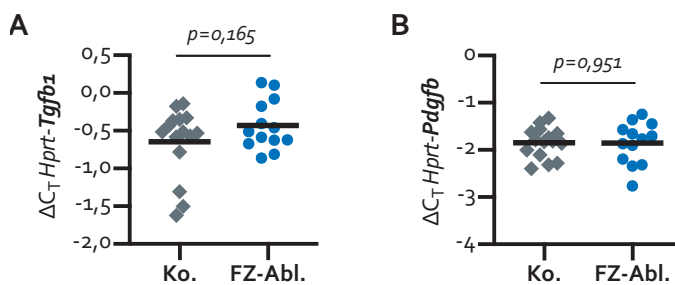
Im Folgenden galt es, neben der weiteren Charakterisierung der durch die Fibrozytenabladiation induzierten Veränderungen, die Ätiologie der verminderten Akkumulation fibrillärer Kollagene zu untersuchen. Zunächst wurde hierzu die hepatische Myofibroblastenpopulation untersucht.

Die immunhistochemische Anfärbung (Abbildung 20A) und eine Western Blot-Analyse (Abbildung 20B) des Myofibroblastenmarkers α -SMA zeigten eine erhöhte Expression in TAA-behandelten Tieren. Es zeigte sich jedoch kein relevanter Unterschied im Vergleich von Versuchs- und Kontrollgruppe. Die immunhistochemische Färbung zeigte darüber hinaus, dass das Verteilungsmuster α -SMA⁺-Myofibroblasten ebenfalls unverändert war. Auch auf transkriptioneller Ebene war die hepatische Expression des für α -SMA kodierenden Gens *Acta2* unverändert (1,08-fache Expression; 95 % KI: 0,8- bis 1,44-fach; $p = 0,614$; Abbildung 20C).



▲ **Abbildung 20 | Hepatische Expression des Myofibroblastenmarkers α -SMA.** (A) Die immunhistochemische Anfärbung von α -SMA (braun) zeigte insbesondere in den Portalfeldern lokalisierte Myofibroblasten in TAA-behandelten Tieren. Die vergrößerten Bildausschnitte zeigen periportale Areale. Repräsentative Färbungen sind gezeigt. Vergrößerung 40x und 200x, Balken 400 und 50 μ m. (B) Western Blots und deren densitometrische Auswertung zeigten die unveränderte Expression von α -SMA in der Versuchs- gegenüber der Kontrollgruppe. Superkontrollen (WT) wiesen eine niedrigere α -SMA-Expression auf. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt, beide Experimente fanden Eingang in die densitometrische Auswertung. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt. (C) Die Expression von *Acta2*, welches für α -SMA kodiert, war in der qPCR in Versuchs- und Kontrollgruppe vergleichbar. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). Modifiziert aus Vorveröffentlichung ¹⁶², siehe S. 149. α -SMA, α -smooth muscle actin; C_T , Cycle of Threshold; qPCR, Quantitative real time Polymerasekettenreaktion.

Zusätzlich wurden zwei für die Aktivierung von Myofibroblasten relevante Wachstumsfaktoren untersucht. Weder die Expression des für TGF- β 1 (*Tgfb1*; 1,16-fach exprimiert; 95 % KI: 0,94- bis 1,45-fach; $p = 0,165$; Abbildung 21A), noch des für PDGF, Untereinheit B (*Pdgfb*; 0,99-fach exprimiert; 95 % KI: 0,81- bis 1,22-fach; $p = 0,951$; Abbildung 21B) kodierenden Gens waren in der qPCR in der Ablationsgruppe signifikant verändert.

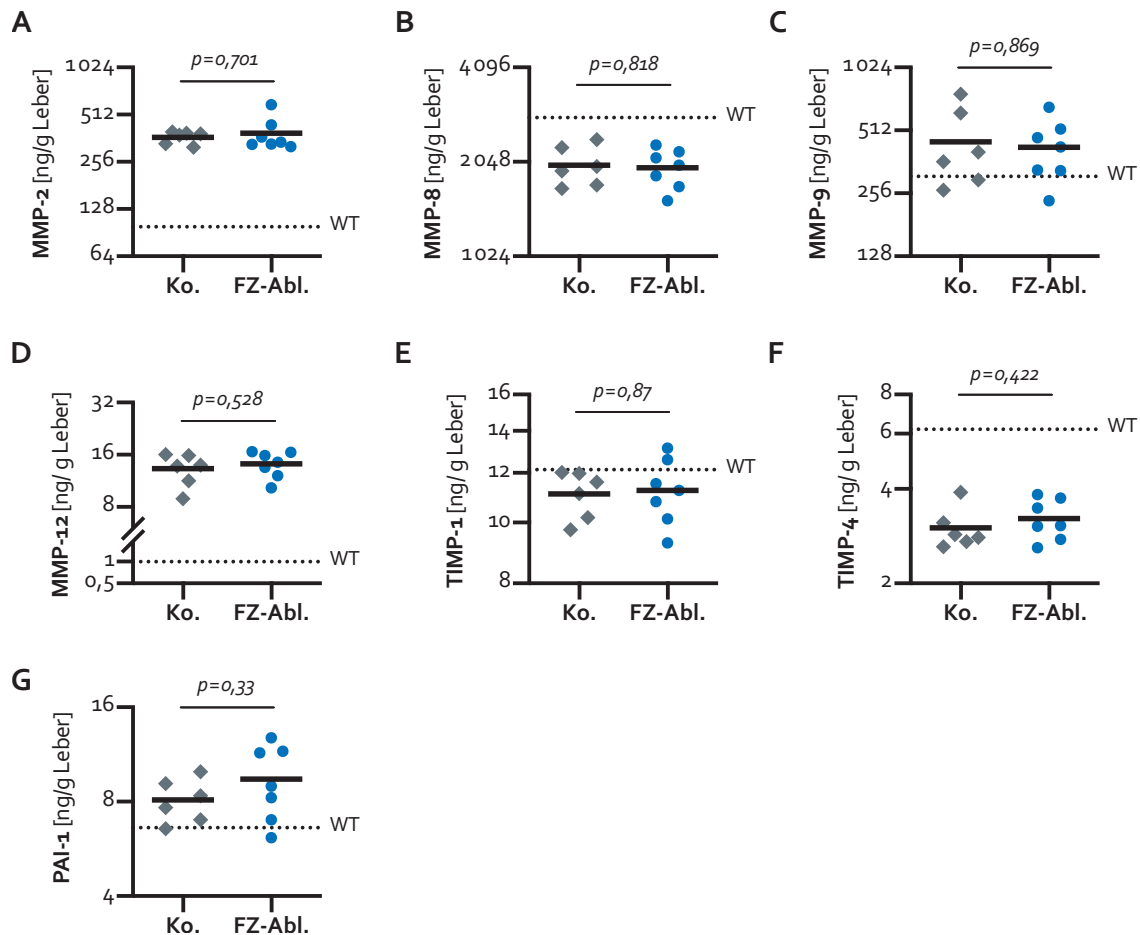


.....
 ◀ **Abbildung 21 | Relative Genexpression von *Tgfb1* und *Pdgfb*.** TGF- β und PDGF aktivieren Myofibroblasten. Die Expression von (A) *Tgfb1* und (B) *Pdgfb* war in der qPCR nicht signifikant verändert. Die Experimente wurden jeweils zweimal durchgeführt. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). Modifiziert aus Vorveröffentlichung¹⁶², siehe S. 149. C_T , Cycle of Threshold; qPCR, Quantitative real time Polymerasekettenreaktion.

In der gepoolten Transkriptionsanalyse (Abbildung 19) zeigten sich ebenfalls keine relevanten Unterschiede in der Expression von *Tgfb1* (1,15-fach exprimiert), *Tgfb2* (1,46-fach exprimiert) und *Tgfb3* (0,96-fach exprimiert) sowie der Rezeptoren *Tgfr1* (1,0-fach exprimiert) und *Tgfr2* (1,58-fach exprimiert). Einzig *Smad6* zeigte sich als an der Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilie beteiligtes Gen deutlich verstärkt (2,3-fach) in fibrozytenabladierten Tieren exprimiert.

3.5 Fibrolytische Mediatoren

Die Komposition der EZM hängt maßgeblich von der Balance pro- und antifibrotischer Einflüsse ab. Daher wurden die zentralen Effektormoleküle der hepatischen Fibrolyse in einem Multiplex-ELISA untersucht. Die hepatischen Konzentrationen von MMP-2, -8, -9 und -12, der spezifischen Gewebsinhibitoren TIMP-1 und -4 sowie des Plasminogenaktivator-Inhibitors 1 waren in der Ablationsgruppe nicht signifikant verändert (Abbildung 22). Die jeweiligen 95 % Konfidenzintervalle der relativen Änderung gegenüber der Kontrollgruppe überspannten Größenordnungen (0,82- bis 1,51-fach), die im Kontext dieser Untersuchung als nicht-relevant angesehen wurden. Eine Ausnahme bildete MMP-9. Hier zeigte sich ein breites Konfidenzintervall, das sowohl eine Reduktion der mittleren Konzentration um circa 50 % als auch eine Steigerung um circa 40 % in der Ablationsgruppe beinhaltete. In der gepoolten Transkriptionsanalyse wurden darüber hinaus auch die Genexpression von *Mmp1a*, *Mmp2*, *Mmp3*, *Mmp8*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Mmp14*, *Timp1*, *Timp2*, *Timp3*, *Timp4*, *Plg*, *Plat*, *Plau* und *Serpine1* untersucht (Abbildung 19). *Mmp9* (1,9-fach) und *Mmp13* (1,75-fach) gehörten zu den am stärksten hochregulierten Transkripten infolge der Fibrozytenablation. Für die weiteren Analyte fanden sich nur geringfügige Regulationen.



▲ **Abbildung 22 | Hepatische Proteinkonzentrationen von MMPs und deren Inhibitoren.** Die Konzentrationen von Schlüsselenzymen der Fibrolyse wurden mittels eines Multiplex-ELISAs (*Magnetic Luminex® Assay*) bestimmt. Die Konzentrationen von (A) MMP-2, (B) MMP-8, (C) MMP-9, (D) MMP-12, (E) TIMP-1, (F) TIMP-4 und (G) PAI-1 zeigten keine signifikanten Mittelwertsunterschiede in fibrozytenablatierten Tieren gegenüber Kontrollen. Die gepunktete Linie zeigt die jeweilige mittlere Konzentration in Superkontrollen (WT; $n=4$). Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). *Modifiziert aus Vorveröffentlichung*¹⁶², siehe S. 149. ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; MMP, Matrix-Metalloproteinase; PAI, Plasminogenaktivator-Inhibitor; TIMP, Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase.

3.6 Hepatische Inflammation

3.6.1 Histologische Beurteilung

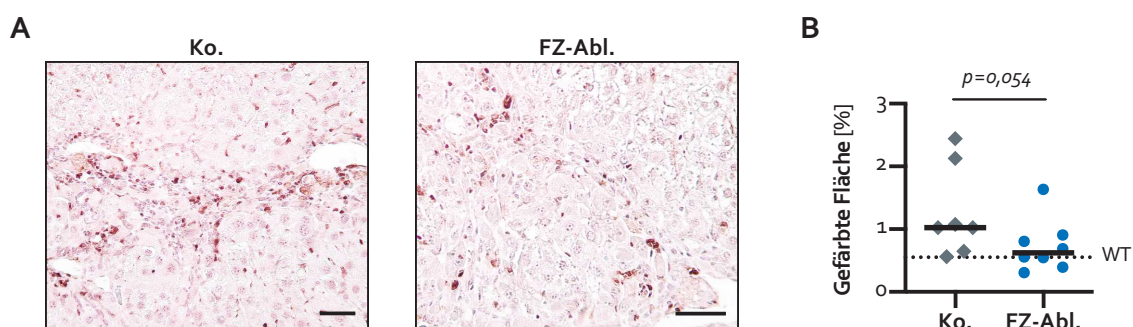
Aufgrund der beschriebenen Immunzeleigenschaften von Fibrozyten wurde die hepatische Inflammation zunächst histologisch in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Leberschnitten durch einen erfahrenen Pathologen anhand des Scoring-Systems nach Ishak *et al.* bewertet (*Grading*). Die Auswertung der Gesamtscores zeigte eine gegenüber den Superkontrollen (Median = 0) gesteigerte inflammatorische Aktivität in TAA-behandelten Tieren (Ko. Median = 5; FZ-Abl. Median = 6). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ($p=0,455$; Mann-Whitney U-Test). Die Ergebnisse der einzelnen Kategorien sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede infolge der Fibrozytenablation.

▼ Tabelle 3 | Ergebnisse des Grading.

Kategorie	Gruppe	Grad							Median	p
		0	1	2	3	4	5	6		
A	WT	6	2	0	0	0	0	0	0	0,218
	Ko.	0	0	1	11	4			3	
	FZ-Abl.	0	0	0	8	7			3	
B	WT	8	0	0	0	0	0	0	0	1
	Ko.	16	0	0	0	0	0	0	0	
	FZ-Abl.	15	0	0	0	0	0	0	0	
C	WT	6	2	0	0	0			0	0,6
	Ko.	3	13	0	0	0			1	
	FZ-Abl.	1	14	0	0	0			1	
D	WT	6	2	0	0	0			0	0,473
	Ko.	8	8	0	0	0			0,5	
	FZ-Abl.	10	5	0	0	0			0	

Das Ausmaß der hepatischen Inflammation wurde für die Qualitäten (A) periportale oder periseptale Grenzzonenhepatitis (sog. Mottenfraßnekrosen), (B) konfluente Nekrosen, (C) fokale kleinherdige lytische Nekrosen, Apoptosen und fokale Entzündungsherde und (D) portale Entzündung graduiert. Es zeigten sich weder für den Gesamtscore, noch für Einzelkategorien signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe. Mann-Whitney U-Test. Qualitative Beschreibungen der Graduierungen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. *Modifiziert aus Vorveröffentlichung*¹⁶², siehe S. 149.

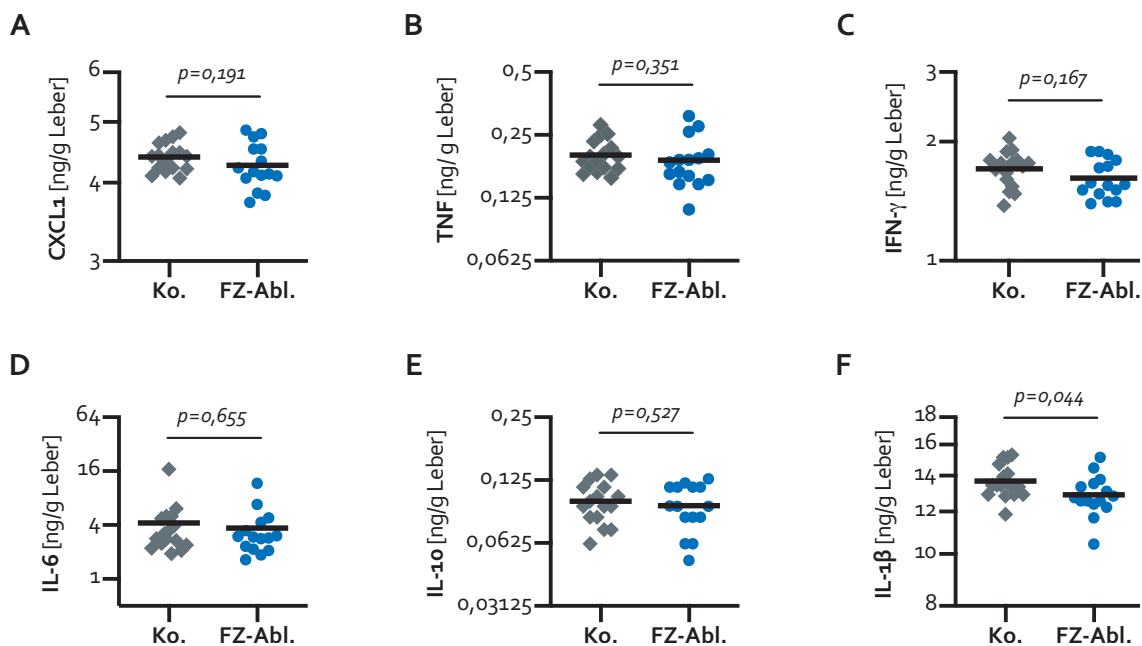
Die immunhistochemische Anfärbung des Panleukozytenmarkers CD45 (Abbildung 23A) ließ eine verminderte Präsenz CD45⁺-Zellen in Schnitten der Ablationsgruppe vermuten. Eine anschließende morphometrische Auswertung (Abbildung 23B) bestätigte die Tendenz, der Mittelwertsunterschied war in dieser Analyse statistisch jedoch nicht signifikant ($p = 0,054$).



▲ **Abbildung 23 | Histologische Darstellung hepatischer Immunzellen.** (A) Die immunhistochemische Anfärbung des Panleukozytenmarkers CD45 (braun-schwarz) zeigte die Anreicherung von Leukozyten in TAA-behandelten Tieren. In der Ablationsgruppe erschien diese visuell vermindert. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Vergrößerung 200x, Balken 50 µm. (B) Die computergestützte morphometrische Analyse ergab eine nicht-signifikante Verminderung der Fläche CD45⁺-Zellen in der Ablationsgruppe. 2-42 Bilder pro Maus, Median=19. Balken zeigen den Median. WT $n=2$. Mann-Whitney U-Test. *Modifiziert aus Vorveröffentlichung*¹⁶², siehe S. 149. CD, Cluster of differentiation; TAA, Thioacetamid.

3.6.2 Inflammatorische Zytokine

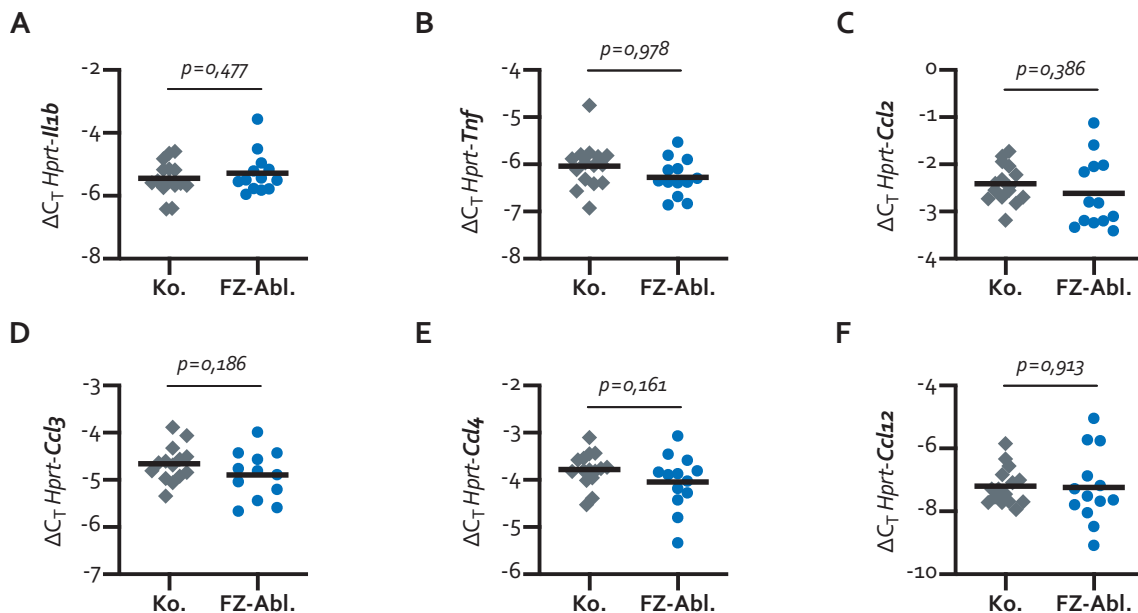
Weiterhin wurde das inflammatorische Milieu auf Protein- und Genexpressionsebene charakterisiert. Die Proteinkonzentrationen der inflammatorischen Zytokine CXCL1, TNF, IFN- γ , sowie IL-6 und -10 waren in fibrozytenabladierten Tieren nicht relevant verändert (Abbildung 24A-E). Die Konzentration von IL-1 β war in dieser Gruppe jedoch signifikant verringert ($-0,93\%$; 95 % KI: $-0,03$ bis $-1,83\%$; $p = 0,044$; Abbildung 24F). In der qPCR zeigte sich eine vergleichbare Expression des für IL-1 β kodierenden Gens *Il1b* in der Versuchs- gegenüber der Kontrollgruppe (1,12-fach exprimiert; 95 % KI: 0,81- bis 1,54-fach; $p = 0,477$; Abbildung 25A).



▲ **Abbildung 24 | Hepatische Konzentrationen inflammatorischer Zytokine.** Die Konzentrationen verschiedener inflammatorischer Mediatoren wurden mittels eines Multiplex-ELISAs (*Magnetic Luminex® Assay*) bestimmt. Die Konzentrationen von (A) CXCL1, (B) TNF, (C) IFN- γ , (D) IL-6 und (E) IL-10 zeigten keine signifikanten Mittelwertunterschiede in fibrozytenabladierten Tieren gegenüber Kontrollen. (F) Die Konzentration von IL-1 β war in fibrozytenabladierten Tieren geringfügig vermindert. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). Modifiziert aus Vorveröffentlichung ¹⁶², siehe S. 149. CXCL, C-X-C-Motif Chemokinligand; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; IFN, Interferon; IL, Interleukin; TNF, Tumornekrosefaktor.

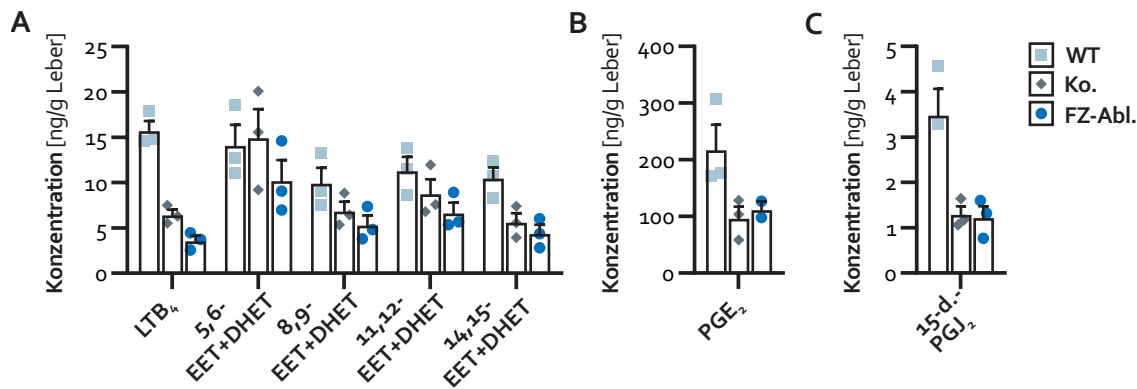
Weiterhin deuteten die Ergebnisse der gepoolten Genexpressionsanalyse (Abbildung 19) auf Veränderungen inflammatorischer Vorgänge infolge der Fibrozytenablation hin. So zeigte sich die Expression der für inflammatorische Zytokine kodierenden Gene *Ccl3* (0,31-fach), *Ccl12* (0,45-fach) und *Ifng* (0,52-fach) in der Versuchsgruppe deutlich vermindert. *Tnf* sowie das für den Transkriptionsfaktor CCAAT/Enhancer-Binding-Protein β kodierende *Cebpb* zeigten sich hingegen verstärkt exprimiert (2,7- und 2,45-fach). Da *Tnf*, *Ccl3* und *Ccl12* zu den am stärksten regulierten Transkripten zählten, wurden diese, sowie zwei weitere Mitglieder der C-C-Motif Chemokin-Familie, *Ccl2* und -4, weiter mittels qPCR untersucht (Abbildung 25B-F). Alle Analyte

zeigten eine im Mittel tendenziell verringerte Konzentration von Transkripten in fibrozytenabladierten Tieren. In keinem der Fälle war der Mittelwertsunterschied statistisch signifikant. Aufgrund der fehlenden Regulation von IFN- γ auf Proteinebene (Abbildung 24C) wurde die Expression von *Ifng* nicht weiter untersucht.



▲ **Abbildung 25 | Relative Genexpression inflammatorischer Mediatoren.** qPCR-Analysen von (A) *Il1b*, (B) *Tnf*, (C) *Ccl2*, (D) *Ccl3*, (E) *Ccl4* und (F) *Ccl12* zeigten keine signifikanten Unterschiede der relativen Genexpression in Tieren der Versuchs- und Kontrollgruppe. Die Experimente wurden jeweils zweimal durchgeführt. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). Modifiziert aus Vorveröffentlichung¹⁶², siehe S. 149. C_T , Cycle of Threshold; qPCR, Quantitative real time Polymerasekettenreaktion.

Aufgrund der bekannten Expression der unter anderem als inflammatorische Botenstoffe fungierenden Cysteinyl-Leukotriene durch Fibrozyten, wurden die hepatischen Konzentrationen verschiedener Eicosanoide bestimmt (Abbildung 26). Cysteinyl-Leukotriene selbst ließen sich in dem genutzten experimentellen Aufbau in Leberhomogenisaten nicht nachweisen. Die Konzentrationen von LTB₄, verschiedenen Isomeren der Epoxyeicosatetraensäure (EET) beziehungsweise Dihydroxyepoxyeicosatetraensäure (DHET), 15-Deoxy- Δ -12,14-Prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) stellten sich in TAA-behandelten Tieren gegenüber den Wildtypkontrollen vermindert dar. In fibrozytenabladierten Tieren war eine Verminderung von EETs und DHETs sowie LTB₄ gegenüber der Kontrollgruppe zu erkennen.

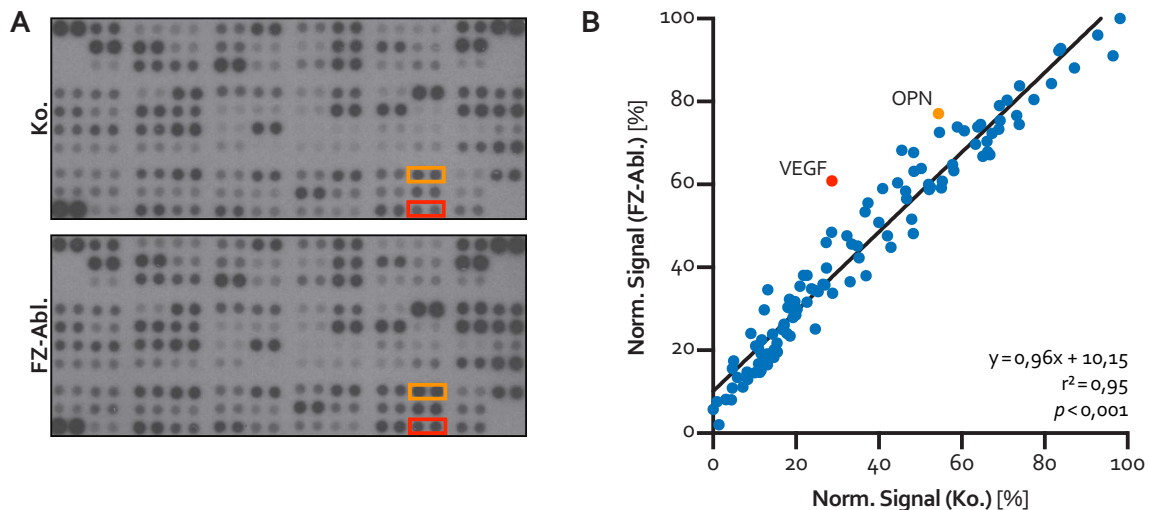


▲ **Abbildung 26 | Konzentrationen hepatischer Eicosanoide.** (A-C) Alle untersuchten Analyte, mit Ausnahme von 5,6-EET+DHET, zeigten eine Reduktion der absoluten Konzentration in Leberhomogenisaten TAA-behandelter Tiere in der Flüssigchromatographie-gekoppelten Tandem-Massenspektrometrie. LTB₄ stellte sich in fibrozytenabladierten Tieren darüber hinaus deutlich vermindert gegenüber der Kontrollgruppe dar. Es wurden gepoolte Proben untersucht, WT (hellblaue Quadrate) $n=8$, Ko. (graue Rauten) $n=15$, FZ-Abl. (dunkelblaue Punkte) $n=15$. Die Symbole repräsentieren einzelne Messungen, Säulen zeigen das arithmetische Mittel und den Standardfehler der Messwiederholungen. Modifiziert aus Vorveröffentlichung ¹⁶², siehe S. 149. 15-d-PG₂, 15-Deoxy- Δ -12,14-Prostaglandin J₂; DHET, Dihydroxyepoxyeicosatetraensäure; EET, Epoxyeicosatetraensäure; LTB₄, Leukotrien B₄; PGE₂, Prostaglandin E₂.

In einem explorativen Ansatz wurden die Konzentrationen weiterer inflammatorischer Zytokine mittels einer Dotblot-Analyse bestimmt (Abbildung 27). In einer vorläufigen Auswertung zeigten sich durchweg erhöhte normierte Signale in der Versuchsgruppe, die auf eine versuchsbedingte, systematische Abweichung hindeuteten. Unter der Annahme, dass sich in einem linearen Modell nicht-regulierte Mediatoren aufgrund des nicht-systematischen experimentellen Fehlers zufällig um eine Regressionsgerade verteilen, wurde eine lineare Regression der normierten Signale durchgeführt. Anhand der erhaltenen Regressionsgeraden ($y = 0,96x + 10,15$; $r^2 = 0,95$; $p < 0,001$) wurden für jeden x-Wert (im vorliegenden Fall normierte Signale der Kontrollgruppe) Erwartungswerte (für die normierten Signale der Versuchsgruppe) berechnet. Abweichungen von diesen Erwartungswerten (*Residuals*) wurden als nicht-versuchsbedingte, biologisch interpretierbare Abweichungen gewertet. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *Osteopontin* (OPN) zeigten die stärksten Regulationen. Beide Analyte wiesen erhöhte hepatische Proteinkonzentrationen in gepoolten Proben fibrozytenabladiertter Tiere auf.

3.7 Leberzellschädigung

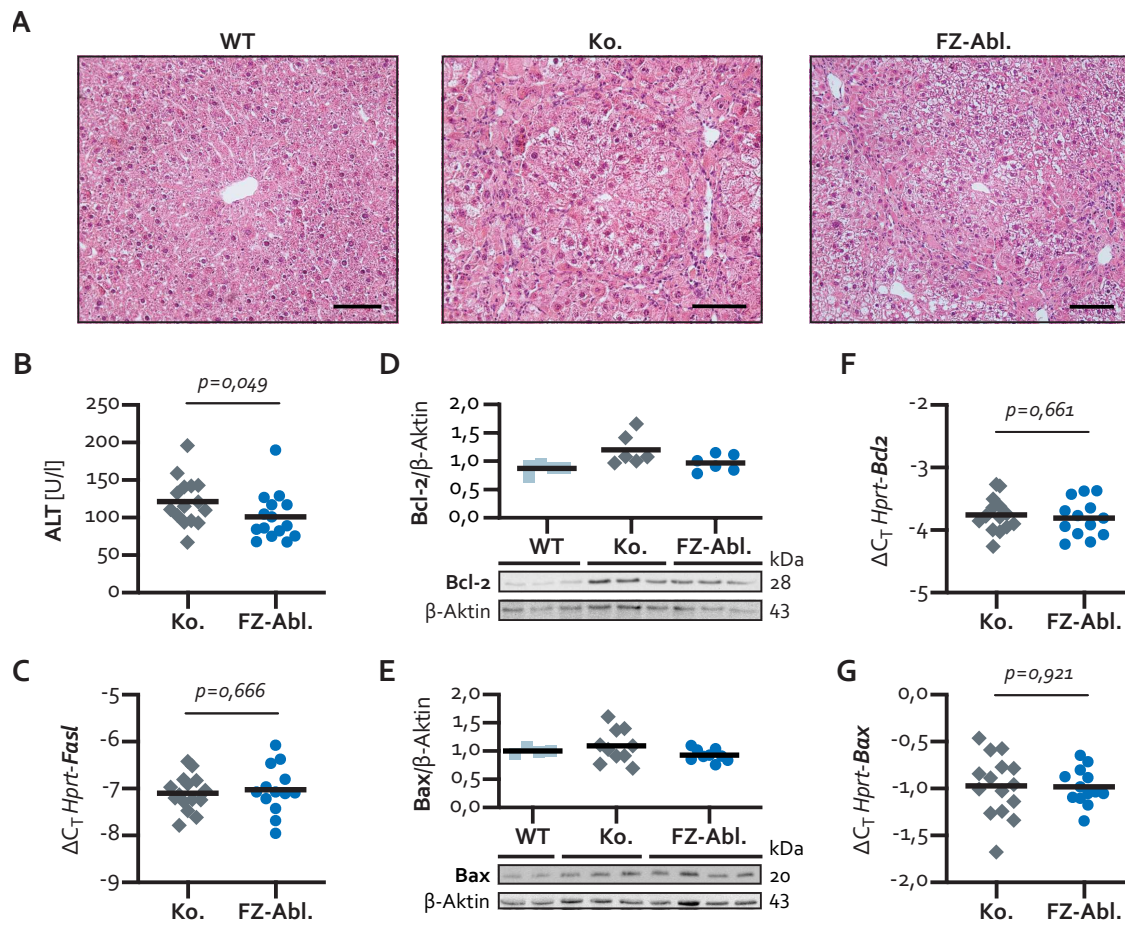
Die Schädigung hepatischer Zellen infolge verschiedener Trigger und Mechanismen stellt einen zentralen pathophysiologischen Mechanismus der Leberfibrose und daher eine wichtige Zielgröße im vorliegenden Experiment dar. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte sich in TAA-behandelten Tieren eine deutliche Disruption der physiologischen Leberarchitektur (Abbildung 28A), gekennzeichnet durch Regeneratknotten, biliäre Hyperplasie sowie den Nachweis von Apoptosen, Megalozyten, Zellverfettungen und Siderophagen. Unbehandelte Superkontrollen zeigten eine regelhafte Leberarchitektur.



▲ **Abbildung 27 | High-Troughput Analyse inflammatorischer Marker.** (A) In einer Dot-Blot Analyse wurden 111 inflammatorische Mediatoren auf Proteinebene untersucht. Gepoolte Proben, Ko. $n = 16$, FZ-Abl. $n = 15$. (B) Die densitometrische Auswertung zeigte eine systematische Abweichung der beiden Gruppen. Daher wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt, Abweichungen einzelner Analyte von der Regressionsgeraden wurden als Konzentrationsunterschiede interpretiert. Die am stärksten regulierten Analyte sind gekennzeichnet und ihre Positionen farblich korrespondierend in (A) markiert. Modifiziert aus Vorveröffentlichung¹⁶², siehe S. 149.

Der zentrale Analyseparameter in Bezug auf die Leberintegrität war die Volumenaktivität der ALT, ein leberspezifisches Enzym, das bei dem Untergang von Hepatozyten in das Blut freigesetzt wird. In der fibrozytenabladierten Gruppe war die ALT im Serum gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert ($-20,9\%$; 95 % KI: $-0,4$ bis $-36,9\%$; $p = 0,049$; Abbildung 28B).

Auf molekularer Ebene deutete die verminderte Expression des für den extrazellulären Todesliganden kodierenden Gens *FasI* in der gepoolten Genexpressionsanalyse (Abbildung 19) weiterhin auf eine Regulation apoptotischer Prozesse infolge der Fibrozytenablation hin. Im Gegensatz dazu ergab sich in der qPCR jedoch kein Hinweis auf eine in der Versuchsgruppe verminderte Expression von *FasI* (1,04-fach exprimiert; 95 % KI: 0,83- bis 1,34-fach; $p = 0,666$; Abbildung 28C). Es wurden abschließend zwei essenzielle Regulatoren der Apoptose, Bcl-2 und Bax, untersucht. Die Proteinkonzentration von Bcl-2 war in Leberhomogenisaten von fibrozytenabladierten Tieren niedriger als in Kontrollmäusen (Abbildung 28D). Bax war in allen untersuchten Mäusen in vergleichbarer Konzentration nachweisbar (Abbildung 28E). Auf transkriptioneller Ebene fand sich weder für *Bcl2* (0,97-fach exprimiert; 95 % KI: 0,83- bis 1,13-fach; $p = 0,661$; Abbildung 28F), noch für *Bax* (0,99-fach exprimiert; 95 % KI: 0,86- bis 1,15-fach; $p = 0,921$; Abbildung 28G) eine veränderte Expression in der Versuchs- gegenüber der Kontrollgruppe.



▲ **Abbildung 28 | Untersuchungen zur Leberzellschädigung.** (A) In der Hämatoxylin-Eosin Übersichtsfärbung zeigte sich eine erhaltene Integrität der Leberarchitektur in unbehandelten Mäusen (WT). Die TAA-Behandlung führte zur Disruption dieser. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Vergrößerung 200x, Balken 100 μ m. (B) Die signifikant verminderte Aktivität der ALT im Serum deutete auf eine verminderte Leberzellschädigung in Mäusen der Versuchsgruppe hin. Rauten und Punkte stellen biologische Replikate dar, der Balken zeigt den Median. Mann-Whitney U-Test. (C) Im Gegensatz zu dem Ergebnis der gepoolten Genexpressionsanalyse, zeigte eine qPCR die gleichmäßige Expression von *Fasl* in Mäusen der Versuchs- und Kontrollgruppe. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). (D) Auf Proteinebene zeigte sich eine erhöhte hepatische Konzentration von Bcl-2 in TAA-behandelten Tieren, die in fibrozytenablatierten Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe verringert war. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt, willkürliche Einheit. (E) Die Expression des Gegenspielers Bax war in allen drei Gruppen vergleichbar. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt, willkürliche Einheit. In der qPCR zeigten sich die Konzentrationen von (F) *Bcl2* und (G) *Bax* relativ zu dem Referenzgen *Hprt* unverändert infolge der Fibrozytenablation. Die Experimente wurden jeweils zweimal durchgeführt. Ungepaarter t-Test (zweiseitig). *Modifiziert aus Vorveröffentlichung* ¹⁶², siehe S. 149. ALT, Alanin-Aminotransferase; C_T , Cycle of Threshold, qPCR, Quantitative real time Polymerasekettenreaktion; TAA, Thioacetamid.

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Forschungshypothese und zeigen erstmals den funktionellen Beitrag von Fibrozyten zur hepatischen Fibrogenese. Im Folgenden soll dieses Ergebnis sowie seine Implikationen im Kontext anderer Arbeiten und translationaler Ansätze diskutiert werden. Angesichts des Pilotcharakters der vorliegenden Arbeit, die erstmals eine Fibrozytenausschaltung im Kontext eines Leberfibrosemodells zeigt, soll ein besonderer Fokus auf die Betrachtung des gewählten Versuchsaufbaus gelegt werden.

4.1 Einsatz des Mausmodells der Thioacetamid-induzierten Leberfibrose

Leberfibrose als gemeinsame pathologische Endstrecke zahlreicher chronischer Erkrankungen mit Leberbeteiligung wurde in der vorliegenden Arbeit durch die kontinuierliche Applikation von TAA im Trinkwasser von C57BL/6-Mäusen modelliert. Zunächst stellt die experimentelle Induktion einer Fibrose eine notwendige Bedingung für die Prüfung der formulierten Forschungshypothese dar. Darüber hinaus sind die damit einhergehenden Belastungen, mögliche Optimierungen und Alternativen von großer Bedeutung für die tierexperimentelle Diskussion des vorliegenden Versuchsaufbaus. Zuletzt zeigen sich die Limitationen des Tiermodells maßgeblich für die externe Validität der Hypothesenprüfung.

4.1.1 Erfolg der Fibroseinduktion

In der vorliegenden Arbeit wurde die erfolgreiche Induktion einer fortgeschrittenen Leberfibrose durch TAA in ausnahmslos allen Versuchstieren nachvollzogen. Insgesamt war das histopathologische Bild der Fibrose mit dem in der Literatur beschriebenen vereinbar. Im Mittel wurde sie als fortgeschrittene Fibrose klassifiziert, zum Teil zeigten Versuchstiere Zeichen beginnender zirrhotischer Umbauprozesse (Tabelle 2).¹⁵⁷ In der Versuchsbeobachtung war initial eine schiefe Verteilung des absoluten und relativen Lebergewichts (Abbildung 14C-D) beobachtet worden, in der die Lebergewichte einzelner Versuchstiere denen der unbehandelten Superkontrollen glichen. Die Bestimmungen des hepatischen Hydroxyprolinegehalts zeigten jedoch gegenüber den Superkontrollen deutlich erhöhte Werte in allen Versuchstieren (Abbildung 18A). Eine fehlgeschlagene Fibroseinduktion kann damit als Ursache des niedrigen Lebergewichts ausgeschlossen werden. Das Auftragen des relativen Lebergewichts gegen die hepatischen Hydroxyprolinwerte zeigte, dass die drei und zwei Tiere der Kontroll- und Versuchsgruppe mit den jeweils niedrigsten relativen Lebergewichten ein abgrenzbares Cluster bilden, das durch einen hohen hepatischen Hydroxyprolinegehalt gekennzeichnet ist (Abbildung 18B). Der Zusammenhang von Lebergewicht und Hydroxyprolinegehalt kann in der Versuchstierpopulation damit als kurvilinear beschrieben werden: Das Lebergewicht steigt mit ansteigendem Hydroxyprolinegehalt zunächst an und fällt nahe dem Maximum wieder ab. Dies steht im Einklang mit der klinischen Erfahrung aus Patientinnen und Patienten mit chronischen Lebererkrankungen. Hier präsentieren sich frühe und mittlere Stadien regelhaft mit unverändertem oder erhöhtem Lebervolumen (Hepatomegalie),

während eine Leberzirrhose als Spätstadium zumeist mit einem kleinen, kontrakten Organ einhergeht.¹² Es kann daher die Vermutung angestellt werden, dass das Cluster mit niedrigem Lebergewicht in der vorliegenden Arbeit eine Subpopulation darstellt, die eine besonders fortgeschrittene Lebererkrankung aufweist. Auf der einen Seite spricht dies für die Abbildung des Spektrums chronischer Lebererkrankungen im Menschen durch das TAA-Mausmodell. Auf der anderen Seite muss beachtet werden, dass eine Heterogenität hinsichtlich des Fortschritts der Lebererkrankung in der Versuchstierpopulation die Varianz der Merkmalsausprägungen erhöht. Dies beeinflusst die Teststärke statistischer Tests und stellt eine potenzielle Moderatorvariable für den Einfluss der Fibrozytenausschaltung auf die hepatische Fibrose dar. Gegen eine relevante Heterogenität innerhalb der Versuchstierpopulation spricht, dass das Fibrosestadium der Versuchstiere mit niedrigem Lebergewicht in der histopathologischen Beurteilung nicht gegenüber den restlichen Versuchstieren erhöht war (Median = 3 und 4 für die Färbung fibrillärer Kollagene und retikulärer Fasern, vergleiche Tabelle 2).

4.1.2 Verträglichkeit

Die Beobachtungsdaten aus dem Tierversuch deuten auf gute Verträglichkeit und geringe Belastung der Versuchstiere hin. Im Gegensatz zu anderen verbreiteten Fibrosemodellen sind für das Modell der peroralen TAA-Gabe keine belastenden Eingriffe zur Induktion der Schädigung notwendig wie etwa die wiederholten intraperitonealen Injektionen von CCl₄ oder BDL. Es zeigte sich eine konstante Gewichtszunahme, auch unter der TAA-Administration (Abbildung 14A), und eine Mortalität von 0 % während der TAA-Gabe. Eine Tumorentwicklung, wie sie für schwere Ausprägungen der chronischen Exposition gegenüber TAA beschrieben worden war¹⁵⁴, wurde in der vorliegenden Arbeit weder makroskopisch noch in der histopathologischen Begutachtung nachgewiesen.

4.1.3 Limitationen

Naturgemäß kann ein Mausmodell der Leberfibrose die komplexe Pathologie chronischer Lebererkrankungen des Menschen nur unvollständig abbilden. Zum einen bestehen generelle Einschränkungen, die unabhängig von der Wahl des schädigenden Agens die Übertragbarkeit von Beobachtungen aus Mausmodellen auf humane Pathologien erschweren. Zum anderen können die verschiedenen verfügbaren Modelle mit ihren spezifischen Vor- und Nachteilen nur in ihrer Gesamtheit die Heterogenität menschlicher Lebererkrankungen erfassen.

Die Zeitspanne bis zur Ausbildung einer fortgeschrittenen Fibrose ist im Mausmodell, auch relativ zur durchschnittlichen Lebenserwartung der Maus, bedeutend kürzer als der humane Krankheitsverlauf. Während dieser in aller Regel Jahre bis Jahrzehnte umfasst, gelingt die Fibroseinduktion im Mausmodell innerhalb von Tagen bis Wochen. Das in der vorliegenden Arbeit gewählte Vorgehen der TAA-gestützten Fibroseinduktion über 18 Wochen stellt eines der langfristigen etablierten Modelle dar.^{48,153}

In der Humanmedizin ist kein Krankheitsbild als direktes Korrelat der kontinuierlichen Gabe von TAA im Mausmodell bekannt. Während die direkte Ethanolgabe im Nagetiermodell keine signifikante Leberfibrose induziert und damit die humane Pathologie nur unzureichend abbildet, entspricht die chronisch-toxische Schädigung der TAA-induzierten Fibrose prinzipiell der Alkohol-assoziierten Lebererkrankung des Menschen, einem der bedeutendsten hepatologischen Krankheitsbilder mit hoher klinischer Relevanz.^{48,177} Es muss jedoch bedacht werden, dass in der vorliegenden Arbeit neben der TAA-Administration auch eine Ganzkörperbestrahlung, Knochenmarktransplantation und VCV-Gabe erfolgte. Der Effekt dieser Interventionen auf die Leberfibrose ist unklar. Die vorliegende Arbeit trägt hierzu nicht bei, da auf weitere Kontrollgruppen, etwa mit alleiniger VCV- oder TAA-Gabe, verzichtet wurde. Der Fokus lag auf der Kontrolle möglichst vieler potenziell konfundierender Parameter, um den Effekt der Fibrozytenablation valide prüfen zu können. Es wurde der internen Validität der Hypothesenprüfung Vorrang vor der externen Validität eingeräumt.

Ungeachtet der Vor- und Nachteile bildet die chronische TAA-Exposition als Modell der chronisch-toxischen Leberschädigung nur einen Teil des Spektrums der klinisch relevanten Ätiologien der Leberfibrose ab. Untersuchungen zu dem Ursprung fibrogener Zellen zeigten die relevant divergierenden Pathomechanismen in verschiedenen Ätiologien der Leberzellschädigung (siehe Kapitel 1.2.3). Nach epidemiologischen Erwägungen muss die hepatische Fibrose im Rahmen der NAFLD ein vorrangiges Ziel weiterer Arbeiten darstellen, hier liegen bislang kaum Daten zur Beteiligung von Fibrozyten vor. Biliäre Leberschädigungen zeigen hingegen die klarste Abgrenzung hinsichtlich des Pathomechanismus und können damit wichtige mechanistische Erkenntnisse liefern. *Fate-tracing*-Untersuchung zur Beteiligung von Fibrozyten an der Leberfibrose wurden am BDL-Modell durchgeführt und prädisponieren es damit für weitere Experimente (siehe Kapitel 1.3.7).¹⁴⁵

4.2 Einsatz der Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase/Ganciclovir-Suizidgenstrategie

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die Anwendung des HSV-TK/GCV-Modells in Kombination mit Knochenmarktransplantationen für die spezifische *in vivo* Ablation von Fibrozyten in einem Mausmodell der Leberfibrose. Die kritische Diskussion des Modells ist essenziell für die Evaluation der Validität der hypothetischen Wirkvariable und damit der Prüfung der vorliegenden Forschungshypothese. Angesichts des Pilotcharakters der vorliegenden Arbeit ergeben sich außerdem Implikationen für möglicher Folgeuntersuchungen unter Einsatz der neuartigen Ausschaltungsstrategie.

4.2.1 Potenzielle Schwachstellen

Das HSV-TK/GCV-Modell gilt als sehr effektiv. Der Anteil der ausgeschalteten Zielzellen variiert jedoch beträchtlich je nach Zielzellpopulation, transgener Mauslinie und Versuchsbedingungen. Während in einer der ersten *in vivo* Studien des HSV-TK/GCV-Modells, hier unter Kontrolle

eines Immunglobulin-Promotors, nach sieben Tagen die Ausschaltung von > 99 % aller Thymozyten erreicht worden war, berichteten andere Autoren von 65-70 % Effektivität.^{178,179} Im Kontext der vorliegenden Arbeit können allgemeine Herausforderungen der erfolgreichen Umsetzung der HSV-TK/GCV-Suizidgenstrategie neben solchen, die sich spezifisch aus der Applikation zur Ausschaltung von Fibrozyten ergeben, identifiziert werden.

Voraussetzung für die erfolgreiche Umsetzung der Suizidgenstrategie ist zunächst die hinreichende Expression des Suizidgens durch die Zielzellen. Die Konstruktion des Vektors sowie die Integration in das Empfänger-genom stellen wichtige gentechnische Variablen dar (siehe unten). Eine weitere Einflussgröße stellt die Exposition der Suizidgen-tragenden Zielzelle gegenüber dem entsprechenden Substrat dar. In der Literatur zeigt sich eine große Bandbreite eingesetzter Applikationsformen und Dosierungen von GCV beziehungsweise VCV. Die zum Teil dosisabhängige Ausschaltung der Zielzellpopulation muss gegen die Belastung der Versuchstiere und die mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die unspezifische Toxizität abgewogen werden. Etabliert ist die Gabe im Trinkwasser, intraperitoneal oder subkutan mittels osmotischer Pumpe.^{85,140,178-180} Im Sinne der Minimierung belastender Eingriffe an Versuchstieren ist hier die orale Gabe vorzuziehen. Es liegen nur wenige veterinärmedizinische Daten zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen von GCV bei Mäusen vor, in der Humanmedizin zeigt sich jedoch oft eine therapielimitierende Toxizität. Die Fachinformation gibt als sehr häufige Nebenwirkungen unter anderem Neutropenie, Anämie, Appetitverlust, Dyspnoe, Diarrhö und Erbrechen an.¹⁸¹ In höheren Konzentrationen ist *in vitro* außerdem eine Toxizität gegenüber Hepatozyten und HSCs demonstriert worden.¹⁷⁹ Es gilt daher die niedrigste effektive Dosierung für Tierversuche einzusetzen. Während einige Autoren dem Trinkwasser bis zu 4 mg/ml GCV zusetzen, wurde die erfolgreiche Ablation bereits bei einer Trinkwasserkonzentration von 60 µg/ml GCV gezeigt.¹⁸⁰ Dies diente als Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit genutzte Dosierung. Aufgrund der um den Faktor zehn höheren Bioverfügbarkeit von VCV, ist hier aufgrund der Gabe von 8,3 µg/ml VCV von einer mindestens gleichwertigen GCV-Exposition der Zielzellen auszugehen.^{182,183} Weiterhin nicht abschließend geklärt ist die Relevanz des sogenannten *bystander effects*. Dieser beschreibt die Schädigung von Zellen in direkter Nachbarschaft der durch die Verstoffwechselung von GCV abgetöteten Zellen.¹⁸⁴ Biologisch erscheint dies aufgrund von Zell-Zell-Verbindungen und der Freisetzung zytotoxischer Mediatoren durch das Absterben der Zielzelle plausibel.

Die Applikation der HSV-TK/GCV-Suizidgenstrategie für die Ausschaltung von Fibrozyten basiert auf dem Austausch des Knochenmarks durch Ganzkörperbestrahlung und Knochenmarktransplantation. Ein unvollständiger Chimärismus der fibrozytären Vorläuferzellpopulation, etwa durch nach der Ganzkörperbestrahlung verbleibende Stammzellen im Knochenmark, würde die kompensatorische Proliferation einer nicht GCV-sensiblen Fibrozytenpopulation ermöglichen. Bedacht werden müssen außerdem zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits differenzierte Fibrozyten. Inwieweit diese radiosensibel sind und zur Expansion der Fibrozytenpopulation beitragen können, ist nicht abschließend geklärt.⁸⁹ Gegen einen signifikanten Beitrag dieser Population spricht, dass unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Zahl differenzierter Fibrozyten in der Zirkulation und in peripheren Geweben zu beobachten ist. Weiterhin wurde die Expansion von Fibrozyten in der Leber nach Injektion von CCl₄ von einem parallelen Anstieg im Knochen-

mark begleitet.¹⁴⁵ Auch in einem Modell der Nierenfibrose zeigten sich keine Hinweise auf eine lokale Proliferation von Fibrozyten, das rasche Auftreten von CD115⁻Fibrozyten deutete vielmehr auf eine Infiltration durch bereits differenzierte Fibrozyten hin.¹¹⁵ Der Suizidgenstrategie in der vorliegenden Arbeit liegt daher – im Einklang mit auf Knochenmarktransplantationen basierenden *fate-tracing*-Untersuchungen – die Annahme einer untergeordneten Rolle der Zellproliferation außerhalb des Knochenmarks, analog zu anderen hämatopoetischen Zellen, zugrunde.

4.2.2 Validierung der Fibrozytenausschaltung

Die Effektivität der Suizidgenstrategie wurde umfangreich in Untersuchungen zur Expression des Suizidgens sowie dessen Effekt *in vitro* und *in vivo* geprüft.

Expression des Suizidgens und Effektivität *in vitro*

Die initiale Validierung des in der vorliegenden Arbeit genutzten Plasmidvektors (Abbildung 8A) zeigte die stabile Expression des Suizidgens in transgenen Tieren.¹⁵² Wurden transgene Zellen dieser Versuchstiere *in vitro* mit GCV versetzt, zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion vitaler Zellen. Nach fünf Tagen wurden Reduktionen der Zellzahl zwischen 40 (0,02 µmol/l GCV) und 80 % (5 µmol/l GCV) beobachtet. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Mauslinie wurde unter Einsatz desselben Plasmids generiert. Da die Integration des Vektors durch Pronukleusinjektion zufällig in das Genom erfolgt, waren erneute Untersuchungen zur Expression der ektopen Kinase notwendig. Unsere Kooperationspartner bestätigten zunächst die Expression beider Komponenten des bicistronischen Vektors, HSV-TK und *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), in pulmonalen Fibroblasten.¹⁴⁰ Insbesondere zeigten sie auch die Expression von eGFP in isolierten Fibrozyten. *In vitro* reduzierte bereits die Zugabe von GCV in der niedrigsten Dosierung (0,02 µmol/l) die Zahl transgener vitaler pulmonaler Fibroblasten nach fünf Tagen um etwa 50 %. Es war eine 5 000-fach höhere GCV-Konzentration notwendig, um eine vergleichbare Reduktion nicht-transgener Fibroblasten zu erreichen. In einem breiten Dosisbereich von 0,2 bis 100 µmol/l GCV wurden Reduktionen transgener Fibroblasten von über 90 % erreicht. Genotypisierungen zeigten in der vorliegenden Arbeit die Expression des entsprechenden Plasmidvektors durch die Knochenmarkspender (Abbildung 8B).

Effektivität der Ausschaltung *in vivo*

Der Nachweis von Fibrozyten stellt außerhalb von Zellkulturversuchen weiterhin eine experimentelle Herausforderung dar, die auch die Evaluation von Ablationsmodellen erheblich limitiert. Das Fehlen eines spezifischen Markers (siehe Kapitel 1.3.2) bedingt, dass stets Analysen auf Einzelzellebene vorgenommen werden müssen, um die Kollokalisation von zwei oder mehr Markern in einer einzelnen Zelle nachzuweisen. CD45 und Kollagen Typ I stellen in jüngeren Arbeiten hierfür die meistgenutzte Kombination dar. CD45 wird auf der Oberfläche aller hämatopoetischer Zellen mit Zellkern exprimiert und deckt das größte Spektrum von Entwicklungsstufen ab, auch wenn eine Arbeit den Nachweis einer kleineren, mutmaßlich CD45⁻-Fibrozytenpopulation erbrachte.⁸¹ Die Expression von Matrixproteinen wie Kollagen Typ I ist für Fibrozyten definierend. Die extrazelluläre Sekretion der Matrixproteine erschwert in Antikörper-basierten Gewebs-

untersuchungen aber die zuverlässige Identifizierung der produzierenden Zellen. Zumeist reicht die Auflösung und Schichtdicke in der herkömmlichen Lichtmikroskopie nicht aus, um im Einzelfall intrazelluläre Proteine eindeutig von EZM zu unterscheiden. Der Antikörper-basierte Nachweis von intrazellulären EZM-Bestandteilen erlaubt darüber hinaus zunächst keine definitive Aussage, ob das Protein von der jeweiligen Zelle synthetisiert oder durch Endozytose aus dem Extrazellulärraum aufgenommen wurde.¹²² Immunzellen, die Kollagen aus dem Extrazellulärraum aufgenommen haben, können so als Fibrozyten fehlgedeutet werden. Diesem Phänomen, das auch Vorstufen wie Prokollagene betrifft, kommt im Milieu der hepatischen Fibrose eine besondere Bedeutung zu, da hier ein gesteigerter Umsatz von EZM-Komponenten auf die Infiltration von Immunzellen trifft.¹⁸⁵ Die praktische Relevanz wurde von Kleaveland *et al.* gezeigt: In einem Modell, in dem *Coll1a1* in allen hämatopoetischen Zellen spezifisch ausgeschaltet wurde, gelang trotzdem der Nachweis von intrazellulärem Kollagen und es erfolgte eine entsprechende Sortierung im *fluorescence-activated cell sorting* (FACS).¹⁸⁶ Schließlich wurde in einer CD45/Kollagen Typ I-basierten FACS-Analyse von humanem Vollblut und PBMCs nach etablierten Protokollen eine ausgeprägte Kontamination der Fibrozytenpopulation mit Granulozyten und Monozyten gezeigt.¹⁸⁷ Dies stellt die Validität von FACS-Analysen nach vergleichbaren Protokollen erheblich infrage.

Um diesen experimentellen Fallstricken Rechnung zu tragen, wurde in der vorliegenden Arbeit – komplementär zu den Vorarbeiten mit der genutzten Mauslinie – erstmals eine RNA *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von Fibrozyten in Lebergewebe durchgeführt. Zuvor hatten unsere Kooperationspartner in einem Versuchsaufbau analog zu dem der vorliegenden Arbeit die erfolgreiche Ausschaltung von Fibrozyten in Modellen der pulmonalen Hypertonie¹⁴⁰ und des Lungenkrebses⁸⁵ gezeigt. In einer Durchflusszytometrie pulmonaler Zellen wurde zunächst ein geringer Anteil (1,08 %) CD45⁺/eGFP⁺-Fibrozyten nachgewiesen.¹⁴⁰ Ein fünfwöchiges Hypoxiemodell der pulmonalen Hypertonie führte zu einem signifikanten Anstieg dieses Anteils (7,08 %). Die Gabe von GCV parallel zur Induktion der pulmonalen Hypertonie reduzierte den Anteil auf 0,64 % der Zellen. Auch immunhistochemisch wurde die Reduktion von CD45⁺/eGFP⁺-Fibrozyten in GCV-exponierten Tieren gezeigt. Der Nachweis des Vektor-eigenen eGFP verhindert den Nachweis endozytierter EZM-Proteine. Die fehlgeschlagene Ausschaltung von Fibrozyten durch eine unzureichende Expression des Vektors und damit des Suizidgens kann in diesem Ansatz allerdings nicht detektiert werden. In einer weiteren Arbeit zeigten Weigert *et al.* die Ausschaltung von CD45⁺/SiglecH⁺/CD162⁺/CD9⁺/CD11b⁺/CD44⁺/CCR2/5⁺-Fibrozyten im Knochenmark mithilfe einer komplexen, mehrstufigen FACS-Analyse sowie die Ausschaltung von CD45⁺/CD162⁺/F4/80⁺/CD9⁺/CCR2/5⁻ beziehungsweise CD45⁺/CD163⁺/CCR2⁺/Col1⁺-Fibrozyten in drei Lungenkrebsmodellen mithilfe einer mehrstufigen FACS-Analyse und einer kombinierten Immunhistochemie.⁸⁵ Die komplexen Protokolle erlauben eine scharfe Abgrenzung gegenüber anderen Zelltypen und demonstrierten über verschiedene Gewebe und Modalitäten hinweg konsistent die erfolgreiche Fibrozytenausschaltung. Die neuartigen Protokolle schränken jedoch den Vergleich quantitativer Daten zwischen Studien erheblich ein. Nebenbefundlich zeigten sich Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Makrophagen sowie die Gesamtzahl CD45-positiver und -negativer Zellen im Knochenmark infolge der Fibrozytenablation unverändert, sodass ein signifikanter *bystander effect* der Suizidgenstrategie hier unwahrscheinlich scheint.

In der vorliegenden Arbeit erlaubte die Hybridisierung von *Colla1*- und *Ptprc*-mRNA den qualitativen Nachweis der erfolgreichen Fibrozytenablation (Abbildung 15). Der Nachweis der *Colla1*-mRNA umgeht sowohl das Problem der Abgrenzung intrazellulärer und extrazellulärer Proteine als auch der möglichen Aufnahme von Kollagen aus dem Extrazellularraum. Auch verbleibende Fibrozyten, die keine Expression des eingebrachten Vektors zeigen, würden von der RNA *in situ* Hybridisierung erfasst. Schließlich erfolgte der Nachweis der Fibrozytenablation an Proben von Versuchstieren, die in die Auswertung des Experiments eingegangen sind. Die für durchflusszytometrische Methoden erforderlichen frischen Gewebeproben hätten in der vorliegenden Arbeit nur durch den Einsatz zusätzlicher Versuchstiere realisiert werden können. Der qualitative Nachweis der erfolgreichen Ausschaltung zeigt die Effektivität des gewählten Versuchsaufbaus über die generelle Eignung der Mauslinie hinaus. Analog zu den Beobachtungen ähnlicher Versuche unter Einsatz der HSV-TK/GCV-Suizidgenstrategie, waren verbleibende Zellen in der Versuchsgruppe jedoch vereinzelt nicht auszuschließen.^{85,140,179} Die niedrige Zahl von Fibrozyten im Gewebe und große Untersucherabhängigkeit in der Identifizierung kolokalisierter mRNA-Transkripte verhindern jedoch eine verlässliche Quantifizierung. Eine Weiterentwicklung hin zu einer Antikörper-basierten Darstellung von CD45, das als Transmembranprotein die Zellgrenzen CD45⁺-Zellen visualisiert, in Kombination mit der hier gezeigten RNA *in situ* Hybridisierung von *Colla1* könnte das Verfahren in zukünftigen Versuchen, auch für humanpathologische Anwendungen, weiter optimieren und für automatisierte Auswertungen zugänglich machen. Die zusätzliche Hybridisierung einer gegen den Vektor gerichteten Sonde könnte auch CD45⁻-Zellen identifizieren und die Unterscheidung zwischen mangelnder Expression des Transgens und fehlgeschlagener Abtötung trotz Expression ermöglichen. Die Kombination einer RNA *in situ* Hybridisierung in einzelnen Zellen mit anschließender Durchflusszytometrie an Stelle einer Antikörper-basierten Markierung der Zielzellen könnte die Quantifizierung weiter vereinfachen.^{188,189} Die Erprobung dieser Technik zur Identifizierung von Fibrozyten steht aktuell aber noch aus.

Die Quantifizierung und Charakterisierung der möglicherweise verbleibenden Fibrozyten wäre wünschenswert, um im Einklang mit der formulierten Forschungshypothese das Potenzial der gesamten Fibrozytenpopulation erfassen zu können. Obwohl Lösungsansätze für einige experimentellen Fallstricke vorliegen, bleibt jedoch zweifelhaft inwiefern eine valide Quantifizierung der Fibrozytenzahl aktuell möglich ist. Angesichts dieser Einschränkung, der umfangreichen Charakterisierung der etablierten HSV-TK/GCV-Suizidgenstrategie und der komplementären Validierungsschritte unserer Kooperationspartner in vergleichbaren Versuchsaufbauten unter Einsatz der hier genutzten Mauslinie scheinen über den qualitativen Nachweis der erfolgreichen Ausschaltung hinausgehende Untersuchungen – insbesondere unter dem Einsatz weiterer Versuchstiere – nicht gerechtfertigt. Die konsistent weitreichende Ausschaltung von Fibrozyten in den Vorarbeiten zu der genutzten Mauslinie lassen eine hohe Effektivität der Ausschaltung vermuten.^{85,140} Insbesondere ergeben sich in Zusammenschau keine Hinweise auf unbeabsichtigte, potenziell konfundierende Effekte der Suizidgenstrategie. Auch unter der Annahme einer unvollständigen Ausschaltung von Fibrozyten in der vorliegenden Arbeit, ergeben sich keine Hinweise, dass eine andere experimentelle Bedingung variiert wäre, sodass die Validität der empirischen Hypothesenprüfung unbeeinträchtigt bleibt. Einzig für die Interpretation des Ausmaßes der gezeigten Veränderung der abhängigen Variable muss diese Einschränkung bedacht werden.

4.2.3 Verträglichkeit

Die Umsetzung der HSV-TK/GCV-Suizidgenstrategie erforderte die Generierung eines transgenen Mausstammes, die Zucht von Versuchstieren über mehrere Generationen und belastende Eingriffe im Rahmen des eigentlichen Versuchs. Die Zucht geht nach aktuellem Kenntnisstand mit sehr geringen Belastungen für die Versuchstiere einher. Mit Ausnahme der Infertilität männlicher Tiere, die schon früh auf die ektope Expression der TK zurückgeführt worden war und auch in unserer Zucht beobachtet wurde, gelten die transgenen Tiere als phänotypisch unauffällig.¹⁹⁰ Auch unter GVC-Exposition für 14 Tage zeigten Mäuse des hier genutzten transgenen Stammes keine Auffälligkeiten infolge der Expression der TK unter Kontrolle des *Colla2*-Promotors.¹⁵² Ein Bericht beschrieb die spontane Entwicklung von Lebertumoren ab dem Alter von sechs Monaten in Kunming-Mäusen, die die TK unter Kontrolle eines Albumin-Promotors exprimierten.¹⁹¹ Eine Reproduktion dieser Beobachtung steht trotz der Vielzahl von publizierten Versuchen unter Einsatz des HSV-TK/GCV-Modells aus. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde keine Entwicklung von Lebertumoren nachgewiesen. Trotz der hohen Belastung der Versuchstiere, die durch die Ganzkörperbestrahlung und Knochenmarktransplantation nötig war, wurde über den gesamten Versuch hinweg eine niedrige Mortalität beobachtet. Lediglich eine der 32 Empfängermäuse (Abbildung 7) musste aufgrund eines unklaren Gewichtsverlustes vorzeitig getötet werden. In der Literatur werden bedeutend höhere Mortalitätsraten von zehn bis 15 % für TAA-Modelle ohne zusätzliche Eingriffe berichtet.¹⁵⁷ Auch nach umfangreichen veterinärpathologischen Untersuchungen des Kadavers wurde keine versuchsspezifische Ursache identifiziert, die eine Optimierung zukünftiger Versuche erlauben würde. Der zeitliche Zusammenhang zu Ganzkörperbestrahlung und Knochenmarktransplantation lässt jedoch eine Komplikation dieses Eingriffs vermuten.

4.3 Beitrag von Fibrozyten zur hepatischen Fibrogenese

Die Forschungshypothese, dass Fibrozyten funktionell zur Leberfibrose beitragen, konnte im oben diskutierten Modell über die Bestimmung des hepatischen Hydroxyprolinegehalts bestätigt werden. Die vorliegende Arbeit unterstreicht damit die Beteiligung mindestens dreier fibrogener Zellpopulationen – HSCs, portaler Fibroblasten und Fibrozyten – an der hepatischen Fibrogenese (Abbildung 4). Die Betrachtung der ALT-Aktivität im Serum als sekundärer Zielparameter und komplementärer Untersuchungen erlauben eine Einordnung des fibrozytären Beitrags zur hepatischen Fibrogenese.

4.3.1 Hepatischer Nachweis von Fibrozyten in Thioacetamid-behandelten Tieren

Die hepatische Präsenz von Fibrozyten wurde in Mausmodellen der CCl₄- und BDL-induzierten Leberfibrose sowie in *Acb4*^{-/-}-Mäusen nachgewiesen (siehe Kapitel 1.3.7). Die Visualisierung von Fibrozyten in der Kontrollgruppe (Abbildung 15A) der vorliegenden Arbeit erbrachte erstmals den Nachweis der hepatischen Präsenz von Fibrozyten in einem Mausmodell der TAA-induzierten Leberfibrose.

4.3.2 Verminderte Fibrose infolge der Fibrozytenausschaltung

Der hepatische Hydroxyprolinegehalt war in der vorliegenden Arbeit der Hauptzielparameter zur Einschätzung des Ausmaßes der hepatischen Fibrose beziehungsweise die abhängige Variable der statistischen Hypothesenprüfung. Infolge der Fibrozytenausschaltung zeigte sich eine Reduktion des hepatischen Hydroxyprolinegehalts um im Mittel 7,8 % in den Tieren der Versuchsgruppe (Abbildung 18A). Der p -Wert von 0,033 unterschritt das festgelegte Signifikanzniveau, sodass die Nullhypothese verworfen und die Testhypothese formal angenommen werden kann.

Zur Interpretation des Ausmaßes der Reduktion kann zunächst ein standardisiertes Effektstärkemaß herangezogen werden. Das berechnete Eta-Quadrat (η^2) von 0,15 lässt sich zweifach interpretieren. Zum einen erlaubt es, die beobachtete Streuung der hepatischen Hydroxyprolinwerte zu erklären. Nach diesem Modell begründen sich 15 % der in allen TAA-behandelten Tieren beobachteten Varianz auf den Mittelwertsunterschied zwischen den verglichenen Gruppen. Die verbleibende, hierdurch nicht erklärte Varianz von 85 % entfällt demnach auf die Streuung innerhalb der Gruppen, die nicht auf die hypothetische Wirkvariable zurückgeführt werden kann. Zum anderen erlauben Effektstärkemaße, anders als p -Werte, den Vergleich von Effekten unabhängig von der Stichprobengröße, sodass Vergleiche zwischen Studien möglich sind. Infolgedessen haben sich nach Cohen Grenzwerte für η^2 zur Kategorisierung kleiner, mittlerer und großer Effekte etabliert.¹⁹² Demzufolge liegt in der vorliegenden Arbeit ($\eta^2 > 0,14$) ein großer Effekt vor. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Kategorisierung ihren Ursprung in der Verhaltensforschung hat. Auch in diesem Feld erfährt die oftmals unterkomplexe, willkürliche Kategorisierung Kritik und wird zunehmend verlassen.

Einen weiteren Ansatz zur Diskussion der Effektstärke bietet der Intervallschätzer des beobachteten Mittelwertsunterschiedes. Das 95 % Konfidenzintervall der Stichprobe, das in 95 % der Fälle den wahren Mittelwertsunterschied überspannt, umfasst eine Reduktion des hepatischen Hydroxyprolinegehalts infolge der Fibrozytenablation von 0,7 bis 14,8 %. Die Interpretation der Extreme zeigt (innerhalb des gewählten Konfidenzniveaus) das Spektrum der mit den beobachteten Werten vereinbaren Effekte: Während eine Reduktion fibrillärer Kollagene um wenige Prozent im Kontext der vorliegenden Arbeit unstrittig zu vernachlässigen wäre, stellten ~ 15 % weniger fibrotisches Material eine bemerkenswerte, translational hochrelevante Beobachtung dar. Es muss in dieser Interpretation konstatiert werden, dass die vorliegenden Daten keine Unterscheidung zwischen einem vernachlässigbaren und einem relevanten Ausmaß der Reduktion des Hydroxyprolinegehalts erlauben.

Präzisere Schätzungen des Mittelwertsunterschiedes ließen sich in zukünftigen Versuchen durch größere Stichproben (hier allerdings im Konflikt mit dem tierexperimentellen Ziel der Reduktion eingesetzter Versuchstiere) sowie geringere Merkmalsstreuungen innerhalb der Versuchstierpopulation erreichen. Letztere sind neben biologischen Effekten auch das Ergebnis von Standardisierung in der Versuchsdurchführung. Insbesondere die perorale Gabe von TAA mit interindividuell unterschiedlicher Trinkwasseraufnahme der Versuchstiere bietet in unserem Versuchsaufbau einen Angriffspunkt für weitere Standardisierung. Weiterhin muss hinsichtlich der Auswertung beachtet werden, dass – obwohl die Interpretation der Extreme eindeutig erscheint – das Konfidenzintervall einen Graubereich umfasst, in dem die Relevanz der Reduktion unklar bleibt. Es liegen

keine etablierten Grenzwerte vor, die einen klinisch relevanten Effekt hinsichtlich der Reduktion des Hydroxyprolinegehalts definieren. Dies stellt eine generelle Limitation präklinischer Arbeiten zur Leberfibrose dar, die als eine der möglichen Ursachen für das wiederholte Scheitern vielversprechender antifibrotischer Interventionen in klinischen Studien diskutiert wird.^{60,193}

Für humane chronische Lebererkrankungen ist die prognostische Relevanz des histologischen Fibrosestadiums für die leberspezifische- und Gesamtmortalität gezeigt worden.^{58,59} Vergleichbare Untersuchungen unter Einsatz des hepatischen Hydroxyprolinegehalts liegen nicht vor. Das histopathologische *Staging* dient auch der Erfassung der Fibrose, unterscheidet sich hierin aber grundlegend von der Hydroxyprolinbestimmung. Die zugrunde gelegten Kriterien (Tabelle 1) zeigen, dass hier das Vorliegen von Merkmalen der krankhaft veränderten Leberarchitektur maßgeblich für die Stadieneinteilung ist. Diese können unabhängig von der Menge des Narbengewebes, die die Hydroxyprolinbestimmung erfasst, auftreten.¹⁹⁴ In der vorliegenden Arbeit zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im *Staging* der Versuchs- und Kontrollgruppe (Tabelle 2), die auf Veränderungen der Leberarchitektur oder der Komposition der EZM über den reduzierten Gehalt fibrillärer Kollagene hinaus hindeuten. Es muss dabei beachtet werden, dass die ordinalskalierte Kategorisierung, auch in der siebenteiligen Form nach Ishak *et al.*, möglicherweise nicht in der Lage ist, die Effekte der Fibrozytenablation ausreichend sensitiv abzubilden. Darüber hinaus wurde die geringe Reliabilität standardisierter histopathologischer Begutachtungen wiederholt gezeigt.⁶³

Die digitale morphometrische Analyse histologischer Färbungen wird seit langem als Weiterentwicklung der histopathologischen Beurteilung diskutiert. Diese entspricht in ihrer Konzeption aber weniger dem *Staging* als Erfassung krankheitsspezifischer Meilensteine, als der Hydroxyprolinbestimmung. Letztlich stellt die Menge der akkumulierten Fasern auch hier den Zielparameter dar. Für Sirius Red-basierte Färbungen wurde eine Korrelation mit dem hepatischen Hydroxyprolinegehalt gezeigt.¹⁹⁵ In der vorliegenden Arbeit wurden Sirius Red/Fast Green-gefärbte Schnitte ungeachtet der Redundanz als unterstützende Analyse des Ausmaßes der Fibrose analysiert. Es zeigte sich kein Effekt infolge der Fibrozytenablation (Abbildung 17). Die Repräsentativität einzelner histologischer Färbungen bleibt jedoch zweifelhaft, da in der Regel nur ein willkürlich gewählter Teil der Leber histologisch aufgearbeitet wird. Untersuchungen zu humanen Leberbiopsien zeigen hierfür einen beträchtlichen Stichprobenfehler aufgrund der inhomogenen Verteilung von Narbengewebe in der Leber.^{61,62} Die Methodik der Morphometrie unterscheidet sich darüber hinaus stark zwischen verschiedenen Studien. Einige Arbeiten schlossen beispielsweise ausgewählte Bereiche der Leber wie größere Gefäße oder Gallenwege manuell aus, andere nutzten wie in der vorliegenden Arbeit die gesamten Schnitte.¹⁹⁴ Darüber hinaus führen Unterschiede in der Färb- und Auswertungsmethodik zu deutlich divergierenden Anteilen gefärbter Fläche in histologisch vergleichbar anmutenden Schnitten. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die detaillierte Darstellung der Faserqualität und spezifische Erfassung fibrillärer Kollagene gelegt. Hierzu wurden geringe Schichtdicken der histologischen Schnitte gewählt, eine Gegenfärbung mit Fast Green durchgeführt sowie die Aufnahmen in hoher Vergrößerung und Auflösung angefertigt. Im Ergebnis zeigen sich deutlich geringere Anteile der gefärbten Fläche als in vergleichbaren Arbeiten.^{153,157}

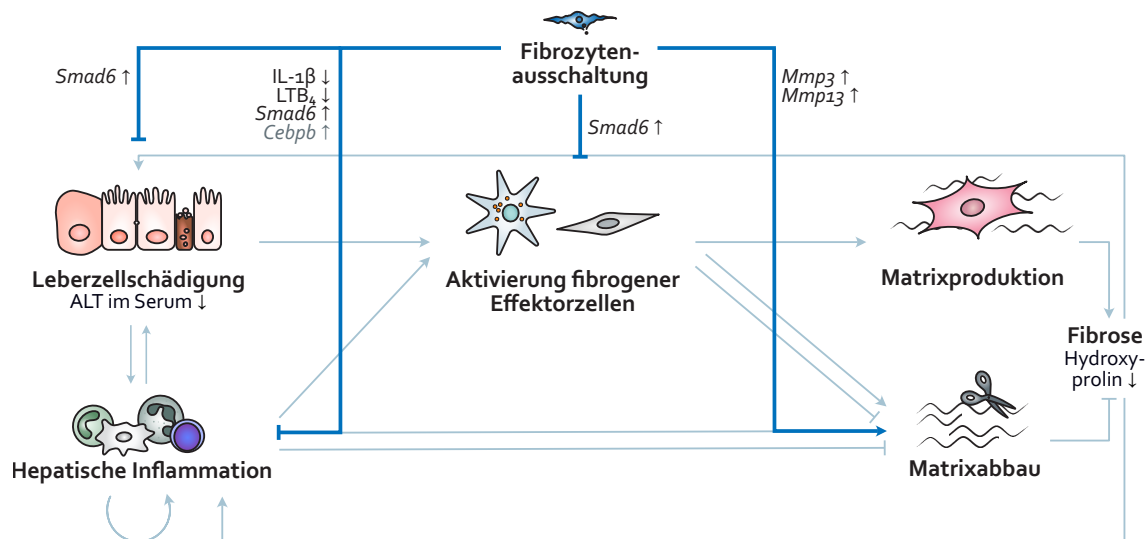
4.3.3 Reduktion der Alanin-Aminotransferase-Aktivität im Serum

Der sekundäre Zielparameter der vorliegenden Arbeit, die Volumenaktivität der ALT im Serum, zeigte sich infolge der Fibrozytenablation signifikant vermindert (Abbildung 28B). Dies zeigt eine Reduktion hepatozytärer Schädigung. Die Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Ausschaltung von Fibrozyten eine hinreichende Reduktion des fibrotischen Materials in Art und Ausmaß bedingt, um die Leberintegrität positiv zu beeinflussen. Es müssen zwei Einschränkungen bedacht werden. Zum einen erlaubt die beobachtete Reduktion der ALT auch andere Hypothesen zur Kausalität: Es ist denkbar, dass das Fehlen parakriner Fibrozyteneffekte zu einer verminderten Zellschädigung führt, die wiederum eine Reduktion der fibrotischen Reaktion zur Folge hat (siehe Kapitel 4.4.5). Zum anderen zeigt die vorliegende Arbeit sowohl für die Kontroll- als auch die Versuchsgruppe höhere ALT-Aktivitäten als vermutet. Das TAA-Modell geht in der Regel nur mit milden Erhöhungen der ALT einher.¹⁵⁷ Eine zusätzliche Leberzellschädigung oder Enzyminduktion durch die kontinuierliche VCV-Gabe, die die Auswertung beeinflussen, können nicht ausgeschlossen werden. Die Fachinformation listet entsprechende Laborbefunde als häufige unerwünschte Arzneimittelwirkung.¹⁸¹

4.4 Mechanismen und Mediatoren des Beitrags zur hepatischen Fibrose

Nach der statistischen Hypothesenprüfung soll der Beitrag von Fibrozyten in der Leberfibrose anhand weiterer Untersuchungen charakterisiert und Hypothesen zu den zugrundeliegenden Mechanismen der oben diskutierten Ergebnisse aufgestellt werden. Es handelt sich hierbei um – keineswegs erschöpfende – explorative Analysen. Ziel ist es, durch breite Analysen in Anlehnung an die bekannten Funktionen von Fibrozyten prioritäre Ansätze für weiter Untersuchungen und Folgearbeiten zu identifizieren. Abbildung 29 fasst die dahingehenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen.

Es müssen mehrere Fallstricke der explorativen Analysen beachtet werden. Eine ungleiche Verteilung des Beitrags der verschiedenen fibrogenen Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf der hepatischen Fibrogenese ist denkbar. Die *fate-tracing*-Untersuchungen von Scholten *et al.* sprechen dafür, dass der größte Beitrag von Fibrozyten hierbei in einer frühen Phase der Pathogenese zu erwarten ist (siehe Kapitel 1.3.7).¹¹⁹ Es kann somit stets die Hypothese aufgestellt werden, dass der gezeigten Reduktion des fibrotischen Materials infolge der Fibrozytenausschaltung ein transienter Prozess zugrunde liegt, der am Untersuchungszeitpunkt der vorliegenden Arbeit bereits nicht mehr präsent war. Weiterhin können aus der Analyse des hepatischen Proteoms beziehungsweise Transkriptoms zum Untersuchungszeitpunkt nur begrenzt Rückschlüsse auf die Funktion von Fibrozyten *in vivo* gezogen werden. Praktisch jede bekannte biologische Funktion der Fibrozyten zeigt eine Redundanz in anderen Zelltypen, die die Ausschaltung der Fibrozyten potenziell kompensieren können. Zuletzt muss in der statistischen Auswertung der einzelnen Untersuchungen die Akkumulation der Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erster Art durch multiples Testen beachtet werden.



▲ **Abbildung 29 | Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse.** Die Ausschaltung von Fibrozyten in einem Mausmodell der TAA-induzierten Leberfibrose führte zu einer verminderten hepatischen Fibrose, gekennzeichnet durch den reduzierten hepatischen Hydroxyprolinegehalt (rechts). Weiterhin zeigte sich anhand der reduzierten Aktivität der ALT im Serum eine verminderte Leberzellschädigung (oben links). In der vorliegenden Arbeit konnten erste Indizien der zugrundeliegenden Mechanismen identifiziert werden (dunkelblaue Pfeile), Erläuterungen siehe Kapitel 4.4. ALT, Alanin-Aminotransferase; IL, Interleukin; LTB₄, Leukotrien B₄.

4.4.1 Aufbau von Matrixbestandteilen

Die EZM der Leber unterliegt ständigen, dynamischen Auf-, Um- und Abbauprozessen. Der hepatische Hydroxyprolinegehalt bildet das Ergebnis dieser Prozesse zum Zeitpunkt der Auswertung ab, erlaubt aber keine Rückschlüsse auf die Beteiligung der einzelnen Prozesse. Die verminderte Sekretion von Matrixbestandteilen stellt einen naheliegenden Erklärungsansatz für die beobachtete Reduktion des hepatischen Hydroxyprolinegehalts dar, dem sich mit Transkriptionsanalysen einzelner, an der Sekretion von Matrixbestandteilen beteiligter, Gene genähert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription zahlreicher solcher Gene untersucht. Überraschenderweise zeigten weder die für die strukturellen Bestandteile der EZM Kollagen Typ I (*Colla1*, *Colla2*) und -III (*Col3a1*) sowie das Proteoglykan Decorin (*Dcn*) kodierenden Gene relevante Regulationen infolge der Fibrozytenablation (Abbildung 18C, Abbildung 19). Auch die für die Quervernetzung von Kollagen und Elastin essenzielle Lysyloxidase (*Lox*) präsentierte sich unverändert (Abbildung 19). Diese Auswahl ist keineswegs erschöpfend und lässt methodisch bedingt posttranskriptionelle Regulationen außer Acht. Nichtsdestotrotz kann spekuliert werden, dass entweder der Aufbau von Matrixbestandteilen nicht maßgeblich für den Effekt der hier gezeigten Intervention ist und andere Prozesse des *matrix remodeling* im Vordergrund stehen oder ein transientser Prozess, der aufgrund der kurzen Halbwertszeit der mRNA-Transkripte nicht zum Untersuchungszeitpunkt erfasst wurde, zugrunde liegt.

4.4.2 Expansion und Aktivierung hepatischer Myofibroblasten

Kontraktile α -SMA⁺-Myofibroblasten wurden als die zentralen Effektorzellen in der hepatischen Fibrogenese identifiziert (siehe Kapitel 1.2.3). Fibrozyten können prinzipiell sowohl durch Transdifferenzierung direkt zur Myofibroblastenpopulation beitragen (Abbildung 4) als auch deren Aktivierung, unter anderem über PDGF und Zytokine der TGF- β -Superfamilie, vermitteln (Abbildung 6). Der Ursprung der hepatischen Myofibroblastenpopulation wird kontrovers diskutiert. Mehrere Arbeiten legen überzeugende Hinweise dar, dass Fibrozyten *in vivo* nicht zur Myofibroblastenpopulation beitragen.^{45,47,49,145} Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen hiermit insofern im Einklang, als dass keine Reduktion α -SMA⁺-Zellen beobachtet wurde (Abbildung 20). Einen potenziellen Beitrag von Fibrozyten zur Myofibroblastenpopulation kann sie aufgrund ihrer Konzeption jedoch nicht ausschließen: Auch die vermehrte Transdifferenzierung anderer Zellen zu Myofibroblasten oder verminderte Dedifferenzierung beziehungsweise Zelltod infolge der Fibrozytenausschaltung könnten den Beitrag von Fibrozyten maskieren.

Die Aktivierung von Myofibroblasten wird über eine Vielzahl von Signalwegen komplex reguliert.⁴¹ Die umfassendsten Nachweise für eine Beteiligung an der hepatischen Fibrogenese liegen hierbei für die TGF- β -Superfamilie und PDGF vor, die Ziel der explorativen Analysen dieser Arbeit waren. *Pdgfa* und *Pdgfb* zeigten keine relevanten Regulationen auf transkriptioneller Ebene (Abbildung 19, Abbildung 21B), sodass dieser Signalweg zunächst nicht weiter untersucht wurde. Die TGF- β -Superfamilie umfasst 33 Mitglieder, die über verschiedene, oft wechselwirkende Rezeptoren und Signalwege, pleiotrope biologische Funktionen vermitteln. Für die Aktivierung hepatischer Myofibroblasten wurde eine maßgebliche Rolle von TGF- β 1, in geringerem Umfang auch der anderen Isoformen TGF- β 2 und TGF- β 3, gezeigt.⁴³ Nach erfolgter Bindung und Aktivierung der TGF- β -Rezeptoren Typ I und -II werden hier im sogenannten kanonischen Signalweg die Proteine Smad2 und -3 intrazellulär phosphoryliert und in einem Komplex mit Smad4 in den Zellkern transloziert, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren.¹⁹⁶ Die Expression von Smad7 wird durch diesen Signalweg induziert und hemmt die Signaltransduktion im Sinne einer negativen Feedbackschleife.^{197,198} Die Relevanz dessen wurde im Mausmodell gezeigt. Hier reduzierte die Überexpression von Smad7 die hepatische Fibrogenese im BDL-Modell.¹⁹⁹ Die Zytokine *Tgfb1*, -2 und -3, die Rezeptoren *Tgfb1* und -2 sowie *Smad2*, -3, -4 und -7 zeigten in der vorliegenden Arbeit keine transkriptionelle Regulation infolge der Fibrozytenablation (Abbildung 21A, Abbildung 19). Eine Regulation der kanonischen TGF- β -Signaltransduktion infolge der Fibrozytenablation scheint damit unwahrscheinlich.

Ein anderes an der Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilie beteiligtes Protein, Smad6, zeigte sich jedoch auf transkriptioneller Ebene mehr als doppelt so stark in der Ablationsgruppe exprimiert (Abbildung 19). Smad6 zählt wie auch Smad7 zu den inhibitorischen Smad-Proteinen²⁰⁰, zeigt aber nur eine geringe Aktivität im kanonischen TGF- β -Signalweg.^{201,202} Präferentiell inhibiert Smad6 die Rezeptortyp-1A und -1B vermittelten Signalwege der knochenmorphogenetischen Proteine (engl. *bone morphogenetic proteins*, BMP).^{202,203} Fehlende Regulationen der an der BMP-vermittelten Signaltransduktion beteiligten Gene *Bmp7*, *Grem1* und *Eng* in der *High-Throughput* Genexpressionsanalyse sprechen gegen eine Regulation der BMP-vermittelten Signal-

transduktion infolge der Fibrozytenablation (Abbildung 19). Interessante Perspektiven ergeben sich hingegen aus der Rolle von Smad6 in der nicht-kanonischen Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilie. Es wurde gezeigt, dass Smad6 *in vitro* TGF- β -vermittelte antiinflammatorische Effekte durch die Inhibition des IL-1/TLR-abhängigen *Myeloid differentiation primary response protein MyD88* (MyD88)-NF- κ B-Signalwegs verstärkt.^{204,205} Dies ist im Kontext der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse, da die Aktivierung von hepatischen Myofibroblasten durch PAMPs im Kontext der hepatischen Fibrose über diesen Signalweg nachgewiesen wurde und in der vorliegenden Arbeit Veränderungen der IL-1-Achse infolge der Fibrozytenablation beobachtet wurden (Abbildung 24F, siehe unten). Die vermehrte Translokation bakterieller Endotoxine in die portale Zirkulation zeigt sich regelhaft in Patientinnen und Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und mediiert maßgeblich die Wechselwirkungen zwischen enteralem Mikrobiom und hepatischer Inflammation. Bindet TLR-4 bakterielle Lipopolysaccharide, fungiert MyD88 als Adapterprotein, das die nukleäre Translokation von NF- κ B ermöglicht.²⁰⁶ Diese fördert die Transkription inflammatorischer Gene sowie des *Decoy*-Rezeptors *BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog*, der aktives TGF- β bindet ohne eine entsprechende Signaltransduktion auszulösen und so die Wirkung von TGF- β begrenzt.⁴⁴ Smad6 fördert den Abbau von MyD88 und hemmt die nukleäre Translokation sowie induzierte Genexpression von NF- κ B.^{204,205} Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Smad6 so durch die Inhibition des IL-1/TLR-MyD88-NF- κ B-Signalwegs zur Entkoppelung bakterieller Translokation von hepatischer Inflammation und Fibrogenese beiträgt. Es wurde weiterhin beschrieben, dass Smad6 *in vitro* die TGF- β -vermittelte Apoptoseinduktion von Leberzellen in einem weiteren nicht-kanonischen Signalweg inhibiert.²⁰⁷ Im Mausmodell führte die Ausschaltung von Smad6 zu vermehrter Apoptose von Leberzellen und erhöhter ALT-Aktivität im Serum. Die komplexen Wechselwirkungen der mehrfach positiv und negativ regulierten kanonischen und nicht-kanonischen Signalwege der TGF- β -Superfamilie lassen eine Vielzahl von Hypothesen zu, wie die Fibrozytenablation zu einer differentiellen Regulation von Smad6 führt. Die Rolle in den oben genannten Signalwegen, deren Beteiligung an der Myofibroblastenaktivierung und Leberintegrität *in vivo* gezeigt wurde, unterstreicht die Notwendigkeit, dies in weiteren Untersuchungen zu beleuchten.

4.4.3 Fibrolyse

Fibrolyse stellt einen integralen Prozess des *matrix remodelings* dar, der die Komposition der EZM unabhängig vom Matrixaufbau beeinflusst. Maßgeblich für die Regulation der hepatischen Fibrolyse ist das Verhältnis von MMPs und deren Inhibitoren.⁵⁴ Die bekannte Sekretion von MMP-1, -2, -7, -8 und -9¹²⁵ sowie TIMP-1¹²⁶ durch Fibrozyten stellt damit einen weiteren potenziellen Mechanismus dar, die beobachtete Reduktion der hepatischen Fibrose zu vermitteln. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit deckten darüber hinaus weitere Mediatoren der Fibrolyse ab.

MMP-1 (auch interstitielle Kollagenase) prozessiert im menschlichen Organismus eine Vielzahl von Matrixbestandteilen, darunter Kollagen Typ I, -II und -III. Die Genprodukte der murinen Homologe *Mmp1a* und *Mmp1b* zeigen jedoch nur eine vergleichsweise geringe Übereinstim-

mung mit der Aminosäuresequenz und dem Expressionsprofil der humanen MMP-1.^{208,209} Daten zur Rolle in Nagetiermodellen der hepatischen Fibrose fehlen bislang weitestgehend. In der vorliegenden Arbeit war *Mmp1a* nicht reguliert (Abbildung 19). Aufgrund der großen sequenziellen und funktionellen Ähnlichkeit zu MMP-1 war die erste in Nagetieren identifizierte Kollagenase, MMP-13, als mutmaßliches funktionelles Homolog zur MMP-1 intensiv untersucht worden.⁵⁴ In der vorliegenden Arbeit gehörte *Mmp13* zu den am stärksten hochregulierten Genen der Fibrolyse in der Versuchsgruppe (1,75-fach, Abbildung 19). Da MMP-13 als wichtigste Kollagenase in Nagetieren gilt, erscheint plausibel, dass die Induktion von *Mmp13* das Ausmaß der Fibrose reduziert. Die Daten zur Rolle von MMP-13 in der hepatischen Fibrogenese sind jedoch zum Teil widersprüchlich. Nach BDL zeigten *Mmp13*^{-/-}-Mäuse eine verminderte Fibrogenese.²¹⁰ Die Ausschaltung von MMP-13 hemmte im Mausmodell jedoch auch die spontane Rückbildung einer CCl₄-induzierten Leberfibrose.²¹¹ Es wurde spekuliert, ob die Kollagenaseaktivität von MMP-13 in der Frühphase der Fibrogenese das *matrix remodeling* durch die Aktivierung von Myofibroblasten und proinflammatorischen Mediatoren über die Aktivierung von *connective tissue growth factor* unterstützt.²¹² Die Rolle von MMP-13 im langfristigen Verlauf der Fibrogenese bleibt in weiteren Modellen zu beleuchten. Ob murine Fibrozyten MMP-13 exprimieren, ist bislang unklar. Um die beobachtete Hochregulation zu erklären, wäre mechanistisch der Wegfall eines inaktivierenden Faktors infolge der Fibrozytenablation zu erwarten: Die untersuchten Inhibitoren TIMP-1 und -4 sowie Plasminogenaktivator-Inhibitor-1²¹³ zeigten jedoch keine Konzentrationsunterschiede im Lebergewebe (Abbildung 22). Auch die korrespondierenden Gene zeigten nur geringfügige Regulationen (Abbildung 19). Es fiel auf, dass *Mmp3* ebenfalls eine deutliche Hochregulation (1,9-fach, Abbildung 19) zeigte. Da MMP-3 zur Aktivierung von MMP-13 beitragen kann, lässt sich hier ein mechanistischer Zusammenhang herstellen.²¹⁴ Auch MMP-14 war mit der Aktivierung von MMP-13 in Verbindung gebracht worden, zeigte auf Transkriptionsebene aber nur eine schwache Regulation (Abbildung 19).

Die vorliegende Arbeit zeigt darüber hinaus, dass die fibrozytäre Sekretion von MMP-2 und -8 *in vitro* kein Korrelat in den hier beobachteten hepatischen Proteinkonzentrationen fand (Abbildung 22). MMP-9 wurde als Mediator der Fibrolyse im Mausmodell der CCl₄-induzierten Leberfibrose identifiziert. Zellen aus dem Knochenmark, unter anderem neutrophile Granulozyten, stellten eine wesentliche Quelle dar.^{162,222} In Fibrozyten war *MMP9* außerdem gegenüber Monozyten mehr als 200-fach hochreguliert.⁸² In der vorliegenden Arbeit erlauben die Daten keine abschließende Interpretation des Einflusses der Fibrozytenablation auf die hepatische Konzentration von MMP-9. Es zeigte sich eine große Streuung der jeweiligen Konzentrationen: Das 95 % Konfidenzintervall umfasst sowohl eine relevante Unter- als auch Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch *MMP7* zeigte im Vergleich zu Monozyten eine deutliche Überexpression in Fibrozyten.⁸² Zur Rolle von MMP-7 in der hepatischen Fibrogenese liegen bislang wenig Daten vor, sodass sie zunächst kein Gegenstand der hier gezeigten Untersuchungen war. Klar gezeigt ist insbesondere eine Beteiligung an der Pathophysiologie der biliären Atresie.²¹⁵ Eine Arbeit identifizierte MMP-7 hingegen auch als geeigneten Biomarker für fortgeschrittene Fibrose.²¹⁶ Die Transplantation von Knochenmark führte in Mäusen zur Induktion von *Mmp7*.¹⁷⁶ Weitere Untersuchungen zu MMP-7 und -9 sind daher geboten.

4.4.4 Hepatische Inflammation

Immunmechanismen im inflammatorischen Milieu der geschädigten Leber sind zentrale Treiber der Fibrogenese. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Ausschaltung von Fibrozyten den inflammatorischen Phänotyp im Mausmodell der TAA-induzierten Leberfibrose nicht grundsätzlich verändert. Weder das histopathologische *Grading* (Tabelle 3) noch die objektivierte Auswertung der hepatischen Leukozytenpopulation (Abbildung 23) ergaben signifikante Unterschiede. Für Letztere zeigte sich wiederholt eine Tendenz zu einer verminderten Zahl CD45⁺-Zellen in fibrozytenabladierten Tieren, die sich jedoch auch durch das Fehlen CD45⁺-Fibrozyten erklären könnte. Weiterhin zeigte die Bestimmung zahlreicher inflammatorischer Zytokine, dass keine konsistente Veränderung humoraler, in der Inflammation parallel wirkender, Mediatoren nachweisbar war. Es fand sich kein Korrelat der *in vitro* beobachteten fibrozytären Sekretion von TNF, CXCL1, IL-6 und -10 auf Protein- sowie CCL2, -3 und -4 auf Transkriptionsebene in Leberhomogenisaten. Es zeigten sich einzelne Mediatoren reguliert, die im Folgenden diskutiert werden sollen. Für die in der *High-Troughput* Genexpressionsanalyse deutlich regulierten Transkripte *Tnf*, *Ifng*, *Ccl3* und *Ccl12* soll keine weitere Einordnung vorgenommen werden. Die zunächst beobachteten Regulationen bestätigten sich in nachfolgenden Analysen auf Transkriptions- (Abbildung 25) oder Proteinebene (Abbildung 24) nicht. Auf Transkriptionsebene wird den Ergebnissen der individuellen qPCR-Analysen Vorrang eingeräumt, da hier umfangreiche methodische Validierungen durchgeführt worden waren (siehe Kapitel 2.12).

IL-1 β ist ein prototypisches, hochpotentes inflammatorisches Zytokin. Die signifikante Reduktion der hepatischen Konzentration in der Versuchsgruppe (Abbildung 24F) stellt das stärkste Indiz für eine Veränderung des inflammatorischen Milieus in der vorliegenden Arbeit dar, deren direkter Zusammenhang mit der Fibrozytenablation aufgrund der berichteten Expression von IL-1 β durch Fibrozyten plausibel scheint.¹²⁴ Eine fehlende korrespondierende Regulation von *Il1b* (Abbildung 25A) schränkt die Aussagekraft zwar ein, die Reduktion des biologisch aktiven Proteins stellt, insbesondere angesichts der komplexen, mehrschrittigen Sekretion und Aktivierung des aktiven Zytokins, jedoch den relevanteren Befund dar.²¹⁷ Die isolierte Regulation von IL-1 β ist ein überraschender Befund, funktionell wäre die verminderte Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten sowie eine reduzierte Sekretion weiterer Zytokine wie IL-6 zu erwarten.

OPN ist ein Mediator inflammatorischer und fibrogener Prozesse in der Leber.²¹⁸ Im Lebergewebe von Patientinnen und Patienten mit Leberzirrhose und Mausmodellen CCl₄-induzierter Fibrose war OPN in einer profibrotischen Makrophagenpopulation hochreguliert, interessanterweise zusammen mit VEGF (siehe unten).²¹⁹ Es zeigte sich zudem eine positive Korrelation von OPN mit dem Fibrorestadium im Menschen und in Mausmodellen.^{220,221} Die Überexpression von OPN führte im Mausmodell zu spontaner Fibrose, der Verlust der hepatischen Expression wirkte demgegenüber protektiv im CCl₄- und TAA-Modell.^{220,221} Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Überexpression von OPN in fibrozytenabladierten Tieren (Abbildung 27) steht demnach im Widerspruch mit der verminderten Leberfibrose. Für die Alkohol-assoziierte Lebererkrankung und NAFLD wurden hingegen auch positive Effekte von OPN berichtet.²¹⁸ Diese zunächst widersprüchlichen Beobachtungen in der Literatur sind noch nicht vollends aufgelöst und werden ins-

besondere durch zahlreiche Isoformen von OPN, die distinkte biologische Funktionen ausüben, erschwert.²¹⁸ Es muss beachtet werden, dass der in der vorliegenden Arbeit genutzte Array zwar eine breite Erfassung proteomischer Veränderungen ermöglicht und so eine wertvolle Ergänzung zur Generierung neuer Hypothesen darstellt, die Ergebnisvalidierung aufgrund nichtöffentlicher Antikörperspezifikationen und fehlender Größenauftrennung der Proteine dem Western Blot jedoch unterlegen ist. Insbesondere für OPN sind weitere Analysen unter Beachtung der Isoformen geboten.

VEGF stellt einen maßgeblichen Wachstumsfaktor der Angiogenese dar. Diese ist pathophysiologischer Bestandteil der hepatischen Fibrogenese. Ausmaß, Zeitpunkt und Lokalisation der Gefäßneubildung unterscheiden sich je nach Ätiologie der Lebererkrankung zum Teil deutlich, insbesondere der Progress zur Leberzirrhose ist jedoch uniform durch eine Disruption der vaskulären Architektur mit umfangreicher Neoangiogenese gekennzeichnet.⁶⁰ Fibrozyten können VEGF sezernieren und so potenziell zur Angiogenese beitragen.^{222,223} Spätere Arbeiten zeigten aber auch antiangiogenetische Kapazitäten, unter anderem durch die Sekretion von Thrombospondin 1, und postulierten eine differenziertere Rolle von Fibrozyten in der Regulation der Angiogenese.²²⁴ Auf Proteinebene zeigte sich VEGF in Tieren der Versuchsgruppe verstärkt exprimiert. Obwohl es den Erwartungen einer niedrigeren Konzentration infolge der fehlenden Sekretion durch Fibrozyten widerspricht, unterstützt die Beobachtung eine mögliche komplexere Beteiligung von Fibrozyten in der hepatischen Angiogenese. Auf Transkriptionsebene waren *Vegfa* und das für Thrombospondin 1 kodierende Gen *Thbs1* nicht relevant reguliert (Abbildung 19). Histologisch waren in der Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (Abbildung 28A) keine Veränderungen der Gefäßarchitektur infolge der Fibrozytenablation zu erkennen. Weitere Untersuchungen unter dem Einsatz spezifischer endothelialer Marker könnten dazu beitragen, sich der Rolle von Fibrozyten in der Angiogenese weiter zu nähern.

LTB₄ war in der vorliegenden Arbeit das am stärksten von der Fibrozytenablation beeinflusste hepatische Eicosanoid (Abbildung 26). LTB₄ war in Tieren der Ablationsgruppe deutlich vermindert nachweisbar. Dieses Ergebnis steht insofern im Einklang mit der publizierten Literatur, als dass die Sekretion von LTB₄ in kultivierten Fibrozyten gezeigt wurde.¹²⁸ Interessanterweise zeigte sich unter Ruhebedingungen jedoch keine LTB₄-Sekretion, erst eine Kalziumstimulation führte zu einer nennenswerten fibrozytären LTB₄-Produktion. Dies deutet auf eine spezifische Sekretion unter pathologischen, mit zellulärem Stress assoziierten Bedingungen hin. Weitere Studien zur Sekretion von Eicosanoiden *in vivo* werden hier aber dringend benötigt. LTB₄ gilt als proinflammatorisches Eicosanoid, es wirkt insbesondere chemotaktisch auf Leukozyten.²²⁵ Fibrozyten exprimieren hierbei weder den spezifischen LTB₄-Rezeptor 1 noch den weniger affinen Rezeptortyp 2, sodass die klassischen LTB₄-Rezeptor 1-vermittelten Effekte nicht autokrin wirksam werden können und von einer chemotaktischen Wirkung auf andere Leukozytenpopulationen auszugehen ist, die die hepatische Inflammation aggraviert.¹²⁸ Zwei neuere Arbeiten bestätigen diese Funktion von LTB₄ und zeigen zusätzlich metabolische Effekte auf Hepatozyten, Muskel- und Fettgewebe.^{108,109} LTB₄ führte hier zu Insulinresistenz und hepatischer Steatose. Es war eine direkte Beteiligung der LTB₄-LTB₄-Rezeptor 1-Achse an der hepatozytären Lipogenese nachweisbar, die Inhibition führte zu verbesserter Glukosetoleranz und verminderter Steatose *in vitro*

und im Mausmodell. Die Hinweise auf eine Beteiligung an zentralen pathophysiologischen Prozessen der NAFLD eröffnen angesichts der hier gezeigten Reduktion infolge der Fibrozytenablation spannende Perspektiven hinsichtlich der Rolle von Fibrozyten in metabolisch-bedingten chronischen Lebererkrankungen. Das TAA-Modell der chronisch-toxischen Leberschädigung kann hier aber nur begrenzt herangezogen werden, da die LTB_4 -Spiegel in Mäusen mit hepatischer Steatose in den genannten Publikationen erhöht waren. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch eine Reduktion der LTB_4 -Spiegel in TAA-behandelten Tieren, sodass davon auszugehen ist, dass das TAA-Modell die zugrundeliegenden Mechanismen nicht gleichsam abbildet.

Zuletzt zeigte sich *Cebpb* in der gepoolten Genexpressionsanalyse in der Versuchsgruppe 2,45-fach hochreguliert (Abbildung 19). Das Gen kodiert für verschiedene Isoformen des CCAAT/Enhancer-Binding-Protein β (C/EBP β), die auch als *liver-enriched activator protein* (LAP) und *liver-enriched inhibitory protein* (LIP) bezeichnet werden.²²⁶ C/EBP β fungiert als Transkriptionsfaktor für immunologische und inflammatorische Gene, außerdem ist es unter anderem an Zellproliferation, Adipogenese und Glukoneogenese beteiligt.²²⁷ Es war insbesondere gezeigt worden, dass C/EBP β für das Leberwachstum nach partieller Hepatektomie im Mausmodell benötigt wird.²²⁸ LAP und LIP beeinflussten hier gegenläufig die Zellzyklusprogression, das relative Verhältnis der Isoformen regulierte die Proliferation von Hepatozyten.²²⁹ Im NAFLD-Mausmodell der Methionin- und Cholin-defizienten Diät wurde darüber hinaus eine erhöhte Expression von *Cebpb* sowie beider Isoformen, LAP und LIP, auf Proteinebene beobachtet.²³⁰ Die Überexpression von LAP und LIP verstärkte, die Ausschaltung verminderte die hepatische Steatose sowie Marker des endoplasmatischen Retikulums-Stresses. Kürzlich wurde *Cebpb* in einer *machine learning*-gestützten Auswertung von Genexpressionsdatensätzen von Patientinnen und Patienten mit NAFLD als potenzieller Biomarker identifiziert.²³¹ In einer kleinen Stichprobe von Patientinnen und Patienten mit NAFLD wurde die verminderte Expressionen – im Gegensatz zu den Beobachtungen im Mausmodell – von *Cebpb* im peripheren Blut gegenüber gesunden Vergleichspersonen gezeigt. Die Expression von C/EBP β selbst unterliegt einem komplexen Zusammenspiel von regulierter Transkription und posttranslationalen Modifikationen.²³² Eine mögliche Rolle von Fibrozyten ist hier bislang nicht beschrieben. Um mechanistische Überlegungen zur Überexpression von *Cebpb* im Kontext der Fibrozytenablation zu ermöglichen, sind zunächst weitere Untersuchungen mit Fokus auf die Genprodukte LAP und LIP geboten.

4.4.5 Leberzellschädigung

Die verminderte Aktivität der ALT im Serum fibrozytenabladiert Tiere wurde zunächst als Konsequenz der verminderten Fibrogenese interpretiert. Die verminderte Expression des Todesliganden *Fasl* in der *High-Troughput* Genexpressionsanalyse deutete jedoch auf eine potenzielle Reduktion hepatischen Zelltods hin, die bislang nicht mit Fibrozyten in Verbindung gebracht worden war. Zelltod stellt einen integralen Bestandteil der Pathophysiologie der hepatischen Fibrogenese dar und eine Verminderung könnte ebenfalls die reduzierte ALT-Aktivität im Serum erklären. Auch die beschriebene Hemmung der Apoptoseinduktion durch Smad6 über nicht-kanonische TGF- β -Signaltransduktion und die Regulation von *Cebpb* als Mediator des hepatozytären

Zellzyklus deuten hierauf hin. Wie bereits für die inflammatorischen Zytokine *Tnf*, *Ccl3* und *Ccl12* (siehe Kapitel 4.4.4) bestätigte sich die Regulation von *Fasl* in der qPCR jedoch nicht. Auch in der Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung waren keine Veränderungen der Leberintegrität abzugrenzen. Dies wurde durch die verblindete histopathologische Begutachtung weiter untermauert: Hier zeigten sich auch in den Kategorien A-C des *Grading*, die Apoptosen und Nekrosen beinhalten, keine Unterschiede infolge der Fibrozytenablation (Tabelle 3). Auch die Analyse der pro- und antiapoptotischen Mediatoren Bax und Bcl-2 erbrachte keine konsistenten Hinweise auf eine Beeinflussung durch die Fibrozytenablation. So erlauben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zunächst nicht, weitere Hypothesen bezüglich der Rolle von Fibrozyten in der Leberzellschädigung aufzustellen. Einschränkend ist hier jedoch zu beachten, dass die Analyse der potenziellen Mediatoren nur einen begrenzten Ausschnitt der beteiligten Faktoren abbildet und bekannte Unterschiede in der Art der Leberzellschädigung zwischen Mausmodellen der chronisch-toxischen Leberschädigung und chronischen Lebererkrankungen des Menschen bestehen.¹⁵³

4.5 Einordnung in die bestehende Forschung

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die spezifische Ausschaltung von Fibrozyten in einem Modell der Leberfibrose. Sie fügt damit einen neuen Ansatz zur wissenschaftlichen Debatte hinzu, der in folgenden Arbeiten zu reproduzieren und einzuordnen ist. Vergleiche mit *fate-tracing*-Studien oder indirekten Ausschaltungsmodellen müssen mit großer Vorsicht angestellt werden. Nichtsdestotrotz können sie in Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Kontext schaffen, Limitationen verdeutlichen und translationale Perspektiven eröffnen.

4.5.1 Untersuchungen zur Leberfibrose

Fate tracing-Untersuchungen mit Reporter-Knochenmarkchimären bezifferten den Anteil von Fibrozyten an der fibrogenen Zellpopulation über verschiedene Modelle der Leberfibrose hinweg mit 4-10 %.^{46,49,145} Es erscheint plausibel, dass die Ausschaltung von Fibrozyten in der vorliegenden Arbeit zu einer Reduktion des Narbengewebes in einer Größenordnung, die ihrem relativen Anteil an der fibrogenen Zellpopulation entspricht, führt. Der bisherige Forschungsstand besagte aber keineswegs, dass ein solcher linearer Zusammenhang zwangsläufig zu erwarten wäre. Die im Vergleich zu anderen fibrogenen Zellpopulationen, insbesondere Myofibroblasten, gezeigte geringe Sekretion von Matrixbestandteilen könnten einen niedrigeren Beitrag, Wechselwirkungen mit anderen Zellpopulationen einen höheren Beitrag von Fibrozyten begründen.¹²³ Nicht zuletzt muss ebenso bedacht werden, dass die Vielzahl von direkt an der hepatischen Fibrogenese beteiligten Zellpopulationen für eine biologische Redundanz der fibrogenen Mechanismen spricht, die eine Kompensation bei Ausschaltung einer Population ermöglichen würde. Dies erschwert die direkte Korrelation der oben genannten, im weitesten Sinne Beobachtungsstudien, mit dem hier gezeigten interventionellen Ansatz in einem komplexen biologischen System.

Die bislang einzige weitere publizierte Arbeit, die anstrebt, den Beitrag von Fibrozyten zur hepatischen Fibrogenese durch eine Ausschaltung zu charakterisieren, wurde von Ozono *et al.* veröffentlicht.²³³ Es sind jedoch einige Kontroversen hinsichtlich der Versuchsdurchführung und -auswertung zu beachten. Die Ablation von Fibrozyten sollte indirekt über die Ausschaltung ihrer Vorläuferzellen durch die intravenöse Gabe von Dinatriumclodronat in liposomaler Formulierung erreicht werden. Liposomales Clodronat wird von Makrophagen, unter anderem in der Leber und Milz, phagozytiert und intrazellulär freigesetzt, wo es dosisabhängig Apoptose initiiert.²³⁴ Differenzierte Fibrozyten phagozytieren, zumindest *in vitro*, kein liposomales Clodronat.²³⁵ Inwieweit auch monozytäre Vorläuferzellen der Makrophagen ausgeschaltet werden, ist umstritten. Während zunächst nur eine partielle Wirksamkeit berichtet wurde, beschrieb eine spätere Studie die fast vollständige Ablation monozytärer Zellen.^{236,237} Da die exakten Mechanismen der Differenzierung von Fibrozyten weitgehend ungeklärt bleiben (siehe Kapitel 1.3.3), birgt dieser erstmals eingesetzte Ansatz der Fibrozytenausschaltung potenzielle Limitationen. Insbesondere die Möglichkeit einer nicht-monozytären Vorläuferpopulation der Fibrozyten muss bedacht werden.⁹¹ Auch unter der Annahme, dass die Vorläuferpopulation von der Intervention erfasst wird, bleibt unklar, inwieweit die Expansion der Fibrozytenpopulation unter pathologischen Bedingungen auf der Differenzierung von Vorläuferzellen oder der Teilung differenzierter Fibrozyten beruht und damit der Ausschaltung der Vorläuferzellen zugänglich ist. Zuletzt bleibt die Latenz, mit der sich eine mögliche Depletion der Vorläuferzellen auf die hepatische Fibrozytenpopulation auswirkt, unklar. Dies ist besonders durch den gezeigten frühzeitigen Einstrom von Fibrozyten im CCl₄-Modell von Bedeutung.¹¹⁹ Ozono *et al.* zeigten nichtsdestotrotz den deutlichen Rückgang CD45⁺/Col1⁺-Zellen mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie, wobei die in Kapitel 4.2.2 genannten Limitationen dieser Antikörper-basierten Nachweisverfahren beachtet werden müssen. Es fällt zusätzlich auf, dass die Autoren von etablierten Protokollen für die Durchflusszytometrie abweichen und mononukleäre Zellen in einem für Fibrozyten nie validierten Verfahren anreichern. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hepatische Makrophagenpopulation Ziel der intravenösen Gabe von liposomalem Clodronat ist, es handelt sich somit nicht um eine spezifische Ausschaltung von Fibrozyten. Inwieweit zusätzlich Fibrozyten durch die Ausschaltung monozytärer Vorläuferzellen betroffen sind, bleibt zweifelhaft. Anschließend wurde über vier Wochen mittels CCl₄ eine Fibrose in C57BL/6-Mäusen induziert.

Es zeigte sich, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, kein statistisch signifikanter Rückgang der hepatischen Fibrose in der Versuchsgruppe. Hauptzielparameter der Autoren war die morphometrische Analyse histologischer Schnitte, über eine direkte Quantifizierung des hepatischen Kollagengehalts wurde nicht berichtet. In der Morphometrie zeigt sich eine tendenzielle Verringerung der gefärbten Fläche infolge der Clodronatgabe, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Eine gegenüber der vorliegenden Arbeit geringere Teststärke mit acht Tieren in der Versuchsgruppe bietet hier eine mögliche Erklärung, genauere Analysen der statistischen Auswertung sind anhand der Publikation jedoch leider nicht möglich: Die Autoren machen keine Aussage zur Varianz der Gruppen (es wird lediglich der Standardfehler genannt), es wird außerdem kein *p*-Wert angegeben. Die Untersuchung steht damit primär im Widerspruch zu Vorarbeiten, die deutliche Alterationen der hepatischen Fibrogenese nach Ausschaltung CD11b⁺-Makrophagen zeigten.³³ Unter der

Annahme der zusätzlichen Ausschaltung von Fibrozyten steht die Arbeit von Ozono *et al.* außerdem in einem gewissen Widerspruch zu der vorliegenden Arbeit. Während prinzipiell das abweichende Modell der Fibroseinduktion einen möglichen Erklärungsansatz darstellt, erscheinen die Wechselwirkungen mit der Ausschaltung hepatischer Makrophagen sowie die abweichende Auswertung vordergründig für die divergenten Beobachtungen.

4.5.2 Weitere fibrotische Entitäten

Auch in anderen Organsystemen beschränkt sich der aktuelle Stand der Forschung zumeist auf Untersuchungen zu der Präsenz von Fibrozyten. Einzelne Publikationen zeigen dennoch interessante Ansätze zur Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf. Umfangreiche Untersuchungen liegen zur Rolle von Fibrozyten in fibrosierenden Lungenerkrankungen vor. Ihr Anteil an der fibrogenen Zellpopulation wird hier deutlich höher eingeschätzt als bei der Leberfibrose.¹³⁷ Eine spezifische Ausschaltung zum Nachweis des Beitrags von Fibrozyten wurde bislang jedoch nicht berichtet, lediglich der Effekt der Hemmung der Fibrozytendifferenzierung durch PTX-2 wurde gezeigt (siehe Kapitel 4.6.1). Kleaveland *et al.* strebten an, direkte Effekte der Matrixproduktion von Fibrozyten von parakrinen Effekten auf andere Effektorzellen abzugrenzen.¹⁸⁶ Sie schalteten dazu in einem Mausmodell *Coll1a1* in allen hämatopoetischen Zellen aus. Es wurde gezeigt, dass die fehlende Expression von Kollagen Typ I durch Fibrozyten keinen Einfluss auf das Ausmaß der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose hat. Auch wenn *Coll1a1* nur eines der für die Fibrogenese relevanten Gene darstellt, deutet diese Beobachtung auf eine maßgebliche Rolle der parakrinen Effekte von Fibrozyten hin. In einem Mausmodell der Nierenfibrose wurde ein Beitrag von Fibrozyten zu der Myofibroblastenpopulation von über 30 % beobachtet.²³⁸ Eine kleinere Population, die mutmaßlich Fibrozyten entspricht, ließ sich darüber hinaus in der Einzelzellanalyse humaner Proben nachweisen.²³⁹ Die Ablation CD11b⁺-Zellen des Knochenmarks erlaubte, Fibrozyten in einem Mausmodell der Nierenfibrose erfolgreich auszuschalten.¹¹⁵ Es zeigte sich, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ein funktioneller Beitrag zur Fibrogenese. Erneut handelte es sich aber nicht um eine spezifische Ausschaltung von Fibrozyten. Auch infiltrierende Monozyten waren betroffen, wodurch die Interpretation hinsichtlich des Beitrags von Fibrozyten limitiert wird.

4.6 Ausblick

Das dynamische Feld der Leberfibrose verspricht in den kommenden Jahren spannende Entwicklungen. Die vorliegende Arbeit hat Pilotcharakter, es gilt in nachfolgende Untersuchungen die Ergebnisse einzuordnen, offene Fragen zu adressieren und den positiven Effekt der Fibrozytenausschaltung gegebenenfalls translational nutzbar zu machen. In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen sich bereits jetzt Implikationen für zukünftige antifibrotische Therapien. Parallel eröffnen neuartige experimentelle Techniken das Potenzial, das Verständnis von Fibrozyten in der hepatischen Fibrose zu erweitern.

4.6.1 Fibrozyten in antifibrotischen Therapien

Wirksame antifibrotische Therapien bergen ein enormes Potenzial, die Morbidität und Mortalität chronischer Lebererkrankungen zu senken. Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte funktionelle Beitrag von Fibrozyten wirft die Frage nach dem translationalen Potenzial der Fibrozytenausschaltung auf. Während der hier gezeigte Versuchsaufbau für einen direkten Einsatz in der Humanmedizin nicht infrage kommt, erscheint eine gezielte pharmakologische Ausschaltung im Menschen perspektivisch denkbar. Exemplarisch wurde unlängst die Ausschaltung kardialer Fibroblasten durch *in vivo* generierte chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen gezeigt.²⁴⁰ Auch HSCs in der Leber wurden als potenzielles Ziel dieser Methode bestätigt.²⁴¹

Theoretisch erfüllen Fibrozyten mehrere der Ansprüche, die an ein ideales Ziel antifibrotischer Therapien formuliert wurden.⁶⁰ Nach bisherigem Kenntnisstand ist die Proliferation und hepatische Migration von Fibrozyten weitgehend krankheitsspezifisch. Physiologisch sind kaum Fibrozyten in der Zirkulation oder dem Leberparenchym nachweisbar. Auch wenn die Kombination immunologischer und mesenchymaler Eigenschaften in einer einzelnen Zelle bislang einzigartig ist, besteht eine große biologische Redundanz der jeweiligen Funktionen. Dies unterscheidet Fibrozyten grundsätzlich von HSCs und portalen Fibroblasten als lebereigene fibrogene Zellpopulationen. Aufgrund ihrer Funktionen im Vitamin A-Stoffwechsel beziehungsweise der strukturellen Integrität des biliären Systems sind sie essenziell für die Leberhomöostase und stellen daher nur in ihrer pathologischen Aktivierung einen therapeutisch nutzbaren Angriffspunkt für antifibrotische Therapien dar. Darüber hinaus können aufgrund der immunologischen und mesenchymalen Funktionen von Fibrozyten potenziell mehrere fibrogene Prozesse zeitgleich gehemmt werden. Gegen Fibrozyten als Angriffspunkt antifibrotischer Therapien sprach bislang vordergründig ihr gegenüber HSCs mutmaßlich geringer quantitativer Beitrag zur Matrixproduktion. Weiterhin weckt der zeitliche Verlauf des Auftretens von Fibrozyten im Tiermodell der Leberfibrose Zweifel an einer möglichen therapeutischen Effektivität. Während hier vornehmlich in der Frühphase der Leberschädigung Fibrozyten nachweisbar waren¹¹⁹, steht klinisch die Hemmung des weiteren Fortschreitens und idealerweise Rückbildung einer über Jahre und Jahrzehnte bestehenden Fibrose im Vordergrund. Der Nachweis eines funktionellen Beitrags zur hepatischen Fibrogenese in der vorliegenden Arbeit liefert einen wichtigen Beitrag zu dieser Debatte und unterstreicht das translationale Potenzial von Fibrozyten als Angriffspunkt antifibrotischer Therapien.

Die präklinische Identifizierung antifibrotischer Wirkstoffe ist ein dynamisches Forschungsfeld, das sich rapide verändert. Neue Technologien ermöglichen die Lücke zwischen Zellkultur und Tiermodell zu überbrücken: Organoide sind dreidimensionale Kultursysteme sich erneuernder Stammzellen, die sich organähnlich organisieren.²⁴² Über eine hepatozytäre und biliäre Kodifferenzierung wurde bereits berichtet.²⁴³ *Organ-on-a-chip*-Modelle verwenden inzwischen kombinierten biologischen 3D-Druck aus Hepatozyten, HSCs und Endothelzellen zur zunehmend komplexeren Nachahmung der hepatischen Architektur von Gallen- und Blutwegen.²⁴⁴ *Precision-cut liver slices* aus primärem Gewebe wie OP-Präparaten oder Nagetieren können in Bioreaktoren kultiviert werden. Nachdem diese zunächst primär für pharmakodynamische und toxikologische Untersuchungen eingesetzt wurden²⁴⁵, können weiterentwickelte Reaktoren Gewebe für bis zu

sechs Tage kultivieren und Fibrogenese stimulieren. Diese werden inzwischen kommerziell als präklinisches Modell zur Medikamentenentwicklung eingesetzt.²⁴⁶ Gemein ist allen genannten Modellen bislang das Fehlen infiltrierender Zellen aus der Zirkulation, wie beispielsweise Fibrozyten. Diese Limitation muss insbesondere in zukünftigen Untersuchungen zur Fibrogenese berücksichtigt werden.

Es gilt in der Zukunft, Transferpotenziale antifibrotischer Therapien anderer Entitäten bestmöglich für die hepatische Fibrose zu nutzen. Die Hemmung der Fibrozytendifferenzierung durch PTX-2 wurde als Therapie der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) und Fibrose des Knochenmarks (Myelofibrose) untersucht. Für weitere zugelassene oder in Erprobung befindliche Wirkstoffe wurde, wie im Folgenden diskutiert, eine Interferenz mit der Biologie der Fibrozyten gezeigt. Die Beteiligung von Fibrozyten im Wirkmechanismus der Therapien sollte hier besondere Aufmerksamkeit erfahren, da sie als nicht-organspezifische fibrogene Zellen mutmaßlich weitgehend uniforme biologische Funktionen über verschiedene fibrotische Entitäten hinweg ausüben.

PTX-2

Das Potenzial von PTX-2, die Differenzierung von Fibrozyten zu inhibieren (siehe Kapitel 1.3.3), führte zur Entwicklung eines rekombinanten humanen PTX-2 (rhPTX-2, auch Zinpentraxin alfa, PRM-151, RG6354 oder RO7490677) für die pharmazeutische Anwendung. Am weitesten fortgeschritten ist die klinische Erprobung für die Indikation IPF. Bereits kurz nach der Identifizierung von PTX-2 als Inhibitor der Fibrozytendifferenzierung wurde die antifibrotische Aktivität in verschiedenen Mausmodellen der Lungenfibrose gezeigt.²⁴⁷⁻²⁴⁹ Eine Phase I-Studie zeigte den Anstieg der PTX-2-Plasmakonzentration nach intravenöser Gabe von rhPTX-2, der mit einem Rückgang zirkulierender Fibrozyten um etwa 50 % nach 24 h in Freiwilligen mit IPF einherging.²⁵⁰ In einer 28-wöchigen, randomisiert-kontrollierten Phase II-Studie führte die vierwöchentliche intravenöse Gabe von rhPTX-2 zu einer verlangsamten Abnahme der forcierten Vitalkapazität von Patientinnen und Patienten mit IPF²⁵¹, in einem ähnlichen Ausmaß wie die zugelassenen Wirkstoffe Nintedanib und Pirfenidon.²⁵² Eine 52-wöchige internationale, multizentrische, randomisiert-kontrollierte Phase III-Studie läuft zur Zeit (Tabelle 4).

Weiterhin befindet sich rhPTX-2 aktuell auch zur Behandlung der Myelofibrose in klinischer Erprobung. Die präklinischen Daten sind vielversprechend. Es zeigten sich vermehrt Fibrozyten im Knochenmark von Patientinnen und Patienten mit primärer Myelofibrose und in einem Mausmodell der Myelofibrose.¹³⁶ PTX-2 war im Serum von Patientinnen und Patienten mit Myelofibrose vermindert, *ex vivo* reduzierte die Zugabe von PTX-2 die Fibrozytenzahl.¹³⁶ Die Hemmung der Differenzierung von Fibrozyten durch PTX-2 führte im Mausmodell zu einem Rückgang der Fibrozyten im Knochenmark, verminderter Fibrose und längerem Überleben der Versuchstiere. Nach Beendigung der PTX-2-Gabe zeigte sich – wie in unbehandelten Tieren – ein tödlicher Verlauf der Myelofibrose. Die Analyse der Fibrozyten im Knochenmark zeigte, dass diese bekannte Treibermutationen der Myelofibrose trugen und sich klonal vermehrten. Es wurde eine zweistufige Phase II-Studie (Tabelle 4) durchgeführt. Zunächst wurde rhPTX-2 allein oder in Kombination mit dem für die Behandlung der Myelofibrose zugelassenen Januskinase-Inhibitor

Ruxolitinib in verschiedenen Applikationsschemata geprüft, in der zweiten Stufe kam rhPTX-2 als Monotherapie in drei Dosierungen zum Einsatz. Die Ergebnisse beider Stufen sind bislang lediglich auf Fachkongressen vorgestellt worden, eine vollständige Veröffentlichung der Ergebnisse bleibt abzuwarten.^{253,254}

▼ **Tabelle 4 | Ausgewählte antifibrotische Wirkstoffe in der klinischen Erprobung.**

Wirkstoff	Ausgewählter Wirkmechanismus	Indikation	Primärer Endpunkt	Phase	Registrierung
rhPTX-2	Hemmung der Fibrozyten-differenzierung	IPF	Veränderung der forcierten Vitalkapazität	III	NCT04552899 (STARSCAPE)
rhPTX-2 Ruxolitinib		Primäre/Post-Polycythaemia vera/ Post-Essenzielle Thrombozythämie-Myelofibrose	Ansprechrate nach IWG-MRT (Stufe 1), Änderung der Myelofibrose um mindestens eine Stufe (Stufe 2)	II	NCT01981850
CVC	Hemmung der Fibrozytenmigration über CCR2/-5	NASH-Fibrose	Verbesserung der Leberfibrose um mindestens eine Stufe ohne Verschärfung der inflammatorischen Aktivität	III	NCT03028740 (AURORA)
		Primär-sklerosierende Cholangitis	Veränderung der alkalischen Phosphatase im Serum	II	NCT02653625 (PERSEUS)
CVC Tropifexor		NASH-Fibrose	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen	II	NCT03517540 (TANDEM)
Elotuzumab	Ausschaltung SLAMF7 ⁺ -Zellen	JAK2 ^{V617F} -mutierte primäre/Post-Polycythaemia vera/ Post-Essenzielle Thrombozythämie-Myelofibrose	Ansprechrate nach IWG-MRT	II	NCT04517851

Die Tabelle zeigt ausgewählte Wirkstoffe in der klinischen Erprobung, deren Wirkmechanismus einen Bezug zu Fibrozyten zeigt. Studiendaten abgerufen unter <https://clinicaltrials.gov>. CCR, C-C-Motif Chemokinrezeptor; CVC, Cenicriviroc; IPF, Idiopathische pulmonale Fibrose; IWG-MRT, International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment; NASH, Nicht-alkoholische-Steatohepatitis; rhPTX-2, rekombinantes humanes Pentraxin-2; SLAMF7, Signaling lymphocytic activation molecule F7.

Mechanistisch bleibt unklar, inwieweit die Rolle von PTX-2 im angeborenen Immunsystem (siehe Kapitel 1.3.3) neben der Hemmung der Fibrozytendifferenzierung zu der Wirkung von rhPTX-2 beiträgt. Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass PTX-2 in einem Mausmodell fibrotischer Nierenschädigung mit Epithelzellen interagiert und dort die Aktivität des Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein-1 über c-Jun inhibiert.²⁵⁵ Es muss weiterhin bedacht werden, dass PTX-2 ubiquitär in Amyloidablagerungen bei Amyloidose und Morbus Alzheimer identifiziert

wurde und hier eine stabilisierende Wirkung vermutet wird.^{256,257} In einem Versuch, Amyloidablagerungen bei viszeraler Amyloidose durch die Elimination von PTX-2 dem körpereigenen Abbau zugänglich zu machen, wurde ein PTX-2-Inhibitor, der die Plasmaspiegel um > 95 % reduzierte, für bis zu zwei Jahre eingesetzt ohne dass signifikante Nebenwirkungen berichtet worden wären.^{258,259} Es wurden insbesondere keine fibrotischen Erkrankungen angegeben. Pilling *et al.* hatten im Gegensatz dazu vermehrte Fibrose in einem Mausmodell der Lungenfibrose unter Ausschaltung von PTX-2 gezeigt.²⁶⁰ Eine Phase IIb-Studie zur PTX-2-Inhibition bei Morbus Alzheimer (ISRCTN13656673) läuft aktuell. Auch das Nebenwirkungsprofil der intravenösen rhPTX-2-Gabe erscheint bislang günstig. Die häufigste Nebenwirkung in der Phase II-Studie für IPF war Husten (18 % versus 5 % in der Placebogruppe). Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse traten in der Placebogruppe numerisch häufiger auf, kein Ereignis der rhPTX-2-Gruppe wurde mit der Studienmedikation in Verbindung gebracht.²⁵¹ Placebo-kontrollierte Daten zu unerwünschten Ereignissen liegen aktuell nur für den 28-wöchigen Studienzeitraum vor, in der anschließenden *open-label*-Extensionsphase erhielten alle Teilnehmenden rhPTX-2. Hier liegen Ergebnisse für bis zu 128 Wochen Behandlung vor, es ergaben sich keine weiteren Sicherheitsbedenken.^{261,262} Die Bestimmung von Fibrozyten im peripheren Blut unter PTX-2-Gabe und -Elimination könnte neue Erkenntnisse zur funktionellen Relevanz der Differenzierungshemmung durch PTX-2 liefern.

Über eine klinische Erprobung von rhPTX-2 in der hepatischen Fibrose wurde bislang nicht berichtet. Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte funktionelle Beitrag von Fibrozyten unterstreicht das Potenzial einer Differenzierungshemmung von Fibrozyten *in vivo*. Für eine therapeutische Applikation von rhPTX-2 spricht weiterhin, dass die Serumspiegel von PTX-2 in einer NAFLD-Kohorte negativ mit dem histologischen Fibrorestadium und der Lebersteifigkeit korrelierten.²⁶³ PTX-3, das gegenläufig zu PTX-2 die Fibrozytendifferenzierung fördert, war in Patientinnen und Patienten mit NAFLD hingegen erhöht und korrelierte positiv mit dem Fibrorestadium.^{264,265} Cong *et al.* berichteten nach rhPTX-2-Gabe die Reduktion der hepatischen Fibrose um etwa 50 % im BDL- und CCl₄-Mausmodell der Leberfibrose.²⁶⁶ Die Ergebnisse wurden bislang jedoch lediglich auf einem Fachkongress vorgestellt. rhPTX-2 und ein alternativer, synthetisch hergestellter Ligand des PTX-2-Rezeptors CD209 wirkte in Mausmodellen der NAFLD ebenfalls antifibrotisch.^{267,268} Die ermutigenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die klinischen Erfahrungen mit rhPTX-2 für andere fibrotischen Entitäten zeigen eine Wissenslücke hinsichtlich der antifibrotischen Wirksamkeit von PTX-2 und seiner Rezeptoren in der hepatischen Fibrogenese auf, die es durch zukünftige Untersuchungen zu schließen gilt.

CVC

Cenicriviroc (CVC) ist ein spezifischer, oral verabreichbarer Inhibitor von CCR2 und -5. Es zeigte sich eine antifibrotische Aktivität in verschiedenen Tiermodellen der chronisch-toxischen Leberschädigung und NAFLD.²⁶⁹⁻²⁷² Es wird vermutet, dass die verminderte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen über CCR2 die hepatische Inflammation als fibrogenen Stimulus reduziert. Die präklinischen Beobachtungen zur Wirkung von CVC auf die hepatische Inflammation sind jedoch uneindeutig. In einem *Western Diet*-Mausmodell, das die metabolischen Verän-

derungen der NAFLD nachahmt, zeigte sich eine reduzierte Zahl infiltrierender Makrophagen, die mit einer Verbesserung der Steatohepatitis einherging.²⁷¹ In einem anderen Mausmodell der NAFLD war eine signifikant reduzierte Fibrose ohne Besserung der hepatischen Inflammation im histopathologischen *Grading* nachweisbar.²⁷² Diese Diskordanz aus verbesserter Fibrose ohne reduzierte inflammatorische Aktivität entspricht den Ergebnissen der klinischen Erprobung am Menschen: Eine Phase IIb-Studie für die Indikation NASH verlief formal negativ, der primäre Endpunkt einer histologischen Verbesserung der hepatischen Inflammation ohne Progression des Fibroestadiums wurde nicht erreicht.²⁷³ In der Analyse der sekundären Endpunkte zeigte sich unter CVC jedoch ein größerer Anteil von Teilnehmenden, die eine Verbesserung der Fibrose ohne Verschlechterung der hepatischen Inflammation erfuhren. Einige Autoren vermuteten deshalb direkte Effekte von CVC auf HSCs. Hierzu liegen jedoch nur wenige *in vitro*-Daten mit widersprüchlichen Ergebnissen vor.^{271,272} Kürzlich wurde eine Phase III-Studie initiiert, die im ersten Teil die Verbesserung der Fibrose ohne verschärfte inflammatorische Aktivität in Patientinnen und Patienten mit NASH und Leberfibrose Stadium F2-3 nach einem Jahr prüfte (Tabelle 4).²⁷⁴ Die Studie wurde nach Auswertung dieses Teils aufgrund mangelnder Effektivität vorzeitig abgebrochen, die Daten sind bislang nicht veröffentlicht. Trotz der insgesamt enttäuschenden Ergebnisse der klinischen Erprobung von CVC sind in den kommenden Jahren weitere Studien, insbesondere in Kombinationstherapien, zu erwarten. Eine erste solche Studie läuft bereits (Tabelle 4).²⁷⁵

Die Wirkung von CVC auf Fibrozyten wurde bislang nicht untersucht. Fibrozyten exprimieren CCR2 und -5 (siehe Kapitel 1.3.4). Eine *fate-tracing*-Untersuchung in einem Mausmodell der CCl₄-induzierten Leberfibrose zeigte in *Ccr2*^{-/-}-Mäusen eine um 50 % verminderte Migration von Fibrozyten in die Leber.¹¹⁹ Es kann daher angenommen werden, dass CVC den Einstrom von Fibrozyten in die Leber hemmt. Dies ist mit den bisherigen Beobachtungen aus den präklinischen Untersuchungen zu CVC vereinbar. Diese Arbeiten nutzten zur Identifizierung von Monozyten und Makrophagen unterschiedliche Kombinationen der Marker CD45, F4/80, CD11b und Ly-6C.²⁶⁹⁻²⁷² Alle diese Marker werden auch von Fibrozyten exprimiert.^{75,81,84,85} Inwieweit die zum Teil genutzten *Gating*-Strategien der Durchflusszytometrie anhand der Expressionsmuster der einzelnen Marker eine Abgrenzung erlauben, bleibt zu untersuchen. Es kann jedoch die Hypothese aufgestellt werden, dass die Hemmung der Fibrozytenmigration über CCR2 einen Mechanismus der antifibrotischen Wirkung von CVC darstellt. Die ausbleibende direkte Sekretion von Matrixbestandteilen durch Fibrozyten könnte die beobachtete antifibrotische Wirkung ohne adäquate Reduktion der hepatischen Inflammation erklären. Weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus von CVC sind hier geboten.

Nintedanib

Nintedanib ist ein oral verfügbarer Tyrosinkinasehemmer mit Aktivität gegen die Rezeptoren von VEGF, PDGF und FGF. Nintedanib ist in Deutschland zur Behandlung der IPF, interstitiell fibrosierender Lungenerkrankungen auf dem Boden einer systemischen Sklerose oder anderer Ätiologien sowie in Kombination mit Docetaxel zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen, metastasierten oder lokal rezidierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zugelassen. Die

kombinierte Hemmung mehrerer komplexer Signalwege führt zu einer Vielzahl potenzieller antifibrotischer Mechanismen, deren Ausmaß und Anteil bislang nur unvollständig erfasst sind.²⁷⁶ Sato *et al.* zeigten, dass Nintedanib die Differenzierung und Migration von Fibrozyten *in vitro* und im Mausmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose hemmt.²⁷⁷ In einer weiteren Arbeit zeigten pulmonale Fibrozyten aus einem TGF- α -Mausmodell der Lungenfibrose *ex vivo* eine größere Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli im Vergleich zu Fibrozyten aus Wildtyp-Mäusen.²⁷⁸ Die Autoren postulierten, dass verminderte Apoptose zur Akkumulation von Fibrozyten im fibrogenen Milieu beitragen kann. Die Zugabe von Nintedanib führte zu vermehrter Apoptose von Fibrozyten *in vitro* und *in vivo* im TGF- α -Mausmodell. Cutolo *et al.* berichteten außerdem, dass *ex vivo* kultivierte Fibrozyten von Patientinnen und Patienten mit systemischer Sklerose gegenüber Fibrozyten von gesunden Vergleichspersonen signifikant höhere Expressionen von Kollagen Typ I und α -SMA auf Transkriptions- und Proteinebene aufwiesen.²⁷⁹ Die Zugabe von Nintedanib reduzierte *in vitro* die Expression beider Marker. Dies deutet auf eine Hemmung der Matrixproduktion und Transdifferenzierung zu Myofibroblasten von Fibrozyten durch Nintedanib hin. Die genannten Arbeiten legen Indizien für Fibrozyten-medierte antifibrotische Wirkmechanismen von Nintedanib vor, die potenziell auch die hepatische Fibrogenese günstig beeinflussen könnten. Erste präklinische Arbeiten zeigten antifibrotische Effekte von Nintedanib in Mausmodellen der CCl₄-induzierten Leberfibrose und NAFLD.^{280,281} Spezifische Untersuchungen zur Wirkung von Nintedanib auf Fibrozyten im Kontext der Leberfibrose liegen bislang jedoch nicht vor.

Elotuzumab

Elotuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen das Oberflächenantigen *signaling lymphocytic activation molecule* F7 (SLAMF7) gerichtet ist. Elotuzumab ist in Deutschland zur Zweitlinienbehandlung des Multiplen Myeloms, in Kombination mit Lenalidomid oder Pomalidomid und Dexamethason, zugelassen. SLAMF7 wird von Fibrozyten exprimiert und wurde als Marker identifiziert, der Fibrozyten von Makrophagen abgrenzen kann.^{100,235} Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass ein Anteil der monozytären Vorläuferzellen von Fibrozyten SLAMF7 trägt und SLAMF7⁺-Monozyten im peripheren Blut von Myelofibrose-Erkrankten erhöht waren.^{100,282} Der Anteil von SLAMF7⁺-Monozyten korrelierte bei Patientinnen und Patienten mit JAK2^{V617F}-Mutation – eine der drei bekannten Treibermutationen der Myelofibrose – mit der Mutationslast im peripheren Blut und in kultivierten Fibrozyten.²⁸² Elotuzumab hemmte *in vitro* die spontane und Romiplostim-induzierte Differenzierung von Fibrozyten gesunder und an Myelofibrose erkrankter Versuchspersonen. In einem Mausmodell der Romiplostim-induzierten Myelofibrose reduzierte Elotuzumab das Ausmaß der Fibrose signifikant.²⁸² Zuletzt wurde eine Pilotstudie für Patientinnen und Patienten mit Myelofibrose und JAK2^{V617F}-Mutation, die nicht für eine Behandlung mit Januskinase-Inhibitoren infrage kommen, initiiert (Tabelle 4).²⁸³ Es bleibt bislang unklar, inwieweit die vielversprechenden präklinischen Ansätze mutationsspezifisch sind. Die Bestimmung und Charakterisierung SLAMF7⁺-Zellen der Leber und des peripheren Blutes könnten Aufschlüsse über das translationale Potenzial in der hepatischen Fibrogenese geben.

Omalizumab

Omalizumab ist ein monoklonaler anti-Immunglobulin E-Antikörper, der in Deutschland für die Behandlung von schwerem allergischem Asthma bronchiale, chronischer spontaner Urtikaria und chronischer Rhinosinusitis mit Nasenpolypen zugelassen ist. Wang *et al.* zeigten einen potenziellen Beitrag von Fibrozyten zur Wirkung von Omalizumab bei schwerem allergischem Asthma bronchiale. Fibrozyten migrieren hier in die Lunge und transdifferenzieren zu pulmonalen Myofibroblasten. Die CXCR4/CXCL12- und CCR7/CCL9-Achse spielen dafür eine wichtige Rolle.²⁸⁴ IL-33 und IL-13 führen in Fibrozyten von Patientinnen und Patienten mit Asthma bronchiale über das Protein *IL-1 receptor-like 1* synergistisch zur Induktion von CXCR4 und CCR7 sowie zur verstärkten Transdifferenzierung in α -SMA⁺-Myofibroblasten.²⁸⁵ Omalizumab reduzierte die IL-33- und IL-13-Spiegel in diesen Patientinnen und Patienten und wirkte sich positiv auf Lungenfunktion und *tissue remodeling* aus. Die Zahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut sank nach dreimonatiger Behandlung mit Omalizumab stark ab. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass die Wirkung zum Omalizumab sich in Teilen durch die verminderte IL-33/-13-vermittelte Migration und Transdifferenzierung von Fibrozyten erklärt. Unterstützt wird diese These von der Beobachtung, dass nicht nur die Zahl der Fibrozyten unter der Therapie mit Omalizumab zurückgeht, sondern auch deren Expression von CXCR4 und CCR7 *in vivo*. Die Autoren präsentieren überzeugende Indizien für eine IL-33/-13-vermittelte Regulation der Fibrozytenmigration über die CXCR4/CXCL12- und CCR7/CCL9-Achse. Inwieweit diese, neben der *in vitro* gezeigten IL-33/-13-abhängigen Transdifferenzierung, kausal zur Wirkung von Omalizumab bei schwerem allergischem Asthma bronchiale beiträgt, ist hiermit nicht belegt, sicherlich aber ein spannender Ansatz für weitere Untersuchungen.

4.6.2 Diagnostische Bedeutung zirkulierender Fibrozyten

Das Fehlen zuverlässiger und breit verfügbarer Biomarker der hepatischen Fibrose stellt aktuell eine zentrale Limitation in der Diagnostik und Behandlung chronischer Lebererkrankungen dar. Das Auftreten von Fibrozyten in der Zirkulation, ihre Proliferation infolge einer Leberschädigung und ihre direkte Beteiligung an der Fibrogenese prädisponieren zirkulierende Fibrozyten als Biomarker der hepatischen Fibrose. Eine positive Korrelation der Fibrozytenzahl im peripheren Blut mit dem histologischen Fibrorestadium und der Lebersteifigkeit wurde in Patientinnen und Patienten mit chronischer HCV-Infektion demonstriert.²⁸⁶ Unabhängig von den diagnostischen Gütekriterien, verhindern zwei Limitationen den Einsatz zirkulierender Fibrozyten als Biomarker. Zum einen ist die reliable Identifizierung mittels Durchflusszytometrie wie in Kapitel 4.2.2 diskutiert, weiterhin eine Herausforderung. Ein kostengünstiges, breit verfügbares Nachweisverfahren, das die Anforderungen an die *in vitro*-Diagnostik im humanmedizinischen Kontext erfüllt, ist aktuell nicht in Sicht. Zum anderen ist das Auftreten von Fibrozyten in der Zirkulation keineswegs spezifisch für die Leberfibrose. Erhöhte Zahlen zirkulierender Fibrozyten wurden unter anderem in Patientinnen und Patienten mit Asthma bronchiale²⁸⁷⁻²⁸⁹, IPF^{187,290}, systemischer Sklerose^{291,292} und Appendizitis²⁹³ nachgewiesen, sodass die diagnostische Wertigkeit begrenzt erscheint und der Einsatz zirkulierender Fibrozyten als Biomarker allenfalls in speziellen Szenarien zu erwarten ist.

4.6.3 Fibrozyten in der Ära der Einzelzell-Transkriptomik

Die jüngsten technischen Fortschritte der Einzelzellanalysen haben das Potenzial, Paradigmen der Abgrenzung von Zelltypen zu revolutionieren und das Verständnis von Fibrozyten zu erweitern. Erste Pionierarbeiten erlauben bereits jetzt völlig neue Einblicke in die zelluläre Komposition der Leber und die zellulären Akteure der hepatischen Fibrogenese. Es müssen jedoch die Limitationen der Methode und die Besonderheiten von Fibrozyten berücksichtigt werden, um das Potenzial vollumfänglich ausschöpfen zu können. Das *single-cell RNA sequencing* (scRNA-seq) erlaubt die umfassende Sequenzierung des Transkriptoms einer Zelle.²⁹⁴ Die parallele Charakterisierung des Transkriptoms tausender Zellen erlaubt die Identifizierung von Gruppen, die ein ähnliches Genexpressionsprofil aufweisen (*Cluster*).²⁹⁵ Während die Definition von Zelltypen historisch zumeist anhand der zellulären Morphologie, charakteristischen Funktionen und Oberflächenantigenen erfolgte, können sich die Zellen der so identifizierten *Cluster* in ihrer Morphologie, den Oberflächenmarkern und ihrer Herkunft unterscheiden. Sie üben aber mutmaßlich ähnliche Funktionen aus, sodass sich biologisch relevante Gruppen von Zellen definieren lassen.

Das *Human Cell Atlas*-Projekt strebt die umfassende Kartierung humaner Zelltypen auf Basis der scRNA-seq-Technologie an.²⁹⁶ In der Analyse humaner Leberproben zeigte sich eine ungeahnte Heterogenität innerhalb der hepatischen Zelllandschaft.²⁹⁷⁻²⁹⁹ Domínguez Conde *et al.* veröffentlichten kürzlich außerdem eine Analyse von über 300 000 Immunzellen über verschiedene Organsysteme hinweg.³⁰⁰ In keiner der Arbeiten wird explizit eine Fibrozytenpopulation beschrieben, auch in den öffentlich verfügbaren Datensätzen gelingt es nicht, ein *PTPRC⁺/COL1A1⁺*-Cluster nachzuweisen. Zum jetzigen Zeitpunkt müssen hier aber die technischen Limitationen der Methode beachtet werden. Zum einen muss aus wirtschaftlichen Erwägungen in der Datenerhebung ein Kompromiss aus der Zahl der analysierten Zellen und der Lesetiefe, die die Zahl der Sequenzierungsvorgänge pro Zelle angibt, gefunden werden. Je niedriger die Lesetiefe, desto höher muss die Expression eines Transkripts sein, um nachgewiesen werden zu können. Die Verarbeitung der enormen Datenmengen, die bei der Sequenzierung gewonnen werden, erfordern außerdem einen beträchtlichen Ressourceneinsatz, sodass oft nur eine Auswahl von Genen in die weitere Analyse mit einbezogen werden.³⁰¹ Die niedrige Expression von mesenchymalen Genen in Fibrozyten kann so potenziell die Nachweisgrenze unterschreiten. Eine Analyse weniger Zellen mit hoher Lesetiefe ist wiederum ebenso ungeeignet einen seltenen Zelltyp zu charakterisieren, da hier in der Regel nur wenige Zielzellen enthalten sind. Aktuell können als Lösungsansatz die Datensätze mehrerer Experimente mit hoher Lesetiefe kombiniert analysiert werden. Osorio *et al.* entwickelten hierzu ein Softwarepaket und konnten in einer Beispielanwendung 157 Fibrozyten aus mehreren Experimenten als *Cluster* identifizieren und charakterisieren.³⁰² Es ist davon auszugehen, dass in den kommenden Jahren die zur Verfügung stehenden Sequenzierungs- und Auswertungskapazitäten weiter sprunghaft steigen werden und so die Zahl der analysierten Zellen und die Lesetiefe parallel ansteigen werden. Alternativ kann die Isolation und Sequenzierung nukleärer Transkripte (*single-nucleus RNA sequencing*) die Lesetiefe von relevanten mRNA-Transkripten erhöhen, da hier weniger ribosomale und mitochondriale Transkripte erfasst werden. In einer kombinierten scRNA-seq- und *single-nucleus RNA sequencing*-Analyse humaner Leberproben ließen sich so zuvor unerkannte mesenchymale Zellpopulationen abgren-

zen.³⁰³ Insbesondere wurden hier mit Fibrozyten vereinbare mesenchymale Cluster identifiziert, die eine erhöhte Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ohne klassische HSC-Marker zeigten.³⁰³

Neben den Limitationen des Nachweisverfahrens, birgt auch die Auswertung von scRNA-seq-Daten Fallstricke in der Identifizierung von Fibrozyten. Die Zahl und Größe der identifizierten *Cluster* können direkt durch die Wahl und Implementierung der *Clustering*-Methode sowie der Visualisierung der Ergebnisse beeinflusst werden. Populäre Modelle wie der *k-means*-Algorithmus tendieren etwa dazu, seltene Zelltypen in größere Cluster zu integrieren.³⁰¹ Im nächsten Schritt wird zumeist angestrebt, den identifizierten *Clustern* einen bekannten Zelltyp zuzuweisen (Annotation). Hier ist große Vorsicht geboten, nicht fälschlicherweise historisch gewachsene Abgrenzungen von Zelltypen auf scRNAseq-Daten anzuwenden. Die untersucherabhängige Annotation kann so den Erkenntnisgewinn von scRNAseq-Analysen erheblich limitieren. Ontologie-Projekte wie *Cell Ontology* streben an, durch eine logisch formalisierte Datenbank von Zelltypen eine konsistente Annotation zu erreichen.³⁰⁴ Die entsprechenden Datenbanken ermöglichen die Integration von Informationen über die Entwicklung, Funktion und anatomische Lokalisation von Zellen. Diese jedoch kontinuierlich weiterzuentwickeln, um Vollständigkeit, Korrektheit und Aktualität zu gewährleisten, aber auch wissenschaftliche Kontroversen sowie Grenzbereiche der Zelldifferenzierung abzubilden ist eine große Herausforderung. So ist zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit in der *Cell Ontology* eine Fibrozyten-Klasse enthalten (http://purl.obolibrary.org/obo/CL_0000135). Es wurde allerdings keine Trennung zwischen der ursprünglichen anatomisch-histologischen Definition eines inaktiven, gewebsständigen Fibroblasten und der von Bucala *et al.* geprägten⁷⁵, in der vorliegenden Arbeit genutzten, Definition einer hämatopoetischen Zelle vorgenommen (siehe Kapitel 1.3.1). Folglich dienen in der *Cell Ontology* Arbeiten, die unterschiedlich definierte Zellen untersuchten, als gemeinsame Quellen für die Eigenschaften der Klasse „Fibrozyt“, was zu einer inkorrekten und irreführenden Repräsentation eines in dieser Form bislang nicht beschriebenen Zelltyps führt. Ob und inwieweit die Datenbanken die nötige Akzeptanz und aktive Beteiligung der Forschungsgemeinschaft finden werden, um über das *Human Cell Atlas*-Projekt hinaus Verbreitung zu erfahren, erscheint derzeit unklar.

Während der *Human Cell Atlas* vornehmlich eine Charakterisierung des physiologischen Organismus anstrebt, stellt die Analyse fibrotisch veränderter Organe durch Einzelzelltechniken einen spannenden Ausblick im Kontext der vorliegenden Arbeit dar. Während bislang versucht worden war, zunächst die an der Fibrogenese beteiligten Zellpopulationen und ihren relativen Anteil zu identifizieren und sie anschließend unter Einsatz mutmaßlich Zelltyp-spezifischer Oberflächenmarker näher zu untersuchen, erlauben die neuartigen Methoden einen entgegengesetzten Ansatz. Unabhängig ihres Ursprungs können an der Fibrogenese beteiligte *Cluster* von Zellen umfassend identifiziert und kontextspezifisch charakterisiert sowie von anderen *Clustern* abgegrenzt werden. Dies ermöglicht neue Perspektiven auf den Beitrag von Fibrozyten in der Leberfibrose und ihre Beziehungen zu anderen an der Fibrogenese beteiligten Zellpopulationen. Erste Arbeiten zeigten mithilfe von Einzelzelltechniken die Heterogenität fibrogener Zellpopulationen in verschiedenen Mausmodellen der Leberfibrose.^{47,305-307} Krenkel *et al.* demonstrierten mittels scRNA-seq vier

distinkte *Cluster* von Myofibroblasten im Mausmodell der CCl₄-induzierten Leberfibrose.³⁰⁶ Eines dieser *Cluster* zeigte eine vergleichsweise schwache Expression von Matrixbestandteilen, demgegenüber waren Transkripte der Immunregulation deutlich überexprimiert. Die Autoren schlussfolgerten, dass dies auf eine Transdifferenzierung hämatopoetischer Zellen zu Myofibroblasten hindeuten könne. Auch wenn keine spezifische Identifizierung dieser Zellen als Fibrozyten angestrebt wurde, impliziert die Beobachtung die Transdifferenzierung von Fibrozyten zu hepatischen Myofibroblasten *in vivo*. Ramachandran *et al.* legten die bislang umfassendsten Daten mit humanen Leberproben vor.²¹⁹ Sie charakterisierten die Veränderungen hepatischer Zellpopulationen in Lebern von Patientinnen und Patienten mit Zirrhose und identifizierten neuartige Subpopulationen, insbesondere profibrotische Makrophagen. Aussagen zur Rolle von Fibrozyten sind anhand dieser Arbeit nicht möglich, da Zellen mit Korrelat in der Zirkulation ausgeschlossen wurden.

4.6.4 Offene Fragen und Perspektiven

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die spezifische Ausschaltung von Fibrozyten in einem Mausmodell der Leberfibrose und damit den mechanistisch neuartigen Nachweis einer funktionellen Beteiligung von Fibrozyten in der Leberfibrose. Hieraus ergeben sich spannende Perspektiven für das Verständnis der Rolle von Fibrozyten in der Leberfibrose und anderen fibrotischen Entitäten. Nichtsdestotrotz bleiben wie im Folgenden diskutiert einige Fragen, insbesondere hinsichtlich des eingesetzten Mausmodells, des Ausmaßes und der Mechanismen des fibrozytären Beitrags zur Leberfibrose sowie für potenzielle antifibrotische Therapieansätze offen.

Es bleibt offen, wie das gezeigte Ausmaß der Fibrosereduktion infolge der Fibrozytenausschaltung zu bewerten ist (siehe Kapitel 4.3.2). Mehrere Faktoren tragen in der Zusammenschau hierzu bei: Zum einen überspannte das Konfidenzintervall der Reduktion des hepatischen Hydroxyprolinegehalts ein Spektrum unterschiedlich zu bewertender relativer Änderungen. Zum anderen bleibt unklar, ob die HSV-TK/GCV-Suizidgenstrategie zu einer vollständigen Ausschaltung von Fibrozyten führte und damit ihren Beitrag vollumfänglich abbildete (siehe Kapitel 4.2.2). Letztere Frage ist eng mit der bislang unzureichend gelösten Problematik der Identifizierung von Fibrozyten in verschiedenen experimentellen Kontexten verknüpft: Verbesserte Nachweisverfahren stellen perspektivisch die Grundlage dafür dar, das HSV-TK/GCV- und andere Modelle der Fibrozytenausschaltung zu evaluieren und zu optimieren. Die Implikationen eines effektiven Nachweisverfahrens und Ausschaltungsmodells für Fibrozyten gehen dabei weit über das Feld der Leberfibrose hinaus. Neben der Untersuchung von Fibrozyten in anderen Organsystemen bietet die Rolle von Fibrozyten in der Tumormikroumgebung der Leber spannende Perspektiven.^{308,309} Verbesserte Nachweisverfahren sind außerdem eine Voraussetzung, um die bisherigen Erkenntnisse zur Beteiligung von Fibrozyten an der Leberfibrose und anderen fibrotischen Entitäten im Menschen zu reproduzieren und zu erweitern. Zuletzt stellen entsprechende Nachweisverfahren ein wichtiges Werkzeug zur Evaluation antifibrotischer Therapien mit Fibrozytenbezug dar (siehe unten). Einzelzelltechniken wie das scRNA-seq haben das Potenzial, das Vorgehen in der Identifizierung von Zelltypen zu revolutionieren. Umso wichtiger erscheint es, die besonderen Herausforderungen des Nachweises von Fibrozyten zu beachten (siehe Kapitel 4.6.3).

Mechanistisch bleiben zum jetzigen Zeitpunkt die Fragen offen, inwieweit sich die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit in anderen Modellen der Leberfibrose reproduzieren lassen und welche Mechanismen der verminderten Fibrose im TAA-Modell zugrunde liegen. Folgearbeiten werden zeigen, inwieweit die Ätiologie der Leberschädigung den Beitrag von Fibrozyten beeinflusst. Angesichts der bedrohlichen epidemiologischen Daten erscheint es vordringlich, Wissenslücken im Hinblick auf die Beteiligung von Fibrozyten an der Fibrogenese im Rahmen der NAFLD zu schließen. Die beobachteten Auswirkungen der Fibrozytenausschaltung auf LTB_4 und *Cebpb* in der vorliegenden Arbeit weisen auf mögliche spezifische Mediatoren in diesem Schädigungsmuster hin (siehe Kapitel 4.4.4). Geboten scheinen außerdem Untersuchungen in Modellen der biliären Leberschädigung – hier zeigen sich große pathophysiologische Unterschiede zur TAA-induzierten Leberschädigung. Aus der vorliegenden Arbeit lässt sich zunächst kein zugrundeliegender Mechanismus der verminderten Fibrose infolge der Fibrozytenausschaltung ableiten. Die explorativen Analysen bieten aber zahlreiche Erkenntnisse und Anknüpfungspunkte für nachfolgende Arbeiten zur hepatischen Fibrogenese und Fibrolyse. Insbesondere die Rolle von Smad6 in der nicht-kanonischen TGF- β -Signaltransduktion sowie die beobachteten Regulationen von IL-1 β , *Mmp3* und *Mmp13* zählen hierzu (Abbildung 29). Der Fokus auf transiente Prozesse im zeitlichen Verlauf der Fibrogenese kann weiter zum Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen beitragen.

Zuletzt unterstreicht der Nachweis des funktionellen Beitrags von Fibrozyten in der vorliegenden Arbeit ihre Relevanz für zukünftige Therapien der hepatischen Fibrose. Es gilt den Beitrag von Fibrozyten in präklinischen Modellen zu beachten. Die Aufklärung der Wirkmechanismen der klinisch erprobten oder zugelassenen Wirkstoffe PTX-2, CVC, Nintedanib, Elotuzumab und Omalizumab kann zusätzlich dazu beitragen, Transferpotenziale zu identifizieren und die Translation des antifibrotischen Effekts der Fibrozytenausschaltung zu beschleunigen.

5. Zusammenfassung

Leberfibrose ist gekennzeichnet durch die pathologische Expansion extrazellulärer Matrix infolge dysregulierter Wundheilungsprozesse. Sie stellt einen gemeinsamen Mechanismus zahlreicher chronischer Lebererkrankungen dar und ist maßgeblich für deren Morbidität und Mortalität. Die zellulären Akteure der Leberfibrose sind bislang jedoch nur unvollständig verstanden. Fibrozyten repräsentieren einen einzigartigen Zelltyp, der Eigenschaften von Leukozyten und Fibroblasten vereint. Sie entstammen dem Knochenmark, zirkulieren im peripheren Blut und tragen in zahlreichen Geweben zu Entzündung und Fibrose bei. Im Mausmodell infiltrieren Fibrozyten spezifisch die geschädigte Leber. Inwieweit sie dort zur Entstehung der Leberfibrose beitragen, war bislang unklar.

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals den Beitrag von Fibrozyten zur Leberfibrose durch die selektive Ausschaltung in einem Mausmodell der Thioacetamid-induzierten Leberfibrose. Hierzu wurde eine Suizidgenstrategie eingesetzt: Mittels Bestrahlung und Knochenmarktransplantation wurden chimäre C57BL/6-Mäuse kreiert, die in Zellen des Knochenmarks eine Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase unter Kontrolle eines Kollagen Typ I-Promotors exprimieren. Durch die Gabe des Suizidgensubstrats Valganciclovir wurden Fibrozyten als Kollagen-produzierende Zellen des Knochenmarks parallel zur 18-wöchigen Fibroseinduktion mit Thioacetamid ausgeschaltet.

Die hepatische Präsenz von Fibrozyten in der Thioacetamid-induzierten Leberfibrose wurde mittels einer RNA *in situ* Hybridisierung bestätigt. Die Suizidgenstrategie führte zur Ausschaltung der Fibrozyten. Infolgedessen zeigte sich eine signifikant reduzierte hepatische Fibrose (hepatischer Hydroxyprolinegehalt $-7,8\%$; 95 % Konfidenzintervall $-0,7$ bis $-14,8\%$; $p = 0,033$). Die ebenfalls signifikant verminderte Volumenaktivität der Alanin-Aminotransferase im Serum ($-20,9\%$; 95 % Konfidenzintervall $-0,4$ bis $-36,9\%$; $p = 0,049$) zeigte eine reduzierte Leberzellschädigung. In explorativen Analysen konnten Interleukin-1 β , Leukotrien B $_4$, Smad6, *Cebpb*, *Mmp3* und *Mmp13* als potenzielle Mediatoren identifiziert werden.

Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmals den funktionellen Beitrag von Fibrozyten zur hepatischen Fibrogenese. Limitationen der Arbeit umfassen den möglichen Verbleib von Fibrozyten im Rahmen der Suizidgenstrategie sowie die unklare Relevanz des Effekts auf die hepatische Fibrose. Weitere Untersuchungen werden benötigt, um den Beitrag von Fibrozyten in anderen Modellen der Leberfibrose und die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären. Dennoch ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit schon jetzt Implikationen für das Verständnis der zellulären Akteure der Leberfibrose und potenzielle antifibrotische Therapien.

Liver fibrosis is characterized by the excess deposition of extracellular matrix due to dysregulated wound healing processes. It represents a common mechanism of many chronic liver diseases and drives morbidity and mortality. However, the cellular actors of liver fibrosis are incompletely understood. Fibrocytes are a unique cell type sharing features of leukocytes and fibroblasts. They originate from the bone marrow, circulate in the peripheral blood, and contribute to inflammation and fibrosis in various tissues. In mice, fibrocytes specifically infiltrate the liver upon injury. The extent to which they contribute to the development of liver fibrosis has previously been unclear.

The present work is first to investigate the contribution of fibrocytes to liver fibrosis by a selective depletion in a model of thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. A suicide gene strategy was applied: Irradiation and bone marrow transplantation were used to create chimeric C57BL/6 mice expressing a herpes simplex virus thymidine kinase in cells of the bone marrow under the control of a collagen type I promoter. Administration of the suicide gene substrate valganciclovir selectively depleted fibrocytes as collagen-producing cells of the bone marrow throughout the 18-week period of fibrosis induction with thioacetamide.

The presence of fibrocytes in thioacetamide-induced liver fibrosis was confirmed by RNA *in situ* hybridization. The suicide gene strategy led to the depletion of fibrocytes. As a result, liver fibrosis was significantly attenuated (hepatic hydroxyproline content -7.8% ; 95% confidence interval -0.7 to -14.8% ; $p = 0,033$). Serum alanine aminotransferase activity was also significantly decreased (-20.9% ; 95% confidence interval -0.4 to -36.9% ; $p = 0,049$), demonstrating reduced hepatocellular injury. Exploratory analyses identified interleukin 1β , leukotriene B_4 , Smad6, *Cebpb*, *Mmp3*, and *Mmp13* as potential mediators.

The present work demonstrates the functional contribution of fibrocytes to liver fibrosis. Limitations include possibly remaining fibrocytes in the context of the suicide gene strategy and the unclear relevance of the effect on liver fibrosis. Further studies are warranted to elucidate the contribution of fibrocytes in other models of liver fibrosis and the underlying mechanisms. Nevertheless, the present work provides implications for the understanding of the cellular actors in liver fibrosis and potential antifibrotic therapies.

Abkürzungsverzeichnis

15-d.-PGJ ₂	15-Deoxy- Δ -12,14-Prostaglandin J ₂
α -SMA	α -smooth muscle actin
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
BDL	Operativer Gallengangsverschluss
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C/EBP β	CCAAT/Enhancer-Binding-Protein β
CCD	Charge-coupled device
CCL	C-C-Motif Chemokinligand
CCR	C-C-Motif Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CRP	C-reaktives Protein
C _T	Cycle of Threshold
CVC	Cenicriviroc
CXCL	C-X-C-Motif Chemokinligand
CXCR	C-X-C-Motif Chemokinrezeptor
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DHET	Dihydroxyepoxyeicosatetraensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EET	Epoxyeicosatetraensäure
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCF	Zur Lebensmittelfärbung
FGF	Fibroblast growth factor
GCV	Ganciclovir
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HDV	Hepatitis D-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase
HSC	Hepatische Sternzelle
HSV	Herpes-simplex-Virus
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
IFN	Interferon

IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
IWG-MRT	<i>International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment</i>
KanR	Kanamycin-Resistenzgen
LAP	<i>Liver-enriched activator protein</i>
LIP	<i>Liver-enriched inhibitory protein</i>
LTB ₄	Leukotrien B ₄
Ly-6C	Lymphozytenantigen 6C
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein MyD88</i>
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NeoR	Neomycin-Resistenzgen
NF	Nukleärer Faktor
NTC	<i>No template control</i>
OPN	Osteopontin
ori	Replikationsursprung
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PES	Polyethersulfon
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pTK	Plasmidäre Thymidinkinase
<i>Ptpnc</i>	Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C
PTX	Pentraxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative <i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
rhPTX-2	Rekombinantes humanes Pentraxin-2
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of Interest</i>
RTU	<i>Ready to use</i>
scRNA-seq	<i>Single-cell RNA sequencing</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLAMF7	<i>Signaling lymphocytic activation molecule F7</i>
SSC	<i>Standard citrate saline</i>

TAA	Thioacetamid
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween® 20</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TK	Thymidinkinase
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
VCV	Valganciclovir
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Lebererkrankungen in Europa	1
Abbildung 2 Mechanismen der hepatischen Fibrogenese	4
Abbildung 3 Architektur der gesunden und fibrotischen Leber	6
Abbildung 4 Fibrogene Effektorzellen der Leberfibrose	7
Abbildung 5 Historische Identifizierung von Fibrozyten	11
Abbildung 6 Potenzielle Beteiligung von Fibrozyten an der hepatischen Fibrogenese	18
Abbildung 7 Schematischer Ablauf des Tierversuchs	22
Abbildung 8 pCol1-TK-IRES-eGFP-Plasmid	23
Abbildung 9 Exemplarischer Ablauf der morphometrischen Auswertung	29
Abbildung 10 Densitometrische Auswertung der <i>Proteome Profiler™ Arrays</i>	34
Abbildung 11 Prinzip des <i>Magnetic Luminex® Assays</i>	35
Abbildung 12 Prüfung der RNA-Integrität und -Konzentration	37
Abbildung 13 Bestimmung von Primereffizienzen	39
Abbildung 14 Biometrische Daten der Versuchstiere	44
Abbildung 15 RNA <i>in situ</i> Hybridisierung von <i>Ptprc</i> und <i>Col1a1</i>	45
Abbildung 16 Histologische Darstellung des fibrotischen Lebergewebes	47
Abbildung 17 Morphometrische Analyse der fibrotischen Areale	48
Abbildung 18 Quantifizierung des hepatischen Hydroxyprolinegehalts	48
Abbildung 19 Gepoolte Transkriptionsanalyse Fibrose-assoziiierter Gene	49
Abbildung 20 Hepatische Expression des Myofibroblastenmarkers α -SMA	50
Abbildung 21 Relative Genexpression von <i>Tgfb1</i> und <i>Pdgfb</i>	51
Abbildung 22 Hepatische Proteinkonzentrationen von MMPs und deren Inhibitoren	52
Abbildung 23 Histologische Darstellung hepatischer Immunzellen	53
Abbildung 24 Hepatische Konzentrationen inflammatorischer Zytokine	54
Abbildung 25 Relative Genexpression inflammatorischer Mediatoren	55
Abbildung 26 Konzentrationen hepatischer Eicosanoide	56
Abbildung 27 <i>High-Troughput</i> Analyse inflammatorischer Marker	57
Abbildung 28 Untersuchungen zur Leberzellschädigung	58
Abbildung 29 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Kriterien der histopathologischen Begutachtung	27
Tabelle 2 Ergebnisse des <i>Staging</i>	47
Tabelle 3 Ergebnisse des <i>Grading</i>	53
Tabelle 4 Ausgewählte antifibrotische Wirkstoffe in der klinischen Erprobung	82

Referenzen

1. Karlsen TH *et al.* The EASL-Lancet Liver Commission: protecting the next generation of Europeans against liver disease complications and premature mortality. *Lancet* **2022**; 399(10319): 61-116.
2. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* **2020**; 396(10258): 1204-22.
3. Haldar D *et al.* Outcomes of liver transplantation for non-alcoholic steatohepatitis: A European Liver Transplant Registry study. *J Hepatol* **2019**; 71(2): 313-22.
4. Bataller R, Arab JP, Shah VH. Alcohol-Associated Hepatitis. *N Engl J Med* **2022**; 387(26): 2436-48.
5. Jochmans I *et al.* Adult Liver Allocation in Eurotransplant. *Transplantation* **2017**; 101(7): 1542-50.
6. Riazi K *et al.* The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **2022**; 7(9): 851-61.
7. Younossi ZM *et al.* The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology* **2023**; 77(4): 1335-47.
8. Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet* **2021**; 397(10290): 2212-24.
9. Roeb E *et al.* Aktualisierte S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – April 2022 – AWMF-Registernummer: 021-025. *Z Gastroenterol* **2022**; 60(9): 1346-421.
10. Younossi ZM *et al.* Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Most Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2021**; 19(3): 580-9 e5.
11. Estes C *et al.* Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol* **2018**; 69(4): 896-904.
12. Gines P *et al.* Liver cirrhosis. *Lancet* **2021**; 398(10308): 1359-76.
13. Zeynalova S *et al.* Event dependent overall survival in the population-based LIFE-Adult-Study. *PLoS One* **2022**; 17(12): e0278069.
14. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome Langversion 3.0, AWMF-Registernummer: 032/053OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/> (zuletzt abgerufen am 02.05.2023).
15. Vogel A *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **2022**; 400(10360): 1345-62.
16. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome – an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**; 4(1): a004903.
17. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**; 15(12): 786-801.
18. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **2009**; 326(5957): 1216-9.
19. Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature* **2020**; 587(7835): 555-66.
20. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis – a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med* **2015**; 372(12): 1138-49.
21. Wynn TA. Fibrotic disease and the T_H1/T_H2 paradigm. *Nat Rev Immunol* **2004**; 4(8): 583-94.
22. Gurtner GC *et al.* Wound repair and regeneration. *Nature* **2008**; 453(7193): 314-21.
23. Cordero-Espinoza L, Huch M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *J Clin Invest* **2018**; 128(1): 85-96.
24. Lüdde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* **2014**; 147(4): 765-83 e4.
25. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2021**; 18(3): 151-66.
26. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest* **2017**; 127(1): 55-64.
27. Schwabe RF, Lüdde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2018**; 15(12): 738-52.
28. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* **2017**; 356(6342): 1026-30.
29. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver – from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2016**; 13(2): 88-110.
30. Rivera CA *et al.* Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **2007**; 47(4): 571-9.
31. Baeck C *et al.* Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* **2012**; 61(3): 416-26.
32. Heymann F *et al.* Hepatic macrophage migration and differentiation critical for liver fibrosis is mediated by the chemokine receptor C-C motif chemokine receptor 8 in mice. *Hepatology* **2012**; 55(3): 898-909.
33. Duffield JS *et al.* Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* **2005**; 115(1): 56-65.
34. Hinz B *et al.* The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* **2007**; 170(6): 1807-16.

35. Kisseleva T. The origin of fibrogenic myofibroblasts in fibrotic liver. *Hepatology* **2017**; 65(3): 1039-43.
36. Kupffer C. Ueber Sternzellen der Leber. *Arch Mikroskop Anat* **1876**; 12(1): 353-8.
37. Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* **1971**; 132(4): 429-62.
38. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* **2008**; 88(1): 125-72.
39. Friedman SL *et al*. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **1985**; 82(24): 8681-5.
40. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* **2003**; 200(4): 504-15.
41. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**; 14(7): 397-411.
42. Pinzani M *et al*. 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* **1989**; 84(6): 1786-93.
43. Hellerbrand C *et al*. The role of TGF β 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* **1999**; 30(1): 77-87.
44. Seki E *et al*. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* **2007**; 13(11): 1324-32.
45. Mederacke I *et al*. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* **2013**; 4: 2823.
46. Iwaisako K *et al*. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **2014**; 111(32): E3297-305.
47. Yang W *et al*. Single-Cell Transcriptomic Analysis Reveals a Hepatic Stellate Cell-Activation Roadmap and Myofibroblast Origin During Liver Fibrosis in Mice. *Hepatology* **2021**; 74(5): 2774-90.
48. Ravichandra A, Schwabe RF. Mouse Models of Liver Fibrosis. In: Hinz B, Lagares D (Hrsg.). *Myofibroblasts. Methods and Protocols. New York: Humana Press* **2021**: 339-56.
49. Nishio T *et al*. Activated hepatic stellate cells and portal fibroblasts contribute to cholestatic liver fibrosis in MDR2 knockout mice. *J Hepatol* **2019**; 71(3): 573-85.
50. Karin D *et al*. The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. *Differentiation* **2016**; 92(3): 84-92.
51. Koyama Y *et al*. Mesothelin/mucin 16 signaling in activated portal fibroblasts regulates cholestatic liver fibrosis. *J Clin Invest* **2017**; 127(4): 1254-70.
52. Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix Biol* **2018**; 68-69: 452-62.
53. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells* **2020**; 9(5).
54. Hemmann S *et al*. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* **2007**; 46(5): 955-75.
55. Iredale JP *et al*. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* **1992**; 90(1): 282-7.
56. The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **1994**; 20(1): 15-20.
57. Ishak K *et al*. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* **1995**; 22(6): 696-9.
58. Lackner C *et al*. Histological parameters and alcohol abstinence determine long-term prognosis in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* **2017**; 66(3): 610-8.
59. Dulai PS *et al*. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* **2017**; 65(5): 1557-65.
60. Friedman SL, Pinzani M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future. *Hepatology* **2022**; 75(2): 473-88.
61. Regev A *et al*. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* **2002**; 97(10): 2614-8.
62. Ratziu V *et al*. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **2005**; 128(7): 1898-906.
63. Westin J *et al*. Interobserver study of liver histopathology using the Ishak score in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Liver* **1999**; 19(3): 183-7.
64. Suzuki Y *et al*. Histological changes in liver biopsies after one year of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* **1999**; 30(5): 743-8.
65. Arif A *et al*. Regression of fibrosis in chronic hepatitis C after therapy with interferon and ribavirin. *Dig Dis Sci* **2003**; 48(7): 1425-30.
66. Arima M *et al*. Regression of liver fibrosis in cases of chronic liver disease type C: quantitative evaluation by using computed image analysis. *Intern Med* **2004**; 43(10): 902-10.
67. Pockros PJ *et al*. Final results of a double-blind, placebo-controlled trial of the antifibrotic efficacy of interferon- γ 1b in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis or cirrhosis. *Hepatology* **2007**; 45(3): 569-78.
68. Younossi ZM *et al*. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **2019**; 394(10215): 2184-96.
69. Harrison SA *et al*. Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* **2019**; 394(10213): 2012-24.

70. Noble PW *et al.* Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* **2011**; 377(9779): 1760-9.
71. Richeldi L *et al.* Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **2014**; 370(22): 2071-82.
72. Distler O *et al.* Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med* **2019**; 380(26): 2518-28.
73. Flaherty KR *et al.* Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N Engl J Med* **2019**; 381(18): 1718-27.
74. Paget J. Lectures On Surgical Pathology. *Philadelphia: Lindsay & Blakiston* **1854**.
75. Bucala R *et al.* Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* **1994**; 1(1): 71-81.
76. Bucala R. Fibrocytes In Health And Disease. *Singapur: World Scientific* **2011**.
77. Chesney J *et al.* The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**; 94(12): 6307-12.
78. Dean LS *et al.* Characterization of Circulating Fibrocytes in People Living with HIV on Stable Antiretroviral Therapy. *Immunohorizons* **2022**; 6(11): 760-7.
79. Pittenger MF *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**; 284(5411): 143-7.
80. Hoogduijn MJ *et al.* No evidence for circulating mesenchymal stem cells in patients with organ injury. *Stem Cells Dev* **2014**; 23(19): 2328-35.
81. Suga H *et al.* Tracking the elusive fibrocyte: identification and characterization of collagen-producing hematopoietic lineage cells during murine wound healing. *Stem Cells* **2014**; 32(5): 1347-60.
82. Abe S *et al.* Functional analysis of human fibrocytes derived from monocytes reveals their profibrotic phenotype through paracrine effects. *J Med Invest* **2020**; 67(1.2): 102-12.
83. Pilling D *et al.* Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One* **2009**; 4(10): e7475.
84. Wang X *et al.* Identification and Function of Fibrocytes in Skeletal Muscle Injury Repair and Muscular Dystrophy. *J Immunol* **2016**; 197(12): 4750-61.
85. Weigert A *et al.* Fibrocytes boost tumor-supportive phenotypic switches in the lung cancer niche via the endothelin system. *Nat Commun* **2022**; 13(1): 6078.
86. Mori L *et al.* Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res* **2005**; 304(1): 81-90.
87. Ishii G *et al.* In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* **2005**; 23(5): 699-706.
88. Bartsch K *et al.* Mesenchymal stem cells remain host-derived independent of the source of the stem-cell graft and conditioning regimen used. *Transplantation* **2009**; 87(2): 217-21.
89. Abe R *et al.* Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* **2001**; 166(12): 7556-62.
90. Niedermeier M *et al.* CD4⁺ T cells control the differentiation of Gr1⁺ monocytes into fibrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**; 106(42): 17892-7.
91. Reinhardt JW, Breuer CK. Fibrocytes: A Critical Review and Practical Guide. *Front Immunol* **2021**; 12: 784401.
92. Hong KM *et al.* Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor- β and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem* **2007**; 282(31): 22910-20.
93. Wang S *et al.* TGF- β /Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis. *Oncotarget* **2016**; 7(8): 8809-22.
94. Shao DD *et al.* Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol* **2008**; 83(6): 1323-33.
95. Zhong JN *et al.* IL-4 and serum amyloid P inversely regulate fibrocyte differentiation by targeting store-operated Ca²⁺ channels. *Pharmacol Rep* **2018**; 70(1): 22-8.
96. White MJ, Galvis-Carvajal E, Gomer RH. A brief exposure to tryptase or thrombin potentiates fibrocyte differentiation in the presence of serum or serum amyloid p. *J Immunol* **2015**; 194(1): 142-50.
97. Pilling D *et al.* TNF- α -stimulated fibroblasts secrete lumican to promote fibrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **2015**; 112(38): 11929-34.
98. Pilling D *et al.* Fibroblasts secrete Slit2 to inhibit fibrocyte differentiation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2014**; 111(51): 18291-6.
99. Maharjan AS, Pilling D, Gomer RH. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially regulate human fibrocyte differentiation. *PLoS One* **2011**; 6(10): e26078.
100. Maekawa T *et al.* Myeloproliferative leukemia protein activation directly induces fibrocyte differentiation to cause myelofibrosis. *Leukemia* **2017**; 31(12): 2709-16.
101. Maharjan AS, Pilling D, Gomer RH. Toll-like receptor 2 agonists inhibit human fibrocyte differentiation. *Fibrogenesis Tissue Repair* **2010**; 3: 23.
102. Bottazzi B *et al.* An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* **2010**; 28: 157-83.
103. Pilling D *et al.* Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol* **2003**; 171(10): 5537-46.
104. Bharadwaj D *et al.* Serum amyloid P component binds to Fc γ receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* **2001**; 166(11): 6735-41.

105. Lu J *et al.* Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins. *Nature* **2008**; 456(7224): 989-92.
106. Castano AP *et al.* Serum amyloid P inhibits fibrosis through FcγR-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo. *Sci Transl Med* **2009**; 1(5): 5ra13.
107. Bottazzi B *et al.* The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling. *J Hepatol* **2016**; 64(6): 1416-27.
108. Crawford JR, Pilling D, Gomer RH. FcγRI mediates serum amyloid P inhibition of fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol* **2012**; 92(4): 699-711.
109. Cox N, Pilling D, Gomer RH. Distinct Fcγ receptors mediate the effect of serum amyloid P on neutrophil adhesion and fibrocyte differentiation. *J Immunol* **2014**; 193(4): 1701-8.
110. Cox N, Pilling D, Gomer RH. DC-SIGN activation mediates the differential effects of SAP and CRP on the innate immune system and inhibits fibrosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **2015**; 112(27): 8385-90.
111. Pilling D *et al.* The long pentraxin PTX3 promotes fibrocyte differentiation. *PLoS One* **2015**; 10(3): e0119709.
112. Phillips RJ *et al.* Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* **2004**; 114(3): 438-46.
113. Moore BB *et al.* CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* **2005**; 166(3): 675-84.
114. Chen G *et al.* CXCL16 recruits bone marrow-derived fibroblast precursors in renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* **2011**; 22(10): 1876-86.
115. Reich B *et al.* Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney Int* **2013**; 84(1): 78-89.
116. Moore BB *et al.* The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2006**; 35(2): 175-81.
117. Xia Y, Entman ML, Wang Y. CCR2 regulates the uptake of bone marrow-derived fibroblasts in renal fibrosis. *PLoS One* **2013**; 8(10): e77493.
118. Singh SR *et al.* CCL2 release by airway smooth muscle is increased in asthma and promotes fibrocyte migration. *Allergy* **2014**; 69(9): 1189-97.
119. Scholten D *et al.* Migration of fibrocytes in fibrogenic liver injury. *Am J Pathol* **2011**; 179(1): 189-98.
120. Aono Y *et al.* Role of platelet-derived growth factor/platelet-derived growth factor receptor axis in the trafficking of circulating fibrocytes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2014**; 51(6): 793-801.
121. Schmidt M *et al.* Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol* **2003**; 171(1): 380-9.
122. Bianchetti L *et al.* Extracellular matrix remodelling properties of human fibrocytes. *J Cell Mol Med* **2012**; 16(3): 483-95.
123. Ling C *et al.* Differentiated fibrocytes assume a functional mesenchymal phenotype with regenerative potential. *Sci Adv* **2019**; 5(5): eaav7384.
124. Chesney J *et al.* Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* **1998**; 160(1): 419-25.
125. Garcia-de-Alba C *et al.* Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes: possible role in migration and homing. *Am J Respir Crit Care Med* **2010**; 182(9): 1144-52.
126. Kuroda N *et al.* Infiltrating CCR2⁺ monocytes and their progenies, fibrocytes, contribute to colon fibrosis by inhibiting collagen degradation through the production of TIMP-1. *Sci Rep* **2019**; 9(1): 8568.
127. Balmelli C *et al.* Responsiveness of fibrocytes to toll-like receptor danger signals. *Immunobiology* **2008**; 212(9-10): 693-9.
128. Vannella KM *et al.* Cysteinyl leukotrienes are autocrine and paracrine regulators of fibrocyte function. *J Immunol* **2007**; 179(11): 7883-90.
129. Balmelli C *et al.* Fibrocytes are potent stimulators of anti-virus cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol* **2005**; 77(6): 923-33.
130. Kisseleva T *et al.* Fibrocyte-like cells recruited to the spleen support innate and adaptive immune responses to acute injury or infection. *J Mol Med (Berl)* **2011**; 89(10): 997-1013.
131. Collins D *et al.* Phagocytosis by Fibrocytes as a Mechanism to Decrease Bacterial Burden and Increase Survival in Sepsis. *Shock* **2019**; 51(4): 464-71.
132. Nemzek JA, Fry C, Moore BB. Adoptive transfer of fibrocytes enhances splenic T-cell numbers and survival in septic peritonitis. *Shock* **2013**; 40(2): 106-14.
133. Yang L *et al.* Identification of fibrocytes in post-burn hypertrophic scar. *Wound Repair Regen* **2005**; 13(4): 398-404.
134. Haudek SB *et al.* Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**; 103(48): 18284-9.
135. Sakai N *et al.* Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**; 103(38): 14098-103.
136. Verstovsek S *et al.* Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis. *J Exp Med* **2016**; 213(9): 1723-40.
137. Hashimoto N *et al.* Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **2004**; 113(2): 243-52.
138. Dupin I, Contin-Bordes C, Berger P. Fibrocytes in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Variations on the Same Theme. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2018**; 58(3): 288-98.
139. Nikam VS *et al.* Treprostinil inhibits the recruitment of bone marrow-derived circulating fibrocytes in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* **2010**; 36(6): 1302-14.
140. Nikam VS *et al.* Implication of in vivo circulating fibrocytes ablation in experimental pulmonary hypertension murine model. *Br J Pharmacol* **2020**; 177(13): 2974-90.

141. Chhabra Y, Weeraratna AT. Fibroblasts in cancer: Unity in heterogeneity. *Cell* **2023**; 186(8): 1580-609.
142. Saijo A *et al.* Bone marrow-derived fibrocytes promote stem cell-like properties of lung cancer cells. *Cancer Lett* **2018**; 421: 17-27.
143. Zhang H *et al.* Fibrocytes represent a novel MDSC subset circulating in patients with metastatic cancer. *Blood* **2013**; 122(7): 1105-13.
144. Forbes SJ *et al.* A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* **2004**; 126(4): 955-63.
145. Kisseleva T *et al.* Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* **2006**; 45(3): 429-38.
146. Higashiyama R *et al.* Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology* **2009**; 137(4): 1459-66 e1.
147. Asawa S *et al.* Participation of bone marrow cells in biliary fibrosis after bile duct ligation. *J Gastroenterol Hepatol* **2007**; 22(11): 2001-8.
148. Roderfeld M *et al.* Bone marrow transplantation demonstrates medullar origin of CD34⁺ fibrocytes and ameliorates hepatic fibrosis in *Abcb4*^{-/-} mice. *Hepatology* **2010**; 51(1): 267-76.
149. Borrelli E *et al.* Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**; 85(20): 7572-6.
150. Ladd B *et al.* Unrepairable DNA double-strand breaks initiate cytotoxicity with HSV-TK/ganciclovir. *Cancer Gene Ther* **2011**; 18(10): 751-9.
151. Miller WH, Miller RL. Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. *J Biol Chem* **1980**; 255(15): 7204-7.
152. Tian B *et al.* An HSV-TK transgenic mouse model to evaluate elimination of fibroblasts for fibrosis therapy. *Am J Pathol* **2003**; 163(2): 789-801.
153. Kim YO, Popov Y, Schuppan D. Optimized Mouse Models for Liver Fibrosis. In: Clausen BE, Laman JD (Hrsg.). *Inflammation. Methods and Protocols. New York: Humana Press* **2017**: 279-96.
154. Fitzhugh OG, Nelson AA. Liver Tumors in Rats Fed Thiourea or Thioacetamide. *Science* **1948**; 108(2814): 626-8.
155. Hajovsky H *et al.* Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* **2012**; 25(9): 1955-63.
156. Sarma D *et al.* Covalent modification of lipids and proteins in rat hepatocytes and in vitro by thioacetamide metabolites. *Chem Res Toxicol* **2012**; 25(9): 1868-77.
157. Wallace MC *et al.* Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. *Lab Anim* **2015**; 49(1 Suppl): 21-9.
158. Udenfriend S. Formation of hydroxyproline in collagen. *Science* **1966**; 152(3727): 1335-40.
159. Bentley JP, Hanson AN. The hydroxyproline of elastin. *Biochim Biophys Acta* **1969**; 175(2): 339-44.
160. Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. *Amtsblatt der Europäischen Union* **2010**; 53(L276): 33-79.
161. Percie du Sert N *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* **2020**; 18(7): e3000410.
162. Hempel F *et al.* Depletion of Bone Marrow-Derived Fibrocytes Attenuates TAA-Induced Liver Fibrosis in Mice. *Cells* **2019**; 8(10): 1210.
163. Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of laboratory animal management and welfare*. 3. Auflage. Oxford: Blackwell Publishing **2003**.
164. Tannapfel A. Invasive Fibrosediagnostik. *Hepatitis&more* **2012**; (1): 20-3.
165. Schirmacher P *et al.* Biopsische Diagnostik der chronischen Hepatitis - Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und des Kompetenznetzes Hepatitis (HepNet). *Z Gastroenterol* **2004**; 42(2): 175-85.
166. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **2012**; 9(7): 671-5.
167. Wang F *et al.* RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* **2012**; 14(1): 22-9.
168. Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* **1961**; 93: 440-7.
169. Stegemann H, Stalder K. Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* **1967**; 18(2): 267-73.
170. Kiss L *et al.* Direct eicosanoid profiling of the hypoxic lung by comprehensive analysis via capillary liquid chromatography with dual online photodiode-array and tandem mass-spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* **2008**; 390(2): 697-714.
171. Bustin SA *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **2009**; 55(4): 611-22.
172. Ye J *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **2012**; 13: 134.
173. Pfaffl MW *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **2004**; 26(6): 509-15.
174. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* **2001**; 25(4): 402-8.
175. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing **2013**.

176. Roderfeld M *et al.* Bone marrow transplantation improves hepatic fibrosis in *Abcb4*^{-/-} mice via Th1 response and matrix metalloproteinase activity. *Gut* **2012**; 61(6): 907-16.
177. Bertola A *et al.* Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* **2013**; 8(3): 627-37.
178. Heyman RA *et al.* Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**; 86(8): 2698-702.
179. Puche JE *et al.* A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage in mice. *Hepatology* **2013**; 57(1): 339-50.
180. Heppner FL *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* **2005**; 11(2): 146-52.
181. Roche Pharma AG. Fachinformation Cymeven®. Stand der Information April 2018.
182. Jung D, Dorr A. Single-dose pharmacokinetics of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive subjects. *J Clin Pharmacol* **1999**; 39(8): 800-4.
183. Lukacova V *et al.* A Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Ganciclovir and Its Pro-drug Valganciclovir in Adults and Children. *AAPS J* **2016**; 18(6): 1453-63.
184. van Dillen IJ *et al.* Influence of the bystander effect on HSV-tk/GCV gene therapy. A review. *Curr Gene Ther* **2002**; 2(3): 307-22.
185. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* **2005**; 118(Pt 7): 1341-53.
186. Kleaveland KR *et al.* Fibrocytes are not an essential source of type I collagen during lung fibrosis. *J Immunol* **2014**; 193(10): 5229-39.
187. Heukels P *et al.* Fibrocytes are increased in lung and peripheral blood of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* **2018**; 19(1): 90.
188. Arrigucci R *et al.* FISH-Flow, a protocol for the concurrent detection of mRNA and protein in single cells using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nat Protoc* **2017**; 12(6): 1245-60.
189. Soh KT, Wallace PK. RNA Flow Cytometry Using the Branched DNA Technique. *Methods Mol Biol* **2018**; 1678: 49-77.
190. Braun RE *et al.* Infertility in male transgenic mice: disruption of sperm development by HSV-tk expression in postmeiotic germ cells. *Biol Reprod* **1990**; 43(4): 684-93.
191. Gong Z *et al.* A Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase-Induced Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma Associated with Up-Regulated Immune-Inflammatory-Related Signals. *Genes (Basel)* **2018**; 9(8).
192. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2. Auflage. Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates **1988**.
193. Vuppalanchi R *et al.* Therapeutic pipeline in non-alcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2021**; 18(6): 373-92.
194. Standish RA *et al.* An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* **2006**; 55(4): 569-78.
195. James J *et al.* Sirius red histophotometry and spectrophotometry of sections in the assessment of the collagen content of liver tissue and its application in growing rat liver. *Liver* **1990**; 10(1): 1-5.
196. Dooley S *et al.* Transforming growth factor β signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGF β signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* **2001**; 502(1-2): 4-10.
197. Nakao A *et al.* Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* **1997**; 389(6651): 631-5.
198. Hayashi H *et al.* The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell* **1997**; 89(7): 1165-73.
199. Dooley S *et al.* Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* **2003**; 125(1): 178-91.
200. Imamura T *et al.* Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature* **1997**; 389(6651): 622-6.
201. Itoh S *et al.* Transforming growth factor β 1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* **1998**; 273(44): 29195-201.
202. Hata A *et al.* Smad6 inhibits BMP/Smad1 signalling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* **1998**; 12(2): 186-97.
203. Goto K *et al.* Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* **2007**; 282(28): 20603-11.
204. Lee YS *et al.* Smad6-specific recruitment of Smurf E3 ligases mediates TGF- β 1-induced degradation of MyD88 in TLR4 signalling. *Nat Commun* **2011**; 2(1): 460.
205. Choi KC *et al.* Smad6 negatively regulates interleukin 1-receptor-Toll-like receptor signaling through direct interaction with the adaptor Pellino-1. *Nat Immunol* **2006**; 7(10): 1057-65.
206. Kawai T *et al.* Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **1999**; 11(1): 115-22.
207. Jung SM *et al.* Smad6 inhibits non-canonical TGF- β 1 signalling by recruiting the deubiquitinase A20 to TRAF6. *Nat Commun* **2013**; 4: 2562.
208. Balbin M *et al.* Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem* **2001**; 276(13): 10253-62.
209. Foley CJ, Kuliopulos A. Mouse matrix metalloprotease-1a (Mmp1a) gives new insight into MMP function. *J Cell Physiol* **2014**; 229(12): 1875-80.
210. Uchinami H *et al.* Loss of MMP 13 attenuates murine hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *Hepatology* **2006**; 44(2): 420-9.

211. Fallowfield JA *et al.* Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol* **2007**; 178(8): 5288-95.
212. George J, Tsutsumi M, Tsuchishima M. MMP-13 deletion decreases profibrogenic molecules and attenuates N-nitrosodimethylamine-induced liver injury and fibrosis in mice. *J Cell Mol Med* **2017**; 21(12): 3821-35.
213. Bergheim I *et al.* Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**; 316(2): 592-600.
214. Suzuki K *et al.* Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* **1990**; 29(44): 10261-70.
215. Huang CC *et al.* Matrilysin (MMP-7) is a major matrix metalloproteinase upregulated in biliary atresia-associated liver fibrosis. *Mod Pathol* **2005**; 18(7): 941-50.
216. Irvine KM *et al.* Multiplex Serum Protein Analysis Identifies Novel Biomarkers of Advanced Fibrosis in Patients with Chronic Liver Disease with the Potential to Improve Diagnostic Accuracy of Established Biomarkers. *PLoS One* **2016**; 11(11): e0167001.
217. Andrei C *et al.* Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 β secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**; 101(26): 9745-50.
218. Song Z *et al.* Osteopontin Takes Center Stage in Chronic Liver Disease. *Hepatology* **2021**; 73(4): 1594-608.
219. Ramachandran P *et al.* Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level. *Nature* **2019**; 575(7783): 512-8.
220. Urtasun R *et al.* Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin $\alpha_v\beta_3$ engagement and PI3K/pAkt/NFkB signaling. *Hepatology* **2012**; 55(2): 594-608.
221. Arriazu E *et al.* Signalling via the osteopontin and high mobility group box-1 axis drives the fibrogenic response to liver injury. *Gut* **2017**; 66(6): 1123-37.
222. Hartlapp I *et al.* Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J* **2001**; 15(12): 2215-24.
223. Kao HK *et al.* Peripheral blood fibrocytes: enhancement of wound healing by cell proliferation, re-epithelialization, contraction, and angiogenesis. *Ann Surg* **2011**; 254(6): 1066-74.
224. Li J *et al.* Circulating fibrocytes stabilize blood vessels during angiogenesis in a paracrine manner. *Am J Pathol* **2014**; 184(2): 556-71.
225. Buret A *et al.* Effector mechanisms of intestinally induced immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in the rat lung: role of neutrophils and leukotriene B₄. *Infect Immun* **1993**; 61(2): 671-9.
226. Descombes P, Schibler U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* **1991**; 67(3): 569-79.
227. Kinoshita S, Akira S, Kishimoto T. A member of the C/EBP family, NF-IL6 β , forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**; 89(4): 1473-6.
228. Greenbaum LE *et al.* CCAAT enhancer-binding protein β is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* **1998**; 102(5): 996-1007.
229. Lüdde T *et al.* C/EBP β isoforms LIP and LAP modulate progression of the cell cycle in the regenerating mouse liver. *Hepatology* **2004**; 40(2): 356-65.
230. Rahman SM *et al.* CCAAT/enhancing binding protein β deletion in mice attenuates inflammation, endoplasmic reticulum stress, and lipid accumulation in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2007**; 45(5): 1108-17.
231. Han N *et al.* Identification of biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: A machine learning method and experimental study. *Front Genet* **2022**; 13: 1020899.
232. Tsukada J *et al.* The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* **2011**; 54(1): 6-19.
233. Ozono Y *et al.* Monocyte-derived fibrocytes elimination had little contribution on liver fibrosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **2019**; 18(4): 348-53.
234. Van Rooijen N. The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* **1989**; 124(1): 1-6.
235. Hashimoto M *et al.* Fibrocytes Differ from Macrophages but Can Be Infected with HIV-1. *J Immunol* **2015**; 195(9): 4341-50.
236. Zhang-Hoover J *et al.* A critical role for alveolar macrophages in elicitation of pulmonary immune fibrosis. *Immunology* **2000**; 101(4): 501-11.
237. Sunderkotter C *et al.* Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* **2004**; 172(7): 4410-7.
238. LeBleu VS *et al.* Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* **2013**; 19(8): 1047-53.
239. Kuppe C *et al.* Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature* **2021**; 589(7841): 281-6.
240. Rurik JG *et al.* CART cells produced in vivo to treat cardiac injury. *Science* **2022**; 375(6576): 91-6.
241. Amor C *et al.* Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies. *Nature* **2020**; 583(7814): 127-32.
242. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **2014**; 345(6194): 1247125.
243. Prior N, Inacio P, Huch M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications. *Gut* **2019**; 68(12): 2228-37.
244. Vunjak-Novakovic G, Ronaldson-Bouchard K, Radisic M. Organs-on-a-chip models for biological research. *Cell* **2021**; 184(18): 4597-611.

245. de Graaf IA *et al.* Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat Protoc* **2010**; 5(9): 1540-51.
246. Paish HL *et al.* A Bioreactor Technology for Modeling Fibrosis in Human and Rodent Precision-Cut Liver Slices. *Hepatology* **2019**; 70(4): 1377-91.
247. Pilling D *et al.* Reduction of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by serum amyloid P. *J Immunol* **2007**; 179(6): 4035-44.
248. Murray LA *et al.* Serum amyloid P therapeutically attenuates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis via its effects on macrophages. *PLoS One* **2010**; 5(3): e9683.
249. Murray LA *et al.* TGF- β driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P. *Int J Biochem Cell Biol* **2011**; 43(1): 154-62.
250. Dillingh MR *et al.* Recombinant human serum amyloid P in healthy volunteers and patients with pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* **2013**; 26(6): 672-6.
251. Raghu G *et al.* Effect of Recombinant Human Pentraxin 2 vs Placebo on Change in Forced Vital Capacity in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2018**; 319(22): 2299-307.
252. Pitre T *et al.* Medical treatments for idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and network meta-analysis. *Thorax* **2022**; 77(12): 1243-50.
253. Verstovsek S *et al.* Phase 2 Trial of PRM-151, an Anti-Fibrotic Agent, in Patients with Myelofibrosis: Stage 1 Results. *56th American Society of Hematology Annual Meeting* **2014**.
254. Verstovsek S *et al.* A Randomized, Double Blind Phase 2 Study of 3 Different Doses of PRM-151 in Patients with Myelofibrosis Who Were Previously Treated with or Ineligible for Ruxolitinib. *24th Congress of the European Hematology Association* **2019**.
255. Nakagawa N *et al.* Pentraxin-2 suppresses c-Jun/AP-1 signaling to inhibit progressive fibrotic disease. *JCI Insight* **2016**; 1(20): e87446.
256. Cathcart ES, Wollheim FA, Cohen AS. Plasma protein constituents of amyloid fibrils. *J Immunol* **1967**; 99(2): 376-85.
257. Cathcart ES, Comerford FR, Cohen AS. Immunologic Studies on a Protein Extracted from Human Secondary Amyloid. *N Engl J Med* **1965**; 273: 143-6.
258. Pepys MB *et al.* Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature* **2002**; 417(6886): 254-9.
259. Gillmore JD *et al.* Sustained pharmacological depletion of serum amyloid P component in patients with systemic amyloidosis. *Br J Haematol* **2010**; 148(5): 760-7.
260. Pilling D, Gomer RH. Persistent lung inflammation and fibrosis in serum amyloid P component (APCs^{-/-}) knockout mice. *PLoS One* **2014**; 9(4): e93730.
261. Raghu G *et al.* Long-term treatment with recombinant human pentraxin 2 protein in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an open-label extension study. *Lancet Respir Med* **2019**; 7(8): 657-64.
262. Raghu G *et al.* Long-term evaluation of the safety and efficacy of recombinant human pentraxin-2 (rhPTX-2) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): an open-label extension study. *Respir Res* **2022**; 23(1): 129.
263. Verna EC *et al.* Novel association between serum pentraxin-2 levels and advanced fibrosis in well-characterised patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* **2015**; 42(5): 582-90.
264. Yoneda M *et al.* Plasma Pentraxin3 is a novel marker for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *BMC Gastroenterol* **2008**; 8: 53.
265. Boga S *et al.* Plasma Pentraxin 3 Differentiates Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) from Non-NASH. *Metab Syndr Relat Disord* **2015**; 13(9): 393-9.
266. Cong M *et al.* Serum Amyloid P Attenuates Hepatic Fibrosis in Mice by Inhibiting the Activation of Fibrocytes and Hepatic Stellate Cells. *The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting* **2011**.
267. Pilling D *et al.* Serum Amyloid P and a Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin Ligand Inhibit High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue and Liver Inflammation and Steatosis in Mice. *Am J Pathol* **2019**; 189(12): 2400-13.
268. Pilling D, Karhadkar TR, Gomer RH. A CD209 ligand and a sialidase inhibitor differentially modulate adipose tissue and liver macrophage populations and steatosis in mice on the Methionine and Choline-Deficient (MCD) diet. *PLoS One* **2020**; 15(12): e0244762.
269. Lefebvre E *et al.* Antifibrotic Effects of the Dual CCR2/CCR5 Antagonist Cenicriviroc in Animal Models of Liver and Kidney Fibrosis. *PLoS One* **2016**; 11(6): e0158156.
270. Ambade A *et al.* Pharmacological Inhibition of CCR2/5 Signaling Prevents and Reverses Alcohol-Induced Liver Damage, Steatosis, and Inflammation in Mice. *Hepatology* **2019**; 69(3): 1105-21.
271. Krenkel O *et al.* Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology* **2018**; 67(4): 1270-83.
272. Kruger AJ *et al.* Prolonged cenicriviroc therapy reduces hepatic fibrosis despite steatohepatitis in a diet-induced mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Commun* **2018**; 2(5): 529-45.
273. Friedman SL *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology* **2018**; 67(5): 1754-67.

274. Anstee QM *et al.* Cenicriviroc for the treatment of liver fibrosis in adults with nonalcoholic steatohepatitis: AURORA Phase 3 study design. *Contemp Clin Trials* **2020**; 89: 105922.
275. Pedrosa M *et al.* A randomized, double-blind, multicenter, phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of a combination of tropifexor and cenicriviroc in patients with non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: Study design of the TANDEM trial. *Contemp Clin Trials* **2020**; 88: 105889.
276. Wollin L *et al.* Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **2015**; 45(5): 1434-45.
277. Sato S *et al.* Anti-fibrotic efficacy of nintedanib in pulmonary fibrosis via the inhibition of fibrocyte activity. *Respir Res* **2017**; 18(1): 172.
278. Kasam RK *et al.* Dysregulation of Mesenchymal Cell Survival Pathways in Severe Fibrotic Lung Disease: The Effect of Nintedanib Therapy. *Front Pharmacol* **2019**; 10: 532.
279. Cutolo M *et al.* Nintedanib downregulates the transition of cultured systemic sclerosis fibrocytes into myofibroblasts and their pro-fibrotic activity. *Arthritis Res Ther* **2021**; 23(1): 205.
280. Öztürk Akcora B *et al.* Tyrosine kinase inhibitor BIBF1120 ameliorates inflammation, angiogenesis and fibrosis in CCl₄-induced liver fibrogenesis mouse model. *Sci Rep* **2017**; 7: 44545.
281. Susutlerpanya W *et al.* Histological evaluation of nintedanib in non-alcoholic steatohepatitis mice. *Life Sci* **2019**; 228: 251-7.
282. Maekawa T *et al.* Increased SLAMF7^{high} monocytes in myelofibrosis patients harboring JAK2V617F provide a therapeutic target of elotuzumab. *Blood* **2019**; 134(10): 814-25.
283. Bose P *et al.* A Pilot Study of the Anti-SLAMF7 Monoclonal Antibody, Elotuzumab, in Myelofibrosis. *63rd American Society of Hematology Annual Meeting* **2021**.
284. Wang CH *et al.* Fibrocyte trafficking in patients with chronic obstructive asthma and during an acute asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* **2015**; 135(5): 1154-62 e1-5.
285. Wang CH *et al.* Anti-IgE therapy inhibits chemotaxis, proliferation and transformation of circulating fibrocytes in patients with severe allergic asthma. *Respirology* **2021**; 26(9): 842-50.
286. Nunnari G *et al.* Circulating fibrocytes as a marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Front Biosci (Elite Ed)* **2010**; 2(4): 1241-5.
287. Wang CH *et al.* Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**; 178(6): 583-91.
288. Isgro M *et al.* The C-C motif chemokine ligands CCL5, CCL11, and CCL24 induce the migration of circulating fibrocytes from patients with severe asthma. *Mucosal Immunol* **2013**; 6(4): 718-27.
289. Shipe R *et al.* Number, activation, and differentiation of circulating fibrocytes correlate with asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* **2016**; 137(3): 750-7 e3.
290. Moeller A *et al.* Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2009**; 179(7): 588-94.
291. Mathai SK *et al.* Circulating monocytes from systemic sclerosis patients with interstitial lung disease show an enhanced profibrotic phenotype. *Lab Invest* **2010**; 90(6): 812-23.
292. Ruaro B *et al.* Correlation between circulating fibrocytes and dermal thickness in limited cutaneous systemic sclerosis patients: a pilot study. *Rheumatol Int* **2019**; 39(8): 1369-76.
293. Zarog MA *et al.* Role of circulating fibrocytes in the diagnosis of acute appendicitis. *BJS Open* **2020**; 4(6): 1256-65.
294. Tang F *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* **2009**; 6(5): 377-82.
295. Ramachandran P *et al.* Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2020**; 17(8): 457-72.
296. Regev A *et al.* The Human Cell Atlas. *eLife* **2017**; 6.
297. MacParland SA *et al.* Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun* **2018**; 9(1): 4383.
298. Aizarani N *et al.* A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature* **2019**; 572(7768): 199-204.
299. Payen VL *et al.* Single-cell RNA sequencing of human liver reveals hepatic stellate cell heterogeneity. *JHEP Rep* **2021**; 3(3): 100278.
300. Dominguez Conde C *et al.* Cross-tissue immune cell analysis reveals tissue-specific features in humans. *Science* **2022**; 376(6594): eabl5197.
301. Kiselev VY, Andrews TS, Hemberg M. Challenges in unsupervised clustering of single-cell RNA-seq data. *Nat Rev Genet* **2019**; 20(5): 273-82.
302. Osorio D, Kuijjer ML, Cai JJ. rPanglaoDB: an R package to download and merge labeled single-cell RNA-seq data from the PanglaoDB database. *Bioinformatics* **2022**; 38(2): 580-2.
303. Andrews TS *et al.* Single-Cell, Single-Nucleus, and Spatial RNA Sequencing of the Human Liver Identifies Cholangiocyte and Mesenchymal Heterogeneity. *Hepatology Commun* **2022**; 6(4): 821-40.
304. Bard J, Rhee SY, Ashburner M. An ontology for cell types. *Genome Biol* **2005**; 6(2): R21.
305. Dobie R *et al.* Single-Cell Transcriptomics Uncovers Zonation of Function in the Mesenchyme during Liver Fibrosis. *Cell Rep* **2019**; 29(7): 1832-47 e8.
306. Krenkel O *et al.* Single Cell RNA Sequencing Identifies Subsets of Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts in Liver Fibrosis. *Cells* **2019**; 8(5).
307. Rosenthal SB *et al.* Heterogeneity of HSCs in a Mouse Model of NASH. *Hepatology* **2021**; 74(2): 667-85.
308. Roife D, Fleming JB, Gomer RH. Fibrocytes in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **2020**; 1224: 79-85.
309. Ying F, Chan MSM, Lee TKW. Cancer-Associated Fibroblasts in Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2023**; 15(4): 985-99.

Anhang

Anhang 1 Verwendete Geräte	110
Anhang 2 Verwendete Verbrauchsmaterialien	112
Anhang 3 Verwendete Chemikalien.....	113
Anhang 4 Verwendete Puffer und Lösungen	115
Anhang 5 Verwendete Antikörper	117
Anhang 6 Verwendete Oligonukleotide.....	118
Anhang 7 <i>ARRIVE</i> -Checkliste	119
Anhang 8 Makro zur Quantifizierung fibrotischen Materials.....	121
Anhang 9 Makro zur Quantifizierung CD45 ⁺ -Areale	122
Anhang 10 Standardarbeitsanweisung Hydroxyprolin-Bestimmung	123
Anhang 11 Standardarbeitsanweisung RNA-Isolierung	132
Anhang 12 Masson-Goldner-Färbung	147

▼ Anhang 1 | Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Analysegerät für klinische Chemie	Reflotron® Plus	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Blotkammer	Biometra™ Fastblot B43	Analytik Jena, Jena, Deutschland
CCD-Kamera	ChemoStar ECL & Fluorescence Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Dispergierer	T8 ULTRA-TURRAX®	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur™	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Durchflusszytometer	Luminex® 200™	Luminex Corporation, Austin, TX, USA
Einbettssystem	Leica EG1140H	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Elektrophoresekammer	Biometra™ Agagel Maxi	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Elektrophoresekammer	ROTIPHORESE® PROfessional	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Feinwaage	A200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Flachbettscanner	CanoScan LiDE 2020	Canon, Tokio, Japan
Fluoreszenz-Phasenkontrastmikroskop	Biozero BZ-8000	Keyence, Osaka, Japan
Gefrierschrank		Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Geldokumentationssystem	Reprostar 3	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Gewebeinfiltrationsautomat	ASP300S	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Gießvorrichtung für Agarosegele	Biometra™ Agagel Maxi	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Gießvorrichtung für Polyacrylamidgele	Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Modul	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Heizblock	ThermoMixer® comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hybridisierungssofen	HybEZ™ II Hybridization System	Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA
Lichtmikroskop	Leica DMRB	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	C-MAG HS 7	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Mikroliterspritze	Microliter Syringe 805 N	Hamilton Company, Reno, NV, USA
Mikrowelle		Severin, Sundern, Deutschland
Mörser		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipette	Multipette® M4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Research® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	pipetus® akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pistill		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Platten-Reader	Infinite® 200 PRO	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
qPCR-Maschine	StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Röntgenentwicklungsmaschine	CP1000	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Röntgenkassette		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotationsmikrotom	Leica RM2255	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland

▼ Anhang 1 | Verwendete Geräte (fortgesetzt).

Schüttler	VXR basic Vibrax®	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Spannungsgeber	Electrophoresis Power Supply Consort EV	Merck, Darmstadt, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop™ One	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spiegelreflexkamera	EOS 600D	Canon, Tokio, Japan
Thermocycler	Biometra™ T3000	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Tischzentrifuge	MIKRO 120	Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Ultratiefkühlschrank	HERAfreeze™ HFU500T	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Verkochungsröhrchen	DURAN® Kulturröhrchen mit Schraubverschluss	DWK Life Sciences, Wertheim, Deutschland
Vortex-Schüttler	Vortex 2	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Waage	Präzisionswaage 440-47N	KERN & SOHN, Balingen-Frommern, Deutschland
Wärmeschrank		Heraeus, Hanau, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem	Elix® Essential	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	HI1210	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Wippschüttler		VWR, Radnor, PA, USA

.....
 Alphabetische Auflistung. CCD, Charge-coupled device; qPCR, Quantitative real time Polymerasekettenreaktion.

▼ Anhang 2 | Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Deckel für qPCR-Reaktionsgefäß	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Deckgläser	Mikroskopische Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Filterpapier	Whatman® Chromatographie-Papier	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mikrotiterplatte	Microtest 96 Well 370 µl Clear Plate	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Objektträger	SuperFrost® plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
PES-Spritzenvorsatzfilter	Millex® Spritzenvorsatzfilter, PES, nicht steril	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pipettenaufsatz	Combitips® advanced	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
PVDF-Membran	Immobilon®-P, PVDF, 0,45 µm	Merck, Darmstadt, Deutschland
qPCR-Reaktionsgefäß	MicroAmp™ Fast Reaction Tube	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Reagiergefäß		Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Röntgenfilm	Amersham Hyperfilm™ ECL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Teststreifen zur ALT-Bestimmung	Reflotron® GPT (ALT)	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Vernichtungsbeutel		Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland

.....
 Alphabetische Auflistung. ALT, Alanin-Aminotransferase; PES, Polyethersulfon; PVDF, Polyvinylidenfluorid; qPCR, Quantitative real time Polymerasekettenreaktion.

▼ Anhang 3 | Verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
4-Dimethylamino-benzaldehyd (Ehrlich-Reagenz)		Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Mischung 30%	ROTIPHORESE® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	ROTI®Garose Broad Range	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidisulfat		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin		GE Healthcare Bio-Sciences Austria, Pasching, Österreich
Bromphenolblau		Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Calciumglycerophosphat	EMPROVE® EXPERT Calcium-glycerophosphat-hydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloramin T-Trihydrat		Merck, Darmstadt, Deutschland
Dekontaminationslösung	RNAse AWAY®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNA-Leiter		New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Enrofloxacin	Baytril®	Bayer Animal Health, Leverkusen, Deutschland
Essigsäure (100%)	EMSURE® Acetic acid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (96%)		Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol (99,6%)		Berkel Unternehmungen, Ludwigshafen, Deutschland
Ethidiumbromid (1%)		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat		Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Fast Green FCF		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd (37%)		Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd-Ladepuffer	NorthernMax®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glycerin	EMPROVE® EXPERT Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin nach Gill I		Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hämatoxylin nach Mayer	Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydroxyprolin		Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isofluran	IsoFlo	Zoetis, Parsippany, NJ, USA
Isopropanol		Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luminol		Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol		Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Morpholinopropansulfonsäure		Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat		Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdesoxycholat		Merck, Darmstadt, Deutschland

▼ Anhang 3 | Verwendete Chemikalien (fortgesetzt).

Natriumdodecylsulfat		Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat		Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid		Merck, Darmstadt, Deutschland
Octoxinol 9	Triton® X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-Cumarsäure		Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd		Merck, Darmstadt, Deutschland
Perchlorsäure		Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid		F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Pikrinsäure (wässrig, gesättigt)		Chroma, Münster, Deutschland
Polysorbat 20	Tween® 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteaseinhibitormischung	cOmplete™ Mini, EDTA-free	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Proteinleiter	Page Ruler™ Plus Pre-stained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
qPCR-Mastermix	SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Salzsäure		Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sirius Red		Polysciences, Warrington, PA, USA
β-Mercaptoethanol		Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylendiamin		Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Thioacetamid		Merck, Darmstadt, Deutschland
Trinatriumcitrat-Dihydrat		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Valganciclovir	Valcyte®	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Wasserstoffperoxid (30%)		Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol (Isomerengemisch)		VWR, Radnor, PA, USA
Zitronensäure-Monohydrat		Merck, Darmstadt, Deutschland

.....
 Alphabetische Auflistung. FCF, zur Lebensmittelfärbung; qPCR, Quantitative real time Polymerasekettenreaktion.

▼ Anhang 4 | Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Chemilumineszenz-Entwicklungslösung	950 µl Aqua bidest.; 500 µl TRIS-Puffer (2M), pH 8,5; 50 µl Luminol (250 mM); 25 µl p-Cumarsäure (90 mM); 2,6 µl Wasserstoffperoxid (30%)
Chloramin T-Lösung	300 mg Chloramin T; 50 ml Hydroxyprolin-Puffer B
Citrat-Puffer (Gebrauchslösung)	9 ml Stammlösung A; 41 ml Stammlösung B; ad 500 ml Aqua bidest.
Citrat-Puffer (Stammlösung A)	21,01 g Zitronensäure (0,1 M); ad 1 l Aqua bidest.
Citrat-Puffer (Stammlösung B)	29,41 g Trinatriumcitrat-Dihydrat (0,1 M); ad 1 l Aqua bidest.
Ehrlich-Reagenz-Lösung	3 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd; 26 ml Isopropanol; 8 ml Perchlorsäure (70%)
Hydroxyprolin-Puffer A	3,4 g Natriumhydroxid; 3,4 g Zitronensäure-Monohydrat; 12 g Natriumacetat; ad 100 ml Aqua bidest.; pH mit Essigsäure auf 6 einstellen
Hydroxyprolin-Puffer B	60 ml Isopropanol, 33 ml Aqua bidest.; 39 ml Hydroxyprolin-Puffer A
Laufpuffer für SDS-PAGE (10-fach)	144 g Glycin (1,92 M); 30 g TRIS (247 mM); 10 g Natriumdodecylsulfat (34,6 mM); ad 1 l Aqua bidest.
Lysepuffer (DNA-Isolierung)	30 ml Natriumchlorid (5 M); 10 ml TRIS-HCl-Puffer pH 8,5 (1 M); 2 g Natriumhydroxid; 1 ml EDTA (0,5 M); 1 ml Natriumdodecylsulfat (20%); ad 100 ml Aqua bidest.
Lysepuffer nach Lämmli (4-fach)	40% Glycerin; 20% β-Mercaptoethanol; 8% Natriumdodecylsulfat; 0,25 M TRIS-Puffer, pH 6,8; 0,02% Bromphenolblau
MOPS-Puffer (10-fach)	41,8 g Morpholinopropansulfonsäure (200 mM); 6,8 g Natriumacetat (50 mM); ad 1 l Aqua bidest.; pH mit Natriumhydroxid auf 7 einstellen
Neutralisationspuffer (DNA-Isolierung)	3 M Natriumchlorid; 0,5 M TRIS-HCl-Puffer (pH 7)
PBS-Puffer	80 g Natriumchlorid; 11,5 g Natriumhydrogenphosphat; 2 g Kaliumchlorid; 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat; ad 1 l Aqua bidest.
Polymerisationslösung für Acrylamid-Sammegel (3,3%)	165 µl Acrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1) 30%; 1,065 ml Aqua bidest.; 415 µl TRIS-Puffer, pH 6,8; 25 µl Ammoniumperoxidisulfat; 2,5 µl Tetramethylethyldiamin
Polymerisationslösung für Acrylamid-Trenngel (10%)	1,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1) 30%; 2,225 ml Aqua bidest.; 975 µl TRIS-Puffer, pH 8,8; 50 µl Natriumdodecylsulfat 10%; 50 µl Ammoniumperoxidisulfat; 5 µl Tetramethylethyldiamin
Polymerisationslösung für Acrylamid-Trenngel (15%)	2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1) 30%; 1,425 ml Aqua bidest.; 975 µl TRIS-Puffer, pH 8,8; 50 µl Natriumdodecylsulfat 10%; 50 µl Ammoniumperoxidisulfat; 5 µl Tetramethylethyldiamin
RIPA-Puffer	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4; 150 mM Natriumchlorid; 1% Octoxinol 9; 0,5% Natriumdesoxycholat; 0,1% Natriumdodecylsulfat; 1 mM EDTA;
Sirius Red/Fast Green-Färbelösung	0,1 g Sirius Red; 0,1 g Fast Green FCF; 100 ml Pikrinsäure; pH mit Natriumhydroxid auf 2 einstellen
SSC-Puffer (20-fach)	175,3 g Natriumchlorid; 88,2 g Natriumcitrat; 800 ml Aqua bidest.; pH mit Salzsäure auf 7 einstellen; ad 1 l Aqua bidest.; steril filtrieren
Stripping-Puffer	0,5 ml Glycin (1 M); 50 µl Salzsäure (37%); 4,5 ml Aqua bidest.
TAE-Puffer (50-fach)	242 g TRIS; 57,1 ml Essigsäure (100%); 100 ml EDTA (0,5 M); ad 1 l Aqua bidest.
TBS-Puffer (10-fach)	200 mM TRIS; 1,37 mM Natriumchlorid; ad 1 l Aqua bidest.

▼ Anhang 4 | Verwendete Puffer und Lösungen (fortgesetzt).

TBS-T-Puffer	250 ml TBS (10-fach konzentriert); 2,5 ml Polysorbat 20 (0,1%); 2250 ml Aqua bidest.
TRIS-EDTA-Puffer, pH 9	1,21 g TRIS; 0,37 g EDTA; ad 1 l Aqua bidest.
TRIS-HCl-Puffer, pH 7	1 M TRIS; ad 1 l Aqua bidest.; pH mit Salzsäure auf 7 einstellen
TRIS-HCl-Puffer, pH 8,5	1 M TRIS; ad 1 l Aqua bidest.; pH mit Salzsäure auf 8,5 einstellen
TRIS-Puffer, pH 6,8 (4-fach)	6,05 g TRIS in 40 ml Aqua bidest. gelöst; pH mit Salzsäure auf 6,8 einstellen; 100 ml Aqua bidest.; 0,4 g Natriumdodecylsulfat
TRIS-Puffer, pH 8,8	242,28 g TRIS; ad 1 l Aqua bidest.; pH mit Salzsäure auf 8,8 einstellen

.....
 Sofern Puffer oder Lösungen als mehrfach konzentrierte Stammlösungen verfügbar waren, wurden diese, wenn nicht anders angegeben, vor Benutzung mit Aqua bidest. verdünnt. Alphabetische Auflistung. *EDTA*, Ethylendiamintetraacetat; *MOPS*, Morpholinopropansulfonsäure; *PBS*, phosphate-buffered saline; *RIPA*, Radioimmunpräzipitationsassay; *SDS-PAGE*, Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)-Polyacrylamidgelelektrophorese; *SSC*, standard saline citrate; *TAE*, *TRIS-Acetat-EDTA*; *TBS*, Tris-buffered saline; *TBS-T*, Tris-buffered saline with Tween® 20; *TRIS*, Tris(hydroxymethyl)amino-methan.

▼ Anhang 5 | Verwendete Antikörper.

	Zielantigen	Ursprungsspezies	Klonalität	Western Blot		IHC		Kopplung	Katalognummer	Hersteller
				Verdünnung	verdünnt in	Verdünnung	Antigen Retrieval			
Primärantikörper	α-SMA	Maus	monoklonal	1:1000	Milchpulver	1:200	keine		61001	Progen, Heidelberg, Deutschland
	α-Tubulin	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Milchpulver				#2144	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
	Bax	Kaninchen	polyklonal	1:1000	BSA				#2772	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
	Bcl-2	Kaninchen	polyklonal	1:1000	BSA				#2876	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
	β-Aktin	Maus	monoklonal	1:1000	Milchpulver				sc-47778	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
	CD45	Kaninchen	polyklonal			1:200	TRIS-EDTA		20103-1-AP	Proteintech, Rosemont, IL, USA
	Kollagen Typ I	Kaninchen	polyklonal			1:200	Citrat		ab34710	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Sekundärantikörper	Maus IgG	Pferd	polyklonal	1:4000	Milchpulver			HRP	#7076	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
	Maus IgG	Ziege	polyklonal			RTU		HRP	MP-7452	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
	Kaninchen IgG	Ziege	polyklonal	1:5000	Milchpulver			HRP	#7074	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
	Kaninchen IgG	Pferd	polyklonal			RTU		HRP	MP-7401	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
	Kaninchen IgG	Pferd	polyklonal			RTU		AP	MP-5401	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

.....
 Alle Primärantikörper sind Immunglobuline der Klasse G. AP, Alkalische Phosphatase; BSA, Bovines Serumalbumin; EDTA, Ethylendiamintetraacetat; HRP, Meerrettichperoxidase; IHC, Immunhistochemie; RTU, engl. ready to use, gebrauchsfertige Lösungen, die nicht weiter verdünnt wurden; TRIS, Tris(hydroxymethyl)amino-methan.

▼ Anhang 6 | Verwendete Oligonukleotide.

Gen-symbol	Annealing-Temperatur	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
<i>Bax</i>	51°C	GGCAACTTCAACTGGGG	CCACCCTGGTCTTGGATC
<i>Bcl2</i>	59°C	CTTCGCAGAGATGTCCAGTC	CATCTCCCTGTTGACGCTC
<i>Ccl12</i>	57°C	ATTCCACACTTCTATGCCTCT	ATCCAGTATGGTCCTGAA
<i>Ccl2</i>	55°C	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
<i>Ccl3</i>	57°C	TTCTCTGTACCATGACACTCTGC	CGTGGAATCTCCGGCTGTAG
<i>Ccl4</i>	56°C	TTCCTGCTGTTTCTTTACACCT	CTGTCTGCCTCTTTTGGTCAG
<i>Col1a1</i>	58°C	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
<i>Fasl</i>	57°C	TCCGTGAGTTCACCAACCAAA	GGGGGTTCCCTGTAAATGGG
<i>Hprt</i>	57°C	GGCCTCCCATCTCCTTCATG	CAGTCCCAGCGTCGTGATTA
<i>Il1b</i>	57°C	CCAGCTTCAAATCTCACAGCAG	CTTCTTTGGGTATTGCTTGGGATC
pTK	60°C	GTAATGACAAGCGCCAGAT	ATGCTGCCATAAGGTATCG
<i>Tnf</i>	59°C	CCCTCACAATCAGATCATCTT	GCTACGACGTGGGCTACAG

Die gezeigten Oligonukleotide wurden in der Polymerasekettenreaktion als Primer, die die zu replizierende Nukleotidsequenzen der entsprechenden Gene flankieren, eingesetzt. Alle Oligonukleotide wurden von Microsyth Seqlab, Göttingen, Deutschland synthetisiert. Die Expression hier nicht aufgeführter Gene wurde mithilfe von *QuantiTect Primer Assays* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) bestimmt. Als *Annealing*-Temperatur wurde hier stets 59°C gewählt.

▼ Anhang 7 | ARRIVE-Checkliste.

Element	Empfehlung	Verweis
Versuchsplanung	1 Machen Sie für jedes Experiment kurz Angaben zum Studiendesign, einschliesslich:	
	a Die zu vergleichenden Gruppen, einschliesslich Kontrollgruppen. Wenn keine Kontrollgruppe verwendet wurde, sollte dies begründet werden.	Abbildung 7
	b Die Versuchseinheit (z.B. ein einzelnes Tier, ein Wurf oder ein Käfig mit Tieren).	Kapitel 2.14
Stichproben- größe	2 a Geben Sie die genaue Anzahl der Versuchseinheiten an, die jeder Gruppe zugeordnet wurden, sowie die Gesamtanzahl in jedem Versuch. Geben Sie auch die Gesamtzahl der verwendeten Tiere an.	Abbildung 7
	b Erklären Sie, wie die Stichprobengröße festgelegt wurde. Geben Sie Einzelheiten zu jeder allfälligen <i>a-priori</i> -Berechnung der Stichprobengröße an.	Kapitel 2.14
Ein- und Aus- schluss- kriterien	3 a Beschreiben Sie alle Kriterien für den Ein- und Ausschluss von Tieren (oder Versuchseinheiten) während des Versuchs, sowie von Datenpunkten während der Analyse. Geben Sie an, ob diese Kriterien <i>a priori</i> festgelegt wurden. Wenn keine Kriterien festgelegt wurden, geben Sie dies ausdrücklich an.	In Tierversuchsansatz GI20/10 Nr. 21/2016 (Regierungspräsidium Gießen) <i>a priori</i> festgelegt
	b Geben Sie für jede Versuchsgruppe alle Tiere, Versuchseinheiten oder Datenpunkte an, die nicht in die Analyse einbezogen wurden, und erläutern Sie die Gründe dafür. Wenn es keine Ausschlüsse gab, geben Sie dies an.	Kapitel 3.1
	c Geben Sie für jede Analyse den genauen Wert von <i>n</i> in jeder Versuchsgruppe an.	Falls aus Abbildung nicht direkt ersichtlich, in Legende angeben
Rando- misie- rung	4 a Geben Sie an, ob die Zuweisung von Versuchseinheiten zu Kontroll- und Behandlungsgruppen randomisiert wurde. Falls ja, geben Sie die Methode an, die zur Generierung der Randomisierungssequenz verwendet wurde.	Kapitel 2.1.2
	b Beschreiben Sie die zur Minimierung potenzieller Störfaktoren angewandte Strategie, wie z.B. die Reihenfolge der Behandlungen und Messungen oder den Standort des Tieres/Käfigs. Falls Störfaktoren nicht kontrolliert wurden, geben Sie dies ausdrücklich an.	Kapitel 2.1.1
Verblin- dung	5 Geben Sie an, wer in den verschiedenen Phasen des Experiments über die Gruppenzuweisung Bescheid wusste (während der Zuweisung, der Durchführung des Experiments, der Datenerhebung und der Datenanalyse).	Kapitel 2.1.2 Kapitel 2.4 Kapitel 2.5.1
Messpa- rameter	6 a Definieren Sie alle erhobenen Messparameter (z.B. Zelltod, molekulare Marker oder Verhaltensänderungen).	Kapitel 3
	b Geben Sie bei Studien zur Hypothesenprüfung den primären Messparameter an, d.h. den Messparameter, der zur Bestimmung der Stichprobengröße verwendet wurde.	Kapitel 1.5.4

▼ Anhang 7 | ARRIVE-Checkliste (fortgesetzt).

Statistische Methoden	7	a	Geben Sie zu jeder Analyse Einzelheiten zu den statistischen Methoden an, einschließlich der verwendeten Software.	Kapitel 2.14
		b	Beschreiben Sie alle Methoden zur Überprüfung, ob die Daten die Annahmen des statistischen Ansatzes erfüllten, und was unternommen wurde, wenn die Annahmen nicht erfüllt waren.	Kapitel 2.14
Versuchstiere	8	a	Machen Sie artspezifische Angaben zu den verwendeten Tieren, einschließlich Tierart, Zuchtlinie, Geschlecht, Alter oder Entwicklungsstadium und, falls relevant, Gewicht.	Kapitel 2.1.1 Abbildung 7
		b	Geben Sie weitere relevante Informationen über die Herkunft der Tiere, den Gesundheits-/Immunistatus, genetische Veränderungen, den Genotyp und etwaige frühere Eingriffe oder Maßnahmen an.	Kapitel 2.1.1
Experimentelle Eingriffe oder Maßnahmen	9		Beschreiben Sie für jede Versuchsgruppe, einschließlich der Kontrollen, die Eingriffe oder Maßnahmen so detailliert, dass sie von anderen reproduziert werden können, einschliesslich:	
		a	Was wurde gemacht, wie wurde es gemacht und was wurde verwendet.	Kapitel 2.1
		b	Wann und wie oft.	Kapitel 2.1
		c	Wo (einschliesslich Einzelheiten über etwaige Akklimatisierungsphasen).	Kapitel 2.1
	d	Warum (Begründung der Eingriffe oder Maßnahmen).	Kapitel 1.5 Kapitel 2.1	
Ergebnisse	10		Für jedes durchgeführte Experiment, einschließlich unabhängiger Replikationen, berichten Sie:	
		a	Zusammenfassende/beschreibende Statistik für jede Versuchsgruppe, wenn möglich mit einem Maß für Variabilität (z.B. Mittelwert und Standardabweichung, oder Median und Spannweite).	Kapitel 3 Abbildung 14-28 Tabelle 2-3
	b	Falls anwendbar, die Effektgrösse mit einem Konfidenzintervall.	Kapitel 3	

.....

Die Tabelle gibt an, wo die zehn unerlässlichen Elemente der Tierversuchsberichterstattung nach den ARRIVE-Richtlinien 2.0 in der vorliegenden Arbeit zu finden sind. Die Richtlinien wurden im Englischen veröffentlicht.¹⁵⁶ Offizielle deutsche Übersetzung von Chantal Britt, Andrina Zbinden und Hanno Würger abgerufen am 09.05.2023 unter <https://arriveguidelines.org/resources/german-translation>. *Creative Commons Namensnennung 4.0 International-Lizenz* (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). © 2023 NC3Rs.

.....

▼ Anhang 8 | Makro zur Quantifizierung fibrotischen Materials.

```

run("Color Threshold...");

// Color Thresholder 1.52a
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=14;
max[0]=227;
filter[0]="stop";
min[1]=0;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=108;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----
run("Measure");

```

.....
Die gezeigte Befehlsfolge wurde in ImageJ (Version 1.52a) über Process/Batch/Macro wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben auf Aufnahmen von Sirius Red/Fast Green-Färbungen angewendet.
.....

▼ Anhang 9 | Makro zur Quantifizierung CD45⁺-Areale.

```
run("8-bit");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(0, 110);
//setThreshold(0, 110);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Measure");
```

.....
Die gezeigte Befehlsfolge wurde in ImageJ (Version 1.52a) über Process/Batch/Macro wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben auf Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen von CD45 angewendet. *CD, Cluster of Differentiation*.
.....

▼ Anhang 10 | Standardarbeitsanweisung „Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern“.

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern
Standardarbeitsanweisung (SOP)	SOP-Nr.: 001
Standort des Originals: Büro PD Dr. Roderfeld	Seite 1 von 9

Nummer der vorliegenden Fassung: 01	Verfasst von: Annette Tschuschner	Genehmigung durch Laborleitung: PD Dr. Martin Roderfeld
Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 14.03.2014	Datum: 22.01.2013	Unterschrift

▼ Anhang 10 | Standardarbeitsanweisung „Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern“ (fortgesetzt).

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern
Standardarbeitsanweisung (SOP)	SOP-Nr.: 001
Standort des Originals: Büro PD Dr. Roderfeld	Seite 2 von 9

Inhaltsverzeichnis

1. Gegenstand	3
2. Geltungsbereich	3
3. Zuständigkeiten	3
4. Durchführung	3
4.1 Allgemeines	3
4.1.1 Probenmaterial : Mausleber	5
4.1.2 Reagenzien	5
4.1.3 Geräte	5
4.1.4 Sonstiges	5
4.2 Vorbereitung	6
4.3 Durchführung	6
5. Dokumentation	9
5.1 Allgemeines	9
5.2 SOP Gültigkeit	9
6. Mitgeltende Unterlagen	9

Nummer der vorliegenden Fassung: 01	Verfasser: Annette Tschuschner	Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 14.03.2014
--	-----------------------------------	--

▼ Anhang 10 | Standardarbeitsanweisung „Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern“ (fortgesetzt).

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern
Standardarbeitsanweisung (SOP)	SOP-Nr.: 001
Standort des Originals: Büro PD Dr. Roderfeld	Seite 3 von 9

1. Gegenstand

Diese SOP beschreibt die allgemeinen Abläufe zur Analyse des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern und deren Dokumentation im Labor.

2. Geltungsbereich

Die vorliegende SOP gilt für das gesamte Labor der AG Roeb.

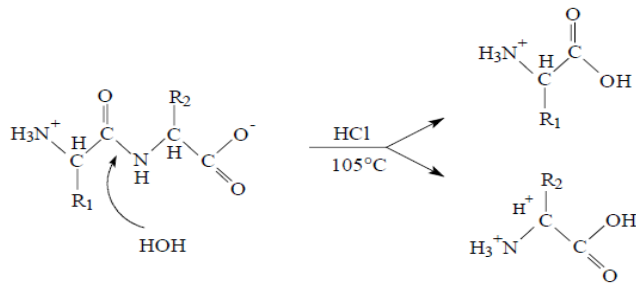
3. Zuständigkeiten

Labormitarbeiter

4. Durchführung**4.1 Allgemeines**

Durch Säurehydrolyse ist es möglich den Hydroxyprolinegehalt von organischen Gewebeprobe zu bestimmen und den Gesamtkollagengehalt zu errechnen. Der Hydroxyprolinegehalt wird nach dem Verfahren von Woessner in einer modifizierten Art nach Stegemann und Stalder ermittelt, da sich diese Methode dann auch für Proben mit niedrigem Hydroxyprolinegehalt eignet [Woessner, 1961; Stegemann und Stalder, 1967]. Es handelt sich hierbei um eine quantitative Kollagenbestimmung in Proteinhydrolysaten.

In Anwesenheit von halbkonzentrierter Salzsäure (6 mol/l) wird die Peptidbindung bei hohen Temperaturen (105°C) hydrolytisch gespalten.

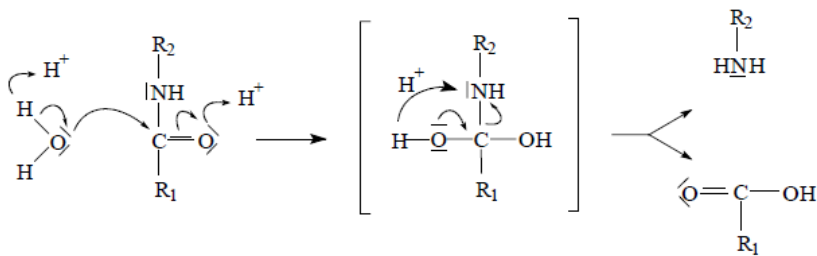


Nummer der vorliegenden Fassung: 01	Verfasser: Annette Tschuschner	Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 14.03.2014
--	-----------------------------------	--

▼ Anhang 10 | Standardarbeitsanweisung „Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern“ (fortgesetzt).

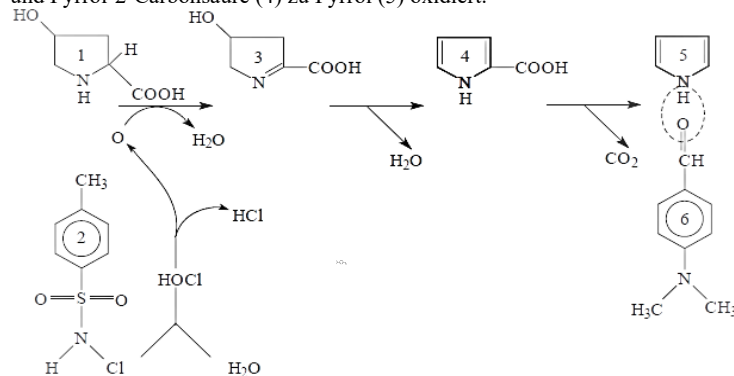
AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern
Standardarbeitsanweisung (SOP)	SOP-Nr.: 001
Standort des Originals: Büro PD Dr. Roderfeld	Seite 4 von 9

Der Reaktionsmechanismus läuft nach folgendem Schema ab:



Nach Abschluß der Hydrolyse wird das Hydrolysat mit Natronlauge neutralisiert und mit einem Citratpuffer auf pH 5,4 bis 6,0 eingestellt. Anschließend kann Hydroxyprolin mit p-Dimethylaminobenzaldehyd nachgewiesen werden [Woessner, 1961]:

Hydroxyprolin(1) wird durch Chloramin T (2) schrittweise über Pyrrolinocarboxylsäure (3) und Pyrrol-2-Carbonsäure (4) zu Pyrrol (5) oxidiert.



Pyrrol (5) bildet zusammen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (6) ein Chromophor, welches ein Absorptionsmaximum bei 565 nm hat.

(Quelle: Hyp-assay german manual page16-20); weitere Literatur: G. Kesava Reddy and Chukuka S. Enwemeka, "A Simplified Method for the Analysis of Hydroxyproline in Biological Tissues", Clinical Biochemistry, 1996, Vol.29, No.3, 225-229)

Nummer der vorliegenden Fassung: 01	Verfasser: Annette Tschuschner	Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 14.03.2014
--	-----------------------------------	--

▼ Anhang 10 | Standardarbeitsanweisung „Bestimmung des Hydroxyprolingehalts in Mäuselebern“ (fortgesetzt).

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Bestimmung des Hydroxyprolingehalts in Mäuselebern
Standardarbeitsanweisung (SOP)	SOP-Nr.: 001
Standort des Originals: Büro PD Dr. Roderfeld	Seite 5 von 9

4.1.1 Probenmaterial: Mauseleber**4.1.2 Reagenzien**

6N HCL (50ml aus 37% HCL + 50ml aq. dest.)	Raum: 00/337220, Labor 2
50% Isopropanol (2-Propanol)	Raum: 00/337220, Labor 2
Methanol	Raum: 00/337230, Labor 3
Isopropanol (2-Propanol)	Raum: 00/337230, Labor 3
Chloramin-T	Raum: 00/337230, Labor 3
0,6%Chloramin-T	Raum: 00/337230, Labor 2
Ehrlich's Reagenz (4-Dimethylamino-benzaldehyd)	Raum: 00/337230, Labor 3
70% Perchlorsäure	Raum: 00/337230, Labor 3
Zitronensäure Monohydrat (Puffer A)	Raum: 00/337230, Labor 3
NaOH (Plätzchen) (Puffer A)	Raum: 00/337230, Labor 3
Natriumacetat trihydrat (Puffer A)	Raum: 00/337230, Labor 3
100 % Essigsäure (z. Einstellen des pH-Wertes)	Raum: 00/337230, Labor 3
Extran MA 03 (Desinfektionsmittel, Fa. Merck)	Raum: 00/337220, Labor 2

4.1.3 Geräte

Mörser		
Feinwaage	(Satorius A200S)	Raum: 00/337320, Wägeraum
Dewargefäß	(Isotherm)	Raum: 00/337210, Labor 1
Löffelspatel		Raum: 00/337220, Labor 2
Metallzange		Raum: 00/337220, Labor 2
Verkochungsröhrchen, Duran (Culture tubes with screw-cap)		Raum: 00/337220, Labor 2
Ultra-Turrax	(IKA T8)	Raum: 00/337210, Labor 1
Stickstoff zum Einengen der Proben		Raum: 00/337230, Labor 3
Vortex	(neoLab 7-2020)	Raum: 00/337210, Labor 2
Tischzentrifuge	(HettichMicro 200R)	Raum: 00/337210, Labor 2
Wärmeschrank	(Heraeus Instruments)	Raum: 00/337330, Spülküche

4.1.4 Sonstiges

Eppendorfpipetten, verschiedene Volumina
 Pipettenspitzen, verschiedene Größen
 Millex Syringe Driven Filtereinheiten, 13mm, PES, 0,45µm
 Kanülen, gelb, 0,9 x 70mm
 Trockeneis
 Flüssiger Stickstoff
 Eis
 Papiertücher

Nummer der vorliegenden Fassung: 01	Verfasser: Annette Tschuschner	Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 14.03.2014
--	-----------------------------------	--

▼ Anhang 10 | Standardarbeitsanweisung „Bestimmung des Hydroxyprolingehalts in Mäuselebern“ (fortgesetzt).

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Bestimmung des Hydroxyprolingehalts in Mäuselebern
Standardarbeitsanweisung (SOP)	SOP-Nr.: 001
Standort des Originals: Büro PD Dr. Roderfeld	Seite 6 von 9

0,5 ml +1,5 ml Eppendorf Cups
Eppendorf Cup Ständer
Erlenmeyerkolben/ Bechergläser
Styroporbox
1x Nitrilhandschuhe
Kittel
Schutzbrille

4.2 Vorbereitung

Nicht vergessen: Schutzkleidung inkl. Handschuhe tragen, bei Arbeiten mit starken Säuren bitte Schutzbrille aufsetzen!

Alle Eppis und Verkochungsröhrchen sollten zuvor beschriftet werden.

4.3 Durchführung

Mauslebern (Lagerung – 80°C Schrank Labor Roeb, Raum: 00/33700)

Lebergewebe in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Mörser sorgfältig zu feinem Pulver zerreiben (1-2 größere Stückchen f. eventuelle Cryoeinbettung zurückbehalten) und in eine vorbeschriftete und mit flüssigem Stickstoff gekühlte Metalldose überführen.

- Die Mausleber wird auf Trockeneis transportiert und bis zum Einwiegen dort aufbewahrt!
- Der Löffelspatel und die Metallzange werden vorher mit flüssigem Stickstoff heruntergekühlt.

Einwaage:

Tag 1: ein vorbeschriftetes Verkochungsröhrchen auf der Feinwaage tarieren.

50mg gemörserte Mausleber einwiegen und in **1ml 6N HCL aufnehmen (das Volumen der Einwaage genau mit 6N HCL anpassen, d.h. bei einer Einwaage von z.B. 45 mg Gewebe Zugabe von 900 µl 6N HCL).**

Alle Proben bei Raumtemperatur bis zum Homogenisieren stehen lassen, da das Gewebe bereits in HCL aufgenommen wurde.

>Nach Gebrauch des Löffelspatels diesen mit einem sauberen Papiertuch gründlich abwischen und ihn danach wieder herunterkühlen, bevor man ihn erneut benutzt<

Nummer der vorliegenden Fassung: 01	Verfasser: Annette Tschuschner	Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 14.03.2014
--	-----------------------------------	--

▼ Anhang 10 | Standardarbeitsanweisung „Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern“ (fortgesetzt).

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Mäuselebern
Standardarbeitsanweisung (SOP)	SOP-Nr.: 001
Standort des Originals: Büro PD Dr. Roderfeld	Seite 7 von 9

Nach dem Einwiegen alle Proben mit einem Ultra-Turrax in Duran-Verkochungsröhrchen homogenisieren, (die Verkochungsröhrchen müssen gut zugedreht werden! Darauf achten, dass die Dichtungsscheiben im Deckel ganz und vorhanden sind).

Die Proben über Nacht (ca. 16h) bei 110°C im Wärmeschrank inkubieren (hydrolytische Spaltung der Peptidbindung).

Tag 2:

Filtration des Homogenats mit einem 0,45µm PES-Filter; der Überstand ist klar und gelb.

Aus den Überständen werden 2 x 15µl (Doppelwerte) in beschriftete 1,5ml Eppis pipettiert. 15µl = 0,75mg Gewebe. Der Rest wird bei 4°C in einer Box aufbewahrt.

Zugabe von 15µl Methanol (absolut) zu jeder Probe (bitte Combitips verwenden, da sonst das Pipettieren zu ungenau wird!)


Die Proben kurz anzentrifugieren und unter Stickstoff bei 50°C (im Heizblock) unter dem Abzug komplett einengen.


In der Zwischenzeit:**Ansatz der Hydroxyprolin-Standards:**


Stock-Lösung Hydroxyprolin: 1mg/ml in 50% Isopropanol (2-Propanol) (Aliquots à 100µl in Martin's Fach, -20°C, Raum: 00/337310, ZKL)


Arbeitslösung: 100µg/ml (Stock-Lsg mit 50% Isopropanol verdünnen)


Standard (50µl Endvolumen):

5) 640ng/50µl (12,8µg/ml) = 261,6µl 50% Isoprop+ 38,4µl 100µg/ml HP 

4) 320ng/50µl (6,4µg/ml) = 1:2 (150µl 50% Isoprop. + 150µl HP) 

3) 160ng/50µl (3,2µg/ml) = 1:2 (150µl 50% Isoprop. + 150µl HP) 

2) 80ng/50µl (1,6µg/ml) = 1:2 (150µl 50% Isoprop. + 150µl HP) 

1) 40ng/50µl (0,8µg/ml) = 1:2 (150µl 50% Isoprop. + 150µl HP) 

0) Leerwert = 50µl 50% Isoprop..

Die Berechnung erfolgte für Doppelwerte. Die einzelnen Standardwerte sollten zur Vermeidung ungenauer Volumina nochmals in neue Eppis 100µl (Doppelwert) genau pipettiert werden.

Die kristallinen Proben werden in 50µl 50% Isopropanol aufgenommen und bis zur vollständigen Auflösung gevortext.

Nummer der vorliegenden Fassung: 01	Verfasser: Annette Tschuschner	Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 14.03.2014
--	-----------------------------------	--

▼ Anhang 10 | Standardarbeitsanweisung „Bestimmung des Hydroxyprolingehalts in Mäuselebern“ (fortgesetzt).

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Bestimmung des Hydroxyprolingehalts in Mäuselebern
Standardarbeitsanweisung (SOP)	SOP-Nr.: 001
Standort des Originals: Büro PD Dr. Roderfeld	Seite 8 von 9

Zu 50µl Standard bzw. Probe + 100µl 0,6% ChloraminT-Lsg. pipettieren, vortexen und 10min bei RT inkubieren.

0,6% ChloraminT- Lsg.: 300mg Chloramin T
(1-2 Tage im Kühlschrank haltbar) in 50ml Puffer B lösen.

Puffer A : 3,4g NaOH
3,4g Zitronensäure Monohydrat (=162mM)
12g Natriumacetat Trihydrat (=881mM)
pH=6,0 mit Eisessig (100 % Essigsäure) einstellen
auf 100ml Endvolumen auffüllen, bei 4°C aufbewahren.

Puffer B: 60ml Isopropanol (2-Propanol)
33ml Aqua dest.
39ml Puffer A, bei 4°C aufbewahren

Ansatz von Ehrlich's Reagenz: 3g Ehrlich's Reagenz (4-Dimethylamino-benzaldehyd)
26ml Isopropanol (100%) (2-Propanol)
8ml 70% Perchlorsäure

Achtung: Perchlorsäure ist ätzend und leichtentzündlich. Bitte tropfenweise und als Letztes dazu pipettieren

Wichtig: Ehrlich's Reagenz immer frisch ansetzen
Die Perchlorsäure-Reste (flüssig und fest) werden gesondert in einem dafür vorgesehenem Abfallgefäß entsorgt.

Zugabe von 100µl der frisch angesetzter Ehrlich's Reagenz-Lsg.
Alle Proben und Standards vortexen und 45min bei 50°C inkubieren. Damit die Reaktion wirklich abgestoppt ist, bitte alle Reaktionen auf Eis stellen.

Danach werden alle Proben und Standards als Doppelwerte in eine 96well Platte überpipettiert und bei einer Absorption von 570nm gegen 0 (Leerwert) mittels ELISA Reader messen (150-200µl Volumen).

Berechnung: Beispiel: OD minus Blank=0,131
50mg Leber in 1000µl 6N HCL (15µl Probe =0,75mg Leber)

$$1000/0,75 = 1,333 \Rightarrow \text{Faktor}$$

Standardkurve, z.B.:
 $x=(y + 0,0040)/0,0003=0,131+0,004)/0,0003=450\text{ng}/0,75\text{mg Leber}$

$$\mu\text{g/g Leber}=450 \times 1,333 = 599\mu\text{g/g Leber}$$

Nummer der vorliegenden Fassung: 01	Verfasser: Annette Tschuschner	Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 14.03.2014
--	-----------------------------------	--

▼ Anhang 10 | Standardarbeitsanweisung „Bestimmung des Hydroxyprolingehalts in Mäuselebern“ (fortgesetzt).

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Bestimmung des Hydroxyprolingehalts in Mäuselebern
Standardarbeitsanweisung (SOP)	SOP-Nr.: 001
Standort des Originals: Büro PD Dr. Roderfeld	Seite 9 von 9

5. Dokumentation

5.1 Allgemeines

Jede Photometrische Bestimmung der Hydroxyprolin-Konzentration muss dokumentiert werden; bitte mit Datum, Probenmaterial und Nummern versehen, um es zu archivieren.

5.2 SOP Gültigkeit

SOP's werden als gelenkte Dokumente gehandhabt. Sie werden mit eindeutigen Bezeichnungen (SOP-Nr. und Version) sowie Gültigkeitsdatum versehen und genehmigt. Die Genehmigung erfolgt durch die Laborleitung.

Die Revision bzw. Überprüfung der SOP erfolgt in vordefinierten Zeitabständen.

6. Mitgeltende Unterlagen

Geräteanweisung für Fusion (ELISA-Reader) von Packard BioScience Company
Produktinformationen der verwendeten Reagenzien

Nummer der vorliegenden Fassung: 01	Verfasser: Annette Tschuschner	Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 14.03.2014
--	-----------------------------------	--

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“.

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 1 von 15</p>
--	--

<p>Nummer der vorliegenden Fassung: 01</p>	<p>Verfasst von: Annette Tschuschner und Katharina Kopsch</p>	<p>Genehmigung durch Laborleitung: PD Dr. Martin Roderfeld</p>
<p>Inkrafttreten der vorliegenden Fassung: 18.02.2015</p>	<p>Datum:</p> <p>Unterschrift</p>	<p>Datum:</p> <p>Unterschrift</p>

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 2 von 15</p>
--	--

Inhaltsverzeichnis

1. Gegenstand.....	3
2. Geltungsbereich	3
3. Zuständigkeiten.....	3
4. Durchführung	3
4.1 Allgemeines	3
4.1.1 Probenmaterial.....	4
4.1.2 Reagenzien.....	4
4.1.3 Geräte.....	5
4.2 Vorbereitung	5
4.3 Durchführung / pipettieren.....	5
5. Dokumentation.....	14
5.1 Allgemeines	14
5.2 SOP Gültigkeit.....	
6. Mitgeltende Unterlagen	15

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 3 von 15</p>
--	--

1. Gegenstand

Diese SOP beschreibt die allgemeinen Abläufe der Isolierung, Quantifizierung und Qualitätssicherung von RNA und deren Dokumentation im Labor.

2. Geltungsbereich

Die vorliegende SOP gilt für das gesamte Labor der AG Roeb.

3. Zuständigkeiten

Labormitarbeiter

4. Durchführung

4.1 Allgemeines

Ribonukleinsäure (RNS) ist eine Nukleinsäure, die sich als Polynukleotid aus einer Kette von vielen Nukleotiden zusammensetzt. Im wissenschaftlichen Sprachgebrauch wird Ribonukleinsäure mit der englischen Abkürzung **RNA** (*ribonucleic acid*) benannt, oft auch im Deutschen.

Wesentliche Funktionen der RNA in der biologischen Zelle ist die Umsetzung von genetischer Information in Proteine (siehe Proteinbiosynthese, Transkription und Translation), in Form der mRNA fungiert sie hierbei als Informationsüberträger. Über die isolierte mRNA sollen nach Umschreibung in cDNA per quantitativer real time PCR Daten über die transkriptionelle Regulation bestimmter Gene gewonnen werden.

Auch die für die Genregulation wichtige microRNA wird in der AG Roeb analysiert.

Daneben erfüllen spezielle RNA-Typen weitere Aufgaben; bei RNA-Viren macht sie sogar das Genom selbst aus. Weiterhin bestehen auch Teile der für die Umsetzung dieser Information verantwortlichen Zellbestandteile aus RNA: Bei der Reifung der mRNA sind snRNA und snoRNA beteiligt, die katalytischen Bestandteile der Ribosomen bildet die rRNA, und die tRNA transportiert die Bausteine für die Proteine. Ferner sind spezielle RNAs an der Genregulation beteiligt.

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion
Standardarbeitsanweisung (SOP)	
Standort des Originals: Büro Laborleiter	
	SOP-Nr.: 004v01
	Seite 4 von 15

4.1.1 Probenmaterial

Mausleber

4.1.2 Reagenzien

RNeasy Mini Kit 250	(Qiagen Cat.No. 74106	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
70% Ethanol (RNase frei)		Labor Roeb, Raum: 00/337210)
β-Mercaptoethanol	(Kühlschrank	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
RNase freies Aqua dest.		Labor Roeb, Raum: 00/337310)
AM 1907 Turbo DNA-free	(Fa.Ambion	Labor Roeb, Raum: 00/337310)
Aqua dest.		Labor Roeb, Raum: 00/337220)
Agarose	(Chemikalienschrank	Labor Roeb, Raum: 00/337230)
6 fach RNA Probenpuffer	(Gefrierschrank – 20°C	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Bromphenolblau	(Chemikalienschrank	Labor Roeb, Raum: 00/337230)
SDS (Natrium Dodecylsulfat)	(Chemikalienschrank	Labor Roeb, Raum: 00/337230)
Ethidiumbromid	(Sicherheitsschrank	Labor Roeb, Raum: 00/337230)
1x TAE Puffer	(Chemikalienschrank	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
(10x TAE = 218g Tris base; 110g Borsäure; 9,3g EDTA ad 2 liter a.d.)		
RNase AWAY 475 ml	(M&PCat.No. # 7002	Labor Roeb, Raum: 00/337310)

4.1.3 Geräte

Mörser		
Feinwaage	(Satorius A200S	Labor Roeb, Raum: 00/337320)
Dewargefäß	(Isotherm	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Löffelspatel		Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Metallzange		Labor Roeb, Raum: 00/337220)
Homogenisator	(IKA T8	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
QIASHredder (250)	(Qiagen, Cat.No. 79656	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Tischzentrifuge	(Hettich Micro 120	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Thermomixer	(Eppendorf comfort	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Photometer	(Spectronic Bio genesys 10 bio,	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Nano Drop	(Spectrophotometer ND-1000	ECCPS, Räume: 118 / 205)
Stromgeber	(Avantec consort EV 243	Labor Roeb, Raum: 00/337230)
Thermocycler	(Biometra T 3000	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Kamera	(Phytec USB Cam 051H Reprostar 3	Labor Roeb, Raum: 00/337230)
Mikrowelle	(Alaska	Labor Roeb, Raum: 00/337230)

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels</p> <p>RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 5 von 15</p>
--	---

4.1.4 Sonstiges

Eppendorfpipetten, verschiedene Volumina
 Pipettenspitzen, verschiedene Größen
 Trockeneis
 Flüssiger Stickstoff
 Eis
 Papiertücher
 0,5 ml +1,5 ml Eppendorf Cups
 Eppendorf Cup Ständer
 2 Bechergläser
 Styroporbox
 1x Handschuhe + Nitrilhandschuhe
 Schutzhandschuhe
 Kittel
 Schutzbrille
 Metalldose
 UVette (Küvette)
 Erlenmeyerkolben/ Bechergläser

4.2 Vorbereitung

Vor Gebrauch sind alle zu verwendende Geräte und die Arbeitsbank mit 70% Ethanol und „RNase AWAY“ zu reinigen. Nicht vergessen: Schutzkleidung inkl. Handschuhe tragen und lange Haare zusammen zu binden.

4.3 Durchführung (RNeasy Mini Kit 250; QIASHredder (250))

Mausleber (Lagerung – 80°C Schränke Labor Roeb, Räume: 00/337300 und 337230)

Gewebematerial in sauberem mit flüssigem Stickstoff gekühltem Mörser sorgfältig zu feinem Pulver zerreiben und in eine vorbeschriftete und mit flüssigem Stickstoff gekühlte Metalldose überführen.

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 6 von 15</p>
--	--

- Die Mausleber wird auf Trockeneis transportiert und bis zum Einwiegen dort aufbewahrt
- Das jeweilige Eppendorf Cup, der Löffelspatel und die Metallzange werden vorher mit flüssigem Stickstoff heruntergekühlt.

Einwaage: zwischen **20** und **30mg** gemörserte Mausleber
in ein vorbeschriftetes 1,5 ml Eppendorf Cup einwiegen und bis zum Homogenisieren in flüssigem Stickstoff lagern.

>Nach Gebrauch des Löffelspatels diesen mit einem sauberen Papiertuch gründlich abwischen und ihn danach wieder herunterkühlen, bevor man ihn erneut benutzt<

Lysepuffer = 1 ml RLT – Puffer + 10µl β-Mercaptoethanol versetzen und gut vortexen.

- Leber mit **600 µl** (350 µl bei Zellen) Lysepuffer versetzen und homogenisieren.

Ab hier alle Schritte bei Raumtemperatur durchführen

- Das Homogenisat auf den **Shredder (lila Säule)** geben und 2 min. bei 14.000 rpm zentrifugieren.

- Den Shredder verwerfen.

- Das Lysat mit **600 µl** (350 µl bei Zellen) 70 % Ethanol (RNasefrei) versetzen, gut mischen und auf die **Säule (rosa)** geben.

2x beladen, da die Säule nur 700 µl fasst.

- Zentrifugation: 15 sec. 8.000 g **2x**.
- Nach der 1. Zentrifugation den Durchfluss verwerfen.

RW1 = Waschpuffer

- Mit **700 µl** (500 µl bei Zellen) RW1 (Waschpuffer) waschen.

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels</p> <p>RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 7 von 15</p>
--	---

- Zentrifugation 15 sec. 8.000g.
- Die Säulen in neue Collection tubes (ohne Deckel) überführen.

RPE = Waschpuffer (enthält 70% Ethanol)

- Je **500 µl** (300 µl bei Zellen) RPE (Waschpuffer) auf die Säulen geben.
- Zentrifugation 15 sec. 8.000g.
- Durchfluss verwerfen.
- Nochmals je **500 µl** (300 µl bei Zellen) RPE (Waschpuffer) auf die Säulen geben.
- Zentrifugation 1min 8.000g.
- Durchfluss verwerfen.
- Sie Säulen 15 sec. mit 8.000g. trocken zentrifugieren.

Elution

- Die trocken zentrifugierten Säulen in vorbeschriftete 1,5 ml Eppendorf Cups überführen.
- Die Membran mit **40 µl** (30 µl bei Zellen), dem Kit beigefügten Aqua dest. (RNasefrei) benetzen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
- Zentrifugation 1 min., 8.000g. Die rosa Säulen verwerfen.

Die isolierte RNA sowie die nachfolgenden Reagenzien des Turbo DNA-free Kits bis zur weiteren Verwendung im Eisbad aufbewahren.

4.4 DNase – Behandlung isolierter RNA
(AM 1907 Turbo DNA-free, Fa.Ambion)

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 8 von 15</p>
--	--

Die isolierte RNA (40 µl) wird mit

- + 1/10 Volumen 10x Turbo DNase Buffer
- + 1µl Turbo DNase

versetzt, gemixt und 30 min. bei 37°C im Thermomixer inkubiert.

Zugabe von

- + 1/10 Volumen DNase Inactivation Reagent

per Hand mischen und 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren. Innerhalb der 5min mind. noch 2mal per Hand durchmischen.

→Zentrifugation: 10.000 x g für 1,5 min.

→Den Überstand in ein neues, beschriftetes Eppendorf Cup überführen. Vorsicht, das Pellet ist sehr weich!

4.5 Konzentrationsbestimmung der DNase behandelten RNA mittels:

4.5.1 Spektrophotometer: Nanodrop

Zur Quantifizierung des RNA-Gehalts der einzelnen Proben wurde die optische Dichte einer 1mm und einer 0,2mm langen Probensäule bei einer Wellenlänge von 280nm, 260nm sowie bei 230nm mit einem Spektrophotometer erfasst. RNA sowie DNA absorbieren aufgrund der enthaltenen Nukleinsäuren ultraviolettes Licht bei einer Wellenlänge von 260nm. Proteine hingegen haben ein Absorptionsmaximum bei 280nm, Kontaminanten wie beispielsweise Phenol absorbieren hingegen bei einer Wellenlänge von 230nm.

Aus den ermittelten Werten werden daraufhin folgende Quotienten gebildet:

$A_{260/280}$:

Das Verhältnis der optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 260n bzw. 280nm gibt Aufschluss über die Reinheit der RNA respektive der DNA. Ab einem Wert von 2,0 kann man

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels</p> <p>RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 9 von 15</p>
--	---

von einer reinen RNA ausgehen. Niedrigere Werte dieses Quotienten sind ein Hinweis auf Verunreinigungen der Proben.

A_{260/230}:

Wie der obige Quotient ist auch das Verhältnis der optischen Dichte bei Wellenlängen von 260nm und 230nm ein Indikator für die Reinheit der gewonnenen RNA und befindet sich bei unkontaminierten Proben im Bereich 1,7-2,1.

Die RNA-Konzentration in den Proben können daraufhin mithilfe einer modifizierten Lambert-Beer-Formel ermittelt:

$$C_{RNA} = (A_{260} - A_{LW}) \cdot 40 \cdot V$$

C_{RNA} = RNA-Konzentration (ng/µl)

A_{260} = Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$

A_{LW} = Absorption der Leerwertprobe bei einer Wellenlänge von 260nm

40 = RNA-spezifischer Multiplikationsfaktor

V = Verdünnungsfaktor

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 10 von 15</p>
--	---

Messung:

Nanodrop: ND-1000 Spectrometer

befindet sich im ECCPS, 1.Stock, links, Raum 118, Lab. Prof. Weißmann

Bitte eigene Pipette, Filtertips + RNase freies Wasser mitnehmen!

Instruktion:

Passwort: PD5501

Programm starten: ND-1000 V3.7.1 Verknüpfung anklicken

Programmauswahl: Nucleid Acid

Kalibrierung: Papiertuch von dem Messhebel entfernen

1µl RNase freies Wasser auf die Messzelle pipettieren (Messsonde ist eingerahmt in Metall)

mit „ok“ bestätigen.

Auswahl der Messmethode = Sample Type: RNA 40,

„Blank“ anklicken

Dieselbe Probe nochmals messen unter „measure“.

Beträgt das gemessene Wasser ≤ 0 , den Wassertropfen abwischen und mit den Probenmessungen fortfahren.

Probenmessung: immer 1µl Volumen pipettieren

nach jeder Messung wird der Tropfen mit Kleenex entfernt,

Probenamen bitte unter „sample ID“ eintragen und entsprechend verändern.

Die Ergebnisse werden unter „Recording“ gespeichert in ng/µl.

Man kann sie laufend kontrollieren unter „Show report“, mit Exit kehrt man wieder in den Messmodus zurück.

Alle Berechnungen erscheinen gleichzeitig: 260nm, 280nm sowie alle Quotienten. Nach dem Messen werden alle Ergebnisse unter „Print report“ ausgedruckt.

Nach den Messungen die Messsonde des Nanodrop mit RNase freiem Wasser säubern und bitte wieder ein Kleenex zw. den Messhebel und die Messsonde legen.

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 11 von 15</p>
--	---

4.5.2 Photometer

Das **Photometer befindet sich im Labor 1**: anschalten und Selbsttest / Kalibration abwarten.

- ° **ESC drücken**
- ° **General Tests wählen**
- ° **Absorbance Ratio wählen**

Wavelength 1 260

Wavelength 2 280

(Das Verhältnis der beiden Wellenlängen ergibt die Reinheit) = **Sollwert: 1,7 – 2,1**

Run Test starten

Eppendorf UVette mit 100 µl RNasefreien H₂O füllen und in den Lichtschacht stellen.

Measure blank (Messung starten)

Messung wiederholen als Sample = 2fach Messung

Eppendorf UVette mit 97,5 µl RNasefreien H₂O und 2,5 µl RNA füllen, leicht mischen und in den Lichtschacht stellen.

Measure Sample

Messung wiederholen = 2fach Messung

Max. Absorption 1000, evtl. die Proben verdünnen.

> 1000, die Proben verdünnen.

< 1000, die Proben konzentrierter einsetzen.

Nachdem die RNA vermessen ist, 3x auf **ESC** drücken und Photometer ausschalten.

Von den bei 260 nm gemessenen Werte den Mittelwert bilden und nach folgender Formel berechnen:

Wellenlänge: **260nm**

Verd. Faktor: z.B. **40 (100 µl : 2,5 µl)**

Dilution multipliert: **1000**

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen	Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels
Standardarbeitsanweisung (SOP)	
Standort des Originals: Büro Laborleiter	RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion
	SOP-Nr.: 004v01
	Seite 12 von 15

$$\text{Absorption}_{260} \times 40 \text{ (verd. Faktor)} \times 40 \text{ (festgelegter Faktor des Photometers)} = \times \mu\text{g}/\mu\text{l RNA}$$

$$1000 \text{ (}\mu\text{l)}$$

4.6 Qualitätskontrolle der RNA mittel Agarosegel + Ethidiumbromid

Agarosegel für RNA

Nitril Handschuhe, Kittel, Schutzbrille!!!

Ethidiumbromid (EtBr), auch **Ethidium** oder **Homidium** genannt, ist ein roter Phenanthridin-Farbstoff, der in der Molekularbiologie zum Nachweis der Nukleinsäuren, DNA und RNA, verwendet wird.



Sehr giftig (T+)



1,5 g Agarose in 92,5 ml 1x **MOPS** (50 ml / Gel ausreichend) mittels Mikrowelle lösen.

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 13 von 15</p>
--	---

Auf ca. 60°C abkühlen lassen, 7,5ml **Formaldehyd (37%)** hinzufügen + 0,5 µl Ethidiumbromid hinzugeben und leicht schwenken.

Vorsichtig in einen vorbereiteten Gelschlitten gießen, Kamm einsetzen und komplett abkühlen lassen. Da das Becherglas mit EtBr. kontaminiert ist, sollte es nach dem Ausleeren mit 70% ETOH mind. 30min dekontaminiert werden. Anschließend gründlich mit Wasser auswaschen und zum Spülen geben.

In der Zwischenzeit:

1 µl RNA + 4 µl 6x RNA Ladepuffer versetzen.

Mixtur 10 min. bei 65°C im Thermomixer erhitzen.

Kurz anzentrifugieren und die Probe komplett auf das Agarosegel auftragen.

Gellauf : kleines Gel **65 V**

4.7 Fotografieren des RNA – Gels

Programm: Phytoc Vision Demo 2.2 Lamag Reprostar3

Kameraverbindung zum Rechner herstellen

Gerät einschalten

Das Gel mittels Schaufel in die linke obere Ecke legen

Linken Drehschalter auf - white stellen und kontrollieren, ob das komplette Gel unter der Kamera liegt.

Objektiv einrichten, sofern nötig

Gain einstellen

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 14 von 15</p>
--	---

UV- Lampe anschalten

Bild aufnehmen (Kamerasymbol)

Bild unter **jpg** in dem jeweiligen Ordner abspeichern und invers für Laborbuch ausdrucken (Banden schwarz, Hintergrund weiss).

Nach Entfernen des Gels die Glasplatte der Kamera und die Schaufel mittels 70% EtOH reinigen. Entsorgen der Tücher, der Handschuhe und des Gels in die dafür vorgesehenen Behälter!

5. Dokumentation

5.1 Allgemeines

Jede Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit (Gel) müssen im Laborbuch dokumentiert werden.

5.2 SOP Gültigkeit

SOP's werden als gelenkte Dokumente gehandhabt. Sie werden mit eindeutigen Bezeichnungen (SOP-Nr. und Version) sowie Gültigkeitsdatum versehen und genehmigt. Die Genehmigung erfolgt durch die Laborleitung.

Die Revision bzw. Überprüfung der SOP erfolgt in vordefinierten Zeitabständen

▼ Anhang 11 | Standardarbeitsanweisung „Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber“ (fortgesetzt).

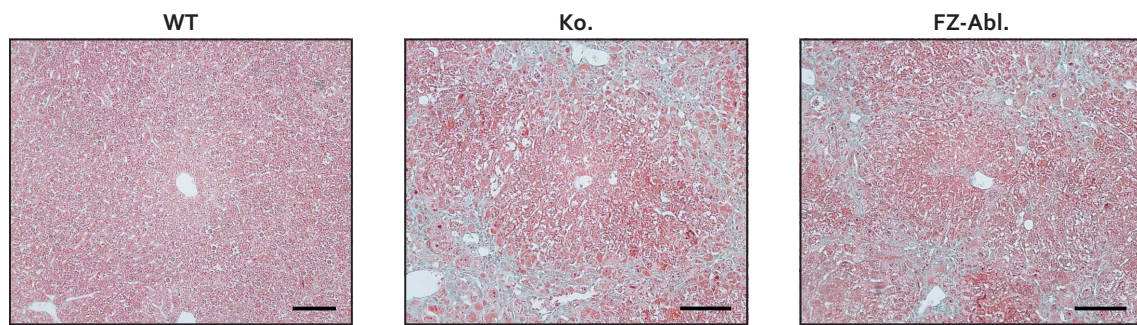
<p>AG Prof. Roeb Institute for Gastroenterology, faculty of medicine, JLU Giessen</p> <p>Standardarbeitsanweisung (SOP)</p> <p>Standort des Originals: Büro Laborleiter</p>	<p>Isolierung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätssicherung von RNA aus Mausleber mittels</p> <p>RNeasy Mini Kit von Qiagen und Turbo DNA-free™ von Ambion</p> <p>SOP-Nr.: 004v01</p> <p>Seite 15 von 15</p>
--	--

6. Mitgeltende Unterlagen

RNeasy Mini Kit 250	(Qiagen Cat.No. 74106	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Homogenisator	(IKA T8.01	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Tischzentrifuge	(Hettich Micro 120	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Thermomixer	(Eppendorf comfort	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Photometer	(Spectronic Bio genesys 10 bio,	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Nano Drop	(Spectrophotometer ND-1000	ECCPS, Räume: 118 / 205)
Stromgeber	(Avantec consort EV 243	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Thermocycler	(Biometra T 3000	Labor Roeb, Raum: 00/337210)
Kamera	(Phytec USB Cam051H Reprostar 3	Labor Roeb, Raum: 00/337230)
Mikrowelle	(Alaska	Labor Roeb, Raum: 00/337230)

Packungsbeilagen der verwendeten Reagenzien

▼ Anhang 12 | Masson-Goldner-Färbung.



.....
Die Masson-Goldner-Färbung stellt fibrilläre Kollagene analog zur Sirius Red/Fast Green-Färbung dar und wurde für das *Staging* herangezogen. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Balken 100 μm .
.....

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Hempel F[†], Roderfeld M[†], Savai R, Sydykov A, Irungbam K, Schermuly R, Voswinckel R, Köhler K, Churin Y, Kiss L, Bier J, Pons-Kühnemann J, Roeb E. Depletion of Bone Marrow-Derived Fibrocytes Attenuates TAA-Induced Liver Fibrosis in Mice. *Cells* **2019**; 8(10): 1210.

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden in oben genannter Publikation in Teilen vorab veröffentlicht. Entsprechend gekennzeichnete Abbildungen wurden hieraus modifiziert reproduziert. Das Werk ist unter <https://doi.org/10.3390/cells8101210> frei verfügbar und steht unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International-Lizenz. Die Lizenzbedingungen sind unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0> einsehbar. © 2019 Die Autorinnen und Autoren.

Irungbam K, Roderfeld M, Glimm H, Hempel F, Schneider F, Hehr L, Glebe D, Churin Y, Morlock G, Yüce I, Roeb E. Cholestasis impairs hepatic lipid storage via AMPK and CREB signaling in hepatitis B virus surface protein transgenic mice. *Lab Invest* **2020**; 100(11): 1411-24.

Weglage J[†], Wolters F[†], Hehr L, Lichtenberger J, Wulz C, Hempel F, Baier A, Quack T, Köhler K, Longerich T, Schramm G, Irungbam K, Müller H, von Bülow V, Tschuschner A, Odenthal M, Drebber U, Arousy ME, Ramalho LNZ, Bankov K, Wild P, Pons-Kühnemann J, Tschammer J, Grevelding CG, Roeb E[†], Roderfeld M[†]. Schistosoma mansoni eggs induce Wnt/ β -catenin signaling and activate the protooncogene c-Jun in human and hamster colon. *Sci Rep* **2020**; 10(1): 22373.

Hempel F[†], Roderfeld M[†], Müntnich LJ, Albrecht J, Oruc Z, Arneth B, Karrasch T, Pons-Kühnemann J, Padberg W, Renz H, Schäffler A, Roeb E. Caspase-Cleaved Keratin 18 Measurements Identified Ongoing Liver Injury after Bariatric Surgery. *J Clin Med* **2021**; 10(6).

Vorträge

Hempel F[‡], Sydykov A, Krambrich D, Köhler K, Savai R, Roderfeld M, Roeb E. Die Ausschaltung zirkulierender Fibrozyten verringert das Ausmaß der Fibrose im Mausmodell der TAA-induzierten Leberfibrose. 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). **02.-04.10.2019**.

Abstract veröffentlicht in: *Z Gastroenterol* **2019**; 57(09): KV 163.

Hempel F[‡], Roderfeld M, Savai R, Sydykov A, Irungbam K, Schermuly R, Voswinckel R, Köhler K, Churin Y, Kiss L, Bier J, Pons-Kühnemann J, Roeb E. Reduced and refined: A novel mouse model to study the role of fibrocytes in liver fibrosis. Symposium „Aktuelle Debatten der 3R-Forschung“ des Interdisciplinary Centre for 3Rs in Animal Research der Justus-Liebig-Universität Gießen, des Regierungspräsidiums Gießen und der Landestierschutzbeauftragten Hessens. **01.10.2020**.

Ausgezeichnet als bester Beitrag in der Kategorie *Reduction*.

Posterbeiträge

Hempel F*, Sydykov A, Krambrich D, Köhler K, Savai R, Roderfeld M, Roeb E. Die Rolle zirkulierender Fibrozyten in der hepatischen Fibrogenese. 3. *Science Day der Justus-Liebig-Universität Gießen*. **01.11.2019**.

Ausgezeichnet als bestes Poster aus dem Bereich Grundlagenforschung.

Hempel F*, Roderfeld M, Savai R, Sydykov A, Irungbam K, Schermuly R, Voswinckel R, Köhler K, Churin Y, Kiss L, Bier J, Pons-Kühnemann J, Roeb E. Bone marrow-derived fibrocytes participate in hepatic fibrogenesis in mice. *FALK-Workshop „Primary Liver Cancer – Emerging Concepts and Novel Treatments“*. **13.-14.02.2020**.

Hempel F*, Roderfeld M, Savai R, Sydykov A, Irungbam K, Schermuly R, Voswinckel R, Köhler K, Churin Y, Kiss L, Bier J, Pons-Kühnemann J, Roeb E. Fibrocytes contribute to TAA-induced liver fibrosis in mice. *36. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL)*. **14.-15.02.2020**.

Abstract veröffentlicht in: *Z Gastroenterol* **2020**; 58(01): e9-10.

Ausgezeichnet als bestes Poster im Themenbereich Basic Hepatology.

Hempel F*, Roderfeld M, Savai R, Sydykov A, Irungbam K, Schermuly R, Voswinckel R, Köhler K, Churin Y, Kiss L, Bier J, Pons-Kühnemann J, Roeb E. An HSV-TK/valganciclovir mouse model enables the study of fibrocytes in liver fibrosis. *The Digital International Liver Congress der Europäischen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber*. **27-29.08.2020**.

Abstract veröffentlicht in: *J Hepatol* **2020**; 75: S513-14.

Hempel F*, Roderfeld M, Savai R, Sydykov A, Irungbam K, Schermuly R, Voswinckel R, Köhler K, Churin Y, Kiss L, Bier J, Pons-Kühnemann J, Roeb E. Die Ausschaltung zirkulierender Fibrozyten reduziert den hepatischen Interleukin-1 β Spiegel im Mausmodell. *126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM)*. **17.-20.04.2021**.

Abstract veröffentlicht in: *Internist* **2020**; 61: S27.

[†] Diese Autoren haben in gleichem Maße zur Erstellung der Arbeit beigetragen

* Präsentierender Autor

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, den 17. Juli 2023

Die Unterschrift wurde in der veröffentlichten Fassung des Dokuments entfernt.

