

Pharmakologische Modulation des CB1-Rezeptors im *Abcb4*<sup>-/-</sup>  
Mausmodell für Cholestase

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

vorgelegt von Nora Lou Helmrich  
aus Bremen

Gießen (2019)

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Schwerpunkt Gastroenterologie

Unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Elke Roeb, MHAC  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Elke Roeb

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Kracht

Tag der Disputation: 20.08.2020

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	- 1 -
1.1 Biliäre Erkrankungen der Leber .....	- 1 -
1.1.1 Cholestase .....	- 1 -
1.1.1.1 Morphologische Veränderungen.....	- 1 -
1.1.1.2 Klinische Zeichen der Cholestase.....	- 2 -
1.1.1.3 Marker der Cholestase: Serum Gallensäuren und enzymatische Marker .....	- 3 -
1.1.2 Primär sklerosierende Cholangitis .....	- 5 -
1.1.3 Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3.....	- 7 -
1.2 Das <i>Abcb4</i> <sup>-/-</sup> Mausmodell für Cholestase.....	- 7 -
1.2.1 P-Glykoproteine der Multidrug Resistance Protein Familie .....	- 8 -
1.3 Leberinflammation und -fibrose bei chronischer Leberschädigung .....	- 10 -
1.4 Leberschädigung und das Endocannabinoidsystem .....	- 14 -
1.4.1 Das Endocannabinoidsystem.....	- 14 -
1.4.2 Das Endocannabinoidsystem und seine Rolle bei Leberinflammation und -fibrose -	- 15 -
1.5 Der JNK1-Signalweg .....	- 16 -
1.5.1 JNK1 – seine Aktivatoren und Substrate .....	- 16 -
1.5.2 JNK1-Signalwege in Leberfibrose und Karzinogenese .....	- 18 -
1.8 Zielsetzung der Arbeit .....	- 21 -
2. Material und Methoden .....	- 22 -
2.1 Material.....	- 22 -
2.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	- 22 -
2.1.2 Puffer und Lösungen .....	- 24 -
2.1.3 Oligonukleotide.....	- 25 -
2.1.4 Antikörper .....	- 28 -
2.1.5 Geräte.....	- 30 -
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	- 31 -
2.1.1 mRNA-Isolation .....	- 31 -
2.1.2 Konzentrationsbestimmung der mRNA mittels Spektrometer .....	- 32 -
2.1.3 Qualitätskontrolle der RNA mittel Agarosegel .....	- 33 -
2.1.4 Umschreibung der mRNA in cDNA.....	- 34 -
2.1.5 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion.....	- 35 -
2.1.5.1 Durchführung.....	- 36 -
2.2 Histologische Methoden .....	- 37 -
2.2.1 Immunhistochemie .....	- 37 -
2.2.2 Isotypkontrolle .....	- 39 -
2.2.3 Mouse-on-mouse Block .....	- 39 -
2.2.4 Sirius Red Färbung .....	- 39 -

2.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	- 40 -
2.3 Proteinbestimmungen mittels Western Blot.....	- 40 -
2.3.1 Lysat-Herstellung .....	- 40 -
2.3.2 Gelelektrophorese .....	- 41 -
2.3.3 Blotten .....	- 42 -
2.3.4 Blocken und Zugabe der Antikörper .....	- 42 -
2.3.5 Entwicklung .....	- 43 -
2.3.6 Strippen .....	- 43 -
2.4 Triglyzeridbestimmung aus Leberproben.....	- 44 -
2.4.1 Proben- und Reagenzienpräparation.....	- 44 -
2.4.2 Standard-Präparation.....	- 44 -
2.4.3 Assay.....	- 45 -
2.5 Serumanalysen mittels Reflotron® .....	- 46 -
2.6 Mauslinien und Behandlung.....	- 46 -
2.7 Statistische Auswertung.....	- 47 -
3. Ergebnisse .....	- 49 -
3.1 Pharmakologische Hemmung des CB1-Rezeptors in Rimonabant-behandelten <i>Abcb4</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	- 49 -
3.2 Verbesserung der Leberintegrität durch Antagonisierung des CB1-Rezeptors .....	- 50 -
3.2.1 Verringerung der Leberzellschädigung durch ACEA und Rimonabant .....	- 50 -
3.2.2 Erhaltung der Leberarchitektur sowie Verbesserung des Gradings in der Rimonabant-Gruppe.....	- 51 -
3.2.3 Rimonabant verringert die Schädigung der Gallengänge.....	- 53 -
3.2.4 Verringerung der Gallensäurekonzentration im Serum der ACEA- und Rimonabant-Gruppe.....	- 55 -
3.3 Metabolismus der Leber.....	- 58 -
3.3.1 Erhalt der Zonierung in ACEA- und Rimonabant behandelten Mäusen.....	- 58 -
3.3.2 Rimonabant normalisiert cholestatische Veränderungen des Fettsäurestoffwechsels ..	60 -
3.4 Inflammation und Akute-Phase-Reaktion .....	- 64 -
3.4.1 Rimonabant-Behandlung reduziert die Inflammation.....	- 64 -
3.5 Leberfibrose .....	- 69 -
3.5.1 Histologische Analyse .....	- 69 -
3.5.2 Erhöhte Expression profibrotischer als auch antifibrotischer Gene in der Rimonabant-Gruppe.....	- 75 -
3.6 Proliferation und Tumorgenese.....	- 78 -
3.6.1 JNK1-Signalweg.....	- 78 -
4. Diskussion .....	- 81 -
4.1 Einordnung der Arbeit .....	- 81 -
4.2 Gallensäuren schädigen die Leberintegrität im <i>Abcb4</i> <sup>-/-</sup> Modell für Cholestase.....	- 82 -
4.3 Einfluss der Modulation des CB1 auf den Lebermetabolismus .....	- 84 -

4.3.1 Regulation des Glukose- und Fettmetabolismus bei chronischer Leberschädigung-	86
-	
4.3.2 Regulation des Lebermetabolismus durch Peroxysome proliferator-activated receptors im <i>Abcb4</i> <sup>-/-</sup> Mausmodell.....	- 87 -
4.4 Herabgesetzte Expression des Akute-Phase-Proteins Lipocalin-2 durch CB1-Antagonisierung .....	- 89 -
4.5 Die CB1-Antagonisierung vermindert die Leberfibrose im <i>Abcb4</i> <sup>-/-</sup> Mausmodell .....	- 92 -
4.6 CB1-Antagonisierung inhibiert die JNK1-Aktivierung .....	- 93 -
4.6.2 Herabgesetzte JNK1-Aktivierung korreliert mit reduzierter Akute-Phase-Reaktion und Leberfibrose bei CB1-Blockade .....	- 94 -
4.6.3 Der JNK1-Signalweg bei unkontrollierter Proliferation und Karzinogenese .....	- 96 -
4.6.4 Conclusio.....	- 98 -
4.6.5 Limitationen der Studie .....	- 99 -
4.6.6 Ausblick .....	- 99 -
5. Zusammenfassung.....	- 100 -
6. Summary .....	- 101 -
7. Abkürzungsverzeichnis .....	- 102 -
8. Abbildungsverzeichnis.....	- 104 -
9. Tabellenverzeichnis.....	- 105 -
10. References .....	- 105 -
11. Publikationsverzeichnis .....	- 121 -
12. Erklärung zur Dissertation.....	- 122 -
13. Danksagung .....	- 123 -

# 1. Einleitung

## 1.1 Biliäre Erkrankungen der Leber

### 1.1.1 Cholestase

Der Begriff der Cholestase beschreibt den Zustand, der nicht mehr fließenden Gallenflüssigkeit. Sie ist definiert als ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von Gallenflüssigkeit und dem natürlichen Abfluss über die Gallenwege.<sup>1,2</sup> Dies schließt extra- als auch intrahepatische Ursachen ein, die sowohl mechanischer als auch funktioneller Ursache sein können.<sup>2</sup> Für die Abklärung der Pathogenese müssen verschiedene Parameter wie die Lokalisation, die Dauer und die Genese mit einbezogen werden, da diese für die Therapie und die Prognose entscheidend sein können. Bei der obstruktiven Form der Cholestase, die chirurgisch potentiell behandelbar ist, verhindert ein mechanisches Hindernis den weiteren Gallefluss. Beispiele für diese Form sind intraluminal gelegene Gallensteine, eine funktionelle Obliteration der extrahepatischen Gallenwege durch entzündliche Erkrankungen oder eine extraluminale Kompression durch proliferative Prozesse im Rahmen abdomineller Karzinome.<sup>1</sup> Die intrahepatisch lokalisierte nicht obstruktive Cholestase ist hereditärer oder erworbener Genese und wird primär konservativ behandelt.<sup>1,2,3,4</sup> Diese Form führt zu einer Dysfunktion und Schädigung zellulärer Strukturen sowie zu Veränderungen im Gallensäuremetabolismus.<sup>5</sup> Hier kann es beispielsweise durch Toxine, Medikamente oder atypische Gallensäuren zur Schädigung der Hepatozyten und somit zur Dysfunktion des Zytoskeletts kommen. Des Weiteren werden intra- und interzelluläre Strukturen wie dem Golgi-Apparat, dem Endoplasmatischen Retikulum oder ATPasen und andere Transporter für Gallensäurebestandteile beschädigt und somit in ihrer Funktion gestört.<sup>1,2,5</sup>

#### 1.1.1.1 Morphologische Veränderungen

Anfänglich liegen die Schädigungen der Hepatozyten und Gallengänge auf ultrastruktureller Ebene und sind potentiell reversibel. Hier kommt es beispielsweise zu einem Anschwellen von periportal Hepatozyten, Veränderungen in den Mitochondrien, Hypertrophie des Golgi-Apparats und zur Apoptose durch die zelltoxischen Gallensäuren.<sup>1,2</sup> Bei weiterem Fortschreiten der Cholestase können auch auf histologischer Ebene, die im vorangegangenen Satz beschriebenen Veränderungen beobachtet werden. Hierzu gehören die Dilatation der Gallenkapillaren aufgrund der Stase und die Schädigung von Zellmembranen. Als Folge dieser Schädigung kommt es

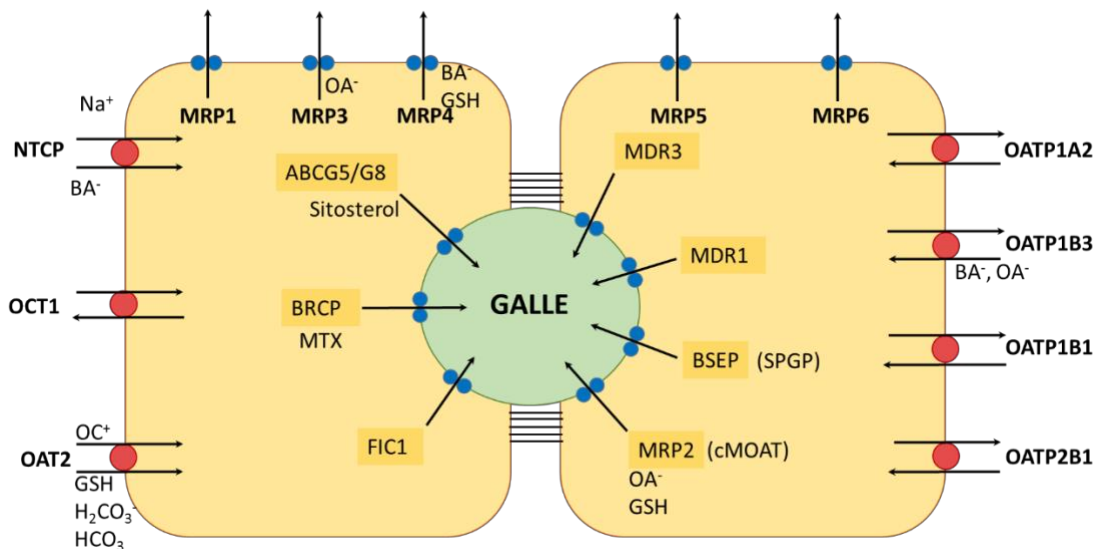
zu einer weiteren Permeabilitätserhöhung der Membranen. Gallenflüssigkeit kann konsekutiv in das Leberparenchym gelangen. Durch eine Schädigung der *Tight junctions* kommt es zu einem Galleaustritt in die Blutzirkulation.<sup>5,6</sup> Des Weiteren sind eine Gallengangsproliferation sowie eine periportale und mesenchymale Inflammation vorzufinden. Auch werden isolierte Nekrosen der Hepatozyten (*network necrosis*) beobachtet. Histologisch kann retikuläres Zytoplasma nachgewiesen werden, welches auf eine Gallensäureretention in den Hepatozyten zurückzuführen ist (*feathery degeneration*).<sup>1</sup>

### **1.1.1.2 Klinische Zeichen der Cholestase**

Zu Beginn wird die Diagnose „Cholestase“ laborchemisch durch einen pathologischen Anstieg von Gallensäuren im Serum, in Kombination mit einer Erhöhung enzymatischer Marker der Cholestase wie der Alkalischen Phosphatase (AP) oder der gamma Glutamyltransferase ( $\gamma$ GT) gestellt. Da der Gallensäurenmetabolismus durch den gemeinsamen Ort der Synthese und des Abbaus in der Leber eng mit dem Bilirubinmetabolismus verknüpft ist, kommt es häufig parallel zu einem Anstieg des Bilirubins. Dies kann zum gleichzeitigen Auftreten einer Cholestase und eines Ikterus führen. Weitere klinische Zeichen der Cholestase können eine Fatigue und Pruritus sein.<sup>7</sup> Die Gründe für die häufige Assoziation von Cholestase und Pruritus sind nicht abschließend geklärt. Als ursächlich werden unter anderem ein erhöhter Tonus des Opiodsystems oder erhöhte Histaminkonzentrationen, stimuliert durch die sich ablagernden Gallensäuren und ihrer Bestandteile, diskutiert.<sup>8,9</sup> Des Weiteren kommen in der Diagnostik bildgebende Verfahren wie der Sonographie eine große Bedeutung zu. Die Sonographie gibt Auskunft über den Status der Gallengänge und kann im Falle einer obstruktiven Cholestase dilatierte Gallenwege darstellen. Auch die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) kommen bei unklaren Befunden zum Einsatz. Eine Besonderheit stellt die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) dar, welche bei dem Verdacht auf Gallenwegserkrankungen wie der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), der primär biliären Cholangitis (PBC) oder der Choledocholithiasis zum Einsatz kommt.<sup>7,10</sup> Bei diesem Verfahren ist bei einer Obstruktion durch einen Gallenstein oder einer Konstriktion bei PSC eine sofortige Intervention möglich. Eine Leberbiopsie kann zur histologischen Abklärung einer unklaren Cholestase erfolgen, wobei hier nicht immer eine Differenzierung zwischen einer intrahepatischen und extrahepatischen Cholestase möglich ist.<sup>1</sup>

### 1.1.1.3 Marker der Cholestase: Serum Gallensäuren und enzymatische Marker

Die Gallenflüssigkeit ist eine mizellen- und lipidreiche wässrige Flüssigkeit, die durch die Hepatozyten der Leber produziert wird. Eine wichtige Aufgabe der Gallensäureproduktion und -ausscheidung ist die Sekretion von Cholesterol.<sup>11</sup> Dieses wird über den Umbau zu Gallensäuren abgebaut. Weitere Ausscheidungsprodukte sind Bilirubin sowie exogen zugeführte Substanzen wie Medikamente oder Schwermetalle. Die Emulgation von Lipiden und fettlöslichen Vitaminen im Darm, die Neutralisierung des Magensafts, die Aktivierung von pankreatischen Enzymen und die Stimulation der Darmmotilität sind weitere Aufgaben der Gallenflüssigkeit. Die Gallensäurebestandteile werden in die Gallenkanalikuli sezerniert und bilden dort die Gallenflüssigkeit. Diese sammelt sich im Ductus hepaticus dexter und sinistra, fließt in den Ductus hepaticus communis und gelangt in die Gallenblase. Diese hat eine Speicher- und Eindickungsfunktion. Zu den Mahlzeiten wird die Gallenflüssigkeit über den Ductus choledochus in das Duodenum geleitet. Ist der Weg der Gallenproduktion oder Sezernierung gestört, kommt es zur Cholestase und zum Übertritt von Gallensäuren in das Serum.<sup>2</sup>



**Abb. 1: Hepatozelluläres Transportsystem.**

Effluxtransporter in blau, aufnehmende Transporter in rot. Abkürzungen: ABCG5/G8 ist eine Cholesterol-Flippase, Bile acids (BA<sup>-</sup>), bile salt export pump (BSEP), FIC1 ist eine Aminophospholipid-Flippase, Multidrug-resistance protein (MDR), Multidrug-resistance-associated protein (MRP), Breast cancer resistance protein transporter (BCRP), Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), Organic anion-transporting polypeptide (OATP), Organic anion-transporter (OAT), Organic anions (OA), Organic cations (OC), reduced Glutathione (GSH). Modifiziert nach <sup>12</sup>

Die basolaterale Membran der Hepatozyten enthält das gelöste Carrier-System mit den OATPs und NTCP. Hier werden Stoffe aus dem Blut in die Hepatozyten aufgenommen. Die meisten Adenosintriphosphat (ATP) -abhängigen ATP-binding cassette (ABC)-Transporter befinden sich in der kanalikulären Membran. Hier werden v.a. über MDR1/3 und BSEP Gallenflüssigkeitsbestandteile in die Kanalikuli gepumpt.<sup>12</sup> Während der Cholestase werden MRP3 und MRP4, zwei organische Anionen-Transporter an der basolateralen Membran, exprimiert. MRP3 transportiert vor allem glucuronidiertes Bilirubin, MRP4 transportiert Gallensäuren und Glutathion.<sup>2,12</sup> Ein Anstieg der Gallensäuren im Serum ist der aussagekräftigste biochemische Marker für eine Cholestase.<sup>1,2</sup> Ihre Bestimmung dient sowohl der Diagnose als auch der Verlaufsbeurteilung und der Prognoseabschätzung. Der Normwert für Gallensäuren im Serum (i.S.) liegt bei 1.0-6.0  $\mu\text{mol/l}$ . Die Serumlevel können bis auf Werte von 300  $\mu\text{mol/l}$  ansteigen.<sup>1</sup> Die AP ist in der Leber sowohl im Zytoplasma als auch in den Gallengang-zugewandten Membranen der Hepatozyten lokalisiert. Sie katalysiert die Spaltung von Phosphorsäureestern. Normwerte für die AP sind altersabhängig und liegen bei Kindern und Jugendlichen zwischen 100-400 U/l. Die Werte senken sich im Erwachsenenalter auf 40-130 U/l.<sup>1</sup> Ein Anstieg der AP im Serum wird durch eine Erhöhung von Gallensäuren im Rahmen der Cholestase induziert, indem die membrangebundene AP durch die erhöhte Gallensäurenkonzentration aus der Membran gelöst wird.<sup>13</sup> Die AP ist mit einer Sensitivität von 80-100% ein sehr geeigneter Marker zur Früherkennung der Gallenstase. Der Anstieg der AP-Aktivität ist bei der extrahepatischen, obstruktiven Form der Cholestase und der Cholangitis am stärksten.<sup>2</sup> Die  $\gamma\text{GT}$  ist, verglichen mit der AP, 6-fach sensitiver für das Vorliegen einer Cholestase. Sie sollte bei jedem Verdacht auf eine Cholestase und Leberschädigung bestimmt werden.<sup>1</sup> Sie katalysiert den Transfer der Glutamyl-Reste von Peptiden und ist entscheidend am Glutamat-Zyklus und an der Regulation des Glutathionmetabolismus beteiligt.<sup>11</sup> Ein Anstieg der  $\gamma\text{GT}$  kann entweder durch eine verstärkte Neu-Synthese des Enzyms oder eine Schädigung der Leberzellmembran hervorgerufen werden. Vor allem Ersteres ist auch im Rahmen der Cholestase als Folge einer vermehrten Biotransformation zu beobachten.<sup>2</sup> Im weiteren Verlauf kommt es ebenfalls zur Freisetzung der  $\gamma\text{GT}$  aus geschädigten Hepatozyten. Die Leucin Aminopeptidase (LAP) ist in verschiedenen Geweben lokalisiert, vor allem aber in der Leber. Sie spaltet im Zytoplasma N-terminale Aminosäuren von Peptiden ab.<sup>11</sup> Ihr Anstieg im Serum ist nicht so sensitiv wie der  $\gamma\text{GT}$ , aber wesentlich Cholestase-spezifischer.<sup>1</sup>

### 1.1.2 Primär sklerosierende Cholangitis

Die PSC ist eine chronische cholestatische Erkrankung. Sie geht mit einer fibro-obliterativen Entzündung der intra- und extrahepatischen Gallenwege einher.<sup>10</sup> Dabei kann das komplette Gallengangssystem betroffen sein. Die sklerosierende Cholangitis wurde erstmals im Jahr 1924 durch Delbet beschrieben.<sup>7</sup> Aufgrund der begrenzten diagnostischen Möglichkeiten dauerte es bis zur Einführung der ERCP Ende der 1970er Jahre, um die tatsächliche Prävalenz abschätzen zu können und durch die Möglichkeit der sofortigen Intervention mittels Ballondilatation und Stent-Einlage eine klinische Verbesserung der krankheitsassoziierten Symptome zu erreichen.<sup>1,14</sup> Daten aus dem Jahr 2010 zeigen eine Prävalenz von 4–16/100 000 und eine zunehmende Inzidenz (35,1 % in 10 Jahren) in Nordeuropa.<sup>15</sup> Überwiegend sind Männer mittleren Alters von der PSC betroffen (Diagnosestellung im Median zwischen dem 36. und 52. Lebensjahr).<sup>16</sup> Die Ursache der Erkrankung ist weitgehend unbekannt.<sup>17</sup> Es konnte gezeigt werden, dass Komplexe immunopathogene Mechanismen mit der Aktivierung des angeborenen Immunsystems an der Pathogenese beteiligt sind. Hierbei kommt es über ausgeschüttete Zytokine und Chemokine zur Aktivierung von Cholangiozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, T-Zellen und hepatischen Sternzellen. Dies führt zu einem inflammatorischen Geschehen. Genetische Varianten der Humanen-Leukozyten-Antigene (HLA) werden als begünstigende Faktoren diskutiert. Ebenso scheinen bakterielle und/oder virale Infektionen als mögliche Ursache in Betracht zu kommen.<sup>2,18–20</sup> Die klassische PSC, auch *large-duct PSC* genannt, betrifft die der endoskopischen Verfahren zugänglichen Gallengänge. Sie führt zu makroskopischen, in der MRCP oder ERCP sichtbaren, multifokalen Strikturen aber auch Ektasien der Gallengänge.<sup>21</sup> Dem gegenüber steht die *small-duct PSC*, welche bioptisch diagnostiziert wird. Die Diagnosestellung erfolgt aufgrund mangelnder endoskopischer Zugänglichkeit rein auf histologischer Ebene.<sup>22</sup> Mikroskopisch zeigen sich eine portale Inflammation mit Ödem und den charakteristischen fibrösen *onion skin lesions*. Die intrahepatischen portalen Gallengänge wirken vergrößert und es kann eine Gallengangsproliferation beobachtet werden. Dem gegenüber kann auch das Bild einer Ductopenie, also eine Verminderung der Anzahl der Gallengänge, vorkommen. Die Endstadien der PSC sind geprägt von einem Fortschreiten der Leberfibrose. Das histologische Korrelat sind die fibrösen Septen (*portal-to-portal bridging, bridging necrosis*), die das Gewebe durchziehen. Schlussendlich kommt es zu einer biliären Leberzirrhose. Hier können mit einer Lebenszeitprävalenz von 5-10% maligne Veränderungen des betroffenen Gewebes wie das Cholangiozelluläre Karzinom (CCC) oder das hepatozelluläre Karzinom (HCC) beobachtet werden.<sup>2,22–24</sup> Die Klinik der Patienten weist eine große Variabilität auf. So bleiben viele Patienten asymptomatisch.

Kommt es zu Symptomen wie Ikterus, Pruritus, Fatigue, Gewichtsverlust oder Fieber, kann häufig eine Latenz von mehr als zwei Jahren zwischen dem Auftreten der Symptome und Diagnosestellung beobachtet werden.<sup>2,25</sup>

Eine starke Assoziation der PSC mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, vor allem der Colitis ulcerosa (bis zu 90%), konnte gezeigt werden.<sup>8,22,26,10,24</sup> Diskutiert wird in diesem Zusammenhang auch eine eigene Form der Colitis ulcerosa, die mit der PSC vergesellschaftet ist.<sup>27,28</sup> Aufgrund dieser häufig auftretenden Komorbidität wird dazu geraten bei jedem Patienten mit diagnostizierter PSC eine Koloskopie durchzuführen.<sup>10</sup> Zudem konnte ein Anstieg des Erkrankungsrisikos für das kolorektale Karzinom bei Vorliegen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung mit PSC nachgewiesen werden.<sup>29</sup> Im Rahmen der PSC zeigen die Laborparameter AP und die  $\gamma$ GT häufig eine Erhöhung. Viele Patienten werden lediglich durch die Veränderung dieser Parameter auffällig. Die Lebertransaminasen sind häufig im Normbereich. Immunologische Parameter wie die Immunglobuline (Ig) der Klasse G (IgG), Anti-Nukleäre Antikörper (ANA) oder die gegen die Myeloperoxydase gerichteten perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (pANCA) können erhöht sein. Das Bilirubin und die Gallensäuren im Serum sind initial häufig im Normbereich. Das Verfahren der Wahl, nachdem Laborparameter, körperliche Untersuchung und Oberbauchsonographie Anhalt zur weiteren Abklärung gegeben haben, ist die MRCP mit T2-gewichteten Sequenzen und kontrastmittelgestützten T1-gewichteten Bildern.<sup>10</sup> Besteht darüber hinaus der Verdacht einer gleichzeitig vorliegenden *small-duct PSC*, sollte eine Leberbiopsie erfolgen.<sup>10</sup> Die PSC ist medikamentös kausal nicht heilbar, da die Ursache dieser Erkrankung nach wie vor unbekannt ist. Konservative Therapieverfahren wurden vielfach diskutiert, ohne eine Einigung zu erzielen. Bei der Gabe von  $< 25\text{mg/kg}$  Körpergewicht Ursodesoxycholsäure (UDCA) konnte eine Reduktion der AP beobachtet werden.<sup>30,10</sup> Auch der hydrophilere UDCA-Abkömmling, 24-norUDCA, ist in klinischer Testung.<sup>31</sup> Die niedrigeren Level der AP im Serum zeigten in einigen Studien eine Verbesserung des *Outcomes* und ein reduziertes Risiko für die Entwicklung eines CCC.<sup>32,30</sup> Gemäß der neuen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS) wird eine UDCA-Dosis von 13–23mg/kg KG bei Patienten mit PSC zur Reduktion der AP und somit einer Verbesserung der Prognose von vielen Experten eingesetzt.<sup>10</sup> Es kann aber keine Empfehlung zur UDCA-Therapie gegeben werden. Weitere Ansätze mit Immunmodulatoren zeigten keine Verbesserung des Krankheitsverlaufes der PSC.<sup>33</sup> Bei dem Vorliegen von Stenosen können Ballondilatation, Bougierungen und kurzzeitige Stenteinlagen helfen, den Gallefluss aufrecht zu erhalten und somit Symptome der Cholestase zu mindern.<sup>34</sup> Als einzig kuratives Verfahren bei fortgeschrittener Leberzirrhose steht die Lebertransplantation

zur Verfügung.<sup>10</sup> Zur Einschätzung des Krankheitsverlaufs können der Mayo Risk Score,<sup>35</sup> der Verlauf der Konzentration der AP und das Vorliegen von relevanten Stenosen herangezogen werden.<sup>10</sup> Die durchschnittliche Überlebenszeit ohne Lebertransplantation beträgt ab Diagnosestellung zwischen 12-17 Jahre.<sup>36</sup>

### **1.1.3 Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3**

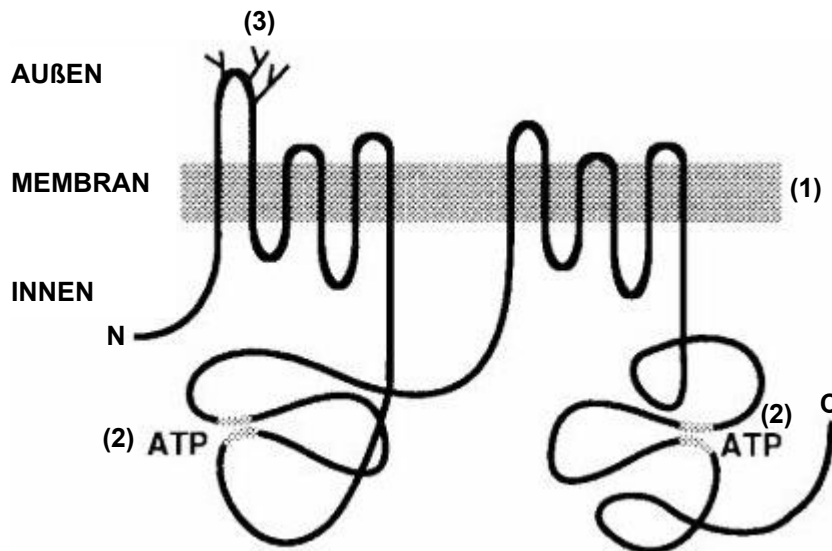
Eine seltene Differentialdiagnose zur primär sklerosierenden Cholangitis stellt die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3 (PFIC) dar. Hierbei handelt es sich um einen autosomal-rezessiv vererbten, molekularen Defekt des *Multidrug resistance 3 (mdr3)* - Gens. Dieses Gen kodiert für das Klasse 3 MDR *P-Glykoprotein* (s. Kapitel 1.2).<sup>3,37</sup> Patienten mit diesem Defekt fallen schon im Säuglings- bis jungen Erwachsenenalter mit Symptomen der Cholestase wie Ikterus, Pruritus, entfärbtem Stuhl und Hepatosplenomegalie auf. Laborchemisch zeigen sich charakteristischerweise erhöhte Werte für die  $\gamma$ GT und Gallensäuren im Serum. In der Leberhistologie sind eine portale Inflammation, Gallengangsproliferation und Leberzirrhose typisch.<sup>37</sup> Die Diagnose der Erkrankung aufgrund der Mutation des *mdr3* Gens, wird am verlässlichsten durch Gensequenzierung gestellt.<sup>38</sup> Die Patienten sind homozygot oder gemischt heterozygot für den *Abcb4*-Defekt.<sup>39</sup> Die frühzeitige Lebertransplantation stellt die einzige kurative Form der Therapie dar. Ursodesoxycholsäure kann als Übergangstherapie gegeben werden.<sup>2</sup>

## **1.2 Das *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell für Cholestase**

Mäuse mit einem Knockout (<sup>-/-</sup>) des *mdr2* (auch *Abcb4*) Gens, welches für eine kanalikuläre Phospholipidflippase in der Leber kodiert, entwickeln eine sklerosierende Cholangitis.<sup>5</sup> Die Hepatozyten sind nicht mehr in der Lage, Phospholipide in die Gallenflüssigkeit zu sezernieren. Durch die fehlenden Phospholipide kommt es zu einem Anstieg von freien, nicht in Mizellen gebundenen Gallensäuren. Diese schädigen das Gallengangsepithel und es kommt zu einer Cholangitis. Charakteristisch entwickelt sich eine periduktale Fibrose mit duktilärer Proliferation. In fortgeschrittenen Stadien erkranken die Individuen an einer sklerosierenden Cholangitis.<sup>5,40</sup> Diese Veränderungen der Gallengänge und des Leberparenchyms werden auch bei der humanen PSC und der PFIC 3 beobachtet. Aus diesem Grund stellt das *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell ein geeignetes Modell zur Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen und möglicher therapeutischer Angriffspunkte dar.

### 1.2.1 P-Glykoproteine der Multidrug Resistance Protein Familie

Der erste Vertreter der Familie des *Multidrug resistance (Glyco-)Proteins* wurde erstmals im Jahr 1976 durch Juliano und Ling an Zellen von Hamsterovarien beschrieben.<sup>41</sup> Sie konnten zeigen, dass ein Glykoprotein in mutierten Zellen für eine Vielzahl von Medikamentenresistenzen verantwortlich ist. Da auch die Dichte der an der Zellmembran vorhandenen Glykoproteine mit der Resistenz korrelierte, konnte davon ausgegangen werden, dass Zellen, die gegenüber einer Vielzahl von Medikamenten resistent sind, dieses Glykoprotein gehäuft exprimieren. Da dieses Transmembranprotein für eine erhöhte Permeabilität von bestimmten Medikamente verantwortlich ist, wurde der Begriff des P-Glykoproteins eingeführt.<sup>41,42</sup> Im Jahr 1986 wurde die komplette molekulare Struktur des humanen P-Glykoprotein (*MDR*) aufgeklärt. Damit wurde gezeigt, dass diese Glykoproteine homologe Regionen mit bakteriellen Membrantransportern haben, die über aktiven Transport Metabolite über ihre Zellmembran transportieren. Es konnte somit bestätigt werden, dass es sich bei den P-Glykoproteinen um Energie-abhängige Effluxpumpen handelt.<sup>43</sup> Im Jahr 1992 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass es sich bei den MDR-Transportern um Flippasen handelt. Der Transport erfolgt durch aktive Ausschleusung aus dem Zytosol der Hepatozyten über die Zellmembran in den Gallengang. Die P-Glykoproteine sind spezifisch für ihre jeweiligen Substrate, mit einer enzymähnlichen Bindungsstelle für eben diese.<sup>44</sup> Für das weitere Verständnis der P-Glykoproteine stellte die Identifikation ihrer molekularen Struktur einen nächsten wichtigen Schritt dar. Bosch und Croop beschrieben 1990 die P-Glykoproteine als Transmembranproteine. Sie sind zusammengesetzt aus zwei identischen Hälften, die aus jeweils sechs Transmembrandomänen jeweils gefolgt von einer ATP-bindenden zytosolischen Domäne bestehen. Auf der zytosolischen Seite fungieren die P-Glykoproteine als ATPasen, um durch die Hydrolyse von ATP die Energie für den Transport ihrer Substrate über die Membran aufzubringen. Basierend auf der ATP-bindenden Eigenschaft, können die P-Glykoproteine der Familie der *ABC-Transporter* zugeordnet werden.<sup>45</sup> Die Mitglieder der Superfamilie der ABC-Transporter sind spezifisch für ihr jeweiliges Substrat und zeigen einen identischen Grundaufbau auf (Abb.2). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität.<sup>46</sup> Die Nomenklatur bezeichnet die jeweiligen Mitglieder dieser Familie zusätzlich nach ihrer Unterfamilie mit den Großbuchstaben A-G und dem Gennamen 1-13 (Beispiel: *ABC-B-4*).



**Abb. 2: P-Glykoproteine: Struktur und Orientierung in der Membran.**

Dargestellt ist die Struktur der P-Glykoproteine, wie sie in zwei asymmetrischen Hälften mit jeweils sechs Transmembrandomänen die Plasmamembran (1) durchziehen. Im Zytoplasma (INNEN) befinden sich zwei Nukleotid-bindende ATPasen (2), extern (AUßEN) zeigen sich in der ersten Domäne Glykosylierungsstellen (3). Modifiziert nach <sup>45</sup>

In weiteren Studien konnte neben dem zuvor beschriebenen Gen *mdr1* ein weiteres P-Glykoprotein dieser Familie anhand seiner sehr ähnlichen Struktur identifiziert werden. Das humane *mdr3* entspricht gemäß seiner Struktur dem *mdr2* der Nagetiere und codiert für das MDR3 P-Glykoprotein. Auch das MDR3 P-Glykoprotein weist grundsätzlich eine fast identische Struktur, wie in 1.2.1 beschrieben, auf. Die Transmembrandomänen und externen Domänen zeigen die größten Unterschiede im Vergleich zu dem MDR1 Glykoprotein. Zusätzlich ist das MDR3 selbst nicht in der Lage, Resistenzen gegen Medikamente zu verursachen.<sup>47,48</sup> Lange war die genaue Funktion des humanen MDR3 P-Glykoproteins (murinen MDR2) unbekannt. Buschman et al. färbten zunächst Lebergewebe mit einem für P-Glykoproteine spezifischen Antikörper, der verstärkt die kanalikuläre Membran an den Hepatozyten anfärbte.<sup>49</sup> Smit et al. setzten basierend auf diesem Wissen einen für das murine MDR2 P-Glykoprotein spezifischen Antikörper ein. Es zeigte sich eine singuläre Anfärbung hepatischer kanalikulärer MDR2 Transportproteine. Interessanterweise konnte keine Anfärbung in den Duktuli nachgewiesen werden. Dies führte zu der Annahme, dass das murine MDR2 P-Glykoprotein an der Sekretion von Bestandteilen der Gallenflüssigkeit durch die Hepatozyten beteiligt ist. Zur Unterstützung dieser Hypothese wurde die erste homozygote *mdr2-Knockout* Mauslinie gezüchtet. Die anschließende Messung verschiedener Parameter zeigte einen Anstieg von Lebertransaminasen und Bilirubin im Serum. Wegweisend war die Analyse der Gallenflüssigkeit der *mdr2-knockout* Mäuse. Hier konnte ein Fehlen von Phospholipiden detektiert werden. Aus den Ergebnissen

dieser Arbeit konnte geschlossen werden, dass das murine MDR2 P-Glykoprotein (entsprechend dem humanen MDR3) einen Transporter für Phospholipide in der kanalikulären Membran der Hepatozyten darstellt, der über aktiven Transport die Phospholipide über die Membran transloziert.<sup>50</sup> Da bei Ausbleiben dieses Transports die Mizellenbildung mit den Gallensalzen ausbleibt, schädigen die Gallensäuren umliegende Strukturen wie z.B. die Plasmamembranen der Hepatozyten und Cholangiozyten. Im Folgenden kommt es zur Cholangitis.<sup>51,52</sup> Durch diese fundamentalen Erkenntnisse und die Möglichkeit der Züchtung einer *mdr2-Knockout* Mauslinie wurden weitere Studien zur Cholangitis ermöglicht.<sup>5,31,40, 49, 51,53,54</sup> Diese wurden durch das Wissen unterschiedlicher Suszeptibilität für die Entwicklung von fibrose-assoziierten Lebererkrankungen in verschiedenen Mauslinien vorangetrieben. Die BALB/c Mauslinie stellte sich am empfänglichsten für die Entwicklung von Leberinflammation und -fibrose heraus.<sup>55</sup> Ein valides Mausmodell für Cholestase und ihrer Folgen stellt der *Abcb4<sup>-/-</sup>* mit BALB/c Hintergrund dar.<sup>54</sup>

### **1.3 Leberinflammation und -fibrose bei chronischer Leberschädigung**

Die gesundheitliche Relevanz chronischer Lebererkrankungen zeigt sich anhand folgender epidemiologischer Daten. Für Deutschland ergaben sich für das Jahr 2014 22.176 Behandlungsfälle in Krankenhäusern mit einer Fallzahl von Arbeitsunfähigkeit von 2.952 und 5.934 Sterbefällen.<sup>56</sup> Weitere Studien konnten eine Prävalenz chronischer Lebererkrankungen bei 3,6%, eine geschätzte Prävalenz der Entstehung von Leberzirrhose bei 25-50% und die Inzidenz für hepatozelluläre Karzinome bei 554,369 für das Jahr 2012 ermitteln.<sup>57,58</sup>

	Inzidenz (Mio)	Prävalenz (%)	Aktuelle Schätzungen (Mio)	Schätzungen Jahr 2013 (Mio)
<b>HBV</b>	4,5-6	3,6	240	120 <sup>a</sup>
<b>HCV</b>	3-4	2,5	170	85 <sup>a</sup>
<b>ALD</b>	16,6	4,5	-	19,3 <sup>b</sup>
<b>NAFLD</b>	13,6	5-8	570	16,2 <sup>b</sup>
<b>NASH</b>	2,5	<4	145	3,8 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Schätzungen anhand eines Modells für Prävalenz

<sup>b</sup> Schätzungen anhand eines Modells für Inzidenz

### Abb. 3: Globale Epidemiologie chronischer Lebererkrankungen.

Zu den Auslösern chronischer Lebererkrankungen gehören die Infektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV), dem Hepatitis C Virus (HCV), die alkoholische Lebererkrankung (ALD), die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH). Dargestellt sind Zahlen für Inzidenz, Prävalenz und aktuelle Schätzungen in Millionen für diese Erkrankungen weltweit. Modifiziert nach <sup>57</sup>

Fibrogenese ist ein dynamischer, potentiell reversibler Prozess, der eine Balance zwischen Matrixsynthese und Matrixdegradation darstellt.<sup>59</sup> Für dieses Gleichgewicht sind vor allem von Myofibroblasten sezernierte matrixdegradierende Enzyme, die *Matrix Metalloproteinasen* (MMP) und Inhibitoren der MMP, die *Tissue inhibitor of metalloproteinasen* (TIMP) verantwortlich.<sup>2,59,60</sup> Ursachen für die Entstehung von Leberfibrose und somit einer Dysbalance der oben beschriebenen Mechanismen zugunsten von matrixakkumulierenden Effekten können Infektionen, lebertoxische Substanzen, metabolische Erkrankungen oder Immunreaktionen sein.

Leberfibrose stellt die gemeinsame Endstrecke und Antwort der Leber auf eine chronische Schädigung dar. Die hepatische Inflammation und Fibrose sind bei Leberschädigung eng miteinander verbundene Prozesse. Akute und chronische Leberschädigung induziert zunächst ein Entzündungsgeschehen, welches im weiteren Verlauf die Aktivierung von fibrogenen Zellen und die Entwicklung von Fibrose zur Folge hat. Hierbei kommt es zur sogenannten *Nekro-Inflammation*. Der Begriff beschreibt die Entzündung und anschließende Nekrose der Hepatozyten. Die *Nekro-Inflammation* induziert die Leberfibrose.<sup>57</sup> Dies konnte in murinen Tiermodellen für Fibrogenese und bei Patienten mit chronischer Leberschädigung gezeigt werden.<sup>2</sup> Die *Nekro-Inflammation* bewirkt durch das Abkapseln des entzündlichen Areals eine Wundheilung. Kennzeichnend für die Leberfibrose ist eine Akkumulation extrazellulärer Matrix im

Disseschen Raum.<sup>61</sup> Diese Matrix besteht zum größten Anteil aus fibrillärem Kollagen-I und III.<sup>62</sup> Die fibrotischen Narben, die bei kurzzeitiger Schädigung entstehen, sind häufig noch reversibel. Bei Persistenz schädigender Ursachen kann keine nachhaltige Regeneration der Leber ermöglicht werden. Es kommt zum Fortschreiten der Fibrose mit diffuser Durchziehung der Leber mit Narbengewebe.<sup>2</sup> Konsekutiv führt die Leberfibrose im weiteren Verlauf zur Leberzirrhose mit Komplikationen wie der portalen Hypertension, Leberversagen und der Entstehung des HCC. Die Hauptakteure der Matrixproduktion sind aktivierte hepatische Sternzellen (HSC) und portale mesenchymale Fibroblasten. Beide zusammen bilden die Gruppe der hepatischen Myofibroblasten. Bei der Aktivierung der Myofibroblasten spielen vor allem die Lebermakrophagen, auch Kupferzellen genannt, eine entscheidende Rolle. Ebenso tragen aktivierte T-Lymphozyten und Neutrophile Granulozyten zur HSC Aktivierung und Entwicklung eines inflammatorischen Lebergewebes bei.<sup>63</sup> Die Aktivierung wird u.a. über den *Transforming growth factor beta 1* (TGFβ1), *Transforming growth factor alpha* (TGFα), Endothelin-1 und Leptin vermittelt.<sup>2</sup> Hepatische Sternzellen, auch Itozellen genannt, sind leberspezifische mesenchymale Zellen. Sie sind im subendothelialen, perisinusoidalen Disse-Raum lokalisiert. HSC weisen vielfältige Funktionen wie die Beteiligung am Vitamin A- und Lipidmetabolismus, Regulation des sinusoidalen Blutflusses, Anreicherung und Degradierung extrazellulärer Matrix und Entwicklung von Leberfibrose auf. Ebenso haben diese Zellen einen regulierenden Einfluss auf Wachstum und Proliferation der Hepatozyten sowie auf die Immunfunktion der Leber.<sup>2</sup> Hepatische Sternzellen liegen in der gesunden Leber in einem inaktivierten Zustand vor und sind vor allem an der Speicherung von Vitamin A beteiligt.<sup>2,64</sup> Im Jahr 1984 konnte gezeigt werden, dass hepatische Sternzellen Desmin enthalten. Desmin ist ein Intermediärfilament, welches zuvor als Bestandteil kontraktile Zellen bekannt war. Diese Entdeckung führte zu der Annahme, dass es Ähnlichkeiten zwischen myogenen Zellen und hepatischen Sternzellen gibt.<sup>65</sup> Betrachtet man ihre morphologischen Veränderungen bei Leberschädigung wird die beschriebene Annahme untermauert. HSC werden zu aktiven, proliferierenden, kontraktile, mobilen, myofibroblast-ähnlichen fibrogenen Zellen. Die zytoskelettalen Marker wie Desmin, Aktin, und Vimentin werden exprimiert und die Sensitivität für profibrotische Zytokine wie den TGFβ und den *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) erhöht.<sup>60,62</sup> Ein weiterer valider Marker für aktivierte HSC ist *alpha smooth muscle actin* (αSMA). Diese Veränderungen und Reaktionen sind am Ort der stärksten Schädigung am prominentesten.<sup>2,60</sup> Dort synthetisieren sie profibrotische und proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren mit parakrinen aktivierenden Effekten auf weitere Myofibroblasten, Parenchym- und inflammatorische Zellen.<sup>66</sup> Ebenso konnte gezeigt werden, dass Myofibroblasten in der

Lage, sind die Angiogenese zu induzieren. Dies geschieht Hypoxie-induziert über den *vaskular endothelial growth factor* (VEGF) und trägt zur weiteren Fibroseprogression bei.<sup>67</sup> Portale mesenchymale Myofibroblasten (PMF) sind eine weitere Gruppe fibrogener Zellen. Sie entwickeln sich bei Aktivierung aus periportalen, perivaskulären und periduktalen Fibroblasten und sind in den fibrotischen Septen lokalisiert. In Bezug auf die Beteiligung am fibrotischen Geschehen haben sie ähnliche Eigenschaften wie die HSC. Die Differenzierung der beiden Zellgruppen kann anhand der phänotypischen Unterschiede und über die prädominante Expression von Desmin und Vitamin A bei HSC vorgenommen werden.<sup>68</sup> HSC sind im aktivierten Zustand rundlich mit einem vergrößerten Zytoplasma. Des Weiteren stellte sich das Stressprotein Cytoglobin als spezifisch für HSC heraus. Portale Myofibroblasten zeigten sich bei Aktivierung spindelförmig, mit höherer Proliferationsrate und vermehrter Expression von phosphoryliertem Cofilin-1.<sup>69</sup>

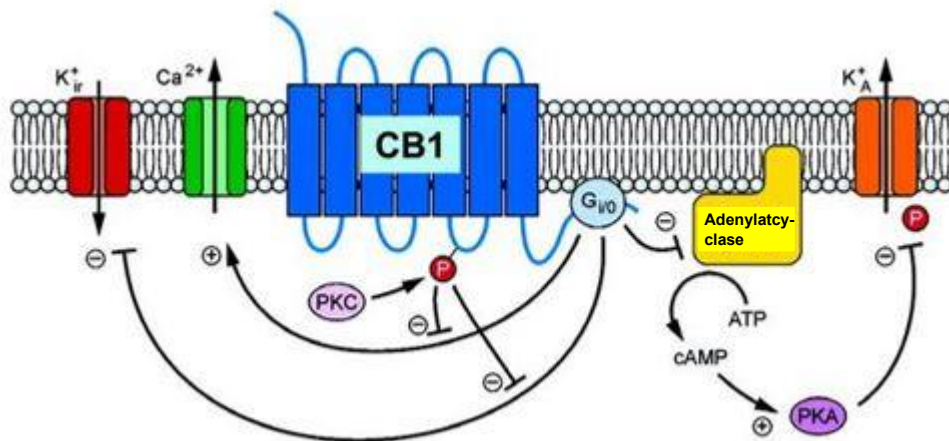
Diagnostisch gilt es, die Ursache der Lebererkrankung abzuklären. Eine Leberbiopsie ist in den meisten Fällen unklarer Lebererkrankungen indiziert.<sup>10</sup> Aus ihr kann ein Grading zur Beurteilung der *Nekro-inflammation* und ein Staging, welches Aussage über das Ausmaß der Fibrose gibt, erfolgen.<sup>70</sup> Hierzu können verschiedene Klassifikationssysteme angewendet werden wie z.B. das Scoringssystem nach Desmet und Scheuer oder Knodell<sup>71-73</sup> oder der METAVIR-Score. Aber auch nicht-invasive Verfahren haben ihren festen Stellenwert. Laborparameter und z.B. der daraus erstellte „*aspartate aminotransferase to platelet ratio index*“ (APRI-Score)<sup>74</sup> finden Anwendung. Die MRT, die Oberbauchsonographie und der Fibroscan sind weitere klinisch relevante Verfahren zur Diagnosestellung durch die Darstellung PSC-typischer Veränderungen wie z.B. Gallengangsstenosen und Leberfibrose.<sup>75,76</sup> Die Therapie der Leberfibrose ist aufgrund der hohen Prävalenz und gravierenden Morbidität der Patienten mit Folgen wie der portalen Hypertension und dem hepatozellulären Karzinom Gegenstand langjähriger und intensiver Forschung. Es ist bekannt, dass selbst die fortgeschrittene Leberzirrhose durch Wegnahme des auslösenden Agens zu Teilen oder auch vollständig reversibel sein kann.<sup>77</sup> Ist dies nicht möglich, werden Medikamente mit konkreten Angriffspunkten an den fibroseassoziierten Zellen, ihren Signalstoffen und –wegen benötigt. Ziel der medikamentösen Therapie ist es die Matrixsynthese zu hemmen oder die Fibrolyse zu stimulieren.<sup>78</sup> Zurzeit existiert keine diesbezüglich empfohlene, effektive Therapie der Leberfibrose und Zirrhose.<sup>79</sup>

## 1.4 Leberschädigung und das Endocannabinoidsystem

### 1.4.1 Das Endocannabinoidsystem

Es konnte gezeigt werden, dass das Endocannabinoidsystem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese chronischer Lebererkrankungen einnimmt.<sup>80</sup>

Das Endocannabinoid-System besteht aus dem Cannabinoid-Rezeptor-1 (CB1), dem Cannabinoid-Rezeptor-2 und seinen Liganden, den Endocannabinoiden. CB1 und CB2 sind *guanine nucleotide binding protein* (G-Protein) gekoppelte Rezeptoren und weisen eine spezifische Bindungsstelle für Cannabonoide auf.<sup>81,82</sup> Das bekannteste und seit Jahrhunderten für medizinische Zwecke genutzte Cannabinoid ist Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC). THC bindet ebenfalls an die Bindungsstellen der CB1- und CB2-Rezeptoren und war namensgebend für die CB-Rezeptoren.<sup>63</sup> Kurz nach der Entdeckung und der erfolgreichen Klonierung dieser beiden Rezeptoren<sup>81</sup> wurden ihre endogenen Liganden identifiziert und als Endocannabinoid betitelt. Anandamid (AEA) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) sind die bekanntesten Vertreter dieser Endocannabinoiden.<sup>83–85</sup> Sie sind lipidhaltige Mediatoren und werden aus der Arachidonsäure synthetisiert. Endocannabinoiden wirken in der direkten Umgebung ihrer Freilassung und werden durch enzymatische Hydrolyse schnell inaktiviert. Ursprünglich wurden die CB-Rezeptoren allein dem Zentralnervensystem zugeordnet.<sup>81</sup>



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Haupteffekte des G-Protein gekoppelten CB1.**

Aktivierung des CB1 führt zur Stimulation des  $G_{i/o}$ -Proteins, welches seinerseits die Adenylatcyclase-vermittelte Konversion von ATP zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) inhibiert. cAMP Moleküle können an regulatorische Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) binden und dadurch die Freisetzung der katalytischen Untereinheiten bewirken. Aktivierte PKA kann Typ-A Kalium ( $K_A^+$ ) Kanäle phosphorylieren, was zu deren Inhibition führt. Der negative Effekt des CB1 auf die Adenylatcyclase resultiert schlussendlich in der Aktivierung von  $K_A^+$  Kanälen. Durch CB1 aktivierte  $G_{i/o}$  kann auch direkt N- oder P/Q-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle inhibieren und aktiviert einwärts gerichtete (*inwardly rectifying*) Kalium ( $K_{ir}$ ) Kanäle. Diese beiden letztgenannten Effekte werden von der Protein Kinase C (PKC) kontrolliert. Diese phosphoryliert nach ihrer Aktivierung den CB1 an der dritten zytoplasmatischen Schleife und entkoppelt den Rezeptor von den Ionenkanälen. Modifiziert nach<sup>86</sup>

Die in Abb. 4 dargestellten Effekte sind nicht in jedem Organ identisch. Der CB1 kann ebenso ein stimulierendes G<sub>s</sub>-Protein aktivieren. Somit bekommen die PKC und PKA weitere inhibierende und aktivierende Effekte auf Moleküle verschiedener Signalwege.<sup>86</sup> In der gesunden Leber sind die CB-Rezeptoren wenig ausgeprägt, obwohl Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen in der Lage sind, Endocannabinoide zu produzieren. Im Rahmen akuter und chronischer Leberschädigungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Endocannabinoide als auch die CB-Rezeptoren stark hochreguliert sind.<sup>87</sup> So kommt es z.B. bei der klinisch relevanten Non-alcoholic liver disease (NAFLD) über die Aktivierung des CB1 durch erhöhte AEA Freilassung zur Aktivierung von *sterol response element-binding protein 1c* (SREBP-1c). Dieses aktiviert konsekutiv die acetyl-CoA carboxylase (ACC1) und *fatty acid synthase* (FASN). Diese Signalkaskade führt über die de-novo Lipogenese und die Regulation weiterer metabolischer Signalwege zum Fortschreiten der Erkrankung.<sup>88</sup>

#### **1.4.2 Das Endocannabinoidsystem und seine Rolle bei Leberinflammation und -fibrose**

Die Funktion der beiden CB-Rezeptoren ist seit vielen Jahren Thema intensiver Forschung. Neben den Analysen ihrer metabolischen Einflüsse sind neue Erkenntnisse ihres Wirkens auf die Entwicklung von Leberinflammation und -fibrose bei chronischer Leberschädigung von großem Interesse.<sup>63,80,89,90,91,92</sup> Eine große Anzahl von Studien konnte demonstrieren, dass das Endocannabinoidsystem ein bedeutender Mediator bei akuter und chronischer Lebererkrankung ist. Teixeira-Clerc et al. konnten zeigen, dass der CB2 zu Beginn der Leberschädigung antiinflammatorische und antifibrotische Effekte aufweist.<sup>93</sup> Dieser protektive Einfluss wird bei weiter fortbestehender Leberschädigung durch die profibrotischen Effekte des aktivierten CB1 ausgeschaltet. Dieser Effekt konnte bei Patienten mit chronischer Hepatitis C bei täglichem Cannabiskonsum nachgewiesen werden.<sup>94</sup> In chronisch geschädigtem Lebergewebe wird der CB1 stark exprimiert und durch vermehrte Ausschüttung der Endocannabinoide durch Hepatozyten, HSC und Kupferzellen stimuliert. Er zeigt seine stärkste Expression in Nicht-Parenchymzellen wie inflammatorischen Zellen, proliferierenden Cholangiozyten, hepatische Sternzellen und portalen Myofibroblasten.<sup>80,94</sup> Diese Ergebnisse konnten durch weitere Untersuchungen an CB1-Knockout Mäusen und die Gabe eines CB1-Rezeptorantagonisten bestätigt werden. In beiden Fällen zeigte sich eine reduzierte Entwicklung von Fibrose und Wachstumsinhibition von Myofibroblasten sowie eine erhöhte Apoptoserate dieser Zellen.<sup>80</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde in

den unter Kapitel 1.2 beschriebenen BALB/c *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen der spezifische CB1-Antagonist Rimonabant zu der Nahrung hinzugegeben.

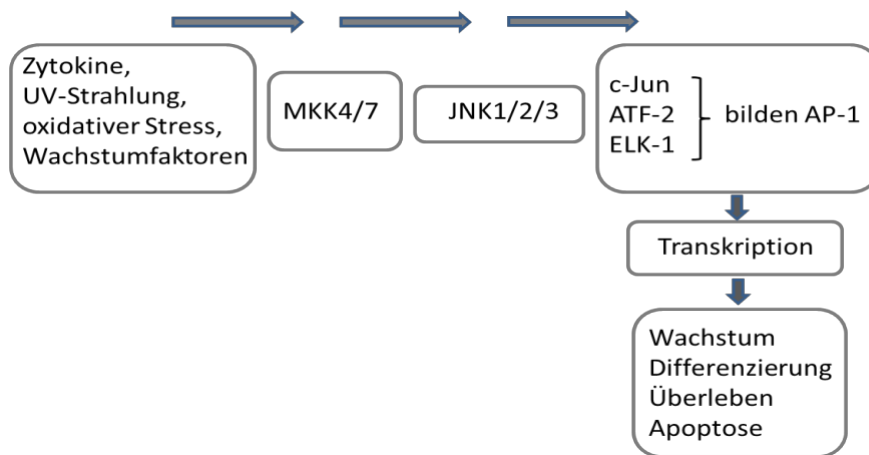
Rimonabant, auch SR141716A genannt, gehört zu der Wirkstoffklasse der Anorektika und ist ein selektiver CB1-Antagonist. Durch die CB1-Blockade in der erkrankten Leber konnten in Tiermodellen positive Effekte auf die Entwicklung von Steatohepatitis und dem metabolischen Syndrom gezeigt werden.<sup>95</sup> Ebenso wurde die Fibroseprogression in verschiedenen Mausmodellen durch Rimonabant-Gabe reduziert.<sup>80</sup> Da gezeigt werden konnte, dass Rimonabant das Körpergewicht, Leptin, Insulin und freie Fettsäuren im Blut senkt sowie die Insulinresistenz verbessert,<sup>96</sup> wurde es zur Behandlung des metabolischen Syndroms am Menschen erprobt.<sup>97</sup> Rimonabant wurde auf Grund seiner Eigenschaft auch im zentralen Nervensystem zu wirken, 2008 vom Markt genommen.<sup>98</sup> Zu den zentralen Nebenwirkungen gehörten Depressionen und Angststörungen.<sup>99</sup> Im Rahmen von Studien zur Wirkung des Endocannabinoidsystems im peripheren Gewebe und dessen Beteiligung an Krankheitsprozessen wird Rimonabant weiterhin in Tiermodellen eingesetzt.

## 1.5 Der JNK1-Signalweg

### 1.5.1 JNK1 – seine Aktivatoren und Substrate

Die c-Jun-N-terminal Kinase (JNK1) ist ein Mitglied der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Familie. Die Gruppe der MAPK besteht aus den drei Untergruppen *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *JNK1* und *p38 MAPK*. Es konnte gezeigt werden, dass MAPK entscheidend an der Transduktion extrazellulärer Signale in den Zellkern beteiligt sind. Sie sind in der Lage, aus dem Zytoplasma in den Zellkern zu gelangen und die Transkription unterschiedlicher Gene zu induzieren.<sup>100</sup> Es gibt drei Iso-formen der JNK in Säugetieren: *JNK1*, *JNK2*, *JNK3* (kodiert durch die Gene *mapk8*, *mapk9* und *mapk10*). *JNK1* und *JNK2* sind in fast allen Geweben des Körpers exprimiert.<sup>101</sup> Den primären Stimulus der JNK-Aktivierung stellen diverse Induktoren wie Zytokine (IL-1, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , PDGF, EGF), reaktive Sauerstoffradikale (ROS), Pathogene wie Lipopolisaccharide (LPS), Toxine, Medikamente, Endoplasmatisches Retikulum-Stress (ER-Stress), freie Fettsäuren und metabolische Veränderungen dar. Zunächst werden MAP Kinase Kinase Kinasen (MAP3K), MAP Kinase Kinase (MAP2K/MKK) oder MAP Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert. Diese sind durch eine duale Phosphorylierung nachfolgend in der Lage, JNK an Threonin- und Tyrosin-Resten zu aktivieren. Hier stellten sich synergistisch wirkende *MKK4* und *MKK7* als führende Aktivatoren der JNKs heraus.<sup>102,103</sup> Aktivierte JNK (p-JNK) sind in der Lage, eine Vielzahl von Proteinen zu

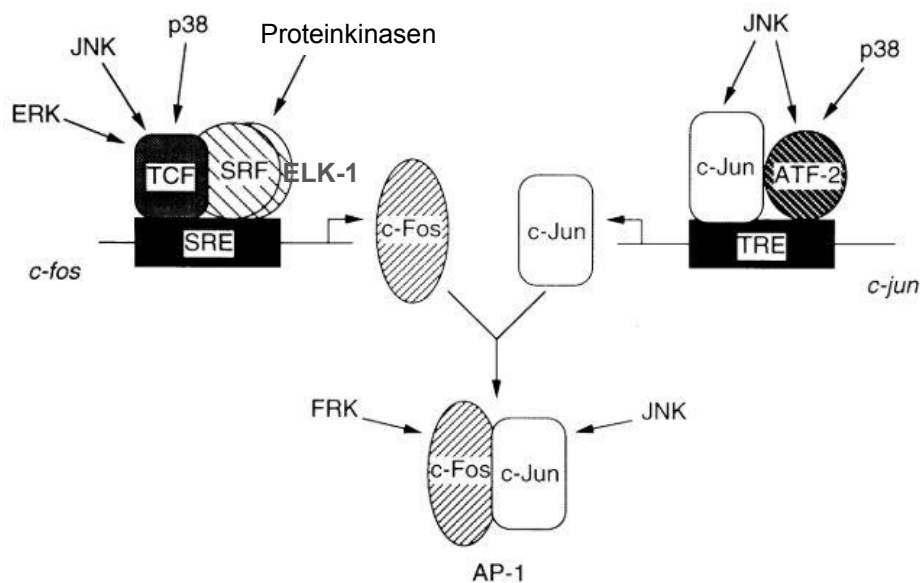
aktivieren, die anschließend als Transkriptionsfaktoren oder an der Kontrolle von Proteindegradierung, -lokalisierung und -signalen, wirken.<sup>104</sup>



**Abb. 5: MAP Kinase Signaltransduktion.**

Stimuli wie inflammatorische Zytokine, UV-Strahlung, oxidativer Stress oder Wachstumsfaktoren aktivieren Rezeptoren (nicht dargestellt). Diese sind über Kinasen in der Lage, MAP Kinase Kinasen wie MKK4 und MKK7 durch Phosphorylierung zu aktivieren. MKK4/7 phosphorylieren anschließend JNK1/2/3. Diese sind in der Lage, Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren ebenfalls durch Phosphorylierung zu aktivieren. AP-1 und seine Bestandteile sind anschließend in der Lage, Zellwachstum, -differenzierung, -überleben und Apoptose zu regulieren. (Abb. N. Helmrich)

Ein repräsentatives Substrat und Zielprotein der JNK1 und JNK2 ist c-Jun. Nach seiner Aktivierung durch Phosphorylierung an zwei Serin-Resten am N-terminalen Ende, dimerisiert c-Jun mit JunB, JunD oder Fos. Zusammen bilden sie das *Activator Protein-1 (AP-1)*.<sup>105</sup> Diese Mitglieder der Jun und Fos Familie gehören zu der Gruppe der DNA-bindenden Proteine. AP-1 bindet an das *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element (TRE)* mit der Konsensussequenz *TGACTCA*. Die Bindungsaffinität für ein spezifisches *TRE* hängt von der Zusammensetzung des AP-1 ab. TREs sind in den Promoterregionen vieler *Immediate Early Genes (IEG)* zu finden.<sup>106</sup> c-Jun und Fos gehören zu den *IEG*. Über ihre Aktivität nehmen sie auf verschieden zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zell-Überleben und die Karzinogenese Einfluss.<sup>107</sup>



**Abb. 6: Regulation von AP-1 durch MAP Kinasen.**

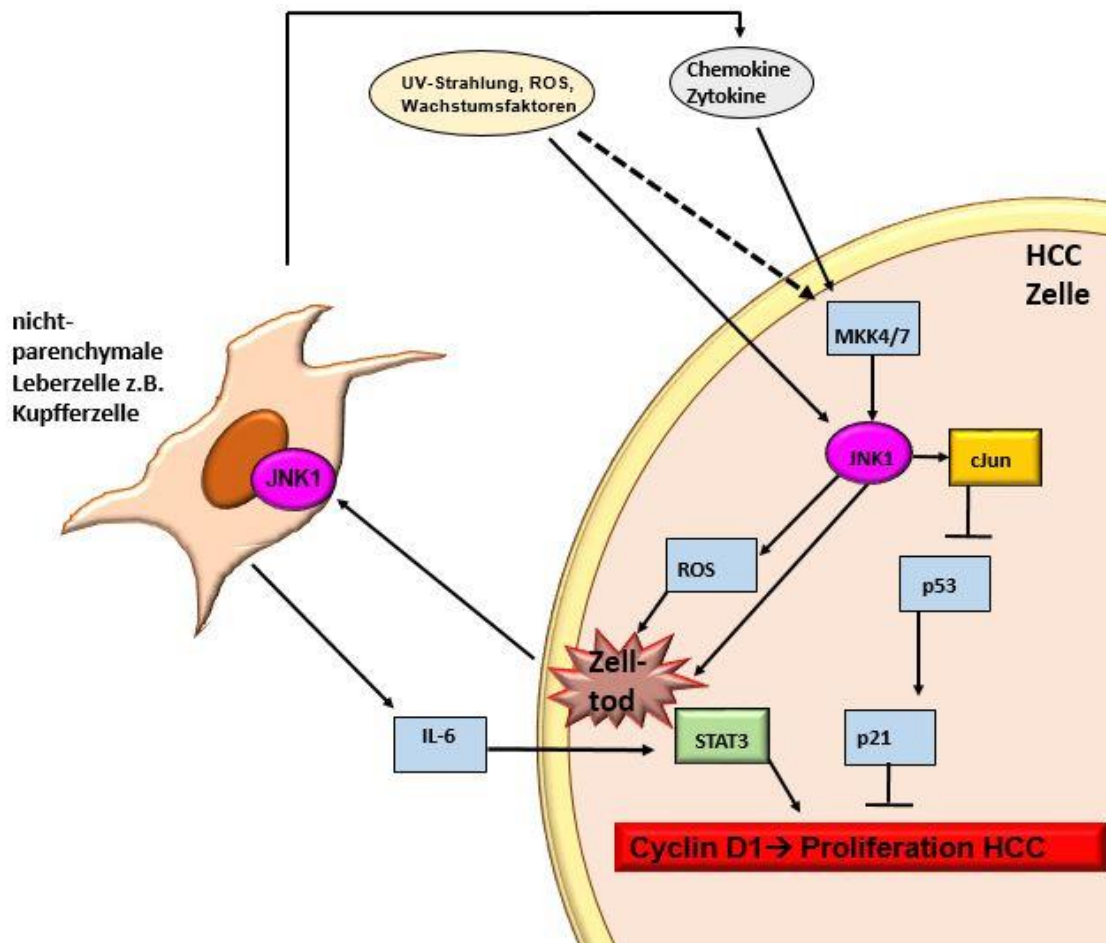
Das MAP Kinase-responsive element des c-fos Promoters ist das *serum response element* (SRE), welches durch einen Transkriptionsfaktorkomplex gebunden wird. Dieser besteht aus dem dimerisierten SRF und dem *ETS domain-containing protein Elk-1* (ELK-1) oder *SIN1-associated protein* (SAP-1). Die MAP Kinasen ERK, JNK und p38 phosphorylieren und aktivieren Elk-1 was zu einer SRE-anhängigen c-fos Expression führt. Die dominanten Kontrollelemente des c-jun Promoters sind TRE. Diese binden vorwiegend Heterodimere aus c-Jun und *Activating transcription factor 2* (ATF-2). Sie werden durch JNK MAP Kinasen und im Falle von ATF-2, auch von p38 aktiviert. c-Fos und c-Jun bilden Heterodimere und binden an ein AP-1 response element. c-Fos wird phosphoryliert und aktiviert durch das Protein *c-Fos-regulating kinase* (FRK), c-Jun durch JNK. Modifiziert nach <sup>108</sup>

### 1.5.2 JNK1-Signalwege in Leberfibrose und Karzinogenese

JNK1 vermittelte Signalwege sind an Zelltod, -überleben, -differenzierung, -proliferation und Tumorgenese in Hepatozyten beteiligt. Im Rahmen der Leberfibrose ist JNK1 an der Aktivierung von HSC beteiligt. Dies konnte anhand reduzierter HSC Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression bei pharmakologischer JNK1-Inhibition gezeigt werden.<sup>109</sup> JNK1-Phosphorylierung zeigte sich erhöht in murinen und humanen fibrotischen Lebern. Am stärksten reguliert zeigte sich die JNK1-Aktivierung in hepatischen Myofibroblasten und Kupferzellen. Studien konnten demonstrieren, dass JNK1 für die Produktion proinflammatorischer Zytokine aus Kupferzellen benötigt wird.<sup>110</sup> Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass JNK1-defiziente Mäuse eine herabgesetzte Fibroseentstehung aufwiesen und resistent gegenüber der *diet-induced steatohepatitis* waren.<sup>110</sup> JNK2-defiziente Mäuse wiesen eine gesteigerte Fibroseentstehung auf. Dies führt zu der Annahme, dass JNK1 profibrotische und JNK2 antifibrotische Effekte in der Leber aufweist.<sup>111</sup>

Das HCC kann sich als Folge chronischer Lebererkrankung bei Leberfibrose und – zirrrose entwickeln. Hui et al. konnten eine erhöhte p-JNK1 Aktivität in humanen HCC nachweisen.<sup>112</sup> Des Weiteren entwickelten *JNK1-defiziente* Knockout-Mäuse (*Jnk1<sup>-/-</sup>*) weniger und kleinere Lebertumoren als Wildtyp- oder *JNK2-Knockout*-Mäuse (*Jnk2<sup>-/-</sup>*) nach Diethylnitrosamine (DEN)-induzierter Hepatokarzinogenese. Hier zeigte sich die Expression von Regulatoren des Zellzyklus wie Cyclin D1 und c-Jun im HCC-Gewebe erhöht. Dem gegenüber waren der Zellzyklusregulator Cyclin D1 und VEGF auf Proteinebene, verglichen mit den Tumoren in Wildtypmäusen, in *Jnk1<sup>-/-</sup>* Tumoren stark reduziert. c-Jun zeigte hier ebenfalls eine Reduktion.<sup>113</sup> JNK1 beeinflusst demzufolge über die Induktion von Proliferationsfaktoren die Zellproliferation und Neovaskularisation während der Tumorentwicklung.<sup>113</sup>

C-Jun ist Ziel JNK1-abhängiger Phosphorylierung. c-Jun ist an proliferativen Prozessen, welche sowohl während der Embryogenese<sup>114</sup> als auch in frühen Phasen der Tumorgenese stattfinden, beteiligt. Im letzteren Fall wird c-Jun nach der Tumor-Initiation zur weiteren Progression des Tumorwachstums benötigt. Zudem zeigte sich, dass c-Jun Tumorzellen vor der Apoptose schützt. Dies suggeriert, dass ein vermehrter apoptotischer Tumorzelluntergang die gestörte Tumorgenese im *c-Jun Knockout* (*c-jun<sup>-/-</sup>*) bedingt. Hier konnte ebenso demonstriert werden, dass der hepatozelluläre *c-jun<sup>-/-</sup>*, die Entstehung DEN-induzierter HCC reduzieren konnte.<sup>107</sup> Auch in Modellen für Hepatitis B Virus assoziierter Hepatokarzinogenese zeigte sich c-Jun als Promotor für die Proliferation und die Progression von Dysplasien und wurde somit als Proto-Onkogen beschrieben.<sup>115</sup> Aktivierter *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) wird ebenfalls unter anderem durch JNK1 reguliert. In gesunden Zellen ist STAT3 mit der Regulation von Zelldifferenzieren und/oder Wachstum assoziiert. Es ist bekannt, dass konstitutiv aktiviertes STAT3 mitogene Effekte hat und mit Wachstumsdysregulation assoziiert ist.<sup>116</sup> Es konnte gezeigt werden, dass neben der Aktivierung von c-Jun STAT3 zur Hepatokarzinogenese beiträgt.<sup>117</sup> Cyclin D1 ist ein *downstream target* von JNK1 und fungiert als Regulator im Zellzyklus von der G1 in die S Phase. Bei konstitutiver Aktivierung z. B. durch die Hochregulation von p-JNK1 oder p-c-Jun ist Cyclin D1 an Zellproliferation und Tumorgenese beteiligt.<sup>118</sup>



**Abb. 7: Der JNK1-Signalweg in Leberzellen**

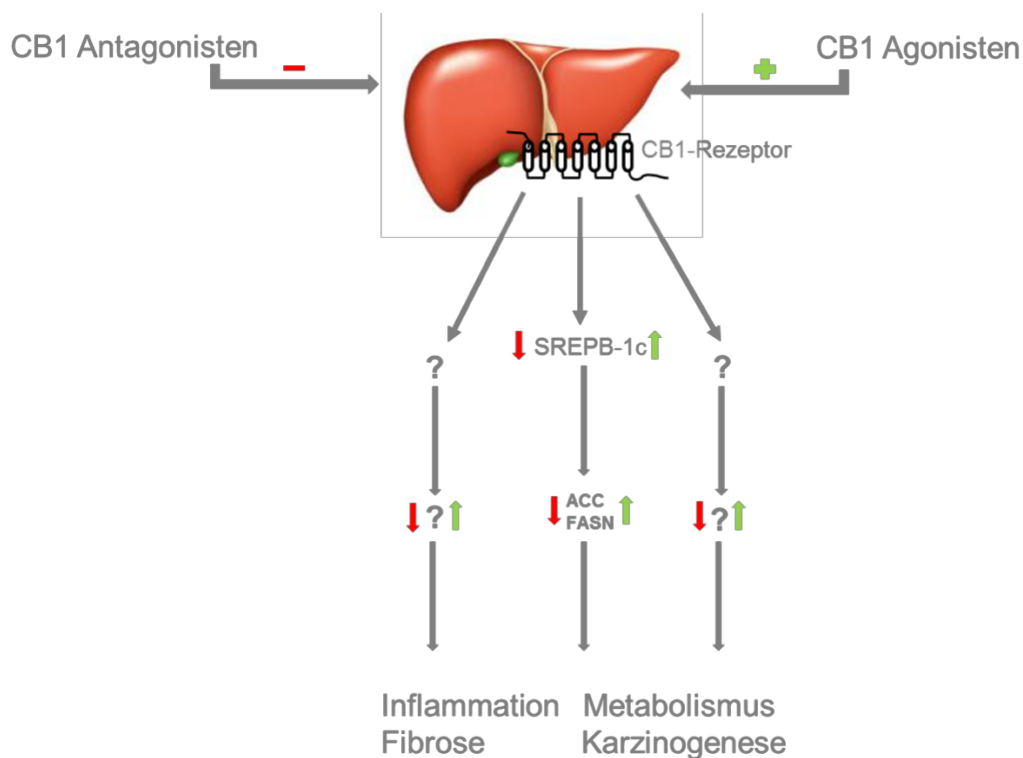
Durch verschiedene oben genannte Stimuli, die entweder von exogen oder über aktivierte hepatische Sternzellen auf die Hepatozyten wirken, kann JNK1 indirekt über MKK4/7 oder direkt durch Phosphorylierung aktiviert werden. Phosphoryliertes JNK1 aktiviert seinerseits c-Jun, welches über eine vermehrte Inhibition von p53 zu einem unkontrollierten Zellzyklus führt. STAT3 wird vornehmlich über IL-6 aktiviert, welches von HSC sezerniert wird. STAT3 bewirkt seinerseits unter anderem eine Akkumulation von Cyclin D1. Diese führt ebenfalls zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen. Ebenso ist JNK1 in der Lage, den kontrollierten Zelltod, die Apoptose, herbeizuführen. Modifiziert nach <sup>104</sup>

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt einer Antagonisierung des CB1-Rezeptors auf die Cholestase und ihre Folgeschäden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit dem selektiven CB1-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant therapiert.

Die zu überprüfende Arbeitshypothese lautete: „Die Krankheitsprogression und Folgen der Cholestase können durch die Antagonisierung des CB1-Rezeptors verzögert bzw. aufgehalten werden.“

Zur Beantwortung der Arbeitshypothese wurden metabolische Parameter sowie spezifische Marker für Inflammation, Fibrogenese und Karzinogenese erhoben. Unbehandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse, eine mit dem CB1-Agonisten *Arachidonyl-2-chloroethylamide* (ACEA) gefütterte Mausgruppe sowie Wildtyp BALB/c Mäuse, wurden als Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt.



### Abb. 8: Signalweg des CB1-Rezeptors

Bei Aktivierung des CB1-Rezeptors der Leber kommt es zum Anstieg von *Sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP-1c). SREBP-1c aktiviert weitere Signalwege, die in der Entstehung von Leberinflammation, -metabolismus, -fibrose und Karzinogenese involviert sind. (Abb. N. Helmrich)

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
2,5% Horse serum	Impres Reagent Kit, Fa. Vector, Burlingame
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
70% Ethanol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
96 Well Platte	
96% Ethanol	Fa. Fischer, Saarbrücken
99,6% Ethanol	Fa. Berkel AHK, Ludwigshafen
Acetic Acid	Merck, Darmstadt
Agarose Broad Range Roti®garose	Roth, Karlsruhe
AM 1907 DNA-free	FA. Ambion
Amersham Hyperfilm™ ECL	Fa. GE Healthcare Life Sciences, München
APS 10%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aqua dest.	Millipore MQ-Biocel Anlage
BSA, # K41-001-500	Fa. PAA, Pasching
Cellstar® Tubes	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Collection Tubes	Fa. Qiagen, Hilden
Curix 60	Fa. AGFA Health Care, Greenville
Deckgläschen	R. Langenbrinck, Emmendingen
Dodecylsulfate-Na-Salt >99,9%	Fa. Serva, Heidelberg
epsilon Aminocaproic acid, #130512	Fa. Serva, Heidelberg
Formaldehyd 6x Loading Dye, AM8552	Ambion, Darmstadt
Gel blotting paper, GB 003, #10426892	Fa. Whatman®
Glycin, Pufferan®	Fa. Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe
Hämalaun Sauer nach Mayer, # T865.2	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
HCl	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
IGEPAL® CA-630	Sigma Aldrich, Darmstadt
Impres Reagent Kit	Fa. Vector, Burlingame
iScript cDNA Synthese Kit, #170-8890	Fa. Bio-Rad, Hercules, USA
Isopropanol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
KCL, #67813	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , #P030.1	Fa. Roth, Karlsruhe
Luminol, # A8511-5G	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
Mercaptoethanol	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Methanol >99,8%, #STBF2109V	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
MicroAmp® Fast Reaction Tubes	Life Technologies, Life Technologies GmbH, Darmstadt
MicroAmp® Optical 8-Cap Strip	Life Technologies, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Milchpulver	Fa. Roth GmbH, Karlsruhe

MOPS 99,5%, HM1245	Sigma Aldrich, Steinheim
Mouse IgG Blocking Reagent, MBK-2213	Fa. Vector Laboratories Inc., Burlington
Multigel	Fa. Biometra, Göttingen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine (TEMED), #35925.01	Fa. Serva, Heidelberg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , #3904.2	Fa. Roth, Karlsruhe
NaCl, #31434	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nümbrecht QIAShredder	Fa. Qiagen, Hilden
Page Ruler™ Plus, Prestained Protein	Fa. Thermo Scientific, Dreieich
p-coumeric acid C9008-10G	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
Pertex® Eindeckmedium	Fa. Medite, Burgdorf
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Platinum SYBR Green qPCR Super Mix, #11733-038	Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA
PVDF Transfer Membran	Immobilon®-P, Fa. Merck Millipore, Darmstadt
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
RNase AWAY, #7002	Thermo Scientific, Dreieich
RNase-freies Wasser	Fa. Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden
RNeasy Minisäulen	Fa. Qiagen, Hilden
Rotiphorese® Gel 30 37,5:1, # A3029.1	Fa. Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 40 29:1, # A515.1	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
RPE Buffer	Fa. Qiagen, Hilden
RTL Buffer	Fa. Qiagen, Hilden
RW1 Buffer	Fa. Qiagen, Hilden
Sirius-Rot-Farbstoff	Fa. Polysciences, Heidelberg
Stickstoff	Apotheke der Justus-Liebig Universität Gießen
Triglyceride Quantification Kit (ab65336)	Abcam, USA
tri-Na-Citratdihydrat, #H1.06448.100	Fa. Merck Darmstadt
Tris, # 4855.2	Fa. Roth, Karlsruhe
Trockeneis	Apotheke UKGM
Tubes Falcon	Corning Science México, Tamaulipas, Mexiko
Tween® 20	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Vector® VIP Peroxidase Substrate Kit	Fa. Vector, Burlingame
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Wasserstoffperoxid 30%	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	Fa. VWR, Darmstadt
Zitronensäure	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim

## 2.1.2 Puffer und Lösungen

<b><u>Lämmli-Puffer (1x):</u></b> 2 ml Lämmli-Puffer (4x), 6 ml Aqua dest.	<b><u>Lämmli-Puffer (4x):</u></b> 40% Glycin, 20% Mercaptoethanol, 8% SDS, 0,25 M Tris HCl pH 6,8, (Stammlösung) 0,02% Bromphenolblau
<b><u>Tris-Glyzin Puffersystem:</u></b> 115 ml Aqua dest., 375 ml 2M Tris pH 8,8 (=1,5M), 10 ml (4×Trenngel-Puffer, 500 mL) 20% SDS (=0,4%)	<b><u>Trenngel (10%):</u></b> 6,66 ml Rotiphorese® Gel 30 37, 5:1, 5 ml Trenngel-Puffer, 200 µl APS 10%, 20 µl TEMED, auf 20 ml mit Aqua dest.
<b><u>Trenngel (12%):</u></b> 8 ml Rotiphorese® Gel 30 37,5:1, 5 ml Trenngel-Puffer, 200 µl APS 10%, 20 µl TEMED, auf 20 ml mit Aqua dest.	<b><u>Trenngel (15%):</u></b> 3,75 ml Rotiphorese® Gel 40 29:1, 5 ml 2M Tris pH 8,5, 100 µl APS 10%, 10 µl TEMED, auf 20 ml mit Aqua dest. auffüllen
<b><u>4×Sammelgel-Puffer:</u></b> 365 ml Aqua dest., 125 ml 2M Tris pH 6,8 (=0,5M), 10 ml 20% SDS (=0,4%)	
<b><u>Sammelgel (6,6 ml):</u></b> 0,66 ml Rotiphorese® Gel 30 37,5:1, 1,66 ml Sammelgel-Puffer, 3,6 ml Aqua dest., 80 µl APS 10%, 8 µl TEMED	<b><u>Sammelgel (6,6 ml):</u></b> 0,66 ml Rotiphorese® Gel 40 29:1, 2,475 ml 2M Tris pH 8,5 3,425 ml Aqua dest., 80 µl APS 10%, 8 µl TEMED
<b><u>Gelelektrophorese-Puffer (1x):</u></b> 100 ml 10x Gelelektrophorese-Puffer, ad 1000ml Aqua dest.	<b><u>Gelelektrophorese-Puffer (10x) :</u></b> 10g SDS, 30g Tris, 144g Glycin, auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen
<b><u>Kathode Puffer (1x):</u></b> 100 ml Kathode Puffer (10x), auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen	<b><u>Kathode Puffer (10x):</u></b> 242 g Tris Base, 358 g Tricin (9), auf 2 l mit Aqua dest. auffüllen, 20 g SDS
<b><u>Anode Puffer (1x):</u></b> 100 ml Anode Puffer (10x) auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen.	<b><u>Anode Puffer (10x):</u></b> 484 g Tris base, mit etwas Aqua dest. auffüllen (weniger als 2 l), pH auf 8,9 einstellen mit konzentrierter Salzsäure auf 2 l mit Aqua dest. auffüllen.
<b><u>Anode 1 Solution (500 ml):</u></b> 75 ml 2M Tris base (=0,3M) und 100 ml Methanol (=20%) pH 10,4	<b><u>Anode 2 Solution (500 ml):</u></b> 6,25 ml 2M Tris base (=25mM und 100 ml Methanol (=20%) pH 10,4

<b><u>Kathode Solution (500 ml):</u></b> 2,6 Aminocaproic acid (=40mM), 100 ml Methanol (=20%) pH 7,6 und 250 µl 20% SDS.	<b><u>TBS (10x) pH 7,5:</u></b> 200 mM Tris pH 7,5, hinzugeben von 1,37 M NaCl und auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen
<b><u>TBS-Tween (TBS-T):</u></b> 200 ml 10x TBS pH 7,5, auf 2 l mit Aqua dest. auffüllen und 2 ml Tween 20 hinzugeben.	<b><u>Milchpulver-Lösung:</u></b> 2,5 mg Milchpulver abwiegen, ad 50 ml TBS-T
<b><u>PBS Stammlösung (10x):</u></b> 80g NaCl (137 mM) (16), 2g KCl (2,7 mM) (17), 2,45 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> abwiegen und mit Aq. dest. auf 1 Liter auffüllen.	<b><u>PBS (1x):</u></b> 100 ml PBS Stammlösung wurden mit 900 ml Aq. dest. aufgefüllt.
<b><u>ECL-Protokoll:</u></b> 10 ml Aqua dest., 0,5 ml 2M Tris pH 8,5, 2,6 µl 30% Wasserstoffperoxid, 50 µl 250 mM Luminol und 25 µl 90mM Coumeric acid wurden zusammengegeben.	<b><u>Stripping Puffer:</u></b> 15 g Glyzin, 1 g SDS wurden mit ca. 950 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, der pH mit konzentrierter HCl auf 2,2 eingestellt und auf 1 L mit Aqua dest. aufgefüllt.
<b><u>Inkubationspuffer:</u></b> 10 ml aus 5 mM NaCl, 2,5 ml 1M MgCl <sub>2</sub> , 50 ml 1M Tris pH 9,5 wurden mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt.	<b><u>NBT=Nitroblau-Tetrazoliumchlorid:</u></b> 66 µl + BCIP= 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat 33µl + 10 ml Inkubationspuffer für AP Entwicklung

### 2.1.3 Oligonukleotide

Gen	Annealingtemperatur in °C	Hersteller	Sequenz
<b>Srebp-1</b>	57,3	MWG	For 5'-tga ctt ccc tgg cct att tg-3'
<b>Srebp-1</b>	56,7	MWG	Rev 5'-ttc aat gga gtg ggt gca g-3'
<b>Acaca</b>	57,0	Invitrogen	For 5'-atg ggc gga atg gtc tct ttc-3'

<b>Acaca</b>	57,0	Invitrogen	Rev 5'-tgg gga cct tgt ctt cat cat-3'
<b>Mmp2</b>	57,0	Qiagen	*
<b>Mmp9</b>	57,0	Qiagen	*
<b>Col1a1</b>	57,0	Qiagen	*
<b>TIMP1</b>	57,0	Qiagen	*
<b>Desmin</b>	57,0	Qiagen	*
<b>Tgfb1</b>	60,0	Qiagen	*
<b>Lcn2</b>	58,8	Life T	For 5'-tgg ccc tga gtg tca tgt g-3'
<b>Lcn2</b>	60,6	Life T	Rev 5'-ctc ttg tag ctc ata gat ggt gc-3'
<b>Mcpt1</b>	60,0	Qiagen	*
<b>Icam1</b>	57,0	Qiagen	*
<b>PEPCK</b>	57,0	Invitrogen	For 5'-ctg cat aac ggt ctg gac ttc-3'
<b>PEPCK</b>	57,0	Invitrogen	Rev 5'-cag caa ctg ccc gta ctc c-3'
<b>PPAR-g</b>	60,1	MWG	For 5' ccc aat ggt tgc tga tta caa ata tg-3'
<b>PPAR-g</b>	61,3	MWG	Rev 5' - aat aag gtg gag atg cag gtt cta c-3'
<b>PPARa</b>	60,5	MWG	For 5'-gga cct tcg gca gct ggt-3'
<b>PPARa</b>	59,8	MWG	Rev 5'-tcg gac tcg gtc ttc ttg atg-3'
<b>FAS</b>	57,0	MWG	For 5'-gct ggg tgg agt ctc tga ag-3'
<b>FAS</b>	57,0	MWG	Rev 5'-tgc aac acc ttc tgc agt tc-3'
<b>Cyp7a1</b>	57,0	Qiagen	*

<b>Ccnd1</b>	59,8	Eurofins	For 5'-tca tcg aac act tcc tct cc-3'
<b>Ccnd1</b>	59,6	Eurofins	Rev 5'-tga ctc tgg aaa gaa agt gc-3'
<b>Actb (β-Actin)</b>	61,4	Life T	For 5'-ggc tgt att ccc ctc cat cg-3'
<b>Actb (β-Actin)</b>	58,4	Life T	Rev 5'-cca gtt ggt aac aat gcc atg t -3'
<b>Gapdh</b>	59,8	Life T	For 5'-agg tcg gtg tga acg gat ttg-3'
<b>Gapdh</b>	58,9	Life T	Rev 5'-tgt aga cca tgt agt tga ggt ca-3'
<b>EGR1</b>	60,0	Invitrogen	For 5'-tcg gct cct ttc ctc act ca-3'
<b>EGR1</b>	60,0	Invitrogen	Rev 5'-ctc ata ggg ttg ttc gct cgg-3'
<b>Cyp7a1a</b>	57,0	Qiagen	*
<b>Creld2</b>	60,0	Invitrogen	For 5'-caa cac ggc cag gaa gaa ttt-3'
<b>Creld2</b>	60,0	Invitrogen	Rev 5'-cat gat ctc cag aag ccg gat-3'
<b>Igfbp1</b>	60,0	Invitrogen	For 5'-atc agc cca tcc tgt gga aac-3'
<b>Igfbp1</b>	60,0	Invitrogen	Rev 5'-tgc agc taa tct ctc tag cac tt-3'
<b>FGF21</b>	57,0	Qiagen	*
<b>Igf1</b>	60,0	Invitrogen	For 5'-ctg gac cag aga ccc ttt gc-3'
<b>Igf1</b>	60,0	Invitrogen	Rev 5'-gga cgg gga ctt ctg agt ctt-3'

<b>Nupr1</b>	60,0	Invitrogen	For 5'-ccc ttc cca gca acc tct aaa-3'
<b>Nupr1</b>	60,0	Invitrogen	Rev 5'-tct tgg tcc gac ctt tcc ga- 3'

## 2.1.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Konzentration	Katalog #	Sekundär- AK	Hersteller
<b>LCN2/NGAL</b>	Santa Cruz	1:50	sc-80234	Impress Reagent Kit Anti-Rat Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame
<b>PEPCK</b>	Abgent	1:50	AP8093b	Impress Reagent Kit Anti-Rabbit Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame
<b>FASN</b>	Cell Signaling	1:1000	#2194	Impress Reagent Kit Anti-Rabbit Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame
<b>P-c-Jun</b>	Cell Signaling	1:200	#3270	Impress Reagent Kit Anti-Rabbit Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame
<b>CK19</b>	Abcam	1:200	ab15463-1	Impress Reagent Kit Anti-Rabbit Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame
<b>CK19</b>	Santa Cruz	1:200	Sc-33111	Impress Reagent Kit Anti-Goat Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame

<b>Col1</b>	Abcam	1:100	Ab34710	Impress Reagent Kit Anti-Rabbit Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame
-------------	-------	-------	---------	--	---------------------------------------

Primär- Antikörper	Hersteller	Konzentration	Katalog #	Sekundär- AK	Hersteller
<b>LCN2/NGAL</b>	R&D	1:1000	AF1857	Donkey anti goat IgG HRP	Santa Cruz, sc- 2056
<b>P-JNK</b>	Cell Signaling	1:2000	#4668	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
<b>JNK</b>	Santa Cruz	1:400	sc-572	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
<b>P-c-Jun</b>	Cell Signaling	1:2000	#3270	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
<b>c-Jun</b>	Cell Signaling	1:2000	#9165	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
<b>P-Stat3</b>	Cell Signaling	1:2000	#9145	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
<b>Stat3</b>	Cell Signaling	1:2000	#4904P	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
<b>β-Actin</b>	Santa Cruz	1:400	sc-47778	Goat anti mouse IgG AP	Santa Cruz, sc-2008

## 2.1.5 Geräte

Geräte	Hersteller
Fastblot B44	Fa. Biometra
Feinwaage A200S	Fa. Satorius, Göttingen
Homogenizer Ultra Turrax T8	Ika Werke, Staufen
Kamera, USB Cam 051H Reprostar 3	Phytec, Mainz
Microplate ELISA-Reader Fusion	Fa. HP
Microwelle	Severin, Sundern
Mikroskop DMIL	Fa. Leica, Wetzlar
Nano Drop, Spectrophotometer ND-1000	Thermo Scientific, Dreieich
Netzbetreiber	Fisher Bioblock Scientific, Schwerte
Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenkassette	Fa. Roth, Karlsruhe
StepOne Plus RT PCR System	Life Technologies, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Stromgeber	Avantec consort EV 243
Thermocycler	Biometra T3000, Göttingen
Thermomixer comfort	Fa. Eppendorf, Hamburg
Vortex Mixer 7-2020	Fa. neoLab, Heidelberg
Vortexer, VF2	Fa. IKA® Labortechnik, Staufen
Waage	Sartorius analytic, Göttingen
Zentrifuge Micro Star 17R	VWR, Radnor, Pennsylvania
Zentrifuge Mikro 120	Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

## 2.1 Molekularbiologische Methoden

### 2.1.1 mRNA-Isolation

Zur Ermittlung der Genexpression stellt die *quantitative Real-Time polymerase chain reaction (qRT-PCR)* ein etabliertes Verfahren dar. Für das Arbeiten mit diesem Verfahren wird *complementary DNA (cDNA)* benötigt, welche zuvor über das Zwischenprodukt mRNA isoliert werden muss. Das zugrunde liegende Prinzip der Isolation beruht auf der Bindungseigenschaft der negativ geladenen RNA an die positiv geladene Silica-Gel Membran in den *Spin-Columns*. Durch Waschen und Zentrifugation wurde die RNA aufgereinigt. Die Länge der isolierten RNA-Molekülstränge beträgt mehr als 200 Nukleotide, da somit ungewollte 5,8S rRNA, 5S rRNA und tRNA selektiv ausgeschlossen werden. Zur mRNA-Isolation wurden 20-25mg Leberpulver, welches zuvor unter Zugabe von Stickstoff gemörsert und bei -80 °C gelagert wurde, abgewogen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Trockeneis überführt. Zum Abwiegen wurden sowohl die Reaktionsgefäße, als auch Löffelspatel und Metallzange in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit nach Vorgabe des Herstellers durchgeführt. Die abgewogenen Proben wurden jeweils mit 600 µl Lysepuffer (1 ml RTL Puffer + 10 µl β-Mercaptoethanol) versetzt, 5 Minuten inkubiert und anschließend mit Hilfe des Ultra Torrax homogenisiert, um die Zellen des Gewebes zu dispergieren und RNasen zu eliminieren. Hierbei bewirkt der im RTL-Puffer enthaltene Guanidin-Thiocyanat-Puffer ebendiese Reaktion. Das Homogenat wurde nun auf die Shreddersäulen (lila Säulen des Kits) überführt und 2 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt entfernt unlösliche Bestandteile des Homogenisats. Die lila Säulen wurden anschließend verworfen. Das erhaltene Homogenat wurde mit 600 µl 70% RNA-freiem Ethanol gemischt. Beim Mischen mit Ethanol bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen RNA-Molekülen und Silikat, wobei es zur Bindung der RNA an die Silica-Membran kommt. Anschließend wurden die homogenisierten Proben auf die rosa RNeasy Minisäulen überführt, für 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert und das untere Reservoir dekantiert. Bei diesem Schritt bindet die mRNA vollständig an die Membran der RNeasy Minisäulen. Für die bessere Handhabung der Probenmenge und, um die Membran nicht zu überladen, wurde der eben genannte Arbeitsschritt zwei Mal mit jeweils der halben Probenmenge durchgeführt. Um die RNA von Salzen, Proteinen und anderen zellulären Bestandteilen zu reinigen, wurden die Proben anschließend gewaschen. Jeweils 700 µl RW1 Waschpuffer wurden auf die Säulen gegeben, 15 s zentrifugiert und das untere Reservoir dekantiert. Die Säulen wurden nun in neue, beschriftete Reaktionsgefäße (*Collection Tubes, Cups*) überführt. Ein weiterer Waschlauflauf mit 500 µl RPE-Waschpuffer/Probe folgte. Um die Säulen zu trocknen, wurden diese für 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert. Die trockenen Säulen

wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 30 µl Aqua dest. benetzt. Eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließende 1-minütige Zentrifugation bei 8.000 x g schloss sich an. Die rosa Säulen wurden verworfen. Die mRNA wurde nun entweder bei -80 °C gelagert oder für die weitere Behandlung im Eisbad aufbewahrt. Zum Ausschluss einer etwaigen Verunreinigung der gewonnenen RNA durch genomische DNA, wurde ein DNase-Verdau mit der hergestellten mRNA durchgeführt. DNAsen spalten DNA und machen diese somit für weitere Analysen funktionslos. Es wurde mittels des AM 1907 DNA-free Kits, nach Vorgaben des Herstellers gearbeitet. Die 30 µl Probe wurde mit 3 µl 10x DNase Buffer und 1 µl Turbo DNase versetzt, gemixt und 30 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Die Turbo DNase hat eine 350 %ig höhere Effizienz der Spaltung von DNA im Vergleich zur DNase1. Selbst in Lösung und unter physiologischen Bedingungen arbeitet die synthetisch hergestellte DNase 100fach effizienter als die körpereigene DNase1. Der DNase Buffer beschleunigt die Reaktion der Turbo DNase. Bei diesem Schritt wurde kontaminierende DNA bis unter die Nachweisgrenze eliminiert. Nach den 30 Minuten Inkubationszeit wurden 3 µl DNase Inactivation Reagent auf die Proben gegeben, per Hand gut gemischt und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Proben noch zwei Mal gut durchmischt. Das *DNase Inactivation Reagent* stoppt die Aktivität der Turbo DNase und entfernt divalente Kationen wie Kalzium und Magnesium. Danach wurde die mRNA bei 10.000 x g für 1,5 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß aus dem *RNeasy Mini Kit* überführt. Hierbei muss darauf geachtet werden, das weiche Pellet am Boden des Cups nicht zu tangieren.

### **2.1.2 Konzentrationsbestimmung der mRNA mittels Spektrometer**

Um eine Aussage über die Menge und Reinheit der isolierten mRNA tätigen zu können, bedient man sich der Spektralphotometrie. Zur Kalibrierung des Gerätes wird zunächst 1 µl RNase freies Wasser auf die Messzelle pipettiert und zweimalig gemessen. Hierbei sollte ein gemessener Wert  $\leq 0$  angezeigt werden. Anschließend werden 1 µl der zu messenden mRNA auf den unteren Sensor des NanoDrop® Geräts pipettiert, der obere Sensor auf die Flüssigkeitssäule geklappt und die Messung gestartet. Der NanoDrop® ermöglicht neben der reinen Messung der Absorptionsspektren für RNA, DNA, Proteine und andere Kontaminanten eine graphische Darstellung der Wellenlängen im Bereich von 220-350 nm. Hierbei kommt folgender Hintergrund zur Anwendung. Die Nukleinsäuren in DNA und RNA absorbieren ultraviolettes Licht bei einem Absorptionsmaximum der Wellenlänge von 260 nm, Proteine bei 280 nm. Andere Kontaminanten wie z.B. Lösungsmittel absorbieren bei 230 nm. Um die Reinheit der isolierten RNA zu überprüfen, wurden die optischen Dichten bei  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$

nm gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Ein Wert von  $A(260/280) = 2,0$  oder darüber spricht für eine reine RNA, die nicht durch Proteine verunreinigt wurde. Niedrigere Werte geben Hinweis auf Verunreinigung der RNA. Auch der Quotient von  $A(260/230)$  ist ein Maß für die Reinheit der RNA bezogen auf andere Kontaminanten und sollte im Bereich von 1,7-2,1 liegen.

Die Berechnung der RNA Menge erfolgte mit folgender Formel:

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

$C_{RNA}$  = Konzentration RNA (ng/uL)

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

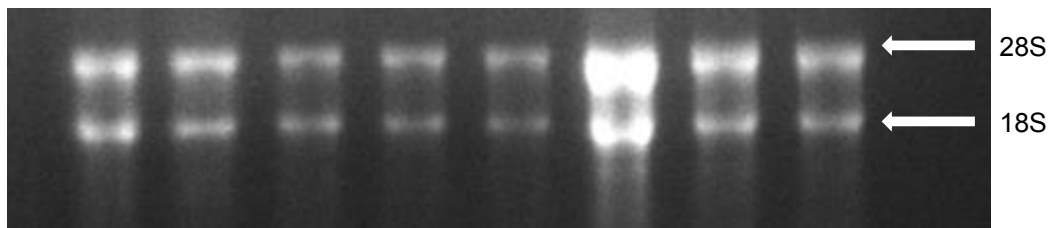
$A_{LW}$  = Absorption der Leerwertprobe bei einer Wellenlänge von 260 nm

40 = RNA-spezifischer Multiplikationsfaktor

V = Verdünnungsfaktor

### 2.1.3 Qualitätskontrolle der RNA mittel Agarosegel

Die isolierte RNA wurde einer erneuten Qualitäts- und Quantitätskontrolle unterzogen. Die Nukleinsäuren werden in der Gelelektrophorese nach Größe und Ladung aufgetrennt, während sie aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste durch ein elektrisches Feld zur Anode wandern. Die Zugabe von Ethidiumbromid ermöglicht die Darstellung der RNA-Banden unter UV-Licht. In einem Becherglas wurden 0,6 g Agarose und 46,25 ml MOPS in der Mikrowelle erhitzt und in Lösung gebracht. Nach anschließendem Abkühlen auf 60 °C wurde 3,75 ml Formaldehyd (37 %) hinzugegeben und in die Kammern eines Gelschlittens gefüllt. Ein eingeführter Kamm ließ während der 30 Minuten andauernden Polymerisation Taschen entstehen, in die später die RNA-Proben aufgetragen wurden. Zur Vorbereitung der RNA-Proben wurden 1 µl isolierte RNA zu 4 µl 6x RNA- Loading Dye (Ethidiumbromid enthaltend) in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, 10 Minuten bei 65 °C im Thermomixer erhitzt und damit denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und vor dem Auftragen auf die Taschen des Agarosegels zentrifugiert. Das Gel wurde in eine Gelelektrophorese Kammer gegeben, die mit MOPS aufgefüllt wurde. 5 µl jeder Probe wurden anschließend komplett auf die Taschen aufgetragen und das Gerät 1 Stunde bei 65 V betrieben. Das im *Loading-Dye* enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die RNA und fluoresziert bei Beleuchtung mit UV-Licht. Somit war es anschließend möglich die 18S und 28S Untereinheit der isolierten RNA in der Photokammer darzustellen und zu fotografieren. Hierbei zeigte sich keine Verunreinigung und ein ausreichender RNA Gehalt.



**Abb. 9: Qualitätskontrolle der isolierten RNA**

Es erfolgte eine Auftrennung der RNA in ihre 28S- und 18S-Untereinheit.

#### 2.1.4 Umschreibung der mRNA in cDNA

Für die PCR wird cDNA benötigt, da die dort verwendete Polymerase keine RNA als Substrat binden kann. Somit dient die isolierte mRNA als Matrize für die cDNA während der Transkription mittels der reversen Transkriptase (RT). Die RT ist in der Lage aus RNA wieder DNA herzustellen, was eine Eigenschaft u.a. von Viren ist. Diese Fähigkeit macht man sich zur Herstellung für PCR Substrate zu Nutze. Das Biorad *iScript™ cDNA Synthesis Kit* enthält eine RT aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT). Diese RT ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase. Der *5x iScript reaction mix* und die *iScript reverse transcriptase* bilden zusammen den Mastermix. Dieser enthält neben der RT Oligo-(dT)-Primer und *random-Hexamerprimer*, Nukleotide, RNase-Inhibitoren und Puffer. Der Primer ist eine Startersequenz zu Beginn der Transkription, die für die weitere Arbeit der RT unerlässlich ist. Diese Startersequenz ist komplementär zu dem Poly-A-Schwanz der mRNA. Die RT bindet an den Primer und kann die Transkription des abzulesenden Abschnittes der mRNA fortführen. Die mRNA und die *iScript reverse transcriptase* wurden auf Eis gestellt, der *5x reaction mix* bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Berechnung des mRNA Einsatzes erfolgte nach denen im NanoDrop® Gerät gemessenen Werten für die Konzentration der mRNA (ng/μl). Die Werte wurden auf 1 μg mRNA umgerechnet und in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Dies geschah nach folgendem Ansatz in 0,5 Reaktionsgefäßen:

Nuklease-freies Wasser (in μl) = 15 – x μl mRNA

Nachfolgend wurde mit dem *iScript cDNA Synthesis Kit* weitergearbeitet. Die Angaben beziehen sich auf das Volumen pro Reaktion:

<i>5x iScript reaction mix:</i>	4 μl
<i>iScript reverse transcriptase:</i>	1 μl
mRNA + nuklease-freies Wasser:	15 μl
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>20 μl</b>

Anschließend wurden alle Tubes an zentrifugiert und in den Biometra ThermocyclerT300 gegeben. Die Inkubation erfolgte nach dem Reaktionsprotokoll des Herstellers:

5 min. bei 25 °C
30 min. bei 42 °C
5 min. bei 85 °C
Abkühlung auf 4 °C

Jede Temperaturstufe schafft ein spezifisches Milieu für die Teilschritte der Transkription:

Bei 25 °C hybridisieren die Primer und die mRNA-Matrize. Bei 42 °C liegt die optimale Temperatur für die Aktivität der RT, die in diesem Schritt die cDNA synthetisiert, vor. Bei 85 °C denaturiert die RT und wird somit inaktiviert.

Die so hergestellte cDNA konnte nun für die qRT-PCR eingesetzt, oder bei -20 °C bis zum nächsten Gebrauch gelagert werden.

### **2.1.5 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion**

Das etablierteste Verfahren zum Nachweis von Genexpression stellt die in Echtzeit gemessene qRT-PCR dar. Hierbei werden die zu analysierenden DNA-Abschnitte (Matrizen) mit Hilfe von Primern, die sich mit ihrer komplementären Nukleotidsequenz an den spezifischen DNA-Abschnitt anlagern, detektiert. Die Primer fungieren somit als Startsequenz und werden anschließend von der Taq-DNA-Polymerase mit freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten elongiert. Dies geschieht bei 72 °C, dem Wirkmaximum der Taq-Polymerase. Nach der Elongation werden die Matrize und der neu synthetisierte komplementäre DNA-Strang bei 95 °C wieder voneinander getrennt (Denaturierung). Anschließend erfolgt eine erneute Anlagerung (*Annealing*) der Primer unter Erwärmung auf ihre spezifische Wirktemperatur, z.B. 60 °C. Die erneute Verlängerung der Primer und Synthese des DNA-Abschnitts erfolgt bei 72 °C. Somit findet durch die wiederholte Abfolge von *Annealing*, Elongation und Denaturierung zunächst eine exponentielle Amplifikation des spezifischen Genabschnitts statt. Um die amplifizierte DNA-Menge zu quantifizieren, interkaliert ein Fluoreszenzfarbstoff, hier SYBR-GREEN, während der Elongation in die DNA-Doppelstränge. Der DNA-SYBR-GREEN-Komplex hat ein Absorptionsmaximum für blaues Licht bei der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$ . Bei  $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$  sendet er grünes Licht aus. Die Intensität des emittierten Lichts ist proportional zur amplifizierten DNA-Menge (quantitative Messung des

spezifischen DNA-Abschnitts) und wird zum Zeitpunkt der exponentiellen Amplifikation gemessen. Auf die exponentielle Vermehrung des DNA-Abschnitts folgt eine lineare Amplifikation, bis es zu einem Sättigungsniveau kommt. Der Zyklus der Amplifikation, bei dem ausreichend Fluoreszenz zur Detektion ausgestrahlt wird, gibt den  $C_T$ -Wert (engl. *Cycle threshold*) an. Aus diesen Werten errechnet sich die Über- oder Unterexpression jeder einzelnen Messung.

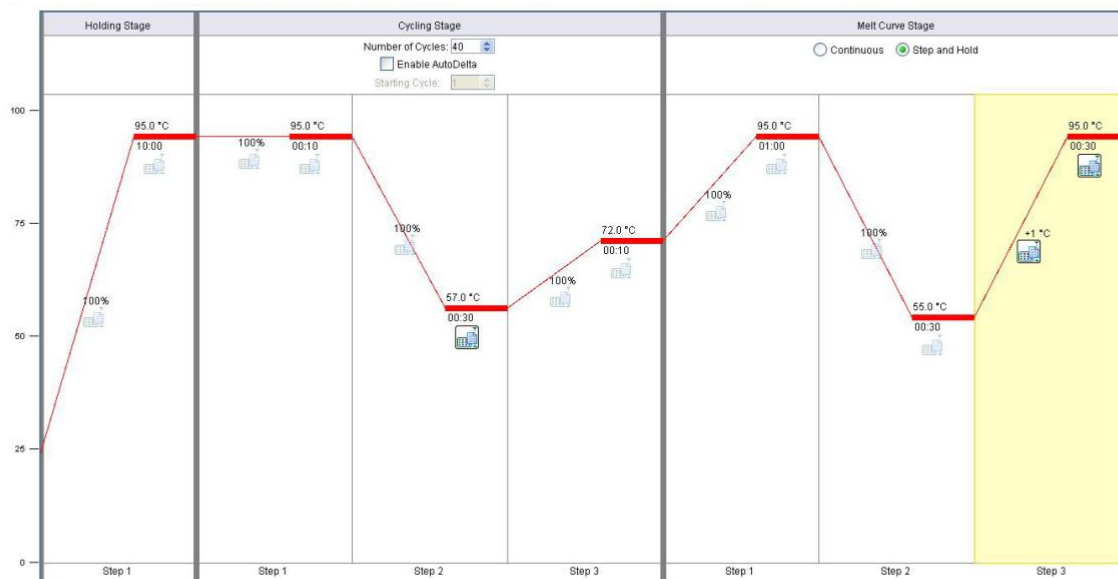
### 2.1.5.1 Durchführung

Die qRT-PCR wurde in Doppelbestimmungen durchgeführt (spätere Mittelwertbildung) und es wurde pro verwendetem Primer eine Negativkontrolle mitgeführt (ohne cDNA-Einsatz), um etwaige Verunreinigungen zu messen. Zunächst wurde ein Mastermix hergestellt, der die gewünschten Primer (1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, *forward* und *reverse* Primern wurden diese im Verhältnis 1:1 hinzugegeben), den Platinum SYBR GREEN qPCR SuperMix-UDG (Taq-Polymerase, UDG, dUTP, MgCl<sub>2</sub>, *ROX reference dye, bovine serum albumine*) und Aqua dest. in folgendem Verhältnis beinhaltete:

<b><u>Versuchsansatz/ Probe:</u></b>	
SYBR green Super Mix/ Rox:	6,30 µl
Primer:	1,25 µl
Aqua dest.:	4,45 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	12 µl

Auf einer 96-Well Platte wurden zunächst 12 µl des Mastermix und anschließend 0,5 µl der cDNA in Tubes pipettiert und anzentrifugiert. Die 96-Well Platte wurde in das StepOnePlus RT-PCR-Gerät gegeben und ein für jeden Primer spezifisches Temperaturprofil angelegt. Alle gemessenen  $C_T$ -Werte wurden auf ein Housekeeping-Gen bezogen (z.B.  $\beta$ -Actin, 18S rRNA, GAPDH). Diese Gene werden unabhängig vom Zelltyp und äußeren Einflüssen im Organismus exprimiert und dienen als Basis für die spätere Errechnung von Über- und Unterexpression anderer Gene. Die Errechnung erfolgte über die von dem PCR-Gerät gemessenen  $C_T$ -Werte und wurden mit Hilfe der  $\Delta\Delta$ -CT-Methode errechnet. Der  $C_T$ -Wert gibt den Zyklus an, in dem die emittierte Fluoreszenz erstmalig den Hintergrund übersteigt. Je früher dies in der Zyklusabfolge geschieht, desto mehr DNA des spezifischen Abschnitts war in der Ursprungs-DNA exprimiert. Die Schmelzkurve gibt Auskunft über Verunreinigungen und den Ablauf des Schmelzens der Reaktionsprodukte während der qRT-PCR.

Die qRT-PCR wurde mit dem Gerät StepOnePlus RT-PCR gemessen, die  $C_T$ -Werte mit Excel aufbereitet und mit SPSS statistisch ausgewertet.



**Abb. 10: Temperaturprofil des StepOnePlus Gerätes.**

Zur Amplifizierung der cDNA wurde für jeden verwendeten Primer eine spezifische Temperaturabfolge programmiert.

## 2.2 Histologische Methoden

### 2.2.1 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach den im Labor etablierten Protokollen durchgeführt. Die verwendeten formalinfixierten Parafinschnitte der 16 Wochen alten Mäuse waren bereits in Vorarbeiten hergestellt worden. Das Prinzip der immunhistochemischen Färbungen beruht auf der Detektion von Antigenen und Epitopen im Gewebe. Diese werden von einem spezifisch gegen sie gerichteten Primärantikörper erkannt, welcher seinerseits von einem Sekundärantikörper gebunden wird. Dieser Sekundärantikörper ist z.B. an *Horseradish-Peroxidase* (HRP) gekoppelt. Die HRP wird dabei optisch aktiv. Somit können Strukturen in der Immunhistochemie (IHC) auf dem Präparat dargestellt werden. Zunächst wurden die zu färbenden Objektträger in der absteigenden Reihe (3 x 10 Minuten Xylol, 2 x 5 Minuten 99,6 % Ethanol, 5 Minuten 96 % Ethanol, 5 Minuten 70 % Ethanol) durch Xylol entparaffiniert und nachfolgend durch das Ethanol und anschließende 5 Minuten in Aqua dest. rehydriert. Durch die Formalinfixierung und das Einbetten in Paraffin wurden einige Epitope im Gewebe in ihrer Struktur verändert oder soweit quervernetzt, sodass diese von ihren spezifischen Antikörpern nicht mehr erkannt würden. Aus diesem Grund wurde

eine Antigendemaskierung oder auch *Antigen-Retrieval* durchgeführt, welches die vernetzten Proteine wieder aufbricht und ihre Struktur wiederherstellt. Bei diesem Schritt wurden die Objektträger in einer Plastikküvette für 10 x 1 Minute in Citratpuffer (pH=6) in der Mikrowelle gekocht und anschließend wieder auf Raumtemperatur gebracht. Ein 5-minütiger Waschvorgang mit *phosphate buffered saline* (PBS) schloss sich an. Einige Gewebe enthalten Peroxidasen, die bei späterer Nutzung von HRP gekoppelten Antikörpern zu einer starken Hintergrundfärbung führen können. Um dies zu vermeiden, wurden diese endogenen Peroxidasen mit einem 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS Gemisch (54 ml PBS+ 6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 15 Minuten geblockt. Anschließend wurden die Objektträger 5 Minuten gewässert und 2 x 2 Minuten mit PBS gewaschen. Jedes Gewebe enthält endogene Bindungen, welche ebenso wie das nachzuweisende Protein, den Primärantikörper binden, was zu einer starken Hintergrundfärbung führen würde. Um dies zu verhindern, werden diese unspezifischen Bindungen für 20 Minuten in einer Dunkel-Feuchtkammer mit 2,5 % *normal Horse-Serum* geblockt. Nach dem Dekantieren des *normal Horse-Serums* wurde erneut mit PBS für 3 x 2 Minuten gewaschen. Der Primärantikörper wurde spezifisch in 10 % bovinem Serum Albumin (BSA) verdünnt, auf das zu färbende Präparat gegeben und dieses über Nacht in einer Dunkel-Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Objektträger erneut 4 x 5 Minuten in PBS gewaschen und nachfolgend mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet ist, für 30 Minuten inkubiert. Ein erneuter Waschgang von 4 x 5 Minuten schloss sich an. Für die eigentliche Färbung der Schnitte wurde das *VIP Substrate Kit for Peroxidase* verwendet und nach den Herstellervorgaben je nach Probenumfang in PBS gelöst. Diese Lösung wurde auf die Schnitte gegeben und laufend unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach Anfärbung gewünschter Strukturen wurde der Färbvorgang durch das Einführen der Objektträger in eine Aqua dest. gefüllte Küvette abgestoppt. Für eine bessere Abgrenzbarkeit der zuvor angefärbten Strukturen gegenüber dem umliegenden Gewebe wurde eine 1-minütige Gegenfärbung (*Counterstaining*) durchgeführt. Etabliert ist das Gegenfärben mit Hämatoxylin, welches Zellkerne blau färbt. Anschließend wurde für 1 Minute gewässert. Um die Proben zu dehydrieren, wurden diese in der aufsteigenden Reihe (5 min 96 % Ethanol, 2 x 5 min Isopropanol, 3 x 5 min Xylol) behandelt. Nachfolgend wurden die Objektträger mit Pertex und Deckglässchen eingedeckt. Mit dem Mikroskop erfolgte die histologische Beurteilung.

### **2.2.2 Isotypkontrolle**

Die Isotypkontrolle dient der Überprüfung unspezifischer Bindungen, die teilweise während der Bindung des Primärantikörpers auftreten. Diese können in der histologischen Auswertung zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Zur Kontrolle wurden von Beginn an Gewebeschnitte mitgeführt, die anstelle des Primärantikörpers mit IgG derselben Spezies und in gleicher Konzentration, inkubiert wurden. Die weitere Färbung der Schnitte war identisch mit den Primärantikörper-behandelten Schnitten. Die Isotypkontrolle fiel stets negativ aus, sodass man von einer spezifischen Bindung des Primärantikörpers ausgehen kann.

### **2.2.3 Mouse-on-mouse Block**

Ist die Spezies von Primärantikörper und Gewebeschnitt identisch (z.B. Primärantikörper und Gewebeschnitt aus Maus), käme es zu einer starken Hintergrundfärbung, da endogene Ig durch den Primärantikörper gebunden würden. Diese unspezifischen Bindungen wurden durch eine 30-minütige Inkubation mit Serum der gleichen Spezies wie der später verwendete Sekundärantikörper abgesättigt. Dies geschah zum Zeitpunkt des Blockens mit dem *normal Horse-Serum*. Das weitere Prozedere erfolgte wie oben beschrieben.

### **2.2.4 Sirius Red Färbung**

Die *Sirius Red* Färbung dient der histologischen Bestimmung des Kollagen I Gehaltes. Die gefärbten Schnitte können anschließend unter polarisiertem Licht im Mikroskop beurteilt werden. Die Gewebeschnitte wurden in der absteigenden Reihe (s. 2.2.1) rehydriert und für 5 Minuten gewässert. Anschließend wurden die Schnitte 90 Minuten in einer *Sirius Red*-Lösung inkubiert und danach 2-3 Minuten gewässert. 200 ml Aqua dest. wurden mit 1 ml *Acetic Acid* gemischt und für 2 x 2 Minuten auf Gewebeschnitte gegeben. Dehydriert wurden die Schnitte anschließend in der aufsteigenden Reihe (s. 2.2.1). Die Auswertung erfolgte mit den Programmen Adobe Photoshop und ImageJ. Hierbei wurden Bilder in polarisiertem Licht unter dem Mikroskop fotografiert und in Adobe Photoshop geladen. Durch die Bearbeitung mit Adobe Photoshop wurden helle und dunkle Areale umgekehrt. Mittels ImageJ ließen sich die Flächen der dunklen und hellen Areale zueinander ins Verhältnis setzen. Dieses Verhältnis wurde durch das Programm als relativer Zahlenwert ausgegeben.

### **2.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) dient der allgemeinen Beurteilung histologischer Schnitte. Das Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie z.B. die DNA blau an (Zellkernfärbung), das Eosin färbt azidophile Strukturen wie z.B. Zellplasmaproteine rot an. Die H&E-Färbung wird in der histologischen Diagnostik verwendet, um verschiedene Zelltypen, Bindegewebe und mögliche physiologische und pathologische Veränderungen zu visualisieren. Unter Verwendung eines pathohistologischen *Grading-Scores* wurde der Grad der Inflammation histologisch quantifiziert. Der *Grading-Score* korreliert mit den pathologischen Veränderungen des Lebergewebes und teilt die Aktivität von Lebererkrankungen in die Kategorien „keine“, „minimal“, „mild“, „moderat“ und „schwer“ ein. Hierzu werden die Kriterien *lymphozytäre Teilnekrose* und *lobuläre Inflammation und Nekrose* herangezogen. Zunächst wurden die Gewebeschnitte in der absteigenden Reihe (s. 2.2.1) rehydriert und anschließend 4 Minuten in Hämalaun inkubiert. Das Hämalaun wurde dann in einem 5-minütigen Waschschrift von den Objektträgern gewaschen. Danach wurden die Schnitte 30 s in Eosin gegeben und erneut 3-5 Minuten gewässert. Die anschließende Dehydrierung erfolgte in der absteigenden Reihe. Abschließend wurden die Schnitte mit Pertex® und Deckgläschen abgedeckt und unter dem Mikroskop untersucht.

## **2.3 Proteinbestimmungen mittels Western Blot**

Der Western Blot (WB) ist ein Verfahren zur Detektion von Proteinen mittels Antikörperbindung und anschließender Lichtemission, die auf einem Röntgenfilm detektiert wird.

### **2.3.1 Lysat-Herstellung**

Es wurden 20 mg Leberpulver jeder Probe eingewogen, in Reaktionsgefäße gegeben und auf Trockeneis gestellt. Zur Herstellung des Ladepuffers wurde 4-fach konzentrierter Laemmli-Puffer (s.u.) 1:4 mit Aqua dest. verdünnt. Auf 20 mg Leberpulver jeder Probe, wurden 400 µl Ladepuffer, also das 20-fache des Leberpulvergewichtes, gegeben. Anschließend wurden die Proben gevortext und sofort wieder auf Trockeneis gestellt. Mit dem Thermomixer wurden die Proben nun für 10 Minuten auf 99 °C erhitzt. Hierbei denaturierten die Proteine und lösten sich im Lämmli-Puffer. Nach dem Erhitzen wurden die Proben auf Eis gestellt, 2 Minuten gekühlt und anschließend bei 10.000 x g für mindestens 5 Minuten zentrifugiert. Hierbei setzte sich ein Pellet aus Lebergewebe am Boden des Reaktionsgefäßes ab, welches beim anschließenden Überführen des Überstandes in zwei neue Reaktionsgefäße, nicht mit pipettiert wurde. Nach dem Überführen wurden die Proben bei -20 °C eingefroren oder sofort verwendet.

### 2.3.2 Gelelektrophorese

Das Prinzip der *sodium dodecyl sulfate* (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) beruht auf der Eigenschaft von Proteinen sich in einem elektrischen Feld durch Gel wandernd, nach Konformation, Molekülmasse und elektrischer Ladung aufzutrennen.<sup>1</sup> Zunächst durchlaufen die Proteinlysate das Sammelgel, welches die Aufgabe hat, die Proteine zu konzentrieren. Das Durchlaufen und damit Auftrennen im daran anschließenden Trenngel wird zum einen durch die Porengröße des Gels und zum anderen durch die Veränderung des pH-Wertes, am Übergang von Sammel- zu Trenngel, beeinflusst. Kleine Moleküle durchwandern die Poren des Gels schneller und somit räumlich weiter. Der basische pH-Wert des Trenngels beeinflusst durch ein sich spezifisch einstellendes Milieu, die Laufzeit der unterschiedlich geladenen Proteine. Zwei Glasplatten wurden mit Ethanol gründlich gereinigt, um Gelreste zu entfernen. Ein Gummi wurde an den Spacer der einen Platte gelegt, um den Raum zwischen den Platten abzudichten. Die beiden Platten wurden aufeinandergelegt und mit vier Klammern am Rand fixiert. Zunächst wurde ein Trenngel gegossen, welches während der Gelelektrophorese die Proteine nach ihrer Größe auftrennt. Hierbei ist zu beachten, welche Größe das zu detektierende Protein aufweist, da man die Dichte, d.h. den Anteil des Polyacrylamid eines Gels, an die Proteingröße anpassen muss, damit die Bande des Proteins innerhalb des Gels liegt. Für das Gel wurden Rotiphorese® Gel 30, Trenngel-Puffer, Aqua dest., Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) verwendet. Das Gel wurde bis zu einer Linie ca. 2 cm von der oberen Kante der vorderen Glasplatte gemessen, zwischen die beiden Platten gegossen und mit Isopropanol aufgefüllt. Anschließend musste 30-45 Minuten gewartet werden, um die vollständige Polymerisation des Gels zu gewährleisten. Das Isopropanol glättet die Oberfläche und verhindert den Kontakt des Gels mit Sauerstoff. Dieser würde Radikale abfangen, die zur Polymerisation des Gels notwendig sind. Das Sammelgel dient der Ausbildung von Geltaschen, in welche die zu messenden Probenlysate pipettiert werden. Nach 30-minütiger Polymerisation des Trenngels wurden Gel 30, Sammelgel-Puffer, Aqua dest., APS und TEMED zusammengegeben und nach Abschütten des Isopropanols auf das Trenngel gegossen. Um die Geltaschen zu formen, wurde ein Kamm mit einer, der Probenanzahl entsprechenden Anzahl an Zinken in das Sammelgel gegeben und 30 Minuten gewartet, bis die Polymerisation vollständig abgelaufen war. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde mit 1x Page im unteren Reservoir aufgefüllt und die Glasplatten mit dem Gel zuerst von Klammern, Kamm und Gummi befreit und anschließend mit zwei Klammern an der Gelelektrophorese-Kammer befestigt. Dies wurde auf beiden Seiten der Kammer

durchgeführt, um eine symmetrische Beladung der Gelelektrophorese-Kammer und einen gleichmäßigen Stromfluss zu gewährleisten. Anschließend konnten auch das obere Reservoir mit 1 x Page aufgefüllt werden und die Taschen beladen werden. Die erste Kammer wurde dabei mit dem PageRuler (7,5 µl) beladen. Dieser wurde im Gel mitgeführt, um die Laufweiten der unterschiedlichen Molekulargewichte farblich zu markieren. Die übrigen Taschen wurden mit 15 µl Probenlysat beladen. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde bei 130 Volt und 75 mA für eine Stunde betrieben.

### 2.3.3 Blotten

Nachdem die Proteine bei der SDS-Gelelektrophorese durch das Polyacrylamidgel gewandert sind, erfolgt das eigentliche Blotten der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran). Durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen bleiben die Proteine gemäß ihrer Lage auf dem Polyacrylamidgel an der PVDF-Membran hängen und können anschließend mit weiteren Verfahren sichtbar gemacht werden. Die PVDF-Membran wurde vor dem Benutzen mit 100% Methanol für 2 Minuten aktiviert, mit Aqua dest. abgespült und 3 Minuten in Anodenpuffer 2 äquilibriert. Pro Gel wurden 2 *Gel blotting paper* in *Anode 1 Solution*, 1 *Gel blotting paper* in *Anode 2 Solution* und 3 *Gel blotting paper* in *Kathode 1 Solution* gegeben. Anschließend wurden alle Komponenten in folgender Reihenfolge auf die Fastblot B44-Blotkammer gegeben:

1. *Anode 1 Solution paper*
2. *Anode 2 Solution paper*
3. PVDF-Membran
4. Polyacrylamidgel
5. *Kathode 1 Solution paper*

Die Kammer wurde geschlossen und bei 1 mA/cm<sup>2</sup> eine Stunde betrieben

### 2.3.4 Blocken und Zugabe der Antikörper

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran für eine Stunde mit Milchpulver in *Tris-buffered saline with Tween 20* (TBS-T) geblockt. Dies sättigt freie, unspezifische Antikörperbindungen ab, um einen spezifischen Nachweis von Proteinen zu ermöglichen. Nach dem Blocken wurde der Primärantikörper in 10 ml Milchpulverlösung nach Angaben des Herstellers spezifisch verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubationszeit erfolgte über Nacht im Kühlraum auf einem Schwenker. Am nächsten Tag wurde die Membran 1 x 15 Minuten und 3 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in 10 ml Milchpulverlösung 1:3000 verdünnt und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Der Sekundärantikörper ist gegen den kristallisierbaren Antikörperanteil (*fragment crystallizable* (Fc)) des

Primärantikörpers gerichtet und bindet diesen. Er dient der späteren Detektion des Proteins mittels einer Elektrochemilumineszenz (ECL)-Entwicklerlösung, die an den Sekundärantikörper bindet und unter Fluoreszenzlicht die Banden des Proteins sichtbar macht. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde erneut 1 x 15 Minuten und 3 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen.

### **2.3.5 Entwicklung**

Für die Entwicklung wurde nach dem ECL-Protokoll die Entwicklerlösung hergestellt und die Membran für eine Minute darin inkubiert. In der Lösung enthaltenes  $H_2O_2$  oxidiert Luminol, welches Licht emittiert, das von einem Röntgenfilm detektiert wird. Anschließend wurde die Membran auf eine Folie gelegt und lichtdicht in eine Röntgenkassette gegeben. Die Entwicklung wurde im Fotolabor, einer mit Rotlicht ausgestatteten Dunkelkammer, durchgeführt. Im abgedunkelten Fotolabor wurde ein Röntgenfilm zur Belichtung auf die Membranen in der Röntgenkassette gelegt und die Kassette gemäß der empirisch ermittelten Belichtungszeit geschlossen. Nach Beendigung dieser Zeit wurde der Röntgenfilm aus der Kassette genommen und in den Einzug des Entwicklers gegeben. Es besteht auch die Möglichkeit einer Entwicklung mittels der Alkalischen Phosphatase (AP), die den Proteinnachweis direkt auf der Membran sichtbar macht. Um diese Art der Entwicklung durchzuführen, muss der Sekundärantikörper AP gekoppelt sein. Es wurden 10 ml Inkubationspuffer auf die Membran gegeben, um diese zu äquilibrieren. Anschließend wurden 10 ml Inkubationspuffer mit 66  $\mu$ l Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) + 33  $\mu$ l 5-Brom-4-chlor-indoxylphosphat (BCIP) versetzt und die Membran darin so lange inkubiert, bis die gewünschte Bande sichtbar wurde. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran zuerst in Aqua dest. gegeben und dann getrocknet. Alle Membranen und Belichtungsfolien wurden eingescannt und mit Adobe Photoshop bearbeitet.

### **2.3.6 Strippen**

Um eine Membran erneut mit einem Antikörper zu beladen kann die Membran gestrippt werden. Hierbei werden alte Antikörper von der Membran heruntergewaschen. Das Strippen erfolgte nach dem abcam® *mild stripping* Protokoll. Hierbei wurden folgende Reagenzien verwendet:

10 ml Stripping Puffer, 5-10 min., dekantieren und erneut 5-10 min.

10 min. waschen mit PBS, dekantieren und erneut 10 min. mit PBS waschen

5 min. waschen mit TBS-T, dekantieren und erneut 5 min. mit TBS-T waschen

1 Stunde blocken mit Milchpulverlösung

Primär-AK über Nacht

Alle weiteren Schritte erfolgten analog zur beschriebenen Vorgehensweise in den Abschnitten „Blocken und Zugabe der Antikörper“ sowie „Entwicklung“.

## **2.4 Triglyzeridbestimmung aus Leberproben**

### **2.4.1 Proben- und Reagenzienpräparation**

Für den Assay wurden 20 mg jeder zu messenden Leberprobe eingewogen (s. 2.1.1). Die eingewogenen Proben wurden mit 200 µl 5 % Octylphenoxypolyethoxyethanol (IGEPAL) gevortext. Die Proben wurden im Thermomixer bei 80-100°C für 2-5 Minuten erhitzt bis das IGEPAL milchig erschien. Anschließend erfolgte ein Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um alle Triglyzeride aus dem Gewebe zu lösen. Um andere lösliche Gewebebestandteile aus der Lösung zu entfernen, wurden die Proben für 2 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. In einem neuen Reaktionsgefäß wurden nun 10 µl jeder Probe mit 900 µl Aqua dest. verdünnt. Die Messung der Triglyzeride in den Leberproben wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem *Triglyceride*-Assay der Firma Abcam durchgeführt. Die Reagenzien lagen im Kit unverdünnt und gefroren vor, sodass eine Verdünnung und/oder Erwärmung der Reagenzien vor Beginn durchgeführt werden musste. *Triglyceride Assay Buffer*: Erwärmen auf Raumtemperatur, *Triglyceride Standard*: Erwärmen in einem 80-100 °C heißen Wasserbad bis die Lösung milchig erschien und anschließendes Vortexen, bis diese klar wurde. Dieser Vorgang wurde wiederholt und anschließend wurde die Lösung aliquotiert, um die nicht gebrauchten Mengen bei -20 °C einzufrieren. *Triglyceride Probe*: Erwärmen in einem 37 °C Wasserbad für 1-5 Minuten, um das darin enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) aufzutauen. Anschließendes Aliquotieren der Lösung und Einfrieren der nicht benötigten Mengen. *Triglyceride Enzyme Mix*: Der Mix wurde in 220 µl *Triglyceride Assay Buffer* gelöst, während des Assays auf Eis gelegt und ebenfalls teilweise aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Lipase: Die Lipase wurde in 220 µl *Triglyceride Assay Buffer* gelöst und analog zum *Triglyceride Enzyme Mix* weiter behandelt.

### **2.4.2 Standard-Präparation**

Für jeden Assay muss laut Herstellerangaben ein neuer Standard vorbereitet und innerhalb von 4 Stunden verwendet werden.

Zunächst wurde ein 0,2 mM *Triglyceride standard* hergestellt indem 100 µl des 1 mM Standards mit 400 µl *Assay Buffer* verdünnt wurden. Der 0,2 mM *Triglyceride standard* wurde anschließend nach folgendem Schema in eine 96-Well Platte pipettiert:

Standard #	Volumen des Triglyzerid Standard ( $\mu\text{l}$ )	Assay Buffer ( $\mu\text{l}$ )	Endvolumen ( $\mu\text{l}$ )	Endkonzentration [Triglyzeride]
1	0	150	150	0 nmol/well
2	30	120	150	2 nmol/well
3	60	90	150	4 nmol/well
4	90	60	150	6 nmol/well
5	120	30	150	8 nmol/well
6	150	0	150	10 nmol/well

**Tabelle 1: Einsatzprotokoll des Triglyceride Assays.**

### 2.4.3 Assay

Vor Durchführung des Assays wurden alle Materialien und Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht, jeder Standard, jede Kontrolle und jede Probe wurde in Doppelbestimmung auf eine 96 Well-Platte aufgetragen und gemessen.

Zunächst wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  des Standards pipettiert. Anschließend wurden 50  $\mu\text{l}$  jeder Probe aufgetragen und schlussendlich aus jeder Gruppe der Proben eine Doppelbestimmung auf die Platte gegeben, um eine Hintergrund-Kontrolle zu erhalten. Nun wurden 2  $\mu\text{l}$  der Lipase in die *Standard wells* und in die *Sample Wells* gegeben, nicht jedoch in die Hintergrund-Kontrollen. Diese wurden mit 2  $\mu\text{l}$  *Triglyceride Assay Buffer* aufgefüllt. In einer 20-minütigen Inkubationszeit spaltete die Lipase die Triglyzeride in Glycerol und Fettsäuren. In der Zwischenzeit wurde der *Triglyceride Reaction Mix* als Mastermix hergestellt. Zielvolumen pro Well waren 50  $\mu\text{l}$ :

Component	Colorimetric Reaction Mix ( $\mu\text{l}$ )/Sample
Triglyceride Assay buffer	46
Triglyceride Probe	2
Triglyceride Enzyme Mix	2

50 µl des Reaction Mix wurden auf jede Probe gegeben und vor Licht geschützt für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde im *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)-Reader bei einer *optical density* (OD) von 570 nm nach 20 und 60 Minuten gemessen und mit dem Programm Excel ausgewertet.

## 2.5 Serumanalysen mittels Reflotron®

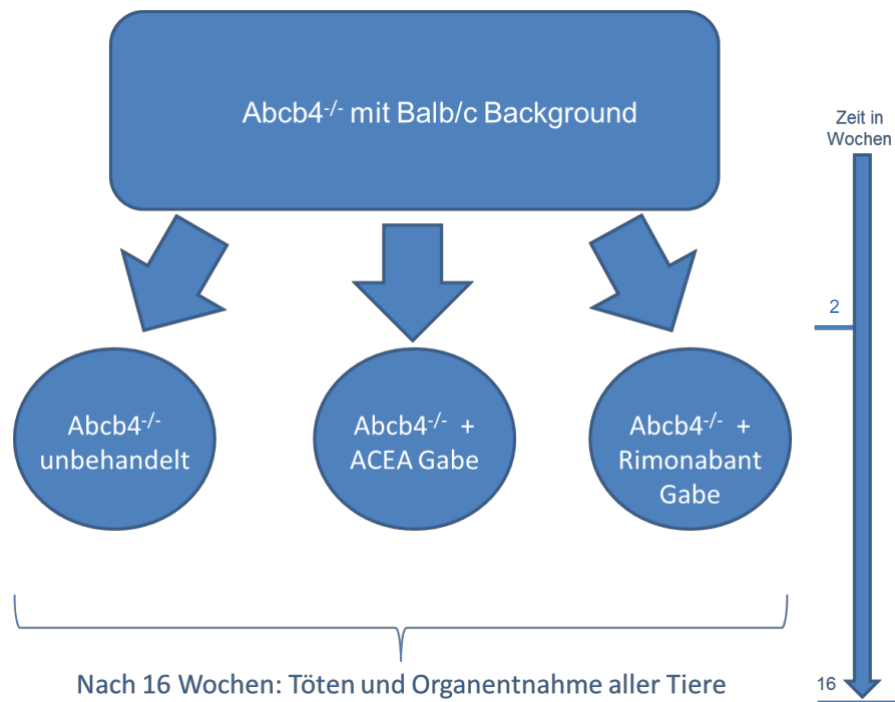
Die quantitative Bestimmung serologischer Parameter wie der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der AP erfolgte bereits im Vorfeld dieser Arbeit im Rahmen eines anderen Projektes. Hier wird darauf hingewiesen, dass die Werte der Messungen der ALT, der AP sowie der Triglyzeride für die Kontrollgruppe der 16 Wochen (w) alten, männlichen, gesunden BALB/c-Wildtypen aus einer vergleichbaren Aufzucht des Labors für experimentelle Gastroenterologie, AG Roeb, stammen. Die Werte der Serumlevel von Glukose und Triglyzeriden für die Gruppe der gesunden BALB/c-Wildtypen wurden der Literatur entnommen. Für die Serumglukose ergaben sich dabei Werte von  $80,75 \pm 20,25$  (69,53-91,96) mg/dL.<sup>119,120</sup> Die Konzentration der Triglyzeride im Serum lag, entsprechend der Literatur, im Mittel bei  $224 (+178/- 133)$  mg/dL.<sup>121</sup>

## 2.6 Mauslinien und Behandlung

Die gezüchteten Mäuse entstammen der Mauslinie des *Abcb4<sup>-/-</sup>-Knockouts* (auch MDR2), welche auf einen für Fibrose-suszeptiblen BALB/c-Stamm zurückgekreuzt wurden. Die BALB/c Mäuse entstammen dem Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA. In diesem Projektaufbau wurde die Grundgesamtheit der männlichen *Abcb4<sup>-/-</sup>* Mäuse in drei Gruppen aufgeteilt. Der Antrag des Versuchsvorhabens wurde am 13.07.2011 mit dem Geschäftszeichen V54-19c2015(1) GI20/10 Nr. 52/2011 genehmigt. Dem Antrag auf Anpassung der Medikamentendosierung wurde mit dem gleichen Geschäftszeichen am 16.03.2012 stattgegeben. Eine Gruppe (n=4) blieb unbehandelt und erhielt eine normale Diät. Die zweite Gruppe (n=4) wurde nach dem Absetzen vom Muttertier in der zweiten Lebenswoche mit Nahrung mit einem Zusatz von 1 mg/kg KG/Tag ACEA gefüttert. Eine dritte Gruppe (n=5) wurde mit 1 mg/kg KG/Tag Rimonabant versetztem Futter ernährt. Das Futter wurde von der Firma Fa. Sniff Spezialdiäten GmbH, D-59494 Soest bezogen. Folgendes Mischverhältnis wurde angewandt: 20 kg Prüfsubstanzfutter + 133 mg Rimonabant. 20 kg Prüfsubstanzfutter +125 mg ACEA.

Die Tiere wurden im Stall des Schwerpunkts Gastroenterologie (AG Roeb), der Justus-Liebig-Universität gehalten und nach 16 Wochen getötet. Die entnommenen Lebern und

Blutseren wurden bei -80 °C gelagert. In dieser Arbeit wurde mit den Lebern und den Seren der 16 w alten Mäuse gearbeitet. Für die interne Kontrolle wurden den *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen ebenfalls 16 w alte Wildtyp Mäuse (WT) gegenübergestellt und in jedem Experiment mitgemessen.



**Abb. 11: Projektaufbau und Behandlung der Mäuse.**

Eine Grundgesamtheit *Abcb4*-Knockout Mäuse mit BALB/c Hintergrund, wurde in drei Gruppen aufgeteilt und entweder unbehandelt belassen oder ab der zweiten Lebenswoche mit dem Medikament ACEA oder Rimonabant gefüttert. Nach 16 Wochen wurden die Mäuse getötet und die Leber und das Serum entnommen. (Abb. N. Helmrich)

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Microsoft Excel Version 2013 aufgearbeitet und mit IBM SPSS Statistics Version 22.0 ausgewertet. Hierbei wurde der Kruskal-Wallis-Test (auch H-Test)<sup>122</sup> für unabhängige Stichproben angewandt. Dieser vergleicht mehrere nicht-normalverteilte Stichproben auf Gleichheit der Mediane. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung (SD) dargestellt. Es wurden p-Werte unter 0.05 als statistisch signifikant angenommen. Hiermit wird die Irrtumswahrscheinlichkeit unter Anwendung eines Hypothesentests ermittelt. Die Nullhypothese ( $H_0$ , Fehler 1. Art), nimmt an, dass zwischen zwei zu vergleichenden Daten, Gruppen etc. kein signifikanter Unterschied, kein Zusammenhang besteht. Die Alternativhypothese ( $H_1$ ) geht von einem bestehenden Unterschied/Zusammenhang aus.

Es wurden jeweils die statistischen Kennwerte und der entsprechende p-Wert angegeben.

Folgende Darstellung der jeweiligen statistisch signifikanten unkorrigierten p-Werte wurde in dieser Arbeit verwendet:

p= 0.05: \*

p= 0.01: \*\*

p= 0.001: \*\*\*

Die statistische Auswertung wurde ab einer Gruppengröße n=3 durchgeführt.

Die Ergebnisse der qRT-PCR Analysen sind als Fold Change dargestellt (x-fache Änderung). Dieser gibt Auskunft über die quantitative Genexpression eines Gens in einer Gruppe verglichen mit einer Vergleichsgruppe.

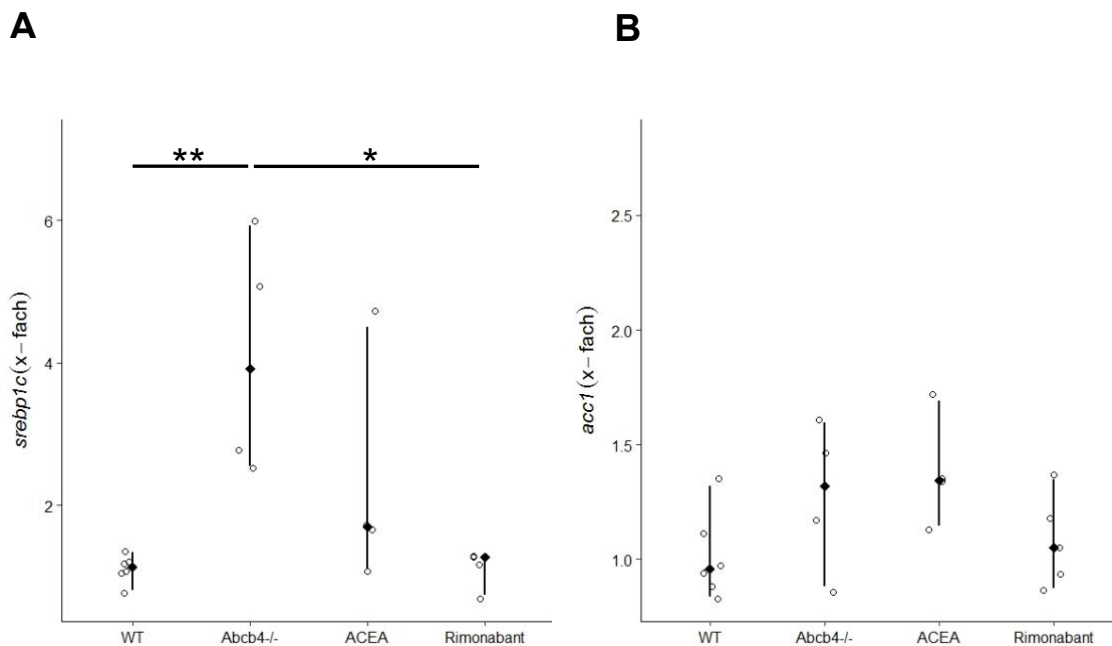
Die graphische Darstellung der statistisch ausgewerteten Ergebnisse erfolgte mit R, *RStudio, Inc*, IBM SPSS Statistics Version 22.0 sowie Microsoft Excel Version 2013.

Die Bearbeitung der histologischen Bilder und der Grafiken erfolgte mit Microsoft PowerPoint Version 2013. Zur genaueren Darstellung erfolgte bei ausgewählten Bildern eine Kontrastanpassung, ohne die Ergebnisse zu verändern. In seltenen Fällen konnte die korrekte Darstellung des *Knockout* (<sup>-/-</sup>) aus technischen Gründen nicht erfolgen. Hier wurde dieser mit -/- kenntlich gemacht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Pharmakologische Hemmung des CB1-Rezeptors in Rimonabant-behandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die inhibitorische Funktion von Rimonabant auf den CB1-Rezeptor in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuseleber wurde durch die Analyse der Genexpression des durch CB1 regulierten *srebp1c* und der Acetyl-CoA-Carboxylase-1 (*acc1*) in den Gruppen Wildtyp, *Abcb4*<sup>-/-</sup>, ACEA und Rimonabant überprüft.



#### Abb. 12: Überprüfung des CB1-Rezeptor-Signalweges

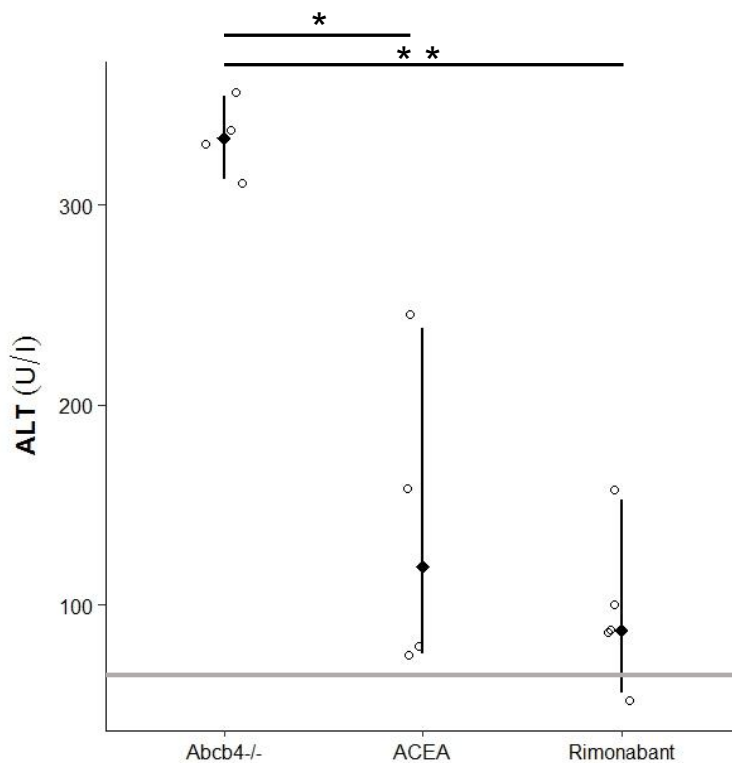
Transkriptionelle Genregulation von A: *srebp1c*. Die *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe zeigte sich signifikant gegenüber dem WT ( $p=0.003$ ) und gegenüber der Rimonabant-Gruppe ( $p=0.011$ ) reguliert. Die ACEA-Gruppe zeigte keine Unterschiede zur *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe ( $p=0.209$ ). B: Genregulation von *acc1* in 16 w alten Mäusen. Hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Expression von *Srebp1c* war in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe am stärksten ausgeprägt. Diese war gegenüber dem WT ( $p=0.003$ ) und Rimonabant-Gruppe ( $p=0.011$ ) signifikant erhöht. Die Transkription von *Srebp1c* wurde durch die Rimonabant-Behandlung auf WT-Niveau reduziert. Die ACEA-Behandlung führte zu keinen signifikanten Ergebnissen im Vergleich zu den weiteren Gruppen ( $p=0.209$ ). Hinsichtlich der Expression von *acc1* ergaben sich zwischen den verschiedenen Gruppen keine signifikanten Unterschiede

## 3.2 Verbesserung der Leberintegrität durch Antagonisierung des CB1-Rezeptors

### 3.2.1 Verringerung der Leberzellschädigung durch ACEA und Rimonabant

Die ALT bzw. ALAT, GPT ist ein sensibler Parameter zur Erfassung der Leberschädigung. Bei hepatozellulärer Schädigung im Rahmen von Lebererkrankungen wie z.B. der sklerosierenden Cholangitis steigt der ALT-Serumwert an. Die pathologischen Serum ALT-Level in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus wurden sowohl durch die Behandlung mit Rimonabant als auch mit ACEA im Mittel auf ein Drittel der Konzentrationen der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe gesenkt. Durch die Behandlungen konnte der ALT-Wert ca. auf den doppelten Normwert reduziert werden. Zwischen den Gruppen der Rimonabant- und ACEA-Behandlung zeigten sich keine Unterschiede im Serum-ALT Level.



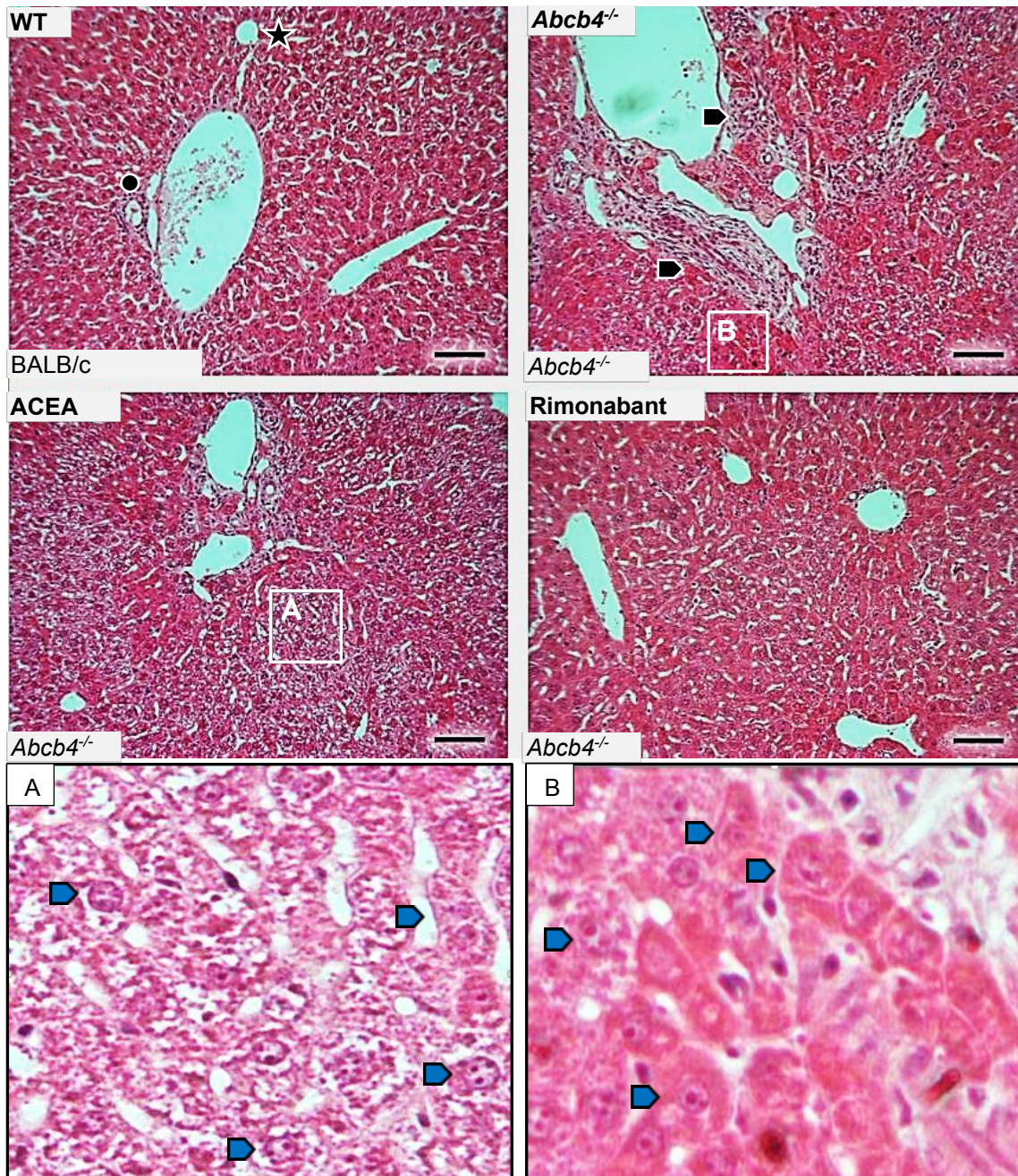
**Abb. 13: Reduktion der ALT im Serum bei ACEA- und Rimonabant-Behandlung**

Die Behandlung mit ACEA ( $p=0.026$ ) und Rimonabant ( $p=0.009$ ) verringerte die ALT-Serumlevel im Vergleich zu den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Werte der BALB/c Wildtyp-Gruppe (graue Linie) ergaben einen Mittelwert von 44,29 U/l, Standardabweichung  $\pm 4,28$ .

### 3.2.2 Erhaltung der Leberarchitektur sowie Verbesserung des Gradings in der Rimonabant-Gruppe

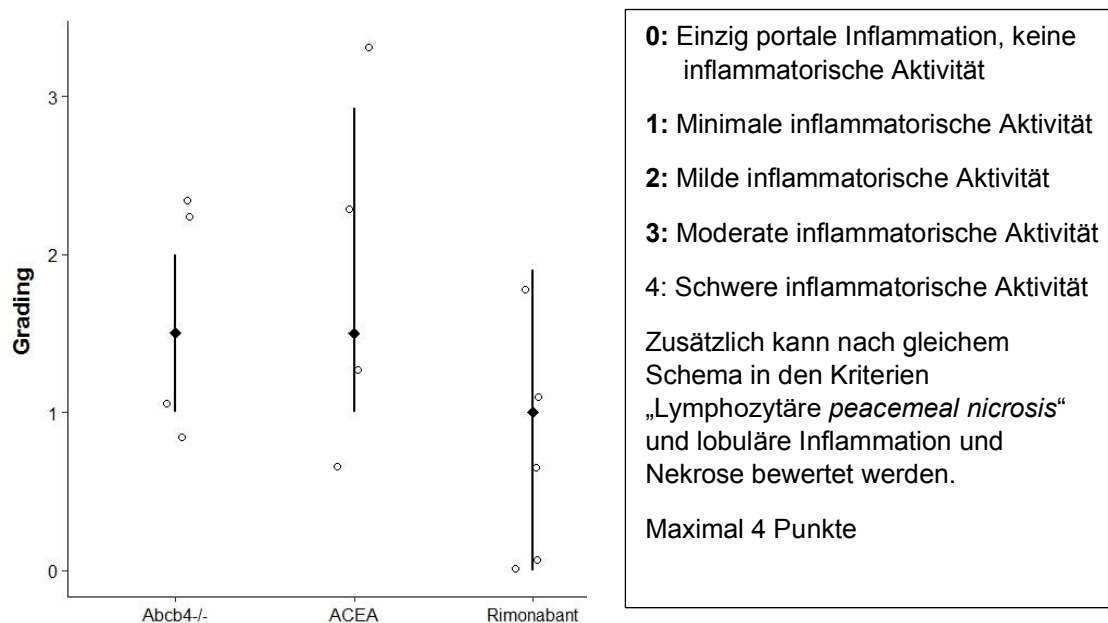
Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E Färbung) stellt eine Übersichtsfärbung über das Lebergewebe dar. Zellkerne werden durch das Hämatoxylin blau, das Zytosol der Zellen durch das Eosin rot gefärbt.

Mit fortschreitender Cholestase wird ein vermehrter bindegewebiger Umbau des Lebergewebes (schwarze Pfeile) der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse beobachtet. Dieser zeigt sich am stärksten im Bereich der periportalen Felder. Die Leberstruktur und der Anteil an Bindegewebe in den mit Rimonabant behandelten Mäusen ist vergleichbar mit dem der Wildtyp-Mäuse, also deutlich reduziert im Vergleich zur *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Die cholestatischen Veränderungen in den Portalfeldern der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde ebenfalls durch die ACEA Behandlung verringert. Darüber hinaus wurde in der ACEA-Gruppe die Architektur des Leberparenchyms (blaue Pfeile) sowie die Morphologie der Hepatozyten modifiziert. Die Hepatozyten erscheinen vergrößert und zeigen Merkmale des sogenannten *Large liver cell change* (LLCC). Hier kommt es neben der Vergrößerung der Zelle zu einem nukleärer Pleomorphismus mit Hyperchromasie sowie mehreren Nukleoli.



**Abb. 14: H&E Färbung zur histologischen Untersuchung der Leber 16 Wochen alter Mäuse** 200x Vergrößerung, Balken entspricht 100 µm. Repräsentative Schnitte sind dargestellt. Oben links: Leberschnitt einer WT-Maus. Oben rechts: Schnitt der Leber einer unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus. Die schwarzen Pfeile markieren entzündlich, fibrotisch verändertes Gewebe mit Infiltrationen von Lymphozyten. Der Leberschnitt unten links: Ausschnitt aus der ACEA behandelten Mäuseleber mit Vergrößerung (A). Die blauen Pfeile markieren vergrößerte Hepatozyten mit Large liver cell change (LLCC), deren Nuclei hyperchrom, pleomorphisch sind und mehrere Nucleoli aufzeigen. Daneben ein vergrößerter Ausschnitt (B) des Gewebeschnittes aus der *Abcb4*<sup>-/-</sup> Gruppe, ebenso mit typischer LLCC mit vergrößerten Hepatozyten und vermehrten Nucleoli. Ein histologischer Schnitt einer Leber aus der Rimonabant-Gruppe stellt sich unten rechts dar. Diese imponiert vergleichbar mit dem WT-Schnitt. Das Sternchen markiert eine Zentralvene, der Punkt die Glisson-Trias mit Gallengang, Arteria interlobularis und Vena interlobularis.

Im Grading zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Entzündungsgrades durch die Rimonabant-Behandlung (<1) im Vergleich zu den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>- Mäusen (1,5). Der Score für die *Abcb4*<sup>-/-</sup>- und ACEA-Gruppe (1,75) war nahezu identisch mit dem der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse.

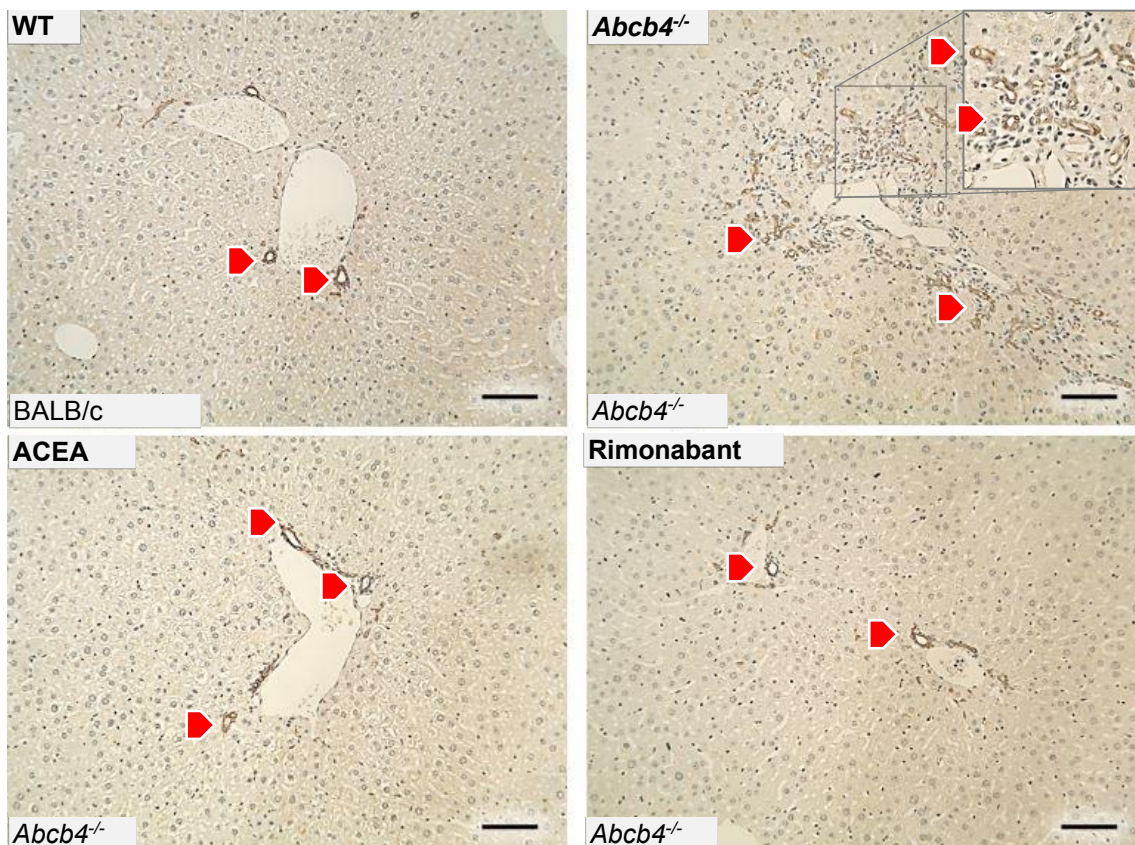


**Abb. 15: Grading der Leberinflammation**

Linke Seite: Im Grading der Leberinflammation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Rimonabant-Gruppe (Score <1) im Vergleich zu den *Abcb4*<sup>-/-</sup>- (Score: 1,5) und ACEA-Mäusen (Score: 1,75). Für den WT kann ein Grading-Wert von 0 angenommen werden. Rechte Seite: Kategorien zur Einschätzung des Gradings, modifiziert nach <sup>123</sup>

**3.2.3 Rimonabant verringert die Schädigung der Gallengänge**

Im Rahmen der Leberfibrose kommt es zur Proliferation von Bindegewebe um die Portalfelder und zur Entstehung fibrotischer Septen, die das Lebergewebe durchziehen. Zudem ist eine Gallengangsproliferation und -destruktion sowie die Infiltration von Leukozyten in das Lebergewebe zu beobachten. Mit Hilfe der CK19 immunhistochemischen Anfärbung der Gallengangsepithelien können pathologische Veränderungen der Gallengänge wie z.B. vermehrte Proliferation visualisiert werden.

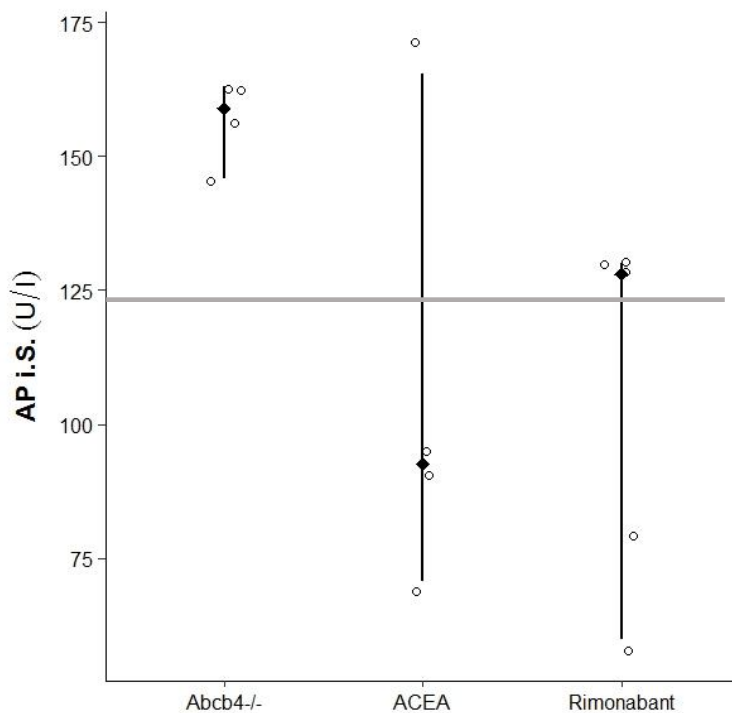


**Abb. 16: Die immunhistologische Färbung von CK19 zeigt eine verringerte Proliferation der Gallengänge in der Rimonabant-Gruppe**

200x Vergrößerung, Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Es zeigt sich in der visuellen Bildanalyse eine verminderte Proliferation der Gallengänge (rote Pfeilspitzen) in den Schnitten der Rimonabant behandelten Mäuse (unten rechts, dem WT (oben links), sowie der ACEA-Gruppe (unten links). Die *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe (oben rechts) wies eine vermehrte Proliferation und Veränderung der Gallengangarchitektur auf.

In der visuellen Bildanalyse zeigte sich die *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich zum WT die stärkste Gallengangsproliferation. Die Rimonabant-Behandlung bewirkte eine im Vergleich zur unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe herabgesetzte Gallengangsproliferation. Bei ACEA-Behandlung zeigte sich ebenso eine verringerte Gallengangsproliferation. Diese Verringerung war weniger ausgeprägt als in der Rimonabant-Gruppe.

Wie zuvor in der CK19 Färbung zu sehen war, unterliegen die Gallengänge in der Leber pathologischer Veränderungen während cholestatischer Erkrankungen. Zur quantitativen Bestimmung biliärer Pathologie kann die Messung der alkalischen Phosphatase herangezogen werden. Während cholestatischer Erkrankungen ist die AP erhöht und zeigt die Schädigung des Gallengangsepithels an. Die beiden behandelten Gruppen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede der AP im Serum in Bezug zu der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Kontrollgruppe.



**Abb. 17: Serum-Konzentration der Alkalischen Phosphatase**

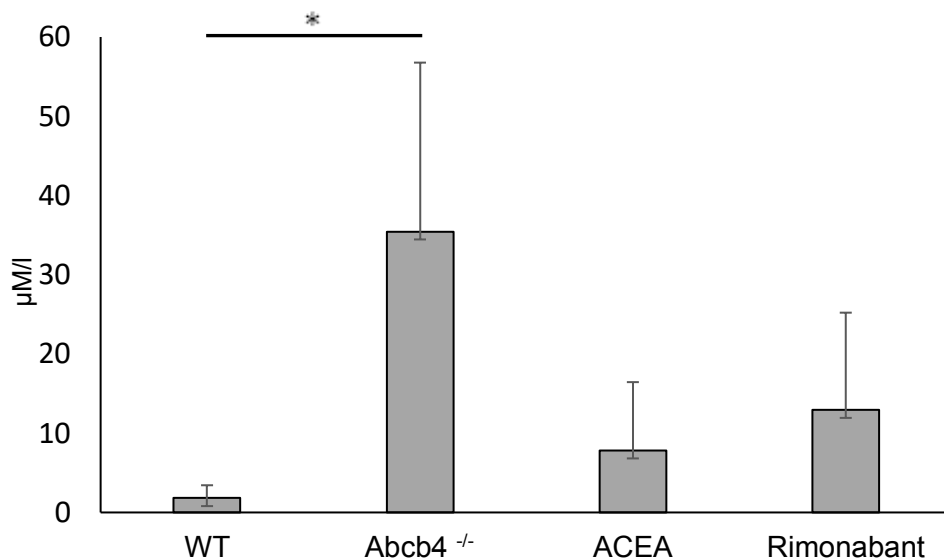
AP im Serum (U/l) in der Rimonabant- und ACEA-Gruppe im Vergleich zu den *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der AP i.S. Die Werte der BALB/c Wildtyp-Gruppe (graue Linie) ergaben einen Mittelwert von 123,4 U/l, Standardabweichung +/- 18,39.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Rimonabant-Behandlung zu einer Verringerung der Gallengangsproliferation und Serum-AP im Vergleich zu den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen führte.

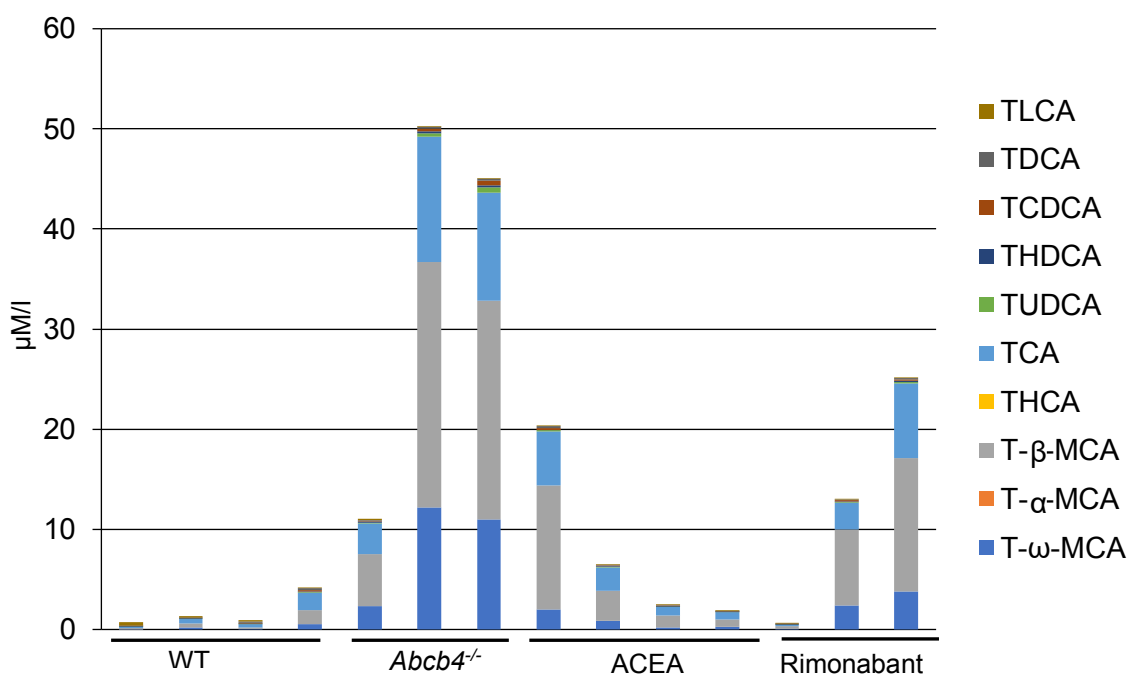
### 3.2.4 Verringerung der Gallensäurekonzentration im Serum der ACEA- und Rimonabant-Gruppe

Die Messung der Gallensäuren im Serum wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayatepek und Dr. Herebian, Klinik für Pädiatrie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Die Analyse der Gallensäuren im Serum 16 Wochen alter Mäuse bietet eine weitere Möglichkeit, den Grad der Cholestase quantitativ zu erfassen. Die Cholestase, insbesondere durch den *Abcb4*<sup>-/-</sup>, führt zu einem Verlust der Barrierefunktion der Gallengänge durch Veränderungen der *tight junctions*. Dadurch kann Gallenflüssigkeit in das Leberparenchym und das Blut übertreten. Durch ihre Zytotoxizität schädigen Gallensäuren die Hepatozyten. In dieser Analyse wurden einzelne Gallensäuren differenziert ermittelt und ihre Konzentration bestimmt.



**Abb. 18: Bestimmung der Serum-Gallensäuren bei Rimonabant- und ACEA-Behandlung**  
 Serum-Gallensäuren in μM/l. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der *Abcb4<sup>-/-</sup>* Gruppe, der Rimonabant- und der ACEA behandelten Gruppe. Der WT zeigte die niedrigsten Werte auf und zeigte gegenüber der *Abcb4<sup>-/-</sup>* signifikant niedrigere Werte ( $p = 0.034$ ).



**Abb. 19: Differenzierte Bestimmung der Gallensäuren im Serum der 16 Wochen alten ACEA und Rimonabant behandelte Mäuse. Prädominanz Taurin-konjugierten Gallensäuren**

Die Bestimmung der absoluten Konzentration der 10 häufigsten Gallensäuren im Serum (μM/l). Signifikante Unterschiede zwischen den vier Gruppen wurden nicht erreicht. Auffallend ist die Prädominanz der T-β-MCA, T-ω-MCA und TCA in der Differenzierung der Gallensäuren.

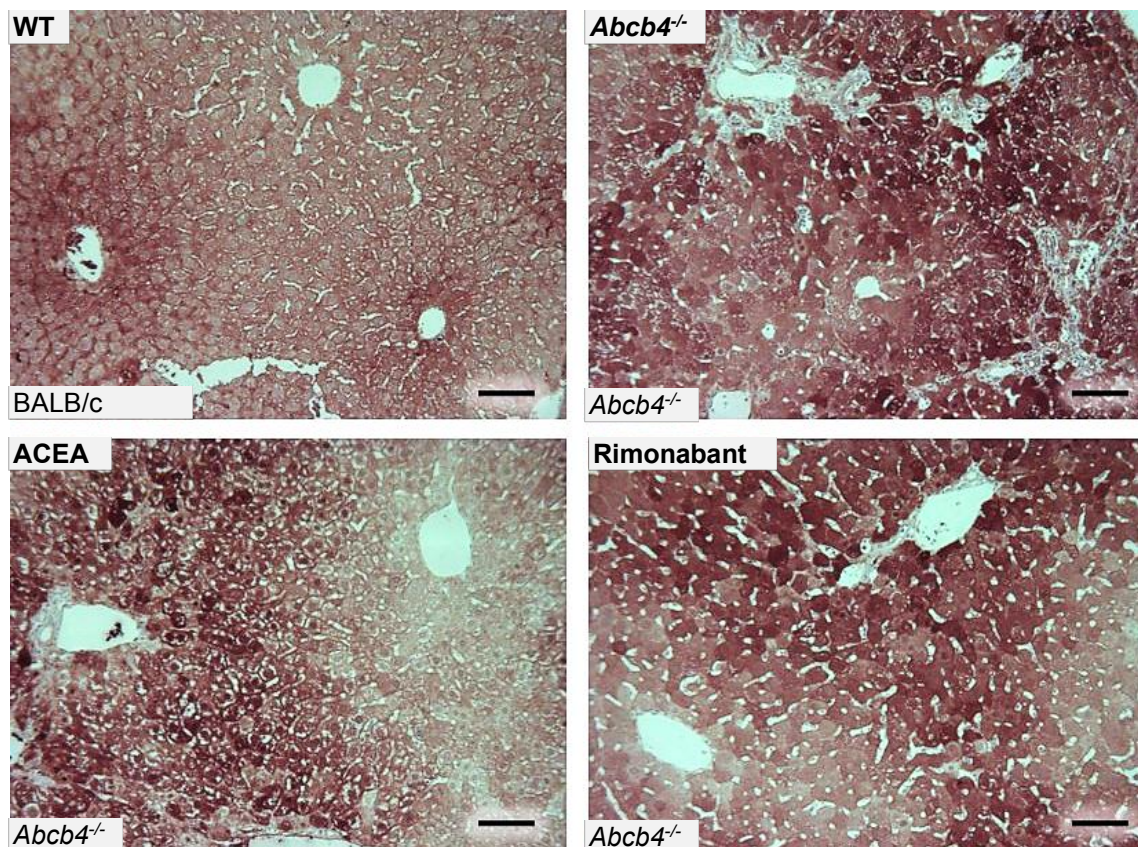
Legende: TLCA = Taurolithocholic acid, TDCA = Taurodeoxycholic acid, TCDCA = Taurochenodeoxycholic acid, THDCA = Taurohyodeoxycholic acid, TUDCA = Tauroursodeoxycholic acid, TCA = Taurocholic acid, THCA = 3α,7α,12α-trihydroxycholestanic acid, T-β-MCA = Tauro-β-muricholic acid, T-α-MCA = Tauro-α-muricholic acid, T-ω-MCA = Tauro-ω-muricholic acid.

Die im Rahmen der cholestatischen Erkrankung in das Serum übergetretenen Gallensäuren zeigten eine deutliche Dominanz der Taurin-konjugierten Gallensäuren T- $\omega$ -MCA und T- $\beta$ -MCA im Serum der Abcb4<sup>-/-</sup>-Mäuse. Bei Mäusen ist das Überwiegen der Taurinkonjugate typisch.

### 3.3 Metabolismus der Leber

#### 3.3.1 Erhalt der Zonierung in ACEA- und Rimonabant behandelten Mäusen

Die Leber ist ein wichtiger Ort der Glukose-Homöostase. Die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PECK) katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat, welcher der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Glukoneogenese ist. Die Glukoneogenese findet in der gesunden Leber hauptsächlich in periportalen Hepatozyten statt, weshalb auch hier eine höhere Expression der PEPCK zu finden ist. In der PEPCK immunhistochemischen Färbung von Leberschnitten kann diese Zonierung des Glukosemetabolismus in gesunden Lebern deutlich visualisiert werden. Darüber kann mit Hilfe der PEPCK-Färbung eine pathologische Störung der metabolischen Zonierung analysiert werden.



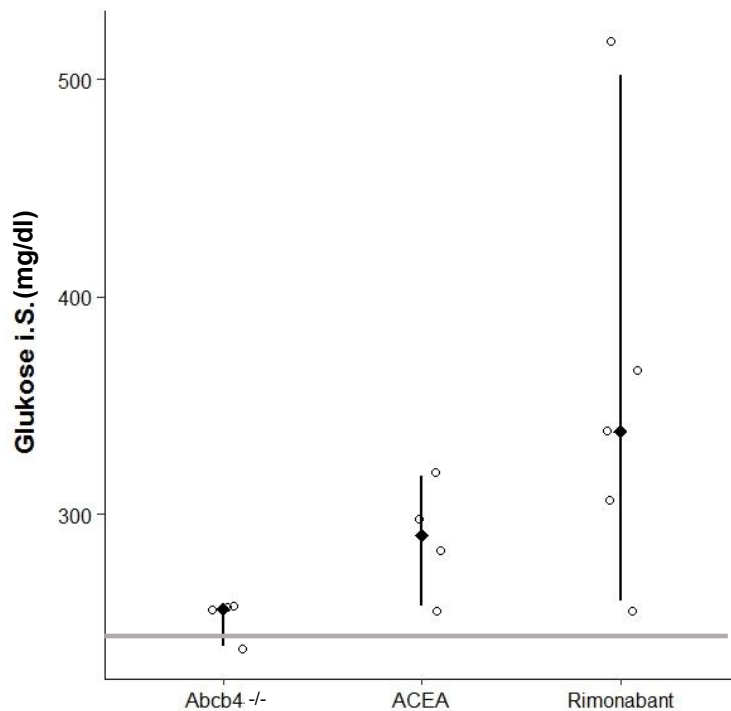
**Abb. 20: Erhalt der Zonierung in der PEPCK IHC-Färbung in der ACEA- und Rimonabant-Gruppe**

200x Vergrößerung, Balken entspricht 100 µm. Färbung mit PEPCK. Oben links WT mit BALB/c Hintergrund, oben rechts unbehandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Maus, unten links ACEA behandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Maus, unten rechts mit Rimonabant behandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Maus.

Es konnte gezeigt werden, dass das Lebergewebe der unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Mäuse eine aufgehobene Struktur und Zonierung aufzeigte. Das Lebergewebe imponiert diffus verändert. Durch die Rimonabant-Behandlung Mäusen konnte eine klare Zonierung

aufrechterhalten werden. Diese imponierte ähnlich der WT-Kontrollgruppe. Bei ACEA-Behandlung zeigte sich eine leichte Verbesserung der Leberstruktur.

Um die Syntheseaktivität der Leber weiter zu analysieren, wurde zudem die Glukosemenge im Serum gemessen.

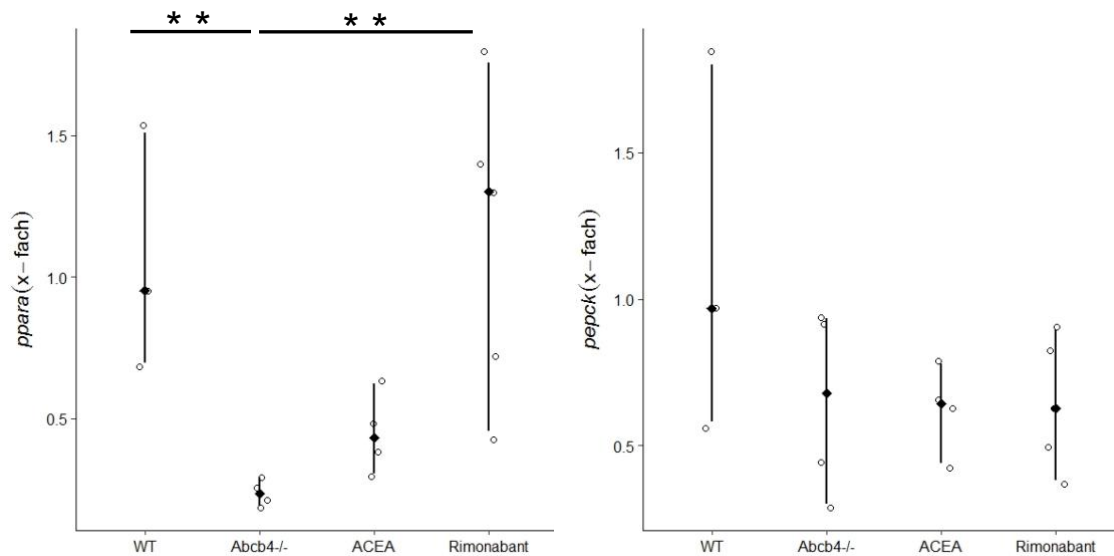


**Abb. 21: Glukose im Serum 16 Wochen alter männlicher Mäuse**

Glukosewerte im Serum (mg/dl) in den Gruppen un behandelter *Abcb4<sup>-/-</sup>*, ACEA-Behandlung bei *Abcb4<sup>-/-</sup>* und Rimonabant-Behandlung bei *Abcb4<sup>-/-</sup>*. Die Glukosewerte der Wildtypen (graue Linie) ergaben  $80,75 \pm 20,25$  (69,53-91,96) mg/dl und wurden aus Messungen von BALB/c WT-Mäusen der Literatur entnommen.<sup>119,120</sup>

Es zeigten sich höhere Glukosewerte im Serum (mg/dl) in den ACEA und Rimonabant behandelten Mäusen im Vergleich zu der *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Gruppe. Alle gemessenen Werte sind mit den Referenzwerten für Serum Glukoselevel von BALB/c Wildtypmäusen vereinbar.

Für den Glukosemetabolismus wichtige Regulatoren, wie der Peroxysome-Proliferator-aktivierte Rezeptoren alpha (PPAR $\alpha$ ) und die PEPCK, wurden in ihrer Genexpression in der qRT-PCR auf mRNA Ebene untersucht. PPAR $\alpha$  ist an der Regulation des Fettsäureabbaus und der Glukosehomöostase beteiligt.



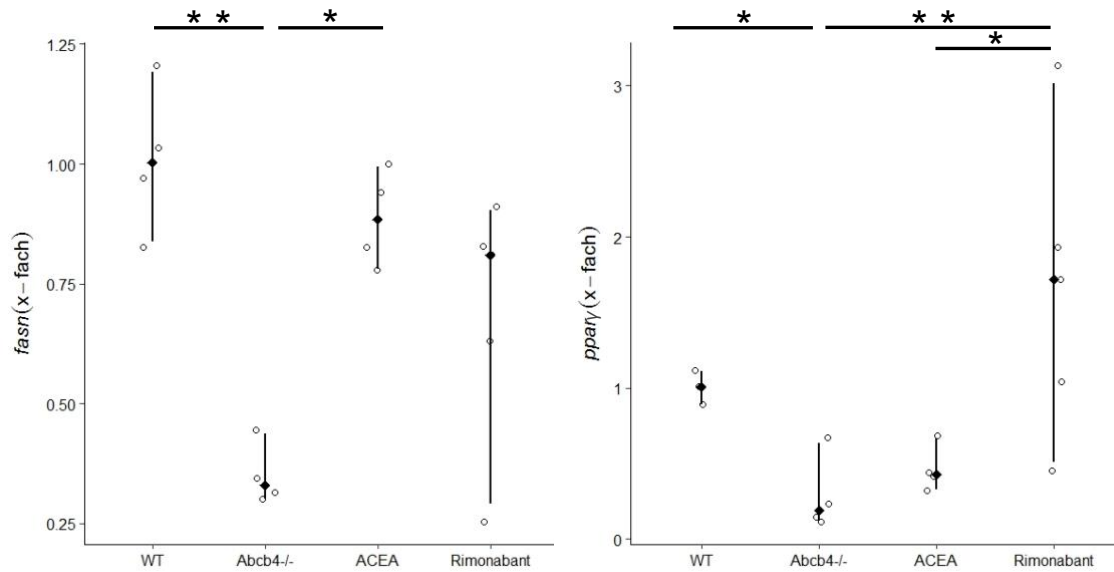
### Abb. 22: Rimonabant-Behandlung normalisiert *ppara* Genexpression

x-fache Regulation. Die Messung der Genexpression von *ppara* zeigte eine Herabregulation in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich zum WT ( $p=0.007$ ). Die Rimonabant-Behandlung normalisierte die *ppara* Genexpression im Vergleich zu den *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=0.002$ ). Die ACEA-Gruppe zeigte keinen Effekt auf den *Abcb4*<sup>-/-</sup>. In der Expression von *pepck* konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Zusammenfassend wurde die Zonierung der PEPCK sowie die Genexpression von PPAR $\alpha$  durch die Rimonabant-Behandlung normalisiert. Die Serum Glukosespiegel waren von diesen Veränderungen weitgehend unbeeinflusst.

### 3.3.2 Rimonabant normalisiert cholestatische Veränderungen des Fettsäurestoffwechsels

Glukose- und Fettmetabolismus sind über verschiedene Abbau- und Synthesewege in der Leber miteinander verbunden. Hier werden die aus der Nahrung aufgenommenen Lipide verwertet oder weiter transportfähig gemacht. Somit wird der Körper mit Fetten versorgt und neue Lipide wie z.B. Fettsäuren oder Triglyzeride werden synthetisiert. Untersucht wurde die Expression der Gene für die Fatty Acid Synthetase (FASN) und des Transkriptionsfaktor Peroxysome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). Beide haben eine regulatorische Funktion im Fettsäureabbau und der Fettsäuresynthese.



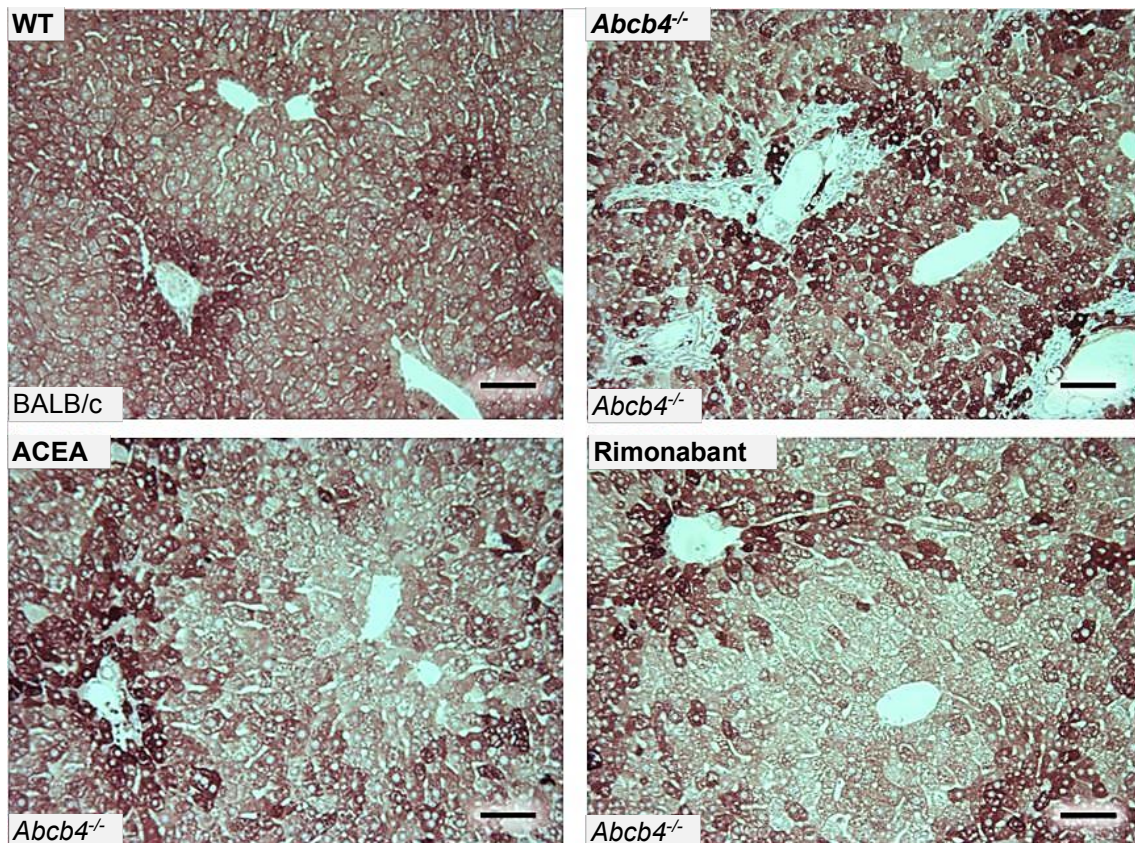
**Abb. 23: Rimonabant normalisiert die Expression von *fasn* und *pparγ* auf WT-Niveau**

qRT-PCR der x-fachen Regulation von *fasn* und *pparγ*. Es zeigte sich eine starke Herabregulation des *fasn*-Gens in den *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen ( $p=0.003$ ) und den ACEA behandelten Mäusen ( $p=0.03$ ). Die Rimonabant behandelten Mäusen zeigten hier in der Analyse keine signifikanten Unterschiede verglichen mit den anderen Gruppen.

Die Genregulation bei *pparγ* zeigte sich in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich zum WT herabreguliert ( $p=0.031$ ). Durch die Rimonabant-Behandlung kam es im Vergleich zu den *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=0.004$ ) und zu den ACEA behandelten Mäusen ( $p=0.033$ ) zu einer Expressionserhöhung. Die ACEA-Gruppe präsentierte sich annähernd auf dem Niveau der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe.

Die Genexpression von *fasn* zeigte sich durch die cholestatische Erkrankung in den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen herabreguliert. Die Rimonabant-Behandlung zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die ACEA-Behandlung normalisierten die Genexpression von *fasn* auf WT-Niveau. Die Genexpression von *pparγ* zeigte sich in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich zum WT herabreguliert. Die Rimonabant-Behandlung führte zu einer Hochregulation verglichen mit der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe als auch mit der ACEA-Gruppe.

Für die Analyse der Verteilung der FASN-Proteinexpression wurde eine immunhistochemische Färbung für FASN durchgeführt.

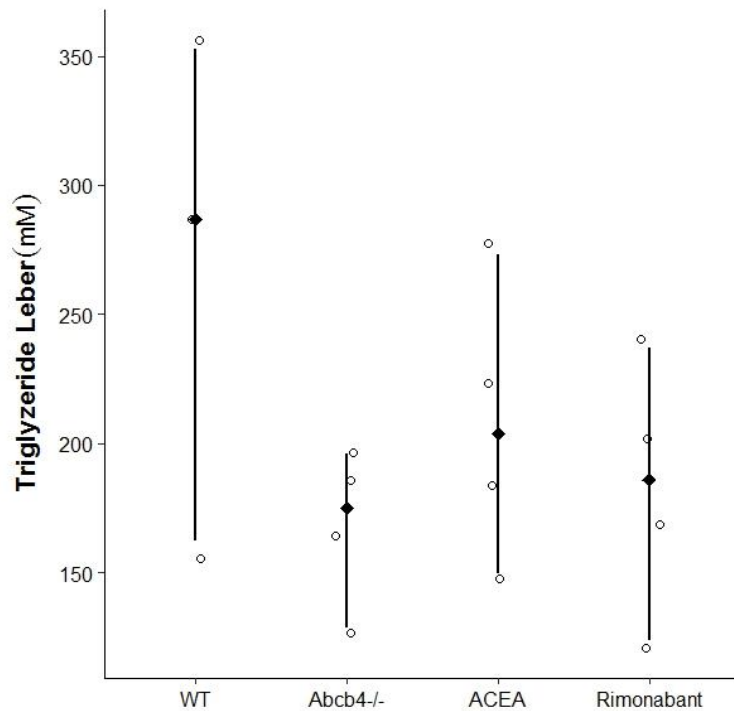


**Abb. 24: Erhalt der Zonierung in der FASN IHC-Färbung in den ACEA und Rimonabant behandelten Mäusen**

200x Vergrößerung, Balken entspricht 100 µm. Färbung mit FASN. Oben links WT mit BALB/c Hintergrund, oben rechts unbehandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus, unten links ACEA behandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus, unten rechts mit Rimonabant behandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus.

Zusammenfassend zeigte sich eine pathologische Struktur der Leber in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe mit aufgelöster Zonierung und Läppchenstruktur. Analog zum Leberschnitt des WT zeigte die Rimonabant behandelte Gruppe mit *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Hintergrund eine klare Zonierung der Leber. Die ACEA behandelte Gruppe mit *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Hintergrund zeigt ebenso eine strukturierte Zonierung.

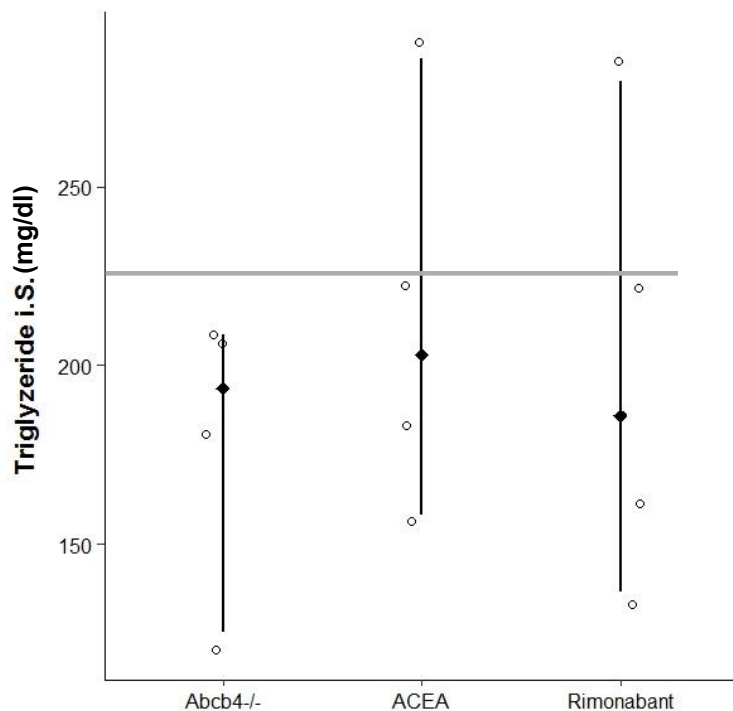
Des Weiteren wurden die Triglyzeridkonzentration (mM) in der Leber und im Serum (U/l) gemessen. Im Rahmen von chronischen Lebererkrankungen kann es zur Einlagerung von Cholesterin und Triglyzeriden in die Leber kommen und die Triglyzeridwerte im Serum erhöht sein.



**Abb. 25: Triglyzeridwerte im Lebergewebe 16 Wochen alter Tiere**

Die Messung des Triglyceride Assays zeigten im Mittel erniedrigte Werte (in mM) in der *Abcb4<sup>-/-</sup>*- und Rimonabant-Gruppe. Die WT-Gruppe zeigte die höchsten Werte, darauffolgend in absteigender Reihenfolge die ACEA-, unbehandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-, Rimonabant-Gruppe.

Die Triglyzeridwerte im Serum wurden ergänzend gemessen, um die Synthesefunktion der Leber und auch potentielle metabolische Störungen mit zu hohen oder zu niedrigen Triglyzeridwerten zu erfassen.



**Abb. 26: Keine Unterschiede in der Messung der Triglyzeride i.S.**

Es zeigten sich nur leicht erniedrigte Werte der *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Mäuse in der Messung der Triglyzeride i. S. (mg/dl) im Vergleich aller Gruppen. Die Werte der Wildtypen (graue Linie) lagen bei Mean=224 (+178/- 133).<sup>121</sup>

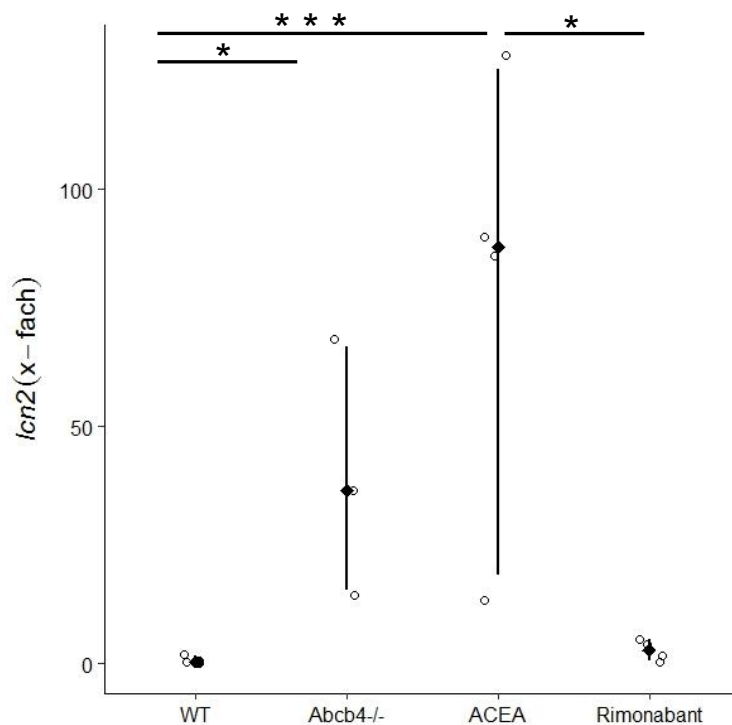
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des Fettsäure- und Triglyzeridmetabolismus sehr heterogene Ergebnisse auf. Eine gesunde Leberstruktur und Enzymwerte auf WT-Niveau waren in den beiden behandelten Gruppen vorzufinden. Die Lebertriglyzeridwerte in den behandelten Gruppen liegen im Mittel unter den WT Werten, auf Niveau der *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Kontrollgruppe. Die Triglyzeridwerte im Serum zeigten keine Unterschiede.

### 3.4 Inflammation und Akute-Phase-Reaktion

#### 3.4.1 Rimonabant-Behandlung reduziert die Inflammation

Im Rahmen der sklerosierenden Cholangitis und Leberfibrose kommt es zur akuten Inflammation im Leberparenchym. Immunzellen wie z.B. Granulozyten und Leukozyten wandern in das Gewebe ein und aktivieren Lebermakrophagen, hepatische Sternzellen, Fibroblasten und Endothelzellen. Über freigesetzte Mediatoren wie die Zytokine wird eine innerhepatische als auch systemische Akute-Phase-Reaktion ausgelöst. Wie im Kapitel 3.2.2.1 bereits beschrieben, wurde in der Untersuchung des Lebergewebes durch den Pathologen ein geringerer Score im Grading der Leberinflammation in der mit Rimonabant behandelten Gruppe gemessen. Ebenso zeigte sich in der H&E

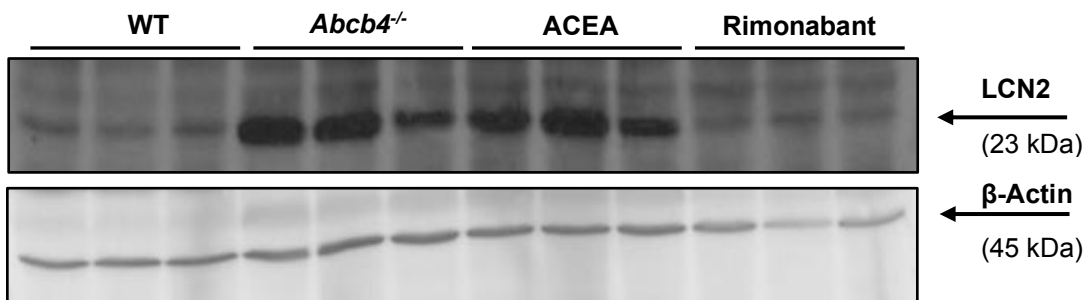
Übersichtsfärbung in dieser Gruppe keine gesteigerte Infiltration von Entzündungszellen. Untersuchungen auf mRNA Ebene in der qRT-PCR zeigten für die Entzündungsmarker *tgfb*, *tnfa* und *il1b* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (nicht gezeigte Daten). Ein wichtiger Bestandteil der Akuten-Phase-Reaktion stellt das Protein Lipocalin-2 (LCN2 bzw. NGAL) dar. LCN2 wird während der Akuten-Phase-Reaktion vermehrt in das Gewebe infiltrierenden neutrophilen Granulozyten aber auch in Hepatozyten exprimiert. Ebenso stellt der STAT3 einen Bestandteil der Akute-Phase-Reaktion dar. Er wird durch IL-6 durch Phosphorylierung induziert und ist seinerseits in der Lage, LCN2 zu aktivieren. Die vermehrte Expression von LCN2 und p-STAT3 ist Charakteristikum des biliären Entzündungsgeschehens.



**Abb. 27: Rimonabant-Gruppe reduziert Genexpression von *lcn2* auf WT-Niveau**

x-fache Genexpression von *lcn2* in der q-RT-PCR aus Lebergewebe 16 Wochen alter Mäuse. Die *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigten sich gegenüber den WT-Mäusen mit  $p=0.016$  hochreguliert. Die Rimonabant behandelte Gruppe zeigte sich gegenüber der ACEA-Gruppe ( $p=0.038$ ) auf WT-Niveau herabreguliert. Ebenso präsentierte sich die ACEA-Gruppe gegenüber dem WT hochreguliert  $p=0.001$ .

Um die Ergebnisse der qRT-PCR auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Das Ergebnis des Western Blots bestätigte die auf transkriptioneller Ebene gemessene vermehrte Expression von LCN2 in den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Normalisierung auf WT-Niveau in der Rimonabant-Gruppe.

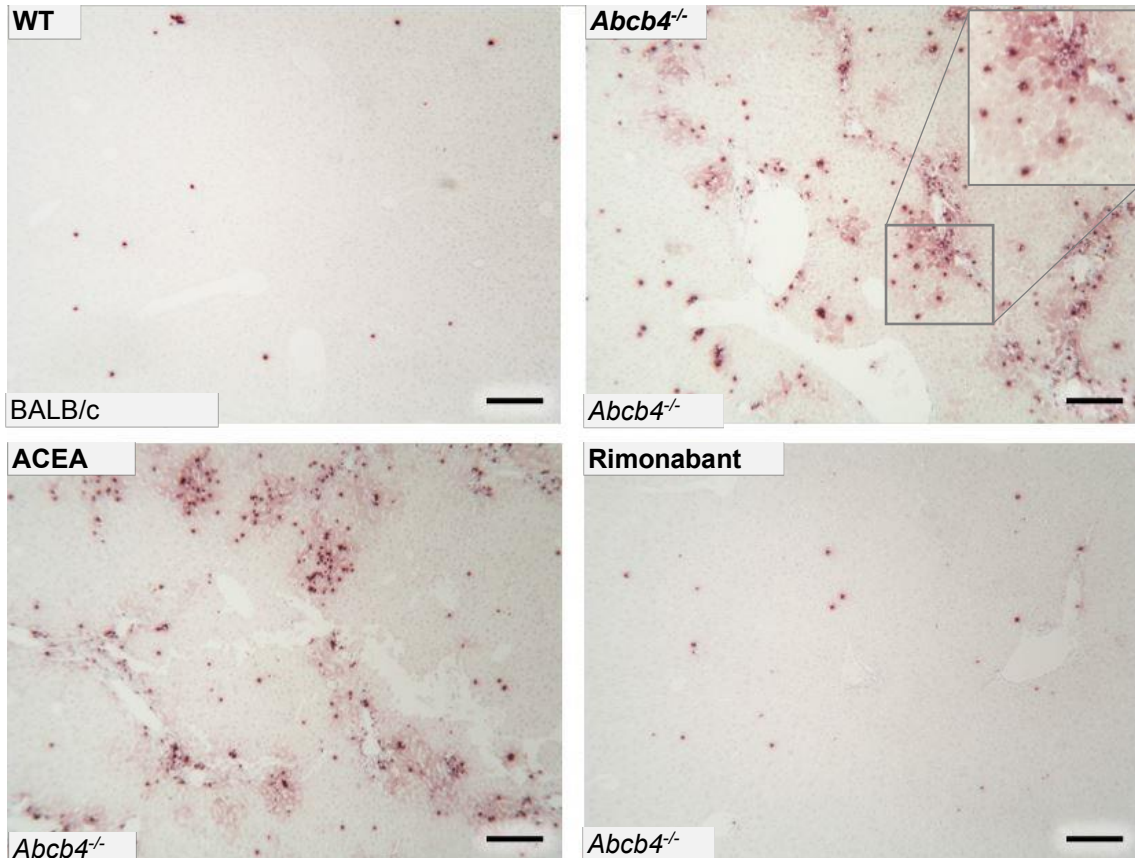


**Abb. 28: Herabgesetzte Expression von LCN2 bei Rimonabant-Behandlung**

Western Blot: Banden 1-3 der WT, 4-6 *Abcb4*<sup>-/-</sup>, 7-9 ACEA und 10-12 Rimonabant. Der oberen Blot zeigt bei 23 kDa eine vermehrte Expression von LCN2 in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-und ACEA-Gruppe. Bei Rimonabant-Behandlung und in der WT-Gruppe konnte keine vermehrte Expression detektiert werden. Unterer Blot Ladekontrolle mit β-Actin (45 kDa).

Auch auf Proteinebene konnten die qRT-PCR Ergebnisse von LCN2 bestätigt werden. LCN2 zeigte eine vermehrte Proteinexpression in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Die Rimonabant behandelte Gruppe und der WT zeigten keine vermehrte Expression von LCN2. Die ACEA-Behandlung bewirkte dagegen keine Veränderung der LCN2-Expression.

LCN2 wird von neutrophilen Granulozyten und Hepatozyten in der Akuten-Phase-Reaktion gebildet. Eine vermehrte Anfärbbarkeit dieser Zellen in den Leberschnitten der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen und den ACEA behandelten Mäusen bestätigte die oben gezeigten Ergebnisse für LCN2 und zeigt darüber hinaus die zelluläre und lokoregionale Verteilung der LCN2-Expression. Hier konnte eine vermehrte Expression und somit konsekutive Anfärbbarkeit in den neutrophilen Granulozyten und Hepatozyten in den Portalfeldern beobachtet werden.



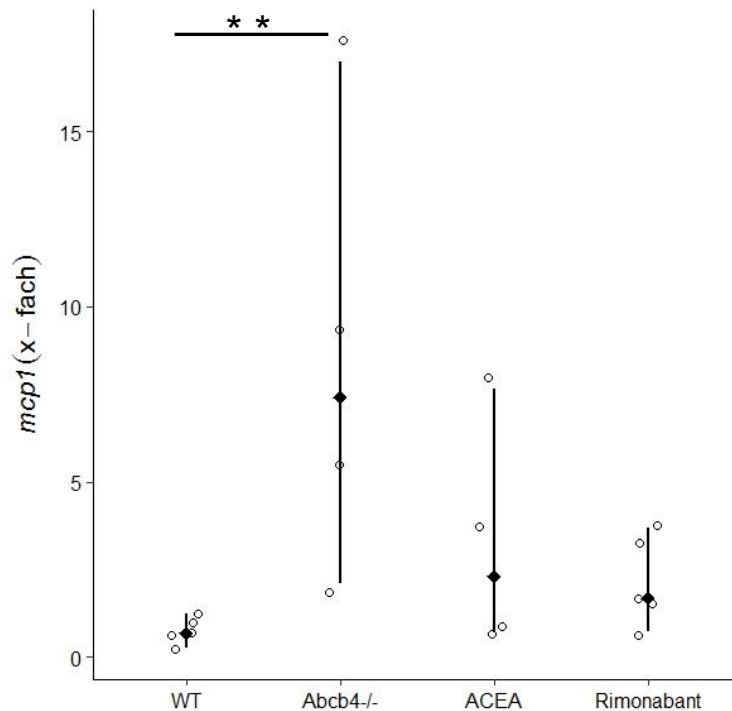
**Abb. 29: Die LCN2-Expression wird in Neutrophilen durch die Rimonabant-Behandlung reduziert**

100x Vergrößerung, Balken entspricht 200 µm. In den Lebern der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse (oben links) und der ACEA (unten rechts) behandelten Mäuse wurden vermehrt Neutrophile LCN2-positiv gefärbt. Dem gegenüber wurden nur wenige Neutrophile in der mit Rimonabant behandelten Gruppe (unten rechts) und in der WT-Kontrolle (oben links) angefärbt.

Die LCN2-Analysen zeigten eine deutlich erhöhte Expression LCN2-positiver Zellen durch die cholestatische Erkrankung in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Die Rimonabant-Behandlung normalisiert die LCN2-Expression auf transkriptioneller und auf Protein-Ebene auf WT-Niveau. Die ACEA-Behandlung hatte keinen Effekt auf die Expression von LCN2.

STAT3 wird ebenso wie LCN2 unter anderem durch Zytokine der Inflammation und Akuten-Phase-Reaktion wie z.B. IL-6 aktiviert. Aktiviertes STAT3 ist in der Lage an die Promoterregion des Gens für LCN2 zu binden und die Transkription von LCN2 zu induzieren.<sup>135</sup> Wie in Abbildung 43 dargestellt, zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe sowie bei ACEA-Gabe. Durch Rimonabant wurde die STAT3-Phosphorylierung deutlich gesenkt.

Als weiterer Marker inflammatorischer Prozesse wurde das *Monocyte chemotactic Proteine 1* (MCP-1) gemessen. MCP-1 ist ein Zytokin, welches Monozyten, T-Zellen und dendritische Zellen zum Ort der Inflammation rekrutiert.

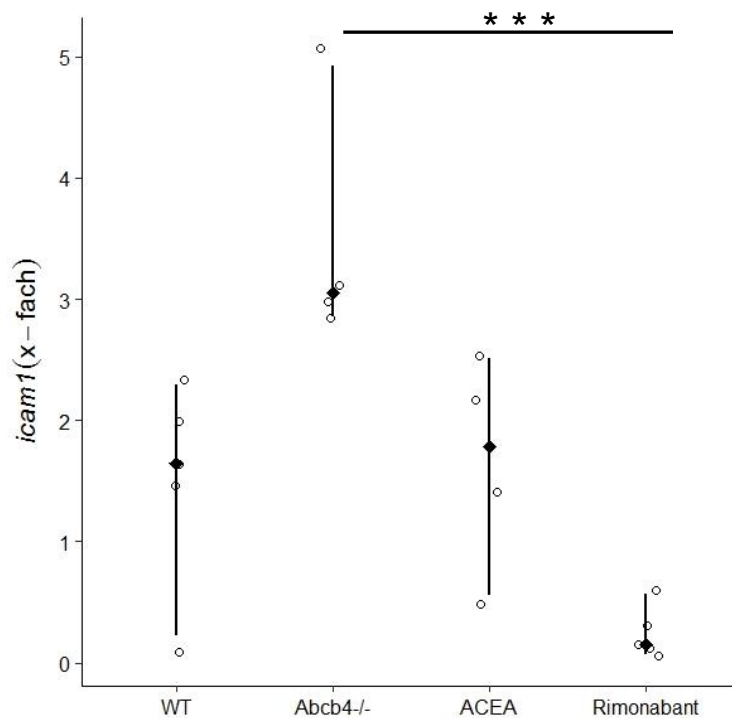


**Abb. 30: Genexpression von *mcp-1***

x-fache Regulation von *mcp1* in der qRT-PCR. Die unbehandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Gruppe präsentierte sich zur WT-Gruppe ( $p=0.004$ ) hochreguliert. Die Rimonabant- und ACEA-Gruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen.

Die unbehandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Gruppe zeigte auch in dieser Messung eine Hochregulation des inflammatorischen Markers. Die Rimonabant behandelte Gruppe zeigte keine signifikant veränderte Genexpression im Vergleich zu den anderen Gruppen.

Das *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) ist ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, welches sich auf der Oberfläche von Endothelzellen, Makrophagen und Leukozyten befindet. Bei Aktivierung durch andere pro-inflammatorische Mediatoren wird es vermehrt synthetisiert. Anschließend transmigrieren durch ICAM-1 angelockte Leukozyten in das inflammatorische Gewebe.



**Abb. 31: Signifikante Reduktion von *icam1* durch Behandlung mit Rimonabant**  
 x-fache Regulation von *icam-1* in der qRT-PCR. Die Genexpression des Adhäsionsmoleküls zeigten sich in den mit Rimonabant behandelten Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Mäusen herabreguliert ( $p = 0.003$ ). Zwischen den anderen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

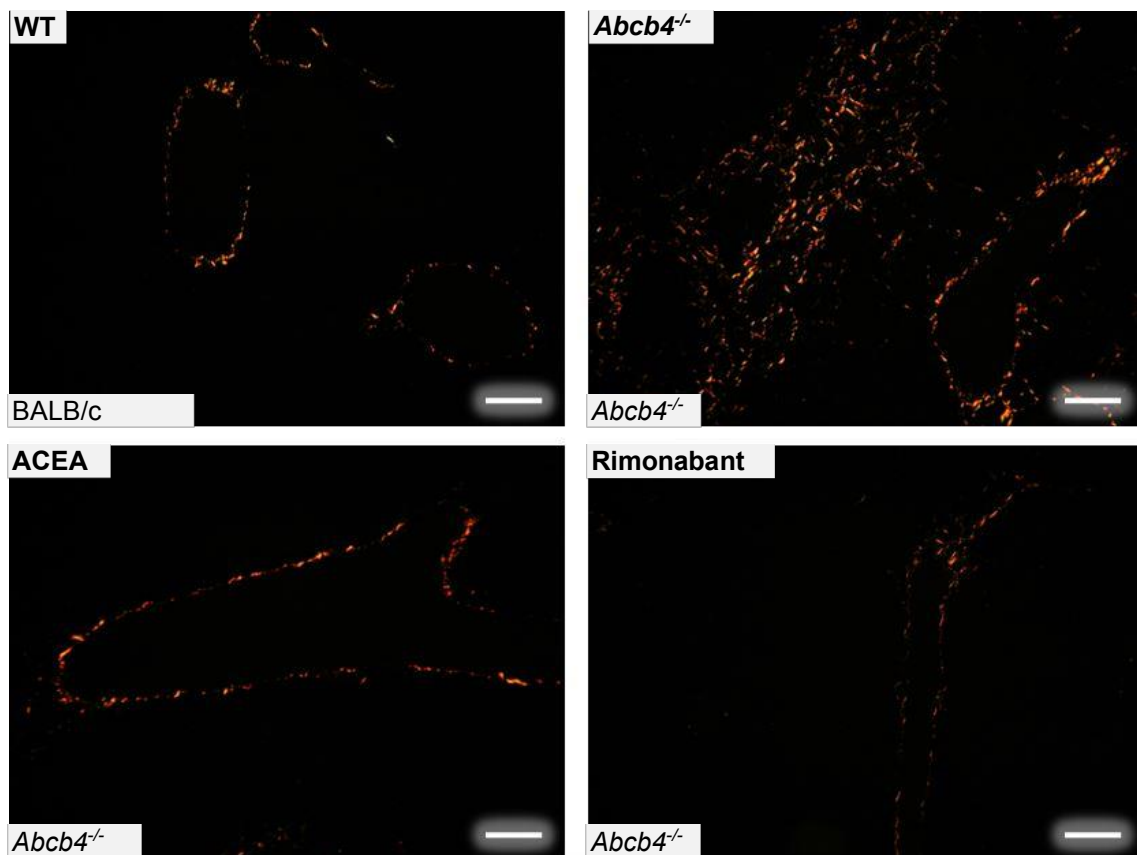
Zusammenfassend kann eine verminderte Expression inflammations- und Akute-Phase-Reaktion-assoziierter Marker in den Rimonabant behandelten Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>*- und ACEA-Mäusen beobachtet werden.

### 3.5 Leberfibrose

#### 3.5.1 Histologische Analyse

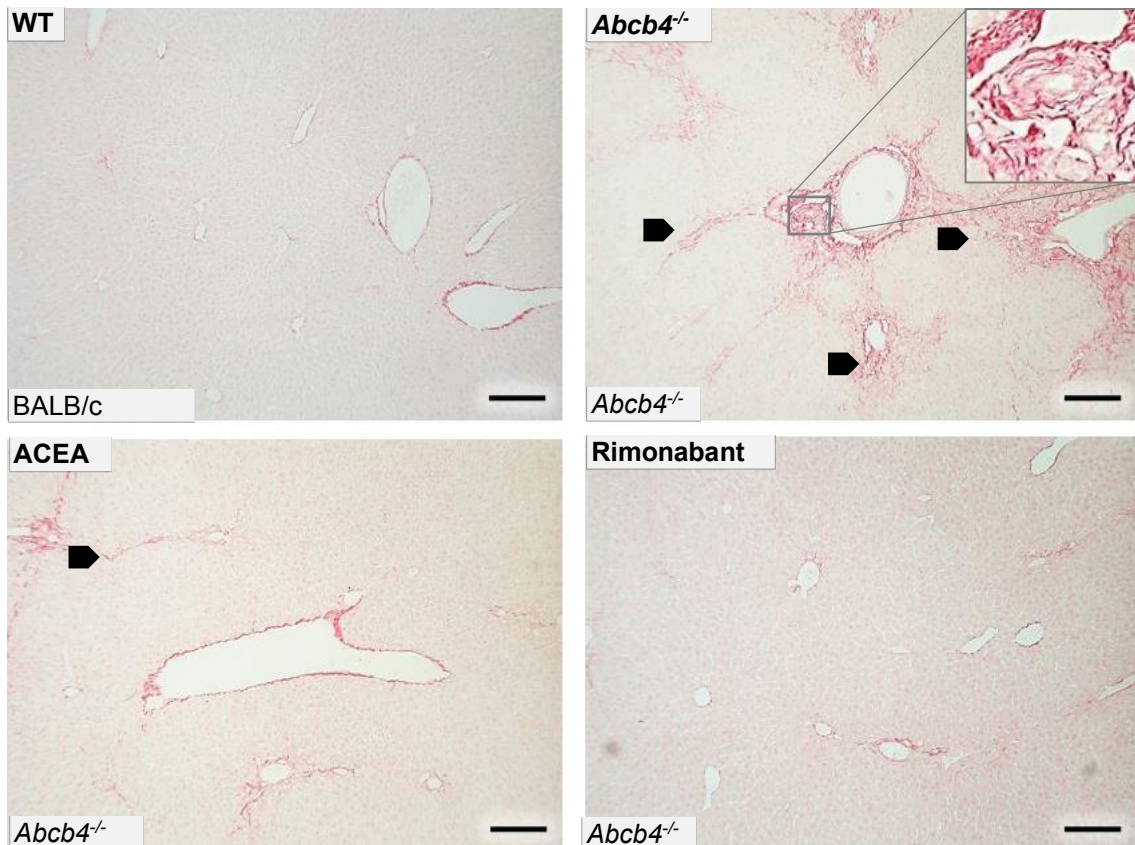
Im Rahmen der cholestatischen Erkrankung kommt es durch die erhöhten Gallensäurekonzentrationen im Parenchym, zu hepatozellulärer Schädigung, zur Inflammation und konsekutiv zur Leberfibrose. Kollagen-1 ist der Hauptbestandteil des fibrillären im fibrotischen Gewebe.

Ein sensibles Verfahren zur Detektion von Kollagen-1 und dessen Lokalisation in Gewebeschnitten der Leber stellt die Färbung mit dem Farbstoff Sirius Red dar. Hierbei wird Kollagen-1 rot gefärbt, der Hintergrund gelb. Betrachtet man die gefärbten Schnitte im zirkulär polarisiertem Licht unter dem Mikroskop so erscheint das Kollagen-1 gelb-orange, der Hintergrund schwarz.



**Abb. 32: Rimonabant-Behandlung vermindert Expression von fibrillärem Kollagen**  
 200x Vergrößerung, Balken entspricht 100 µm. IHC Sirius Red Färbung in polarisiertem Licht. Oben links WT mit BALB/c Hintergrund, oben rechts unbehandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus, unten links ACEA behandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus, unten rechts mit Rimonabant behandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus.

Es zeigte sich eine ausgeprägte Anfärbung fibrillären Kollagens in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Die Rimonabant behandelten Mäuse mit *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Hintergrund zeigten im Vergleich zu den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine geringere Kollagendeposition. Die ACEA-Gruppe mit *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Hintergrund zeigte ebenso eine vermehrte Kollagendeposition, die unter dem Ausmaß der Kollagenexpression der unbehandelten Gruppe lag.

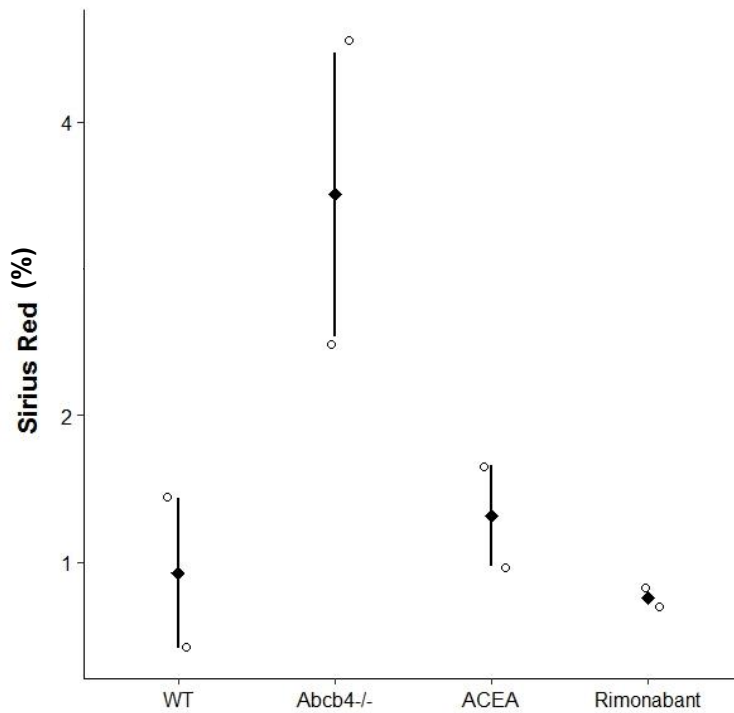


**Abb. 33: Rimonabant-Behandlung vermindert Expression von fibrillären Kollagen**

100x Vergrößerung, Balken entspricht 200 µm. Sirius Red Färbung. Verteilung von fibrillärem Kollagen. Oben links WT mit BALB/c Hintergrund, oben rechts unbehandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus, unten links ACEA behandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus, unten rechts mit Rimonabant behandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Maus. Schwarzer Pfeil markiert fibröse Septen. Die Vergrößerung zeigt charakteristische fibrotische *onion skin lesions*.

Es zeigte sich eine vermehrte Deposition von fibrillärem Kollagen um die Portalfelder und insbesondere um die Gallengänge in den 16 Wochen alten unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Rimonabant behandelte Gruppe imponierte in repräsentativen Leberschnitten in der Sirius Red Färbung annähernd auf WT-Niveau. Die ACEA behandelte Gruppe wies ebenfalls eine Erhöhung des Kollagenanteils auf, ohne das Ausmaß der unbehandelten Gruppe zu erreichen.

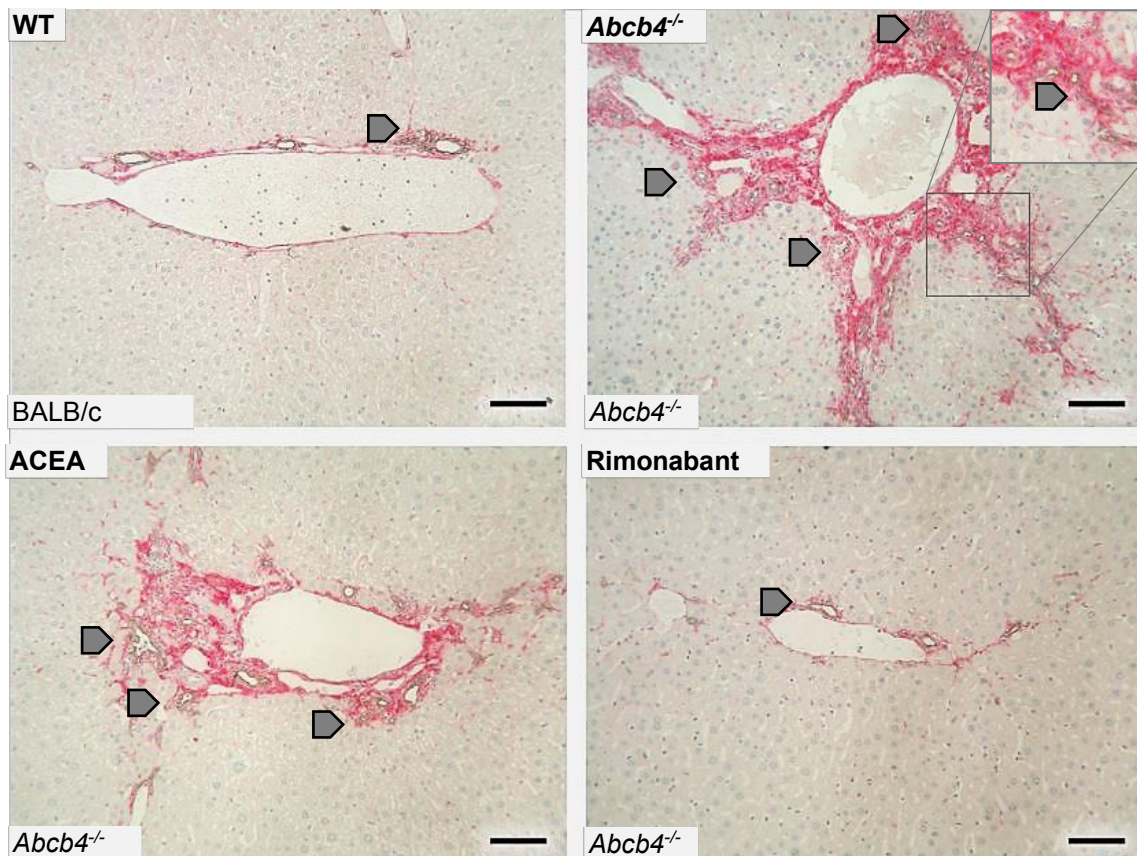
Zur Quantifizierung der im Mikroskop beobachteten Ergebnisse wurden Fotos der Gewebeschnitte mit dem Programm ImageJ ausgewertet.



**Abb. 34: Herabgesetzter Grad der Fibrose in der Rimonabant-Gruppe in der Sirius Red Färbung (Staging)**

Auswertung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen-1 in gefärbten Leberschnitte 16 Wochen alter Mäuse (in %). Die semiquantitative Auswertung wurde zur Visualisierung der Unterschiede an repräsentativen Schnitten durchgeführt. Die Gruppe der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigte anhand der Auswertung repräsentativer Leberschnitte den höchsten Anteil an fibrotischen Gewebe. Die Rimonabant behandelten Mäuse zeigten einen stark erniedrigten Kollagengehalt in den Leberschnitten, verglichen mit den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-und ACEA-Mäuse.

Um die lokoregionale Korrelation von Kollagen-1 und proliferierenden Gallengängen zu überprüfen, wurde eine Kollagen-1/CK19-Ko-Färbung durchgeführt.

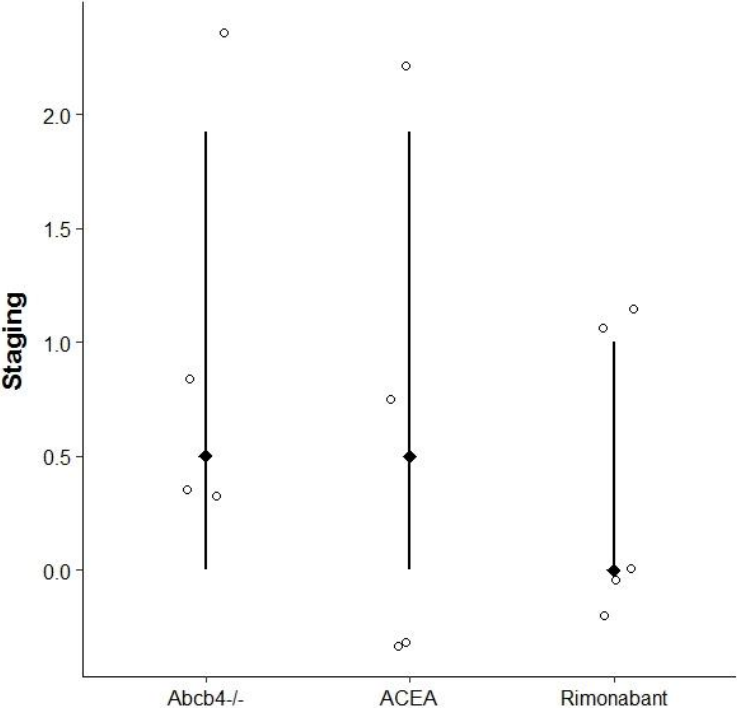


**Abb. 35: Örtliche Beziehung zwischen Kollagendeposition und proliferierenden Gallengängen**

200x Vergrößerung, Balken entspricht 100 µm. CK19 Färbung für Gallengangsepithel. Oben links WT mit BALB/c Hintergrund, oben rechts unbehandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Maus, unten links ACEA behandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Maus, unten rechts mit Rimonabant behandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Maus. Graue Pfeile kennzeichnen Gallengänge, Kollagen-1 stellt sich rot angefärbt dar.

Es besteht eine örtliche Beziehung zwischen proliferierenden Gallengängen und Kollagen-1 Ablagerungen. Die unbehandelte *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Gruppe zeigte eine starke Deposition von Kollagen-1 und eine vermehrte Gallengangsproliferation. Die Rimonabant behandelte Gruppe wies eine geringe Anzahl von Gallengängen und Kollagen-1 Ablagerung auf, die dem WT entsprach. Die ACEA behandelte Gruppe zeigte sich ähnlich der unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Gruppe, erreichte das Ausmaß der Kollagendeposition und Gallengangsproliferation aber nicht.

Des Weiteren wurde ein Staging-Score zur Einschätzung des Fibroseausmaßes sowie der Zerstörung der Leberarchitektur durchgeführt.

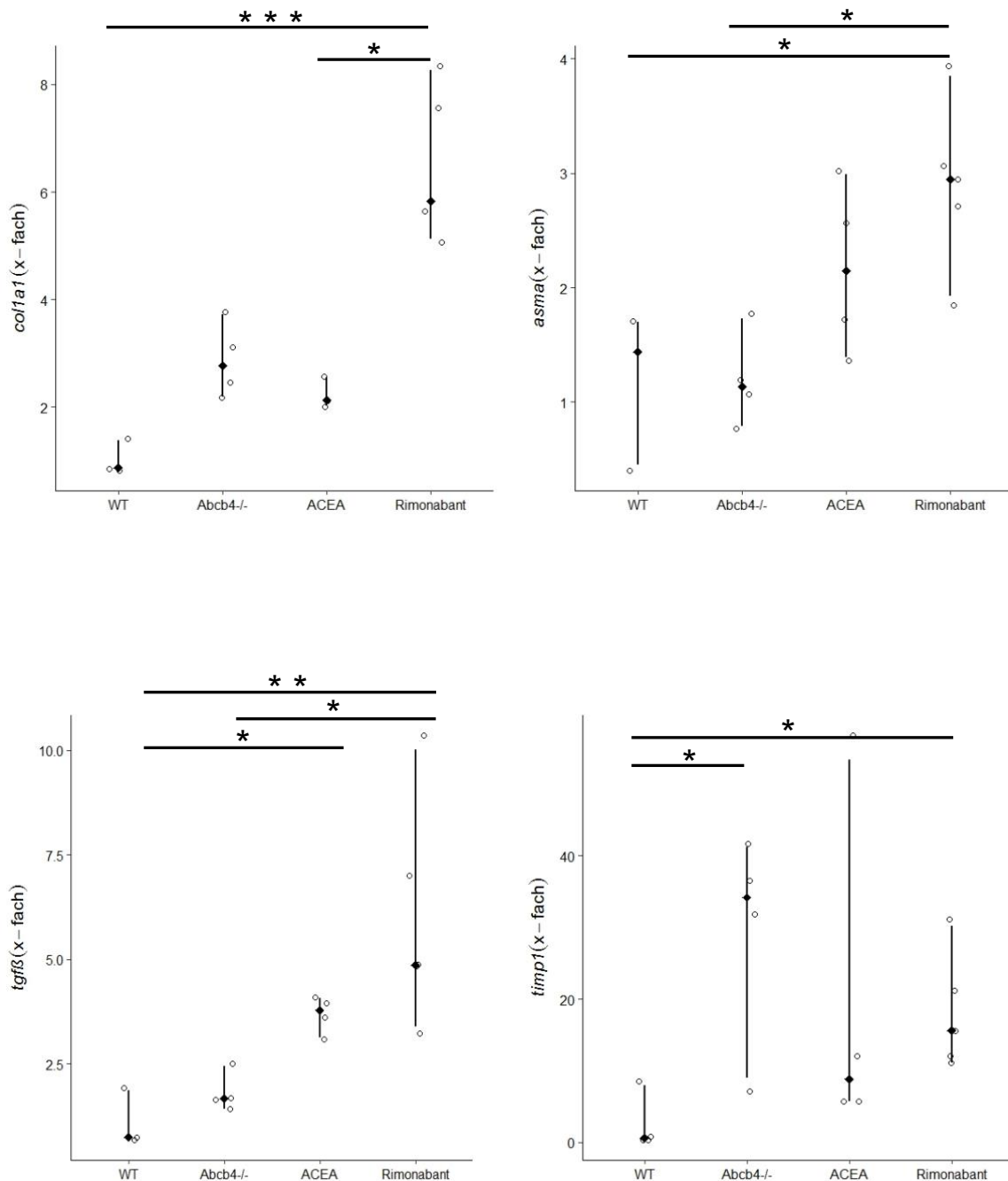


**Abb. 36: Staging der Leberfibrose**

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Für den WT kann ein Grading-Wert von 0 angenommen werden.<sup>123</sup>

### 3.5.2 Erhöhte Expression profibrotischer als auch antifibrotischer Gene in der Rimonabant-Gruppe

Es wurden Fibrose-assoziierte Gene wie *col1a1*, *asma*, *tgfβ*, *timp1* sowie *mmp2* und *mmp9* qRT-PCR Analysen unterzogen.



**Abb. 37: Transkriptionelle Induktion profibrotischer Gene durch Rimonabant-Behandlung** x-fache Regulation in der qRT-PCR. Es wird keine Signifikanz der Genregulation für *col1a1* in der unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Gruppe gegenüber dem WT erreicht. Die Rimonabant behandelten Mäusen zeigten sich in dieser Messung sowohl gegenüber den unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>*, dem WT ( $p=0.001$ ) als auch gegenüber den ACEA behandelten Mäusen ( $p=0.025$ ) hochreguliert.

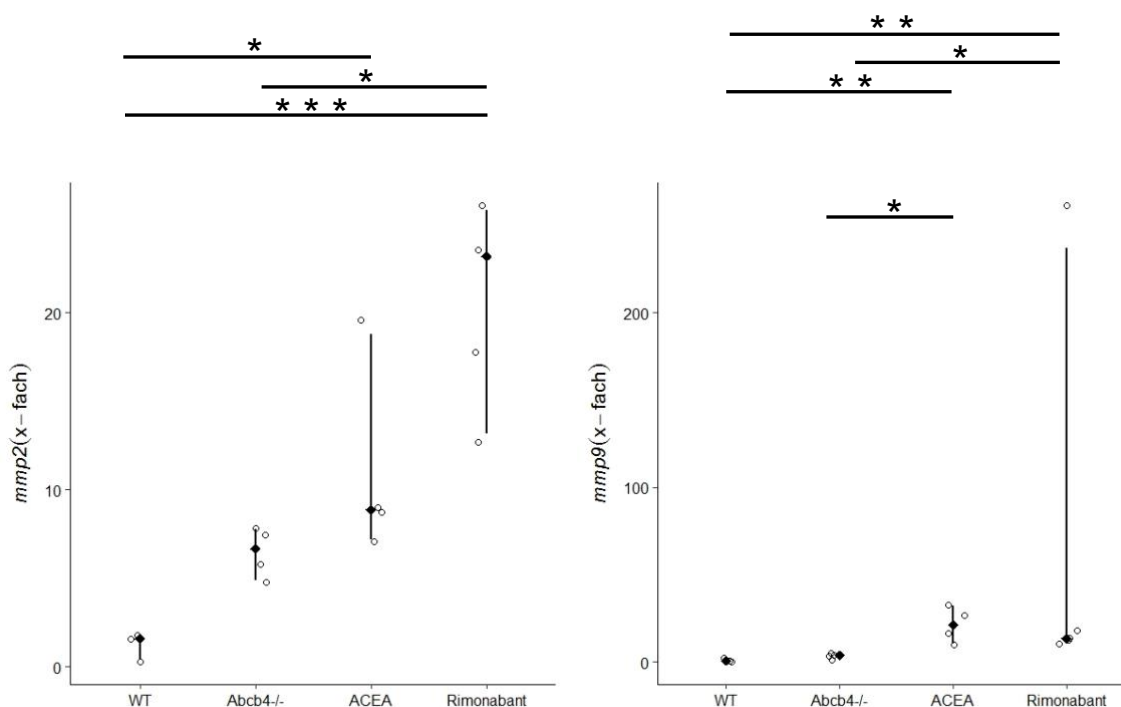
In der Messung der Expression von *asma* zeigte sich keine Regulation der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Bei Rimonabant-Behandlung war eine vermehrte Genexpression im Vergleich zum WT ( $p=0.014$ ), der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe ( $p=0.006$ ) und der ACEA-Gruppe zu messen. Die ACEA-Gruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Die *tgfb* Genexpression zeigte sich nicht reguliert in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Die Rimonabant-Gruppe präsentierte sich gegenüber den WT-Mäusen ( $p=0.003$ ) und den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p=0.007$ ) hochreguliert. Die ACEA-Gruppe zeigte sich zur WT-Gruppe ( $p=0.046$ ) hochreguliert.

*timp1* zeigte sich am stärksten in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe reguliert. Die Genexpression der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen erreichte gegenüber den WT-Mäusen signifikante Werte ( $p=0.008$ ), gegenüber der Rimonabant- und ACEA-Gruppe nicht. Auch bei Rimonabant-Behandlung kam es zu einer vermehrten Genexpression gegenüber den WT-Mäusen ( $p=0.03$ ), gegenüber der ACEA-Gruppe zeigte sich keine Regulation. Die ACEA-Gruppe zeigte sich nicht signifikant reguliert.

Die profibrotischen Gene *col1a1*, *asma* und *tgfb* wurden durch den *Abcb4*-Knockout nicht reguliert. Die Behandlung mit Rimonabant führte zu einer signifikanten Hochregulation dieser Gene. Die ACEA-Gruppe zeigte sich nur in der *tgfb*-Messung signifikant gegenüber der WT reguliert. Die Genexpression des profibrotischen Markers TIMP1 (*timp1*) zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp in den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen hochreguliert. Es zeigten sich keine Unterschiede zu den beiden behandelten Gruppen. Die Genexpression in den Rimonabant-behandelten Mäusen zeigte interessanterweise eine signifikante Hochregulation verglichen mit dem Wildtyp. Die Genexpression von *tgfb* zeigte sich signifikant erhöht in den mit ACEA und Rimonabant behandelten Gruppen im Vergleich zur *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Die ACEA-Behandlung zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression von *timp1*.

Die MMPs führen bei Aktivierung zur Auflösung der Deposition extrazellulärer Matrix (ECM). In weiteren Messungen in der qRT-PCR wurde die Genexpression von *mmp2* und *mmp9* überprüft. Die Expression wurde durch die Cholestase in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht signifikant verändert. Die Behandlung mit Rimonabant und ACEA induzierte die Genexpression von *mmp-2* und *-9*.



**Abb. 38: Messung antifibrotischer Gene**

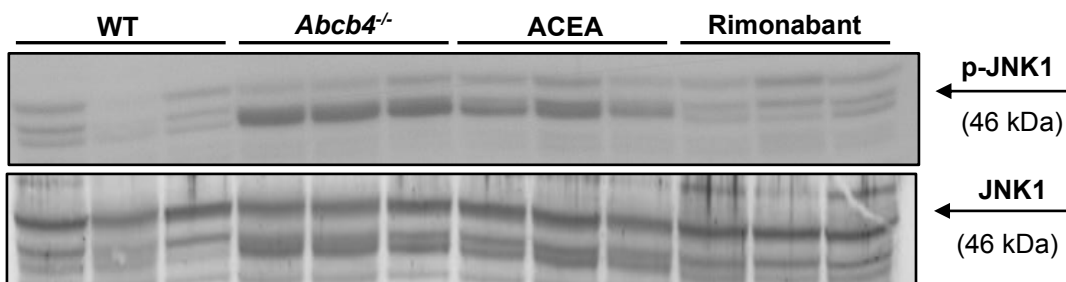
x-fache Regulation in der qRT-PCR. Es wurde keine signifikante Regulation des Gens für MMP2 der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe gegenüber dem WT erreicht. Die Rimonabant behandelte Gruppe zeigte sich im Vergleich zu der WT-Gruppe ( $p=0.001$ ) und zu der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe ( $p=0.017$ ) stärker reguliert. Ebenso zeigte sich die ACEA behandelte Gruppe gegenüber der WT-Gruppe erhöht ( $p=0.039$ ). In der *mmp9* Messung zeigte sich keine Regulation in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Die Rimonabant-Gruppe war sowohl gegenüber der WT-Gruppe ( $p=0.006$ ), als auch gegenüber der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe ( $p=0.04$ ) hochreguliert. Ebenso zeigten sich die ACEA behandelten Mäuse gegenüber den beiden Gruppen WT ( $p=0.006$ ) und unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe ( $p=0.038$ ) hochreguliert.

Zusammenfassend zeigte sich, entgegen der durch die Rimonabant-Behandlung reduzierten Akkumulation fibrotischer Matrix, auf transkriptioneller Ebene eine deutliche Induktion der Fibrosemarker *col1a1*, *αsma* und *tgfβ*, während die *timp1* Genexpression unverändert blieb. Die für die Regeneration wichtigen MMP-2 und MMP-9 wurden auf genregulatorischer Ebene durch die Rimonabant-Behandlung deutlich induziert.

## 3.6 Proliferation und Tumorgenese

### 3.6.1 JNK1-Signalweg

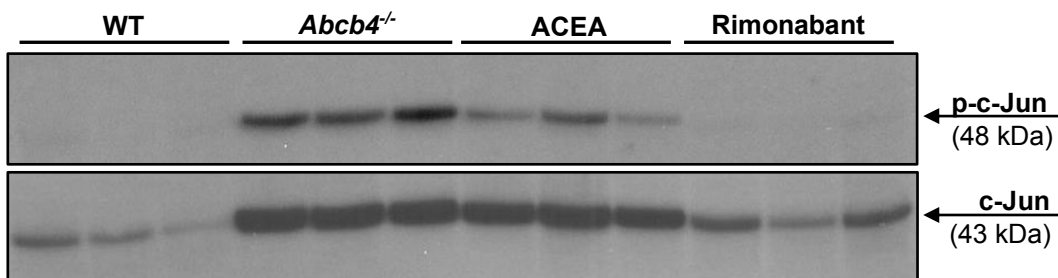
Durch inflammatorische und fibrotische/zirrhöse Prozesse im Rahmen chronischer Lebererkrankungen kann es zur Aktivierung proliferativer und karzinogener Signalwege kommen. Der JNK-Signalweg ist ein zentraler Signalweg, der an diesen potentiell pro-onkogenen Veränderungen beteiligt ist.<sup>104,124,125</sup> In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, ob es zu einer Aktivierung des JNK1 Signalweges durch cholestatische Lebererkrankungen kommt. Durch Phosphorylierung werden JNK1 und seine *downstream* Signalwege aktiviert. Hierbei überträgt JNK1 selbst als Kinase eine Phosphat-Gruppe zur Aktivierung z.B. auf c-Jun oder STAT3. Für die Analysen dieser Signalwege wurden zunächst p-JNK1 und p-c-Jun im Western Blot im Vergleich zur Expression der unphosphorylierten Formen untersucht.



**Abb. 39: Reduktion der JNK1-Aktivierung durch Rimonabant**

Banden 1-3 WT, 4-6 unbehandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>, 7-9 ACEA und 10-12 Rimonabant.

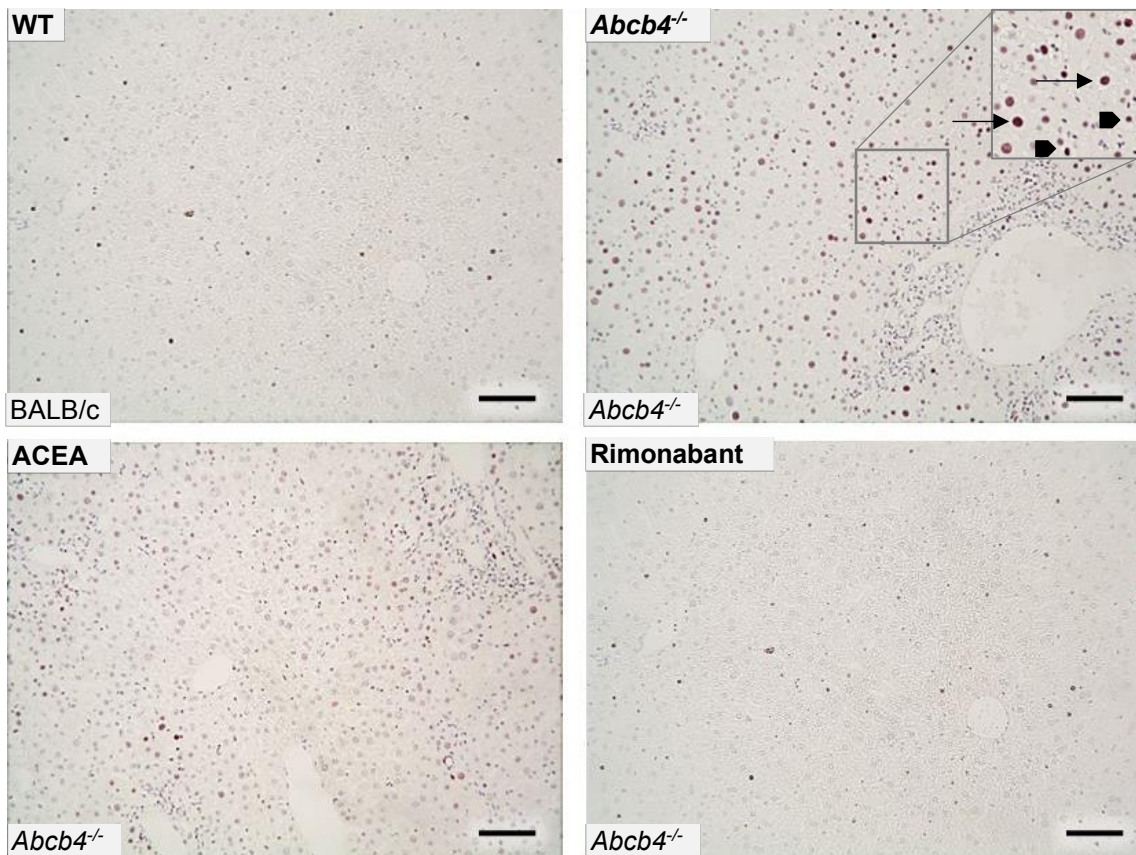
Der obere Blot bei 46 kDa, zeigt eine vermehrte Phosphorylierung von JNK1 in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-und der ACEA-Gruppe. Bei Rimonabant-Behandlung und in der WT-Gruppe konnte keine vermehrte Phosphorylierung detektiert werden. Unterer Blot: Ladekontrolle mit JNK1.



**Abb. 40: Verminderte Phosphorylierung von c-Jun durch Rimonabant**

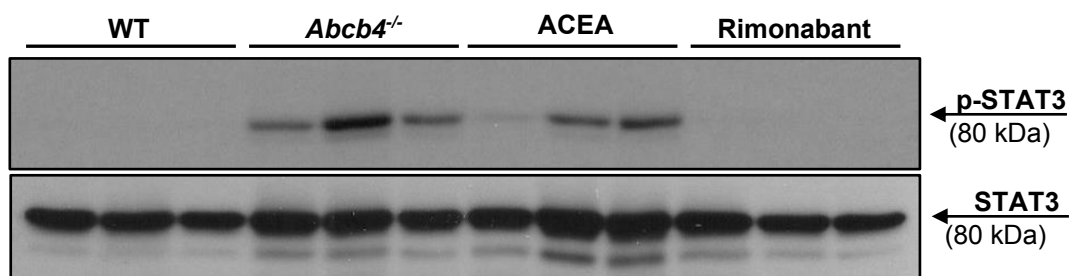
Banden 1-3 der WT, 4-6 unbehandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>, 7-9 ACEA und 10-12 Rimonabant.

Der obere Blot zeigt bei 48 kDa eine vermehrte Phosphorylierung von in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-und ACEA behandelten Gruppe. Bei Rimonabant-Behandlung und in der WT-Gruppe konnte keine vermehrte Phosphorylierung detektiert werden. Unterer Blot: Ladekontrolle mit c-Jun bei 43 kDa.



**Abb. 41: Verminderte hepatozelluläre Kerntranslokation von p-c-Jun bei Rimonabant-Behandlung**

100x Vergrößerung, Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ . Auch in der Immunhistochemie konnte in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>- und ACEA-Gruppe eine stärkere p-c-Jun Expression detektiert werden. Bei Rimonabant-Behandlung zeigte sich keine vermehrte Anfärbbarkeit p-c-Jun positiver Zellen. Anfärbt wird in der p-c-Jun Färbung typischerweise der Zellkern p-c-Jun positiver Zellen wie Hepatozyten (schwarzer Pfeil) und Immunzellen wie Leukozyten (schwarze Pfeilspitze).

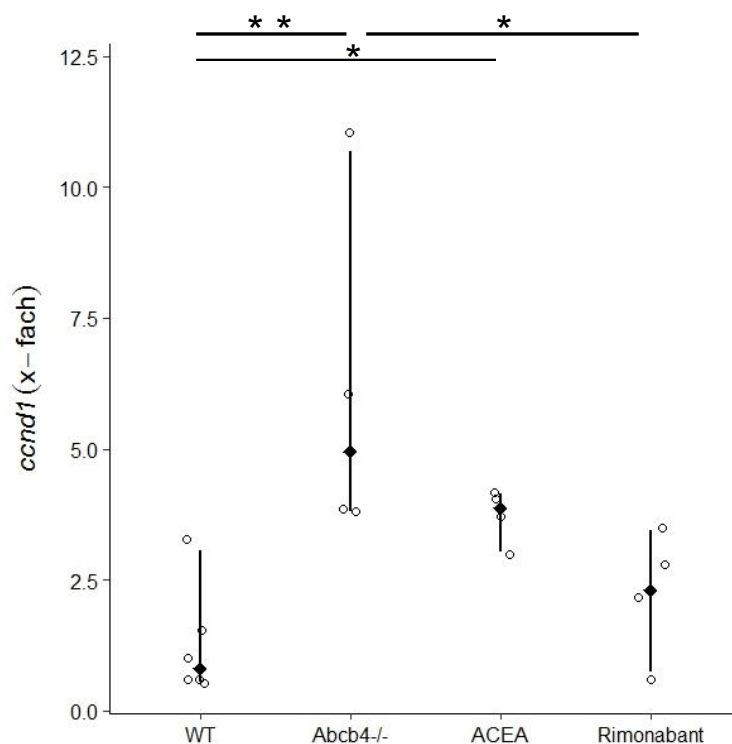


**Abb. 42: Verminderte p-STAT3-Expression im Western Blot bei Rimonabant-Behandlung**

Banden 1-3 der WT, 4-6 unbehandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>, 7-9 ACEA und 10-12 Rimonabant.

Der obere Blot bei 80 kDa, zeigt eine vermehrte Phosphorylierung von STAT3 in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>- und ACEA-Gruppe. Bei Rimonabant-Behandlung und in der WT-Gruppe konnte keine vermehrte Phosphorylierung detektiert werden. Unterer Blot: Ladekontrolle mit STAT3.

Cyclin D1 ist ein Protein, welches in der G1 Phase des Zellzyklus synthetisiert wird. Es reguliert den Übergang in die S Phase des Zyklus und ist somit maßgeblich an proliferativen Prozessen beteiligt. Eine Cyclin D1 Überexpression zeigt sich schon in frühen Phasen der Krebsentstehung und -progression. Durch Aktivierung des JNK1/c-Jun-/STAT3 Signalweges, welcher eine essentielle Rolle in der unkontrollierten Proliferation während der Krebsentstehung spielt, kommt es zu einer erhöhten Expression des Gens *ccnd1* und somit zu einer vermehrten Synthese von Cyclin D1. Hierbei hat insbesondere p-STAT3 einen initiierenden Effekt auf die Überexpression von Cyclin D1.<sup>116</sup>



**Abb. 43: Verminderte Genexpression von Cyclin D1 (*ccnd1*) bei Rimonabant-Behandlung**  
 Es zeigte sich eine x-fache Hochregulation in der unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Gruppe im Vergleich zum WT ( $p=0.001$ ) und zur Rimonabant behandelten Gruppe ( $p=0.021$ ). Die Rimonabant-Behandlung normalisiert die *ccnd1* Genexpression. Die ACEA-Gruppe zeigte sich auch gegenüber dem WT ( $p=0.012$ ) signifikant erhöht.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass JNK1, c-Jun und STAT3 durch die chronische Leberschädigung in den *Abcb4-Knockout* Mäusen aktiviert werden. Die Behandlung mit Rimonabant nivelliert diese Aktivierung auf WT-Niveau, während ACEA keinen signifikanten Einfluss hat.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einordnung der Arbeit

Chronische Lebererkrankungen, induziert durch HBV- und HCV-Infektion, NAFLD, ASH, PBC oder PSC, sind auf Grund hoher Prävalenz und Morbidität von großer gesundheitlicher Relevanz.<sup>57,15</sup> Die gemeinsame Endstrecke dieser Erkrankungen stellt die Entwicklung von Leberinflammation, -fibrose und -zirrhose dar.<sup>2</sup> An den Folgeerkrankungen wie der portalen Hypertension und dem hepatozellulären Karzinom, sterben jährlich weltweit 745.533 Menschen. Davon versterben die meisten Menschen in Entwicklungsländern.<sup>58,126</sup> Diese Zahlen demonstrieren die Notwendigkeit der Etablierung neuer und effektiver Therapieoptionen für die Behandlung chronischer Lebererkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Entfernung der Ursache selbst bei fortgeschrittener Leberzirrhose zu einer Regeneration der geschädigten Leber kommen kann.<sup>77</sup> Ist dies nicht möglich, besteht bis heute keine effektive Therapie.<sup>79</sup>

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gabe des CB1-Antagonisten Rimonabant im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell für Cholestase zu

1. herabgesetzter Inflammation des Lebergewebes
2. dem Erhalt der Leberintegrität und Zonierung
3. einer geringeren Leberfibrose
4. ausbleibenden Aktivierung Karzinogenese-assoziiertes Signalwege

führt.

Verschiedene Therapieansätze, mit dem Ziel Zellen, Rezeptoren und Mediatoren der Fibroseentstehung zu beeinflussen, sind in unterschiedlichen Modellen für chronische Lebererkrankungen Gegenstand langjähriger Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass die Modulation des Endocannabinoidsystems der Leber eine potentielle Therapieoption zur Behandlung der Leberfibrose ist. In verschiedenen Mausmodellen wie der CCl<sub>4</sub>-, Thioacetamid- oder Gallengangsligatur-induzierter Fibrose, in humanen Resektaten zirrhotischer Lebern sowie in Zellkulturen humaner hepatischer Sternzellen und hepatischer Myofibroblasten wurde bestätigt, dass die Stimulation des CB1-Rezeptors profibrotische und die Stimulation des CB2-Rezeptors antifibrotische Effekte bewirkt.<sup>80,93,127</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss der pharmakologischen Modulation am CB1 durch den CB1-Antagonisten Rimonabant und den Liganden ACEA (CB1-Agonist) in BALB/c *Abcb4*-Knockout Mäusen untersucht.

In vorausgegangenen Studien anderer Tiermodelle wie z.B. der *diet-induced obese mice* konnte gezeigt werden, dass Rimonabant positive Effekte auf den Lebermetabolismus

und die Reduktion der Fibroseentstehung hat.<sup>80,95,96</sup> Weiterhin ist bekannt, dass es in der Signalkaskade des aktivierten CB1 zu einem Anstieg von SREBP-1c, ACC1 und der *fatty acid synthetase* (FASN) kommt. Dies trägt über vermehrte Lipogenese zur Entwicklung von Übergewicht und Fettleber bei.<sup>88</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ebenfalls dieser Signalweg überprüft und es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *srebp-1c* in der mit Rimonabant behandelten Gruppe im Vergleich zu den unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup> und ACEA behandelten Mäusen, herabreguliert wird. Die Genexpression von *acc1* zeigte keine signifikanten Unterschiede, was auf die geringe Stichprobengröße zurückzuführen sein kann (Abb.12).

Damit wurde auch für das *Abcb4-Knockout* Mausmodell der intrahepatischen Cholestase gezeigt, dass eine Hemmung des CB1-Rezeptors durch Rimonabant initiale Signalwege der Lipogenese inhibiert. Ziel der weiteren Studien war es, erstmalig die Auswirkung der pharmakologischen Aktivierung bzw. Inhibierung dieser Signalwege im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell für Cholestase zu untersuchen.

## **4.2 Gallensäuren schädigen die Leberintegrität im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Modell für Cholestase**

Akute und chronische Lebererkrankungen schädigen die Hepatozyten. ALT gilt als sensitiver und etablierter Parameter zur Erfassung der Leberintegrität.<sup>2</sup> In der vorliegenden Studie belegen erhöhte ALT-Werte in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe eine vermehrte Leberzellschädigung, welche in den ACEA und Rimonabant behandelten Mäusen nicht auftrat. Die ALT-Werte der Rimonabant- und ACEA behandelten Gruppe waren im Vergleich zur *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abb.13), liegen aber dennoch oberhalb der Referenzwerte gesunder Mäuse (Normwerte für männliche Mäuse: mean = 50 U/L).<sup>121</sup> Der nicht vollständige protektive Effekt könnte auf zu niedrige Blutspiegel des Medikaments durch die orale Darreichungsform, die nicht vollständige Resorption im Darm oder die weitere Metabolisierung zurückgeführt werden.<sup>128,129</sup> Die vorliegenden Daten verdeutlichen daher, dass eine optimierte pharmakologische Antagonisierung des CB1 einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Therapie der Leberschädigung bei Cholestase darstellen kann. Die Verringerung der Serum-ALT-Werte der ACEA-Gruppe sind sehr interessant, da hier in Analogie zu anderen Modellen für chronische Lebererkrankungen eine Verschlechterung der Erkrankung erwartet wurde.<sup>130</sup> In anderen Studien konnte bei wiederholter Gabe von CB1-Agonisten eine Toleranz für einige agonistische Effekte beobachtet werden. Diese war am ehesten auf die CB1-Internalisierung oder die Reduktion der CB1 Proteinsynthese zurückzuführen.<sup>131</sup> Dies könnte jedoch lediglich die ausbleibende Verschlechterung der

ACEA behandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse erklären, nicht aber die verbesserten ALT-Werte im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe. Ein Koppeln von ACEA an andere Rezeptoren mit protektiven Effekten auf die Leberschädigung war lange Zeit aufgrund seiner zuvor angenommenen hohen Spezifität für den CB1 unwahrscheinlich.<sup>131</sup> Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ACEA als Agonist am *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV<sub>1</sub>) wirkt.<sup>132,133,134</sup> Die Aktivierung des TRPV<sub>1</sub> durch Capsaizin führte zu einer geringeren Lipiddroplet Formation in der Leber *high fat diet* (HD) gefütterter Mäuse.<sup>135</sup> Vor diesem Hintergrund ist es möglich, dass die ACEA-Gabe über den Agonismus am TRPV<sub>1</sub> auf einige Cholestase-assoziierte Leberveränderungen einen protektiven Einfluss haben könnte. Beispiele sind herabgesetzte ALT-Werte, welche auf eine geringere Leberschädigung hinweisen sowie der geringere Anstieg der Gallensäuren im Serum im Vergleich zur unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen gleichgerichteter Wirkung in den genannten Messungen sowohl bei CB1-Agonismus als auch CB1-Antagonismus werden Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell für Cholestase ist eine Schädigung des Lebergewebes durch toxische Gallensäuren charakteristisch. In gesunden Individuen stellt das Gallengangsepithel eine funktionelle Barriere dar. Es verhindert die Diffusion toxischer Substanzen in das Leberparenchym.<sup>6,136</sup> Die Dysfunktion dieser Barriere ist in die Entwicklung biliärer Erkrankungen involviert.<sup>5,137</sup> Sie beruht auf der erhöhten Permeabilität der Tight junctions und Basalmembran.<sup>5,52,138</sup> In zukünftigen Versuchen im Rahmen dieses Projektes kann eine Immunfluoreszenz für Tight junctions, Desmosomen und andere Zell-Zell-Kontakte dabei behilflich sein, den Ort der Schädigung visuell darzustellen und die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen.<sup>31</sup>

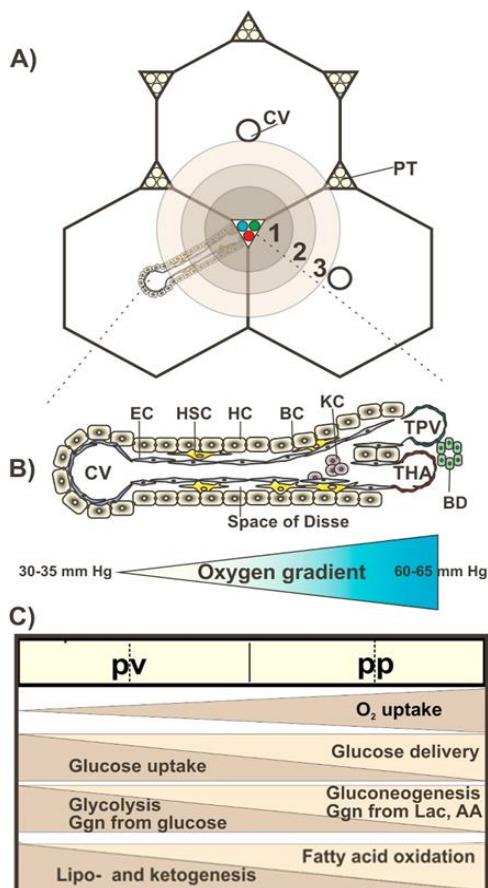
Der Übertritt von Gallensäuren in das Leberparenchym führt zur Inflammation und Fibrose. Auch in der Blutzirkulation können aufgrund dieser vermehrten Durchlässigkeit, erhöhte Gallensäurekonzentrationen gemessen werden. Die Alkalische Phosphatase und freie Gallensäuren sind Serummarker der Cholestase.<sup>2</sup> Die Konjugation von Gallensäuren mit Aminosäuren wie Taurin oder Glyzin erhöht ihre detergierenden Eigenschaften und verhindert ihre Präzipitation im sauren Milieu. Es ist bekannt, dass die Gallensäuren in Nagern zu 80-90% Taurin-konjugiert sind.<sup>139</sup> Die Gesamtkonzentration der Gallensäuren im Serum zeigte in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb.18). Interessanterweise erreichten die ACEA behandelten Mäuse im Mittel sowohl in der AP-Messung (Abb. 17) als auch in der Analyse der Gallensäuren niedrigere Level als die Rimonabant

behandelten Mäuse. Dies steht im Widerspruch zu anderen Mausmodellen für chronische Leberschädigung, in denen die Agonisierung des CB1 einen aggravierenden Faktor für die Progression der chronischen Leberschädigung darstellt.<sup>80,88,140</sup> In der vorliegenden Analyse der Gallensäuren im Serum konnte ebenfalls eine Dominanz Taurin-konjugierter, im Speziellen, der *Tauro-β-muricholic acid*, *Tauro-α-muricholic acid* und *Tauro-ω-muricholic acid*, in allen Proben bestätigt werden (Abb.19).<sup>5</sup> Die vorliegenden Ergebnisse sowie die reduzierte Parenchymschädigung weisen darauf hin, dass auch die Agonisierung des CB1-Rezeptors im *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Modell hepatoprotektive Effekte haben kann, was im Gegensatz zu anderen Modellen chronischer Lebererkrankungen steht. Dies ist möglicherweise wie oben beschrieben, ebenfalls auf eine ungenügende Wirkung des CB1-Agonismus durch Toleranzentwicklung durch CB1-Internalisierung oder Reduktion der CB1 Proteinsynthese zurückzuführen oder Resultat weiterer Interaktionen von ACEA an Rezeptoren, deren Aktivierung zu einem hepatoprotektiven Effekt führt.<sup>131–135</sup> Demgegenüber zeigten die Ergebnisse der Cholestase-assoziierten Gallengangsproliferation in der vorliegenden Arbeit durchaus vergleichbare Ergebnisse zu anderen Mausmodellen chronischer hepatischer Schädigung: Es zeigte sich durch die CB1-Antagonisierung mit Rimonabant eine herabgesetzte Proliferation von Gallengängen. Die Behandlung mit ACEA bewirkte eine lediglich leichtgradig vermehrte Proliferation von Gallengängen. Zusammenfassend zeigte sich die stärkste Schädigung der Leber sowohl auf histologischer Ebene als auch in den Serumanalysen in der unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Gruppe. Die protektive Wirkung von Rimonabant im *Abcb4<sup>-/-</sup>* Modell für Cholestase, die sich in den Ergebnissen der vorliegenden Studie widerspiegelt, ist kongruent zu anderen Modellen chronischer Leberschädigung wie CCl<sub>4</sub>-induzierter Leberfibrose, Thioacetamid-induzierter Fibrose und *Bile duct ligation*-induzierter Leberfibrose<sup>66,80</sup> So konnte sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch wie durch Teixeira-Clerc et al.<sup>80</sup> eine Reduktion der Leberfibrose beschrieben werden, was auf eine verringerte Leberschädigung durch den CB1-Antagonismus zurückzuführen war.

### **4.3 Einfluss der Modulation des CB1 auf den Lebermetabolismus**

Die Leber ist das zentrale Organ des Metabolismus. Sie ist zuständig für die Detoxifikation, Synthese von Plasmaproteinen, Glukose Homöostase sowie Verarbeitung und Verteilung von Nährstoffen.<sup>141</sup> Obwohl das Lebergewebe auf histologischer Ebene homogen imponiert, ist es bezüglich der Verteilung von Schlüsselenzymen, deren funktioneller Aktivität, Translokatoren, Rezeptoren und subzellulären Strukturen heterogen aufgebaut. Anhand dessen wurde der Begriff der

„metabolischen Zonierung“ eingeführt. So kann grob zwischen einer „upstream“ periportalen (pp) und einer „downstream“ perivenösen (pv) Zone unterschieden werden. Bezogen z.B. auf den Glukosemetabolismus bedeutet dies, dass die Umwandlung von Glykogen zu Glukose und die Glukoneogenese in der periportalen Zone stattfinden, der Glukoseverbrauch in der perivenösen Zone. Diese Heterogenität ist auf die unterschiedliche Aktivierung metabolischer Vorgänge in den pp und pv Hepatozyten zurückzuführen. Diese Distribution wird wiederum unter anderem von der Blutversorgung und den daran gebundenen Sauerstoffgradienten, der von der periportal zur perivenösen Zone hin abfällt, bestimmt.<sup>142,143</sup> Im Rahmen cholestatischer Erkrankungen kommt es zur Zerstörung des Leberparenchyms und somit der Leberarchitektur sowie der beschriebenen Zonierung. Die Leberintegrität wird geschädigt, sodass die örtliche Zuordnung für metabolische Prozesse aufgehoben wird. Die Darstellung einer integen Leberarchitektur gibt Aufschluss über die Leberfunktion in ihren funktionellen Einheiten der beschriebenen Zonen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine aufgehobene Zonierung in der unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>* und ACEA behandelten Gruppe in immunhistochemischen Färbungen für PEPCK und FASN (Abb. 20, 24), Enzyme des Glukose- und Fettstoffwechsels, dargestellt werden. In der Rimonabant behandelten Gruppe blieb die Zonierung erhalten, was Zeichen einer geringeren Leberschädigung ist.



#### Abb. 44: Metabolische Zonierung

Für die Erläuterung der Ergebnisse zur metabolischen Zonierung sollen mit Abb. 45 schematisch die Grundzüge der Leberarchitektur und Zonierung illustriert werden. Modifiziert nach 112

#### A) Leber mikro-Architektur

Zentralvene (CV) in der Mitte des hexagonalen Leberlobulus, die portale Trias (PT) mit Portalvenenast (blau), Ast der A. hepatica (rot) und Gallengang (grün) in den Ecken. Periportale Zone (pp) (1), intermediäre Zone (2), perivenöse/perizentrale Zone (pv) (3)

#### B) Lebersinusoid und Sauerstoffgradient

Hepatozyten (HC), Gallengangskanalikuli (BC), Gallengang (BD), Endothelzellen (EC). HC und EC sind separiert durch den Disse-Raum, hepatische Sternzellen (HC), residente Makrophagen und Kupferzellen (KC) im Sinusoid. Terminale portale Vene (TPV, terminale hepatische Arteriole (THA).

#### C) metabolische Zonierung

Verteilung von Glukose- und Fettsäuremetabolismus. Modifiziert nach 112

### 4.3.1 Regulation des Glukose- und Fettmetabolismus bei chronischer Leberschädigung

Das Endocannabinoidsystem trägt zur Entstehung von Steatose, Dyslipidämie und Insulinresistenz bei.<sup>144</sup> In der vorliegenden Studie wurden auch die Effekte der Modulation am CB1 auf den Leberglukose- und Fettmetabolismus analysiert. Die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glukoneogenese zeigte in der IHC nicht die klare Anfärbung in der periportalen Zone, sondern eine diffuse Verteilung PEPCK-positiver Hepatozyten.<sup>142</sup> Ghafroory et al.<sup>141</sup> konnten zeigen, dass die durch CCl<sub>4</sub>-Injektion hervorgerufene Leberschädigung in Mäusen zu einer starken Veränderung der Genexpression für Enzyme des Glukosemetabolismus in den beschriebenen periportalen und perivenösen Zonen führte. Auch sie konnten zeigen, dass es durch die Schädigung zu nekrotischen Zellen und somit einer inhomogenen Leberstruktur kam. Im Verlauf konnte sich das Parenchym durch Abbau der abgestorbenen Zellen und Regeneration neuer Zellen erholen. Durch die Rimonabant-Behandlung blieb die typische Zonierung der PEPCK-Expression<sup>141</sup> weitgehend erhalten (Abb. 20), was die protektive Wirkung von Rimonabant auch auf metabolischer Ebene widerspiegelt. Auf Genexpressionsebene von *pepck* zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb.22). Die Glukose-Konzentrationen im Serum befanden sich in allen Gruppen im Normbereich (Abb.21).

Es ist bekannt, dass chronische Hyperinsulinämie zu Insulinresistenz führen kann.<sup>145</sup> Es wird angenommen, dass es bei Leberzirrhose zu einer verminderten hepatischen Insulinaufnahme kommt und zusätzlich portosystemische Shunts entstehen. Dies führt zur Hyperinsulinämie und mit der Zeit zur Insulinresistenz und nachfolgend zur Entwicklung der Hyperglykämie.<sup>146</sup> Die Euglykämie in allen Gruppen der vorliegenden Studie ist also vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Mäuse sich im Stadium der Leberfibrose mit kompensiertem Metabolismus, aber noch nicht im Stadium der zirrhotischen Dekompensation mit assoziierter Hyperglykämie befanden.<sup>144</sup>

In verschiedenen Modellen wurde gezeigt, dass die hepatische CB1-Aktivierung die *de novo* Lipogenese mittels Aktivierung von SREBP1c, ACC und FASN erhöht und gleichzeitig die Fettsäureoxidation reduziert.<sup>88,90</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte durch die CB1 Blockade eine Herabregulation von *srebp1c* erzielt werden, was den Beobachtungen aus anderen Modellen entspricht<sup>88,90</sup> (siehe Kapitel 4.1). Im Modell für *diet-induced obesity* konnten Osei-Hyiaman et al. zeigen, dass die CB1 Antagonisierung durch eine Verringerung der Expression von SREBP1c ebenfalls eine Herabregulation von FASN bewirkte, was im Widerspruch zu den hier vorgelegten Daten steht, da sich in der vorliegenden Arbeit eine Regulation der beiden behandelten Gruppen auf

Wildtypniveau zeigte. Die unbehandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe zeigte eine Herabregulation der *fasn* Genexpression (Abb.23).<sup>88</sup> Nichtsdestotrotz zeigt die Normalisierung der *fasn*-Expression durch die Rimonabant-Behandlung, dass die hepatoprotektive Wirkung der Substanzen auch mit der Normalisierung metabolischer Vorgänge assoziiert sein kann. In der IHC für FASN (Abb.24) konnte ebenfalls eine diffuse Verteilung FASN-positiver Hepatozyten in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe und eine Normalisierung der Zonierung in der Rimonabant behandelten Gruppen beobachtet werden.

Triglyzeride werden aus Fettsäuren synthetisiert. Die Analyse der Triglyzeride in der Leber und im Serum zeigten in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich keine signifikanten Unterschiede (Abb.25, 26). Herabgesetzte Triglyzeridlevel in *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mäusen konnten ebenfalls in Studien von Moustafa et al. gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden über die verringerte Aktivität der *stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1)*, welche Fettsäuren zu Phospholipiden und Triglyzeriden umsetzt, erklärt.<sup>147</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der *Scd1* nicht gemessen. Dies wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein, um die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen.

#### **4.3.2 Regulation des Lebermetabolismus durch Peroxysome proliferator-activated receptors im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell**

*Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) sind nukleäre Rezeptoren, die an der Regulation metabolischer Homöostase, Inflammation, Zellwachstum und Differenzierung beteiligt sind.<sup>148</sup> In der Therapie des Typ 2 Diabetes werden PPAR $\alpha$ -, PPAR $\delta$ - und PPAR $\gamma$ -Agonisten als Lipidsenker und Insulinsensitizer angewandt. Es konnte gezeigt werden, dass duale PPAR $\alpha$ /PPAR $\delta$ -Agonisten die hepatische und periphere Insulinsensitivität sowie die Steatose und Inflammation reduzieren.<sup>149,150</sup> PPAR $\alpha$  wird in Hepatozyten vermehrt exprimiert und reguliert den Fettsäuretransport, die  $\beta$ -Oxidation, Glukoneogenese und Inflammation.<sup>150</sup> In der Leber konnte ein protektiver Effekt von PPAR $\alpha$  auf die Entwicklung von NASH und Inflammation über die Herabregulation von NF $\kappa$ B, AP-1, STATs und IL-6 gezeigt werden.<sup>104,148,151</sup> In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Cholestase-Gruppe des unbehandelten *Abcb4*-*Knockouts* eine herabgesetzte Genexpression von *ppara* gegenüber dem WT und der Rimonabant-Gruppe. In der Rimonabant-Gruppe konnte eine Normalisierung des Expressionslevels auf WT-Niveau beobachtet werden, während die Expression von *ppara* bei ACEA-Behandlung unverändert blieb (Abb.22). Vor diesem Hintergrund korrelieren herabgesetzte Inflammation und Erhalt der Leberintegrität in der Rimonabant behandelten Gruppe mit der Aktivierung der *ppara*-Genexpression. Da sich keine

Unterschiede in der Glukosekonzentration im Serum zeigten, scheint die cholestatisch verringerte *ppara*-Expression keine Auswirkungen auf den stabilen hepatischen Glukosemetabolismus auszuüben. Ghafoory et al.<sup>141</sup> konnten im Mausmodell CCl<sub>4</sub>-induzierter Leberschädigung zeigen, dass es zu einer Umstrukturierung der Enzymverteilung kommt. Trotz Zerstörung der normalen Zonierung kam es zu kompensatorischen Mechanismen, um die Funktion der Leber aufrechtzuerhalten und den Schaden zu minimieren.

PPAR $\gamma$  reguliert unter anderem die Differenzierung von Adipozyten und trägt zur Lipidakkumulation in der Leber bei. Diese Effekte werden über die Induktion von SREBP-1c, ACC und FASN moderiert.<sup>152</sup> Interessanterweise wurde die Genexpression von *ppary* in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich zum WT und zur Rimonabant-Gruppe signifikant herabreguliert (Abb.23). Die Rimonabant-Behandlung führte zu einer Normalisierung verglichen mit der WT-Gruppe und zeigte sich ebenfalls signifikant gegenüber der ACEA Gruppe erhöht. Die ACEA-Gruppe zeigte keine Unterschiede gegenüber der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe. Geht man davon aus, dass PPAR $\gamma$  an der Differenzierung von Adipozyten und somit auch an der Entstehung der Steatosis hepatis beteiligt ist, war eine Hochregulation in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe zu erwarten.<sup>152</sup> In einem Modell für alkoholische Leberschädigung in Ratten konnte gezeigt werden, dass der PPAR $\gamma$ -Agonist, Pioglitazone zu einer Suppression der TNF-Produktion und einer Sensitivierung von Kupfferzellen gegenüber Lipopolysacchariden und somit zu einer Reduktion der Leberschädigung führte.<sup>153</sup> Dieser Effekt ist mit den vorliegenden Ergebnissen einer erhöhten *ppary*-Genexpression und geringeren Leberschädigung in der Rimonabant behandelten Gruppe kongruent, auch wenn die genauen zugrunde liegenden Mechanismen zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend zu benennen sind.

In der Rimonabant-Gruppe ist die Genexpression von *srebp-1c* signifikant herabreguliert, was in der Kombination der oben beschriebenen Hochregulation der Genexpression von *ppara* und *ppary* auf die entgegengesetzte Regulation verschiedener Signalwege des Lipidmetabolismus durch die Cholestase und gleichzeitige Antagonisierung des CB1 hindeuten kann. Die unveränderten Triglyzeridlevel in Leber und Serum könnten eine direkte Folge der entgegengesetzten Regulation des Lipidmetabolismus durch die Cholestase und die Modulation des CB1 sein oder einfach nur den Erhalt der Kompensation metabolischer Funktionen zum Messzeitpunkt widerspiegeln. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz, der herangezogen werden kann, beruht auf der ausschließlichen Messung für Triglyzeride. Weitere Lipide, wie zum Beispiel erhöhtes Cholesterin, werden von dem verwendeten

Assay nicht gemessen und können daher dem Gesamtbild der Modulation des Lipidmetabolismus nicht zugeführt werden.

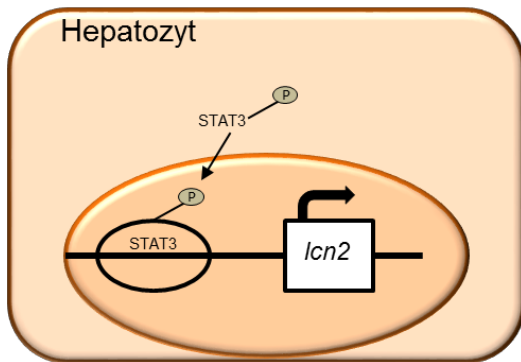
Zusammengefasst sind weder Glukose- noch Fettmetabolismus durch Agonisierung oder Antagonisierung des CB1 beeinflusst, obwohl assoziierte Signalwege reguliert werden. Dies zeigt sich in den fehlenden Unterschieden zwischen den Gruppen bei Messung der Leber- und Serum-Triglyzeride sowie der Glukose im Serum und der Regulation der Genexpression von Signalmolekülen und Enzymen beteiligter Signalwege. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs in den jeweiligen Gruppen, kam es zu großen Streuungen der Ergebnisse, die bei größeren Gruppen homogenere Ergebnisse ergeben hätten. So fielen die Extreme der Ausreißer stärker ins Gewicht (s. Kapitel 4.6.5).

#### **4.4 Herabgesetzte Expression des Akute-Phase-Proteins Lipocalin-2 durch CB1-Antagonisierung**

*Lipocalin-2* (LCN2) oder auch *Neutrophil gelatinase associated Lipocalin* (NGAL) gehört zu der Familie der Lipocaline. Die Lipocaline sind eine Gruppe von Transportern kleiner lipophiler Moleküle wie Steroide, Lipopolysaccharide, Fettsäuren und auch Eisen. Ihren Namen erhielten die Lipocaline aufgrund ihrer Affinität lipophile Substanzen zu binden. Das 25 kDa Glykoprotein LCN2 wurde erstmals von Kjeldsen et al. aus humanen neutrophilen Granulozyten isoliert. Aufgrund seiner Assoziation mit der humanen Gelatinase in Neutrophilen wurde als Synonym für das murine LCN2 das humane Homolog *Neutrophil gelatinase associated Lipocalin* (NGAL) eingeführt.<sup>154</sup> Kurz darauf konnte die komplette Länge der cDNA kloniert werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde davon ausgegangen, dass LCN2 lediglich in myeloischen Zellen synthetisiert wird.<sup>155</sup> In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass LCN2 bakterielles Eisen binden und durch Sequestrierung abbauen kann. Somit wird den Bakterien ein überlebenswichtiger Metabolit entzogen. Diese und weitere Untersuchungen zeigten, dass LCN2 aufgrund dieser Fähigkeit ein Mediator des angeborenen Immunsystems ist und bakteriostatisch wirkt. Die Eisen-bindende Eigenschaft verlieh LCN2 den Namen Siderocalin.<sup>156,157</sup> Es sind zwei LCN2 bindende Rezeptoren bekannt. Megalin und 24p3R, auch LCN2-Receptor (LCN2R) genannt.<sup>158,159</sup> Änderungen in der LCN2 Expression und Funktion konnten in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen nachgewiesen werden. Hierzu gehören die Fettleber, hepatische Inflammation, Hepatitis C, Leberregeneration, akute und chronische Leberschädigung, Zirrhose und Leberversagen.<sup>160–163</sup> LCN2 konnten protektive Funktionen in Modellen für akute und chronische Leberschädigung nachgewiesen werden.<sup>162,164</sup> Diese Ergebnisse

suggerieren, dass LCN2 bei Leberschädigung als intrinsischer „Hilf mir“-Sensor fungiert und somit inflammatorische Zellen rekrutiert. Diese Zellen beginnen den Auslöser der hepatischen Schädigung zu bekämpfen.<sup>165,166</sup> Hepatozyten tragen zu einem geringen Anteil basaler LCN2 Level im Serum bei. Kommt es z.B. zur bakteriellen Infektion, konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten als Hauptproduzent für die erhöhten Serumlevel verantwortlich sind.<sup>167</sup> So ist seine erhöhte Expression in Zellen wie Hepatozyten, neutrophilen Granulozyten, aktivierten Leukozyten und Adipozyten ein guter Biomarker pathologischer vor allem inflammatorischer Zustände der Leber.<sup>167,154,157</sup> Im entzündlichen Gewebe wird die LCN2 Expression u.a. durch Lipopolysaccharide (LPS), Zytokine, Wachstumsfaktoren und hepatotoxische Substanzen induziert. Vor allem die Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10 und der *tumor nekrosis factor alpha* (TNF $\alpha$ ) und der *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF $\kappa$ B) Signalweg sind starke Induktoren von LCN2.<sup>168</sup> LCN2 fungiert im Rahmen der Entzündung als Akute-Phase-Protein (APP). Es konnte bestätigt werden, dass LCN2 ein verlässlicher Indikator für Leberschädigung ist, der sehr gut mit dem Ausmaß der Leberinflammation korreliert und ebenfalls als Marker hepatozellulärer Karzinome diskutiert wird.<sup>164,169,170</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde LCN2 auf mRNA- und immunhistochemischer Ebene sowie im Western Blot untersucht. LCN2 wurde in den unbehandelten Mäusen und der ACEA-Gruppe vermehrt exprimiert, wohingegen die Rimonabant-Gruppe eine normalisierte LCN2-Expression auf WT-Niveau aufzeigte. Dies korreliert mit den Ergebnissen der niedrigeren ALT-Werte. Der Anstieg der LCN2-Expression korrelierte mit dem Ausmaß hepatischer Schädigung in experimentellen Modellen.<sup>168</sup> In einer klinischen Studie konnte ein Anstieg von LCN2 im Urin bei zirrhotischen Patienten gezeigt und anschließend sein Anstieg als prognostischer Marker der Leberzirrhose diskutiert werden.<sup>162</sup>

Des Weiteren wurde STAT3 untersucht. STAT3 ist, wie auch LCN2, ein Downstream-Effektor von IL-6. Die Aktivierung des hepatischen IL-6/IL-6-Rezeptor/STAT3 Signalweges ist durch die Bindung von p-STAT3 an die LCN2-Promoterregion an der Aktivierung von LCN2 beteiligt.<sup>167</sup> Die p-STAT3-Expression korrelierte in der vorliegenden Studie sehr gut mit der LCN2-Expression. Interessanterweise zeigten sich in der unbehandelten Gruppe und der ACEA-Gruppe weder eine Hochregulation von IL-6, NF- $\kappa$ B, I- $\kappa$ B, AKT noch anderer zuvor genannter LCN2 und STAT3 induzierender Mediatoren (Daten nicht gezeigt). So muss davon ausgegangen werden, dass LCN2 über alternative Wege durch die geschädigten Hepatozyten aktiviert wird.



**Abb. 45: Aktivierung der Expression von LCN2 durch STAT3 in Hepatozyten**

STAT3 wird durch Phosphorylierung aktiviert, transloziert in den Zellkern und bindet an der Promoterregion des *lcn2* Gens. *lcn2* wird abgelesen und die Proteinsynthese von LCN2 induziert.

Modifiziert nach <sup>137</sup>

Das Chemokin *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1/CCL2) ist an der konzentrierten Antwort der Leber auf akute und chronische Inflammation beteiligt. Es wird von unterschiedlichen Zellen und Geweben entweder konstitutiv exprimiert oder durch oxidativen Stress, Zytokine und Wachstumsfaktoren getriggert. MCP-1 dirigiert als Chemokin Monozyten und Makrophagen zum Ort des inflammatorischen Geschehens.<sup>171,172</sup> Die *mcp1* Genexpression in der *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe zeigte sich signifikant gegenüber dem WT hochreguliert. Die Rimonabant- und ACEA Gabe zeigte keine signifikanten Unterschiede verglichen mit den anderen Gruppen. Ein weiterer gemessener Marker der Inflammation, das *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), wird konstitutiv von Endothelzellen (EC) in niedrigen Konzentrationen exprimiert. Kommt es zur Stimulation der EC durch entzündliche Prozesse, steigt die ICAM-1 Expression an. ICAM-1 ermöglicht Leukozyten die Adhäsion, das anschließende Rollen entlang von Selectin Molekülen und schließlich die Diapedese durch die interzellulären Spalten. Somit gelangen Leukozyten an den Ort der Entzündung.<sup>173</sup> Auch die durch Rimonabant verminderte Expression von *icam1* korrelierte sehr gut mit den Ergebnissen reduzierter hepatischer Inflammation bei CB1-Antagonisierung, welche durch die geringeren Expression von LCN2 (Abb. 27-29) gezeigt werden konnte. In der H&E Färbung zeigten sich im fibrotisch veränderten Gewebe der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe eine vermehrte Infiltration von Leukozyten (Abb.14).

Zusammenfassend zeigten die Messungen pro-inflammatorischer Marker wie LCN2, p-STAT3, MCP-1 und ICAM-1, den antiinflammatorischen Effekt der Rimonabant-Behandlung, was mit der verringerten Leberschädigung in unserem Modell korreliert.

## 4.5 Die CB1-Antagonisierung vermindert die Leberfibrose im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell

Das Endocannabinoidsystem ist an der Pathogenese der Leberfibrose während chronischer Lebererkrankungen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass in der Analyse menschlicher zirrhotischer Lebern der CB1-Rezeptor stark exprimiert war.<sup>80</sup> Des Weiteren führte die CB1 Antagonisierung sowie der *CB1-Knockout* (*Cnr1*<sup>-/-</sup>) in Mäusen nach *bile duct ligation* und Applikation von *CCl<sub>4</sub>* zu einer herabgesetzten Leberfibrose.<sup>66,80, 174</sup> Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduktion der Kollagendeposition in der Kollagen-1/CK19 Ko-Färbung und der Sirius Red Färbung in Mäusen der Rimonabant behandelten Gruppe gezeigt werden. In der ACEA behandelten und der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe wurde wie erwartet eine vermehrte Kollagendeposition im Vergleich zur WT-Kontrolle beobachtet. Die Kollagen-1/CK19 Ko-Färbung demonstrierte zudem die örtliche Beziehung zwischen der für cholestatische Erkrankungen charakteristischen Gallengangsproliferation und der Kollagenanreicherung. Diese präsentierte sich vor allem in den periportalen Zonen als charakteristische fibröse *onion skin lesions* und als fibröse Septen in Mäusen der ACEA- und unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe.<sup>2</sup> Der Staging Score bewertet den Grad der Fibrose, die architektonische Zerstörung des Lebergewebes sowie die Leberzirrhose.<sup>61, 70,71</sup> Das Staging beschreibt somit die strukturelle Progression der Erkrankung und kann für das Einschätzen der Prognose herangezogen werden. Bewertet wird die Ausdehnung fibrotischen Gewebes in der Leber.<sup>70</sup> Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Zusammenfassend konnte die Rimonabant-Behandlung auf immunhistochemischer Ebene einen protektiven Effekt auf die Fibroseentstehung und -progression bewirken.

Auch auf mRNA Ebene wurden die charakteristischen Gene der Fibrogenese untersucht. Zu den Genen, die für profibrotische Proteine und Enzyme kodieren, gehören unter anderem die gemessenen *col1a1*, *asma*, *tgfb* und *timp1*. Interessanterweise zeigten die drei erstgenannten die stärkste Hochregulation in der Rimonabant-Gruppe. In den Ergebnissen anderer Studien sind diese Marker typischerweise in den Untersuchungen erkrankter Lebern am stärksten hochreguliert. Zieht man die Ergebnisse der Leberintegrität, Akute-Phase-Reaktion und IHC für Kollagen heran, wäre die stärkste Regulation in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe zu erwarten.<sup>66,80,174</sup> TIMP1, welches antifibrotisch wirkende Matrix Metalloproteinasen (MMPs) inhibiert, ist profibrotisch.<sup>175</sup> Die Genregulation von *timp1* zeigte sich in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe am stärksten aktiviert und wird durch die Behandlung mit Rimonabant auf ein normalisiertes WT-Niveau reduziert. Die Aktivierung von MMPs führt zur Auflösung der

Deposition extrazellulärer Matrix (ECM). Somit führt die Aktivität der MMPs zur Fibroseregession.<sup>176,91,175</sup> Hier zeigte sich die stärkste Hochregulation der Gene *mmp2* und *mmp9* in der Rimonabant behandelten Gruppe. Die Ergebnisse der Genregulation von *timp1*, *mmp2* und *mmp9* stützen die Erkenntnisse aus der IHC.

Es muss in Betracht gezogen werden, dass die Hochregulation der MMPs als Konsequenz und Gegenregulation bei Fibroseentstehung aufkommt. Auf dies kann durch die nahezu nicht vorhandene Regulation der MMPs in der WT-Gruppe bei gesteigerter Regulation in allen Gruppen mit *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Hintergrund geschlossen werden. In der WT-Gruppe stimmt die fehlende Detektion von Fibrose mit der ausgebliebenen MMP-Expression überein. In der Rimonabant-Gruppe ist ebenfalls nur eine geringe Fibroseentstehung zu beobachten, eine erhöhte Genregulation von MMP aber vorhanden. Somit muss ein adäquater Stimulus vorhanden sein, um eine Regulation/Expressionssteigerung der MMPs zu induzieren. Zu dieser Annahme passen die zuvor beschriebenen ALT-Werte. Sie zeigen auch eine gewisse Schädigung der Hepatozyten in der Rimonabant-Gruppe an. Gehen Hepatozyten zugrunde, kann die Produktion extrazellulärer Matrix wie z.B. Kollagene das Lebergewebe vorübergehend stützen. Bei Regeneration der Leber wird das Stützgewebe durch MMP abgebaut und wieder durch Hepatozyten ersetzt. Somit kann die Aktivierung der MMP als physiologische Reaktion auf eine vorherige ECM-Entstehung und anschließende Regeneration gewertet werden. Zusammenfassend zeigten die Färbungen für Kollagen-1, Sirius Red und die transkriptionellen Daten für TIMP-1, MMP-2 und MMP-9 die verringerte cholestatisch getriggerte Fibroseentstehung in den Rimonabant behandelten Mäusen.

#### **4.6 CB1-Antagonisierung inhibiert die JNK1-Aktivierung**

Signalwege der *c-Jun-N-terminal Kinase* (JNK) Isoenzyme sind in der Leber an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. Studien konnten zeigen<sup>104,177,178,104,179</sup>, dass JNK1 durch Stimuli wie inflammatorische Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies, Pathogene, Toxine, Medikamente und metabolische Veränderungen aktiviert werden. Als Folgen der JNK1-Aktivierung können über JNK1-Signalwege Zelltod, -überleben und -differenzierung, Inflammation, Proliferation, Metabolismus und Karzinogenese in der Leber reguliert werden.<sup>104,177,178,112,124,180,181,125,107,111,182</sup> JNK1 aktiviert Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Jun, JunB oder ATF2 durch Phosphorylierung. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren translozieren in den Nukleus und steuern dort die Genregulation verschiedener zellulärer Prozesse. Bei akuter und chronischer

Leberschädigung sind insbesondere JNK1 und *downstream*-Signale aktiviert und tragen zur Krankheitsprogression bei.<sup>112,124,125</sup> Es konnte gezeigt werden, dass THC und synthetische Cannabinoide über den CB1-Rezeptor die Induktion von JNK1 stimulieren können. Diese Aktivierung kann durch den selektiven Antagonisten Rimonabant inhibiert werden.<sup>183</sup> In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in Western Blot Analysen in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe, eine vermehrte Aktivierung von JNK1 und seiner direkten *downstream* Transkriptionsfaktoren, c-Jun und STAT3. Der hepatoprotektive Effekt der Rimonabant-Behandlung zeigte sich in einer auf WT-Niveau normalisierten, geringeren Aktivierung von JNK1, c-Jun und STAT3. Die mit ACEA behandelten Mäuse zeigten eine starke Aktivierung dieser Marker. Hiermit wurde gezeigt, dass die CB1 Agonisierung mit dem Liganden ACEA zu einer verstärkten Aktivierung des JNK1-Signalweges führt. Insgesamt korrelieren diese Ergebnisse deutlich mit dem in der Literatur beschriebenen Zusammenhang zwischen CB1 und JNK1-Signalweg.<sup>183</sup> Interessanterweise zeigten sich die charakteristischen Aktivatoren wie MKK4 und MKK7 in diesem Modell nicht reguliert, was möglicherweise auf die Aktivierung durch alternative *upstream*-Signalwege wie z.B. die Aktivierung von JNK1 durch reaktive Sauerstoffspezies, welche im Rahmen chronischer Leberschädigung auftreten<sup>184</sup> hinweist. Des Weiteren konnten Gupta et al. in Ratten Hepatozyten aufzeigen, dass eine direkte Aktivierung von JNK1 durch Taurin-konjugierte Gallensäuren<sup>179</sup>, welche im vorliegenden Modell in der unbehandelten *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Gruppe ebenfalls erhöht waren, induzierbar war. Ziel zukünftiger Forschung wird es sein, die Aktivatoren des JNK1-Signalweges im vorliegenden Modell zu bestimmen und somit weitere Ansatzpunkte für die Inhibition proliferativer Signalwege zu finden. Für die vorliegende Arbeit kann dementsprechend folgende Schlussfolgerung gezogen werden: In der cholestatisch geschädigten Leber kommt es durch Stresstimuli zu einer Aktivierung des Endocannabinoidsystems. Die Aktivierung des Endocannabinoidsystems führt über die Aktivierung des JNK1-Signalweges zur Induktion von Mediatoren der Inflammation, Fibrose und zu metabolischen Störungen. Diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtung gestützt, dass sowohl die Aktivierung des JNK1-Signalweges als auch die pathologischen Auswirkungen als direkte Folge der CB1 Blockade durch Rimonabant unterdrückt werden.<sup>88,63,83</sup>

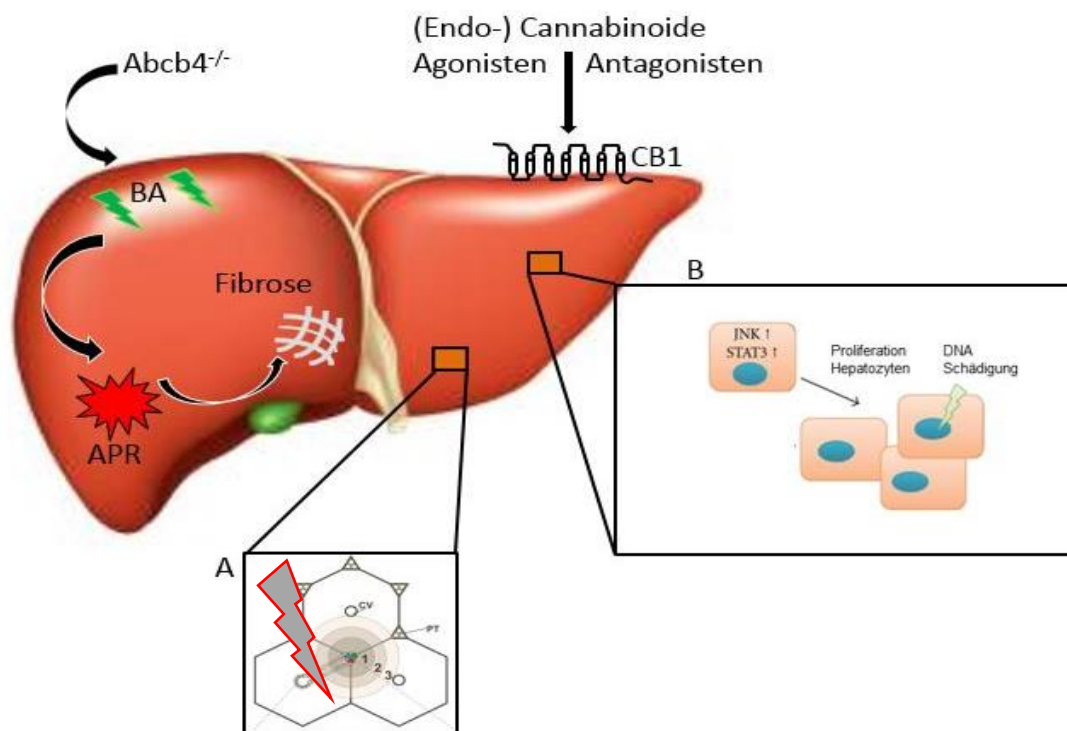
#### **4.6.2 Herabgesetzte JNK1-Aktivierung korreliert mit reduzierter Akute-Phase-Reaktion und Leberfibrose bei CB1-Blockade**

In Abb. 41 wurde gezeigt, dass die Aktivierung von c-Jun sowohl in Hepatozyten (schwarze Pfeile) als auch in Immunzellen und Fibroblasten (schwarze Pfeilspitzen) der

*Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zu finden ist. Die Aktivierung des JNK1-Signalweges durch Stressstimuli wie Zytokine und Chemokine lässt auf eine Beteiligung von JNK1 am inflammatorischen Geschehen schließen.<sup>178</sup> JNK1 ist an der Aktivierung inflammatorisch wirkender Makrophagen beteiligt. Ihre Wirkung entfalten diese über die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen.<sup>185,186</sup> Han et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von JNK1 in Makrophagen zu einem erhöhten inflammatorischen Geschehen in der Leber führt. Dies zeigte sich anhand reduzierter Leukozyteninfiltration und herabgesetzter Zytokin und Chemokin Ausschüttung nach LPS und N-acetyl-galactosamine Stimulation in JNK1-defizienten Mäusen.<sup>177</sup> Kodama et al. konnten im *JNK1-Knockout* Mausmodell eine Resistenz für Diät-induzierte Steatoshepatitis und Leberfibrose nachweisen. Des Weiteren zeigten sie, dass JNK1 aus Kupfferzellen ebenso einen großen Einfluss auf die Entstehung von Leberinflammation und -fibrose hat.<sup>110</sup> Aktiviertes STAT3 stellt einen gemeinsamen Metaboliten der Akuten-Phase-Reaktion und des JNK1-Signalweges dar.<sup>167,187</sup> Die Ergebnisse der Expression von p-JNK1, p-c-Jun, p-STAT3 und LCN2 korrelieren in der vorliegenden Arbeit in hohem Maße. Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch im vorliegenden Mausmodell ein Zusammenhang zwischen herabgesetzter Akute-Phase-Reaktion und herabregulierter JNK1-Aktivierung besteht. Der funktionelle Nachweis müsste durch *loss and gain of function* Experimente oder durch Verwendung entsprechender Knockout-Mäuse belegt werden, was allerdings über die Zielsetzung der vorliegenden Studie hinausgeht. Es konnte eine Hochregulation von p-JNK1 in den Myofibroblasten fibrotischer menschlicher Lebern und in murinen Modellen nach CCl<sub>4</sub>-Applikation oder nach Gallengangsligation (BDL) gezeigt werden.<sup>111</sup> Die Inhibition von pan-JNK1 oder in *JNK1-defizienten* Mäusen entwickelte sich nach Induktion durch CCl<sub>4</sub> oder BDL eine Leberfibrose geringeren Ausmaßes.<sup>111</sup> In der vorliegenden Studie korrelieren das geringe Ausmaß der Leberfibrose, gemessen in der Kollagen-1 und Sirius Red Färbung, mit der Aktivierung von JNK und c-Jun im Western Blot in der Rimonabant behandelten Gruppe. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse aus anderen Studien lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Entstehung von Leberfibrose und der Aktivierung des JNK-Signalweges besteht.

### 4.6.3 Der JNK1-Signalweg bei unkontrollierter Proliferation und Karzinogenese

Alle Leberzirrhose-induzierenden Erkrankungen können die Entstehung eines HCC begünstigen. Ebenso kann das HCC auch direkt aus der Leberinflammation wie es z.B. bei HBV oder der NAFLD auftreten kann, entstehen.<sup>188,189</sup> Typische Auslöser des HCC sind chronische HBV- und HCV-Infektion, chronischer Alkoholkonsum und Aflatoxin-B1-Exposition. Aber auch biliäre Erkrankungen wie die PBC und PSC können über den chronischen Krankheitsprozess zur HCC-Entstehung führen. Die anhaltenden destruktiv-regenerativen Prozesse begünstigen die unkontrollierte Proliferation in der Leber und führen zur HCC-Entstehung. So konnten Mauad et al. und Katzenellenbogen et al. zeigen, dass es im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell für Cholestase zur Inflammations-assoziierten HCC Entstehung kommt. Im Alter von 3 Monaten konnten eine Hochregulation pro-onkogener Signalwege gezeigt und nach 4-6 Monaten erste noduläre Foci im Leberparenchym beobachtet werden.<sup>51,53,190</sup>



**Abb. 46: Histopathologische Progression im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell**

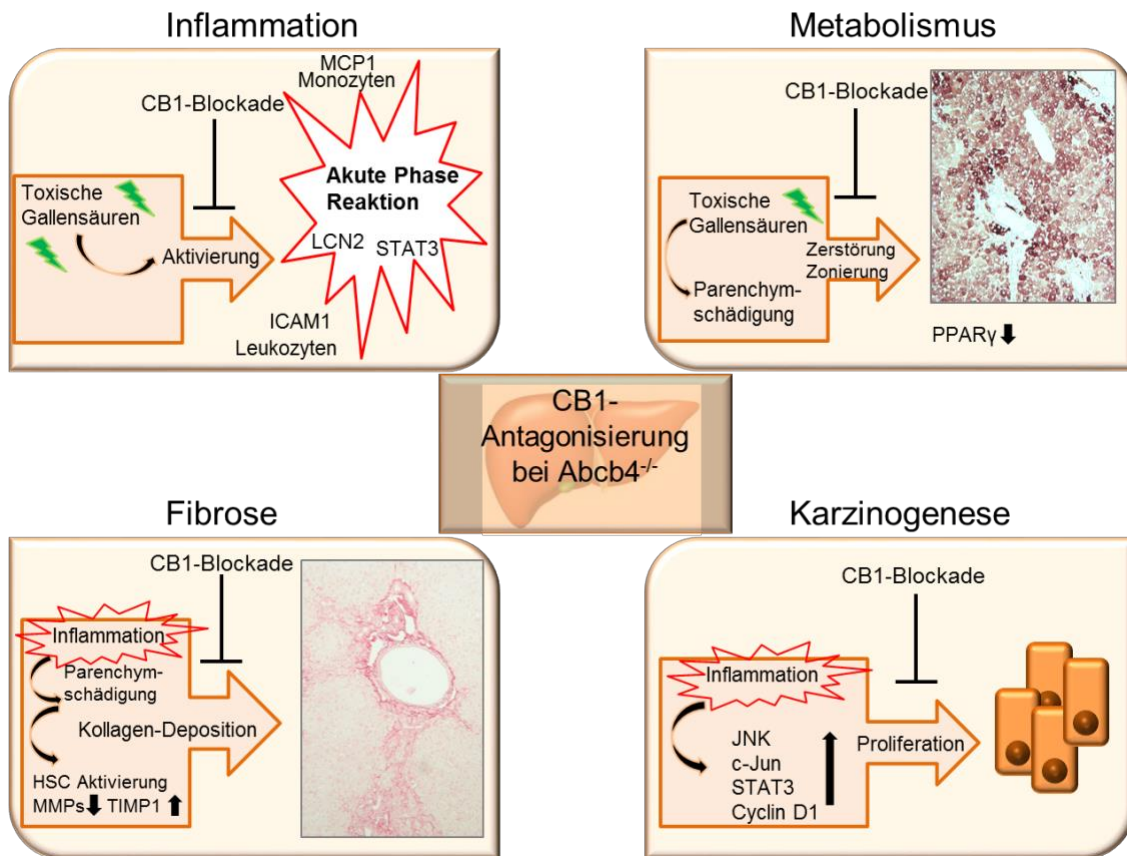
Nach hepatischer Schädigung durch die toxischen Gallensäuren (BA) kommt es zur Inflammation mit Akuter-Phase-Reaktion (APR). Das im Rahmen der Inflammation zugrunde gehende Leberparenchym wird durch fibrotisches Stützgewebe stabilisiert. Kontinuierliche Zyklen destruktiv-regenerativer Prozesse begünstigen die chronische Lebererkrankung mit Störung des Metabolismus und der Auflösung der Leberzonierung (A) sowie Gallengangsproliferation und Leberfibrose. Diese mündet im Status der Leberzirrhose. In Endstadien kommt es zur inflammations-assoziierten HCC-Entstehung mit Beteiligung proliferativer Signalwege (B). Das Endocannabinoidsystem kann bei Aktivierung oder Inhibition diese Prozesse modulieren. (Abb. N. Helmrich)

JNK1 und seine Signalwege sind an Zellproliferation und Tumorgenese beteiligt.<sup>112,124</sup> Die Aktivierung von c-Jun, eines *downstream target* von JNK1 führt zur Entwicklung des HCC durch Suppression des p53-Signalweges.<sup>107</sup> Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des HCC durch eine erhöhte Aktivität des JNK1/c-Jun-Signalweges im p38 $\alpha^{-/-}$  Mausmodell hervorgerufen wird.<sup>191</sup> Eine herabgesetzte Tumorgenese in *JNK1<sup>-/-</sup>*-Mäusen korrelierte mit einer verringerten Zytokinproduktion, reduzierter Cyclin D1 und VEGF Expression und verringertem Zelltod.<sup>113</sup> Im Mausmodell für chemisch induzierte Magentumoren bei *JNK1-Knockout* wurde eine Reduktion der Tumorlast, eine verringerte Tumor-Initiation Rate und -Zellproliferation sowie eine Herabregulation des Zellzyklusregulators Cyclin D1, gezeigt.<sup>182</sup> Konstitutiv aktiviertes STAT3 besitzt ein onkogenes Potential.<sup>116</sup> p-JNK1 ist in der Lage STAT3 durch Phosphorylierung dauerhaft zu aktivieren.<sup>187</sup>

Sowohl p-JNK1 als auch p-c-Jun, p-STAT3 und Cyclin D1 waren in der unbehandelten *Abcb4<sup>-/-</sup>*-Gruppe aktiviert (Fig. 39-43). In der Rimonabant behandelten Gruppe zeigte sich eine Aktivierung auf WT-Niveau. Die Behandlung mit ACEA zeigte keinen Effekt. Die Ergebnisse der Rimonabant behandelten Gruppe sind, entsprechend der Literatur, direkt auf die CB1 abhängige JNK1-Aktivierung<sup>183</sup> oder indirekt auf eine geringere Leberschädigung durch die CB1-Antagonisierung zurückzuführen.<sup>183</sup>

Die intrazellulären Signalwege der Familie der MAPK wie JNK1 sind in malignen Zellen, wie bereits beschrieben, häufig dereguliert und aktiviert.<sup>112,113,115,118,124</sup> Der JNK1-Signalweg stellt durch seine vielfältigen regulatorischen Einflüsse einen zentralen Ansatzpunkt bei der Entstehung physiologischer und pathologischer Zustände dar. Ziel aktueller Forschung ist es, neue Inhibitoren dieser Kinasen zu entwickeln, um maligne Erkrankungen zu behandeln. ATP-kompetitive Inhibitoren, die an der ATP-bindenden Domäne von JNK1 kompetitiv andocken, sind neben ATP-nichtkompetitiven Inhibitoren, reversiblen und irreversiblen Inhibitoren sowie allosterischen Inhibitoren von großem Interesse.<sup>192</sup> Die Herausforderung liegt unter anderem darin, eine möglichst hohe Spezifität für die jeweiligen JNK-Isoformen zu erreichen.

#### 4.6.4 Conclusio



**Abb. 47: Zusammenfassung der Ergebnisse**

Auswirkungen der CB1-Antagonisierung im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell für Cholestase auf die Bereiche Leberinflammation, -metabolismus, -fibrose und -karzinogenese. (Abb. N. Helmrich)

Durch die CB1-Blockade im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell mit Rimonabant, konnte eine Reduktion inflammatorischer und Akute-Phase-Marker wie Lipocalin2, STAT3, MCP1 und ICAM1 gemessen werden. Auf Ebene des Lebermetabolismus kam es durch die Behandlung mit Rimonabant zum Erhalt der Leberzonierung. Durch die CB1-Blockade konnte eine geringere Kollagen-Deposition und somit herabgesetzte Leberfibrose beobachtet werden. Bei Untersuchungen des Leberproliferation und -karzinogenese-assoziierten JNK1-Signalweges wurde eine Normalisierung der Aktivierung auf WT-Niveau beobachtet. Vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur lässt sich daraus schließen, dass der durch CB1-Modulation regulierte JNK1-Signalweg im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell für die hepatische Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt.

#### 4.6.5 Limitationen der Studie

Die Verwendung eines Mausmodells zur Erforschung cholestatischer Erkrankungen und mögliche therapeutische Ansätze hat gegenüber der Zellkultur den Vorteil, dass es z.B. zur Aktivierung des Immunsystems und somit zu Wechselwirkungen zwischen dem cholestatisch veränderten Gewebe und den aktivierten Immunzellen und ihren ausgeschütteten Zytokinen, Chemokinen und aktivierten Signalwegen kommt. Trotz etablierter investigativer Methoden ist die Übertragbarkeit eines Modells auf die humane Situation im Allgemeinen nicht zu 100% gegeben.

Eine weitere Limitation der Studie ist der geringe Stichprobenumfang von 3-6 Tieren pro Gruppe. Eine Vergrößerung der Anzahl von Individuen pro Gruppe hätte die Ergebnisse konsistenter bzw. die Standardabweichung verringern können. Des Weiteren wäre zur Überprüfung der Wirkung der pharmakologischen CB1-Antagonisierung durch Rimonabant das Mitführen einer *Abcb4<sup>-/-</sup>/CB1<sup>-/-</sup>*-Gruppe als Kontrolle interessant gewesen. Durch das Mitführen dieser Gruppe hätte möglicherweise z.B. bei den Ergebnissen gleichgerichteter Effekte von ACEA und Rimonabant eine bessere Aussage darüber getroffen werden können, ob es hier möglicherweise zu CB1-unabhängigen Wirkungen der beiden Medikamente gekommen ist. Eine weitere Limitation der Studie ist der Weg der Medikamentenapplikation über das Trinkwasser, wodurch interindividuell unterschiedliche Wirkstoffkonzentrationen nicht auszuschließen sind. Sowohl die Menge der Aufnahme über den Darm als auch die weitere Metabolisierung bleiben unbekannte Einflussgrößen. Alternativen sind die intravenöse oder intraabdominelle Injektion. Diese Verfahren sind technisch und zeitlich wesentlich aufwändiger. Ethisch betrachtet sind diese invasiven Verfahren schwerer zu rechtfertigen.

#### 4.6.6 Ausblick

Im weiteren Prozess dieses Projektes ist die Züchtung einer *Abcb4<sup>-/-</sup>/Cnr1<sup>-/-</sup>* Mauslinie (CB1-Knockout) sinnvoll. Diese wäre eine ergänzende interne Kontrolle des Effektes des pharmakologischen CB1-Antagonismus mit Rimonabant.

In zukünftigen Untersuchungen ist eine Überprüfung weiterer Ansatzpunkte und Rezeptoren von ACEA und Rimonabant von großer Relevanz. Hier wird es das Ziel sein eine Erklärung für die beschriebenen gleichgerichteten Effekte zu finden.

Trotz des Nachweises einer Aktivierung des JNK1-Signalweges in der unbehandelten und mit ACEA behandelten Gruppe zeigten sich die am besten bekannten JNK1-Aktivatoren in der vorliegenden Arbeit nicht reguliert. Ziel ist die Identifizierung weiterer, hier relevanter, JNK1-Induktoren und somit Ausweitung der möglichen Ansatzpunkte der Inhibition Karzinogenese-assoziiertes Signalwege.

## 5. Zusammenfassung

**Hintergrund** Chronische Lebererkrankungen sind auf Grund hoher Prävalenz und Morbidität von großer gesundheitlicher Relevanz. Die gemeinsame Endstrecke dieser Erkrankungen stellt die Entwicklung von Leberinflammation, -fibrose und -zirrhose dar. An den Folgeerkrankungen wie der portalen Hypertension und dem hepatozellulären Karzinom sterben jährlich weltweit über 740.000 Menschen. Diese Zahl demonstriert die Notwendigkeit der Etablierung neuer und effektiver Therapieoptionen. Durch die Entfernung der Ursache kann in Einzelfällen selbst bei fortgeschrittener Leberzirrhose eine Regeneration der geschädigten Leber erfolgen. Ist dies nicht möglich, besteht bis heute keine effektive Therapie. Anhand verschiedener Modelle für akute und chronische Lebererkrankungen konnte gezeigt werden, dass das Endocannabinoidsystem über die Rezeptoren CB1 und CB2 an der Modulation inflammatorischer, fibrotischer, metabolischer und Karzinogenese-assoziiierter Signalwege beteiligt ist.

**Arbeitshypothese** Die Cholestase im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell wird durch die pharmakologische Antagonisierung des CB1-Rezeptors verzögert bzw. aufgehalten.

**Material und Methoden** Männliche *Abcb4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden nach Absetzen vom Muttertier bis zu einem Alter von 16 Wochen oral mit Rimonabant (Antagonist des CB1-Rezeptors) bzw. ACEA (Agonist des CB1-Rezeptors) behandelt. Nach Tötung der Tiere wurden Leber, Serum und abdominales Fett isoliert und mittels Serumanalytik, qRT-PCR, Western Blot und Immunhistochemie untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mäuse und BALB/c Wildtypen.

**Ergebnisse** Die herabgesetzte Aktivierung des Cannabinoidsystems bei CB1-Antagonismus wurde durch die geringere Expression von *srebp-1c* bestätigt. Cholestase spezifische Symptome, wie Leberschädigung, Gallengangsproliferation und Gallensäurefreisetzung wurden durch die Antagonisierung des CB1 verringert. In der Rimonabant behandelten Gruppe zeigte sich außerdem eine verringerte Akute-Phase-Reaktion. Das Ausmaß der hepatischen Fibrose wurde durch Agonisierung des CB1 Rezeptors gesteigert, während die Antagonisierung keine eindeutige Regulation Fibrose-assoziiierter Marker auf Proteinebene aufzeigte. Der in *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mäusen aktivierte Karzinogenese-assoziierte JNK1-Signalweg wurde durch CB1 Antagonisierung auf Wildtyp-Niveau gesenkt.

**Schlussfolgerung** Zusammenfassend konnte durch die vorliegende Arbeit erstmalig im *Abcb4*<sup>-/-</sup> Mausmodell für Cholestase der protektive Effekt der CB1-Antagonisierung bei chronischer Leberschädigung gezeigt und der mögliche therapeutische Nutzen zur Verhinderung von Leberinflammation, -fibrose und -karzinogenese bestätigt werden.

## 6. Summary

**Background** Chronic liver diseases are exceedingly relevant due to their high prevalence and mortality rates. Their common progression leads to the development of liver inflammation, fibrosis and cirrhosis. Due to comorbidities such as portal hypertension and hepatocellular carcinoma, the global annual death rate reaches up to 740.000. Hence there is a continued interest in establishing new and effective treatments to delay or halt chronic liver disease progression. In individual cases, regeneration of the damaged liver is possible by removing the causative factors. In most cases, if this is not possible there is no effective treatment for progressive liver disease. In various models for acute and chronic liver disease it could be shown that the endocannabinoid system exerts a modulatory effect on inflammatory, fibrotic, metabolic and carcinogenesis-associated pathways through CB1 and CB2 receptors. **Hypothesis** By pharmacological antagonisation of the CB1-receptor in the *Abcb4*<sup>-/-</sup> mouse model, cholestasis can be delayed or halted completely. **Materials and methods** After weaning, male *Abcb4*<sup>-/-</sup> mice were orally treated with Rimonabant (CB1-receptor antagonist) or ACEA (CB1-receptor agonist). Post mortem liver, serum and, abdominal fat were isolated and analyzed by serum analytics, qRT-PCR, Western Blot, and Immunohistochemistry. Untreated *Abcb4*<sup>-/-</sup> mice and BALB/c wildtypes were used as controls. **Results** The downregulation of the cannabinoid system by CB1-antagonisation was verified by lower levels of *srebp-1c* expression. CB1 antagonisation led to a reduction in cholestatic specific symptoms, such as liver damage, bile duct proliferation, and bile leakage. Furthermore, Rimonabant treatment led to a reduced acute-phase reaction. The extent of hepatic fibrosis was increased by CB1-agonisation, whereas receptor antagonisation showed no clear effect on the regulation of fibrosis-associated markers on protein levels. The carcinogenesis-associated JNK1-Pathway was activated in *Abcb4*<sup>-/-</sup> mice, while CB1-antagonisation led to wildtype-like levels. **Conclusion** Using the *Abcb4*<sup>-/-</sup> mouse model for cholestasis, this study shows for the first time the protective effect of the CB1 antagonisation in chronic liver disease and its potential therapeutic benefit to prevent liver inflammation, -fibrosis and -carcinogenesis.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

/

*-/-* · Knockout

---

**2**

2-AG · 2-arachidonoylglycerol

---

**A**

ABC · ATP-binding cassette

*Abcb4<sup>-/-</sup>* · Adenosine triphosphate-binding cassette  
B4

ACC1 · acetyl-CoA carboxylase

ACEA · Arachidonyl-2-chloroethylamide

Activating transcription factor 2 · Siehe

AEA · Anandamid

ALD · alkoholische Lebererkrankung

ALT · Aminotransferase

ANA · Anti-Nukleäre Antikörper

AP · Alkalische Phosphatase, Alkalische Phosphatase

AP-1 · Activator Protein-1

APP · Akute-Phase Protein

APS · Ammoniumpersulfat

Aq. dest. · Aqua destillata

ATP · Adenosintriphosphat

---

**B**

BCIP · 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-  
toluidine salt

BCRP · Breast cancer resistance protein transporter

BSA · Bovines Serum Albumin

BSEP · bile salt export pump

---

**C**

**cAMP** · cyclisches Adenosinmonophosphat

CB1-Rez. · Cannabinoid-Rezeptor 1

CB1-Rez.) · Cannabinoid-Rezeptor-1

CCC · Cholangiokarzinom

cDNA · complementary DNA, complementary DNA

CT · Computertomographie, Cycle threshold

---

---

**D**

DEN · Diethylnitrosamine

DGVS · Deutsche Gesellschaft für Verdauungs-und  
Stoffwechselerkrankungen

---

**E**

EC · Endothelzellen

ECL · Einsteiger-Peroxidase-Substrat für verbesserte  
Chemilumineszenz

ERCP · endoskopische retrograde  
Cholangiopankreatikographie

ERK · extracellular signal-regulated kinase

ER-Stress · Endoplasmatisches Retikulum Stress

ETS transcription factor ELK1 · Siehe

---

**F**

FAS · fatty acid synthase

---

**G**

G-Protein · guanine nucleotide binding protein

GSH · reduced Glutathione

---

**H**

H&E · Hämatoxylin und Eosin

HBV · Hepatitis B Virus

HCC · hepatozellulären Karzinom

HCV · Hepatitis C Virus

HD · high fat diet

HLA · Humanes Leukozyten-Antigen, Humanes  
Leukozyten-Antigen

HRP · Horseradish-Peroxidase

HSC · hepatische Sternzellen

---

**I**

i.S. · im Serum

ICAM-1 · Intercellular Adhesion Molecule 1

IEG · Immediate Early Genes

IgG · Immunglobuline der Klasse G

IHC · Immunhistochemie

Immunglobulin · Siehe, Siehe

---

---

## J

JNK · *c-Jun-N-terminal Kinase*

---

## L

LAP · *Leucin Aminopeptidase*  
LCN2 · *Lipocalin-2, Lipocalin-2*  
LPS · *Lipopolisaccharide*

---

## M

MAP3K · *MAP Kinase Kinase Kinasen*  
MAPK · *mitogen-activated protein kinase*  
MCP-1 · *Monocyte chemotactic Proteine 1*  
MDR · *Multidrug-resistance protein*  
mdr3 · *Multidrug resistance 3*  
MMP · *Matrix Metalloproteinasen*  
mRNA · *messenger RNA*  
MRP · *Multidrug-resistance-associated protein*  
MRT · *Magnetresonanztomographie*

---

## N

NAFLD · *nicht-alkoholische Fettlebererkrankung, Non-alcoholic liver disease*  
NBT · *Nitro-Blue Tetrazolium*  
NGAL · *Neutrophil gelatinase associated Lipocalin*  
NTCP · *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide*

---

## O

OA · *Organic anions*  
OAT · *Organic anion-transporter, Organic anion-transporter*  
OATP · *Organic anion-transporting polyptide*  
OC · *Organic cations*

---

## P

pANCA · *perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper*  
PBC · *primär biliäre Zirrhose*  
PBS · *Phosphate buffered saline*  
PCR · *Polymerase Chain Reaction*  
PDGF · *Platelet-Derived Growth Factor*  
PECK · *Phosphoenolpyruvat Carboxykinase*  
PFIC · *progressive familiäre intrahepatische Cholestase*  
PKA · *Proteinkinase A*  
PKC · *Protein Kinase C*  
PMF · *Portale mesenchymale Myofibroblasten*

---

pp · *periportal*  
PPAR $\gamma$  · *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*  
PSC · *primär sklerosierende Cholangitis*  
pv · *perivenös*  
PVDF · *Polyvinylidenfluorid*

---

## Q

q RT-PCR · *quantitative Real Time PCR*

---

## R

ROS · *reaktive Sauerstoffradikale*  
rRNA · *ribosomale RNA*

---

## S

SIN1-associated protein · *Siehe*  
SRE · *serum response element*  
SREBP-1c · *sterol response element-binding protein 1c*  
STAT3 · *Aktivierter signal transducer and activator of transcription 3*

---

## T

TBS · *Tris buffered saline*  
TGF $\alpha$  · *Transforming growth factor alpha*  
TGF $\beta$ 1 · *Transforming growth factor beta 1*  
THC · *delta-9-tetrahydrocannabinol*  
TIMP · *Tissue inhibitor of metalloproteinases*  
TRE · *TRA- responsive element*  
tRNA · *transkriptionelle RNA*

---

## U

UDCA · *Ursodesoxycholsäure*

---

## V

Vascular Endothelial Growth Factor · *Siehe*  
VEGF · *vaskular endothelial growth factor*

---

## W

w · *Wochen, Wochen*  
WB · *Western Blot*  
WT · *Wildtyp*

---

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Hepatozelluläres Transportsystem.....	- 3 -
Abb. 2: P-Glykoproteine: Struktur und Orientierung in der Membran.....	- 9 -
<b>Abb. 3: Globale Epidemiologie chronischer Lebererkrankungen.</b> .....	- 11 -
Abb. 4: Schematische Darstellung der Haupteffekte des G-Protein gekoppelten CB1.....	- 14 -
Abb. 5: MAP Kinase Signaltransduktion.....	- 17 -
Abb. 6: Regulation von AP-1 durch MAP Kinasen.....	- 18 -
Abb. 7: Der JNK1-Signalweg in Leberzellen.....	- 20 -
Abb. 8: Signalweg des CB1-Rezeptors .....	- 21 -
<b>Abb. 9: Qualitätskontrolle der isolierten RNA</b> .....	- 34 -
Abb. 10: Temperaturprofil des StepOnePlus Gerätes.....	- 37 -
Abb. 11: Projektaufbau und Behandlung der Mäuse.....	- 47 -
Abb. 12: Überprüfung des CB1-Rezeptor-Signalweges .....	- 49 -
Abb. 13: Reduktion der ALT im Serum bei ACEA- und Rimonabant-Behandlung .....	- 50 -
Abb. 14: H&E Färbung zur histologischen Untersuchung der Leber 16 Wochen alter Mäuse ..	- 52 -
-	
<b>Abb. 15: Grading der Leberinflammation</b> .....	- 53 -
Abb. 16: Die immunhistologische Färbung von CK19 zeigt eine verringerte Proliferation der Gallengänge in der Rimonabant-Gruppe .....	- 54 -
Abb. 17: Serum-Konzentration der Alkalischen Phosphatase .....	- 55 -
Abb. 18: Bestimmung der Serum-Gallensäuren bei Rimonabant- und ACEA-Behandlung... -	- 56 -
Abb. 19: Differenzierte Bestimmung der Gallensäuren im Serum der 16 Wochen alten ACEA und Rimonabant behandelte Mäuse. Prädominanz Taurin-konjugierten Gallensäuren .....	- 56 -
Abb. 20: Erhalt der Zonierung in der PEPCK IHC-Färbung in der ACEA- und Rimonabant-Gruppe.....	- 58 -
Abb. 21: Glukose im Serum 16 Wochen alter männlicher Mäuse .....	- 59 -
Abb. 22: Rimonabant-Behandlung normalisiert <i>ppara</i> Genexpression .....	- 60 -
Abb. 23: Rimonabant normalisiert die Expression von <i>fasn</i> und <i>ppary</i> auf WT-Niveau .....	- 61 -
Abb. 24: Erhalt der Zonierung in der FASN IHC-Färbung in den ACEA und Rimonabant behandelten Mäusen.....	- 62 -
Abb. 25: Triglyzeridwerte im Lebergewebe 16 Wochen alter Tiere .....	- 63 -
Abb. 26: Keine Unterschiede in der Messung der Triglyzeride i.S. ....	- 64 -
Abb. 27: Rimonabant-Gruppe reduziert Genexpression von <i>lcn2</i> auf WT-Niveau.....	- 65 -
Abb. 28: Herabgesetzte Expression von LCN2 bei Rimonabant-Behandlung .....	- 66 -
Abb. 29: Die LCN2-Expression wird in Neutrophilen durch die Rimonabant-Behandlung reduziert.....	- 67 -
Abb. 30: Genexpression von <i>mcp-1</i> .....	- 68 -
Abb. 31: Signifikante Reduktion von <i>icam1</i> durch Behandlung mit Rimonabant .....	- 69 -
Abb. 32: Rimonabant-Behandlung vermindert Expression von fibrillärem Kollagen .....	- 70 -
Abb. 33: Rimonabant-Behandlung vermindert Expression von fibrillären Kollagen .....	- 71 -
Abb. 34: Herabgesetzter Grad der Fibrose in der Rimonabant-Gruppe in der Sirius Red Färbung (Staging).....	- 72 -
Abb. 35: Örtliche Beziehung zwischen Kollagendeposition und proliferierenden Gallengängen... -	- 73 -
Abb. 36: Staging der Leberfibrose .....	- 74 -
<b>Abb. 37: Transkriptionelle Induktion profibrotischer Gene durch Rimonabant-Behandlung</b> .....	- 75 -

<b>Abb. 38: Messung antifibrotischer Gene</b> .....	- 77 -
Abb. 39: Reduktion der JNK1-Aktivierung durch Rimonabant.....	- 78 -
Abb. 40: Verminderte Phosphorylierung von c-Jun durch Rimonabant.....	- 78 -
Abb. 41: Verminderte hepatozelluläre Kerntranslokation von p-c-Jun bei Rimonabant- Behandlung .....	- 79 -
Abb. 42: Verminderte p-STAT3-Expression im Western Blot bei Rimonabant-Behandlung..	- 79 -
Abb. 43: Verminderte Genexpression von Cyclin D1 ( <i>ccnd1</i> ) bei Rimonabant-Behandlung .	- 80 -
Abb. 44: Metabolische Zonierung .....	- 85 -
Abb. 45: Aktivierung der Expression von LCN2 durch STAT3 in Hepatozyten .....	- 91 -
Abb. 46: Histopathologische Progression im <i>Abcb4</i> <sup>-/-</sup> Mausmodell .....	- 96 -
Abb. 47: Zusammenfassung der Ergebnisse .....	- 98 -

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einsatzprotokol des <i>Triglyceride Assays</i> .....	- 45 -
---	--------

## 10. References

1. Kuntz E, Kuntz H-D. Hepatology Textbook and Atlas: History · Morphology Biochemistry · Diagnostics Clinic · Therapy. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008.
2. Dancygier H. Clinical Hepatology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.
3. Vree JML de, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:282–287; <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.282>.
4. Ziol M, Barbu V, Rosmorduc O, Frassati-Biaggi A, Barget N, Hermelin B, et al. ABCB4 heterozygous gene mutations associated with fibrosing cholestatic liver disease in adults. *Gastroenterology* 2008;135:131–141; PMID:18482588; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.044>.
5. Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (*Abcb4*) knockout mice. *Gastroenterology* 2004;127:261–274; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.009>.
6. Rao RK, Samak G. Bile duct epithelial tight junctions and barrier function. *Tissue barriers* 2013;1:e25718; PMID:24665411; <https://doi.org/10.4161/tisb.25718>.
7. Chapman RW, Arborgh BA, Rhodes JM, Summerfield JA, Dick R, Scheuer PJ, et al. Primary sclerosing cholangitis: A review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology. *Gut* 1980;21:870–877; <https://doi.org/10.1136/gut.21.10.870>.
8. Thornton JR, Losowsky MS. Opioid peptides and primary biliary cirrhosis. *BMJ (Clinical research ed.)* 1988;297:1501–1504; PMID:3147046.
9. Gittlen SD, Schulman ES, Maddrey WC. Raised histamine concentrations in chronic cholestatic liver disease. *Gut* 1990;31:96–99; PMID:2108078.

10. S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen. Zeitschrift für Gastroenterologie 2017;55:1135–1226; PMID:29141269; <https://doi.org/10.1055/s-0043-120199>.
11. Heinrich PC, Löffler G. Biochemie und Pathobiochemie. Heidelberg: Springer, 2010.
12. Balistreri WF, Bezerra JA, Jansen P, Karpen SJ, Shneider BL, Suchy FJ. Intrahepatic cholestasis: Summary of an American Association for the Study of Liver Diseases single-topic conference. Hepatology (Baltimore, Md.) 2005;42:222–235; PMID:15898074; <https://doi.org/10.1002/hep.20729>.
13. Hatoff DE, Hardison WGM. Bile Acid-Dependent Secretion of Alkaline Phosphatase in Rat Bile. Hepatology 1982;2:433S-439S; <https://doi.org/10.1002/hep.1840020407>.
14. McCune WS, Shorb PE, Moscovitz H. Endoscopic cannulation of the ampulla of Vater: A preliminary report. Annals of surgery 1968;167:752–756; PMID:5646296.
15. Lindkvist B, Benito de Valle M, Gullberg B, Björnsson E. Incidence and prevalence of primary sclerosing cholangitis in a defined adult population in Sweden. Hepatology (Baltimore, Md.) 2010;52:571–577; PMID:20683956; <https://doi.org/10.1002/hep.23678>.
16. Mendes F, Lindor KD. Primary sclerosing cholangitis: Overview and update. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology 2010;7:611–619; PMID:20938459; <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.155>.
17. Lee YM, Kaplan MM. Primary sclerosing cholangitis. The New England journal of medicine 1995;332:924–933; PMID:7877651; <https://doi.org/10.1056/NEJM199504063321406>.
18. Eaton JE, Talwalkar JA, Lazardis KN, Gores GJ, Lindor KD. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. Gastroenterology 2013;145:521–536; PMID:23827861; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.052>.
19. Karlsen TH, Franke A, Melum E, Kaser A, Hov JR, Balschun T, et al. Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis. Gastroenterology 2010;138:1102–1111; PMID:19944697; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.046>.
20. O'Mahony CA, Vierling JM. Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. Seminars in liver disease 2006;26:3–21; PMID:16496229; <https://doi.org/10.1055/s-2006-933559>.
21. Ludwig J, Maccarty RL, Larusso NF, Krom RAF, Wiesner RH. Intrahepatic cholangiectases and large-duct obliteration in primary sclerosing cholangitis. Hepatology 1986;6:560–568; <https://doi.org/10.1002/hep.1840060403>.
22. Ludwig J. Small-duct primary sclerosing cholangitis. Seminars in liver disease 1991;11:11–17; PMID:2047885; <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040417>.
23. Singh S, Talwalkar JA. Primary sclerosing cholangitis: Diagnosis, prognosis, and management. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association 2013;11:898–907; PMID:23454027; <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.02.016>.

24. Weismüller TJ, Trivedi PJ, Bergquist A, Imam M, Lenzen H, Ponsioen CY, et al. Patient Age, Sex, and Inflammatory Bowel Disease Phenotype Associate With Course of Primary Sclerosing Cholangitis. *Gastroenterology* 2017;152:1975-1984.e8; PMID:28274849; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.038>.
25. Wiesner RH, Grambsch PM, Dickson ER, Ludwig J, Maccarty RL, Hunter EB, et al. Primary sclerosing cholangitis: Natural history, prognostic factors and survival analysis. *Hepatology* 1989;10:430-436; <https://doi.org/10.1002/hep.1840100406>.
26. Thorpe ME, Scheuer PJ, Sherlock S. Primary sclerosing cholangitis, the biliary tree, and ulcerative colitis. *Gut* 1967;8:435-448; PMID:6057772.
27. Loftus EV, Harewood GC, Loftus CG, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, et al. PSC-IBD: A unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2005;54:91-96; PMID:15591511; <https://doi.org/10.1136/gut.2004.046615>.
28. Fausa O, Schrupf E, Elgjo K. Relationship of inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Seminars in liver disease* 1991;11:31-39; PMID:2047887; <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040420>.
29. Boonstra K, Weersma RK, van Erpecum KJ, Rauws EA, Spanier BWM, Poen AC, et al. Population-based epidemiology, malignancy risk, and outcome of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2013;58:2045-2055; PMID:23775876; <https://doi.org/10.1002/hep.26565>.
30. Stanich PP, Björnsson E, Gossard AA, Enders F, Jorgensen R, Lindor KD. Alkaline phosphatase normalization is associated with better prognosis in primary sclerosing cholangitis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2011;43:309-313; PMID:21251891; <https://doi.org/10.1016/j.dld.2010.12.008>.
31. Fickert P, Wagner M, Marschall H-U, Fuchsbichler A, Zollner G, Tsybrovskyy O, et al. 24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 2006;130:465-481; PMID:16472600; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.10.018>.
32. Al Mamari S, Djordjevic J, Halliday JS, Chapman RW. Improvement of serum alkaline phosphatase to <1.5 upper limit of normal predicts better outcome and reduced risk of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Journal of Hepatology* 2013;58:329-334; PMID:23085647; <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.013>.
33. Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH. Primary sclerosing cholangitis. *The Lancet* 2013;382:1587-1599; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60096-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60096-3).
34. Gotthardt DN, Rudolph G, Klöters-Plachky P, Kulaksiz H, Stiehl A. Endoscopic dilation of dominant stenoses in primary sclerosing cholangitis: Outcome after long-term treatment. *Gastrointestinal endoscopy* 2010;71:527-534; PMID:20189511; <https://doi.org/10.1016/j.gie.2009.10.041>.

35. Kim WR, Therneau TM, Wiesner RH, Poterucha JJ, Benson JT, Malinchoc M, et al. A revised natural history model for primary sclerosing cholangitis. *Mayo Clinic proceedings* 2000;75:688–694; PMID:10907383; <https://doi.org/10.4065/75.7.688>.
36. Larusso NF, Shneider BL, Black D, Gores GJ, James SP, Doo E, et al. Primary sclerosing cholangitis: Summary of a workshop. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2006;44:746–764; PMID:16941705; <https://doi.org/10.1002/hep.21337>.
37. Jacquemin E, Bernard O, Hadchouel M, Cresteil D, Vree JML de, Paul M, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: From neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* 2001;120:1448–1458; <https://doi.org/10.1053/gast.2001.23984>.
38. Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Kühlkamp T, Keppler D, Häussinger D, et al. Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2005;41:1160–1172; PMID:15841457; <https://doi.org/10.1002/hep.20682>.
39. Falguières T, Aït-Slimane T, Housset C, Maurice M. ABCB4: Insights from pathobiology into therapy. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 2014;38:557–563; PMID:24953525; <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.03.001>.
40. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammert F, et al. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology* 2002;123:1238–1251; PMID:12360485.
41. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1976;455:152–162; [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7).
42. Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, et al. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:4538–4542; PMID:3459187.
43. Chen C-j, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986;47:381–389; [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90595-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90595-7).
44. Higgins C. GM. Is the Multidrugtransporter a Flippase;1992.
45. Bosch I, Croop JM. P-glycoprotein structure and evolutionary homologies. *Cytotechnology* 1998;27:1–30; PMID:19002778; <https://doi.org/10.1023/A:1008080911522>.
46. Lomri N et al. Hepatocellular Transport: Role of ATP Binding Cassette Proteins 1996.
47. A. M. Van der Blik, F. Baas. The human mdr3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver 1987.

48. Gros P, Raymond M, Bell J, Housman D. Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Molecular and cellular biology* 1988;8:2770–2778; PMID:3405218.
49. Buschman E, Arceci RJ, Croop JM, Che M, Arias IM, Housman DE, et al. *mdr2* encodes P-glycoprotein expressed in the bile canalicular membrane as determined by isoform-specific antibodies. *The Journal of Biological Chemistry* 1992;267:18093–18099; PMID:1381362.
50. Ruetz S. Phosphatidylcholine translocase: A physiological role for the *mdr2* gene. *Cell* 1994;77:1071–1081; [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90446-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90446-4).
51. Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP, Smit JJ, Schinkel AH, Notenboom RG, et al. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *The American Journal of Pathology* 1994;145:1237–1245; PMID:7977654.
52. Coleman R, Rahman K. Lipid flow in bile formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1992;1125:113–133; [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90036-U](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90036-U).
53. Katzenellenbogen M, Mizrahi L, Pappo O, Klopstock N, Olam D, Jacob-Hirsch J, et al. Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the *mdr2*-knockout mice. *Molecular cancer research : MCR* 2007;5:1159–1170; PMID:18025261; <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0172>.
54. Ikenaga N, Liu SB, Sverdlov DY, Yoshida S, Nasser I, Ke Q, et al. A New *Mdr2*<sup>-/-</sup> Mouse Model of Sclerosing Cholangitis with Rapid Fibrosis Progression, Early-Onset Portal Hypertension, and Liver Cancer. *The American Journal of Pathology* 2015;185:325–334; <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.10.013>.
55. Hillebrandt S, Goos C, Matern S, Lammert F. Genome-wide analysis of hepatic fibrosis in inbred mice identifies the susceptibility locus *Hfib1* on chromosome 15. *Gastroenterology* 2002;123:2041–2051; PMID:12454860; <https://doi.org/10.1053/gast.2002.37069>.
56. Weissbuch gastroenterologische Erkrankungen 2017: Gegenwart und Zukunft der Versorgung von Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, der Leber und der Bauchspeicheldrüse in Deutschland. Herne: Frischtexte Verlag, 2017.
57. Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2018;38 Suppl 1:2–6; PMID:29427496; <https://doi.org/10.1111/liv.13682>.
58. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 2015;136:E359-86; PMID:25220842; <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
59. Roeb E. Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*

- 2018;68-69:463–473; PMID:29289644;  
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.012>.
60. Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochar F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *The American Journal of Pathology* 1991;138:1233–1242; PMID:2024709.
  61. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2005;115:209–218; <https://doi.org/10.1172/JCI200524282>.
  62. Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134:1655–1669; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>.
  63. Siegmund SV, Schwabe RF. Endocannabinoids and liver disease. II. Endocannabinoids in the pathogenesis and treatment of liver fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2008;294:62; <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00456.2007>.
  64. Wake K. "Sternzellen" in the liver: Perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am. J. Anat.* 1971;132:429–461; <https://doi.org/10.1002/aja.1001320404>.
  65. Yokoi Y, Namihisa T, Kuroda H, Komatsu I, Miyazaki A, Watanabe S, et al. Immunocytochemical Detection of Desmin in Fat-Storing Cells (Ito Cells). *Hepatology* 1984;4:709–714; <https://doi.org/10.1002/hep.1840040425>.
  66. Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveaux V, Lotersztajn S. Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing strategies during chronic liver diseases. *Expert opinion on therapeutic targets* 2007;11:403–409; PMID:17298297; <https://doi.org/10.1517/14728222.11.3.403>.
  67. Novo E, Cannito S, Zamara E, Di Bonzo LV, Caligiuri A, Cravanzola C, et al. Proangiogenic Cytokines as Hypoxia-Dependent Factors Stimulating Migration of Human Hepatic Stellate Cells. *The American Journal of Pathology* 2007;170:1942–1953; <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060887>.
  68. Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, et al. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: Different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999;117:1205–1221; [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70407-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70407-5).
  69. Bosselut N, Housset C, Marcelo P, Rey C, Burmester T, Vinh J, et al. Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: Hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics* 2010;10:1017–1028; PMID:20049859; <https://doi.org/10.1002/pmic.200900257>.
  70. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, Groote J de, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* 1995;22:696–699; [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80226-6](https://doi.org/10.1016/0168-8278(95)80226-6).
  71. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994;19:1513–1520; <https://doi.org/10.1002/hep.1840190629>.
  72. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: A need for reassessment. *Journal of Hepatology* 1991;13:372–374; [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(91\)90084-O](https://doi.org/10.1016/0168-8278(91)90084-O).

73. Desmet VJ, Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis [Hepatology 1981;1: 431–435]. *Journal of Hepatology* 2003;38:382–386; [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00005-9).
74. Lörke J, Erhardt A. Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt* 2007.
75. Castéra L, Le Bail B, Roudot-Thoraval F, Bernard P-H, Foucher J, Merrouche W, et al. Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: Comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores. *Journal of Hepatology* 2009;50:59–68; PMID:19013661; <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.018>.
76. Castera L. Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Non-invasive tests are enough. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2018;38 Suppl 1:67–70; PMID:29427494; <https://doi.org/10.1111/liv.13658>.
77. Ellis EL, Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 2012;56:1171–1180; PMID:22245903; <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.09.024>.
78. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2011;25:195–206; <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.005>.
79. Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: Molecular mechanisms and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2005;45:605–628; PMID:15471534; <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095906>.
80. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Van Nhieu, Jeanne Tran, Deveaux V, Li L, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006;12:671–676; <https://doi.org/10.1038/nm1421>.
81. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561–564; PMID:2165569; <https://doi.org/10.1038/346561a0>.
82. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61–65; PMID:7689702; <https://doi.org/10.1038/365061a0>.
83. Di Marzo V. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacological research* 2009;60:77–84; PMID:19559360; <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.02.010>.
84. Devane W, Hanus L, Breuer A, Pertwee R, Stevenson L, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946–1949; <https://doi.org/10.1126/science.1470919>.
85. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor

- Ligand in Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995;215:89–97; <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>.
86. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine reviews* 2006;27:73–100; PMID:16306385; <https://doi.org/10.1210/er.2005-0009>.
  87. Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and Liver Disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007;294:G9-G12; <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00467.2007>.
  88. Osei-Hyiaman D, DePettillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 2005;115:1298–1305; <https://doi.org/10.1172/JCI200523057>.
  89. Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Current opinion in lipidology* 2007;18:129–140; PMID:17353660; <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32803dbdec>.
  90. Jeong W-i, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay P, et al. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell metabolism* 2008;7:227–235; <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.12.007>.
  91. Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2017; PMID:29221811; <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.11.011>.
  92. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3949261/>.
  93. Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu, Jeanne Tran, Li L, Karsak M, et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005;128:742–755; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.12.050>.
  94. Hézode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani E-S, et al. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;42:63–71; PMID:15892090; <https://doi.org/10.1002/hep.20733>.
  95. Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, et al. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2007;46:122–129; PMID:17526015; <https://doi.org/10.1002/hep.21641>.
  96. Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand J-P, et al. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2003;284:R345-53; PMID:12399252; <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00545.2002>.
  97. van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and

- cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *The Lancet* 2005;365:1389–1397; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66374-X).
98. Sam AH, Salem V, Ghatei MA. Rimonabant: From RIO to Ban. *Journal of obesity* 2011;2011:432607; PMID:21773005; <https://doi.org/10.1155/2011/432607>.
  99. Moreira FA, Crippa JAS. The psychiatric side-effects of rimonabant. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)* 2009;31:145–153; PMID:19578688.
  100. Davis RJ. MAPKs: New JNK expands the group. *Trends in Biochemical Sciences* 1994;19:470–473; [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90132-5).
  101. Davis RJ. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* 2000;103:239–252; [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00116-1).
  102. Haeusgen W, Herdegen T, Waetzig V. The bottleneck of JNK signaling: Molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *European journal of cell biology* 2011;90:536–544; PMID:21333379; <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.11.008>.
  103. Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:7337–7342; <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7337>.
  104. Seki E, Brenner DA, Karin M. A liver full of JNK: Signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* 2012;143:307–320; PMID:22705006; <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.004>.
  105. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 1995;270:16483–16486; PMID:7622446.
  106. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1991;1072:129–157; [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(91\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0304-419X(91)90011-9).
  107. Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David J-P, Rath M, et al. Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 2003;112:181–192; PMID:12553907.
  108. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996;74:589–607; <https://doi.org/10.1007/s001090050063>.
  109. Schnabl B, Bradham CA, Bennett BL, Manning AM, Stefanovic B, Brenner DA. TAK1/JNK and p38 have opposite effects on rat hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2001;34:953–963; PMID:11679966; <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.28790>.
  110. Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Miura K, Taura K, Minicis S de, et al. c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice.

- Gastroenterology 2009;137:1467-1477.e5; PMID:19549522;  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.06.045>.
111. Kluwe J, Pradere J-P, Gwak G-Y, Mencin A, Minicis S de, Osterreicher CH, et al. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition. *Gastroenterology* 2010;138:347–359; PMID:19782079;  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.015>.
  112. Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF. Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J. Clin. Invest.* 2008;118:3943–3953; PMID:19033664; <https://doi.org/10.1172/JCI37156>.
  113. Sakurai T, Maeda S, Chang L, Karin M. Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:10544–10551; PMID:16807293; <https://doi.org/10.1073/pnas.0603499103>.
  114. Johnson RS, van Lingen B, Papaioannou VE, Spiegelman BM. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes & Development* 1993;7:1309–1317;  
<https://doi.org/10.1101/gad.7.7b.1309>.
  115. Trierweiler C, Hockenjos B, Zatloukal K, Thimme R, Blum HE, Wagner EF, et al. The transcription factor c-JUN/AP-1 promotes HBV-related liver tumorigenesis in mice. *Cell death and differentiation* 2016;23:576–582; PMID:26470729; <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.121>.
  116. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an Oncogene. *Cell* 1999;98:295–303;  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81959-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81959-5).
  117. Machida K, Tsukamoto H, Liu J-C, Han Y-P, Govindarajan S, Lai MMC, et al. c-Jun mediates hepatitis C virus hepatocarcinogenesis through signal transducer and activator of transcription 3 and nitric oxide-dependent impairment of oxidative DNA repair. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2010;52:480–492; PMID:20683948; <https://doi.org/10.1002/hep.23697>.
  118. Schwabe RF, Bradham CA, Uehara T, Hatano E, Bennett BL, Schoonhoven R, et al. c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2003;37:824–832; PMID:12668975;  
<https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50135>.
  119. Almeida AS, Faleiros ACG, Teixeira DNS, Cota UA, Chica JEL. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2008;44:429–432;  
<https://doi.org/10.1590/S1676-24442008000600006>.
  120. Kong DY, Park JH, Lee KW, Park H, Cho JA. Comparative Analysis of 3 Experimental Mouse Model for Blood Hematology and Chemistry. *BSL* 2016;22:75–82; <https://doi.org/10.15616/BSL.2016.22.3.75>.
  121. Charles River Research Models. BALB/c Nude Mouse Hematology.
  122. Kruskal, W. H. und Wallis, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis.

123. Batts KP, Ludwig J. An Update on Terminology and Reporting. *The American Journal of Surgical Pathology* 1995;19:1409–1417; <https://doi.org/10.1097/00000478-199512000-00007>.
124. Das M, Garlick DS, Greiner DL, Davis RJ. The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma. *Genes & Development* 2011;25:634–645; PMID:21406557; <https://doi.org/10.1101/gad.1989311>.
125. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, et al. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2006;43:163–172; PMID:16374858; <https://doi.org/10.1002/hep.20999>.
126. Wong MCS, Jiang JY, Goggins WB, Liang M, Fang Y, Fung FDH, et al. International incidence and mortality trends of liver cancer: A global profile. *Scientific Reports* 2017;7:45846; PMID:28361988; <https://doi.org/10.1038/srep45846>.
127. Lotersztajn S, Teixeira-Clerc F, Julien B, Deveaux V, Ichigotani Y, Manin S, et al. CB2 receptors as new therapeutic targets for liver diseases. *British journal of pharmacology* 2008;153:286–289; <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707511>.
128. Marx JO, Vudathala D, Murphy L, Rankin S, Hankenson FC. Antibiotic administration in the drinking water of mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 2014;53:301–306; PMID:24827573.
129. Nishino T, Obana Y. Therapeutic efficacy of intravenous and oral ciprofloxacin in experimental murine infections. *Chemotherapy* 1996;42:140–145; PMID:8697889; <https://doi.org/10.1159/000239433>.
130. Gottardi A de, Spahr L, Ravier-Dall'Antonia F, Hadengue A. Cannabinoid receptor 1 and 2 agonists increase lipid accumulation in hepatocytes. *Liver International* 2010;30:1482–1489; <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02298.x>.
131. Pertwee RG. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International journal of obesity (2005)* 2006;30 Suppl 1:8; <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803272>.
132. Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *British journal of pharmacology* 2000;129:227–230; PMID:10694225; <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703050>.
133. Di Marzo V, Bisogno T, Melck D, Ross R, Brockie H, Stevenson L, et al. Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS letters* 1998;436:449–454; [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01175-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01175-2).
134. Baker CL, McDougall JJ. The cannabinomimetic arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) acts on capsaicin-sensitive TRPV1 receptors but not cannabinoid receptors in rat joints. *British journal of pharmacology* 2004;142:1361–1367; <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705902>.
135. Li L, Chen J, Ni Y, Feng X, Zhao Z, Wang P, et al. TRPV1 activation prevents nonalcoholic fatty liver through UCP2 upregulation in mice.

- Pflugers Archiv : European journal of physiology 2012;463:727–732; PMID:22395410; <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1078-y>.
136. LaRusso NF. Morphology, physiology, and biochemistry of biliary epithelia. *Toxicologic pathology* 1996;24:84–89; PMID:8839285; <https://doi.org/10.1177/019262339602400112>.
  137. Sakisaka S, Kawaguchi T, Taniguchi E, Hanada S, Sasatomi K, Koga H, et al. Alterations in tight junctions differ between primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2001;33:1460–1468; PMID:11391535; <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.25086>.
  138. Smit JJM, Schinkel AH, Elferink RPJO, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Homozygous disruption of the murine MDR2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993;75:451–462; [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90380-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90380-9).
  139. Falany CN, Fortinberry H, Leiter EH, Barnes S. Cloning, expression, and chromosomal localization of mouse liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *Journal of lipid research* 1997;38:1139–1148; PMID:9215542.
  140. Shi D, Zhan X, Yu X, Jia M, Zhang Y, Yao J, et al. Inhibiting CB1 receptors improves lipogenesis in an in vitro non-alcoholic fatty liver disease model. *Lipids in Health and Disease* 2014;13:173; <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-173>.
  141. Ghafoory S, Breitkopf-Heinlein K, Li Q, Scholl C, Dooley S, Wöfl S. Zonation of nitrogen and glucose metabolism gene expression upon acute liver damage in mouse. *PLoS ONE* 2013;8:e78262; PMID:24147127; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078262>.
  142. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annual review of nutrition* 1996;16:179–203; PMID:8839925; <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.001143>.
  143. Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox biology* 2017;11:622–630; PMID:28126520; <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.012>.
  144. Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong W-i, et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J. Clin. Invest.* 2008;118:3160–3169; PMID:18677409; <https://doi.org/10.1172/JCI34827>.
  145. Garvey WT, Olefsky JM, Marshall S. Insulin induces progressive insulin resistance in cultured rat adipocytes. Sequential effects at receptor and multiple postreceptor sites. *Diabetes* 1986;35:258–267; PMID:3512337.
  146. Petrides AS, Vogt C, Schulze-Berge D, Matthews D, Strohmeyer G. Pathogenesis of glucose intolerance and diabetes mellitus in cirrhosis. *Hepatology* 1994;19:616–627; <https://doi.org/10.1002/hep.1840190312>.
  147. Moustafa T, Fickert P, Magnes C, Guelly C, Thueringer A, Frank S, et al. Alterations in lipid metabolism mediate inflammation, fibrosis, and proliferation in a mouse model of chronic cholestatic liver injury.

- Gastroenterology 2012;142:140-151.e12; PMID:22001865;  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.051>.
148. La Poulsen LC, Siersbæk M, Mandrup S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in cell & developmental biology* 2012;23:631–639; PMID:22273692;  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.003>.
149. Cariou B, Hanf R, Lambert-Porcheron S, Zaïr Y, Sauvinet V, Noël B, et al. Dual peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\delta$  agonist GFT505 improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in abdominally obese subjects. *Diabetes care* 2013;36:2923–2930; PMID:23715754;  
<https://doi.org/10.2337/dc12-2012>.
150. Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\delta$  agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2013;58:1941–1952; PMID:23703580; <https://doi.org/10.1002/hep.26461>.
151. Stienstra R, Mandard S, Patsouris D, Maass C, Kersten S, Müller M. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology* 2007;148:2753–2763; PMID:17347305; <https://doi.org/10.1210/en.2007-0014>.
152. Schadinger SE, Bucher NLR, Schreiber BM, Farmer SR. PPAR $\gamma$ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 2005;288:E1195-205; PMID:15644454;  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00513.2004>.
153. Enomoto N, Takei Y, Hirose M, Konno A, Shibuya T, Matsuyama S, et al. Prevention of ethanol-induced liver injury in rats by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , pioglitazone. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2003;306:846–854; PMID:12805475; <https://doi.org/10.1124/jpet.102.047217>.
154. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *The Journal of Biological Chemistry* 1993;268:10425–10432; PMID:7683678.
155. Bundgaard JR, Sengeløv H, Borregaard N, Kjeldsen L. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding NGAL: A lipocalin expressed in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994;202:1468–1475; PMID:8060329;  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2096>.
156. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell* 2002;10:1033–1043; [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00708-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00708-6).
157. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004;432:917–921; PMID:15531878;  
<https://doi.org/10.1038/nature03104>.

158. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS letters* 2005;579:773–777; PMID:15670845; <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.031>.
159. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 2005;123:1293–1305; PMID:16377569; <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.027>.
160. Asimakopoulou A, Weiskirchen R. Lipocalin 2 in the pathogenesis of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical Lipidology* 2015;10:47–67; <https://doi.org/10.2217/clp.14.65>.
161. Asimakopoulou A, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Lipocalin 2 (LCN2) Expression in Hepatic Malfunction and Therapy. *Frontiers in physiology* 2016;7:430; PMID:27729871; <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00430>.
162. Ariza X, Graupera I, Coll M, Solà E, Barreto R, García E, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a biomarker of acute-on-chronic liver failure and prognosis in cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2016;65:57–65; PMID:26988732; <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.002>.
163. Wieser V, Tymoszuk P, Adolph TE, Grandner C, Grabherr F, Enrich B, et al. Lipocalin 2 drives neutrophilic inflammation in alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology* 2016;64:872–880; PMID:26682726; <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.037>.
164. Borkham-Kamphorst E, van de Leur E, Zimmermann HW, Karlmark KR, Tihaa L, Haas U, et al. Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. *Biochimica et biophysica acta* 2013;1832:660–673; PMID:23376114; <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.01.014>.
165. Asimakopoulou A, Borkham-Kamphorst E, Tacke F, Weiskirchen R. Lipocalin-2 (NGAL/LCN2), a "help-me" signal in organ inflammation. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2016;63:669–671; PMID:26054053; <https://doi.org/10.1002/hep.27930>.
166. Schroll A, Eller K, Feistritzer C, Nairz M, Sonnweber T, Moser PA, et al. Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality. *European journal of immunology* 2012;42:3346–3357; PMID:22965758; <https://doi.org/10.1002/eji.201142351>.
167. Xu M-J, Feng D, Wu H, Wang H, Chan Y, Kolls J, et al. Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: A critical role for IL-6/STAT3. *Hepatology* 2015;61:692–702; <https://doi.org/10.1002/hep.27447>.
168. Borkham-Kamphorst E, Drews F, Weiskirchen R. Induction of lipocalin-2 expression in acute and chronic experimental liver injury moderated by pro-inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  through nuclear factor- $\kappa$ B activation: LCN2 induction in acute and chronic experimental liver injury. *Liver International* 2011;31:656–665; <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02495.x>.

169. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 2012;1826:129–169; PMID:22513004; <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.008>.
170. Li C, Chan YR. Lipocalin 2 regulation and its complex role in inflammation and cancer. *Cytokine* 2011;56:435–441; PMID:21855366; <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.07.021>.
171. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2009;29:313–326; PMID:19441883; <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>.
172. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS letters* 1989;244:487–493; [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80590-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80590-3).
173. Sumagin R, Sarelius IH. A role for ICAM-1 in maintenance of leukocyte-endothelial cell rolling interactions in inflamed arterioles. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2007;293:H2786-98; PMID:17704289; <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00720.2007>.
174. Giannone FA, Baldassarre M, Domenicali M, Zaccherini G, Trevisani F, Bernardi M, et al. Reversal of liver fibrosis by the antagonism of endocannabinoid CB1 receptor in a rat model of CCl(4)-induced advanced cirrhosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2012;92:384–395; <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.191>.
175. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *Journal of Hepatology* 2007;46:955–975; PMID:17383048; <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.02.003>.
176. Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007;45:213–222; <https://doi.org/10.1002/hep.21477>.
177. Han MS, Barrett T, Brehm MA, Davis RJ. Inflammation Mediated by JNK in Myeloid Cells Promotes the Development of Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cell reports* 2016;15:19–26; PMID:27052181; <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.008>.
178. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) — from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology* 1998;10:205–219; [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80143-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80143-9).
179. Gupta S, Stravitz RT, Dent P, Hylemon PB. Down-regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:15816–15822; PMID:11278771; <https://doi.org/10.1074/jbc.M010878200>.

180. Sabio G, Davis RJ. cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): Roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends in Biochemical Sciences* 2010;35:490–496; PMID:20452774; <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.004>.
181. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002;420:333–336; PMID:12447443; <https://doi.org/10.1038/nature01137>.
182. Shibata W, Maeda S, Hikiba Y, Yanai A, Sakamoto K, Nakagawa H, et al. c-Jun NH2-terminal kinase 1 is a critical regulator for the development of gastric cancer in mice. *Cancer Research* 2008;68:5031–5039; PMID:18593901; <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6332>.
183. Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzmán M. The CB 1 Cannabinoid Receptor Is Coupled to the Activation of c-Jun N-Terminal Kinase. *Mol Pharmacol* 2000;58:814–820; <https://doi.org/10.1124/mol.58.4.814>.
184. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of carcinogenesis* 2006;5:14; PMID:16689993; <https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>.
185. Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cellular Signalling* 2014;26:192–197; PMID:24219909; <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.004>.
186. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000prime reports* 2014;6:13; PMID:24669294; <https://doi.org/10.12703/P6-13>.
187. Lim CP, Cao X. Serine Phosphorylation and Negative Regulation of Stat3 by JNK. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:31055–31061; <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.31055>.
188. Yu L-X, Ling Y, Wang H-Y. Role of nonresolving inflammation in hepatocellular carcinoma development and progression. *NPJ precision oncology* 2018;2:6; PMID:29872724; <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0048-z>.
189. Bishayee A. The role of inflammation and liver cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 2014;816:401–435; PMID:24818732; [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0837-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0837-8_16).
190. Katzenellenbogen M. Multiple Adaptive Mechanisms to Chronic Liver Disease Revealed at Early Stages of Liver Carcinogenesis in the Mdr2-Knockout Mice. *Cancer Research* 2006;66:4001–4010; <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2937>.
191. Hui L, Bakiri L, Mairhorfer A, Schweifer N, Haslinger C, Kenner L, et al. p38 $\alpha$  suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK–c-Jun pathway. *Nature Genetics* 2007;39:741–749; <https://doi.org/10.1038/ng2033>.
192. Messoussi A, Feneyrolles C, Bros A, Deroide A, Daydé-Cazals B, Chev e G, et al. Recent progress in the design, study, and development of c-Jun N-terminal kinase inhibitors as anticancer agents. *Chemistry & biology* 2014;21:1433–1443; PMID:25442375; <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.007>.

## 11. Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht oder präsentiert:

**1. „Therapeutische Effekte der Modulation des Endocannabinoid-Rezeptor Signalwegs“**

32. Jahrestagung der German Association of the Study of the Liver, GASL, 2016, Z Gastroenterol 2015, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York

**2. “Therapeutic effects from modulation of the Cannabinoid-Receptor 1–signaling”**

Falk Foundation Symposia, Communication and System Relevance in Liver Damage and Regeneration, 2016

**3. „Interleukin-13-Knockout reduziert die humorale Gallensäurekonzentration und Leberschädigung in Abcb4-Knockout Mäusen“**

123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM), 2017

**4. „Reduktion Karzinogenese-assoziiertes Signalwege durch pharmakologische Inhibition des Cannabinoid-Rezeptor-1 im murinen *Abcb4*<sup>-/-</sup> Modell“**

34. Jahrestagung der German Association of the Study of the Liver, GASL, 2018; Z Gastroenterol 2017, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York

**5. “Reduction of carcinogenesis-associated pathways by pharmacological inhibition of the Cannabinoid-Receptor-1 in the murine *Abcb4*<sup>-/-</sup>-model”**

Falk Foundation Symposia, Liver-Gut-Microbiome Interactions, 2018

## 12. 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.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 13. Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Roeb für die Überlassung des Themas, die vielen Vorschläge zur Optimierung meiner Arbeit und ganz besonders für die Förderung und Unterstützung der regelmäßigen Vorstellung meiner Arbeit im Rahmen von AG internen Reports und jährlichen Kongressen bedanken. Dies sorgte immer für Inspiration und frische Motivation.

Des Weiteren geht mein großer Dank an Herrn PD Dr. Martin Roderfeld für seine Betreuung, konstruktiven Besprechungen und sehr hilfreiche Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Zudem geht mein herzlicher Dank an Dr. Yura Churin für seine Ideen, das regelmäßiges Hinterfragen und die Weitergabe seines fundierten Wissens.

Vielen herzlichen Dank an Annette Tschuschner für die geduldige und strukturierte Einarbeitung in die Methoden sowie die regelmäßige Unterstützung im weiteren Prozess.

Insbesondere möchte ich mich bei Franziska Schneider bedanken, die mit ihrer unermüdlichen Arbeitsmoral auch meine Motivation vorangetrieben hat. Ich konnte dir nur in „blau-weiß“ Beine machen.

Zudem geht mein sehr großer Dank an Frau Dr. Anita Windhorst und ihre hervorragende Unterstützung bei statistischen Fragen und Herausforderungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem Prägraduierten Kolleg der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Medizin, für die regelmäßigen wissenschaftlichen Vorträge und die großzügige finanzielle Unterstützung bedanken.

Zudem geht mein herzlicher Dank an Can Winzek, der sich um das ein oder andere Komma gekümmert hat.

Eine ausgesprochen großer Dank geht an Thomas Franke, der mit Geduld und Akribie den inhaltlichen und sprachlichen Ungereimtheiten auf den Grund gegangen ist.

Ich danke von Herzen meinen Eltern und meinem Bruder, die mich in jedem Alter, jeder Lebenslage und in jedem Vorhaben liebevoll unterstützen. Es ist wunderbar einen solch starken Rückhalt zu haben.