

Lokalisation und Bedeutung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase bei der Leberfibrose in der Maus

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**



vorgelegt von

Fabian Schwiering

aus Hattingen

Würzburg 2019

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1 Gutachter: _____

2 Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Perizyten	2
1.1.1	Perizyten-Marker	4
1.2	Die Leber	5
1.2.1	Mikroskopischer Aufbau der Leber	6
1.2.1.1	Hepatische Sternzellen (HSC)	9
1.3	Leberfibrose	9
1.3.1	Pathogenese der Leberfibrose	10
1.3.1.1	Myofibroblasten	10
1.3.1.2	Extrazelluläre Matrix (EZM)	11
1.3.1.3	Matrix-Metalloproteasen (MMPs)	12
1.3.1.4	Der TGF- β 1-Signalweg	12
1.3.1.5	PDGF-Signalweg	13
1.3.1.6	Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-(PPAR-)Signalweg	13
1.3.1.7	<i>Bone morphogenetic-Proteins</i> -(BMPs-)Signalweg	14
1.3.2	Auflösung der Leberfibrose	14
1.4	Die NO/cGMP-Signalkaskade	15
1.4.1	Bildung von NO und dessen physiologische Aufgaben	16
1.4.2	Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC)	17
1.4.3	cGMP und seine Effektoren	18
1.4.3.1	cGMP-abhängige Proteinkinasen	18
1.4.3.2	cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs)	18
1.5	Transgene Mausmodelle	21
1.5.1	Globaler NO-GC Knockout (GCKO)	21
1.5.2	Zellspezifischer Knockout der NO-GC	21
1.5.3	Reportermause	22
2	Zielsetzung	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Verwendete Geräte	25
3.1.2	Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	26
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	28
3.1.4	Enzyme	29
3.1.5	Antikörper	29
3.1.6	Oligonukleotide	30
3.2	Methoden	31

3.2.1	Tiere	31
3.2.1.1	Haltung	31
3.2.1.2	Zucht	31
3.2.1.3	Induktion der zellspezifischen Knockout-Tiere und Reportermause	31
3.2.1.4	Fibrose-Modell	31
3.2.2	Zellkultur	33
3.2.2.1	Isolierung der Zellen	33
3.2.2.2	Kultivierung der Zellen	33
3.2.2.3	Behandlung mit Substanzen	34
3.2.3	Molekulargenetische Methoden	34
3.2.3.1	Isolierung von genomischer DNA	34
3.2.3.2	Isolierung von RNA (mittels RNeasy® Mini Kit)	35
3.2.3.3	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	35
3.2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.2.3.5	cDNA-Synthese	36
3.2.3.6	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	37
3.2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.2.4	Proteinbiochemische Methoden	40
3.2.4.1	Isolierung von Proteinen aus Zellen	40
3.2.4.2	Isolierung von Proteinen aus Gewebe	40
3.2.4.3	Proteinbestimmung mittels BCA-Test	41
3.2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.2.4.5	Coomassie-Färbung	42
3.2.4.6	Western-Blot	42
3.2.4.7	Immundetektion mittels Chemilumineszenz	43
3.2.5	Immunhistochemie	43
3.2.5.1	In der Immunhistochemie verwendete Lösungen und Puffer	43
3.2.5.2	PFA-Fixierung von Zellen	43
3.2.5.3	PFA-Fixierung von Gewebe	44
3.2.5.4	Anfertigen von Kryoschnitten	44
3.2.5.5	Pikrosiriusrot-(PSR-)Färbung	44
3.2.5.6	Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen in Zellen	44
3.2.5.7	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen an Gewebeschnitten	45
3.2.5.8	<i>TdT-mediated-dUTP-biotin-nick-end-labeling</i> -(TUNEL-)Test	45
3.2.5.9	Visualisierung	46
3.2.6	Statistik	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Perizyten der Lunge	47
4.1.1	Isolierung und Kultivierung von Perizyten aus der Lunge	47
4.1.2	Charakterisierung von aus der Lunge isolierten Perizyten	50
4.1.3	NO-GC-Expression in isolierten Lungenperizyten	50
4.1.4	Stimulation der Lungenperizyten mit TGF-β1	52
4.2	Analyse der NO-GC-Expression in der murinen Leber	56
4.2.1	Die NO-GC-Expression in der Leber	56

4.2.2	Deletion der NO-GC in der murinen Leber	60
4.2.3	Untersuchung der CCl ₄ -induzierten Leberfibrose	60
4.2.4	Expression der NO-GC in der fibrotischen Leber	65
4.2.4.1	NO-GC-Expression in Myofibroblasten	65
4.2.5	Vergleich der Leberfibrose zwischen WT und GCKO	68
4.2.6	Auflösung der Leberfibrose	73
4.3	<i>Lineage Tracing</i> von HSC	76
4.3.1	Verteilung und Identifizierung der PDGFR β -Tomato-Zellen in der Leber . . .	76
4.3.1.1	PDGFR β -Tomato-Zellen in der CCl ₄ -induzierten Leberfibrose	79
4.3.1.2	Unterschiede in der Fibrose zwischen WT und PDGFR β -GCKO	79
4.3.1.3	Verteilung der PDGFR β -Tomato-Zellen nach Auflösung der Leberfibrose	82
4.3.2	Verteilung und Identifizierung der SM/MHC-Tomato-Zellen in der Leber . . .	84
4.3.2.1	SM/MHC-Tomato ⁺ -Zellen in der Leberfibrose	87
4.3.2.2	NO-GC Expression in der Leber von SM/MHC-GCKO-Mäusen	90
4.3.2.3	Unterschiede in der Fibrose zwischen WT und SM/MHC-GCKO	90
4.3.2.4	Verteilung der SM/MHC-Tomato-Zellen nach Auflösung der Leberfibrose	93
4.3.2.5	Einfluss der NO-GC-Deletion in SM/MHC-GCKO auf die Leberfibrose .	96
5	Diskussion	100
5.1	Die NO-GC-Expression in isolierten Perizyten aus der Lunge	100
5.2	Die NO-GC-Expression in der Leber	103
5.3	Die CCl ₄ -induzierte Leberfibrose	104
5.3.1	Die NO-GC-Expression in der fibrotischen Leber	106
5.4	Die HSC in der CCl ₄ -induzierten Leberfibrose	106
5.5	Die HSC in der Auflösung der Leberfibrose	108
5.6	Der Einfluss der NO-GC auf die Pathogenese der Leberfibrose	110
6	Zusammenfassung	112
7	Summary	114
	Literaturverzeichnis	i
	Danksagung	xxxvi

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Darstellung der Fibroseentstehung in verschiedenen Organen und Tumoren	2
Abbildung 1.2:	Anatomie der Perizyten	4
Abbildung 1.3:	Anatomie der Leber	7
Abbildung 1.4:	Ausschnitt eines Leberläppchens	8
Abbildung 1.5:	Morphologie einer HSC in der Leber	10
Abbildung 1.6:	Die NO/cGMP-Signalkaskade	20
Abbildung 3.1:	Generierung der Knockout-Mausmodelle	32
Abbildung 3.2:	Berechnung von $\Delta\Delta C_p$	38
Abbildung 4.1:	Kultivierung von isolierten Lungenperizyten mit verschiedenen Medien .	49
Abbildung 4.2:	Charakterisierung der kultivierten Lungenperizyten	51
Abbildung 4.3:	Expression der NO-GC in Lungenperizyten aus WT und GCKO	54
Abbildung 4.4:	Die α -SMA-Expression in Lungenperizyten nach Stimulation mit TGF- β 1	55
Abbildung 4.5:	Die NO-GC-Expression in der murinen Leber	57
Abbildung 4.6:	Lokalisation der NO-GC in der murinen Leber	58
Abbildung 4.7:	Expression der NO-GC in der murinen Leber	59
Abbildung 4.8:	Deletion der NO-GC in der murinen Leber	61
Abbildung 4.9:	CCl ₄ -induzierte Leberfibrose in der murinen Leber	62
Abbildung 4.10:	Ergebnisse der Flächenauswertung und qPCR für WT-Tiere	64
Abbildung 4.11:	NO-GC-exprimierende Zellen in der CCl ₄ -induzierten Leberfibrose . . .	66
Abbildung 4.12:	Die α -SMA-Expression in der CCl ₄ -induzierten Leberfibrose	67
Abbildung 4.13:	Die NO-GC-Expression in GCKO-Tieren bei CCl ₄ -induzierter Leberfibrose	69
Abbildung 4.14:	Kollagenbestimmung und TGF- β 1-Signalweg in WT und GCKO Leber .	70
Abbildung 4.15:	Ergebnisse der Flächenauswertung und qPCR für WT- und GCKO-Tiere	72
Abbildung 4.16:	Auflösung der CCl ₄ -induzierten Leberfibrose in der murinen Leber . . .	74
Abbildung 4.17:	Auflösung der CCl ₄ -induzierten Leberfibrose in der murinen Leber . . .	75
Abbildung 4.18:	Verteilung von PDGFR β -Tomato-Zellen in der murinen Leber	77
Abbildung 4.19:	NO-GC-Expression in PDGFR β -Tomato-Zellen in der murinen Leber . .	78
Abbildung 4.20:	Verteilung der PDGFR β -Tomato-Zellen in der Leberfibrose	80
Abbildung 4.21:	Ergebnisse der Flächenauswertung und qPCR für WT- und PDGFR β -GCKO-Tiere	81
Abbildung 4.22:	Verteilung der PDGFR β -Tomato-Zellen nach der Auflösung der Leberfibrose	83
Abbildung 4.23:	Verteilung von SM/MHC-Tomato-Zellen in der murinen Leber	85
Abbildung 4.24:	Die NO-GC-Expression in SM/MHC-Tomato-Zellen in der murinen Leber	86
Abbildung 4.25:	Verteilung der SM/MHC-Tomato-Zellen in der Leberfibrose	88

Abbildung 4.26: Verteilung der SM/MHC-Tomato-Zellen in der Leberfibrose	89
Abbildung 4.27: Die NO-GC-Expression in der gesunden und fibrotischen SM/MHC-GCKO-Leber	91
Abbildung 4.28: Ergebnisse der Flächenauswertung und qPCR für WT- und SM/MHC-GCKO-Tiere	92
Abbildung 4.29: Verteilung der SM/MHC-Tomato-Zellen nach der Auflösung der Leberfibrose	94
Abbildung 4.30: Die NO-GC-Expression in SM/MHC-Tomato-WT- und -GCKO-Tieren nach Auflösung der Leberfibrose	95
Abbildung 4.31: Untersuchung des Einflusses der Deletion der NO-GC in SM/MHC-GCKO-Tieren	98
Abbildung 4.32: Verteilung der Kupfer-Zellen in gesunder und fibrotischer Leber aus WT und SM/MHC-GCKO	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Perizyten-Marker	5
Tabelle 3.1: Verwendete Geräte, Typenbezeichnung und Hersteller	25
Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	26
Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien, Kits und Hersteller	28
Tabelle 3.4: Verwendete Enzyme und Hersteller	29
Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper, Wirt, Verdünnung und Hersteller	29
Tabelle 3.6: Verwendete Oligonukleotide	30
Tabelle 3.7: Eingesetzte Zellzahlen in Abhängigkeit der Fläche	33
Tabelle 3.8: Eingesetzte Mediummenge in Abhängigkeit von der Größe des verwendeten Kulturgefäßes	34
Tabelle 3.9: Programm für die PCR	36
Tabelle 3.10: Programm für die cDNA-Synthese	37
Tabelle 3.11: Programm für die RT-PCR	38
Tabelle 3.12: Eingesetztes RIPA-Volumen in Abhängigkeit von der Größe des verwendeten Kulturgefäßes	40
Tabelle 5.1: HSC-Subpopulationen und deren Schicksale	109

Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	Glattmuskelzellaktin	IRAG	Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptor-assoziiertes cGMP-Kinasesubstrat
BM	Basalmembran	LRAT	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
bp	Basenpaare	LSEC	Leber-Sinus-Endothelzellen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	Ly6C	Lymphozyten-Antigen-6-Komplex
CCl₄	Tetrachlormethan	MAP	Mitogenaktiviertes Protein
CD31	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1)	MMP	Matrix-Metalloproteasen
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
CP	<i>Crossing Point</i>	NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
Cre	<i>Cyclization-recombination</i>	NG2	Neuronales/Gliales Antigen-2
CreER^{T2}	Cre-Recombinase mit einer modifizierten Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne	NK	Killerzellen
Col1α1	Kollagen Typ I α 1	nNOS	neuronale NOS
Col3α1	Kollagen Typ III α 1	NO	Stickstoffmonoxid
CYP	Zytochrom-P450	NO-GC	NO-sensitive Guanylyl-Cyclase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	NOS	NO-Synthase
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche	OHT	Hydroxytamoxifen
dsDNA	<i>Double-strain-DNA</i>	PDE	Phosphodiesterase
E	Effizienz	PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor
EMT	Epithelial-mesenchymaler Übergang	PDGFRα	Blutplättchen-Wachstumsfaktor- α
eNOS	endotheliale NOS	PDGFRβ	Blutplättchen-Wachstumsfaktor- β
ER	Estrogenrezeptor	PF	portale Fibroblasten
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factor</i>	PFA	Paraformaldehyd
ERK	regulierte Kinasen mit extrazellulärem Signal	PI3	Phosphoinositid-3
ESB	DNA-Einzelstrangbrüche	PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
EtBr	Ethidiumbromid	PKC	Proteinkinase C
EZ	Endothelzellen	PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
EZM	Extrazelluläre Matrix	PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>	PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
FoxD1	<i>Forkhead-box-D1</i>	PPRE	Peroxisom-Proliferator-Reaktionselement
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	RAS	<i>Rat sarcoma</i>
GCKO	Globaler NO-GC-Knockout	RIPA	Radioimmunpräzipitations-Test
GDF	Wachstumsdifferenzierungsfaktoren	ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
GFAP	Saures Gliafaserprotein	RXR-α	Retinoid-X-Rezeptor- α
GFP	Grün fluoreszierende Protein	SM/MHC	Glatte Muskelzellen/Schwere-Myosin-Kette
GTP	Guanosintriphosphat	ssDNA	<i>Single-strain-DNA</i>
HotSHOT	Heißes Natriumhydroxid und Tris Methode	TdT	Desoxyribonukleotidyltransferase
HRP	Meerrettich-Peroxidase	TGF-β1	transformierender Wachstumsfaktor β 1
HSC	Hepatische Sternzellen	TIMP	Gewebe-Inhibitor der Metalloproteasen
IL	Interleukin	TNF-α	Tumornekrosefaktor
iNOS	induzierbare NOS	UR	Untereinheit
i.p.	intraperitoneal	VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzellen
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat		

1 Einleitung

Die Wundheilungsreaktion ist ein fundamentaler biologischer Prozess, der wichtig für das Überleben aller Organismen ist (Das et al., 2015). Hierbei werden mehrere Phasen durchlaufen, die sich zwar zeitlich überschneiden, jedoch funktional unterscheiden (Gurtner et al., 2008; Stramer et al., 2007). In der ersten Phase, nach der Schädigung des Gewebes, kommt es zu einer Hämostase, die zur Bildung eines Blutgerinnsels führt. Phase zwei beinhaltet die Ausschüttung von Zytokinen, die eine Infiltration von Immunzellen (Neutrophilen und Makrophagen) auslöst. Durch Phagozytose nehmen diese Immunzellen die geschädigten und in Apoptose übergegangenen Zellen auf und entfernen diese dadurch aus dem Gewebe. In der dritten Phase werden vor allem proinflammatorische, vasoaktive und profibrotische Effektoren z. B. transformierender Wachstumsfaktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Blutplättchen-Wachstumsfaktor (PDGF), Tumornekrosefaktor (TNF- α), Interleukin-6 und -13 (IL-6 und -13) ausgeschüttet, welche die Neubildung des Gewebes bedingen (Kisseleva und Brenner, 2008; Hochreiter-Hufford und Ravichandran, 2013; Wynn und Vannella, 2016).

Bei der Wundheilung spielen sogenannte Myofibroblasten eine wichtige Rolle. Myofibroblasten sind für die Synthese der extrazellulären Matrix (EZM) verantwortlich. Sie weisen Merkmale sowohl von glatten Muskelzellen als auch von Fibroblasten auf und sind durch ein prominentes raues endoplasmatisches Retikulum, Stressfasern, einen vergrößerten Nukleus und die Expression von Glattmuskelzellaktin (α -SMA) und anderer kontraktiler Proteine gekennzeichnet (Bochaton-Piallat et al., 2016). Die Myofibroblasten bilden sich nach Stimulation durch diverse Zytokine aus Vorläuferzellen und produzieren fibrilläre EZM, die größtenteils aus Kollagen Typ I $\alpha 1$ (Col1 $\alpha 1$) und $\alpha 2$ (Col1 $\alpha 2$) sowie Kollagen Typ III $\alpha 1$ (Col3 $\alpha 1$) besteht, ebenso wie unzählige andere EZM-Proteine (Darby et al., 2016). Die EZM hält die Integrität des verletzten Gewebes während der Reparatur aufrecht und fördert die Bildung von Granulationsgewebe und die Regeneration des Parenchyms. In der letzten Phase der Wundheilung wird die EZM abgebaut, wodurch es zum Aufbau der ursprünglichen Parenchymarchitektur kommt.

Bei der Fibrose hingegen kommt es nun zu einer Fehlregulierung dieses Prozesses und zu einer übermäßigen Akkumulation von EZM. Durch wiederholte, chronische Verletzungen wird die EZM nur unzureichend aufgelöst, da Myofibroblasten unablässig zur Produktion von EZM stimuliert werden und die akkumulierte EZM im Laufe der Zeit beginnt, fibrotische Läsionen zu bilden. Die Fibrose kann unabhängig von der Ätiologie in jedem Organ oder Gewebe vorkommen (Abbildung 1.1). Verschiedene chronische Erkrankungen können zu einer Fibrose führen, darunter Diabetes, Hypertonie, virale und nicht-virale Hepatitis, Herzversagen und Kardiomyopathie, idiopathische Lungenerkrankungen, Sklerodermie und Krebs. Diese Krankheiten haben zur Folge, dass es zu einem Versagen von Leber, Lunge, Niere, Herz und weiteren wichtigen Organen kommt, da durch den übermäßigen Einbau von EZM das Parenchym zum einen ersetzt und zum anderen zerstört wird (Rockey et al., 2015). Schwere Fibrose ist Schätzungen zufolge für 45% der Todesfälle in den Industrieländern verantwortlich (Wynn, 2004). Jedoch existieren bis heute nur wenige Anti-Fibrose-Medikamente (Pirfenidon, Nintedanib), die von der Europäischen

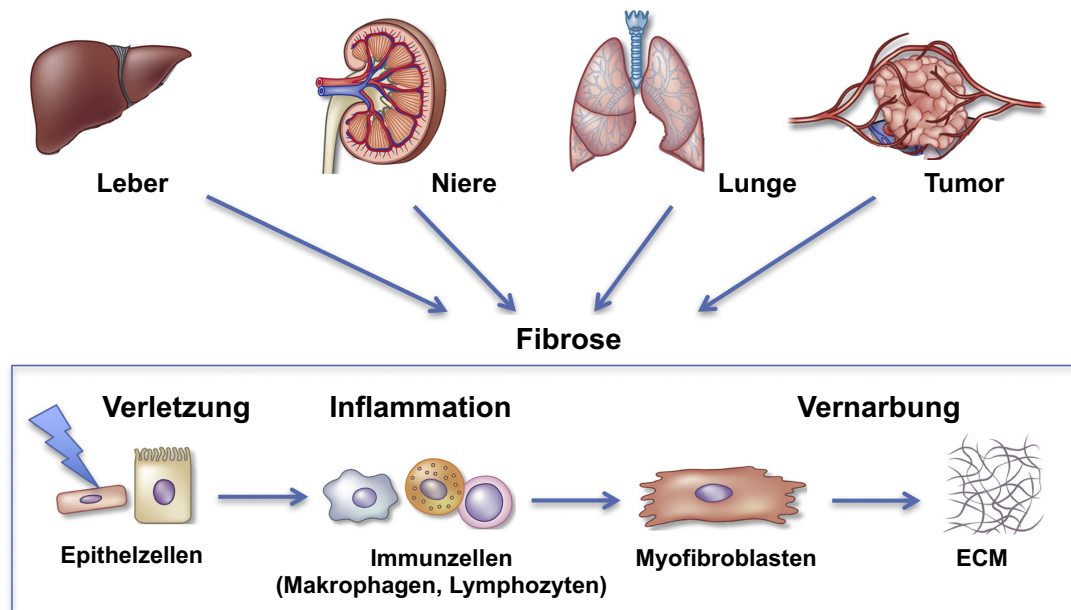


Abbildung 1.1: Schematisches Diagramm für Fibrose in verschiedenen Organen und Tumoren

Die Verletzung von Epithelzellen löst eine Entzündung aus. Dadurch kommt es zu einer Infiltration von Immunzellen (z. B. Makrophagen, Lymphozyten). Die Entzündungszellen sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Zellen in Myofibroblasten transformieren. Im Anschluss sezernieren Myofibroblasten EZM, was zu einer Vernarbung des Gewebes führt; modifiziert nach Jun und Lau (2018).

Arzneimittel-Agentur (EMA) oder der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen wurden, wodurch die Notwendigkeit gegeben ist, den Mechanismus der Fibrose in den spezifischen Organen zu verstehen, um mögliche therapeutische Ansätze zu finden (Jun und Lau, 2018). Auf Grund dieser Tatsache ist es wichtig, herauszufinden, von welchen Zellen die Myofibroblasten abstammen. Können diese identifiziert werden, so kann ein wichtiger Beitrag zur Aufschlüsselung der Vorgänge innerhalb der Fibrose geleistet werden (Tallquist und Molkentin, 2017; Friedman et al., 2013).

1.1 Perizyten

Verschiedene Zelltypen wurden bereits als Vorläuferzellen der Myofibroblasten vermutet, unter anderem Epithelzellen, die durch den Prozess des epithelial-mesenchymalen Übergangs (EMT) in Myofibroblasten umgewandelt werden (Iwano et al., 2002; Kim et al., 2006). Des Weiteren werden aus Knochenmark stammende Zellen wie Fibrozyten (Fathke et al., 2004; Scholten et al., 2011; Poulsom et al., 2001) und im Gewebe residierende Zellen diskutiert (Koesters et al., 2010; Picard et al., 2008). Die Endothelzellen (EZ) wurden lange Zeit als Hauptquelle der Myofibroblasten bei fibrotischen Erkrankungen gesehen; dessen ungeachtet wurde diese These in letzter Zeit verworfen, auf Grund von *In-vivo*-Untersuchungen an Nagern. Dort konnte gezeigt werden, dass EZ nicht zu Myofibroblasten in der Fibrogenese transdifferenzieren (Chu et al., 2011; Taura et al., 2010; Rock et al., 2011). Hingegen konnten durch neueste Studien (*Lineage Tracing*) Perizyten als Myofibroblasten-Vorläufer in einer Vielzahl von Organfibrosen als Myofibroblasten-Vorläufer identifiziert werden, wodurch sie in den Fokus der Forschung zu den molekularen Mechanismen

in der Fibrose gerückt sind.

Perizyten wurden im Jahre 1871 vom Pathologen und Bakteriologen Eberth (1871) nachgewiesen und durch Charles-Marie Benjamin Rouget genauer beschrieben. Dieser fand 1873 eine Population von kontraktile Zellen, die an den EZ kleiner Blutgefäße liegen (Rouget, 1873). Diese Zellen wurden zunächst als „Rouget-Zellen“ bezeichnet, bis der Physiologe Klaus Zimmermann sie genauer definierte und als Perizyten benannte (Zimmermann, 1923). Ihr aktuelle phänotypische Beschreibung konnte jedoch erst durch den Einsatz der Elektronenmikroskopie geliefert werden (Sims, 1986). Perizyten stehen in Kontakt mit den EZ von Mikrogefäßen – Kapillaren, postkapilläre Venolen, Venolen und Arteriolen (Allt und Lawrenson, 2001). Sie sind dort in die vaskuläre Basalmembran (BM) – welche ein dünnes Blatt aus Kollagen-, Laminin-, Fibronektin- und Heparansulfatfasern ist (Bergers und Song, 2005) – eingebettet, die sie sich mit den EZ teilen (Mandarino et al., 1993). Dort sorgen sie für die Integrität der Mikrogefäße und regulieren den Blutfluss (Armulik et al., 2005; Armulik et al., 2011).

Perizyten besitzen einen großen runden Nukleus, wenig Zytoplasma und lange zytoplasmatische Dendriten, mit denen sie die Endothelwände der Gefäße umfassen und sich auf die benachbarten Gefäße erstrecken können (Mazanet und Franzini-Armstrong, 1982). In den Zonen, in denen keine BM vorliegt, kommt es zu verschiedenen Kontakten zwischen EZ und Perizyten (Abbildung 1.2): (1) *peg-and-socket junctions*, bei denen die zytoplasmatischen Finger (*pegs*) der Perizyten in endotheliale Taschen (*sockets*) greifen; (2) *gap junctions*, die direkte chemische Kommunikation ermöglichen; und (3) *adhesion plaques*, die mit dem Aktin-Filament verbunden sind und Zellen aneinander sowie an die BM binden (Bergers und Song, 2005; Rucker et al., 2000; Courtoy und Boyles, 1983; Gerhardt und Betsholtz, 2003). Die Dichte der Perizytenbedeckung variiert in den unterschiedlichen Organen. Während im Gehirn eine EZ-zu-Perizyt Ratio von 1:1 vorliegt, besteht im Muskel ein Verhältnis von 10:1 bis zu 100:1 (Skelett-Muskulatur) (Shepro und Morel, 1993). Dabei scheint die Ratio abhängig zu sein von der Permeabilität des Mikrogefäßes; je höher die Barriereanforderung, desto höher die Perizyten-dichte. Ebenfalls scheint die Dichte von der Dynamik der Endothelerneuerung und dem Blutdruck sowie der Topographie der Gefäße beeinflusst zu werden (Sims, 1986).

Neben der *De-novo*-Bildung von Mikrogefäßen sind Perizyten auch an der Differenzierung von Gewebe und der Angiogenese von Mikrogefäßen in vollständig differenzierten Geweben und Organen beteiligt. Diese Mikrogefäß-Angiogenese beginnt mit der Ausbildung eines primitiven Kapillarröhrchens (angiogener Spross), der sich aus den proliferierenden und migrierenden EZ ableitet. Im Anschluss rekrutieren die EZ die Perizyten über den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2), PDGF, den Heparin-bindenden epidermalen Wachstumsfaktor (HB-EGF) und IL-6 (Ricard et al., 2014; Lindblom et al., 2003; Stratman et al., 2010). Kommt es zum Kontakt mit dem Epithel, unterdrücken die Perizyten das Zellwachstum der EZ, stabilisieren die Gefäße und beteiligen sich an der Reifung der BM der neu entstandenen Mikrogefäßwände. Der Kontakt zwischen den EZ und den Perizyten hingegen löst die Synthese kontraktile Proteine in den Perizyten aus (Kutcher und Herman, 2009).

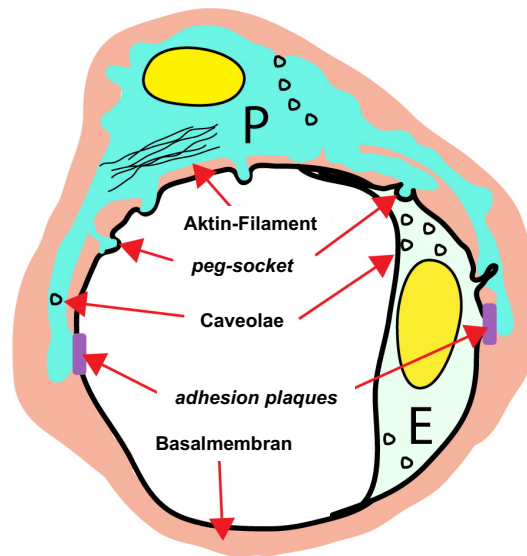


Abbildung 1.2: Anatomie der Perizyten

Perizyten besitzen einen großen runden Nucleus, der von einer kleinen Menge Zytoplasma umgeben ist, das Ribosomen und Mitochondrien enthält. Dichte Banden aus Mikrofilamenten, die Aktin, Myosin und Tropomyosin enthalten, sind unter der Plasmamembran konzentriert, insbesondere unter der dem Endothel zugewandten inneren Oberflächenmembran. Die äußere, abluminale Perizytenoberfläche zeigt häufig zahlreiche Caveolae. Obwohl Perizyten und EZ durch die gemeinsame BM getrennt sind, stellen sie zahlreiche direkte Kontakte unterschiedlicher Art her: Dargestellt sind hier die *peg-and-socket junctions* und *adhesion plaques*; modifiziert nach Armulik et al. (2011).

1.1.1 Perizyten-Marker

Während die EZ der Mikrogefäße mit Perizyten bedeckt sind, werden in größeren Gefäßsystemen die EZ von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) bedeckt, und in mittelgroßen Gefäßen von Zellen, die Eigenschaften von Perizyten und VSMC besitzen. Durch die morphologischen Ähnlichkeiten und die Expression von gleichen Markergenen (Tabelle 1.1) – beide Zellen basieren auf einer mesodermen Abstammung – können VSMC und Perizyten nur schwer voneinander unterschieden werden (Sims, 2000). Zusätzlich variiert die Expression der Markergene in den Perizyten auch zwischen den Entwicklungs-Stadien der verschiedenen Organe und zwischen den Organen (Krueger und Bechmann, 2010). Deshalb kann eine Unterscheidung von VSMC und Perizyten nicht per Marker getroffen werden, sondern es muss auch immer die anatomische Lage der Zelle mitberücksichtigt werden.

Ein prominenter Marker für Perizyten ist Desmin, ein Intermediärfilament vom Typ III, das für die mechanische Elastizität und die Kontraktion der Zellen erforderlich ist (Kiss und Kellermayer, 2014). Neben der Expression in Perizyten kommt es aber auch in Skelett- und glatten Muskelzellen vor (Li et al., 1997). Neuronales/Gliales Antigen-2 (NG2), das regulatorische Funktionen (Trotter et al., 2010) – einschließlich der Rekrutierung von kleinen GTPasen (Eisenmann et al., 1999) – steuert, ist ein weiterer häufig verwendeter Marker für Perizyten (Ozderdem et al., 2001). Ebenfalls als Marker wird α -SMA eingesetzt, eine von sechs verschiedenen Aktin-Isoformen, die an der Ausbildung der Zellstruktur, Kontraktilität und Motilität beteiligt ist. Die α -SMA-Expression

in Perizyten wird *in vivo* durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert (Stark et al., 2013; Pieper et al., 2014). Dabei hängt die Expression von α -SMA in Perizyten davon ab, an welchen Gefäßen diese liegen. Handelt es sich um Perizyten, die sich prä- oder postkapillar befinden, so exprimieren diese α -SMA, während nahe der Kapillaren gelegene Perizyten kein α -SMA exprimieren (Nehls und Drenckhahn, 1993). Zusätzlich kann durch α -SMA „aktivierte“ Perizyten markiert werden (Nehls und Drenckhahn, 1993; Huang et al., 2010).

Tabelle 1.1: Perizyten-Marker

Perizyten-Marker	Zellen, die den Marker ebenfalls exprimieren
PDGFR β	Interstitielle Mesenchymzellen während der Entwicklung; glatte Muskelzellen; im ZNS: bestimmte Neurone und neuronale Vorläufer; Myofibroblasten; mesenchymale Stammzellen
NG2	In der Knorpel-Entwicklung: Knochenzellen; Muskelzellen; frühe postnatale Haut; adulte Hautstammzellen; Adipozyten; glatte Muskelzellen, neuronale Vorläuferzellen, Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
Desmin	Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen, glatte Muskelzellen
α -SMA	Glatte Muskelzellen; Myofibroblasten; Myoepithelium
Alanin-Aminopeptidase (CD13)	VSMC, entzündetes Endothel; bestimmte Tumor-Zellen; myeloide Zellen; Epithelzellen in Niere und Darm

Als der wichtigste Marker für Perizyten gilt Blutplättchen-Wachstumsfaktor- β (PDGFR β), eine Isoform der PDGF-Rezeptoren. Die PDGF-Familie besteht aus PDGF-A, -B, -C und -D, die an die Tyrosinkinase-Rezeptoren PDGFR α und - β binden. Bei PDGF-Rezeptoren handelt es sich um Rezeptortyrosinkinasen mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne und einer zytoplasmatischen, enzymatischen Domäne. Die Signalaktivität von PDGF-Rezeptoren ist durch eine autoinhibitorische, allosterische Konformation streng reguliert und erfordert eine Liganden-induzierte Rezeptor-Dimerisierung an der Zelloberfläche, um die Autoinhibition aufzuheben und physiologische Aktivität zu erreichen. Der Rezeptor wird durch Tyrosinphosphorylierung aktiv und steuert eine Reihe von Signalwegen, unter anderem *Rat-sarcoma*-(RAS-) und Mitogenaktivierte-Protein-(MAP-)Kinasen, Phosphoinositid-3-(PI3-)Kinase, Phosphoinositid-Phospholipase C (PLC), Proteinkinase C (PKC) und Signalwandler und Aktivatoren der Transkription (STATs) (Heldin und Westermark, 1999). Bei Perizyten haben die PDGF-Rezeptoren einen Einfluss auf die Proliferation und die Differenzierung der Zellen sowie auf die Rekrutierung während Angiogenese. Neben seiner Anwesenheit in Perizyten wird PDGFR β auch in glatten Muskelzellen, Mesenchymzellen und neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (Winkler et al., 2010; Lindahl et al., 1997).

1.2 Die Leber

Die Leber (*Hepar*) ist nach der Haut das zweitgrößte Organ, die größte exokrine Drüse, das schwerste Organ (ca. 1200-1400 g) und das wichtigste Stoffwechselorgan im menschlichen Körper. Sie besitzt eine dem Zwerchfell im rechten Oberbauch anliegende Form (*Facies diaphragmatica*). Weiter erstreckt sie sich in den mittleren Bauchbereich und reicht bis zum linken Oberbauch,

wo sie den Eingeweiden aufliegt (*Facies visceralis*). Die Leber besitzt die Form eines Prismas oder Keils, mit ihrer Basis nach rechts und ihrer Spitze nach links. Sie hat eine rosa-braune Farbe und ist stark vaskularisiert. Von außen betrachtet gliedert sich die Leber in einen rechten (*Lobus dexter*) und einen linken Lappen (*Lobus sinister*). Jeder Lappen ist in 2 Sektoren unterteilt. Die rechte Lebervene teilt den rechten Lappen in einen vorderen und einen hinteren Sektor. Die linke Lebervene teilt den linken Lappen in mediale (quadratische) und laterale Sektoren.

Das Leberepithel wächst als ventrales Divertikel strangförmig von der Verbindung am Vorder- und Mitteldarm über das ventrale *Mesogastrium* in das Mesenchym des *Septum transversum*. Der kraniale Teil des Septums bildet später das Zwerchfell. Das gleiche Divertikel bildet auch die Gallenblase und die Gallengänge. Aus den Lebersträngen entstehen die Leberläppchen (*Lobuli hepatis*), die einen zentralen Ast der Zentralvene (*V. cava*) erhalten sowie umgebende Äste des Portalvenensystems. Später beginnt das Bindegewebe, das die Pfortader (*V. portae*) umgibt, zu proliferieren. Nebenbei differenzieren aus den Zellen des Leberparenchyms die Gallengänge.

Über zwei zuführende Gefäße wird die Leber mit Blut versorgt. Beide treten an der Leberpforte in die Leber ein: zum einen die Pfortader und zum anderen die *A. hepatica*, die beide bis zu ihren kleinsten Verzweigungen parallel zueinander verlaufen. Die Pfortader führt venöses Blut aus den unteren Bauchorganen (Magen, Darm, Pankreas und Milz) in die Leber. Der von der *V. portae* ausgehende feine Zweig (*Vv. interlobulares*) umgibt die Leberläppchen und speist die Strombahnen der Leber, die Sinusoide, mit Blut. Nach Durchlaufen der Leber sammelt sich das Blut in den sublobulären Venen, die in die *Vv. hepaticae* übergehen, welche wiederum in die *V. cava* münden. Bei der *A. hepatica* handelt es sich um die Fortsetzung der *A. hepatica communis*. Bei Eintritt in die Leber teilt sich die *A. hepatica* in die *A. gastroduodenalis* und die *A. hepatica propria*. Die *A. hepatica propria* teilt sich in zwei Äste, die über ihre Endaufzweigungen (*Aa. interlobulares*) arterielles Blut in die Sinusoide führen, wo es sich mit dem venösen Blut der *V. portae* mischt (Abbildung 1.3).

1.2.1 Mikroskopischer Aufbau der Leber

Stark vereinfacht dargestellt besteht die Leber aus polygonalen Säulen (Leberläppchen oder *Lobuli hepatici*), die sich millionenfach wiederholen und um die Endaufzweigungen der *V. portae* und der *V. hepaticae* aufteilen. Deshalb werden sie auch als Zentralvenenläppchen bezeichnet. Diese Läppchen bestehen hauptsächlich aus Leberzellen (Hepatozyten) und Sinusoiden – wobei die Hepatozyten radiär in Richtung der *V. centralis* ausgerichtet sind, die sich in der Mitte der Läppchen befindet und den Beginn der blutabführenden *Vv. hepaticae* darstellt. Das Blut, mit dem die Sinusoide gespeist werden, stammt von der *V. portae* und der *A. hepatica*. Diese beiden Gefäße verlaufen gemeinsam mit den interlobulären Gallengängen und werden als Glissonsche Trias (*Trias hepatica*) oder auch als periportale Felder bezeichnet (Abbildung 1.4).

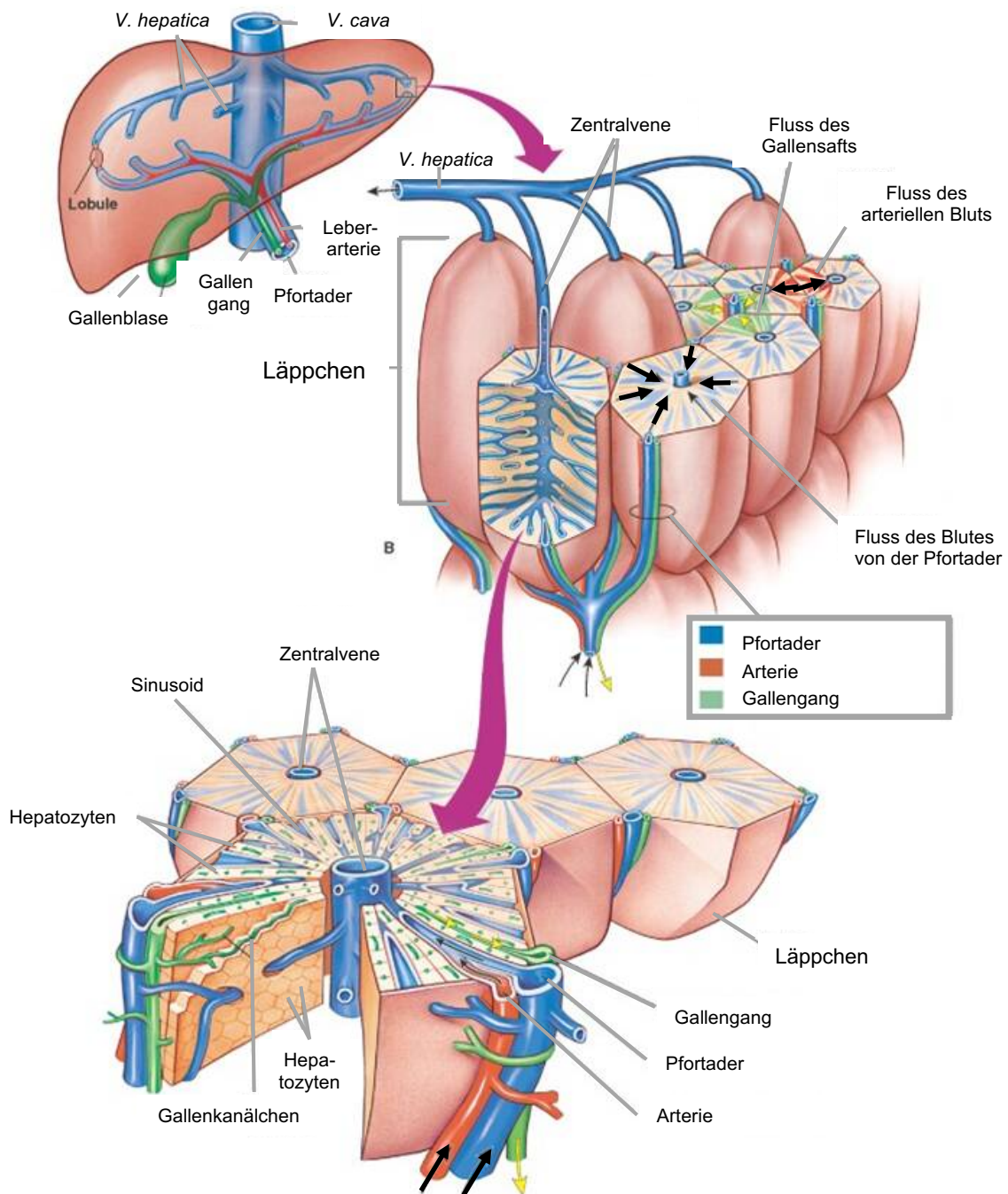


Abbildung 1.3: Anatomie der Leber

Die Leber ist in einen rechten und einen linken Leberlappen unterteilt und die Lappen sind wiederum in acht Segmente aufgeteilt. Diese Segmente bestehen aus Millionen von Läppchen. Im Zentrum dieser sechseckigen Läppchen steht die Zentralvene. In dieser fließt das Blut zusammen, das durch Pfortader und Leberarterie in die Läppchen geführt wurde und dort durch die Sinusoide geflossen ist. Entlang der Sinusoide befinden sich die Hepatozyten, die für den Stoffwechsel in der Leber verantwortlich sind; modifiziert nach Reisner (2014).

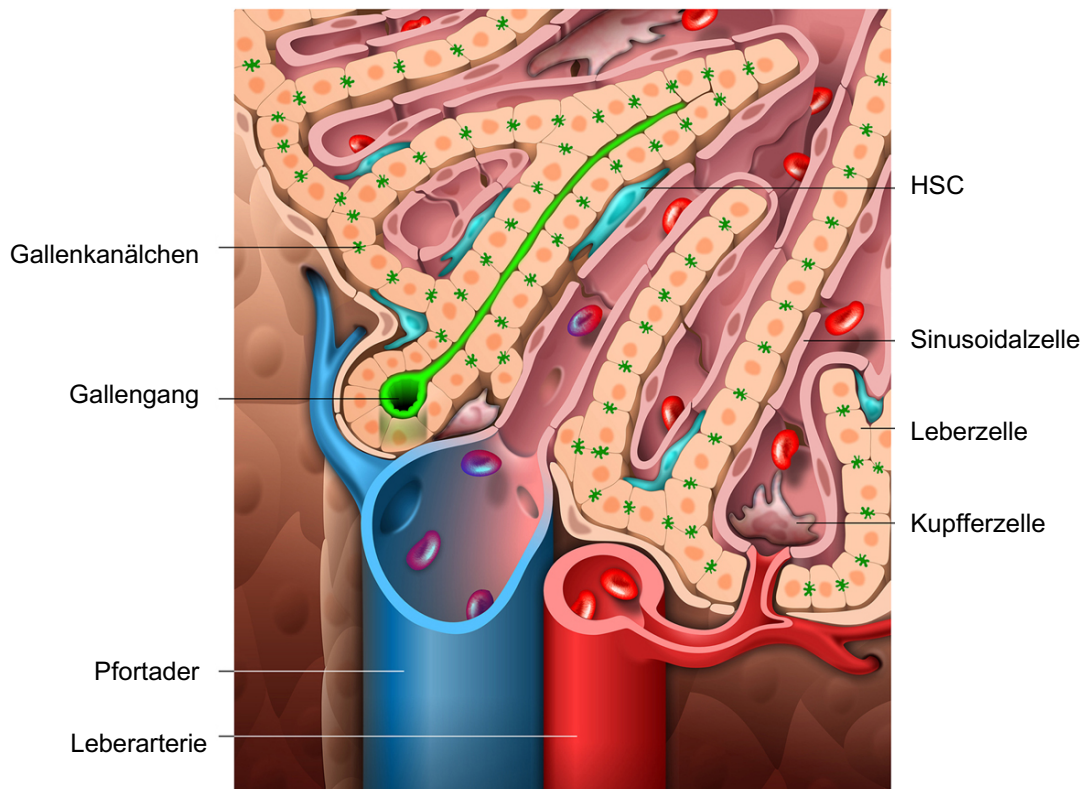


Abbildung 1.4: Ausschnitt eines Leberläppchens

Die Läppchen der Leber bestehen hauptsächlich aus Hepatozyten, die radiär um die Zentralvene angebracht sind. Der Gallensaft wird von den Hepatozyten produziert und fließt mittels der Gallenkanälchen, die sich zu größeren Gallengängen zusammenschließen, zur Gallenblase. Zwischen den Hepatozyten befinden sich die Sinusoide, welche von den Leber-Sinus-Endothelzellen (LSEC) ausgekleidet werden. Innerhalb der Sinusoide befinden sich die Leber-Makrophagen, sogenannte Kupffer-Zellen, die unter anderem am Recycling von Erythrozyten beteiligt sind. Hepatische Sternzellen (HSC) befinden sich im Raum von Disse, der zwischen den Sinusoiden und den Hepatozyten liegt; modifiziert nach Jonker et al. (2009).

In den Lebersinusoiden (*Vasa sinusoidea*) wird das sauerstoffarme Blut aus der *V. portae* mit dem sauerstoffreichen aus der *A. hepatica* gemischt. Das sauerstoffreiche Blut fließt immer am Beginn eines Läppchens in die Sinusoide. Dadurch liegt im Vordersten Bereich des Läppchens eine hohe Sauerstoffpartialdruck vor, der in Richtung Zentralvene abnimmt. Dieser Sachverhalt wird dazu genutzt, um den Leberazinus – eine funktionelle Unterteilung des Leberläppchens – zu definieren. Der Azinus wird in drei Zonen untergliedert. In Zone 1, die sich in der Nähe der *Trias hepatica* befindet, liegt die höchste Sauerstoffversorgung vor. Zone 3 liegt um die Zentralvene, Zone 2 zwischen den Zonen 1 und 3. Die Sinusoide sind mit einem diskontinuierlichen Endothel ausgestattet, das jedoch keine Basallamina besitzt. Diese Leber-Sinus-Endothelzellen (LSEC) sind durch einen 0,3 µm großen Spalt (Disse-Raum) von den Hepatozyten getrennt. Sie besitzen transzelluläre Poren, durch die zelluläre Bestandteile des Blutes in den Disse-Raum eintreten können. Dagegen können Blutzellen und Bakterien nicht durchdringen, weswegen sie nicht zu den Mikrovilli der Hepatozyten gelangen, die sich im Disse-Raum befinden.

Hepatozyten besitzen einen Kern, der diploid, tetraploid oder oktaploid sein kann. Teilweise besitzen Hepatozyten sogar zwei Kerne. Sie sind polarisierte Zellen mit einem apikalen Pol, der sich an der Wand der Gallenkanälchen befindet, und einem basolateralen Pol, der in Richtung

Sinusoid orientiert ist. Dieser bildet Mikrovilli aus, über die der Stofftransport der Hepatozyten erreicht wird. Eine wichtige Funktion, die die Hepatozyten erfüllen, ist die Entgiftung von Xenobiotika. Durch das Zytochrom-P 450-(CYP-) System werden die eingeführten Fremdstoffe zunächst oxidiert, um sie dann im nächsten Schritt mit Glycin, Glucuronsäure oder Sulfat zu konjugieren. Durch diesen Prozess werden lipophile Xenobiotika wasserlöslich und können über die Niere ausgeschieden werden (Benninghoff und Drenckhahn, 2008; Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012).

1.2.1.1 Hepatische Sternzellen (HSC)

HSC sind die Perizyten der Leber. Auch „Sternzellen“ genannt wurden diese erstmals im 19. Jahrhundert vom deutschen Anatomen Carl von Kupffer beschrieben (Kupffer, 1876) sowie von Wake überprüft und mittels der Gold-Chlorid-Methode bestätigt (Wake, 1980; Wake et al., 2009). Im Jahre 1952 beschrieb sie der japanische Anatom Toshio Ito als Fett speichernde Zellen, weshalb sie zunächst auch „Ito-Zellen“ genannt wurden (Ito und Nemoto, 1952). Später wurde die internationale Bezeichnung „HSC“ für diese Zellen eingeführt (Oakley et al., 2005). HSC sind neben den Hepatozyten die am häufigsten vorkommenden Zellen in der Leber. Sie machen 10-15% der gesamten Zellpopulation in der Leber, und 30% der nicht-parenchymalen Zellen aus (Senoo et al., 2010).

Die HSC liegen im Disse-Raum zwischen den fenestrierten LSEC und den Hepatozyten (Abbildung 1.5). Besonders prominent sind die zahlreichen dendritischen Fortsätze (Tsukada et al., 2006), wodurch sie mit mehreren Hepatozyten und LSEC in Kontakt treten können (Wang et al., 2002). Eines ihrer wichtigsten Charakteristika ist, dass sie Vitamin A in Fetttröpfchen lagern (Wandzioch et al., 2004). In diesen Fetttröpfchen sind 80% des körpereigenen Retinols als Retinyl-ester gespeichert (Blomhoff und Blomhoff, 2006). Die Verteilung der Tröpfchen ist recht homogen, wobei die Vitamin-A-Fluoreszenz um die Periportal-Felder am höchsten ist (Watanabe et al., 2003).

1.3 Leberfibrose

Leberfibrose ist eine Antwort auf verschiedene chronische Lebererkrankungen, wobei Virusinfektionen sowie alkoholische und nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) die häufigsten sind (Brunt, 2004). Unabhängig von der Ursache der iterativen Verletzung kommt es immer zu Entzündungsschäden, Matrixablagerungen, Parenchymzelltod und Angiogenese, bis eine Leberzirrhose auftritt (Dechêne et al., 2010). Wenn es über einen langen Zeitraum zu einem Einbau von Narbenmatrix kommt (die mittlere Zeitdauer bis zum Entstehen einer Zirrhose beträgt 30 Jahre bei chronischer Hepatitis C), ist dieser Prozess kaum noch reversibel. Zwar kann es auch durch kurzfristige Schädigungen zu einer Fibrose der Leber kommen, z. B. durch Hepatitis C nach Leber-Transplantationen (Schluger et al., 1996) oder HIV (Bonnard et al., 2007), jedoch ist die o. g. Dauer eher typisch. Neben Erkrankungen können genetische Polymorphismen und Faktoren wie Fettleibigkeit und Alkohol das Risiko für ein Fortschreiten der Fibrose beeinflussen (Bataller et al., 2003). Können die Ursachen für eine Fibrose beseitigt werden, kann die Fibrose

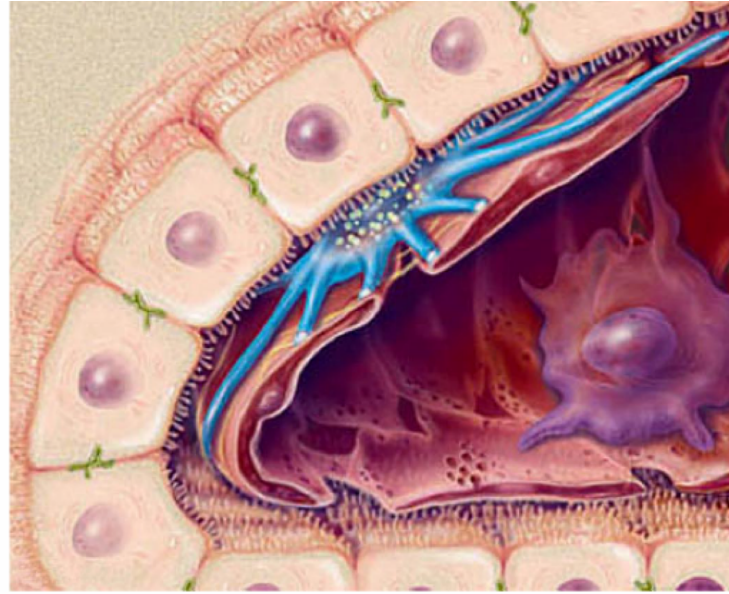


Abbildung 1.5: Morphologie einer HSC in der Leber

Die Zeichnung veranschaulicht die relative Orientierung einer HSC (blaue Zelle) im Sinusoid; modifiziert nach Friedman (2008).

aufgelöst und die normale Leberarchitektur wiederhergestellt werden. Bei einer Leberzirrhose ist dies jedoch nicht möglich und als einzige Therapie bleibt die Lebertransplantation (Davis et al., 2003). Auf Grund dieser Tatsache ist die Notwendigkeit gegeben, nach Therapien zu suchen, die den Prozess der Leberfibrose stoppen bzw. umkehren können, sodass es nicht zur Entstehung einer Leberzirrhose kommt (Henderson et al., 2013).

1.3.1 Pathogenese der Leberfibrose

Hauptursache einer Leberfibrose ist die Schädigung der Epithelzellen (Hepatozyten oder Cholangiozyten). Infolge der Schädigung kommt es zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und zur Initiation einer Gerinnungskaskade. Durch die Schädigung gehen die Epithelzellen in Nekrose über. Leukozyten wandern zu diesen nekrotischen Zellen und amplifizieren dort die inflammatorische Antwort durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Dazu gehören $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 (Bataller et al., 2003). Daneben werden $\text{PDGFR}\beta$, $\text{TGF-}\beta 1$, Bindegewebe-Wachstumsfaktor (CTGF) und IL-13 ausgeschüttet, wodurch die mesenchymalen Vorläuferzellen in Myofibroblasten differenzieren, die in die Wunde migrieren (Wynn, 2008). Während $\text{TGF-}\beta 1$ die Synthese von $\alpha\text{-SMA}$ und $\text{Col1}\alpha 1$ und $\alpha 2$ stimuliert (Hellerbrand et al., 1999), kommt es durch $\text{PDGFR}\beta$ zur Proliferation der Myofibroblasten über den MAP-Kinase-Weg (Friedman, 2000). Bei diesem wird über MAP die regulierten Kinasen mit einem extrazellulärem Signal (ERK) aktiviert. ERK wiederum beeinflusst die Translation von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Pages et al., 1993).

1.3.1.1 Myofibroblasten

Das Entstehen von Myofibroblasten ist ein kritischer Punkt bei der Entwicklung einer Leberfibrose. Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Schwere der Fibrose und der Anzahl an Myofibroblasten festgestellt werden (Brenner et al., 2012). Deshalb ist ein Ziel von anti-

fibrotischen Therapien, die Aktivierung von Myofibroblasten zu verhindern (Kisseleva et al., 2012; Liu et al., 2013). Myofibroblasten sind in der gesunden Leber nicht vorhanden. Im Rahmen der „normalen“ Wundheilung kommt es jedoch zu einer Aktivierung von Vorläuferzellen und deren Differenzierung in die Myofibroblasten. Diese Myofibroblasten sorgen dann für die Restaurierung des Gewebes, indem sie eine Narbenmatrix (EZM) bilden. Diese wird in der Regel am Ende der Wundheilung aufgelöst und die Myofibroblasten werden aus dem Gewebe durch Apoptose (Wilson et al., 2007; Desmoulière et al., 2005) oder Inaktivierung entfernt (Hinz et al., 2012; Talele et al., 2015; Hecker et al., 2011). Kommt es jedoch dazu, dass die Myofibroblasten übermäßig im Gewebe auftauchen, so wird auch verstärkt EZM gebildet und eine Fibrose entsteht (Hinz et al., 2007). Neben der Leber tritt dieser Vorgang auch in vielen anderen Organen auf. Darunter fallen unter anderem Lunge, Niere und Herz (Borne et al., 2010; Coen et al., 2011). α -SMA gilt als der Marker für Myofibroblasten. Es wird *de novo* in diesen synthetisiert und steht für die kontraktile Fähigkeiten der aktivierten Zellen (Hinz et al., 2001). Jedoch ist α -SMA ein zum Teil inkonsequenter Marker für Myofibroblasten, da nicht nur diese α -SMA exprimieren, sondern auch VSMC oder Perizyten (Sun et al., 2016). Weitere Marker für Myofibroblasten sind F-Aktin und Vinculin (Hinz, 2016).

Die vorherrschenden Vorläuferzellen der Myofibroblasten in der Leber sind die HSC (Friedman et al., 1985). Durch den fibrotischen Stimulus differenzieren die HSC zu Myofibroblasten. Infolgedessen verlieren sie ihre Fähigkeit, Vitamin A zu speichern, und erhalten kontraktile Eigenschaften sowie die Fähigkeit, inflammatorische Mediatoren zu sekretieren (Milani et al., 1990; Marra, 1999). HSC exprimieren eine Reihe von Genen und Proteinen, womit sie von anderen Zellen in der Leber unterschieden werden können. Diese Marker decken sich teilweise mit den Perizytenmarkern aus Tabelle 1.1. Die wichtigsten Marker für die HSC sind PDGFR β , das Enzym Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT), Desmin und GFAP (Kluwe et al., 2011; Henderson et al., 2013; Mederacke et al., 2013; Zhang et al., 2016).

Neben den HSC werden aber auch andere Zelltypen als Vorläufer der Myofibroblasten vermutet. Dabei hängt es auch entscheidend davon ab, was die Ursache für die fibrotische Erkrankung ist. Bei z. B. Gallenerkrankungen sind die portalen Fibroblasten (PF) die Vorläufer der Myofibroblasten (Dranoff und Wells, 2010). Diese werden auch als ‚ruhende‘ Fibroblasten der Leber bezeichnet, aufgrund der Tatsache, dass kein Marker existiert, mit denen sie von Fibroblasten anderer mesenchymaler Zellen unterschieden werden können (Cassiman et al., 2002; Tang et al., 1994). Als weitere Vorläuferzelle für Myofibroblasten in der Leber konnten vom Mesothel abstammende Zellen identifiziert werden. Diese sind wahrscheinlich die Vorläuferzellen der HSC und der PF in der Embryogenese (Rinkevich et al., 2012; Asahina et al., 2011).

1.3.1.2 Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die EZM im Gewebe repräsentiert eine nicht zelluläre Komponente, welche hauptsächlich aus Wasser, Proteinen und Proteoglykanen besteht. Durch die EZM wird dem Gewebe ein Gerüst zur Verfügung gestellt, durch das dieses stabilisiert wird sowie diesem kontraktile Fähigkeiten verlieht (Frantz et al., 2010). Neben seinen mechanischen und biochemischen Eigenschaften hält

die EZM die Hydratation und Homöostase des Gewebes aufrecht (Hynes, 2009; Øie et al., 2018; Iizuka et al., 2003). Es ist festzuhalten, dass die EZM dynamischen Prozessen unterworfen ist, bei der die EZM ständig auf- und wieder abgebaut wird (Daley et al., 2008).

Kollagen ist ein Hauptbestandteil der EZM. Es können 28 verschiedene Kollagen-Varianten in der EZM gefunden werden (Frantz et al., 2010). Fibrilläre Kollagene, die den Hauptbestandteil des Kollagens der EZM ausmachen, sind Kollagen Typ I, II, III und IV. Ihre Rolle ist hauptsächlich mechanischer Natur und sichern die Festigkeit des Gewebes (Ricard-Blum und Ruggiero, 2005). Neben dem Kollagen existieren auch noch andere Proteine in der EZM. Dazu gehören Fibronectin, Laminin, Elastin, Proteoglykane und MMPs. Fibronectin ist ein hoch-molekulares Glykoprotein, das eine wichtige Rolle bei Zell-Adhäsion, -Wachstum und bei der Wundheilung spielt (Pankov und Yamada, 2002). Laminine sind Glykoproteine die hauptsächlich in der BM gefunden werden und die Zell-Differenzierung sowie die -Migration beeinflussen (Timpl et al., 1979).

1.3.1.3 Matrix-Metalloproteasen (MMPs)

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind die relevantesten EZM-modifizierenden Proteine. Sie stellen eine Superfamilie von Zink-abhängigen Endopeptidasen dar (Page-McCaw et al., 2007). In der gesunden Leber sind die MMPs für die Degradation der EZM zuständig. Hier herrscht ein Gleichgewicht aus Auf- und Abbau der EZM. Die MMPs, die dort konstant exprimiert werden, sind die MMP-1, -2, -3, -11 und -14 (Lichtinghagen et al., 1995; Moore et al., 2007; Milani et al., 1994). Die Aktivität von MMPs wird unter physiologischen Konditionen durch Gewebe-Inhibitoren der Metalloproteasen (TIMPs) reguliert. Diese beiden Familien (MMPs und TIMPs) kontrollieren die EZM-Homöostase und sind damit essentiell für die normalen Zell- und Organfunktionen (Brew und Nagase, 2010). In der Leberfibrose hingegen ist das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der EZM stark gestört (Iimuro et al., 2003). Hier kommt es zu einer übermäßigen Einlagerung von EZM. Diese kann bzw. wird nicht mehr von den MMPs abgebaut, da deren Expression deutlich herunterreguliert wird. Zum anderen wird die Expression von TIMPs hochreguliert, was zur Folge hat, dass die vorhandenen MMPs inhibiert werden (Leroy et al., 2004).

1.3.1.4 Der TGF- β 1-Signalweg

Es existieren verschiedene Mechanismen, die zur Aktivierung bzw. Modulation von HSC beitragen. Einer der wichtigsten ist die Aktivierung über TGF- β 1 (Hellerbrand et al., 1999; Friedman, 1999). TGF- β 1 bindet an die Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren an der Zelloberfläche (Massagué, 1998). Nach der konstitutiven Bindung von TGF- β 1 an den Rezeptor werden SMAD2 und SMAD3 zum Rezeptor rekrutiert, wo diese phosphoryliert werden (Piek et al., 1999). Die Bezeichnung SMAD stammt vom homologen Gen der Taufliege *Drosophila melanogaster*, MAD (*mothers against decapentaplegic*) und dem Gen für das Protein Sma (*small body size*) des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* ab (Heldin et al., 1997). Nach Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 formen diese mit SMAD4 einen hetero-oligomeren Komplex, der in den Zellkern translozieren kann. Dort bindet der Komplex an spezifische Erkennungsstellen auf der DNA und reguliert das Ablesen von spezifischen Zielgenen, wozu unter anderem Col1 α 1 zählt. Die Akti-

vierung von SMAD2 und SMAD3 wird durch die Bindung von SMAD7 an den TGF- β 1-Rezeptor verhindert, wodurch der hetero-oligomeren Komplex nicht mehr in den Zellkern eindringen kann und der TGF- β 1-Signalweg blockiert wird (Nakao et al., 1997).

1.3.1.5 PDGF-Signalweg

PDGF gilt als wichtigster Proliferationsfaktor für die HSC (Pinzani et al., 1989). Es ist ein heterodimeres Protein, das aus Kombinationen von zwei Polypeptidketten A und B besteht (PDGF-AA, -BB oder -AB). Die Rezeptoren PDGFR α und PDGFR β gehören zur Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie. PDGF-AA bindet nur an PDGFR α , während PDGF-B an beide bindet (Bonner, 2004). Durch Bindung von PDGF an die Rezeptoren kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosine der Rezeptoren. Diese Tyrosine dienen als Bindungsstellen für Moleküle, welche nachgeschaltet im PDGFR β -Signalweg liegen. Durch Bindung an das Adapter-Protein Grb2 wird RAS aktiviert (Pinzani, 2002). RAS wiederum aktiviert die MAP-Kinase, die regulierte Kinasen mit extrazellulärem Signal (ERK) aktiviert. ERK wandert in den Zellkern und indiziert die Phosphorylierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Pages et al., 1993). Ebenfalls kann die Proliferation über einen ERK-unabhängigen Weg vonstattengehen. Dabei wird Phosphoinositid-3 (PI3)-Kinase, die weitere Kinasen wie PKC stimuliert, vom PDGFR β -Rezeptor rekrutiert (Pinzani et al., 1989; Marra et al., 1999).

1.3.1.6 Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-(PPAR-)Signalweg

Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren (PPAR) gehören zu der Superfamilie von Nuklearhormon-Rezeptoren. Von den PPARs existieren mehrere Isoformen (α , β , γ und δ), die eine Vielzahl von Genen kontrollieren, die elementar für physiologische Prozesse sind (Chawla, 2001). PPAR γ stellt dabei die wichtigste Isoform dar. Von dieser existieren zwei Formen γ 1 und γ 2, die durch unterschiedliches *Splicing* entstehen (Tontonoz und Spiegelman, 2008). PPAR γ enthält eine zentrale DNA-Bindungsdomäne, eine carboxylterminale Bindungsdomäne und zwei Transkriptionsaktivierungsdomänen AF-1 und AF-2 (Nolte et al., 1998). Durch Liganandenbindung (FABP4, CD36) an PPAR γ dissoziiert es seine Repressoren und wandert in den Nukleus, wo es ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor- α (RXR- α) bildet. Dieses Dimer bindet im Anschluss an das Peroxisom-Proliferator-Reaktionselement (PPRE) eine spezifische Gensequenz im Zielpromotor, was zur Aktivierung der Transkription führt (Itoh et al., 2008; Hosooka et al., 2008). PPAR γ spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Apoptose von Fibroblasten (Milam et al., 2008) sowie verschiedenen Krebsarten (Takashima et al., 2001). Darüber hinaus nimmt es eine wichtige Rolle bei der Leberfibrose ein (Wagner et al., 2011). PPAR γ sorgt für die Aufrechterhaltung des inaktivierten Zustandes der HSC. Es blockt die Expression von Kollagen Typ I α 1 über den TGF- β 1-Signalweg, wodurch die Proliferation der Zellen gemindert wird und die Zahl an Fetttröpfchen im Zytoplasma der Zellen erhalten bleibt. Das Ganze geschieht über die Interaktion mit JunD-, einem Aktivatorprotein-(AP-1)-1-Transkriptionsfaktor (Hazra et al., 2004b; Fu et al., 2003). JunD reguliert die Transkription von TIMP1. Wird JunD ausgeschaltet, kommt es zu einer verringerten Ausschüttung von TIMP, wodurch EZM schneller abgebaut werden kann (Smart et al., 2006). Ebenfalls wird durch PPAR γ SMAD3 inhibiert, was zum Blo-

cken des TGF- β 1-Signalweges führt (Ghosh et al., 2004). Kommt es zu einer Leberfibrose und der damit verbundenen Aktivierung der HSC bzw. Differenzierung zu Myofibroblasten, nimmt die Expression von PPAR γ signifikant ab (Zhu et al., 2010), wodurch der TGF- β 1-Signalweg nicht weiter inhibiert wird (Hazra et al., 2004a). Die PPAR γ -Expression wird in der Fibrose über den PDGFR β -Signalweg reduziert (Burgermeister und Seger, 2007), mittels Phosphorylierung von PPAR γ durch die MAP-Kinase (Diradourian et al., 2005). Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung der AF1-Region, wodurch die Bindungsaffinität von PPAR γ zu SMAD3 drastisch reduziert wird (Yoon und Seger, 2009; Adams et al., 1997; Camp und Tafuri, 1997).

1.3.1.7 *Bone morphogenetic-Proteins*-(BMPs-)Signalweg

Bone morphogenetic-Proteine (BMPs) sind multifunktionale Zytokine, die zur TGF- β 1-Superfamilie gehören und machen dort die größte Gruppe aus (Feng und Derynck, 2005). Von den BMPs existieren verschiedene Isoformen (Rider und Mulloy, 2010). Sie spielen eine Rolle in der Embryogenese (Zhang et al., 2016), dem Wachstum, der Differenzierung von Osteoblasten (Wozney et al., 1988) und in der adulten Gewebemöostase, durch Steuerung der Proliferation, Differenzierung, Chemotaxis und Apoptose von Stammzellen in verschiedenen Organen (Wagner et al., 2010). In der Leber nimmt BMP7 eine wichtige Rolle ein. Dieses fungiert als Antagonist zu TGF- β 1 und verhindert die Phosphorylierung von SMAD3 (Zeisberg et al., 2003; Wang und Hirschberg, 2004).

1.3.2 Auflösung der Leberfibrose

Die Leber kann aus einem fibrotischen Zustand wieder in den normalen physiologischen Ausgangszustand zurückkehren durch die Auflösung des proinflammatorischen Milieus, d. h. durch die Ablösung der proinflammatorischen Mediatoren durch antiinflammatorische. Infolgedessen kommt es zu einer Reduzierung der T-Zellen (Marra und Tacke, 2014; Tacke und Trautwein, 2015) und anderer Immunzellen.

Als Beispiel für die Immunzellen sind Makrophagen zu nennen. Diese spielen eine Rolle bei der Förderung der Fibrose (Vernon et al., 2010; Wynn und Barron, 2010) durch Sezernieren von TGF- β 1 (Karlmark et al., 2009) und MMPs (Fallowfield et al., 2007). Makrophagen können in die Typen M1 und M2 unterschieden werden, wobei M1-Makrophagen eher an der Entstehung und M2-Makrophagen an der Auflösung der Fibrose beteiligt sind (Mantovani et al., 2004; Gibbons et al., 2011). Bei der Auflösung der Fibrose erhalten die Makrophagen ihren Ausgangs-Phänotyp zurück, der durch eine niedrige Lymphozyten-Antigen-6-Komplex-(Ly6C-)Expression und eine hohe Sekretion von MMPs und Wachstumsfaktoren (Förderung der Hepatozytenbildung) gekennzeichnet ist (Ramachandran et al., 2012). Des Weiteren wird die Auflösung der Fibrose durch eine erhöhte Anzahl von dendritischen Zellen und Killerzellen (NK) begleitet (Jiao et al., 2012). Während dendritische Zellen den Abbau der EZM durch die Sekretion von MMP-9 herbeiführen, induzieren die NK die Apoptose von aktivierten HSC/Myofibroblasten über die Expression von Tumor-Nekrose-Faktor-verwandten-Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) auf

ihrer Oberfläche (Tian et al., 2013; Pellicoro et al., 2014).

Die Deaktivierung der EZM-sezernierenden Myofibroblasten ist der Schlüssel zur Auflösung der Leberfibrose. Dazu bestehen drei verschiedene Möglichkeiten: (1) Seneszenz, (2) Apoptose, und (3) Inaktivierung der Myofibroblasten. Bei Seneszenz werden die Myofibroblasten in einen Zustand überführt, in dem diese eine reduzierte fibrogene Genexpression und einen dauerhaften G₀/G₁-Zustand aufweisen. Dadurch werden die Zellen anfällig für die mittels NK vermittelte Apoptose (Krizhanovsky et al., 2008). Die Apoptose der Myofibroblasten kann ebenfalls durch den Entzug antiapoptotischer Signale ausgelöst werden (Iredale et al., 1998). Höchstwahrscheinlich kommt es bei den meisten Myofibroblasten jedoch zu einer Inaktivierung. Hierbei werden die Zellen in einen „ruhenden“ Zustand versetzt. Kommt es zu einem erneuten fibrotischen Stimulus, können diese Zellen deutlich schneller wieder in den aktiven Zustand zurückkehren (Kisseleva et al., 2012; Troeger et al., 2012).

Im letzten Schritt muss die EZM abgebaut werden, um die Auflösung der Leberfibrose zu beenden. Dabei spielen die MMPs einschließlich Kollagenasen eine entscheidende Rolle (Iredale, 2008). Neben Makrophagen sezernieren auch HSC und Neutrophile MMPs (Iredale et al., 2013).

1.4 Die NO/cGMP-Signalkaskade

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein multifunktionales Signalmolekül, das in der Aufrechterhaltung einer Vielzahl von physiologischen Prozessen involviert ist, z. B. bei der Immunabwehr, bei der neuronalen Kommunikation und bei der Regulierung des Gefäßtonus. Die meisten dieser physiologischen Funktionen werden durch den Rezeptor NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) vermittelt (Bryan et al., 2009).

Von Furchgott und Zawadzki (1980) wurden Hinweise gefunden, dass NO als Signalmolekül dient. Diese zeigten, dass eine Substanz existiert, die von EZ ausgeschüttet wird und die Relaxation von Blutgefäßen herbeiführt, welche zunächst als *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) beschrieben wurde. Später konnte gezeigt werden, dass es sich beim EDRF eigentlich um das Radikal NO handelt (Moncada und Palmer, 1989; Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). Als Zielprotein von NO konnte die NO-GC identifiziert werden (Ignarro et al., 1986a). Durch Katalyse von NO-GC wird Guanosintriphosphat (GTP) in den sekundären Botenstoff cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umgewandelt. Der Botenstoff cGMP initiiert über den cGMP-Signalweg zahlreiche physiologische Prozesse (Furchgott und Jothianandan, 1991; Waldman und Murad, 1988). Dabei handelt es sich um Relaxation von VSMC (Lincoln, 1989; Hofmann et al., 2000) und gastrointestinalen glatten Muskelzellen (Groneberg et al., 2010), Inhibition der Thrombozytenaggregation und -adhäsion (Mellion et al., 1981; Schwarz et al., 2001), Protektion gegen Ischämie oder Reperfusionsschaden des Herzens (Kass et al., 2007) und Modulation der synaptischen Transmission (Garthwaite et al., 1988; O'Dell et al., 1991; Zhuo und Hawkins, 1995).

1.4.1 Bildung von NO und dessen physiologische Aufgaben

NO wird durch die katalytische Aktivität von verschiedenen NO-Synthasen (NOS) gebildet, welche die Aminosäure L-Arginin zu NO und L-Citrullin umwandeln (Knowles et al., 1989; Schmidt und Murad, 1991). Zu dieser Familie zählen die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS). Alle NOS-Isoformen sind Homodimere, verwenden L-Arginin und Sauerstoff als Substrat und reduzieren das Co-Substrat Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH). Weitere Co-Faktoren die zur Herstellung von NO benötigt werden, sind Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (BH₄). Die NOS transferieren ein Elektron über das FAD und FMN auf die Häm-Gruppe der NOS. Diese bindet im Anschluss BH₄ und L-Arginin. Durch Reduktion von Sauerstoff und durch die Reduzierung von L-Arginin entstehen L-Citrullin und NO (Alderton et al., 2001; Crane et al., 1998).

eNOS ist ein konstitutiv exprimiertes Enzym, das hauptsächlich in EZ, aber auch in Kardiomyozyten und in bestimmten Neuronen im Gehirn exprimiert wird (Massion et al., 2005; Förstermann und Sessa, 2012). Physiologisch erfüllt eNOS mehrere Aufgaben: (1) Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und -Haftung: Durch eNOS kommt es zu einer Erhöhung des NO-Spiegels im Blut, wodurch die Aggregation und Haftung von Blutplättchen verringert wird; (2) Vasodilation (Rapoport et al., 1983; Förstermann et al., 1986; Ignarro et al., 1986b); (3) Hemmung der Leukozytenadhäsion: eNOS kann die Bindung von Leukozyten an die EZ-Wand verhindern und stellt dadurch einen Schutz gegen Atherogenese dar (Arndt et al., 1993; Kubes et al., 1991); (4) Stimulation der Angiogenese (Han und Stewart, 2006); (5) Kontrolle der VSMC-Proliferation: eNOS kann mittels cGMP den PDGFR β -Signalweg steuern und somit die Proliferation von VSMC beeinflussen (Southgate und Newby, 1990).

Die nNOS wird konstitutiv in spezifischen Neuronen im Gehirn exprimiert. Mittels einer PDZ-Domäne kann die nNOS mit anderen Proteinen über deren PDZ-Domäne interagieren. Durch diese Interaktionen werden die Aktivität und die Verteilung der nNOS gesteuert (Zhou und Zhu, 2009). Zusätzlich zum Gehirn konnte die nNOS auch im Rückenmark, in sympathischen Ganglien, Nebennieren, peripheren Nerven, Epithelzellen verschiedener Organe, in *Macula-densa*-Zellen der Niere, in Pankreas-Inselzellen, in VSMC, Skelettmuskeln und dem Gastrointestinaltrakt gefunden werden (Nakane et al., 1993). Im Gehirn ist die nNOS an der Steuerung von physiologischen Prozessen wie Lernen, Erinnern und Neurogenese beteiligt (Zhou und Zhu, 2009). Glatte Muskeln werden von nitrergen Neuronen innerviert. Nitrerge Neuronen können zudem die Relaxation von VSMC um Blutgefäße beeinflussen (Buchwalow et al., 2002).

Die iNOS wird im Gegensatz zu den beiden anderen NOS nicht konstitutiv exprimiert. Die Expression von iNOS wird durch bakterielle Liposaccharide, Zytokine und andere Botenstoffe induziert. Sie lässt sich hauptsächlich in Makrophagen und jedem Organ finden (Förstermann et al., 1994). Zudem wird die iNOS-Expression nicht durch den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel beeinflusst (Förstermann und Sessa, 2012). Sie hat eine bedeutende Aufgabe in der Immunabwehr, indem das von den Makrophagen freigesetzte NO parasitäre Mikroorganismen und Tumorzellen tötet (Wink et al., 1991; Fehsel et al., 1993).

1.4.2 Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC)

Viele der physiologischen Funktionen von NO, wie z. B. in kardiovaskulären, neuronalen oder gastrointestinalen Systemen, werden durch den Rezeptor NO-GC vermittelt. Nach Aktivierung der NO-GC durch NO kommt es zu einer Umwandlung von GTP zu cGMP. Neben der NO-GC existieren noch weitere Enzyme, die cGMP generieren können. Dazu gehören die membranständigen Guanylyl-Cyclasen (GC-A bis GC-G). Diese werden nicht durch NO aktiviert, sondern GC-A durch das atriale natriuretische Peptid (ANP) und GC-B durch das natriuretische Peptid vom C-Typ (CNP) (Kuhn, 2003).

Die NO-GC ist ein Heterodimer bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit (UE). Zwei NO-GC-Isoformen sind bekannt. Hierbei handelt es sich um die Heterodimere α_1/β_1 und α_2/β_1 (Friebe und Koesling, 2003). Der Heterodimer α_1/β_1 ist die am häufigsten vorkommende Isoform. Sie wird ubiquitär exprimiert und lässt sich in allen Organen finden. Besonders hoch ist die Expression dieser Isoform in Gehirn, Lunge, Herz, Niere, Milz und Muskulatur (Nakane et al., 1990). Die andere Isoform ist vor allem in Gehirn und Lunge präsent (Harteneck et al., 1991; Mergia et al., 2003).

Die NO-GC wird in drei Domänen unterschieden: eine N-terminale Domäne, eine zentrale Domäne und eine C-terminale katalytische Domäne. Die N-terminale Domäne enthält eine prosthetische Häm-Domäne, an die NO binden kann (Gerzer et al., 1981). In der prosthetischen Häm-Domäne liegt ein zentrales Eisenatom vor, das zwischen vier Stickstoffen und dem axial liegenden Ligand Histidin-105 koordiniert ist, die zusammen einen penta-koordinierten Aufbau bilden (Ignarro et al., 1986a; Foerster et al., 1996). In Anwesenheit des Co-Faktors Mg^{2+} bindet NO an das Eisen der Häm-Gruppe. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, bei der das Eisen aus der Ebene gezogen wird, was zum Bruch der Bindung zwischen dem Eisen und Histidin führt. Durch diesen Bruch kommt es zu einer Aktivierung des Enzyms (Ignarro, 1990). Die Anwesenheit der Häm-Gruppe ist entscheidend für die Funktion der NO-GC (Craven und DeRubertis, 1978).

Die NO-GC kann durch verschiedene Pharmaka in ihrer Funktion beeinflusst werden. Es wird hierbei zwischen Stimulatoren, Aktivatoren und Inhibitoren unterschieden. Bei den Stimulatoren handelt es sich um Substanzen, die die NO-GC direkt stimulieren, indem sie die Sensitivität der NO-GC für NO durch Stabilisierung der Häm-Domäne erhöhen (Stasch et al., 2001). Zu den prominentesten Vertretern der NO-GC-Stimulatoren zählen Bay 41-2272, Bay 41-8543 und Bay 63-2521 (Riociguat) (Straub et al., 2001). In der Klinik wird bereits der NO-GC-Stimulator Riociguat zur Behandlung von pulmonaler Hypertension verwendet (Mittendorf et al., 2009; Grimminger et al., 2009). Außerdem wurde Riociguat bereits zugelassen zur Behandlung von chronischer thrombotischer pulmonaler Hypertonie (Ghofrani et al., 2013).

Dagegen wirken die NO-GC-Aktivatoren unabhängig von NO. Zu den potentesten NO-GC-Aktivatoren gehört Bay 58-2667 (Cinaciguat). Dieses ersetzt die Häm-Domäne der NO-GC, wodurch es zur Aktivierung des Enzyms kommt (Stasch et al., 2001; Schmidt et al., 2003). Eben-

falls scheint der NO-GC-Aktivator Bay 60-2770, ein nahes chemisches Analog zu Bay 58-2667, die Aktivierung von HSC in CCl₄-Leberfibrosemodell zu reduzieren sowie die übermäßige EZM-Akkumulation zu verhindern (Perri et al., 2006; Evgenov et al., 2006).

Hingegen kommt es bei den Inhibitoren der NO-GC wie z. B. 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-on (ODQ) oder NS2028 zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit der NO-GC durch kompetitive Hemmung gegenüber NO. (Hwang et al., 1998; Kannan und Johnson, 1995; Mayer et al., 1993; Schrammel et al., 1996; Zhao et al., 2000). Dabei ist zu beachten, dass die Hemmung *in vitro* irreversible ist, während *in vivo* diese reversible ist (Lies et al., 2015; Moro et al., 1996).

1.4.3 cGMP und seine Effektoren

Das cGMP-Signal wird über drei Typen von intrazellulären Effektoren weitergeleitet: cGMP-abhängige Proteinkinasen, cGMP-aktivierte Ionenkanäle und cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs) (Hofmann et al., 2006). Die Esterhydrolyse von cGMP wird durch verschiedene PDEs katalysiert (Beavo, 1995).

1.4.3.1 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) – einer Serin/Threonin-Kinase – durch cGMP ist der Hauptmechanismus, der zur Relaxation von VSMC sowie zur Plättchenhemmung und synaptischer Plastizität führt (Walter, 1989; Murad et al., 1992; Walter und Gambaryan, 2009; Gratzke et al., 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PKG durch cGMP einen Einfluss auf die Proliferation von VSMC hat (Lukowski et al., 2008; Lincoln et al., 2006). Es wird zwischen einer zytosolischen PKG I (mit zwei Spleißvarianten: PKG I α und PKG I β) und einer membrangebundenen PKG II unterschieden (Hofmann et al., 2009; Lincoln et al., 1988). Während die PKG I hauptsächlich in VSMC und Thrombozyten exprimiert wird (Keilbach et al., 1992), kommt die PKG II vor allem im Darmepithel vor (Lohmann et al., 1997). Beide Isoformen enthalten eine katalytische und eine regulatorische Domäne. In der regulatorischen Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung nach cGMP-Bindung, wodurch die PKG aktiviert wird (Landgraf et al., 1990). Zur Relaxation von VSMC interagiert die PKG I β mit Inositol-1,4,5-trisphosphat-rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinasesubstrat (IRAG) (Schlossmann et al., 2000). PKG I β phosphoryliert IRAG, das die Inositol-1,4,5-trisphosphat-(IP₃-)induzierte Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Kompartimenten inhibiert (Ammendola et al., 2001). Zusätzlich phosphoryliert die PKG I den Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanal, wodurch dieser aktiviert wird (Fukao et al., 1999; Alioua et al., 1998). Dadurch kommt es zu einer Öffnung der Kanäle, was in einer Hyperpolarisation der Membran resultiert. Diese wiederum sorgt dafür, dass sich spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle schließen, wodurch der Ca²⁺-Einstrom gemindert wird (Sausbier et al., 2000; Robertson et al., 1993).

1.4.3.2 cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs)

Es sind 11 Familien von PDEs bekannt (Francis et al., 2001; Bender und Beavo, 2006). Diese lassen sich in zwei Klassen unterscheiden: (1) PDEs die cGMP hydrolysieren und (2) PDEs

die cAMP hydrolysieren. Während die PDE 5, 6 und 9 für cGMP spezifisch sind, sind die PDE 4, 7 und 8 für cAMP spezifisch. Die PDEs 1, 2, 3, 10 und 11 können sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren. Im Folgenden sind die physiologisch relevantesten Phosphodiesterases (PDEs) aufgeführt. PDE 2 lässt sich in Nebenniere, Leber, Lunge und Blutplättchen finden. Durch Bindung von cGMP an die allosterischen Stellen der PDE2 wird diese aktiviert, was zu einer verstärkten Hydrolyse von zellulärem cAMP führt. PDE3 ist ein cGMP-inhibiertes, cAMP-selektives Enzym, das in Herz, Lunge, Leber, Blutplättchen, Fettgewebe und entzündlichen Zellen exprimiert wird (Wechsler et al., 2002). Die am meisten untersuchte PDE ist die PDE5, die vor allem in der Lunge und in Blutplättchen beschrieben wurde (Francis et al., 1980; Coquil et al., 1980), wo sie vor allem in VSMC gefunden wird (Yanaka et al., 1998). Von PDE5 sind unterschiedliche Spleißvarianten (PDE5 A1, A2, A3) bekannt (Loughney et al., 1998; Lin et al., 2000). Bei der PDE5 ist die hohe Substrataffinität für cGMP hervorzuheben, die ca. 100 Mal größer ist als die für cAMP (Zoraghi et al., 2005). In der pharmakologischen Forschung sind besonders PDE-Inhibitoren interessant. Diese sorgen für einen verhinderten Abbau von cGMP, was zu einer erhöhten Vasodilation führt. Diese Inhibitoren werden besonders bei erektiler Dysfunktion eingesetzt (Sildenafil, Viagra[®]) (Supuran et al., 2006; Huang und Lie, 2013; Ignarro et al., 1990). Neuerdings jedoch werden die Inhibitoren auch bei vaskulären Erkrankungen wie z. B. pulmonaler Hypertension verwendet (Kass et al., 2007).

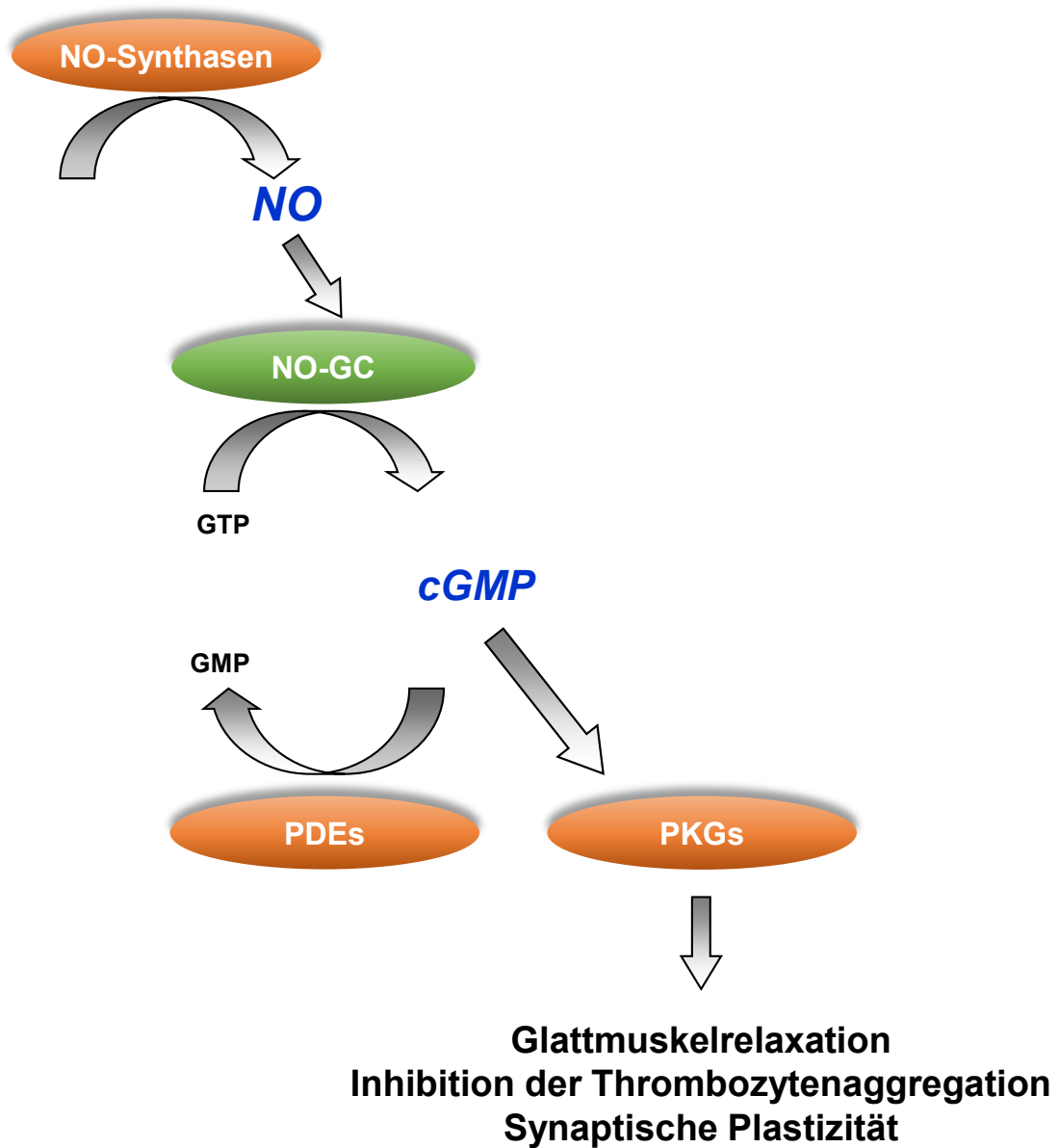


Abbildung 1.6: Die NO/cGMP-Signalkaskade

Das Signalmolekül NO wird von NO-Synthasen generiert. Der Rezeptor für NO ist die NO-GC. Durch Bindung an diese wird die Bildung des sekundären Botenstoff cGMP aus dem Molekül GTP verstärkt. cGMP aktiviert nachfolgende Effektorproteine z. B. cGMP-abhängige Proteinkinase (PKGs). Phosphodiesterasen (PDEs) bauen das synthetisierte cGMP wieder ab und beenden dadurch die Signaltransmission; modifiziert nach Friebe und Koesling (2003).

1.5 Transgene Mausmodelle

Transgene Tiermodelle sind zu einem Schlüsselinstrument zur Erforschung von physiologischen Prozessen geworden. Besonders im Fokus stehen dabei transgene Mäuse. Deren Genom korreliert zu 96% mit dem menschlichen Genom. Deshalb können transgene Mäuse neue Einblicke in pathophysiologische Vorgänge menschlicher Krankheiten liefern sowie das Verständnis dieser verbessern. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Mäusen als Modellorganismen ist, dass sie bedingt durch ihr geringes Körpergewicht nur wenig Platz brauchen. Des Weiteren besitzen sie eine hohe Reproduktionsrate und eine kurze Generationszeit (Houdebine, 2007).

1.5.1 Globaler NO-GC Knockout (GCKO)

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Friebe steht der globale NO-GC Knockout (GCKO) zur Verfügung. In diese Mäuse ist es möglich die NO-GC ubiquitär auszuschalten, sodass der Einfluss der NO-GC im Gesamten erfasst werden kann. Um GCKO-Tiere zu züchten, wurde das Cre-loxP-System verwendet. Hierbei wurden Mäuse benutzt, bei denen das Exon 10 der β 1-UE der NO-GC von zwei *lox*-Stellen umgeben war, und mit Tieren verpaart, welche die Cre-Rekombinase (Ela-Cre) ubiquitär exprimieren. Durch die Mutation in der β 1-UE kam es zu einer vollständigen Ausschaltung der NO-GC in allen Zellen, in denen die NO-GC exprimiert wird (Friebe et al., 2007; Friebe und Koesling, 2009).

Durch das globale Ausschalten der NO-GC kam es bei den Tieren zu einigen phänotypischen Auffälligkeiten. 80% der Tiere versterben bereits in den ersten zwei Tagen nach der Geburt. Die anderen Tiere sterben 3–5 Wochen nach dem Absetzen von der Muttermilch, durch eine stark verminderte gastrointestinale Motilität (Friebe et al., 2007). Deshalb erhielten die Tiere ein spezielles Futter (Abschnitt 3.2.1.1). Durch die globale Deletion der NO-GC kommt es zu makroskopischen Veränderungen bei den Tieren. Das *Caecum* ist stark vergrößert und die Gallenblase erweitert. Zudem zeigten die Tieren eine Erhöhung des systolischen Blutdruckes um 30 mmHg. Des Weiteren bleibt in GCKO-Tieren die NO gesteuert Thrombin-induzierte Aggregation aus, welches zu einer stark verkürzten Blutungszeit führt (Dangel et al., 2010).

1.5.2 Zellspezifischer Knockout der NO-GC

Es wurden verschiedene genetische Techniken entwickelt, um die zellspezifische Rolle eines Genprodukts bzw. des daraus abgelesenen Proteins zu untersuchen (Branda und Dymecki, 2004). Das heute meistbenutzte System basiert auf der seiten-spezifischen *Cyclization-recombination*-(Cre-)Rekombinase, die aus der Bakteriophage P1 stammt (Sauer und Henderson, 1988). Durch die Cre wird die Rekombination zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen (*locus of X-over of P1*) vermittelt. Bei der loxP-Stelle handelt es sich um ein acht Basenpaare (bp) langes Zentralelement, das von zwei palindromischen Sequenzen mit 13 bp Länge flankiert wird. Liegt ein chromosomales DNA-Segment zwischen zwei solchen gleichgerichteten Sequenzen („gefloxt“) vor, so wird es durch die Cre-Rekombinase in Form eines zirkulären Produktes ausgeschnitten und in der Zelle degradiert (Feil et al., 2009). Zur Durchführung eines zellspezifischen Ausschnittes eines Gens (bzw. Proteins) zu einem definierten Zeitpunkt wird

eine Cre-Rekombinase benötigt, die dieses bewerkstelligen kann. Hierzu wurden chimere Cre-Rekombinasen entwickelt, die durch Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Hormon-bindungsdomäne des Estrogenrezeptors (ERs) erzeugt werden konnten (CreER^{T2}). Aktiviert wird die CreER^{T2} durch Hydroxytamoxifen (OHT), das ein synthetischer Estrogenrezeptor-Ligand ist. OHT bindet an ER, wodurch die CreER^{T2} in den Zellkern eindringen und die Deletion durchführen kann (Feil et al., 1997; Zhang et al., 1996). Während mittels des CreER^{T2}-Systems die Zeit bestimmt werden kann – durch spezifische Gabe von Tamoxifen, das zu OHT metabolisiert wird – wann das Gen deletiert wird, kann durch die Kontrolle der CreER^{T2} (durch einen spezifischen Promotor gesteuert) festgelegt werden, in welchen Zellen diese exprimiert wird, d. h. in welchen Zellen es zum Ausschnitt des geflochten Gens kommt. Zum Einsatz kam die unter der Kontrolle SM/MHC- und PDGFR β -Promotor liegende CreER^{T2}. Somit wurde in allen Zellen, in denen der SM/MHC- bzw. PDGFR β -Promotor zur Zeit der Tamoxifen-Gabe abgelesen wurde, die NO-GC deletiert. Bei der Glatte Muskelzellen/Schwere-Myosin-Kette (SM/MHC)-GCKO-Linie ist darüber hinaus zu beachten, dass das SM/MHC-Cre-Konstrukt auf dem Y-Chromosom lokalisiert war. Das bedeutet nur männliche Tiere besaßen den gesuchten Genotypen und wurden somit in den Versuchen eingesetzt (Wirth et al., 2008).

1.5.3 Reporterermäuse

Neben den zellspezifischen Knockout-Mäusen existieren Reporterermäuse die ein Fluoreszenzprotein (z. B. tdTomato) exprimieren. In dieser Arbeit wurden Promotor-CreER^{T2}-Mäuse mit Mäusen gekreuzt, bei denen im ROSA26 *locus* das tdTomato-Gen vorlag, vor dem sich ein gefloxtes Stopcodon befand. Kommt es hier zur Bindung von OHT an die ER-Domäne der CreER^{T2}, so wird das Stopcodon ausgeschnitten; wodurch das Fluorophor tdTomato exprimiert wird. Durch diese Technik ist es möglich, Zellen zu identifizieren, in denen der entsprechende Promotor zur Zeit der Tamoxifen-Gabe aktiv ist (Madisen et al., 2010). Mit Hilfe dieser Reporterermäuse können *lineage tracing*-Versuche durchgeführt werden (Kretzschmar und Watt, 2012).

2 Zielsetzung

Bei der Fibrose bzw. der Narbenbildung handelt es sich um eine Reaktion auf eine wiederholten oder chronischen Verletzungen, die einer unkontrollierten Wundheilung entspricht. Dabei kommt es zu einer übermäßigen Produktion und Akkumulation von Kollagen, dem daraus resultierenden Verlust der Gewebearchitektur und dem Organversagen (Birbrair et al., 2014). Zwar existieren bis jetzt nur wenige Therapiemöglichkeiten (Rockey et al., 2015), jedoch zeigten bereits mehrere NO-GC-Stimulatoren bei der Behandlung von Organfibrosen (Haut, Niere, Leber, Lunge) *in vitro* und *in vivo* vielversprechende Resultate (Sandner und Stasch, 2017; Evgenov et al., 2006); durch den Einsatz von NO-GC-Stimulatoren wird die Produktion von EZM inhibiert (Lambers et al., 2014; Beyer et al., 2015). Um die Wirkung der NO-GC-Stimulatoren in der Fibrose besser zu verstehen, muss geklärt werden, in welchen Zellen in den betreffenden Organen die NO-GC exprimiert wird sowie den Einfluss der NO-GC auf die Pathogenese der Fibrose.

1: NO-GC-exprimierende Zellen in der Lunge

Im ersten empirischen Teil dieser Arbeit sollte herausgearbeitet werden, in welchen Zellen der Lunge die NO-GC exprimiert wird. Als NO-GC-exprimierende Zellen wurden die Lungenperizyten vermutet, da für andere Organe gezeigt werden konnte, dass die NO-GC in Perizyten exprimiert wird (Bettaga et al., 2015). Deshalb sollten die Perizyten der Lunge *in vitro* auf die NO-GC-Expression untersucht werden. Dazu wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Etablierung eines Protokolls zur Isolierung und Kultivierung von Lungenperizyten
2. Untersuchung der NO-GC-Expression in den isolierten Lungenperizyten
3. Differenzierung der isolierten Lungenperizyten

2: NO-GC-exprimierende Zellen in der Leber

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die Zellen identifiziert werden, die die NO-GC in der Leber exprimieren. HSC gelten als Perizyten der Leber (Hellerbrand, 2013). Deshalb wurde analog zu Teil 1 vermutet, dass die HSC die NO-GC-exprimierenden Zellen in der Leber sind. Im Anschluss sollte die NO-GC-Expression in der Leberfibrose und nach der Auflösung der Leberfibrose betrachtet werden. Dazu wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Identifizierung der NO-GC-exprimierenden Zellen in der murinen Leber
2. Untersuchung der NO-GC-Expression in der Leberfibrose
3. Vergleich der Fibrose zwischen WT und GCKO

3: Lineage Tracing der HSC

Bei der Suche nach Therapiemöglichkeiten für Organfibrosen ist es elementar, zu erfassen, woher die EZM-produzierenden Zellen in der Fibrose kommen. EZM wird hauptsächlich von Myofibroblasten produziert. Diese besitzen Eigenschaften von glatten Muskelzellen und Fibroblasten und sind gekennzeichnet durch die Expression von α -SMA (Bochaton-Piallat et al., 2016). Perizyten sind als Vorläuferzellen der Myofibroblasten in den Fokus gerückt. Bereits in mehreren Organen konnte mittels *Lineage Tracing* gezeigt werden, dass Perizyten zu EZM sezernierenden Myofibroblasten differenzieren (Wells et al., 2015). In der Leber werden die HSC als die

Vorläuferzellen der EZM produzierenden Myofibroblasten vermutet. Deshalb sollte im dritten Teil dieser Arbeit HSC-spezifische Reportermäuse verwendet werden und mit diesen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Lokalisierung der Fluoreszenz-markierten Zellen in der Leber
2. Untersuchung der markierten Zellen in der CCl₄-induzierten Leberfibrose
3. Untersuchung der Zellen bei der Auflösung der Leberfibrose

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Geräte

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte, Typenbezeichnung und Hersteller

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
Autoklav	5075 ELC-G	Tuttnauer Europe B.V, Breda, Niederlande
CO ₂ -Inkubator	HERAcell® 150	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	DM6 FS	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Geldokumentation	Gel Logic 100 FluorChem™ SP	Kodak Inc., New York, USA Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Gelelektrophorese-Apparatur	Mini-PROTEAN® System	Tetra Bio-Rad, München, Deutschland
Konfokalmikroskop	TCS SP5/SP8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kryostat	CM3050 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank	HERAfreeze™ HFU B Serie	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Inkubator	Heraeus® B 5042 E	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Inverses Mikroskop	ID03	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Labor-Wärmeschrank	U400	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Lichtquelle	KL 2500 LED	Schott AG, Mainz, Deutschland
Magnetrührer	Combimag RCT	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
PCR-Thermocycler	FlexCycler	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
pH-Meter		Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Plattenleser	Wallac 1420 VICTOR2™	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Sicherheitswerkbank	BSB-6A	Gelaire Flow Laboratories Inc., USA

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte, Typenbezeichnung und Hersteller

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
Stereo Mikroskop	SZ51	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
Spannungsquelle	EV 231	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Spektralphotometer	SIMPLINANO™	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Thermocycler	CFX96 Touch™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermomixer	TMix	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Mikrozentrifuge	5415C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Mixer	Vortex-Genie 2	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Waage	R 160 P	Sartorius Corporate Administration GmbH, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL 1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus® Biofuge® fresco Rotofix 32A	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

3.1.2 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Miglyol® 812	Apotheke, Würzburg, Deutschland
Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB); DL-Dithiothreitol (DTT); Ethanol (EtOH) absolut; Kaliumdihydrogenphosphat (KH); Leupeptin; Natriumdodecylsulfat (SDS); Pepstatin-A; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fötale Kälber Serum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
GelRed®	Biotium Inc., Fremont, USA
Normales Esel Serum (NDS)	Biowest Inc., Riverside, USA
EtOH (96%) vergällt	Brügemann Alkohol, Heilbronn, Deutschland

Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid; Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4); D(+)-Glucose Monohydrat; Kupfer(II)-sulfat; wasserfrei (CuSO_4); N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED); Ponceau [®] S; Roti [®] -Block; Trichloressigsäure (TCA); Tris/HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Tamoxifen	Cayman Chemical Inc., Ann Arbor, USA
Benzamidin	Fluka Chemie AG, Heidelberg, Deutschland
Agarose LE	GENAXXON Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Bay 41-2272; β -Mercaptoethanol; Ethylendiaminotetraacetat (EDTA); Glycerin (85%); Methanol (MeOH); Paraformaldehyd (PFA); Triethylamin (TEA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pikro-Siriusrot; Xylol	Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Transformierender Wachstumsfaktor- β Maus (TGF- β) (10 ng/ml)	PeproTech, Hamburg, Deutschland
Perizyten-Medium Maus; Perizyten Wachstumsfaktor	Science Cell Inc., Carlsbad, USA
Bradford-Reagenz, 5x Konzentrat; Isopropanol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Albumin aus Hühnereiweiß Grad II; Ammoniumperoxodisulfat (APS); Bromphenolblau; DABCO [®] ; DAPI; Digitonin; Dimethylsulfoxid (DMSO); Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA); Rinderserumalbumin (BSA); Saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$); Tetrachlormethan (CCl_4); Triton [™] X-100; Trypanblau; Tween [®] 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Corning™ Kollagen I, Ratte; Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium + Glutamax™-I (DMEM [+] 1g/l D-Clearnce [+] Pyruvat; Kollagen I vom Ratten Schwanz (4 mg/ml); Kaliumchlorid (KCl); Natriumhydroxid (NaOH); Penicillin-Streptomycin (P/S) (10.000 U/ml) & 69-57-8 (Penicillin G Natriumsalz) 3810-74-0 (Streptomycinsulfat); Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS); Radioimmunpräzipitations-Test (RIPA); Trinatriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$); Trypsin/EDTA-Lösung 0,25% (w/v) / 0,02% (w/v) in PBS (w/o) Ca^{2+} (w/o) Mg^{2+}	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien, Kits und Hersteller

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
SsoFast™ EvaGreen® Supermix Deckgläschen (24 x 60 mm, No 1.5) Immersionsöl	Bio-Rad, München, Deutschland Marienfeld Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gewebe- und Zellhomogenisator (QIASchredder™); RNeasy® Mini Kit Einbettmedium TissueTek® OCT Compound	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland Sakura FineTek Germany GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
CyroPure Gefäß (1,6 ml), Zellkultur-Deckgläser (Ø13 mm) Hochkapazitäts-cDNA-Reverse-Transkriptions-Kit; <i>in-situ</i> -Zell-tod-Erkennungsset, Super Signal® ELISA Femto Substrat Adhäsionsobjektträger, SuperFrost® Plus, Menzel Gläser; Nylonfilter (50 µm)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland VWR International, Darmstadt, Deutschland

3.1.4 Enzyme

Tabelle 3.4: Verwendete Enzyme und Hersteller

Enzym	Hersteller
Kollagenase II	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Phire Hot Start II DNA Polymerase, Phire Reaction Puffer, RNase Inhibitor (20 U/ μ l), Trypsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland

3.1.5 Antikörper

Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper, Wirt, Verdünnung und Hersteller

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
α 1-NO-GC	Kaninchen	1:200	Friebe et al., 2007
α -SMA	Kaninchen	1:1000	Abcam Inc., Cambridge, UK
α -SMA		1:500	Abcam Inc., Cambridge, UK
β 1-NO-GC	Kaninchen	1:800	Friebe et al., 2007
CD31	Ratte	1:200	Becton, Dickinson and Company Inc., New Jersey, USA
Col1 α 1	Kaninchen	1:500	Abcam Inc., Cambridge, UK
Desmin	Ziege	1:200	Antikörper Online, Aachen, Deutschland
F4/80	Ratte	1:100	Bio-Rad, München, Deutschland
GAPDH	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Histon H3	Kaninchen	1:2000	Abcam Inc., Cambridge, UK
Lectin		1:200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
NG2 (Proteoglycan)	Kaninchen	1:200	Merck Millipore, Burlington, USA
PDGFR β	Ziege	1:200	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
PPAR γ	Kaninchen	1:1000	Abcam Inc., Cambridge, UK
pSMAD3	Kaninchen	1:200	Abcam Inc., Cambridge, UK
SM/MHC	Kaninchen	1:200	Abcam Inc., Cambridge, UK
Vimentin	Kaninchen	1:200	Abcam Inc., Cambridge, UK

3.1.6 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland bezogen.

Tabelle 3.6: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Schmelztemperatur (T_m) in [°C]
Acta2 5'	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	62,9
Acta2 3'	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	67,0
β -actin 5'	TGTTACCAACTGGGACGACA	64,1
β -actin 3'	GGGGTGTGGAAGGTCTCAA	63,9
β 1-NO-GC 5'	GCGGTACTCTTGCCCTGGAAG	66,0
β 1-NO-GC 3'	GACCATAATTGCGGATCACCA	66,7
Col1 α 1 5'	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	64,6
Col1 α 1 3'	CCACGTCTCACCATTGGGG	68,9
PDGFR β 5'	TCCAGGAGTGATACCAGCTTT	62,6
PDGFR β 3'	CAGGAGCCATAACACGGACA	66,1
TGF- β 1 5'	CATGGACTGGTGAAACGA	68,5
TGF- β 1 3'	CGCGAGCCTTAGTTTGGACA	66,3

3.2 Methoden

3.2.1 Tiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien/Tiere wurden von Prof. Dr. Andreas Friebe bereitgestellt. Dabei handelte es sich um die folgenden Mauslinien: Globaler NO-GC-Knockout (GCKO), Glatte Muskelzellen/Schwere-Myosin-Kette (SM/MHC-)GCKO und Blutplättchen-Wachstumsfaktor- β -(PDGFR β -)GCKO.

3.2.1.1 Haltung

Zur Haltung wurden Käfige vom Makrolon-Typ II (bis zu sechs adulte Tiere) und Typ III (bis zu vier adulte Tiere) verwendet. Das Einstreu in den Käfigen bestand aus Holzspänen. Zusätzlich lag in jedem Käfig ein Spielzeug (Kartonrolle, Eierkarton) sowie ein Zellulosepapier vor. Wasser und Futter wurde allen Tieren *ad libitum* gegeben. Auf Grund des gastrointestinalen Phänotyps der GCKO-Tiere und der damit verbundenen hohen Letalität erhielten diese eine ballaststoffarme Diät (Altromin 1013), die zusätzlich einen Protonenpumpeninhibitor (Omeprazol) und Natriumbikarbonat enthielt. Alle weiteren Mauslinien bekamen die Nager-Standarddiät (Altromin 1320) (Friebe et al., 2007).

3.2.1.2 Zucht

Um Tiere mit einem gewünschten Genotyp zu erhalten, wurden jeweils zwei heterozygote Weibchen im gebärfähigen Alter (8 bis 45 Wochen) und ein heterozygoten Männchen (7 Wochen bis 1 Jahr) miteinander verpaart. Im Anschluss – 18 bis 21 Tage nach der Geburt – wurde der Nachwuchs von der Mutter abgesetzt und nach Geschlecht getrennt (Abbildung 3.1).

3.2.1.3 Induktion der zellspezifischen Knockout-Tiere und Reportermause

Um die Deletion der geflochten Stellen zu induzieren, wurde 6 bis 8 Wochen alten Tieren 50 μ g Tamoxifen (gelöst in Miglyol[®] 812) pro g Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) injiziert. 50 Tage nach der letzten Injektion konnten die Tiere in Versuchen eingesetzt werden, da zu diesem Zeitpunkt ein vollständiger Ausschnitt der NO-GC erreicht war (Groneberg et al., 2010).

3.2.1.4 Fibrose-Modell

CCl₄-Induktion von Leberfibrose wurde mit 10 bis 12 Wochen alten Tieren durchgeführt. Hier wurde Mäusen vier Wochen lang dreimal wöchentlich 1 μ l CCl₄ oder Miglyol[®] 812 pro g Körpergewicht i.p. verabreicht. Die Lebern wurden 24 h nach der letzten Injektion isoliert (Abschnitt 3.2.5.3) (Henderson et al., 2013). Um die Auflösung der Leberfibrose zu untersuchen, wurden die Lebern 7 Tage nach der letzten Injektion entnommen.

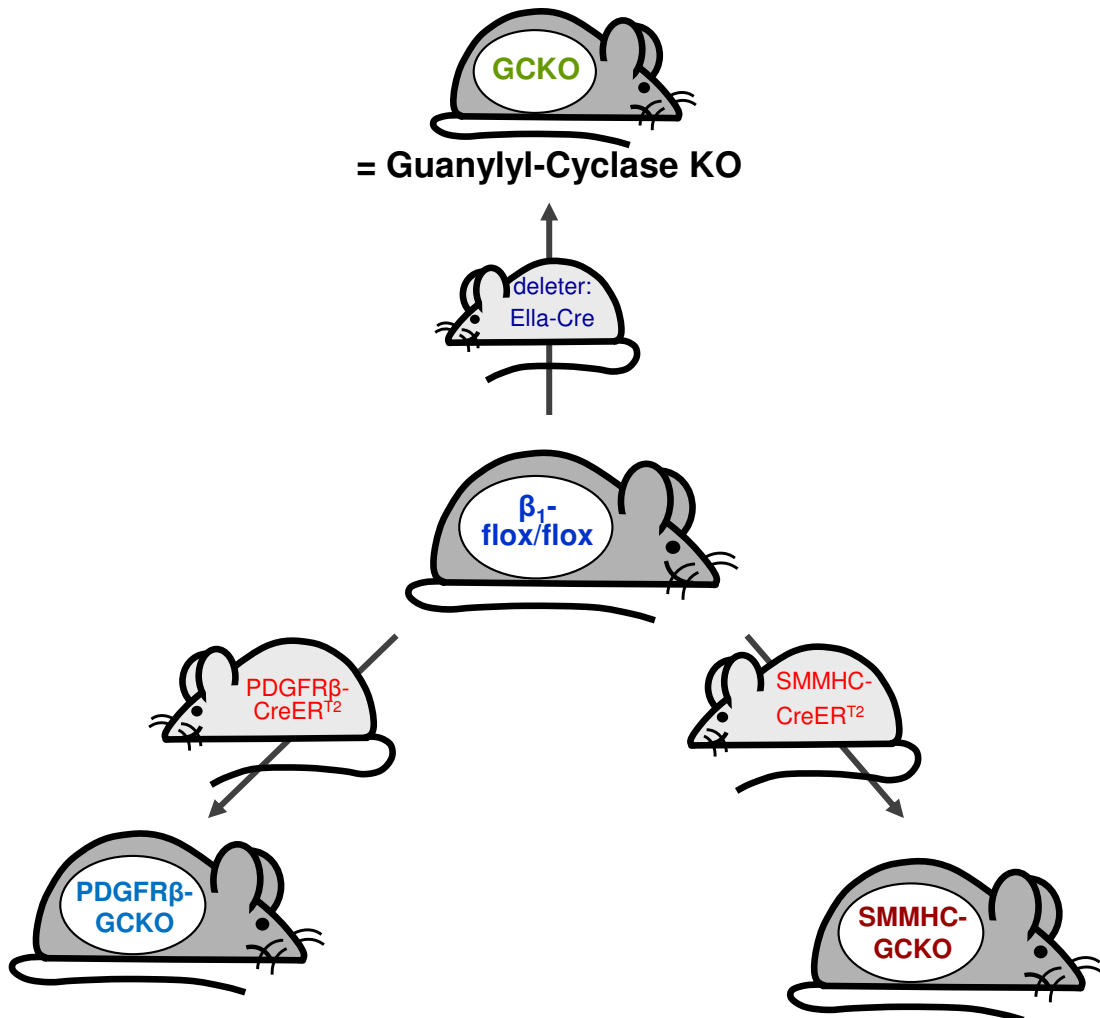


Abbildung 3.1: Generierung der Knockout-Mausmodelle

Durch die Verpaarung einer Maus mit gefloxtem Exon 10 der β_1 -UE der NO-GC (β_1 -flox/flox) mit einer Maus, die die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimieren (Ella-Cre) konnte eine globale Knockout-Mäuse (GCKO) erzeugt werden. Zur Generierung von zellspezifischen Knockout-Mäusen wurde eine β_1 -flox/flox-Maus mit Mäusen verpaart, bei denen die CreER^{T2} unter Kontrolle des SM/MHC- und PDGFR β -Promotors stand.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Isolierung der Zellen

Kulturmedium:

96% Perizyten-Medium

2% (v/v) Fötale Kälber Serum

1% (v/v) Perizyten Wachstumsfaktor

1% (v/v) Penicillin-Streptomycin

Ziel dieses Versuches war es, Perizyten aus der Maus-Lunge zu isolieren und in Kultur zu bringen. Die zu verwendenden Mäuse wurden mit Isofluran CP und anästhesiert durch zervikale Dislokation getötet. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank ausgeführt. Der Rippenbogen der Maus wurde durchtrennt und die Lungenlappen vorsichtig aus der Maus entnommen und in eine mit PBS gefüllte Petrischale gelegt. Von den einzelnen Lappen wurden die Ränder abgeschnitten und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß platziert. Nach zweimaligem Waschen der Gewebe mit sterilem PBS wurden diese in 4% (w/v) Kollagenase in PBS homogenisiert. Hierzu wurden Einmalkanülen (aufsteigend von 20 x G nach 24 x G) verwendet und durch Hoch- und Herunterziehen der Lösung ein Homogenat erzeugt. Das Homogenat wurde für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde das Homogenat durch einen 50-nm-Nylonfilter in ein 50-ml-Röhrchen gefiltert und der Filter zweimal mit 1 ml PBS gespült. Der Durchfluss wurde dann für 10 min bei 100xg zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach Abschluss der Resuspendierung wurden 10 ml Medium hinzugegeben und das Zellhomogenat nochmals durchmischt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl des Zellhomogenats mit 50 µl Trypanblaulösung (0,4%) in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß 1:2 verdünnt. Die Lösung wurde vorsichtig auf- und abpipettiert und 10 µl wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Anhand der bestimmten Zellzahl pro ml und der Tabelle 3.7 konnte die Zellsuspension verdünnt werden, welche dann in der unten geschilderten Zellkultivierung (Abschnitt 3.2.2.2) weiterverwendet wurde.

Tabelle 3.7: Eingesetzte Zellzahlen in Abhängigkeit der Fläche

Wachstumsfläche des Kulturgefäßes in [cm ²]	eingesetzte Mediummenge
25	5–7
9,5 (6-well plate)	4,2–4,5
3,8 (12-well plate)	3,8–4

3.2.2.2 Kultivierung der Zellen

Zur Kultivierung von aus der Lunge isolierten Perizyten mussten die verwendeten *wells* mit Kollagen beschichtet werden. Hierzu wurde eine Lösung mit 2% (v/v) Kollagen-I-Lösung (in PBS)

hergestellt, die auf die Wachstumsflächen gegeben wurde. Im Anschluss wurden diese für 2 h bei 37 °C inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Danach konnten die zuvor isolierten Zellen (siehe Abschnitt 3.2.2.1) ausgesät und bei 37 °C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert werden. Sollten die Zellen jedoch für immunhistochemische Versuche kultiviert werden, wurden in 12-wells Glasplättchen gelegt. Diese wurden ebenfalls mit Kollagen beschichtet; das weitere Verfahren war identisch mit demjenigen bei Kulturflächen ohne Glasplättchen. Nach 24 h wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen, das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde erneut Kulturmedium (Tabelle 3.8) auf die Zellen gegeben und der Phänotyp der Zellen mittels Durchlichtmikroskop überprüft. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 90% erreicht hatten.

In allen Versuchen wurden nur Zellen eingesetzt, die unpassagiert waren.

Tabelle 3.8: Eingesetzte Mediummenge in Abhängigkeit von der Größe des verwendeten Kulturgefäßes

Wachstumsfläche des Kulturgefäßes in [cm ²]	eingesetzte Mediummenge
25	5,0 ml
9.5 (6-well plate)	2,5 ml
3,8 (12-well plate)	1,0 ml

3.2.2.3 Behandlung mit Substanzen

Ziel war es, die Zellen mindestens 1,5 Zellzyklen lang mit den jeweiligen Substanzen zu inkubieren. Da die Zellen eine Verdopplungszeit von ca. 40 h besitzen, wurde die Inkubationszeit auf 72 h festgelegt. Dazu wurde bei den Zellen einen Tag, nachdem sie in Kultur gebracht worden waren, das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen (siehe Abschnitt 3.2.2.2). Danach wurde auf die Zellen neues Kulturmedium gegeben, das mit den verschiedenen Substanzen versetzt war. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit den Zellen wie in Abschnitten 3.2.4.1 bzw. 3.2.5.2 beschrieben weitergearbeitet.

3.2.3 Molekulargenetische Methoden

3.2.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Alkalischer Lysepuffer

10 M NaOH
0,5 M EDTA
pH 8,0

Neutralisationspuffer

1 M Tris/HCl

Um genomische DNA aus Gewebe zu erhalten, wurde die HotSHOT-Methode nach Truett et al. (2000) eingesetzt. NaOH zerstört die Zellwände – einschließlich der Zellkernmembran – und die *Double-strain*-DNA (dsDNA) wird zu *Single-strain*-DNA (ssDNA) denaturiert. Mittels Tris/HCl wird

die Reaktion neutralisiert bzw. abgestoppt.

Zur Genotypisierung wurden Ohrstanzen der Maus verwendet. Diese wurden mit 50 μl alkalischem Lysepuffer und Inkubation für 20 min bei 95 °C bei starkem Schütteln lysiert, danach kurz auf Eis gekühlt und anschließend mit 50 μl Neutralisationspuffer neutralisiert.

3.2.3.2 Isolierung von RNA (mittels RNeasy® Mini Kit)

Das Vorgehen bei der Herstellung von DEPC-H₂O kann Abschnitt 3.2.3.5 entnommen werden. Die anderen Puffer waren im RNeasy® Mini Kit enthalten. Die Isolierung von RNA aus Gewebe erfolgte mittels RNeasy® Mini Kit. Dazu wurde das zu untersuchende Gewebe zunächst aus der Maus isoliert und in eiskaltem PBS in kleine Stücke geschnitten. Die Gewebeproben wurden mit flüssig N₂ eingefroren und konnten bei -20 °C (für bis zu 2 Monate) oder bei -80 °C (für bis zu 2 Jahre) gelagert werden. Zur RNA-Isolation wurden 30 mg des Gewebes zusammen mit 600 μl Lysepuffer in ein Lysegefäß gegeben und durch den Einsatz eines *Dounce*-Homogenisators homogenisiert. Zum Abtrennen von Zellresten wurden die lysierten Proben auf einen Gewebehomogenisator (QIASchredder™) pipettiert und für 3 min bei 10.000 xg zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Gewebehomogenisator-Säule verworfen, 1 Volumen 70% EtOH zum Homogenat gegeben und durch Invertieren durchmischt. Aus diesem Ansatz wurden 700 μl entnommen, auf eine RNeasy-Mini-Säule pipettiert und für 15 s bei 8000 xg zentrifugiert. Hierbei kam es zur Bindung der RNA an die Säule. Darauf wurden drei Waschschriffe durchgeführt. Beim ersten Waschschriff wurden 700 μl RP1-Puffer auf die Säule gegeben und für 15 s bei 8000 xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses und Pipettieren von 500 μl RPE-Waschpuffer auf die Säule wurde wiederum für 15 s bei 8000 xg zentrifugiert und dann erneut 500 μl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Im Anschluss wurde diese für 2 min bei 8000 xg zentrifugiert. Es erfolgte die Elution der RNA mit 30-50 μl DEPC und durch Zentrifugation für 1 min bei 8000 xg.

3.2.3.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Messung der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sowie der Nukleinsäurekonzentration erfolgte mittels des Spektralphotometers SIMPLINANO™. Als Nullwert wurde DEPC verwendet. Über den Quotienten von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ konnte die Reinheit der vorliegenden Probe bestimmt werden.

3.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode, bei der ein spezifischer Teil (durch Primer definiert) der Ausgangs-DNA mit Hilfe von Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) und einer DNA-Polymerase amplifiziert wird (Saiki et al., 1988).

Zur Vervielfältigung der genomischen DNA wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz:

- 1 x Puffer (mit 1,5 mM MgCl₂)
- 200 µM dNTP
- 2,0 µM Primer *forward*
- 2,0 µM Primer *reverse*
- 1,0 U DNA-Polymerase

Von dem Ansatz wurden 19 µl in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, wozu ca. 100 ng DNA kamen. Im Anschluss wurde die PCR, wie in Tabelle 3.9 zu sehen, durchgeführt.

Tabelle 3.9: Programm für die PCR

Schritt	Temperatur in [°C]	Zeit in [min]	Wiederholung
Denaturierung	94	2	
Anlagerung der Primer Verlängerung der Primer	Annealing-Temperatur 72	45 s 2	bis zu 35 Mal
Ende	4	∞	

Bei allen Versuchen wurde eine Negativkontrolle – ohne DNA – mitgeführt, um den Versuchsansatz auf evtl. Kontaminationen zu überprüfen.

3.2.3.5 cDNA-Synthese

DEPC

0,1% (v/v) DEPC

Bei der cDNA-Synthese kam das Hochkapazitäts-cDNA-Reverse-Transkriptions-Kit von Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland zum Einsatz. Hierfür wurde zunächst ein 2 x Reaktionsansatz vorbereitet, der sich wie folgt zusammensetzte:

Ansatz:

- 2 x Puffer
- 2 x dNTP Mix
- 2 x *Random Primers*
- 5,0 U *MultiScribe Reverse[®] Transcriptase*
- 2,0 U RNase-Inhibitor

Zur Durchführung der cDNA-Reaktion wurden in jedem Reaktionsgefäß 10 µl des 2 x Reaktionsansatzes vorgelegt. Dazu wurden 10 µl (1:1-Verdünnung) einer 0,2-µg/µl-RNA-Lösung gegeben; d. h. pro Reaktion lagen 2 µg RNA vor. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden im PCR-Thermocycler von Analytik Jena AG, Jena, Deutschland wie in Tabelle 3.10 zu sehen inkubiert.

Tabelle 3.10: Programm für die cDNA-Synthese

Stufe	Temperatur in [°C]	Zeit in [min]
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

3.2.3.6 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

In der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) kann die Menge an amplifiziertem Produkt mittels Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Dazu wird ein Fluoreszenz-Reportermolekül (SYBR[®] *Green*) verwendet, das sich in die kleine Furche der dsDNA einlagern kann. Liegt SYBR[®] *Green* in Lösung vor, besitzt es nur eine geringe Fluoreszenz; kommt es jedoch zur Interkalation in die dsDNA, steigt die Intensität der Fluoreszenz um das 1000fache an. Damit verhält sich die Intensität der SYBR[®] *Green*-Fluoreszenz proportional zur dsDNA-Konzentration. Die Fluoreszenzintensität wird zur Auswertung logarithmisch gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Dabei wird der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Intensität größer ist als die Hintergrundfluoreszenz; dieser wird als *Crossing Point* (CP) bezeichnet. Des Weiteren kann in Kombination mit SYBR[®]-*Green* eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden: Nach Beendigung der PCR (30–40 Zyklen) werden mit dieser die entstandenen Produkte untersucht. Um auszuschließen, dass es sich bei der gemessenen Fluoreszenz um Signale von Primer-Dimeren und Nebenprodukten handelt, muss der Schmelzpunkt bestimmt werden. Durch kontinuierliches Aufheizen der Probe bis auf 95 °C wird die dsDNA aufgetrennt, wodurch sich die SYBR[®]-*Green*-Moleküle lösen und die Fluoreszenz verschwindet. Um die genannten Störfaktoren auszuschließen, sollte das Ziel sein, eine einheitliche Schmelztemperatur (T_m) für die jeweilige Probe zu erzielen.

Ein wichtiger Aspekt bei der RT-PCR ist die Auswahl der Primer. Diese sollten drei Bedingungen erfüllen: (1) Sie sollten Exon-überspannend sein, (2) zu einem Produkt führen, das kleiner als 200 bp ist, und (3) eine ähnliche Annealing-Temperatur (ca. 60 °C) besitzen. Die Primer-Sequenz für die β 1-UE wurde aus der Studie von Mergia et al. (2003) entnommen, während die übrigen verwendeten Primer mit Hilfe des *Primer-BLAST-Tools* der *US National Library of Medicine* bestimmt wurden (Tabelle 3.1.6).

Die Reaktionsansätze für die RT-PCR setzen sich wie folgt zusammen:

Ansatz:

- 10 µl SsoFast™ EvaGreen® Supermix
- 2 µM Primer *forward*
- 2 µM Primer *reverse*
- 10 µng cDNA
- ad H₂O

Der o. g. Reaktionsansatz wurde mit H₂O auf 20 µl gebracht, dann in einem Thermocycler positioniert und wie in Tabelle 3.11 zu sehen inkubiert.

Tabelle 3.11: Programm für die RT-PCR

Schritt	Temperatur in [°C]	Zeit in [s]	Wiederholung
Denaturierung	94	15	
Anlagerung der Primer	Annealing-Temperatur	30	40 Zyklen
Schmelzkurve	60–95		
Ende	4	∞	

Um die relative Expression eines Gens zu bestimmen, wurde in allen untersuchten Proben die Expression eines Haushaltsgens ermittelt. Bei Letzterem handelt es sich um ein Gen, das in den Zellen immer konstant abgelesen wird. Diese Expression sollte des Weiteren nicht durch andere Einflüsse (z. B. Induktion einer Fibrose) beeinflusst werden. In dieser Arbeit wurde β-Aktin als Haushaltsgen verwendet. Um eine quantitative Aussage über das Zielgen zu treffen, wurde die $\Delta\Delta C_P$ -Methode (Abbildung 3.2) verwendet.

$$\Delta C_P = C_P(\text{Zielgen}) - C_P(\beta\text{-actin})$$

$$\Delta\Delta C_P = \frac{\Delta C_P(\text{Probe})}{\Delta C_P(\text{Kontrolle})}$$

Abbildung 3.2: Berechnung von $\Delta\Delta C_P$

Zudem ist bei der Quantifizierung der Ergebnisse der RT-PCR die Effizienz (E) der einzelnen Reaktionen zu berücksichtigen. Es wird dabei näherungsweise davon ausgegangen, dass es pro Zyklus zu einer Verdopplung der cDNA kommt, d. h., es liegt eine E von 2 vor. Um dies zu überprüfen, wurde für jede cDNA-Probe eine Verdünnungsreihe angesetzt (1:20, 1:10, 1:5) und – mit den in Tabelle 3.11 beschriebenen Konditionen – eine RT-PCR durchgeführt. Die Werte wurden anschließend logarithmisch gegen die Verdünnungsstufen aufgetragen. Aus der Steigung der Geraden konnte im Anschluss E berechnet werden.

3.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese**1 x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)**

40 mM Tris/OH

10 mM EDTA

20 mM HAc

1,5 x Beladungspuffer

0,01% (v/v) Bromphenolblau

10 mM EDTA

14,5% (v/v) Glycerol

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wird die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Hierbei können die Fragmente, bedingt durch ihre negative Ladung, in einem elektrischen Feld bewegt werden. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Die Trennleistung wird entscheidend durch die Konzentration der Agarose im Gel beeinflusst: Je höher die Konzentration an Agarose, desto kleiner sind die Poren im Gel. Somit können bei hohen Agarosekonzentrationen kleine DNA-Fragmente – und bei kleinen Agarosekonzentrationen große Fragmente – besser aufgetrennt werden (Aaij und Borst, 1972).

Zur Durchführung wurde Agarose in 1 x TAE-Puffer gegeben und durch Aufheizen in der Lösung geschmolzen. Um die DNA später im Gel sichtbar zu machen, muss ein DNA-Farbstoff hinzugegeben werden. Hier wurde GelRed[®] verwendet, das zwar strukturell verwandt mit Ethidiumbromid (EtBR) ist, jedoch als nicht kanzerogen gilt. Wie EtBR beginnt es stark zu fluoreszieren, wenn es mit Nukleinsäuren interagiert und durch Ultraviolett-Licht (254 nm) angeregt wird. Nachdem GelRed[®] im Puffer gelöst war, konnte die Lösung in eine Kammer gegossen werden. Um Taschen zu erhalten, in denen später die Proben platziert werden sollten, wurden Käbme im noch flüssigen Gel positioniert. Zum Aushärten des Gels wurde dieses bei 4 °C gelagert. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das Gel aus dem Kühlschrank genommen, in eine Elektrophoresekammer platziert und mit 1 x TAE-Puffer übergossen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit dem Beladungspuffer 1:2 verdünnt und jeweils 3 µl in die Taschen pipettiert. Im Anschluss wurde die Elektrophorese bei 70–80 V durchgeführt, wobei sich die Dauer an der Größe der DNA-Fragmente orientierte. Je kleiner diese waren, desto kürzer lief die Gelelektrophorese. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel mit UV-Licht angeregt und die emittierte Fluoreszenz (560 nm) mittels einer CCD-Kamera aufgenommen.

3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen

Protein-Lysepuffer

2 mM DL-Dithiothreitol (DTT)

1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

1 mM Benzamidin

1 μ M Pepstatin

50 μ M Leupeptin

ad Radioimmunpräzipitations-Test(RIPA-)Puffer

Für einen Western-Blot müssen zunächst die Proteine aus den Zellen isoliert werden. Dazu wurden diese auf Eis positioniert, das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen zweimal für 5 min mit eiskaltem PBS gewaschen. Durch Zugabe von kaltem Radioimmunpräzipitations-Test(RIPA-)Puffer (+ Proteasen) und Inkubation für 10 min konnten die Zellen lysiert werden. Dabei richtet sich das Volumen an zugegebenem RIPA-Puffer nach der Größe der *wells* (Tabelle 3.12). Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat bei 12.000 xg und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Zentrifuge: Heraeus® Biofuge® fresco von Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die lysierten Proben wurden danach in flüssiges N₂ eingefroren und ü. N. bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen aufgetaut und mittels BCA-Test die Proteinmenge (Abschnitt 3.2.4.3) bestimmt.

Tabelle 3.12: Eingesetztes RIPA-Volumen in Abhängigkeit von der Größe des verwendeten Kulturgefäßes

Wachstumsfläche des Kulturgefäßes in [cm ²]	eingesetzte RIPA Volumen
25	500 μ l
9,5 (6-well plate)	200 μ l
3,9 (12-well plate)	90 μ l

3.2.4.2 Isolierung von Proteinen aus Gewebe

Zunächst wurde das Gewebe aus der Maus isoliert und in eine Schale gelegt, die mit eiskaltem PBS gefüllt war. Die Gewebeproben wurden klein geschnitten und mit flüssigem N₂ eingefroren. Sie konnten entweder bei -20 °C oder -80 °C gelagert werden. Für die Proteinisolierung wurde ein 5 mg großes Stück Gewebe in einen *Dounce*-Homogenisator, der auf Eis lag, gegeben und mit 300 μ l eiskaltem RIPA-Puffer (+ Proteasen) (Abschnitt 3.2.4.1) homogenisiert. Dieses Homogenat wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat bei 12.000 xg und 4 °C für 20 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt und die Proteinmenge mittels BCA-Test (Abschnitt 3.2.4.3) bestimmt.

3.2.4.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Test

Da der Bradford-Test besonders anfällig gegenüber Tensiden ist, die im RIPA-Puffer enthalten sind, wurde in dieser Arbeit der Bicinchoninsäure(BCA-)Assay zur Bestimmung der Proteinmenge verwendet. Bei Vorliegen eines alkalischen pH-Wertes kommt es zur Bindung von zweiwertigen Kupfer-Ionen an die Peptidbindung der Proteine, wodurch diese reduziert werden. Liegt zusätzlich BCA in der Lösung vor, bilden die gebundenen Kupfer-Ionen mit dieser einen blauviolettten Farbstoff aus.

Mittels einer Rinderserumalbumin-(BSA-)Standardreihe (0, 100, 300, 500, 700 und 1000 μg) wurde eine Eichgerade bestimmt. Jeweils 15 μl aus der BSA-Standardreihe wurden in eine 96-well-Platte pipettiert. Die zu untersuchenden Proben wurden mit H_2O verdünnt, sodass die zu messenden Werte im linearen Bereich der Eichgeraden lagen. Jeweils 5 μl der verdünnten Proben wurden in die wells gegeben. Während die Punkte der Eichgeraden in Duplikaten gemessen wurden, kam es bei den zu untersuchenden Proben zur Messung in Triplikaten. In jedes well wurden 300 μl BCA-Reagenz pipettiert. Diese wurde durch Mischen von BCA-Lösung A mit CuSO_4 im Verhältnis 1:50 hergestellt. Im Anschluss wurde die Platte bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und dann die Absorption bei 595 nm gemessen.

3.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgelpuffer

0,4% (w/v) SDS
0,5 mM Tris/OH
pH 6,8

Gel-Laufpuffer

192 mM Glycin
25 mM Tris/OH
0,1% (w/v) SDS

Trenngelpuffer

0,4% (w/v) SDS
1,5 mM Tris/OH
pH 8,8

4% (w/v) Sammelgel

13% (v/v) Acrylamid
17% (v/v) Sammelgel-Puffer

Probenpuffer nach Laemmli

62,5 mM Tris/OH
10% (v/v) Glycerin
5% β -Mercaptoethanol
1% (w/v) SDS
0,005% (v/v) Bromphenolblau

Trenngel

(% Trenngel/30%) x 100% (v/v) Acrylamid
17% (v/v) Trenngel-Puffer

Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) eingesetzt. Dazu wurden die Protein-Proben mit Laemmli-Puffer versetzt. Durch das im Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol kam es zur Auflösung der Disulfidbrücken der Proteine, während diese durch das enthaltene SDS zum einen linearisiert und zum anderen mit einer negativen Ladung versehen wurden.

Zu Herstellung der Gele für die SDS-PAGE mussten ein Sammelgel und ein Trenngel angefertigt werden. Dazu wurde die Polymerisation der oben beschriebenen Sammel- und Trenngele durch 0,1% (v/v) APS und 0,1% (v/v) TEMED gestartet. Im Sammelgel befanden sich Geltaschen, in welche die mit Laemmli versetzten Proben sowie ein ebenfalls mit Laemmli versetzter Protein-Marker aufgetragen wurden. Zur Auftrennung der Proteine wurden Gels mit unterschiedlichem Prozentgehalt (7–12%) verwendet, wobei sich die Prozentzahl an der Größe der zu untersuchenden Proteine orientierte: Je kleiner die aufzutrennenden Proteine, desto höher war die Prozentzahl des verwendeten Gels. Im Anschluss wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung von 150 mV für ca. 1 h aufgetrennt, wobei die Proteine durch ihre negative Ladung zum Plus-Pol wanderten.

3.2.4.5 Coomassie-Färbung

Coomassielösung

0,125% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250

10% (v/v) Essigsäure (HAc)

40% EtOH

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 30 min bei RT und Schütteln inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde mit H₂O gewaschen und die Proteinbanden visuell untersucht. Zum Entfärben des Gels wurde dieses ü. N. bei RT mit 10%iger HAc unter Schütteln inkubiert.

3.2.4.6 Western-Blot

Transferpuffer

192 mM Glycin

25 mM Tris/OH

0,2% (w/v) SDS

20% (v/v) MeOH

TBST-T

150 mM NaCl

10 mM Tris/OH

0,1% (v/v) Tween 20

Ponceau[®]-S Reagenz

5% (v/v) HAc

0,2% (w/v) Ponceau[®]-S

Um spezifische Proteine nach erfolgte Größenauffrennung nachzuweisen wurde ein Western-Blot durchgeführt (Towbin et al., 1979). Dazu wurde nach Abschluss der SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.4.4) das Trenngel vom Sammelgel getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, die davor durch Einlegen für 5 min in Transferpuffer aktiviert wurde. Membran und Gel wurden zwischen jeweils 3 in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere gelegt und in einer mit Transferpuffer gefüllten Transferkammer positioniert. Durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 1,5 h wurden die Proteine vom Gel auf die Membran transferiert. Da dabei viel Wärme entstand, musste die Transferkammer bei 4 °C gekühlt werden. Zur Überprüfung des Transfers wurde im Anschluss an den Blot-Vorgang eine Ponceau-S-Färbung durchgeführt. Dazu wurde die Membran für 5 min

in Ponceau-S-Lösung inkubiert. Mittels des Farbstoffes Ponceau-S können Proteine auf einer Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden. Die überständige Färbe-Lösung wurde mittels H_2O gewegewaschen, wodurch nur noch die Proteinbanden sichtbar blieben. Bevor die Membran mit spezifischen Primär-Antikörpern inkubiert werden konnte, mussten zunächst die freien Proteinbindstellen blockiert werden. Dazu wurde die Membran für 30 min mit 1 x Roti-Block unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die verwendeten Primär-Antikörper in 3% Ovalbumin in TBS-T verdünnt (Tabelle 3.1.5) und die Membran ü. N. bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese aus der Antikörperlösung genommen und 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion der Primär-Antikörper, die spezifisch an die zu detektierenden Proteine gebunden waren, wurden Sekundär-Antikörper, die mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt waren, auf die Membran gegeben. Diese waren ebenfalls in 3% Ovalbumin in TBS-T gelöst. Nach Inkubation von einer 1 h bei RT unter Schütteln wurde die Membran 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen und wie im folgendem Abschnitt 3.2.4.7 geschildert fortgeführt.

3.2.4.7 Immundetektion mittels Chemilumineszenz

Zur Immundetektion der mit HRP gekoppelten Antikörper wurde das Substrat Super Signal[®] ELISA Femto von Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Deutschland verwendet. Dazu wurden die enthaltenen Lösungen A und B in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und auf die Membran pipettiert. Nach Inkubation von einer Minute wurde die Reagenz von der Membran entfernt und die Chemilumineszenz in einer Dunkelkammer mittels 16-bit-Kamera aufgenommen.

3.2.5 Immunhistochemie

3.2.5.1 In der Immunhistochemie verwendete Lösungen und Puffer

PBS

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na_2HPO_4
1,8 mM KH_2PO_4
pH 7,4

Mowiol

9,6% (w/v) Mowiol
0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)
24% (v/v) Glycerol
2,5% (w/v) DABCO

PFA (4%ig)

4% (w/v) PFA
PBS
pH 6,9

3.2.5.2 PFA-Fixierung von Zellen

Die Platten wurden aus dem Brutschrank genommen und die Zellen letztmalig phänotypisch überprüft. Im Anschluss wurden das Medium abgesaugt und die *wells* zweimal mit 1 x PBS gespült. Darauf wurde eiskaltes 4%iges PFA auf die Zellen pipettiert und diese für 12 min damit inkubiert. Das PFA wurde im Anschluss abgesaugt und die *wells* für 3 x 10 min mit 1 x PBS gewa-

schen. Die Zellen konnten weiterverwendet oder bei 4 °C gelagert werden. Dazu wurde in jedem *well* ausreichend PBS vorgelegt und die Platte mit Parafilm umwickelt.

3.2.5.3 PFA-Fixierung von Gewebe

Zur Isolierung der Leber aus der Maus wurden die zu untersuchenden Mäuse durch Isofluran CP anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Der Bauchraum wurde geöffnet, die Pfortader freigelegt und die Leberarterie abgeklemmt. Durch Einführen einer Kanüle (23 x G) in die Pfortader konnte die Leber gespült werden. Dazu wurde das in der Leber enthaltene Blut durch 2%ige PFA-Lösung ersetzt. Damit das Blut aus der Leber abfließen konnte, wurde im Laufe der Perfusion der Leber die Lebervene aufgeschnitten. Nachdem die Leber vollständig gespült war, wurde diese aus der Maus entnommen und für 1 h in 2% PFA bei RT unter Schütteln fixiert. Die Leber wurde im Anschluss für 30 min in PBS unter Schütteln gewaschen und ü. N. bei 4 °C in 20% Saccharose gelagert. Am nächsten Tag wurden die Lebern aus der Lösung genommen, die Leberlappen voneinander getrennt und diese mittels flüssigen N₂ eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Proben bei -80 °C gelagert werden.

3.2.5.4 Anfertigen von Kryoschnitten

Um Kryoschnitte von Lebergewebe anzufertigen, wurden die bei -80 °C gelagerten Proben auf Trockeneis zum Kryotom transportiert. Dort wurden 5 µM dicke Schnitte angefertigt, wobei die Kammertemperatur auf -25 °C und die Objekttemperatur auf -20 °C gestellt war. Die Schnitte wurden entweder sofort weiterverwendet (Abschnitt 3.2.5.7) oder bei -20 °C gelagert.

3.2.5.5 Pikrosiriusrot-(PSR-)Färbung

Um Kollagen in Gewebe nachzuweisen, wurde die Pikrosiriusrot-(PSR-)Färbung eingesetzt. Hierbei wird das Kollagen im Gewebe rot angefärbt, wodurch es sich von den übrigen Kompartimenten unterscheiden lässt. Dafür wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 5 µM verwendet. Zunächst ruhten diese für 10 min bei RT, bevor sie für 7 min mit eiskaltem, 4%igen PFA inkubiert wurden. Die Objektträger wurden darauf 2 x 10 min mit H₂O gewaschen. Zum Anfärben der Schnitte wurde für 1 h PSR-Lösung auf diese gegeben und mit 1 M HCl-Lösung gewaschen. Danach wurden die Schnitte zunächst für 30 min in eine 70% EtOH-Lösung gelegt, worauf eine aufsteigende Alkoholreihe (80, 90, 100%; jeweils 10 min) folgte, die das Ziel hatte, das überschüssige Wasser aus dem Gewebe zu entfernen. Zum Schluss wurde die Schnitte mit Xylol für 10 min gewaschen, mittels Mowiol eingedeckelt und die Kollagenfasern mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops sichtbar gemacht.

3.2.5.6 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen in Zellen

Die *wells* wurden aus dem Kühlschrank genommen und entweder mit 0,1% (v/v) Digitonin von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland in PBS (zur Einfärbung von zytosolischen Proteinen) oder 0,5% Triton™ X-100 in PBS (zur Einfärbung von Zytoskelett-Proteinen) für 20 min bei RT permeabilisiert. Danach wurden die Zellen 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Am Ende des

Waschvorganges wurde für 1 h 10% NDS auf die Zellen gegeben. Die zu verwendenden Primär-Antikörper wurden in 10% Normales Esel Serum (NDS) gelöst und ü. N. bei 4 °C auf die Zellen gegeben. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen, die Zellen 3 x 10 min mit PBS gewaschen und die Sekundär-Antikörper, gelöst in 10% NDS, für 1 h auf die Zellen gegeben. Die Antikörperlösung wurde entfernt; für 7 min wurden die Zellkerne mittels DAPI (1:1000 in PBS) angefärbt. Im Folgenden wurden die *wells* erneut 3 x 10 min mit PBS gewaschen und die Glasplättchen mit einer Pinzette aus den *wells* genommen. Um die Glasplättchen auf einem Objektträger zu fixieren, wurden zunächst 30 µl Mowiol punktförmig auf diesen pipettiert und die Glasplättchen darin fixiert. Zum Eindeckeln wurde ein Deckgläschen mit Mowiol versehen und über die Glasplättchen gelegt. Bis zur Untersuchung am Mikroskop konnten die Objektträger im Dunkeln gelagert werden.

3.2.5.7 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen an Gewebeschnitten

Die in Abschnitt 3.2.5.4 angefertigten Kryoschnitte wurden zunächst für 10 min bei RT liegen gelassen. Danach wurden sie für 7 min mit eiskaltem, 4%igem PFA inkubiert, 3 x 10 min mit PBS gewaschen und dann für 20 min mit 0,1% Triton™ X-100 in PBS permeabilisiert. Nach Inkubation für 1 h mit 10% NDS bei RT wurden die Primär-Antikörper (gelöst in 10% NDS) auf die Schnitte gegeben und ü. N. bei 4 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte für 3 x 10 min mit PBS gewaschen und die Sekundär-Antikörper – ebenfalls in 10% NDS gelöst – für 1 h bei RT auf die Schnitte gegeben. Zum Anfärben der Zellkerne wurde DAPI (1:1000 in PBS) für 7 min auf die Schnitte pipettiert. Erneut wurden für 3 x 10 min die Schnitte mit PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt. Bis zur Untersuchung am Mikroskop konnten die Schnitte im Dunkeln gelagert werden.

3.2.5.8 *TdT-mediated-dUTP-biotin-nick-end-labeling*-(TUNEL-)Test

Der *TdT-mediated-dUTP-biotin-nick-end-labeling*-(TUNEL-)Test ist eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Apoptose. Hierbei werden freie 3'-OH-Enden von einzelsträngigen Brüchen detektiert, die gemeinhin als Marker für Apoptose gelten. Durch den Einsatz des Enzyms Desoxyribonukleotidyltransferase (*TdT*) werden diese freien Enden mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden versehen und können so mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Die am Kryotom angefertigten 5 µm dicken Schnitte wurden zunächst für 10 min bei RT ruhen gelassen, daraufhin für 7 min mit eiskaltem 4%igem PFA fixiert und dann 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,1% Triton™ X-100 permeabilisiert und erneut gewaschen (2 x 10 min mit PBS). Danach wurde für 1 h die Färbelösung, die aus den fluoreszenzmarkierten Nukleotiden und dem Enzym *TdT* bestand, auf die Schnitte gegeben. Im Anschluss wurden die Schnitte für 7 min mit DAPI (1:1000 in PBS) inkubiert und 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit Mowiol eingedeckelt und innerhalb von 24 h ausgewertet.

3.2.5.9 Visualisierung

Die Visualisierung der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte mittels Konfokalmikroskop TCS SP5/SP8. Die Auswertung der Bilder wurde mit der Bildbearbeitungssoftware Fiji® durchgeführt (Schindelin et al., 2012). Alle in dieser Arbeit gezeigten Bilder sind repräsentativ. Es wurden alle Färbungen mindestens n=4 mal durchgeführt.

3.2.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Software GraphPad Prism®, Version 7.0 vorgenommen. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Durch den n-Wert wird die Anzahl an verwendeten Proben im jeweiligen Experiment angezeigt. Zur Bestimmung der Signifikanz zwischen den un- und fibrotischen Proben sowie zwischen den verschiedenen Genotypen (WT, SM/MHC-, PDGFR β -, GCKO) wurden zunächst mittels Kruskal-Wallis-Test die Daten auf Normalverteilung getestet und im Anschluss mittels *Two-way-analysis of variance*-(ANOVA-)Test untersucht. Das Signifikanzniveau lag bei * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ und *** = $p \leq 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Perizyten der Lunge

Bei der Lungenfibrose kommt es zur Entstehung von Myofibroblasten, die für die Synthese der EZM verantwortlich sind. Sie nehmen damit eine Schlüsselrolle bei der Wundheilung bzw. der Fibrose ein (Hinz und Gabbiani, 2010). Myofibroblasten zeichnet vor allem eine *De-novo*-Expression von α -SMA aus (Hinz et al., 2012; Wells et al., 2015). Der Ursprung der Myofibroblasten war bislang unbekannt. Neueste Forschungsergebnisse konnten jedoch zeigen, dass ein Teil der Myofibroblasten aus Perizyten entsteht (Fernandez und Eickelberg, 2012; Hung et al., 2013).

Die NO-GC wurde erstmals aus Ratten- und Rinderlungen isoliert, da sie dort besonders stark exprimiert wird (Garbers et al., 1975; Humbert et al., 1990). Jedoch war nicht bekannt, in welchen Zellen der Lunge die NO-GC vorkommt. Bettaga et al. (2015) konnten zeigen, dass die NO-GC in Perizyten des Auges exprimiert wird. Auch in vielen anderen Organen wird vermutet, dass die Perizyten die Zellen sind, die die NO-GC exprimieren. Diese Vermutung konnte durch Aue et. al. *in vivo* für die Lunge bestätigt werden.

Deshalb war es das Ziel hinter diesem ersten Versuchsteil, die *In-vivo*-Beobachtungen aus der Lunge über die Lokalisation der NO-GC-Expression *in vitro* zu bestätigen. Dazu mussten die Perizyten der Lunge zunächst so isoliert werden, dass eine homogene Zellkultur erzielt wurde, die nicht durch andere Zellen verunreinigt war. Um dies zu erreichen, musste ein Protokoll entwickelt werden, mit dem die Proliferation und Adhäsion von Perizyten gefördert und dafür gesorgt wird, dass andere Zelltypen weder adhären noch proliferieren. Des Weiteren mussten zur Überprüfung der Reinheit der Kultur-Marker gefunden werden, mit denen die Perizyten eindeutig identifiziert und von anderen Zellen unterschieden werden konnten. Nachdem diese Schritte absolviert waren, sollten die isolierten Lungenperizyten auf die NO-GC-Expression hin überprüft werden. Im letzten Abschnitt dieses Versuchsteils sollte dann ermittelt werden, ob die Perizyten durch TGF- β 1 zu Myofibroblasten differenzieren und welchen Einfluss dies auf die Markerexpression in den differenzierten Zellen hat.

4.1.1 Isolierung und Kultivierung von Perizyten aus der Lunge

Zur Erzielung einer homogenen Perizytenzellkultur wurde sich vor allem an dem Protokoll von D'Amore (1990) orientiert. Ein bei der Isolierung und Kultivierung von Zellen aus Gewebe auftretendes Problem ist, dass die Zellen einem deutlich höheren Druck ausgesetzt sind als im Gewebe. Während die Perizyten in der Lunge nur einem Druck von 1 bis 5 kPa ausgesetzt sind, liegt in der Zellkultur ein Druck vor, der um das 100-Fache höher ist. Durch diesen erhöhten Druck wird die Expression von kontraktilen Proteinen (z. B. α -SMA) in den Perizyten gefördert. Das bedeutet, die Perizyten differenzieren durch den in der Kultur herrschenden Druck zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Zustand. Dadurch kann die Differenzierung der Zellen durch Gabe von z. B. TGF- β 1 nicht untersucht werden, da die Expression des kontraktilen Proteins dann

nicht mehr verändert wird. Um dieses Problem zu lösen, wurden bei allen Versuchen die *Wells* oder die Glasplättchen (bei immunhistochemischen Versuchen) mit Kollagen-Typ-I beschichtet. Dabei wurde die Konzentration so gewählt, dass die Perizyten einem physiologischen Druck, der dem der Lunge entspricht, ausgesetzt waren.

Auch bei der Kultivierung der Perizyten kann die α -SMA-Expression durch das Kulturmedium beeinflusst werden. Es wurden zwei Medien getestet: zum einen Dulbecco's modifiziertes *Eagle*-Medium (DMEM), zum anderen Perizyten-Medium-Maus (PM-M). Eine Besonderheit bei dem PM-M-Medium war das Vorliegen von Perizytenwachstumsfaktoren, die zusätzlich die Adhäsion und das Wachstum der Perizyten förderten. Durch den Einsatz des PM-M wurde die Expression von α -SMA in den Perizyten im Vergleich zu Perizyten, die mit DMEM kultiviert worden waren, deutlich reduziert. Dies wurde sowohl mittels immunzytochemischen Aufnahmen als auch mittels Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 4.1).

Für die immunhistochemischen Aufnahmen wurden die Perizyten bis zu einer Konfluenz von 90% wachsen gelassen und dann mit Antikörpern gegen Desmin (rot) und α -SMA (grün) gefärbt. Wie zu erkennen war, war das Signal für α -SMA in Perizyten, die in PM-M kultiviert wurden, deutlich geringer als in DMEM-kultivierten Perizyten (Abbildung 4.1A–B). Zur Bestätigung wurde bei Perizyten, die in PM-M kultiviert worden waren, ein weiterer Marker (PDGFR β) verwendet (Abbildung 4.1D). Hier zeigte sich das gleiche Ergebnis wie bei der Betrachtung mit Desmin. Durch den Einsatz von PM-M kam es nur in wenigen Perizyten (PDGFR β^+ -Zellen) zu einer Expression von α -SMA. Jedoch wurde deutlich, dass PDGFR β der geeignetere Marker für Perizyten in Kultur ist als Desmin, da PDGFR β die Zellwände der Perizyten nachzeichnet, während durch Desmin nur Teile des Zytoskeletts sichtbar gemacht werden können.

Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zellen ebenfalls bis zu einer Konfluenz von 90% entweder in DMEM oder PM-M kultiviert. Im Anschluss wurde die Expression von α -SMA durch den Einsatz eines spezifischen, an α -SMA bindenden Antikörper getestet. Zur Überprüfung, ob gleich viel Protein aufgetragen worden war, wurde das Hausprotein Histon H3 verwendet. Bei der Betrachtung der Banden für α -SMA ließ sich wie bei den immunhistochemischen Bildern die Aussage treffen, dass die Expression von α -SMA in Perizyten, die in PM-M kultiviert wurden, geringer ist als bei in DMEM kultivierten Perizyten (Abbildung 4.1C).

Aus diesem ersten Versuchsteil konnte abgeleitet werden, dass für eine homogene Perizytenkultur und eine geringe Expression von α -SMA in den Zellen die Perizyten in PM-M kultiviert werden sollten. Außerdem konnte festgestellt werden, dass PDGFR β der geeignetere Marker ist, um Perizyten in Kultur zu identifizieren.

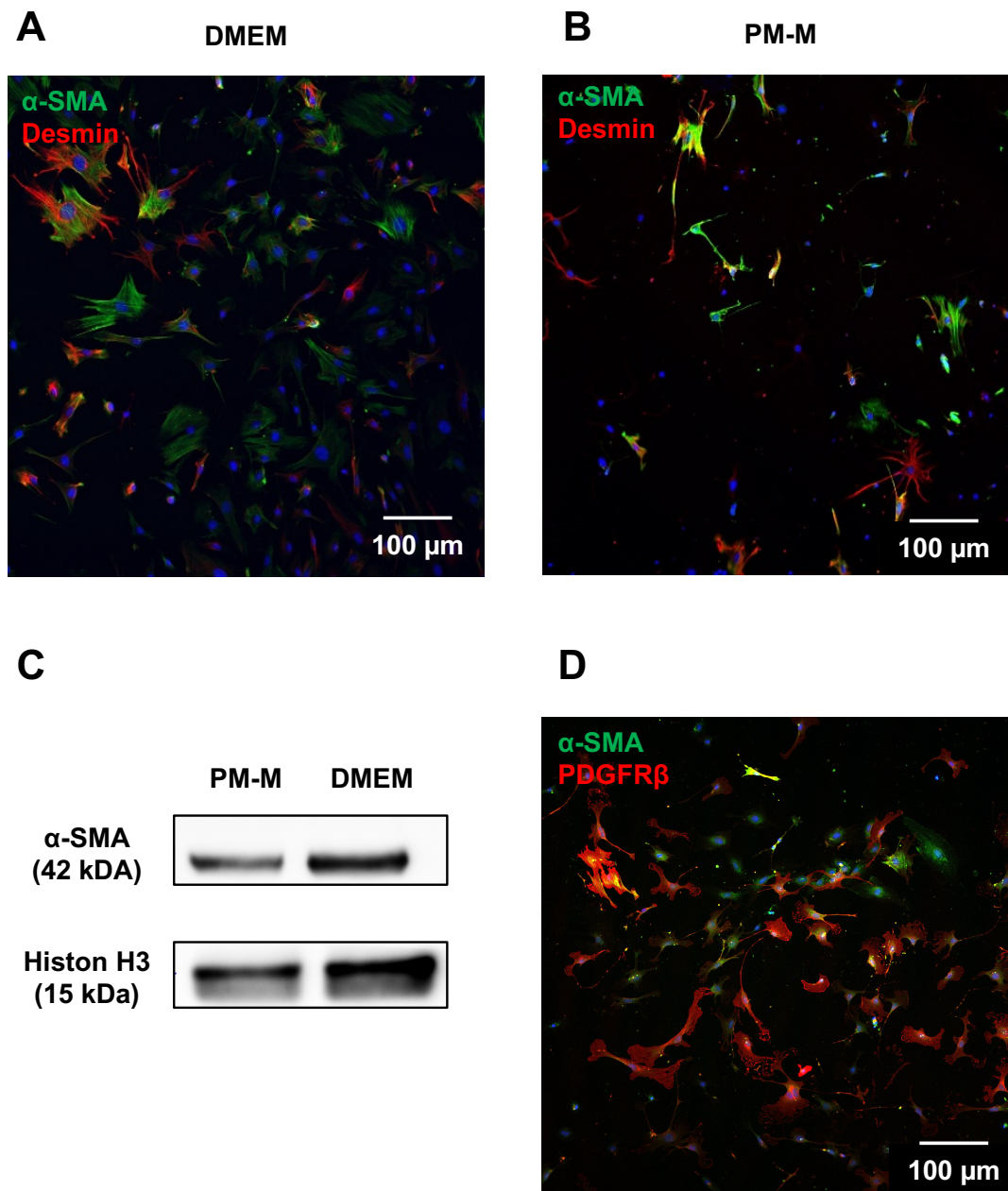


Abbildung 4.1: Kultivierung von isolierten Lungenperizyten mit verschiedenen Medien

Lungenperizyten wurden entweder in DMEM (A) oder PM-M (B & D) bis zu einer Konfluenz von 90% wachsen gelassen. Anschließend wurden diese mit Antikörpern gegen α -SMA (grün) und Desmin (rot) gefärbt. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau). In den gezeigten Überlagerungsbilder kann eine Kolokalisation zwischen α -SMA und Desmin gesehen werden (gelb), wobei das α -SMA-Signal in B schwächer ist. Mittels Western-Blot wurde die Expression von α -SMA in den Lungenperizyten untersucht. Dabei wurde Histone H3 als Ladekontrolle verwendet. Zu sehen ist ein repräsentativer Western-Blot (C). Zusätzlich wurde eine Doppelfärbung mit α -SMA und PDGFR β durchgeführt für Lungenperizyten die in PM-M kultiviert wurden (D). Hier kommt es im Überlagerungsbild zu einer Kolokalisation zwischen α -SMA und PDGFR β , jedoch war das α -SMA-Signal analog zu Überlagerungsbild B sehr schwach.

4.1.2 Charakterisierung von aus der Lunge isolierten Perizyten

Ziel bei diesem Versuchsteil war es, die Perizyten mit dem in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Protokoll zu isolieren und anschließend zu charakterisieren. Perizyten sind murale Zellen. Charakteristisch für diese sind ihr prominenter Zellkern und die vom Zellkörper ausgehenden, zytoplasmatischen Ausläufern, mit denen sich die Perizyten um die Kapillaren winden (Sims, 1986). Für Perizyten sind verschiedene Marker bekannt (Tabelle 1.1), mit denen sie identifiziert und von anderen Zellen unterschieden werden können.

Die in Tabelle 1.1 beschriebenen Marker wurden an den isolierten Lungenperizyten getestet. Dabei wurden immer Doppelfärbungen durchgeführt. Das bedeutet, die Perizyten wurden durch den bereits in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen etablierten Marker PDGFR β (rot) identifiziert und dann wurde untersucht, ob der zu analysierende Marker ebenfalls in diesen PDGFR β^+ -Zellen exprimiert wird. In Abbildung 4.2 sind beispielhaft 3 Marker gezeigt. Andere Marker wurden ebenfalls untersucht (z. B. NG2); diese zeigten jedoch keine Signale in den PDGFR β -markierten Perizyten.

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Marker wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 90% in PM-M wachsen gelassen, dann fixiert und im Anschluss mit spezifischen Antikörpern gegen die Perizytenmarker gefärbt. Es wurde zuerst SM/MHC (grün) angefärbt (Abbildung 4.2A). Dabei ließ sich feststellen, dass ein Teil der kultivierten Lungenperizyten diesen Marker exprimierten. Dies deckt sich mit *In-vivo*-Ergebnissen, bei denen festgestellt werden konnte, dass ein Teil der Perizyten in der Lunge SM/MHC exprimiert. Als Nächstes wurde Vimentin (grün) untersucht (Abbildung 4.2B). Hier zeigte sich, dass alle PDGFR β^+ -Zellen diesen Marker exprimierten. Zusätzlich wurde noch Col1 α 1 untersucht (Abbildung 4.2C). Analog zu α -SMA kennzeichnet Col1 α 1 Myofibroblasten. Zwar konnte eine Expression von Col1 α 1 in allen isolierten Lungenperizyten beobachtet werden, jedoch war diese gering, was wiederum analog zum α -SMA war, das in den kultivierten Perizyten nur in geringem Maß exprimiert wurde.

Aus diesem Versuchsteil konnte abgeleitet werden, dass neben PDGFR β auch Vimentin und SM/MHC als Marker für kultivierte Lungenperizyten dienen können. Während durch Vimentin alle Lungenperizyten markiert wurden, konnte mittels SM/MHC nur ein Teil der kultivierten Lungenperizyten kenntlich gemacht werden, was sich mit der *In vivo*-Beobachtung deckte.

4.1.3 NO-GC-Expression in isolierten Lungenperizyten

Nachdem das Protokoll zur Isolierung von Lungenperizyten etabliert worden war (Abschnitt 4.1.1) und die kultivierten Zellen charakterisiert waren (Abschnitt 4.1.2), sollte die NO-GC-Expression in den Lungenperizyten untersucht werden. Durch *In-vivo*-Ergebnisse war bekannt, dass die Perizyten der Lunge die Zellen sind, die die NO-GC exprimieren. Dies sollte *in vitro* überprüft werden. Dazu wurden die Zellen sowohl immunhistochemisch als auch mittels Western-Blot auf die Expression der NO-GC untersucht.

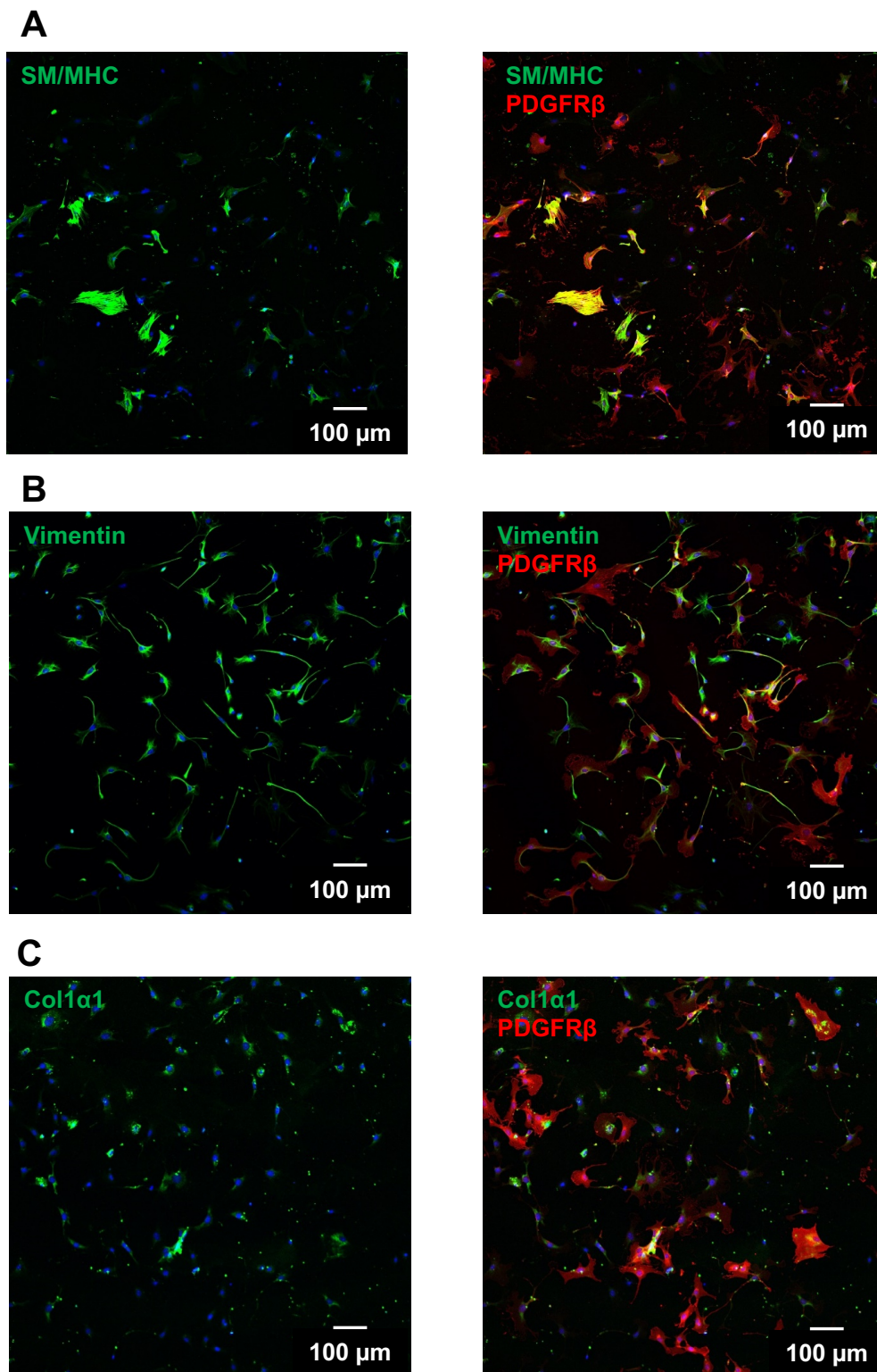


Abbildung 4.2: Charakterisierung der kultivierten Lungenperizyten

Zu sehen sind Lungenperizyten, die mit einem spezifischen Antikörpern gegen SM/MHC (A), Vimentin (B) und α -SMA (C) (alle in Grün) und dem Perizytenmarker PDGFR β (rot) gefärbt wurden. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau). In den Überlagerungsbildern kann für alle Marker eine Kolokalisation (gelb) mit PDGFR β ausgemacht werden.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Lungenperizyten bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert, danach fixiert und auf die Expression der NO-GC überprüft (Abbildung 4.3). Zum Sichtbarmachen der NO-GC-Expression wurden die Lungenperizyten mit einem spezifischen Antikörper gegen die β 1-UE der NO-GC (grün) und mit dem Perizytenmarker PDGFR β (rot) gefärbt. In Abbildung 4.3A sind die Lungenperizyten, die NO-GC exprimieren (identifiziert durch die positive Färbung für PDGFR β), mit einem weißen Pfeil markiert. Wie zu erkennen ist, kam es zu einer Expression der NO-GC in der Hälfte aller Lungenperizyten. Zur näheren Betrachtung der Lokalisation der NO-GC-Expression in den Lungenperizyten ist in Abbildung 4.3D eine vergrößerte Zelle gezeigt, die durch die positive Färbung für PDGFR β als Perizyt erkannt werden konnte und NO-GC exprimiert. Zu sehen ist, dass die NO-GC vor allem im Zytosol rund um den Zellkern zu finden ist.

Neben Perizyten aus dem WT wurden auch Perizyten aus dem GCKO isoliert, fixiert und immunhistochemisch untersucht (Abbildung 4.3B). In den Lungenperizyten aus dem GCKO konnte keine Expression der NO-GC detektiert werden. Diese Negativkontrolle bestätigte, dass die Signale für die NO-GC in den Perizyten aus dem WT korrekt waren und nicht falsch positiv.

Mittels Western-Blot-Analyse sollten die immunhistochemischen Aussagen zur NO-GC-Expression überprüft werden (Abbildung 4.3C). Dazu wurde die NO-GC-Expression in Lungenperizyten aus WT und GCKO untersucht. Durch einen spezifischen Antikörper gegen die α 1-UE der NO-GC wurde die NO-GC im Western-Blot markiert, sodass bei 72 kDa eine Bande detektiert werden konnte. Als Hausprotein wurde wiederum Histon H3 verwendet. Bei Betrachtung des Western-Blots zeigte sich nur im WT eine Bande für die NO-GC, während diese im GCKO fehlte.

Es lässt sich festhalten, dass es auch in isolierten Lungenperizyten zu einer Expression der NO-GC kommt.

4.1.4 Stimulation der Lungenperizyten mit TGF- β 1

Es ist bekannt, dass Perizyten in der Lungenfibrose zu Myofibroblasten differenzieren und für die Synthese der EZM verantwortlich sind (Fernandez und Eickelberg, 2012; Hung et al., 2013). Um isolierte Zellen in Kultur zur Differenzierung zu bringen, kann TGF- β 1 verwendet werden. Im Gewebe sorgt TGF- β 1 für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Myofibroblasten (Desmoulière, 1995; Evans et al., 2003), weshalb dies in diesem Versuchsteil die Differenzierung der isolierten Lungenperizyten durch Kultivierung mit TGF- β 1 versucht wurde. Der Erfolg dieser Differenzierung sollte anhand der α -SMA-Expression überprüft werden, die sowohl durch immunhistochemische Versuche als auch mittels Western-Blot identifiziert werden sollte.

Hierzu wurden Lungenperizyten mit 10 ng TGF- β 1 für 72 h stimuliert, fixiert und mit Antikörpern gegen α -SMA (grün) und PDGFR β (rot) angefärbt. Gleichzeitig wurden Kontrollen erstellt (Abbildung 4.4A,B). Hierbei wurden die Zellen ausschließlich mit dem Vehikel (0,1% BSA) für TGF- β 1 kultiviert. Beim Einsatz von TGF- β 1 ließ sich immunhistochemisch keine Veränderung der α -SMA-Expression durch die Kultivierung mit TGF- β 1 feststellen. Sowohl in der Kontrolle als

auch in der behandelten Kultur blieb die α -SMA-Expression gleich (Abbildung 4.4C).

Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei der Western-Blot-Analyse für α -SMA bei Zellen, die entweder mit dem Vehikel oder mit TGF- β 1 kultiviert worden waren. Bei beiden konnte kein Unterschied in der α -SMA-Expression festgestellt werden.

Aus diesem Versuchsteil lässt sich schließen, dass die isolierten Lungenperizyten nicht mittels TGF- β 1 zu Myofibroblasten differenziert werden können. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Zellen nicht auf TGF- β 1 reagieren, zum anderen ist es möglich, dass α -SMA als Marker ungeeignet ist, um die Differenzierung der Zellen in Kultur anzuzeigen.

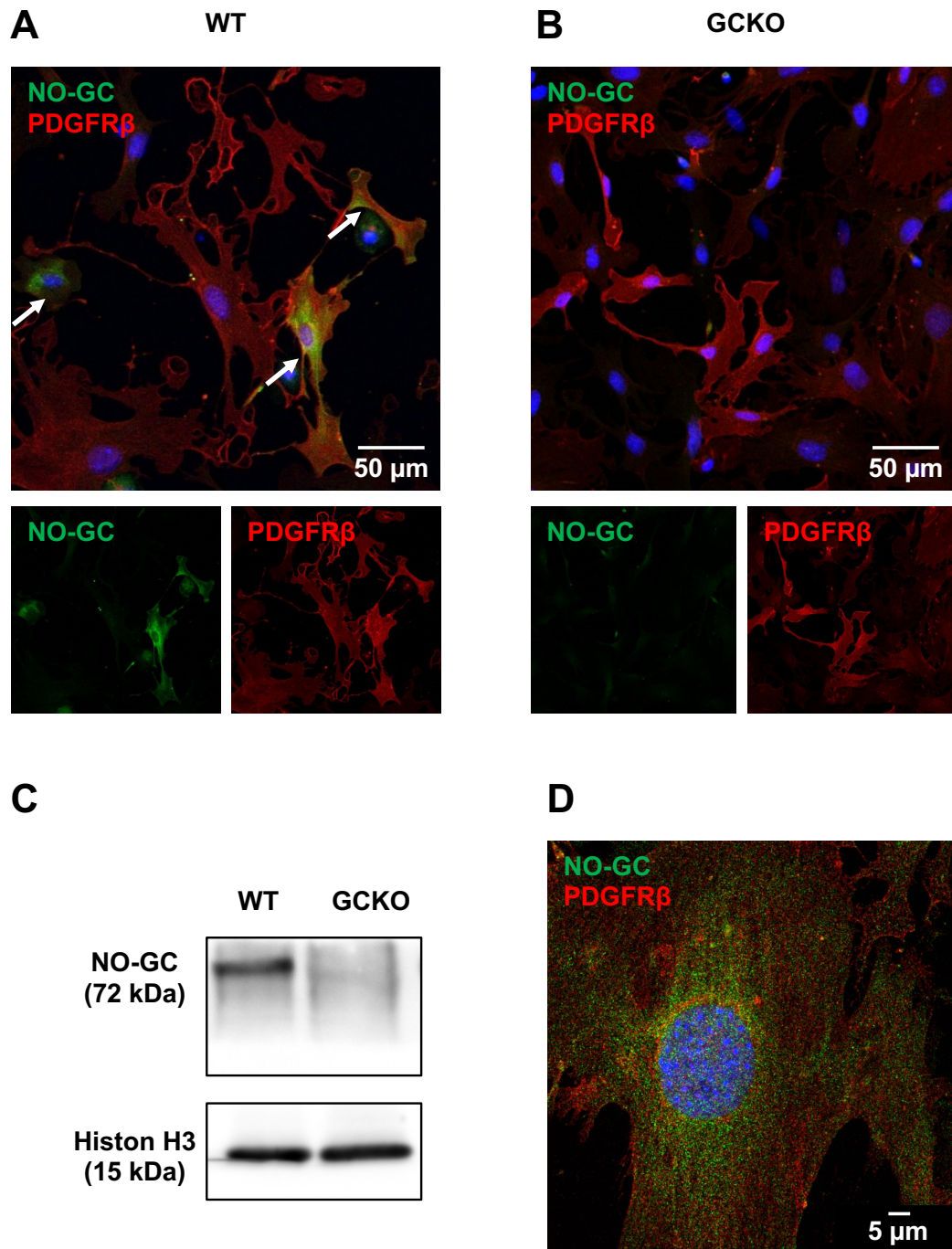


Abbildung 4.3: Expression der NO-GC in Lungenperizyten aus WT und GCKO

Lungenperizyten wurden mit einem Antikörper gegen die β 1-UE der NO-GC (grün) und PDGFR β (rot) gefärbt. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau). Die Perizyten wurden entweder aus WT (A und D) oder GCKO (C) isoliert. Die weißen Pfeile in A markieren Zellen im Überlagerungsbild, die NO-GC exprimieren. Während im Überlagerungsbild A Kolokalisation (gelb) zwischen NO-GC und PDGFR β erkennbar sind, kann im Überlagerungsbild B keine Kolokalisationen beobachtet werden. Western-Blot-Analyse von isolierten Perizyten aus der Lunge von WT und GCKO Tieren. Die Expression der NO-GC wurde mit einem Antikörper gegen die β 1-UE detektiert. Histon H3 wurde als Ladekontrolle verwendet. Zu sehen ist ein repräsentativer Western-Blot (C). Nahaufnahme einer isolierten Zelle aus dem WT (D).

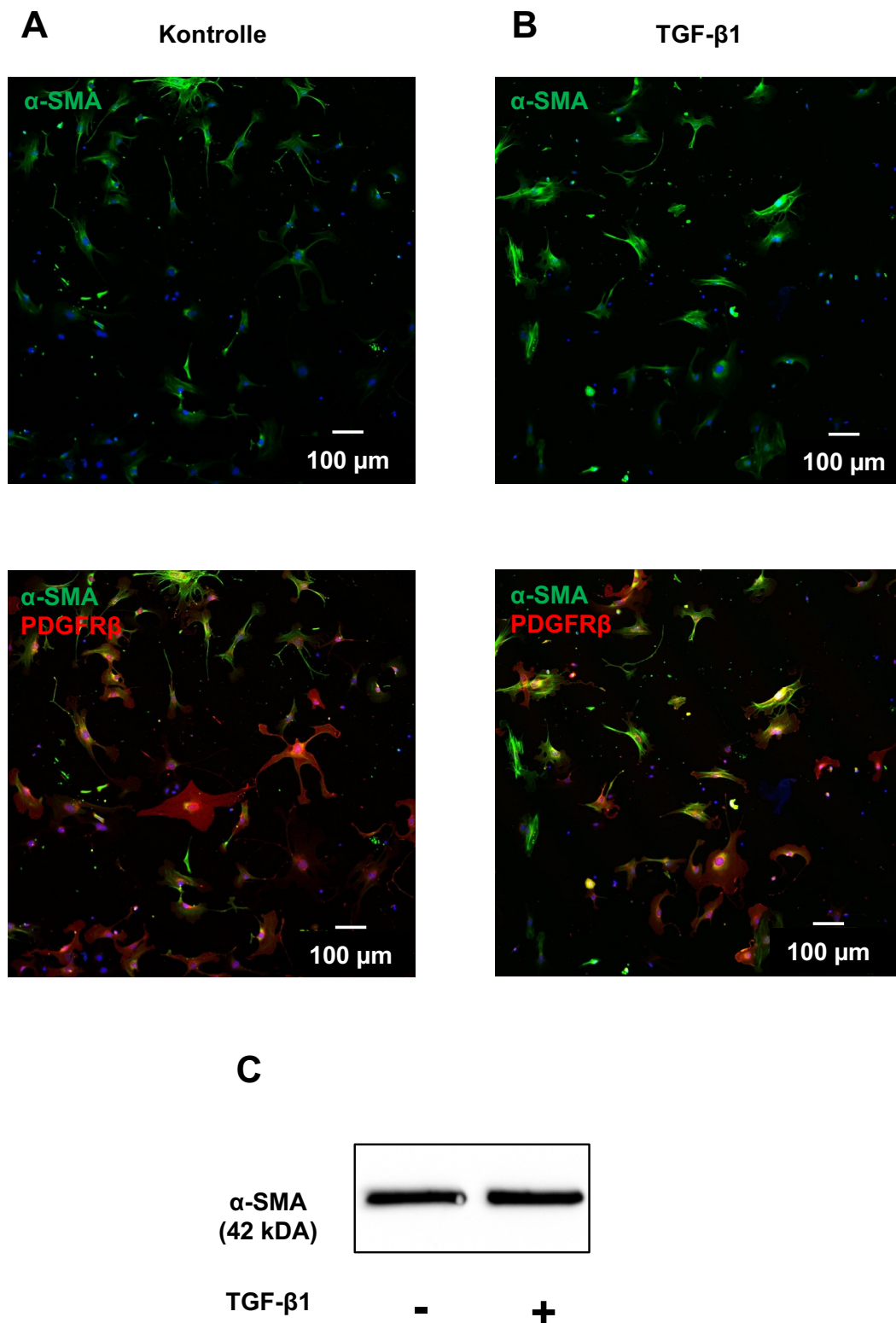


Abbildung 4.4: Die α -SMA-Expression in Lungenperizyten nach Stimulation mit TGF- β 1

Perizyten aus der Lunge wurden entweder mit 10 ng TGF- β 1 oder 0,1% BSA für 72 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Lungenperizyten mit Antikörpern gegen α -SMA (grün) und PDGFR β (rot) (A & B) gefärbt. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau). In den beiden Überlagerungsbild zeigte sich eine Kolokalisation zwischen α -SMA und PDGFR β . Western-Blot-Analyse für Lungenperizyten, die 72 h mit 10 ng TGF- β 1 oder 0,1% BSA inkubiert wurden. Zu sehen ist ein repräsentativer Western-Blot (C).

4.2 Analyse der NO-GC-Expression in der murinen Leber

In diesem Versuchsteil sollten die Zellen in der murinen Leber bestimmt werden, in denen die NO-GC exprimiert wird. Daran anschließend sollte das CCl₄-Fibrosemodell etabliert und durch die Quantifizierung von Fibrosemarkern überprüft werden. Mittels des aufgestellten Modells sollte die Expression der NO-GC in der Leberfibrose betrachtet werden, was ebenfalls in GCKO-Tieren geschehen sollte. Abschließend sollte die Auflösung der Leberfibrose untersucht werden.

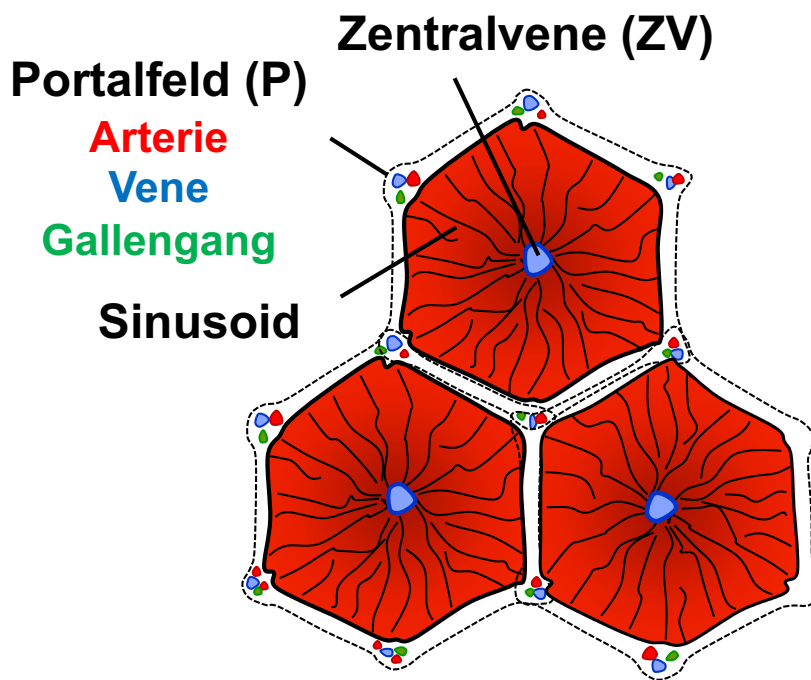
4.2.1 Die NO-GC-Expression in der Leber

Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass die NO-GC in der Leber exprimiert wird (Theilig et al., 2001). Unklar jedoch ist, in welchen Zellen der Leber diese zu finden ist. Sowohl die Leber-Sinus-Endothelzellen (LSEC) (DeLeve und Maretti-Mira, 2017; Mehta et al., 2014) als auch die HSC (Kawada et al., 1993) wurden als NO-GC-exprimierende Zellen vermutet.

Um eindeutig zu identifizieren, welche Zellen die NO-GC exprimieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten aus der Leber durchgeführt (Abbildung 4.5, Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7). Dazu wurde die Leber aus den Tieren entnommen, fixiert und es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. In diesen wurde die HSC mittels eines Antikörpers gegen PDGFRβ (rot) und die LSEC mit einem Antikörper gegen CD31 (rot) gefärbt. Durch gleichzeitige Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen die α1-UE der NO-GC (grün) konnte die NO-GC sichtbar gemacht und auf eine Kolokalisation zwischen PDGFRβ und CD31 überprüft werden. Im Überlagerungsbild zwischen NO-GC und PDGFRβ war zu erkennen, dass die NO-GC in jeder PDGFRβ⁺ Zelle exprimiert wurde (Abbildung 4.5B und Abbildung 4.6A). Dazu zählten auch die PDGFRβ⁺-Zellen (vermutlich VSMCs) in den Portalfeldern (Abbildung 4.5B und Abbildung 4.6B), während im Überlagerungsbild zwischen NO-GC und CD31 keine Kolokalisation zu erkennen war (Abbildung 4.7B). Das bedeutet, dass die NO-GC in den HSC exprimiert wurde und nicht in den LSEC. Zusätzlich wurde die Kolokalisation von NO-GC mit einem weiteren HSC-Marker (Desmin) überprüft (Abbildung 4.7A). Hier zeigte sich das gleiche Bild wie bei PDGFRβ. Die HSC wurden durch Desmin markiert und in jeder Desmin⁺-Zelle war eine NO-GC-Expression auszumachen.

Aus den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die HSC im Lebergewebe mittels PDGFRβ identifiziert werden konnten. Es konnte festgestellt werden, dass die NO-GC zu einem großen Teil in den HSC exprimiert wurde und zu einem kleinen Teil in den VSMC der Gefäße der Leber.

A



B

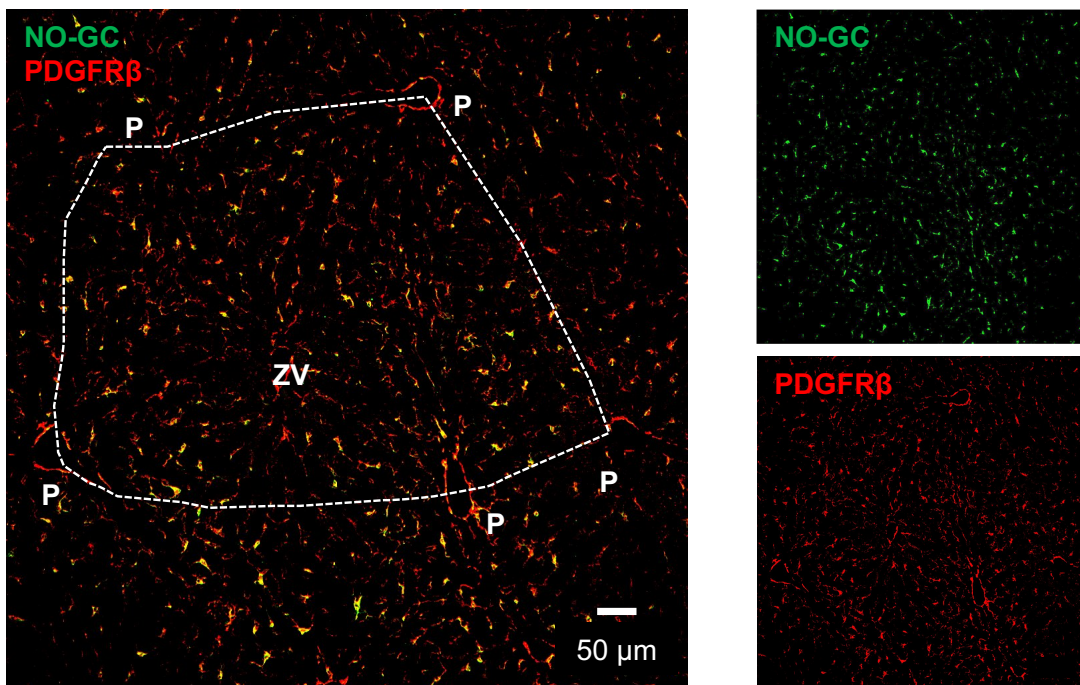


Abbildung 4.5: Die NO-GC-Expression in der murinen Leber

Schematische Darstellung der Leberläppchen, der Zentralvene (ZV) und der Portalfelder (A). Leberschnitte aus dem WT-Tier wurden mit Antikörpern gegen die α 1-UE der NO-GC (grün) und PDGFR β (rot) gefärbt (B). Im Überlagerungsbild B zeigen sich Kolokalisation (gelb) zwischen dem HSC-Marker PDGFR β und der NO-GC. Mittels gestrichelter, weißer Linie wurde das Leberläppchen kenntlich gemacht. Ebenfalls sind Zentralvene (ZV) und Portalfelder (P) markiert.

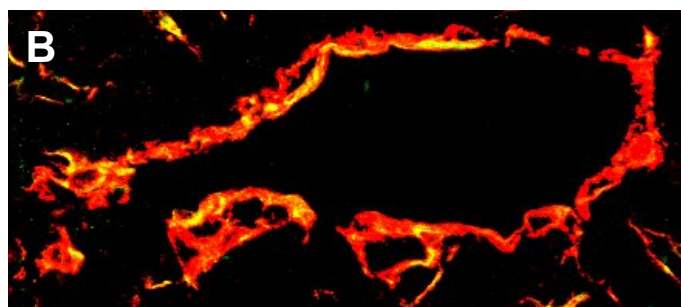
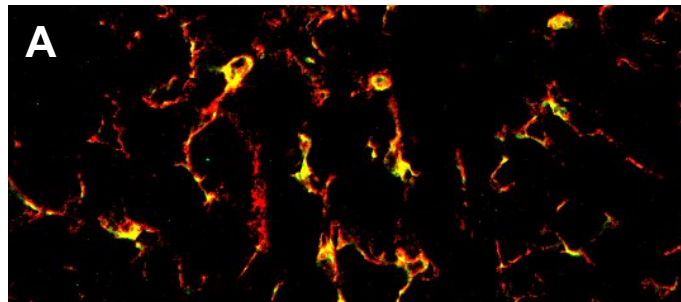
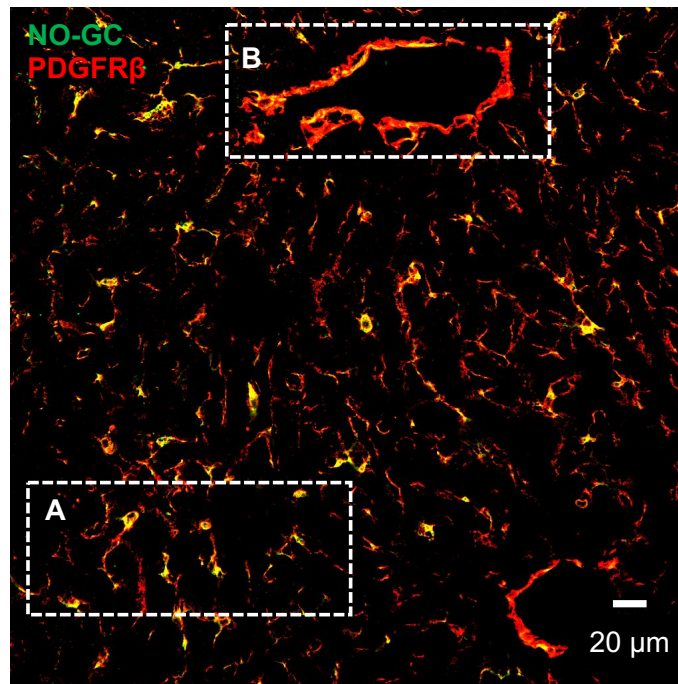


Abbildung 4.6: Lokalisation der NO-GC in der murinen Leber

Leberschnitte aus dem WT-Tier wurden mit Antikörpern gegen die $\alpha 1$ -UE der NO-GC (grün) und PDGFR β (rot) gefärbt. Im Überlagerungsbild zeigen sich Kolo-kalisation (gelb) zwischen dem HSC-Marker PDGFR β und der NO-GC. Mittels gestrichelter, weißer Linie wurden zwei Stellen im Überlagerungsbild markiert, die in A und B als Zoom dargestellt sind. Im Zoombild A ist die Expression der NO-GC in den HSC zu erkennen. Im Zoombild B ist die NO-GC-Expression in den VSMC zu sehen.

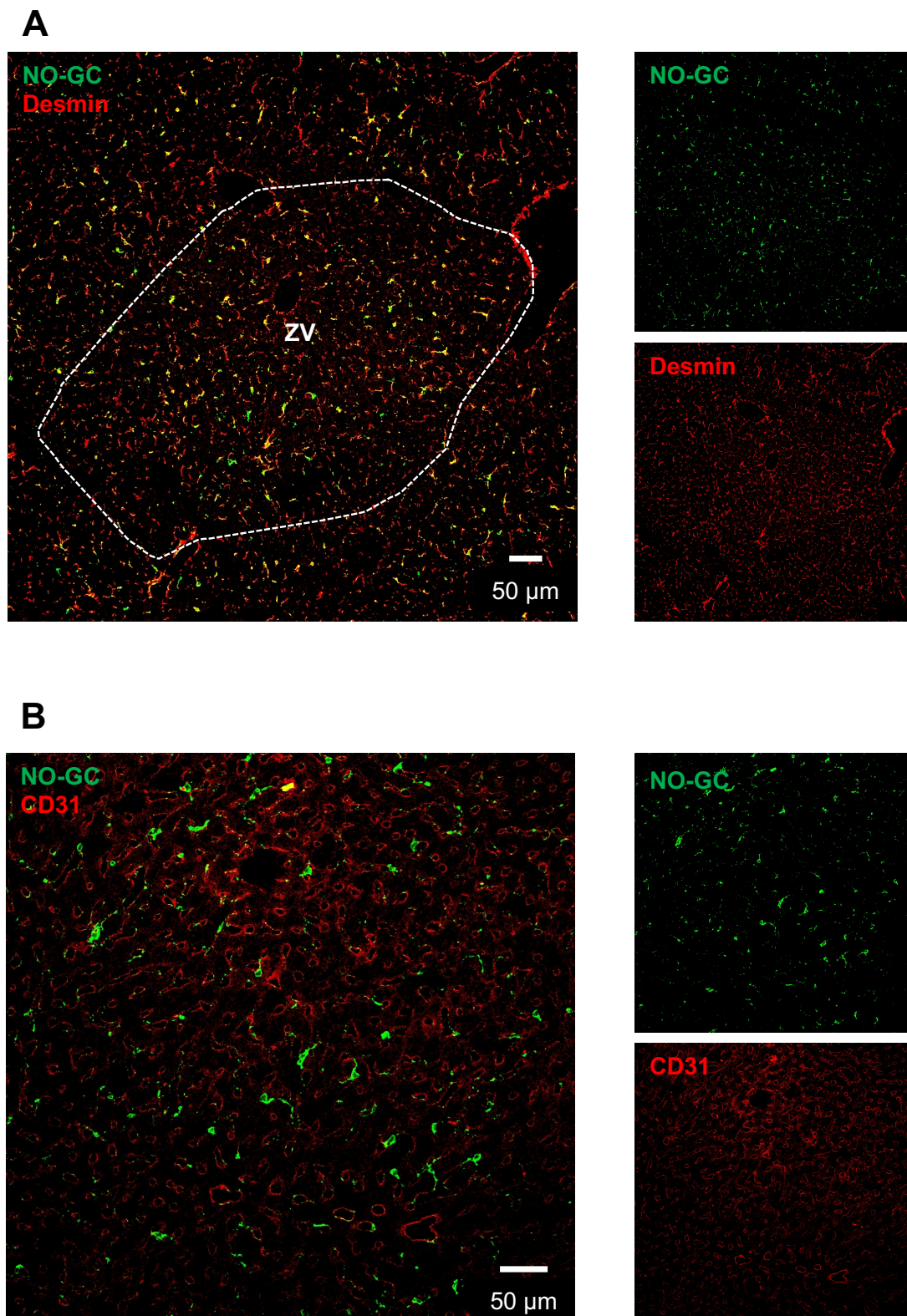


Abbildung 4.7: Expression der NO-GC in der murinen Leber

Leberschnitte aus dem WT-Tier wurden mit Antikörpern gegen die α 1-UE der NO-GC (grün) und Desmin (A) sowie dem Endothelmarker CD31 (B) durchgeführt (beide in Rot). In dem Überlagerungsbild A ist eine Kolokalisation zwischen Desmin und NO-GC zu sehen. Mittels gestrichelter, weißer Linie wurde das Leberläppchen kenntlich gemacht. Zudem wurde die Zentralvene (ZV) markiert. Im Überlagerungsbild B ist keine Überlagerung zwischen NO-GC und CD31 zu erkennen.

4.2.2 Deletion der NO-GC in der murinen Leber

Um die Spezifität der in Abschnitt 4.2.1 vorgestellten Färbungen zu überprüfen, sollte die NO-GC-Expression auch in GCKO-Tieren untersucht werden. Dadurch sollte zum einen die Spezifität des verwendeten Antikörpers überprüft werden, zum anderen sollte ermittelt werden, ob falsch positive Aussagen zur NO-GC-Expression vorlagen. Die Testung erfolgte immunhistochemisch sowie mittels Western-Blot-Analyse.

Für die immunhistochemische Analyse wurde die Leber aus GCKO-Tieren entnommen, fixiert und es wurden 5 μm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden dann mit Antikörpern gegen NO-GC (grün) und PDGFR β (rot) gefärbt. Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen, konnte in GCKO-Tieren keine Expression der NO-GC in HSC (PDGFR β^+) beobachtet werden.

Auch die Western-Blot-Analyse zeigte keine Expression der NO-GC in den Leberhomogenaten aus GCKO an, während im WT eine klare Bande bei 72 kDa auszumachen war (Abbildung 4.13B–C). Für die Western-Blot-Untersuchung wurden die Lebern aus den WT- und GCKO-Tieren entnommen, homogenisiert und die $\alpha 1$ -UE der NO-GC in den Proteinhomogenaten wurden mittels eines spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht. Als Haushaltsprotein wurde GAPDH eingesetzt, das ebenfalls durch einen spezifischen Antikörper detektiert werden konnte.

Anhand der Leber aus GCKO-Tieren konnte die Aussage, dass die NO-GC in der Leber exprimiert wird – und dort spezifisch in den HSC – bestätigt werden. Es wurde dadurch ausgeschlossen, dass es sich um falsch positive Ergebnisse handelte.

4.2.3 Untersuchung der CCl₄-induzierten Leberfibrose

Zur Untersuchung des Einflusses der NO-GC auf die Pathogenese der Leberfibrose sollte zunächst das CCl₄-Leberfibrosemodell etabliert werden. Zur Überprüfung des Modells sollte sowohl die gesunde als auch die fibrotische Leber untersucht und es sollten Marker gefunden werden, mit denen die Fibrose quantifiziert werden kann. Dies sollte sowohl mittels immunhistochemischer Auswertung als auch mittels qPCR-Analyse erfolgen.

Zur Induzierung der Leberfibrose wurde den Tieren über 4 Wochen 12-Mal (1 μl pro g Körpergewicht 1:3 gelöst in Miglyol[®] 812) CCl₄ i.p. verabreicht (Abbildung 4.9A). Das CCl₄ wird in der Leber durch CYP2E1 in das Radikal CCl₃ \cdot umgewandelt. Dieses Enzym kommt nur in Hepatozyten in Zone 1 des Leberazinus vor. Das Radikal löst dort in den Hepatozyten eine Lipidperoxidation sowie eine reduzierte Proteinsynthese aus – was schlussendlich zur Schädigung der Hepatozyten führt, sodass eine inflammatorische Antwort ausgelöst wird, die in einer Fibrose resultiert (Weber et al., 2003). Zur Untersuchung der Fibrose wurden die Organe 24 h nach letzter Injektion entnommen, fixiert und auf Inflammation untersucht.

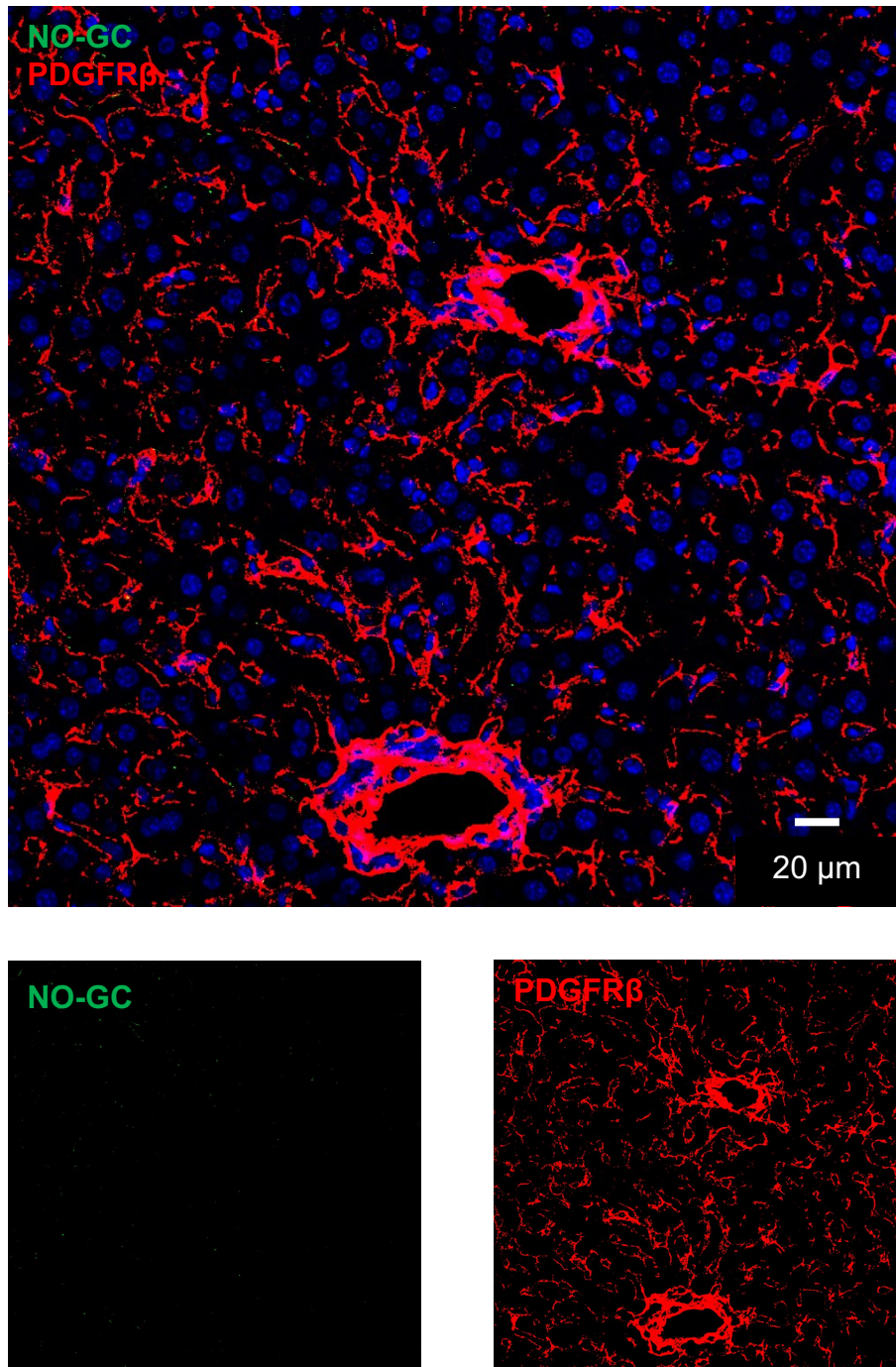


Abbildung 4.8: Deletion der NO-GC in der murinen Leber

Leberpräparate aus GCKO-Tieren wurde mit Antikörpern gegen die $\alpha 1$ -UE der NO-GC (grün) und PDGFR β (rot) angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Im GCKO lässt sich keine Kolokalisation (gelb) im Überlagerungsbild zwischen NO-GC und PDGFR β beobachten.

Durch die wiederholte Gabe von CCl_4 konnte ein starker Anstieg der $\text{PDGFR}\beta^+$ -Zellen beobachtet werden (Abbildung 4.9B). Der Großteil der $\text{PDGFR}\beta^+$ -Zellen sortierte sich dabei am Rand der Leberläppchen. Deren Signalintensität war deutlich höher als die der HSC, die sich im Parenchym befanden. In den Regionen in denen die HSC verstärkt auftraten, konnten auch die fibrotischen Läsionen beobachtet werden. Diese waren durch Einlagerung von $\text{Col1}\alpha1$ gekennzeichnet. Sowohl mit einer PSR-Färbung (Abbildung 4.9B), mit der Kollagen im Gewebe angefärbt werden kann, als auch mit einer Antikörperfärbung gegen $\text{Col1}\alpha1$ konnte dies bestätigt werden.

Bei der Fibrose kommt es zur Differenzierung von Zellen in Myofibroblasten, die die EZM synthetisieren. Ein anerkannter Marker für Myofibroblasten ist α -SMA (Sun et al., 2016). In der gesunden Leber konnte α -SMA nur in VSMC gesehen werden. Dagegen konnten in der Leberfibrose α -SMA⁺-Zellen an den Rändern der Leberläppchen beobachtet werden. Diese waren mit $\text{PDGFR}\beta$ kolokalisiert (Abbildung 4.11A).

Um quantitativ zu bestimmen, wie die mehrfache Gabe von CCl_4 die Expression der genannten Marker $\text{PDGFR}\beta$, $\text{Col1}\alpha1$ und α -SMA (Abbildung 4.10A-C) verändert, wurde eine Flächenauswertung durchgeführt. In der Leberfibrose stiegen die Werte für alle Marker deutlich. Während in der gesunden Leber ein $\text{PDGFR}\beta$ -Signal von unter 10% der Fläche detektiert werden konnte, wurde in der gesunden Leber ein Wert von 37% gemessen. Auch bei $\text{Col1}\alpha1$ stieg das Signal an, jedoch nicht so stark wie bei $\text{PDGFR}\beta$. Hier erhöhte sich das Signal von 20% im gesunden Zustand auf 30% in der Fibrose. Hingegen kam es bei α -SMA zu einem starken Anstieg des Signals von unter 1% in der gesunden auf 6% in der fibrotischen Leber.

Als Ergänzung zur Flächenauswertung wurde eine qPCR-Analyse für die genannten Marker durchgeführt. Auch hier kam es bei allen Markern zu einem signifikanten Anstieg in der Leberfibrose. Die $\text{PDGFR}\beta$ -Expression stieg in der fibrotischen Leber im Vergleich zum gesunden Zustand auf das 4-Fache an. Bei $\text{Col1}\alpha1$ stieg die RNA-Expression sogar auf das 5-Fache an und bei Acta2 – dem Gen für α -SMA – stieg die Expression auf das 6-Fache.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es durch das verwendete Applikationsschema zu einer stabilen Fibrose in der Leber der Mäuse kommt. Zudem konnten die Marker $\text{PDGFR}\beta$, α -SMA und $\text{Col1}\alpha1$ als stabile Parameter etabliert werden, um die Fibrose zu charakterisieren.

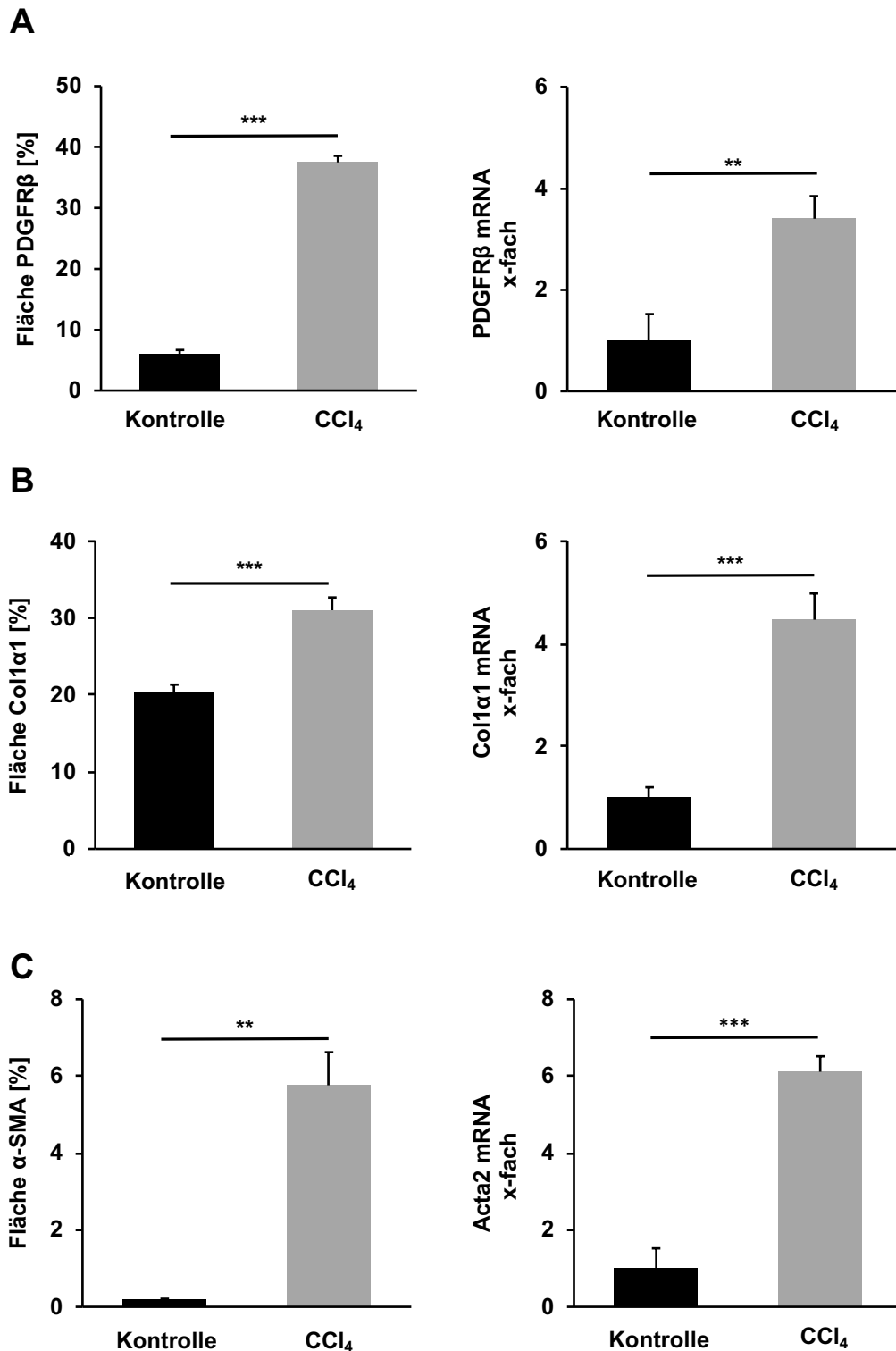


Abbildung 4.10: Ergebnisse der Flächenauswertung und qPCR für WT-Tiere

Dargestellt sind die Ergebnisse der Flächenauswertung und qPCR für gesunde und fibrotische WT-Tiere. PDGFRβ (A); Col1α1 (B) und Acta2 (C). Durch die Induzierung der Leberfibrose mittels CCl₄ kommt es bei allen Markern sowohl in der Flächenauswertung als auch in der qPCR zu einem signifikanten Anstieg. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=5 WT-Tieren (ns=nicht signifikant; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

4.2.4 Expression der NO-GC in der fibrotischen Leber

Nach Etablierung des CCl₄-Modells und der Charakterisierung der Leberfibrose sollte die NO-GC-Expression bei der Leberfibrose untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden, wie sich die Expression der NO-GC verändert und in welchen Zellen diese in der Leberfibrose zu finden ist.

Dazu wurde die Leberfibrose in den Tieren wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben induziert. Die Lebern wurden dann 24 h nach der letzten CCl₄-Gabe aus dem Tier entnommen, fixiert und es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Leberschnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen die α 1-UE der NO-GC (grün) gefärbt.

Es konnte in der fibrotischen Leber eine stark erhöhte Expression der NO-GC im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die Signalintensität für die NO-GC (grün) war hauptsächlich in den fibrotischen Regionen stark erhöht. Durch eine Doppelfärbung mit PDGFR β (rot) konnte festgestellt werden, dass die NO-GC in den PDGFR β ⁺-Zellen im fibrotischen Bereich exprimiert wird (Abbildung 4.11A-B). Gleichzeitig konnten in den Zonen 2 und 3 HSC beobachtet werden, die ebenfalls positiv für die NO-GC waren. Hier hatte sich die NO-GC-Signalintensität jedoch nicht erhöht.

4.2.4.1 NO-GC-Expression in Myofibroblasten

Bei Myofibroblasten handelt es sich um Zellen, die in der Fibrose die EZM produzieren. Auch in der CCl₄-induzierten Leberfibrose kommt es zum Auftreten von Myofibroblasten, die durch den Marker α -SMA sichtbar gemacht werden können. Dazu wurden Leberschnitte aus dem fibrotischen WT-Tier mit Antikörpern gegen α -SMA (grün) und PDGFR β gefärbt (Abbildung 4.12A). Zu erkennen ist, dass α -SMA in der Leberfibrose nicht nur in VSMC, sondern auch in Zellen exprimiert wurde, die in der fibrotischen Region liegen und die zusätzlich mit PDGFR β kolokalisiert waren. Dies spricht dafür, dass es sich hierbei um Myofibroblasten handelt.

Zusätzlich wurden fibrotische Leberschnitte mit α -SMA (rot) und NO-GC (grün) gefärbt. Hier konnte beobachtet werden, dass es in Myofibroblasten zu einer NO-GC-Expression kam (Abbildung 4.12B). Jedoch ließ sich auch feststellen, dass nur ein Teil der Zellen in der fibrotischen Region positiv für α -SMA war. Neben den α -SMA-, NO-GC- und PDGFR β ⁺-Zellen lagen auch noch viele Zellen vor, die zwar NO-GC- und PDGFR β ⁺ waren, aber negativ für α -SMA.

Es wurden zusätzlich Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierbei wurde ein spezifischer Antikörper gegen die α 1-UE der NO-GC verwendet. Sowohl in Leberhomogenaten aus unfibrotischen WT-Tieren als auch in Homogenaten aus dem fibrotischem WT konnte bei 72 kDa eine Bande detektiert werden. Diese war bei fibrotischen WT-Lebern deutlich intensiver als bei gesunden Lebern (Abbildung 4.13B). Die Western-Blot-Daten wurden zusätzlich quantitativ analysiert. Dazu wurde das NO-GC-Signal auf das Haushaltsprotein GAPDH normalisiert. Dadurch konnte festgestellt werden, dass es zu einem signifikanten Anstieg der NO-GC durch die CCl₄-induzierte Fibrose kam.

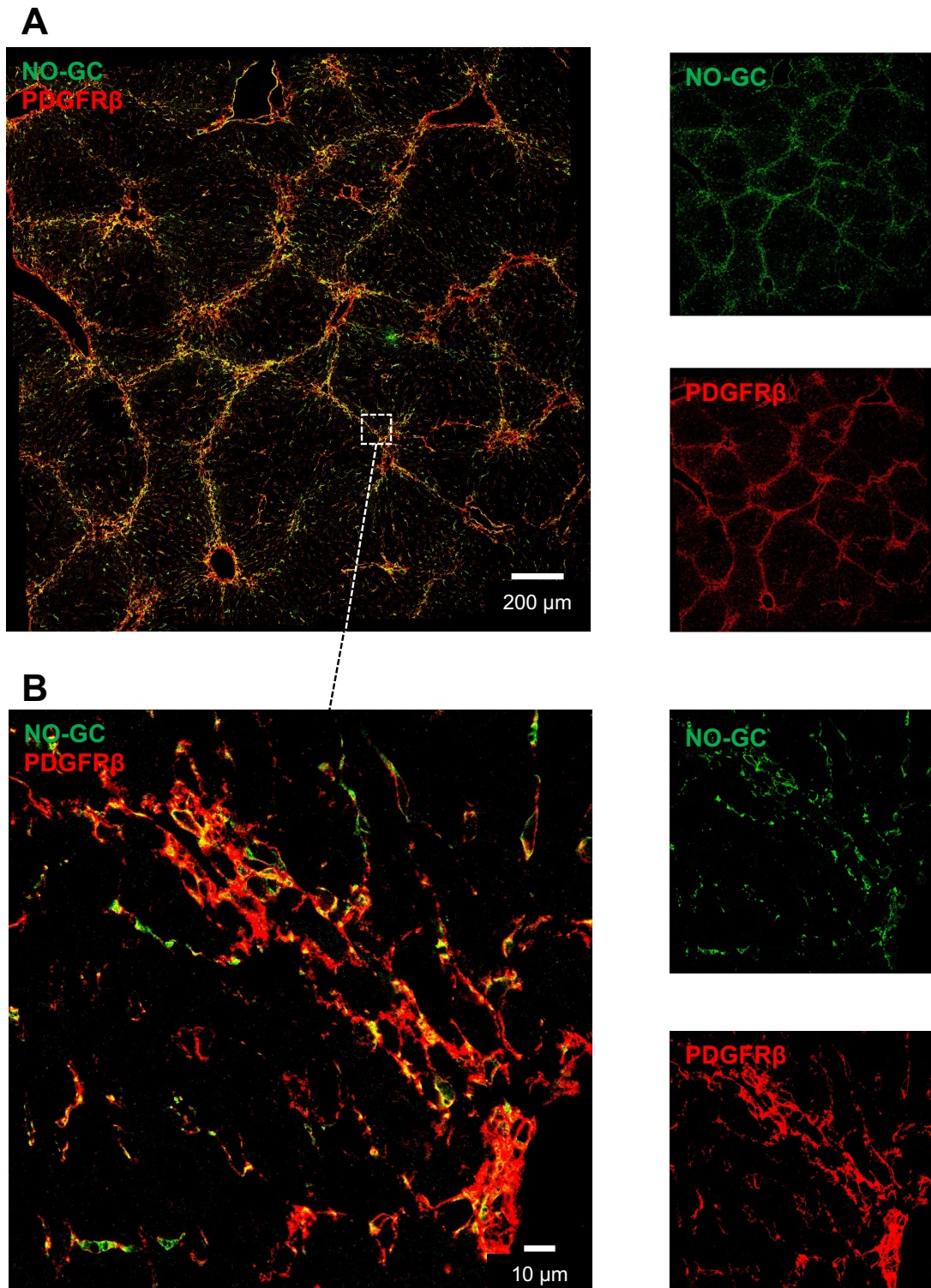


Abbildung 4.11: NO-GC-exprimierende Zellen in der CCl₄-induzierten Leberfibrose

Dopplefärbung von Leberschnitten aus WT-Tieren, in denen mittels CCl₄ Leberfibrose induziert wurde, gegen die $\alpha 1$ -UE der NO-GC (grün) und gegen PDGFR β (rot). Es kommt zu einer Kolokalisation (gelb) zwischen der NO-GC und PDGFR β . Zusammengefügte 20x Aufnahmen (A) und vergrößerte Aufnahme aus einer fibrotischen Region (B).

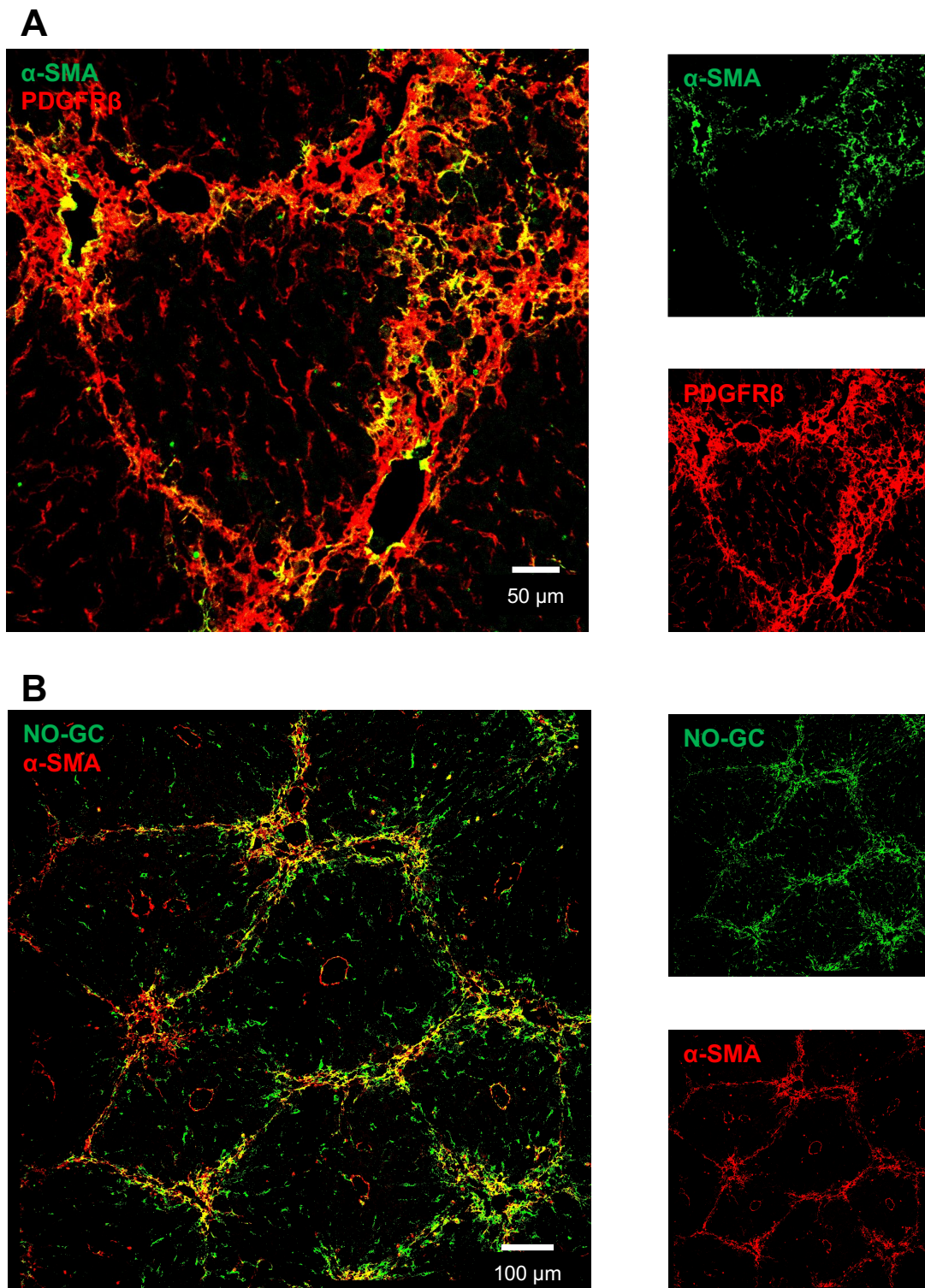


Abbildung 4.12: Die α -SMA-Expression in der CCl_4 -induzierten Leberfibrose

Leberschnitte aus fibrotischen WT-Tieren wurden mit spezifischen Antikörpern gegen α -SMA (grün) und PDGFR β (rot) (A) bzw. der α 1-UE der NO-GC (grün) (B) gefärbt. In den Überlagerungsbildern lässt sich sowohl zwischen PDGFR β als auch zwischen NO-GC Kolokalisationen (gelb) mit α -SMA feststellen.

Es wurde deutlich, dass die NO-GC-Expression in der Leberfibrose hochreguliert wird, was in den HSC in den fibrotischen Regionen ausgemacht werden konnte. Dabei zeigte sich, dass ein Teil dieser Zellen in der fibrotischen Region auch positiv für den Myofibroblastenmarker α -SMA war. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die NO-GC in der Fibrose auch in den Myofibroblasten exprimiert wird.

Um zu untersuchen welchen Einfluss die NO-GC auf die Entwicklung einer CCl_4 -induzierten Leberfibrose hat, wurden zunächst GCKO-Tiere, nach Induzierung der Leberfibrose mittels CCl_4 , immunhistochemisch untersucht (Abbildung 4.13).

Zur Analyse der NO-GC-Expression in der fibrotischen Leber aus GCKO wurden Leberschnitte aus entsprechenden Tieren mittels Antikörper gegen NO-GC (grün) und PDGFR β gefärbt (Abbildung 4.13A). Es ließ sich zunächst feststellen, dass die fibrotische Leber aus GCKO-Tieren der fibrotischen Leber aus WT-Tieren glich. Es kam zudem zum Auftreten von fibrotischen Regionen, die am Rande der Leberläppchen zu sehen waren, in denen PDGFR β^+ -Zellen akkumulierten. Jedoch zeigte sich, wie bereits in der gesunden Leber aus GCKO-Mäusen, kein Signal für die NO-GC in der fibrotischen Leber aus GCKO-Tieren. Während die NO-GC der fibrotischen Leber aus WT-Mäusen in den fibrotischen Regionen stark hochreguliert war, fehlte diese in GCKO-Tieren völlig, was mittels Western-Blot-Analyse überprüft wurde. Hier zeigte sich, wie bereits ebenfalls bei der Untersuchung der gesunden Leber keine Bande bei 72 kDa (Abbildung 4.13B).

4.2.5 Vergleich der Leberfibrose zwischen WT und GCKO

Zum Vergleich der Leberfibrose zwischen WT und GCKO wurden die Marker Col1 α 1, TGF- β 1, PDGFR β und α -SMA verwendet. Zur Untersuchung von Col1 α 1 wurde sowohl die PSR-Methode als auch die Flächenauswertung für die Antikörperfärbung von Col1 α 1 und die qPCR-Analyse von Col1 α 1 verwendet. Die Marker PDGFR β und α -SMA wurden sowohl mittels Flächenauswertung als auch mittels qPCR-Analyse quantifiziert. Der TGF- β 1 wurde nur mittels qPCR analysiert, wobei pSMAD3 – das Effektorprotein von TGF- β 1 – immunhistochemisch untersucht wurde.

Es zeigte sich bei der PSR-Auswertung, dass es keinen Unterschied zwischen den gesunden Lebern aus WT- und GCKO-Mäusen gab (Abbildung 4.14A–C). Kam es jedoch zu einer Fibrose, so stieg die Fläche des Kollagen-Signals beim GCKO signifikant stärker an (von 5% auf 25%) als im WT (von 5% auf 15%). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Flächenauswertung für die Antikörperfärbung von Col1 α 1 (Abbildung 4.15B). Im gesunden Zustand lag im WT und im GCKO eine Bedeckung der Fläche von 20% vor. Kam es zur Fibrose, so stieg im WT die Flächenauslastung auf 30% an, während die Fläche im GCKO auf 35% anstieg. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen WT und GCKO ermittelt werden. Die mittels PSR- und Col1 α 1-Flächenauswertung erhaltenen Ergebnisse konnten zudem durch die qPCR-Analyse für Col1 α 1 bestätigt werden. Während im gesunden Zustand wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen WT und GCKO ausgemacht werden konnte, stieg die RNA-Expression im GCKO in der fibrotischen Leber um das 8-Fache an, während die Expression in der fibrotischen WT-Leber nur um das 4-Fache zunahm. Auch dieser Unterschied war signifikant.

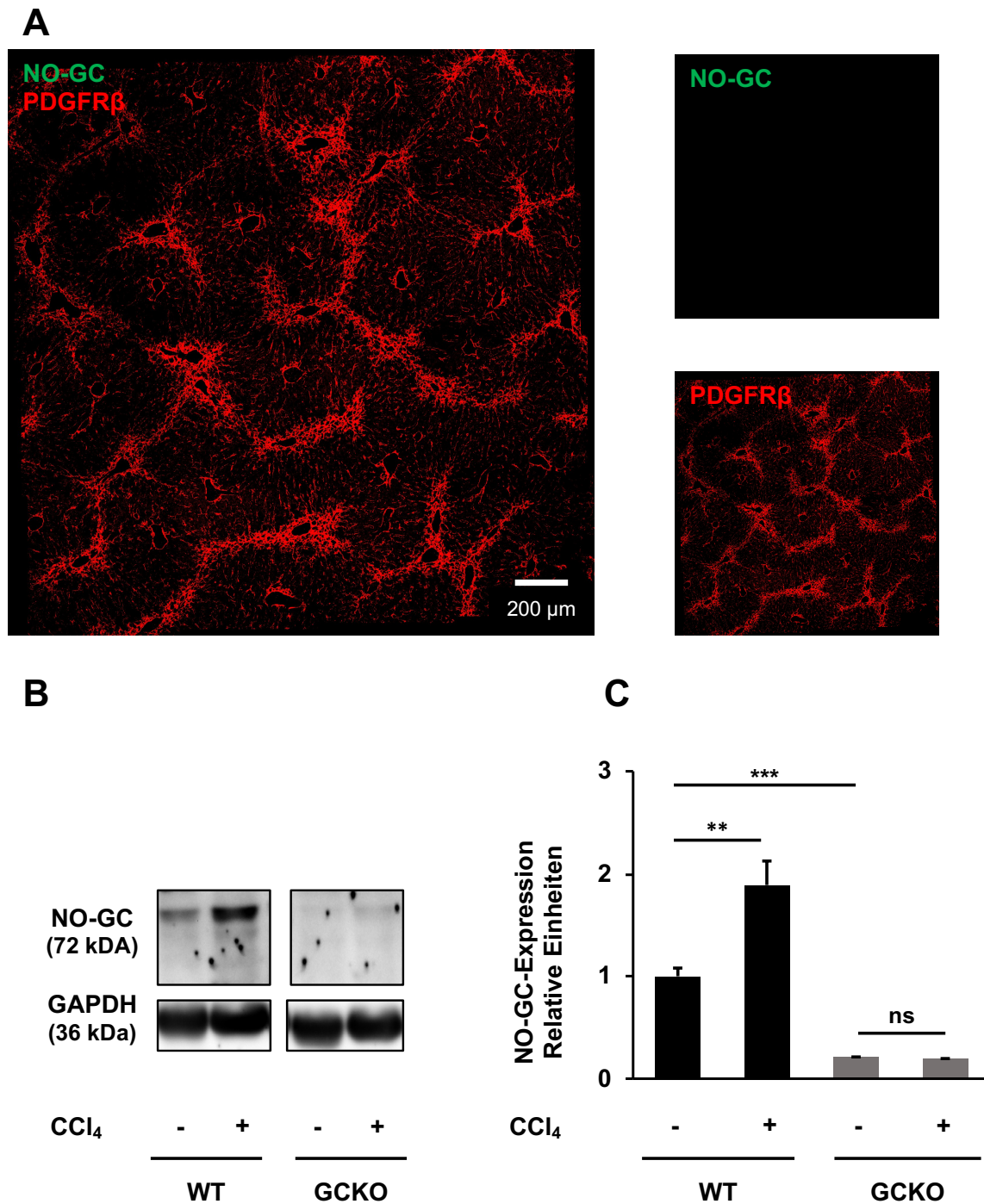


Abbildung 4.13: Die NO-GC-Expression in GSKO-Tieren bei CCl₄-induzierter Leberfibrose

Durch eine Doppelfärbung an Leberpräparaten aus fibrotischen GSKO-Tieren wurde die α 1-UE der NO-GC (grün) und PDGFR β (rot) sichtbar gemacht (A). Im Überlagerungsbild ist kein grünes Signal für NO-GC zu erkennen. Western-Blot für die NO-GC aus gesunden und fibrotischen Leberhomogenaten von WT- und GSKO-Mäusen. Zu sehen ist ein repräsentativer Western-Blot (B). Quantitative Western-Blot-Auswertung (C). Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von $n=4$ pro Genotyp (ns=nicht signifikant; *= $p<0,05$; **= $p<0,01$; ***= $p<0,001$).

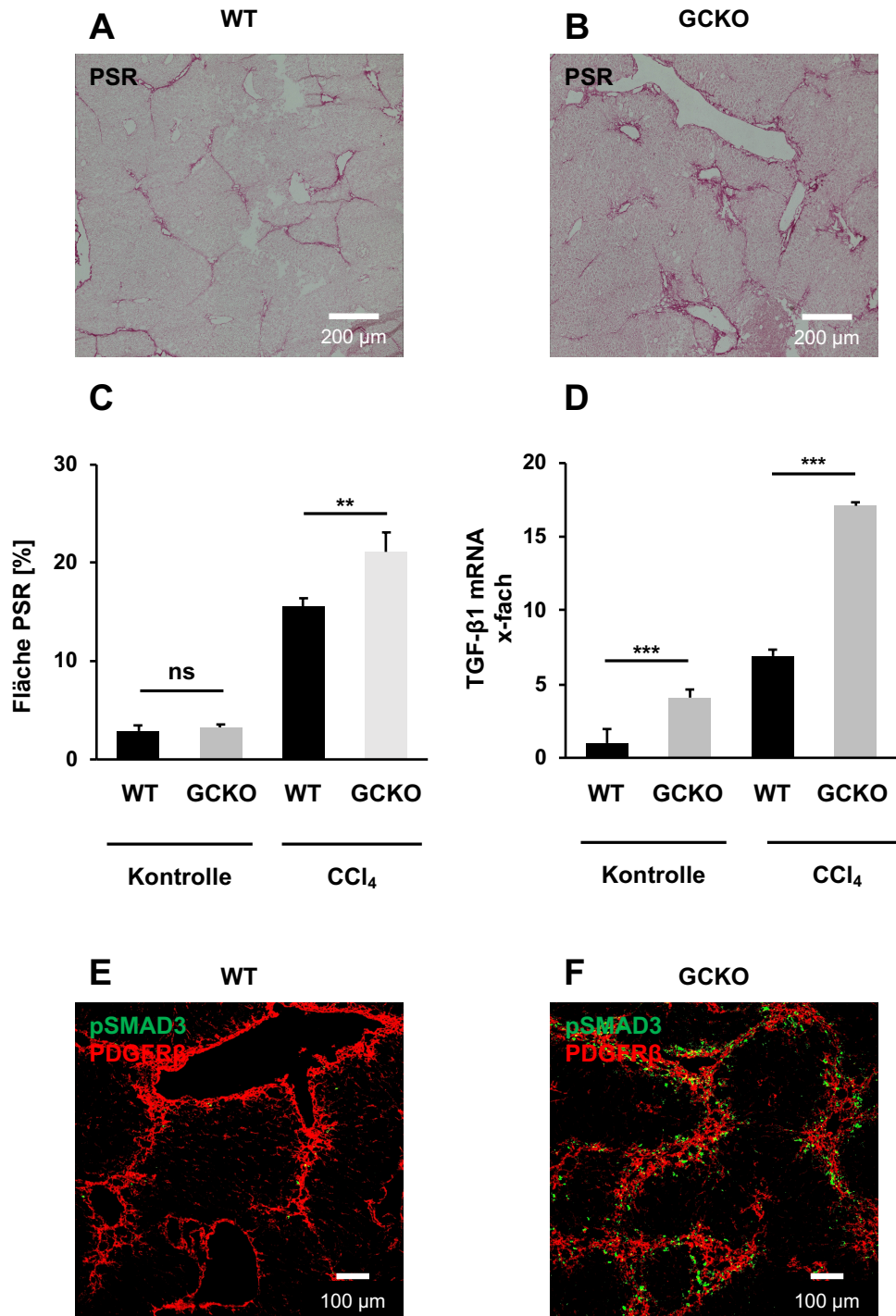


Abbildung 4.14: Kollagenbestimmung und TGF- β 1-Signalweg in WT- und GCKO-Leber

PSR-Färbungen von Leberschnitten aus fibrotischen WT- (A) und GCKO-Tieren (B). Quantitative Auswertung des Kollagengehalts (C) und qPCR Analyse von TGF- β 1 (D) in gesunden und fibrotischer WT- und GCKO-Tieren. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von $n=4-5$ pro Genotyp (ns=nicht signifikant; *= $p<0,05$; **= $p<0,01$; ***= $p<0,001$). Leberschnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen pSMAD3 (grün) und PDGFR β (rot) gefärbt. Leber aus fibrotischen WT- (E) und GCKO-Tieren (F). Im Überlagerungsbild E sind nur wenige pSMAD3-Signale in den fibrotischen Regionen zu erkennen. Dagegen sind im Überlagerungsbild F viele pSMAD3-Signale in den fibrotischen Regionen zu sehen.

Als Nächstes wurde die TGF- β 1-RNA-Expression in WT und GCKO untersucht (Abbildung 4.14D). Der TGF- β 1 sorgt in der fibrotischen Leber für die Stimulation der Col1 α 1-Expression in den Myofibroblasten. Das bedeutet: Je höher die TGF- β 1-Expression, desto mehr Col1 α 1 bzw. EZM wird produziert. Es ließ sich mittels qPCR-Analyse feststellen, dass es bereits in der gesunden Leber zu einem Unterschied bei der TGF- β 1-RNA-Expression kam. Bereits hier betrug diese im GCKO das 4-Fache der TGF- β 1-RNA-Expression in der gesunden WT-Leber. In der Leberfibrose kam es sowohl im WT als auch im GCKO zu einem Anstieg der RNA-Expression. Während die TGF- β 1-RNA-Expression in der fibrotischen WT-Leber um das 6-Fache höher war als in der gesunden Leber, war diese in der fibrotischen GCKO-Leber um das 15-Fache erhöht. Zusätzlich wurde das Effektorprotein von TGF- β 1 betrachtet. Kommt es zur Bindung von TGF- β 1 an den Rezeptor, so wird im nächsten Schritt SMAD3 phosphoryliert. Zur Untersuchung der Phosphorylierung des SMAD3 wurden Leberschnitte aus fibrotischen WT- und GCKO-Tieren mit Antikörpern gegen PDGFR β (rot) und pSMAD3 (grün) gefärbt (Abbildung 4.14E und F). Dort konnten in den fibrotischen Regionen Signale für pSMAD3 ausgemacht werden. Jedoch fiel auf, dass in der fibrotischen Leber aus GCKO-Tieren deutlich mehr Signale zu sehen waren als in den fibrotischen Regionen der WT-Lebern, was dafür spricht, dass mehr TGF- β 1 vorlag – denn je mehr TGF- β 1 vorhanden ist, desto höher ist die Menge von pSMAD3. Damit ließen sich die Beobachtungen aus der qPCR über die RNA-Expression von TGF- β 1 bestätigen.

Beim Vergleich der Flächenauswertung und qPCR-Analyse für PDGFR β und α -SMA (Abbildung 4.15) zeigten sich, anders als bei der Auswertung von Col1 α 1, Unterschiede zwischen den beiden Analysen. Während bei der Flächenauswertung von PDGFR β und α -SMA kein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden WT- und GCKO-Leber detektiert werden konnte (Fläche für PDGFR β bei WT und GCKO bei 5%; Fläche für α -SMA bei WT und GCKO bei 1%), konnte bei der qPCR-Analyse ein signifikanter Unterschied bei beiden Markern ermittelt werden. Während in der gesunden Leber aus GCKO eine 2,5-Fach erhöhte RNA-Expression von PDGFR β festgestellt werden konnte, konnte für α -SMA eine 5-Fach erhöhte Expression in der gesunden GCKO-Leber im Vergleich zur WT-Leber gesehen werden. Ähnlich verhielt sich dies für die fibrotischen Lebern. Zwar stieg auch in den Flächenauswertungen die Fläche für PDGFR β und α -SMA in GCKO-Tieren an, jedoch unterschied diese sich nicht von der Fläche in WT-Tieren. Bei der qPCR-Analyse konnte wiederum ein signifikanter Unterschied für PDGFR β und α -SMA zwischen fibrotischer WT- und GCKO-Leber ermittelt werden. Bei PDGFR β war die RNA-Expression in der fibrotischen WT-Leber um das 4-Fache erhöht, während in der fibrotischen Leber aus GCKO die Expression um das 8-Fache erhöht war. Für α -SMA konnte im fibrotischen WT eine 5-Fache Erhöhung ausgemacht werden, im GCKO aber eine Erhöhung um das 10-Fache. In Lebern aus GCKO kommt es zu einer stärkeren Fibrose als in WT-Lebern. Durch die erhöhte TGF- β 1-Expression kommt es zu einer erhöhten Col1 α 1-Synthese und damit zu einem vermehrten Einbau von EZM.

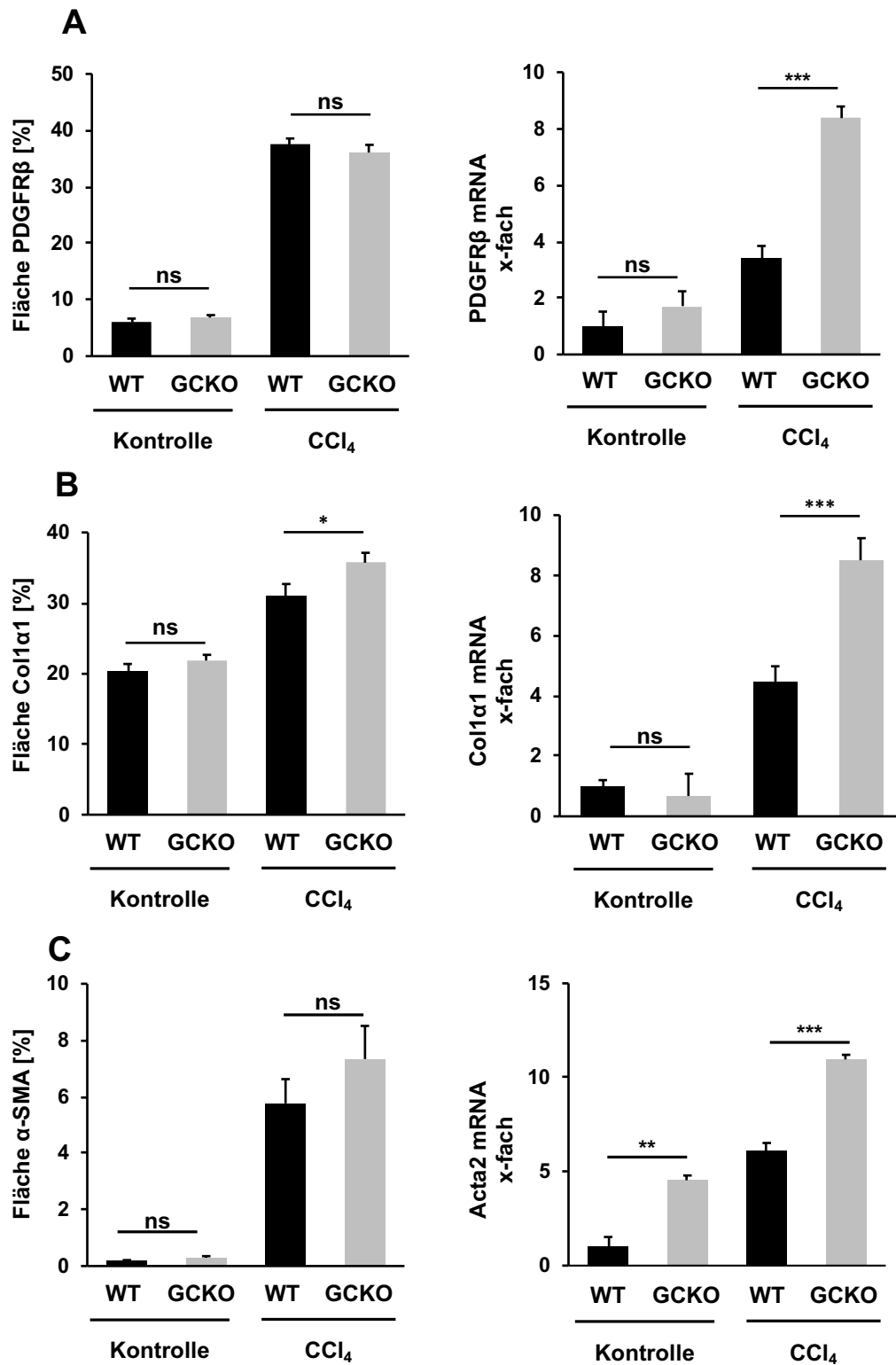


Abbildung 4.15: Ergebnisse der Flächenauswertung und qPCR für WT- und GCKO-Tiere

Dargestellt sind die Ergebnisse der Flächenauswertung und der qPCR für gesunde und fibrotische WT- und GCKO-Tiere. PDGFRβ (A); Col1α1 (B) und α-SMA (C). Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=4–5 pro Genotyp (ns=nicht signifikant; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001).

4.2.6 Auflösung der Leberfibrose

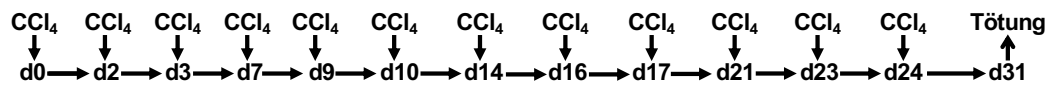
Im Anschluss an die Untersuchung der CCl_4 -induzierten Leberfibrose wurde die Auflösung der Fibrose untersucht. Es ist bekannt, dass die Leber 7 Tage nach der letzten Gabe von CCl_4 wieder das Ursprungsniveau an $\text{Col1}\alpha 1$ besitzt sowie dass die Expression der TIMPs und der MMPs nach dieser Zeit auf den Zustand vor der Leberfibrose zurückgekehrt ist (Iredale et al., 1998). Aus diesem Grund wurden die zu untersuchenden Leberpräparate zur Bestimmung der Auflösung der Leberfibrose, 7 Tage nach der letzten Injektion von CCl_4 aus den Mäusen entnommen (Abbildung 4.16A) und die Auflösung der Leberfibrose mittels Flächenauswertung quantifiziert (Abbildung 4.16B). Zudem wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt (Abbildung 4.17).

Wie bereits von Iredale et al. (1998) beschrieben, ließ sich mittels Flächenauswertung feststellen, dass die beiden Fibrosemarker $\text{PDGFR}\beta$ und $\alpha\text{-SMA}$ 7 Tage nach der letzten CCl_4 -Gabe auf das Niveau zurückgekehrt sind, das sie vor der Fibrose besaßen.

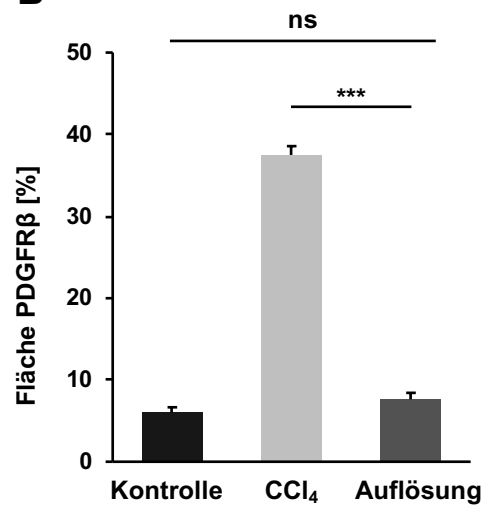
Auch bei der immunhistochemischen Untersuchung ließ sich dies beobachten. Im Vergleich mit Leberschnitten, die 24 h nach der letzten CCl_4 -Gabe isoliert wurden, konnten keine fibrotischen Läsionen an den Rändern der Leberläppchen beobachtet werden. Die Einlagerung von $\text{Col1}\alpha 1$ in den fibrotischen Arealen war verschwunden. Auch war die Zahl an HSC deutlich zurückgegangen und die HSC waren wieder homogen über die Leber verteilt (Abbildung 4.17A). Ebenfalls konnten nach 7 Tagen keine $\alpha\text{-SMA}^+$ -Zellen (Myofibroblasten) in der Leber gefunden werden (Abbildung 4.17B). $\alpha\text{-SMA}$ -Signal konnte nur in VSMC entdeckt werden. Auch die Einlagerungen von $\text{Col1}\alpha 1$ in den fibrotischen Regionen waren stark zurückgegangen (Abbildung 4.17C).

Anhand der gezeigten Ergebnisse lässt sich festhalten, dass sich die Leberfibrose 7 Tage nach der letzten Gabe von CCl_4 aufgelöst hatte. Damit stellt dieser Versuchsaufbau eine geeignete Möglichkeit dar, die Auflösung der Leberfibrose zu untersuchen.

A



B



C

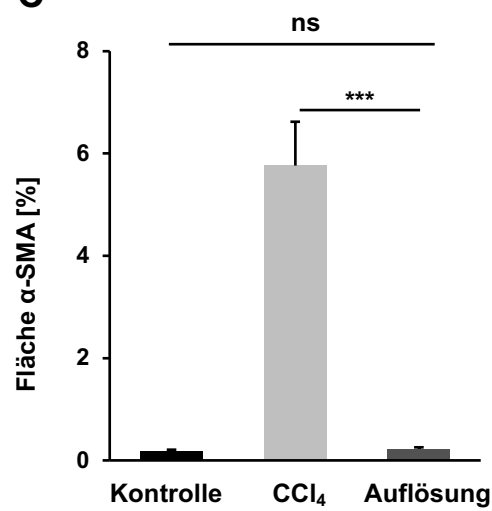


Abbildung 4.16: Auflösung der CCl₄-induzierten Leberfibrose in der murinen Leber

Schema für die Untersuchung der Auflösung der Leberfibrose nach chronischer CCl₄-Gabe (A). Ergebnisse der Flächenauswertung für gesunde und fibrotische Leber sowie Leber nach Auflösung der Leberfibrose für PDGFRβ (A) und α-SMA (B). Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=3–5 pro Genotyp (ns=nicht signifikant; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

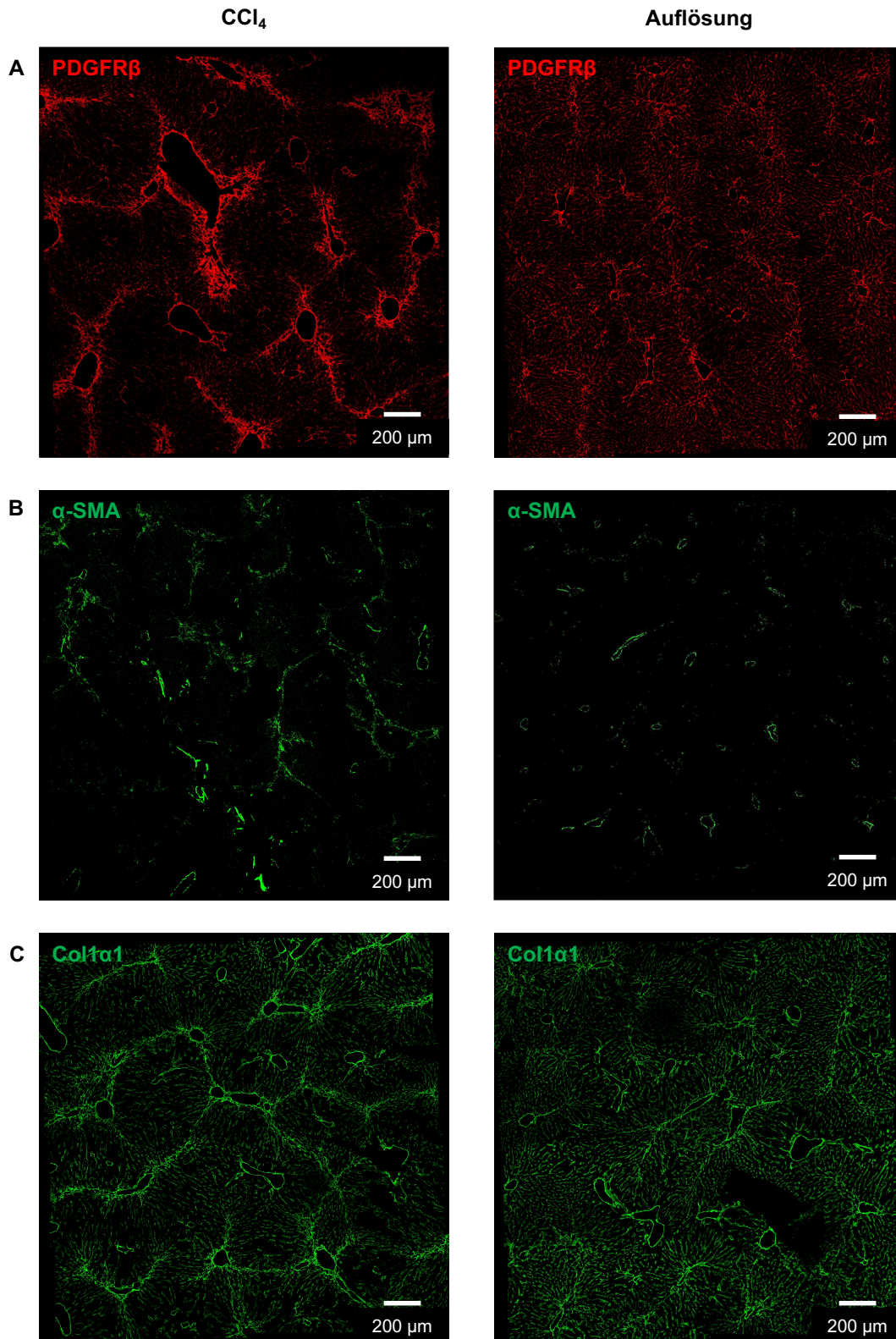


Abbildung 4.17: Auflösung der CCl₄-induzierten Leberfibrose in der murinen Leber

Leberschnitte aus WT-Tieren, die 24 h oder 7 Tage nach letztmaliger Gabe von CCl₄ aus der Leber entnommen wurden, wurden mit spezifischen Antikörpern gegen (A) PDGFRβ (rot), (B) α-SMA (grün) und (C) Col1α1 (grün) gefärbt. In den Leberschnitten aus dem WT-Tier, 7 Tage nach Auflösung der Leberfibrose, sind kaum noch fibrotische Regionen auszumachen.

4.3 Lineage Tracing von HSC

In diesem Versuchsteil sollte das Schicksal der HSC in der Leberfibrose und bei der Auflösung der Leberfibrose untersucht werden. Dazu sollten Reporterermäuse gefunden werden, die unter einem spezifischen Promotor ein Fluorophor, in diesem Fall tdTomato, exprimieren, der durch die CreER^{T2} gesteuert sein sollte. Nachdem Reporterermäuse gefunden werden konnten, in denen die HSC effektiv markiert werden, sollte in diesen Mäusen mittels CCl₄ eine Leberfibrose induziert und das Schicksal der markierten Zellen verfolgt werden. Zum Abschluss sollte der Verbleib dieser markierten Zellen in der Auflösung der Leberfibrose untersucht werden.

4.3.1 Verteilung und Identifizierung der PDGFR β -Tomato-Zellen in der Leber

Wie in Abschnitt 4.2.1 gezeigt, können die HSC in der Leber mittels Antikörperfärbung gegen PDGFR β markiert werden. Deshalb wurde zunächst als Reportermaus eine Maus gewählt, die unter der Kontrolle des Promotors PDGFR β das Fluorophor tdTomato exprimiert.

Um sicherzustellen, dass mittels der PDGFR β -Tomato-Reportermaus wirklich HSC in der Leber markiert werden, wurden Leberschnitte aus Lebern von gesunden PDGFR β -Tomato-Reporterermäusen angefertigt und mit einem spezifischen Antikörper gegen PDGFR β (grün) gefärbt (Abbildung 4.18A). Es konnte beobachtet werden, dass das Tomato-Signal (rot) in Zellkernen akkumulierte, während nur wenige Signale im Zytosol der Zellen vorkamen (Abbildung 4.18A1). Das Tomato-Signal war aber mit dem Signal für PDGFR β kolokalisiert. Auffällig war, dass nur ein kleiner Teil der PDGFR β -Antikörper⁺ HSC auch Tomato exprimierten.

Neben PDGFR β wurden die Leberschnitte aus PDGFR β -Tomato-Reporterermäusen auch mit einem spezifischen Antikörpern gegen α -SMA (grün) gefärbt (Abbildung 4.18B). Bei der Färbung von α -SMA fiel auf, dass PDGFR β -Tomato in den durch α -SMA sichtbar gemachten VSMC exprimiert wurde (Abbildung 4.18B1). Zusätzlich war die Verteilung der PDGFR β -Tomato⁺-HSC auffällig. Diese konnte nur in der Zone 1 des Leberazinus gefunden werden, nicht aber in den Zonen 2 und 3. Wie aus Abschnitt 4.2.1 hervorgeht, können HSC mit einem Antikörper gegen die α 1-UE der NO-GC effektiv markiert werden. Deshalb wurden Leberschnitte aus PDGFR β -Tomato-Reporterermäusen mit einem Antikörper gegen die α 1-UE der NO-GC gefärbt (Abbildung 4.19). Auch hier kam es zur gleichen Verteilung der PDGFR β -Tomato-Zellen, die schon zuvor beobachtet werden konnte. Es wurden nur wenige HSC – hier markiert durch NO-GC – ausgemacht, die positiv für PDGFR β -Tomato waren.

Es ist festzuhalten, dass durch die Verwendung der PDGFR β -Tomato-Reportermaus ein kleiner Teil der HSC sowie alle VSMC markiert werden konnten. Jedoch konnte das Ziel, alle HSC durch PDGFR β -Tomato zu markieren, mit der Reportermaus nicht erreicht werden.

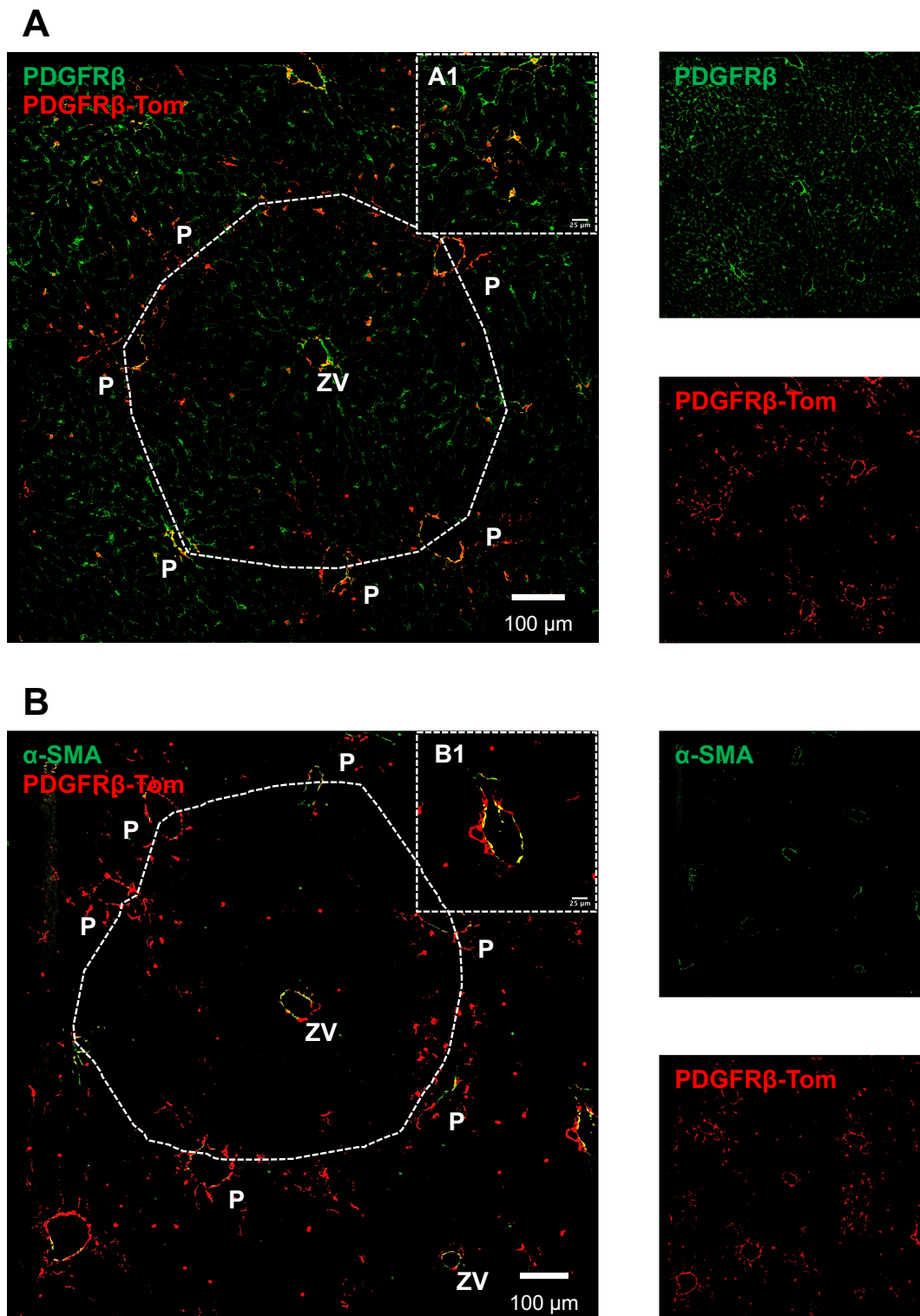


Abbildung 4.18: Verteilung von PDGFR β -Tomato-Zellen in der murinen Leber

Leberschnitte aus PDGFR β -Tomato-Reportermäusen (rot) wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen PDGFR β (A) und α -SMA (B) (beide in Grün) gefärbt. Im Überlagerungsbild A zeigt sich eine Kollokalisierung (gelb) zwischen PDGFR β und PDGFR β -Tomato, wobei nur ein Teil der PDGFR β ⁺-Zellen auch PDGFR β -Tomato⁺ ist. Im Überlagerungsbild A1 ist eine vergrößerte Aufnahme aus dem Überlagerungsbild A zu sehen. Im Überlagerungsbild B1 ist in den VSMC (α -SMA⁺) eine Kollokalisierung (gelb) mit PDGFR β -Tomato zu erkennen. In den Überlagerungsbildern A und B wurden die Umrisse des Leberläppchens eingezeichnet. Ebenfalls wurde die Zentralvene(n) (ZV) und die Portalfelder (P) markiert.

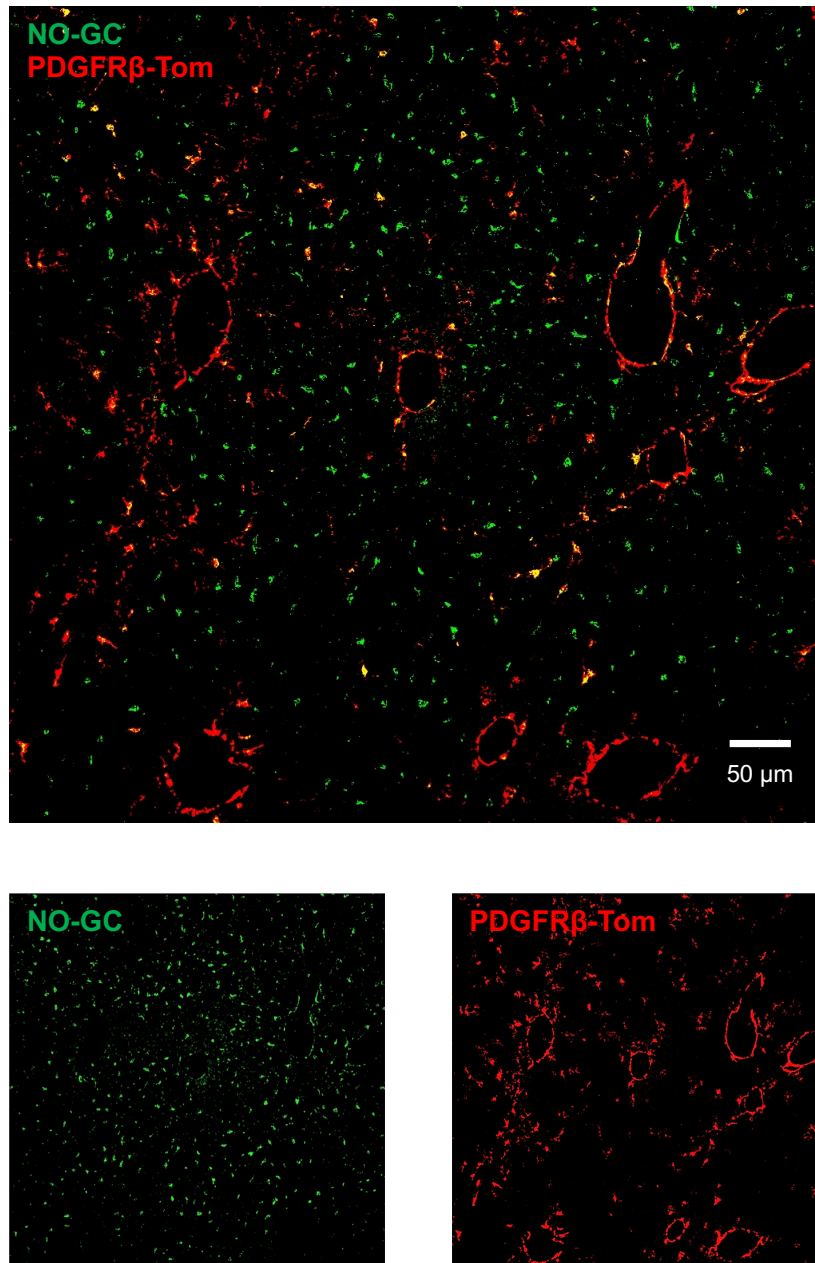


Abbildung 4.19: NO-GC-Expression in PDGFR β -Tomato-Zellen in der murinen Leber

Leberschnitte aus PDGFR β -Tomato-Reportermäusen (rot) wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen NO-GC (grün) gefärbt. Im Überlagerungsbildern kann eine Kolokalisation (gelb) zwischen PDGFR β -Tomato und NO-GC ausgemacht werden.

4.3.1.1 PDGFR β -Tomato-Zellen in der CCl₄-induzierten Leberfibrose

Zwar konnten durch den Einsatz der PDGFR β -Tomato-Reportermaus nur wenige HSC markiert werden, jedoch wurde die Leberfibrose in den Reportertieren induziert, um zu untersuchen, ob nicht evtl. genau diese mit Tomato-markierten Zellen in der Leberfibrose zu Myofibroblasten differenzieren.

Um die Tomato-Expression zu induzieren, wurde 6 Wochen alten PDGFR β -Tomato-Reportermausen 5 Tage lang Tamoxifen i.p. injiziert. Den Tieren wurde 15 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion zum ersten Mal CCl₄ verabreicht, um damit eine Leberfibrose zu induzieren. Nach 4 Wochen wurde die Leber auf die Verteilung der PDGFR β -Tomato⁺-Zellen untersucht.

Es konnte beobachtet werden, dass es durch die CCl₄-induzierte Leberfibrose zu einer verstärkten Proliferation der PDGFR β -Tomato⁺-Zellen kam (Abbildung 4.20). Diese Tomato⁺-Zellen konnten vor allem in den fibrotischen Arealen gefunden werden. Das bedeutet, dass sich die Zellen in der Zone 1 des Leberazinus zeigten – dort wo die CCl₄-induzierte Leberfibrose abläuft. Jedoch machten diese Tomato⁺-Zellen nur einen kleinen Teil der Zellen in den fibrotischen Regionen aus. Bei der Färbung von PDGFR β (grün) zeigte sich zwar eine Kolo-kalisation zwischen PDGFR β und PDGFR β -Tomato, jedoch überstieg die Zahl an PDGFR β ⁺-Zellen die Zahl an PDGFR β -Tomato⁺-Zellen um ein Vielfaches (Abbildung 4.20A). Das gleiche Ergebnis konnte für die Färbung mit Vimentin (grün) beobachtet werden (Abbildung 4.20B).

Leberschnitte aus fibrotischen PDGFR β -Tomato-Reportermausen wurden ebenfalls mit einem spezifischen Antikörper gegen α -SMA (grün) gefärbt (Abbildung 4.20C). Das α -SMA markiert in der Leberfibrose Myofibroblasten und VSMC. Hier zeigte sich nur in den VSMC eine Kolo-kalisation zwischen α -SMA und PDGFR β -Tomato. In den Myofibroblasten dagegen konnte kein Signal für PDGFR β -Tomato beobachtet werden.

Damit ist festzuhalten, dass die HSC auch in der Leberfibrose durch PDGFR β -Tomato nur unzureichend markiert werden.

4.3.1.2 Unterschiede in der Fibrose zwischen WT und PDGFR β -GCKO

Zwar kommt es in PDGFR β -Tomato-Reportermausen nur zu einer geringen Markierung der HSC; jedoch sollte der Einfluss der NO-GC-Deletion unter dem PDGFR β -Promotor auf die Leberfibrose untersucht werden. Dazu wurde PDGFR β -Promotormäusen, bei denen das Exon 10 der NO-GC ‚gefloxt‘ vorlag, 5 Tage lang Tamoxifen i.p. induziert. Nach 50 Tagen wurde mittels CCl₄ über 4 Wochen Leberfibrose in diesen Tieren induziert. Die Mäuse wurden 24 h nach der letzten CCl₄-Injektion geopfert. Die Leberfibrose in PDGFR β -GCKO-Tieren wurde mittels immunhistochemisch Flächenauswertung und qPCR-Analyse von PDGFR β , Col1 α 1 und α -SMA (Abbildung 4.21A-C) quantifiziert und die Ergebnisse wurden mit den Werten von WT-Tieren verglichen.

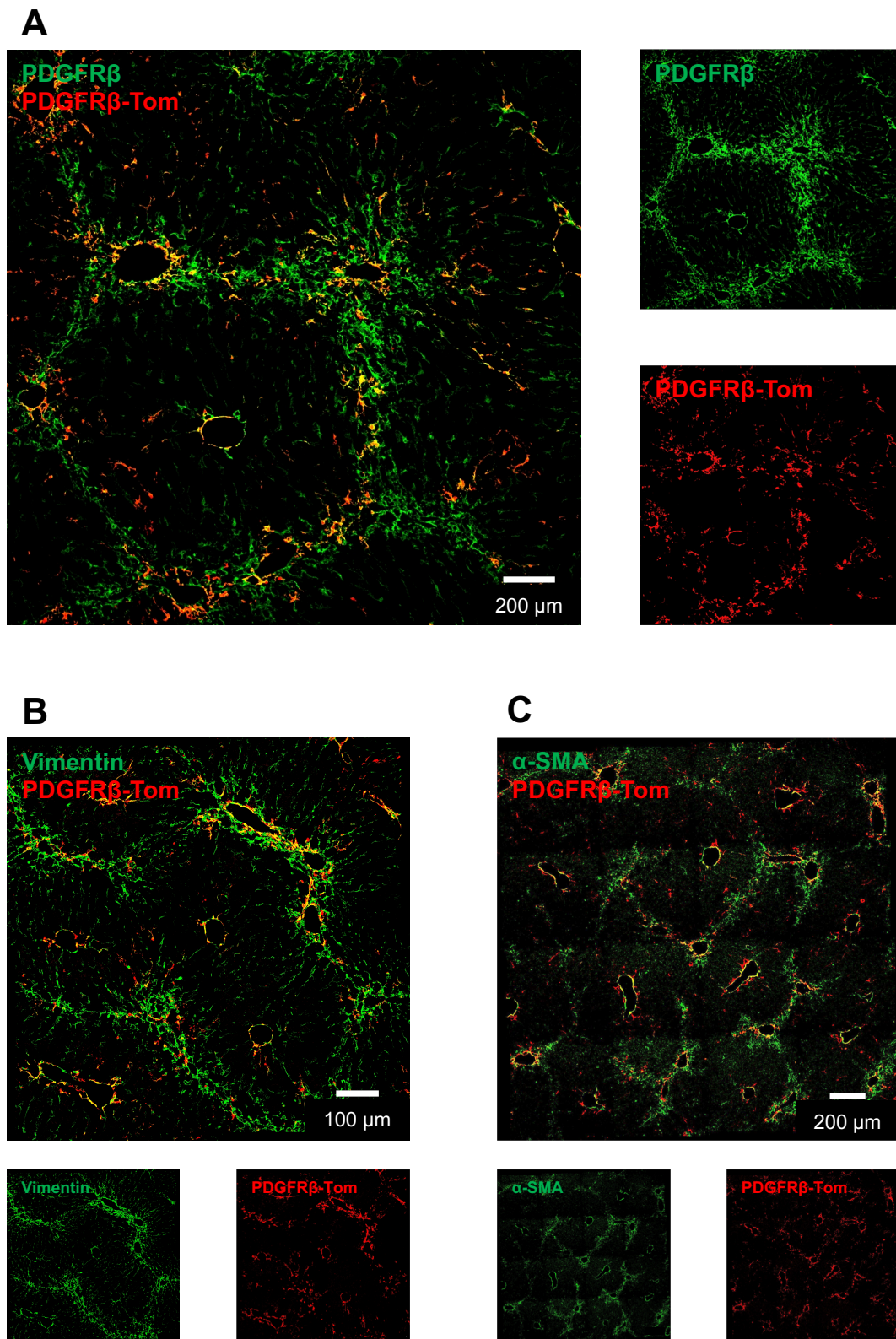


Abbildung 4.20: Verteilung der PDGFR β -Tomato-Zellen in der Leberfibrose

Leberschnitte aus fibrotischen PDGFR β -Tomato-Reporterermäusen wurden mit Antikörpern gegen PDGFR β (A), Vimentin (B) und α -SMA (C) (alle in Grün) gefärbt. In dem Überlagerungsbild A können in den fibrotischen Regionen Tomato-Signale ausgemacht werden, die mit PDGFR β kolokalisiert (gelb) sind. Im Überlagerungsbild B kann eine Kolokalisation (gelb) zwischen Vimentin und PDGFR β -Tomato in den fibrotischen Regionen gesehen werden. In C ist eine Kolokalisation (gelb) zwischen α -SMA und PDGFR β -Tomato zu sehen.

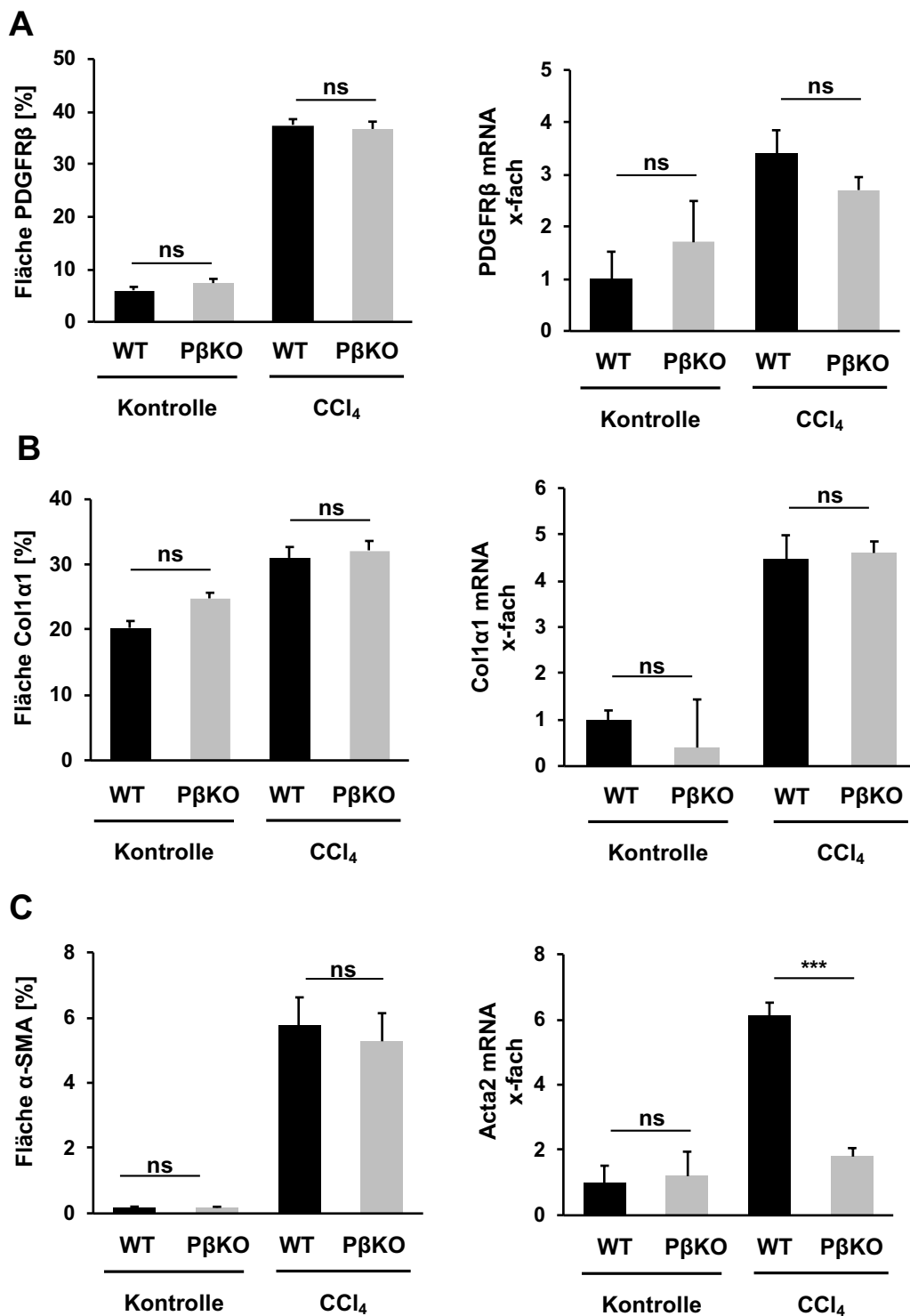


Abbildung 4.21: Ergebnisse der Flächenauswertung und qPCR für WT- und PDGFR β -GCKO-Tiere
 Dargestellt sind die Ergebnisse der Flächenauswertung und der qPCR für gesunde und fibrotische WT- und PDGFR β -GCKO-Tiere. PDGFR β (A); Col1 α 1 (B) und α -SMA bzw. Acta2 (C). Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von n=4-5 pro Genotyp (ns=nicht signifikant; *= p <0,05; **= p <0,01; ***= p <0,001).

Durch die Deletion der NO-GC kam es bei der Flächenauswertung von PDGFR β , Col1 α 1 und α -SMA zu keinen signifikanten Unterschieden, weder in der gesunden Leber noch in der fibrotischen. Zwar stiegen in der Fibrose alle Marker – auch im PDGFR β -GCKO – an, jedoch unterschieden sich die Flächen im PDGFR β -GCKO kaum von den Werten im WT.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der qPCR-Analyse gemacht werden. Auch hier kam es bei PDGFR β und Col1 α 1 weder in der gesunden noch in der fibrotischen Leber zu signifikanten Unterschieden. Nur bei α -SMA ließ sich ein Unterschied zwischen WT und PDGFR β -GCKO feststellen. In der gesunden Leber konnte für α -SMA kein Unterschied zwischen WT und PDGFR β -GCKO ausgemacht werden. Jedoch stieg in der Leberfibrose nur im WT die RNA-Expression an. Dagegen verblieb die RNA-Expression im PDGFR β -GCKO auf dem gleichen Niveau wie in der gesunden Leber.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es durch die Deletion der NO-GC unter dem PDGFR β -Promotor zu keiner signifikanten Veränderung in der Leberfibrose kam.

4.3.1.3 Verteilung der PDGFR β -Tomato-Zellen nach Auflösung der Leberfibrose

Zum Schluss wurde untersucht, was mit den PDGFR β -Tomato⁺-Zellen bei der Auflösung der Leberfibrose passiert. Dazu wurde die Leber aus PDGFR β -Tomato-Reportermausen erst 7 Tage nach der letzten CCl₄-Injektion entnommen und immunhistochemisch untersucht.

Hierbei konnte beobachtet werden, dass es – wie bereits in Abschnitt 4.2.6 beschrieben – wieder zu einer homogenen Verteilung der HSC kam und dass die fibrotischen Läsionen fast vollständig verschwunden waren. Die PDGFR β -Tomato⁺-HSC waren nach der Auflösung der Leberfibrose hauptsächlich in Zone 1 des Leberazinus (kenntlich gemacht durch die Färbung von α -SMA und Vimentin) zu finden (Abbildung 4.22A-B). Nur vereinzelt waren PDGFR β -Tomato⁺-Zellen in den Zonen 2 und 3 des Leberazinus auszumachen.

Das bedeutet, dass es in der Auflösung der Leberfibrose zur einer geringen Abnahme der PDGFR β -Tomato⁺-Zellen kam, die ihre Position am Rand der Leberläppchen nicht veränderten. Auf Grund der gesammelten Ergebnisse für die PDGFR β -Tomato-Reportermaus kann diese nicht für *Lineage Tracing*-Versuche in der Leber eingesetzt werden.

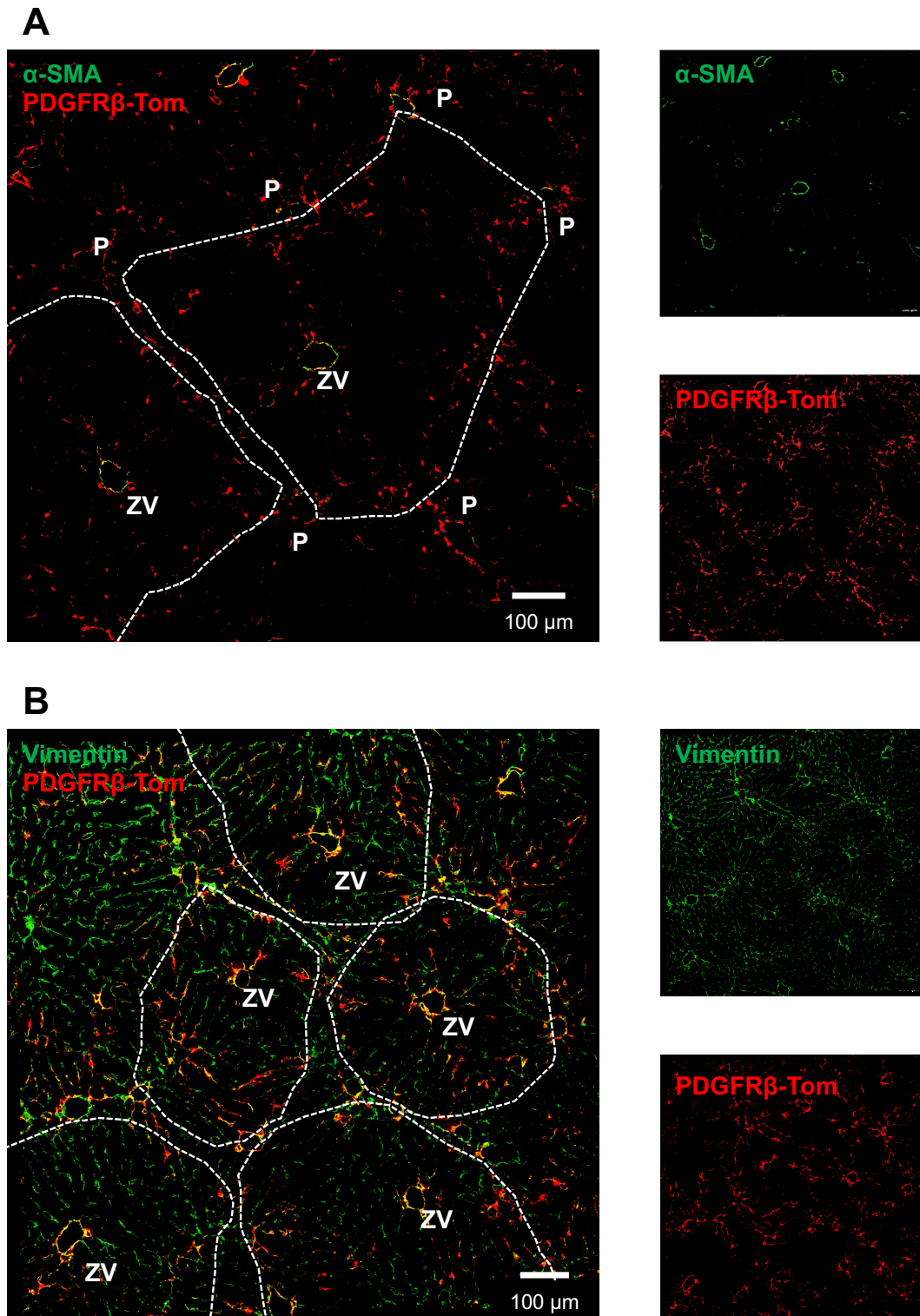


Abbildung 4.22: Verteilung der PDGFR β -Tomato-Zellen nach der Auflösung der Leberfibrose

Leberschnitte aus PDGFR β -Tomato-Reportermäusen nach Auflösung der Leberfibrose wurden mit Antikörpern gegen α -SMA (A) und Vimentin (B) gefärbt (beide in Grün). In den Überlagerungsbildern ist zu erkennen, dass die PDGFR β -Tomato⁺-Zellen sich weiterhin am Rand der Leberläppchen befinden. In beiden Überlagerungsbildern wurde die Struktur der Leberläppchen durch eine weiße Linie kenntlich gemacht. Außerdem wurden die Zentralvenen (ZV) und die Portalfelder (P) markiert.

4.3.2 Verteilung und Identifizierung der SM/MHC-Tomato-Zellen in der Leber

Da mittels der PDGFR β -Tomato-Reportermaus nur ein kleiner Teil der HSC-Zellpopulation in der Leber markiert werden konnte, wurde nach anderen Reportermäusen gesucht. Weil HSC als Perizyten der Leber gelten (Hellerbrand, 2013), wurden verschiedene Cre-Mäuse getestet, bei denen die Cre unter Perizytenmarker-Promotor exprimiert wird (Tabelle 1.1). Dazu zählt die NG2-Tomato-, die *Forkhead-box-D1*-(FoxD1)-Tomato- und die Saures Gliafaserprotein (GFAP)-Grün-fluoreszierendes-Protein-(GFP-)Reportermaus (Daten hier nicht gezeigt). Bei keiner der genannten Mäuse kam es zu einer Markierung der HSC. Deshalb wurde nach anderen Markern gesucht. Da die HSC wie die Perizyten vom Mesoderm- und Mesothel abstammen (Armulik et al., 2011; Asahina et al., 2009; Asahina et al., 2011), besitzen die HSC eine ähnliche Populationsgenetik wie die VSMC. Deshalb wurde die Expression von Tomato unter dem SM/MHC-Promotor – einem bekannten VSMC-Marker – untersucht.

In Leberschnitten aus SM/MHC-Tomato-Reportermäusen konnten Signale für Tomato identifiziert werden, die nur in Zone 1 des Leberazinus lokalisiert werden konnten. Um diese Lokalisation genauer einzugrenzen, wurden Leberschnitte aus SM/MHC-Tomato-Reportermäusen mit Antikörpern gegen α -SMA (grün) gefärbt (Abbildung 4.23A). Durch α -SMA werden die Gefäße in der Leber markiert, wodurch die Leberläppchen in den Schnitten identifiziert werden konnten. Hierdurch konnte festgestellt werden, dass sich die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen ausschließlich in Zone 1 des Leberazinus befanden. Dies konnte durch die Färbung mit Vimentin (grün) bestätigt werden (Abbildung 4.23B). Während in den Zonen 2 und 3 des Leberazinus nur grüne Zellen zu sehen waren, konnten an den Rändern der Läppchen (Zone 1) gelbe Zellen erkannt werden. Dort kam es zu einer Kolokalisation zwischen SM/MHC-Tomato und Vimentin.

Als Nächstes wurde untersucht, ob es sich bei den SM/MHC-Tomato⁺-Zellen um HSC handelte. Dazu wurde eine Färbung an Leberschnitten aus SM/MHC-Tomato-Reportermäusen mit einem Antikörper gegen PDGFR β (grün) durchgeführt (Abbildung 4.24A). Wie zu beobachten war, waren das SM/MHC-Tomato-Signal und das Signal für PDGFR β kolokalisiert. Daraus ließ sich schließen, dass es sich bei den SM/MHC-Tomato⁺-Zellen um HSC handelte. Dies konnte mit einer Färbung von NO-GC (grün) bestätigt werden (Abbildung 4.24B), denn es kam zu einer Kolokalisation zwischen dem NO-GC-Signal und SM/MHC-Tomato.

Daraus ergibt sich, dass HSC mit SM/MHC-Tomato in der murinen Leber markiert werden können. Jedoch, wie schon bei PDGFR β -Tomato, wurden nicht alle HSC markiert, sondern nur ein Teil der Zellen. Diese Zellen wurden, ähnlich wie die PDGFR β -Tomato⁺-Zellen, nur in Zone 1 des Leberazinus gefunden.

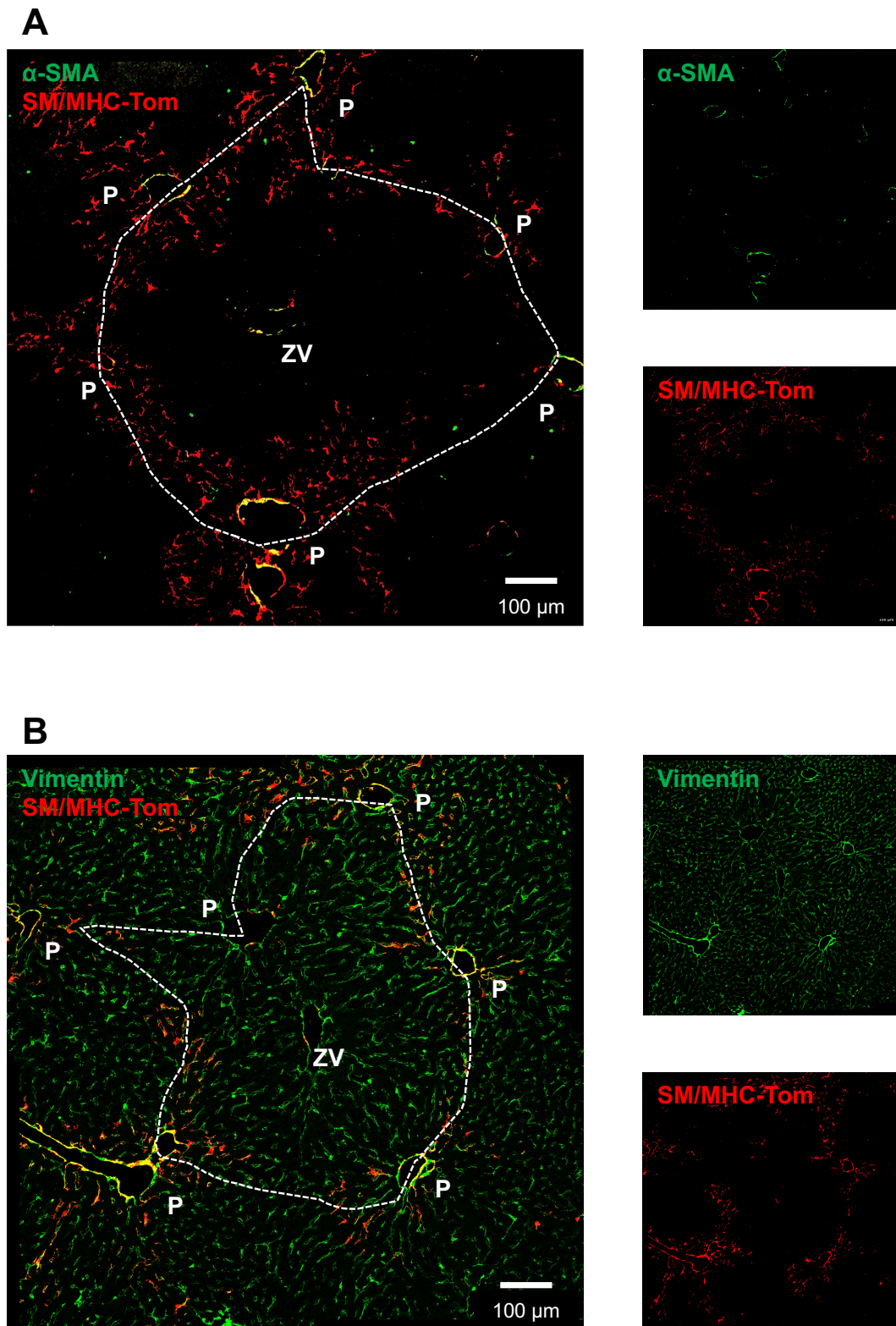


Abbildung 4.23: Verteilung von SM/MHC-Tomato-Zellen in der murinen Leber

Leberschnitte aus SM/MHC-Tomato-Reportermäusen, die mit spezifischen Antikörpern gegen α -SMA (A) und Vimentin (B) gefärbt wurden (beide in Grün). Mittels gepunkteter Linien wurden die Leberläppchen in den Bildausschnitt sichtbar gemacht. Dabei war zu erkennen, dass die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen sich nur in Zone 1 des Leberläppchens befanden. In beiden Überlagerungsbildern wurde die Struktur der Leberläppchen durch eine weiße Linie kenntlich gemacht. Außerdem wurden die Zentralvene (ZV) und die Portalfelder (P) markiert.

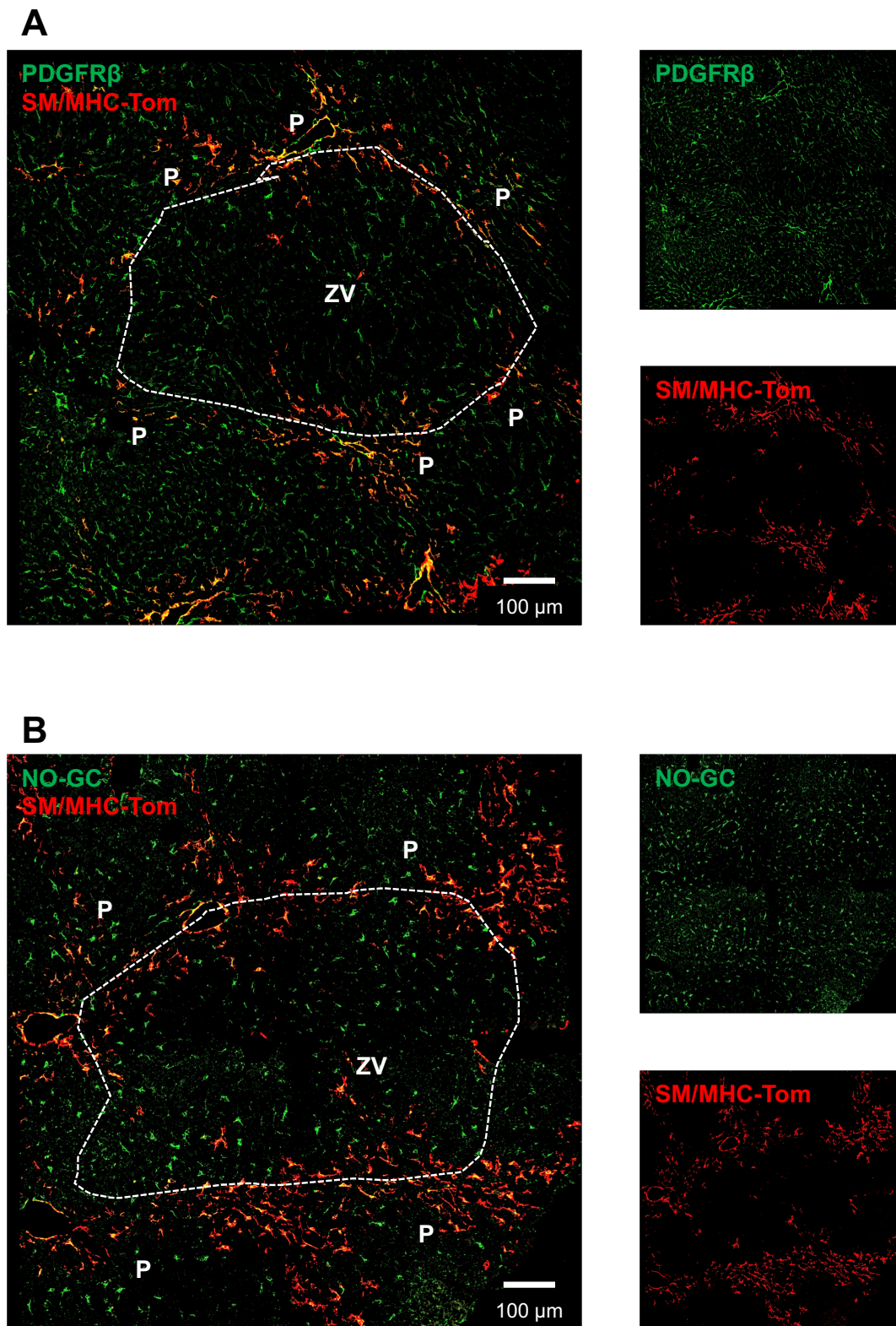


Abbildung 4.24: Die NO-GC-Expression in SM/MHC-Tomato-Zellen in der murinen Leber

Leberschnitte aus SM/MHC-Tomato-Reportermäusen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen PDGFR β (A) und NO-GC (B) gefärbt (beide in Grün). In den Überlagerungsbildern ist eine Kolokalisation (gelb) zwischen SM/MHC-Tomato (rot) und PDGFR β sowie NO-GC zu erkennen. In beiden Überlagerungsbildern wurde die Struktur der Leberläppchen durch eine weiße Linie kenntlich gemacht. Außerdem wurden die Zentralvene (ZV) und die Portalfelder (P) markiert.

4.3.2.1 SM/MHC-Tomato⁺-Zellen in der Leberfibrose

Wie bei PDGFR β -Tomato-Reporter-mäusen konnten auch nur wenige HSC mittels SM/MHC-Tomato markiert werden. Trotzdem sollte die Leberfibrose auch in SM/MHC-Tomato-Reporter-mäusen untersucht werden. Dazu wurde den Tieren 15 Tage nach der ersten Tamoxifen-Gabe CCl₄ injiziert. Nach 4 Wochen wurden die Lebern aus den Mäusen entnommen, fixiert und immunhistochemisch auf die Verteilung des Tomato-Signals untersucht.

Es konnte beobachtet werden, dass sich das Tomato-Signal vervielfacht hatte. Während in der gesunden Leber SM/MHC-Tomato⁺-Zellen nur in der Zone 1 des Leberazinus gefunden werden konnten, wurden in SM/MHC-Tomato⁺-Zellen in der fibrotischen Leber verstärkt in den Zonen 2 und 3 gesehen. Zur genaueren Lokalisation der Zellen wurden Leberschnitte aus SM/MHC-Tomato-Reporter-mäusen mit Antikörpern gegen PDGFR β , Col1 α 1 und Vimentin (alle in Grün) gefärbt (Abbildung 4.25). Durch die drei Marker konnten die fibrotischen Areale sichtbar gemacht werden. Dabei fiel auf, dass die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen zwar noch am Rand der Leberläppchen zu finden waren, dass sie aber nicht in den fibrotischen Bereichen am Rand der Leberläppchen lagen. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen mit dem HSC-Marker PDGFR β kolokalisiert waren. Bei den SM/MHC-Tomato⁺-Zellen handelte es sich somit auch in der Leberfibrose um PDGFR β ⁺-Zellen. Als Nächstes sollte untersucht werden, ob es sich bei den SM/MHC-Tomato⁺-Zellen in der Leberfibrose um Myofibroblasten handelte. Dazu wurden Leberschnitte aus fibrotischen SM/MHC-Tomato-Reporter-mäusen mit einem Antikörper gegen α -SMA (grün) gefärbt (Abbildung 4.26A). Es zeigte sich, dass das SM/MHC-Tomato-Signal und das α -SMA-Signal in den Myofibroblasten nicht kolokalisiert waren. Das bedeutet, dass die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen in der Leberfibrose nicht zu Myofibroblasten differenzierten. Hingegen konnte, wie in der gesunden Leber, eine Kolokalisation zwischen α -SMA und SM/MHC-Tomato in den VSMC gefunden werden. Ebenfalls wurde untersucht, ob die NO-GC in der Leberfibrose in den SM/MHC-Tomato⁺-Zellen exprimiert wurde. Dazu wurden Leberschnitte aus fibrotischen SM/MHC-Tomato-Reporter-mäusen mit einem spezifischen Antikörper gegen die α 1-UE der NO-GC (grün) gefärbt (Abbildung 4.26B). Es zeigte sich, dass die NO-GC auch in der Leberfibrose in den SM/MHC-Tomato⁺-Zellen exprimiert wurde. Des Weiteren konnte mit der NO-GC-Färbung beobachtet werden, dass es zu verschiedenen Subtypen von Zellen kam, die die NO-GC exprimierten: zum einen die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen in den Zonen 2 und 3 des Leberazinus, zum anderen die SM/MHC-Tomato⁻-Zellen, die sich in der Zone 1 des Leberazinus befanden und dort in den fibrotischen Regionen lagen.

Durch die Indikation der Leberfibrose in SM/MHC-Tomato-Reporter-mäusen konnten zwei verschiedene Typen von HSC beobachtet werden. Die einen sind SM/MHC-Tomato⁻ und wandern in der Leberfibrose in die fibrotische Region, wo sie proliferieren und zu Myofibroblasten werden. Die anderen sind SM/MHC-Tomato⁻ und NO-GC⁺, wandern in die Zonen 2 und 3 des Leberazinus und sind α -SMA⁻ und somit nicht direkt als Myofibroblasten zu bezeichnen.

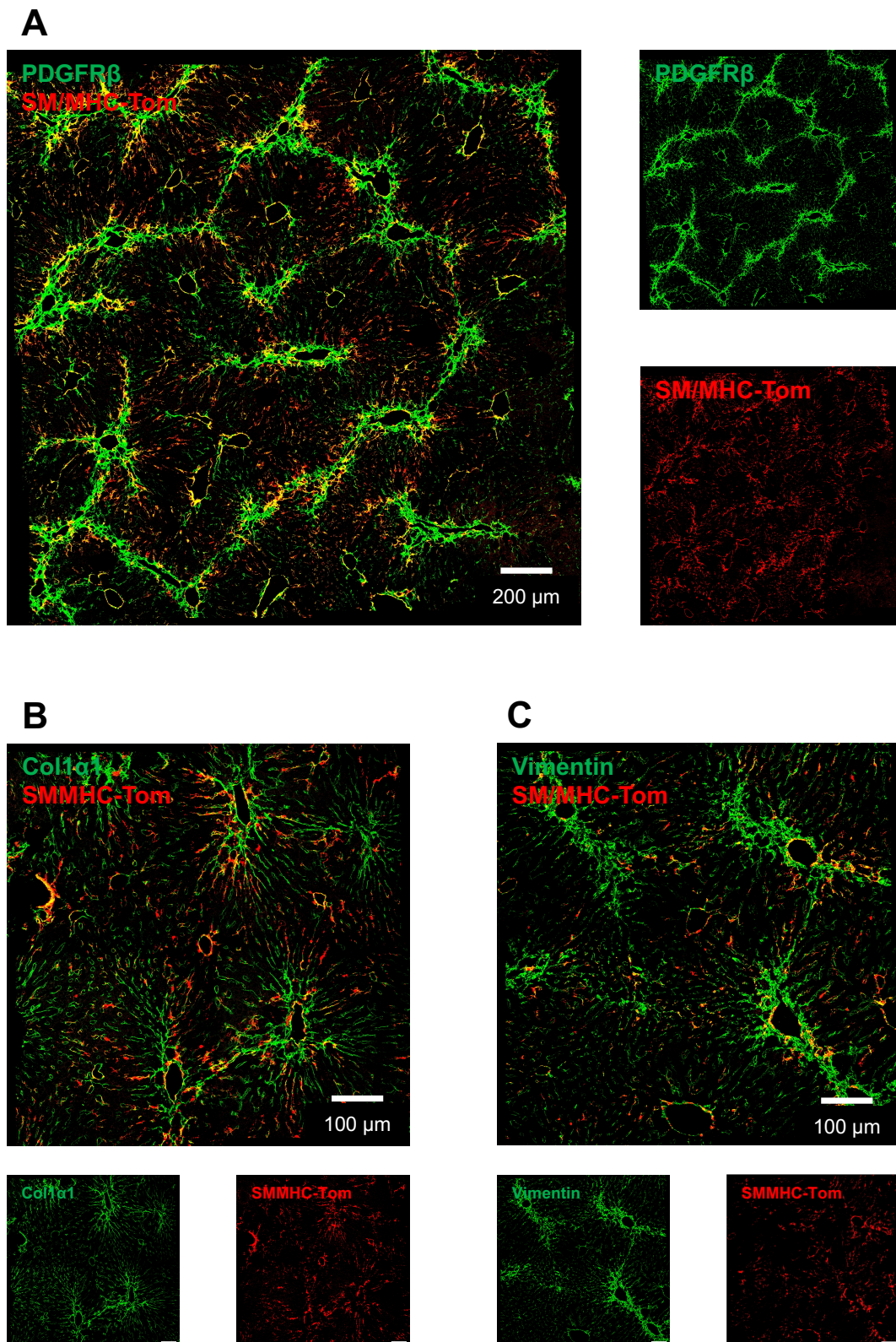


Abbildung 4.25: Verteilung der SM/MHC-Tomato-Zellen in der Leberfibrose

Leberschnitte aus fibrotischen SM/MHC-Tomato-Reportermäusen wurden mit Antikörpern gegen PDGFR β (A), Col1 α 1 (B) und Vimentin (C) gefärbt (alle in Grün). In den Überlagerungsbildern ist zu erkennen, dass sich die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen (rot) in der Zone 2 und 3 des Leberazinus befinden. In den fibrotischen Regionen können keine SM/MHC-Tomato⁺-Zellen gefunden werden.

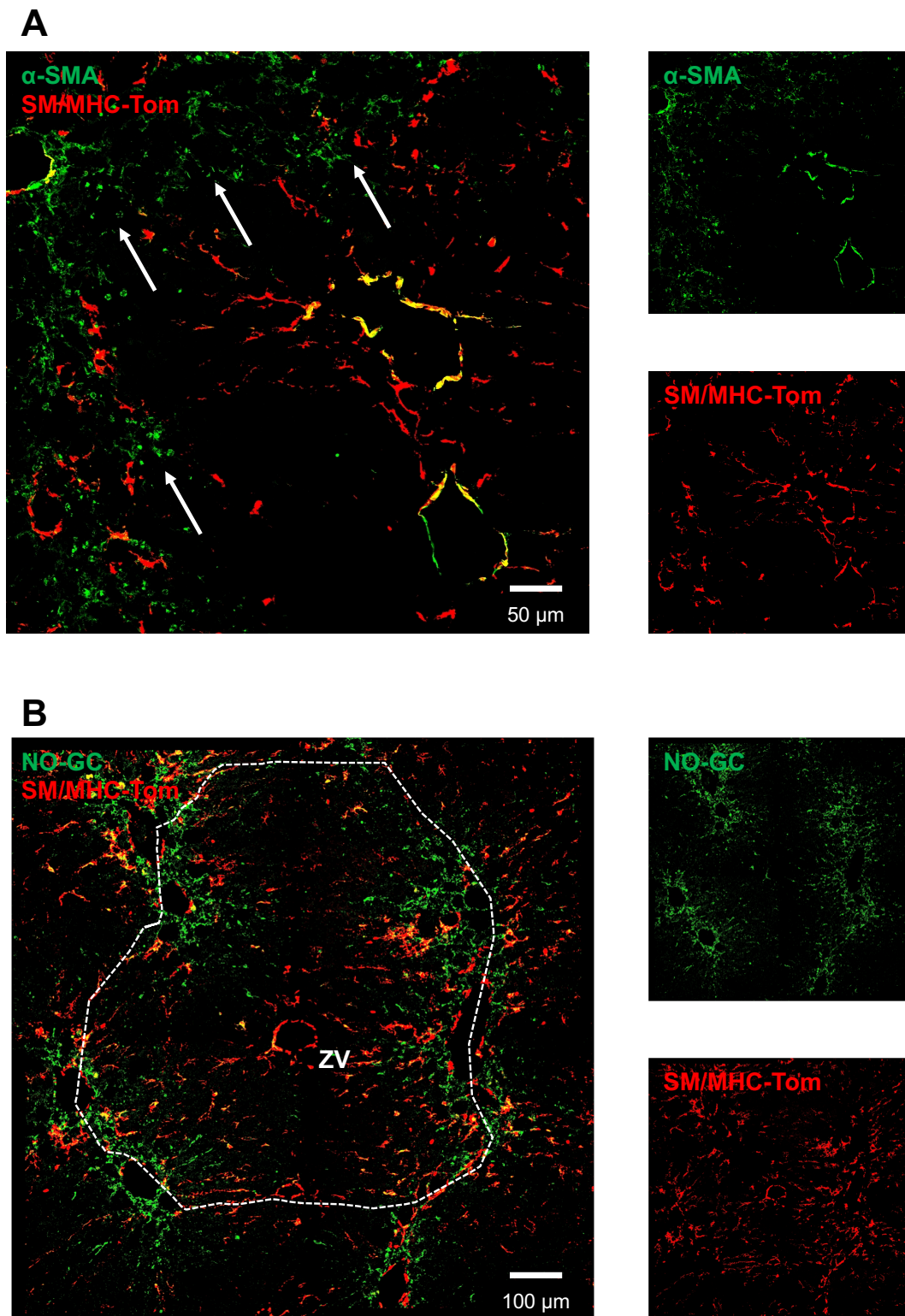


Abbildung 4.26: Verteilung der SM/MHC-Tomato-Zellen in der Leberfibrose

Leberschnitte aus fibrotischen SM/MHC-Tomato-Reporterermäusen wurden mit Antikörpern gegen α -SMA (A) und die α 1-UE der NO-GC (B) gefärbt (beide in Grün). Im Überlagerungsbildern A ist zu erkennen, dass es zu keiner Kolokalisation (gelb) zwischen SM/MHC-Tomato (rot) und α -SMA in den Myofibroblasten (weiße Pfeile) kommt. Das bedeutet, dass SM/MHC-Tomato⁺-Zellen nicht zu Myofibroblasten differenzieren. In den VSMC kommt es dagegen zu einer Kolokalisation. Im Überlagerungsbild B ist zu erkennen wie die NO-GC⁺-Zellen von den SM/MHC-Tomato⁺-Zellen eingerahmt werden. Durch die weiße Linie wurde das Leberläppchen gekennzeichnet. Ebenfalls wurden die Zentralvenen (ZV) markiert.

4.3.2.2 NO-GC Expression in der Leber von SM/MHC-GCKO-Mäusen

Zur Untersuchung, ob es durch die Deletion der NO-GC unter dem SM/MHC-Promotor zu einer phänotypischen Veränderung der gesunden bzw. fibrotischen Leber kommt, wurden Leberschnitte aus gesunden und fibrotischen SM/MHC-Tomato-GCKO-Lebern mit einem spezifischen Antikörper gegen die α 1-UE der NO-GC (grün) gefärbt (Abbildung 4.27).

Es zeigte sich, dass es durch die Deletion unter dem SM/MHC-Promotor in den mit Tomatomarkierten-Zellen zu einer fast vollständigen Deletion der NO-GC kam (Abbildung 4.27A). Nur in wenigen Zellen war noch eine Kolo-kalisation erkennbar (markiert durch weiße Pfeile). Im SM/MHC-Tomato-GCKO-Tier zeigte sich die gleiche Verteilung der SM/MHC-Tomato⁺-Zellen wie in SM/MHC-Tomato-WT-Mäusen. Diese befanden sich ausschließlich in Zone 1 des Leberazinus. Kam es zu einer CCl₄-induzierten Leberfibrose in den SM/MHC-Tomato-GCKO-Tieren, so konnte in den SM/MHC-Tomato⁺-Zellen keine Expression der NO-GC beobachtet werden (Abbildung 4.27B). Des Weiteren wurde deutlich, dass sich die NO-GC⁺-Zellen nur in der Zone 1 des Leberazinus befanden, während die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen nun in den Zonen 2 und 3 des Leberazinus zu finden waren. Dies war analog zu den Ergebnissen im fibrotischen WT.

Durch die Deletion der NO-GC unter dem SM/MHC-Promotor kam es zu einem fast vollständigen Ausschnitt in den SM/MHC-Tomato⁺-Zellen. Die Verteilung dieser Zellen entsprach der Verteilung im WT. In der Leberfibrose konnten NO-GC⁺-Zellen nur in der Zone 1 des Leberazinus gefunden werden, während die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen nur in den Zonen 2 und 3 zu finden waren und keine NO-GC exprimierten.

4.3.2.3 Unterschiede in der Fibrose zwischen WT und SM/MHC-GCKO

Zur Untersuchung, ob die Tamoxifen-induzierte Deletion unter dem SM/MHC-Promotor einen Einfluss auf die Leberfibrose hat, wurde eine Leberfibrose in SM/MHC-GCKO Mäusen mittels CCl₄ induziert. Zur Quantifizierung der Leberfibrose in diesen Tieren wurden immunhistochemische Flächenauswertungen sowie qPCR-Analysen der drei Fibrosemarker PDGFR β , Col1 α 1 und α -SMA vorgenommen (Abbildung 4.28A-C).

Bei der Flächenauswertung von PDGFR β ließ sich feststellen, dass kein Unterschied zwischen gesunden WT- und SM/MHC-GCKO-Lebern bestand. Zwar stieg die Belegung der Fläche in der Leberfibrose im SM/MHC-GCKO auf 35% an: diese unterschied sich aber nicht von der Fläche, die im WT vorlag. Dagegen konnte bei der Flächenauswertung der Kollagenfärbung ein signifikanter Unterschied zwischen WT und SM/MHC-GCKO in der fibrotischen Leber ausgemacht werden (in der gesunden Leber nicht). Im SM/MHC-GCKO lag die Col1 α 1-Flächenbelegung mit 35% leicht über der im WT (30%). Auch bei der qPCR-Analyse konnte bei Col1 α 1 ein signifikant erhöhter Wert im fibrotischen SM/MHC-GCKO gemessen werden. Analog zur Flächenauswertung von PDGFR β konnte bei der Flächenauswertung von α -SMA weder in der gesunden noch in der fibrotischen Leber ein Unterschied zwischen dem WT und dem SM/MHC-GCKO ermittelt werden.

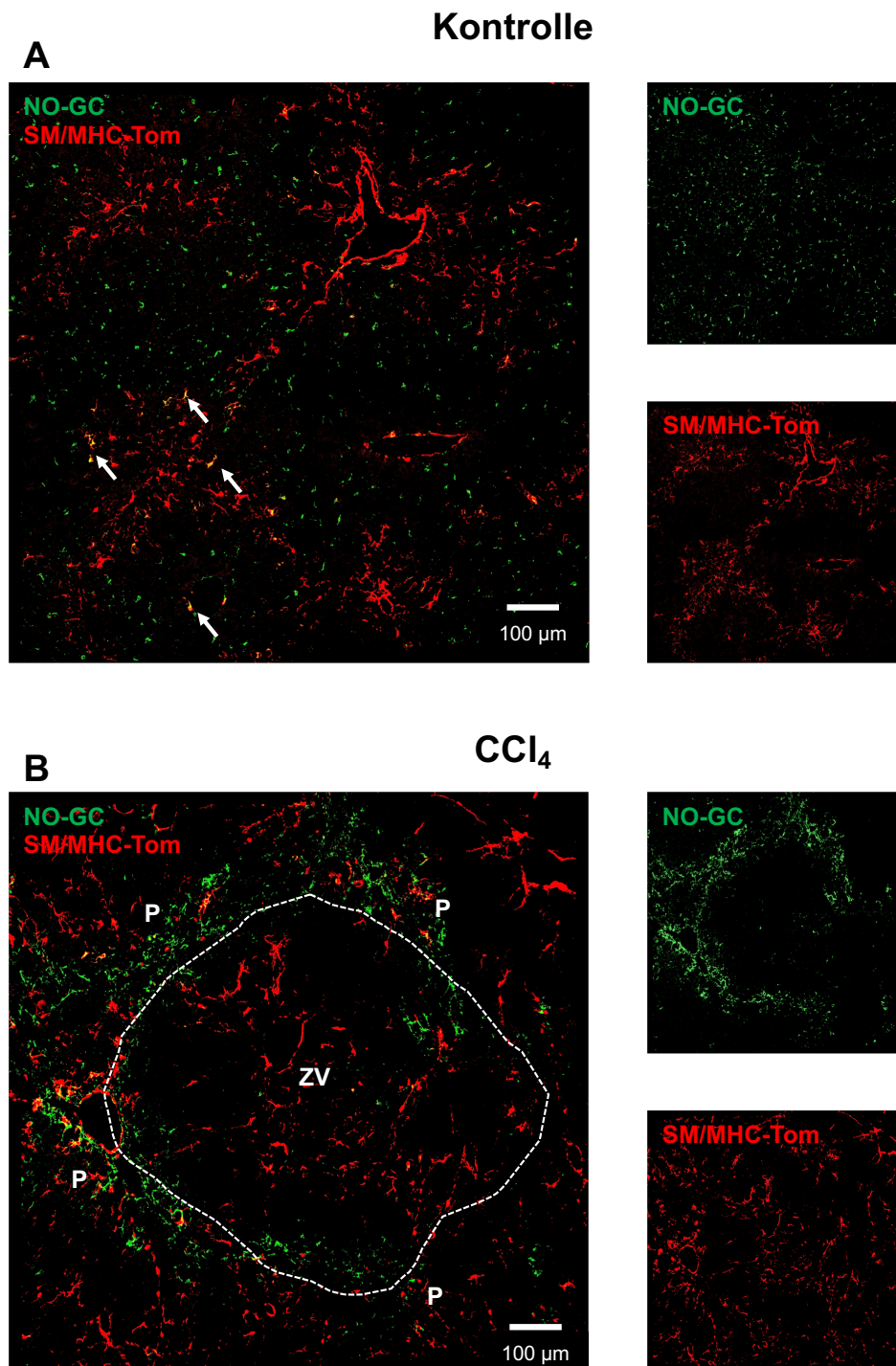


Abbildung 4.27: Die NO-GC-Expression in der gesunden und fibrotischen SM/MHC-GCKO-Leber
 Leberschnitte aus gesunden (A) und fibrotischen (B) SM/MHC-Tomato-GCKO-Tieren wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen die α 1-UE der NO-GC (grün) gefärbt. Im Überlagerungsbild A ist eine Ko-lokaliaation (gelb) nur in wenigen Zellen zu erkennen (weiße Pfeile). Im Überlagerungsbild B kann durch die NO-GC die fibrotischen Regionen ausgemacht werden. In den NO-GC⁺-Zellen lässt sich kein SM/MHC-Tomato Signal finden. Zusätzlich wurde mittels weißer Linie das Leberläppchen eingezeichnet und die Zentralvene (ZV) sowie die Portalfelder (P) kenntlich gemacht.

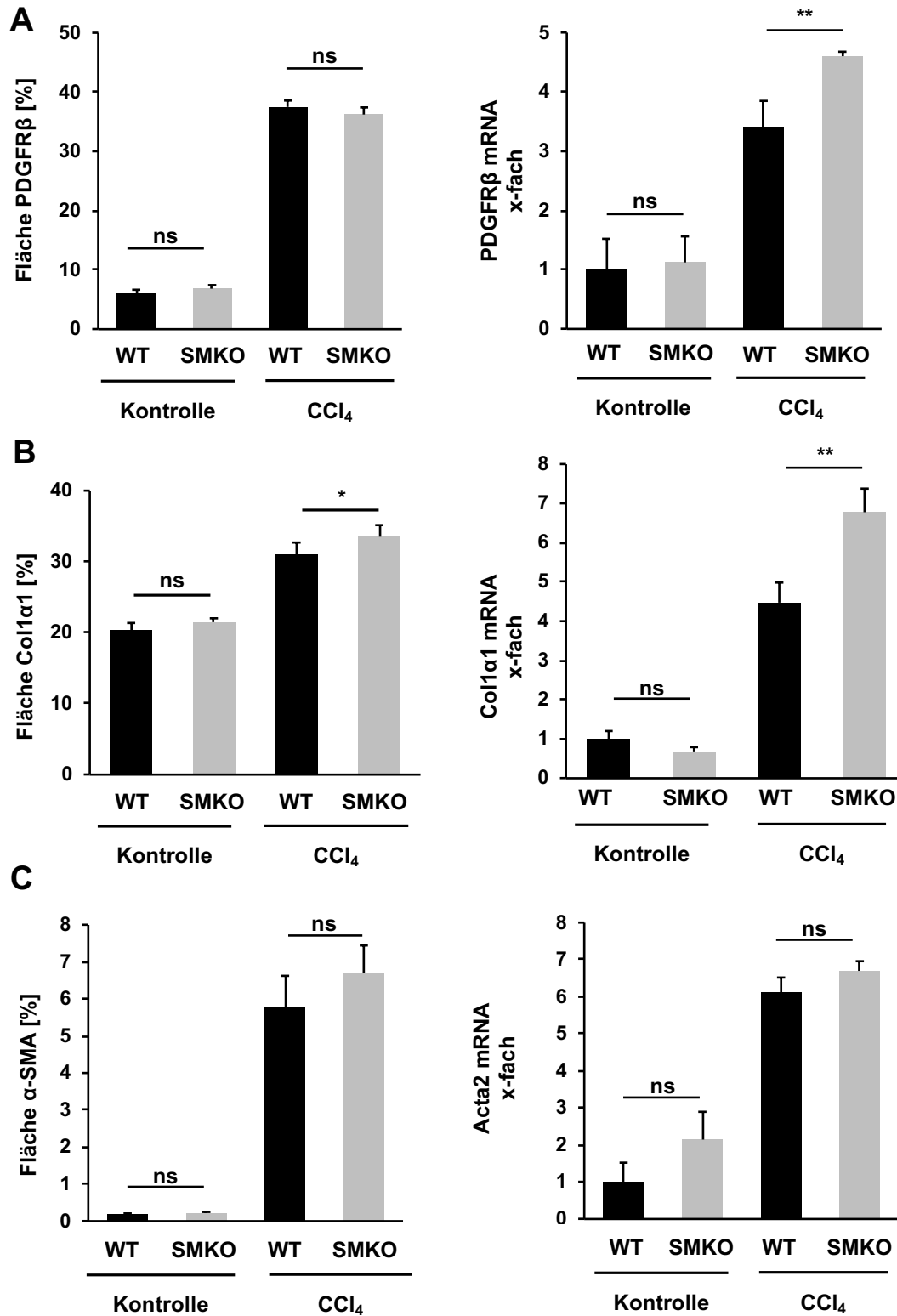


Abbildung 4.28: Ergebnisse der Flächenauswertung und qPCR für WT- und SM/MHC-GCKO-Tiere
 Dargestellt sind die Ergebnisse der Flächenauswertung und der qPCR für gesunde und fibrotische WT- und SM/MHC-GCKO-Tiere (SMKO). PDGFRβ (A); Col1α1 (B) und α-SMA bzw. Acta2 (C). Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=4-5 pro Genotyp (ns=nicht signifikant; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Es ist festzuhalten, dass es durch die Deletion der NO-GC nur bei Col1 α 1 bei beiden Quantifizierungs-Methoden zu einem signifikant höheren Wert im SM/MHC-GCKO im Vergleich zum WT kam. Bei PDGFR β kam es nur zu einer signifikant erhöhten RNA-Expression, während bei α -SMA weder die Flächenbelegung noch die RNA-Expression verändert waren. Die erhöhte Kollagen-Expression lässt darauf schließen, dass es durch die Deletion der NO-GC unter dem SM/MHC-Promotor es zu einer stärkeren Fibrose kommt.

4.3.2.4 Verteilung der SM/MHC-Tomato-Zellen nach Auflösung der Leberfibrose

Zum Abschluss sollte geklärt werden, wie sich die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen bei der Auflösung der Leberfibrose verhalten. Dazu wurde die Leber aus den SM/MHC-Tomato-Reporterermäusen 7 Tage nach der letzten CCl₄-Gabe isoliert, fixiert und immunhistochemisch untersucht.

Zur genaueren Lokalisierung der SM/MHC-Tomato⁺-Zellen in der Leber nach Auflösung der Leberfibrose wurden die Leberschnitte aus den SM/MHC-Tomato-Reporterermäusen mit Antikörpern gegen Vimentin und PDGFR β (beide in Grün) gefärbt (Abbildung 4.29A-B). Es konnte gesehen werden, dass die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen auch weiterhin PDGFR β exprimierten. Durch die Färbung von Vimentin und PDGFR β konnte zusätzlich bemerkt werden, dass die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen nun homogen über das gesamte Leberläppchen verteilt waren.

Ebenfalls wurde die Verteilung der NO-GC⁺-Zellen nach Auflösung der Leberfibrose in SM/MHC-Tomato-WT- und -GCKO-Tieren untersucht. Dazu wurden Leberschnitte angefertigt und mit einem spezifischen Antikörpern gegen die α 1-UE der NO-GC (grün) gefärbt (Abbildung 4.30). Es zeigte sich, dass nach der Auflösung der Fibrose fast alle NO-GC⁺-Zellen auch Tomato exprimierten. Nur wenige NO-GC⁺-Zellen waren Tomato⁻ (Abbildung 4.30A). Diese fanden sich vornehmlich in den ehemals fibrotischen Regionen. Nach Auflösung der Fibrose in SM/MHC-GCKO konnten nur wenige NO-GC⁺-Zellen gefunden werden (Abbildung 4.30B). Diese befanden sich alle in der ehemaligen fibrotischen Region am Rande des Leberläppchens. Im Leberparenchym hingegen konnten nur SM/MHC-Tomato⁺-Zellen gefunden werden, die – durch den Ausschnitt unter dem SM/MHC-Promotor – für die NO-GC⁻ waren.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sich die SM/MHC-Tomato⁺-HSC in der Auflösung der Leberfibrose homogen über das Leberläppchen verteilt haben. Die Zellen in den fibrotischen Regionen dagegen waren nach Auflösung der Fibrose nicht mehr im Gewebe zu finden.

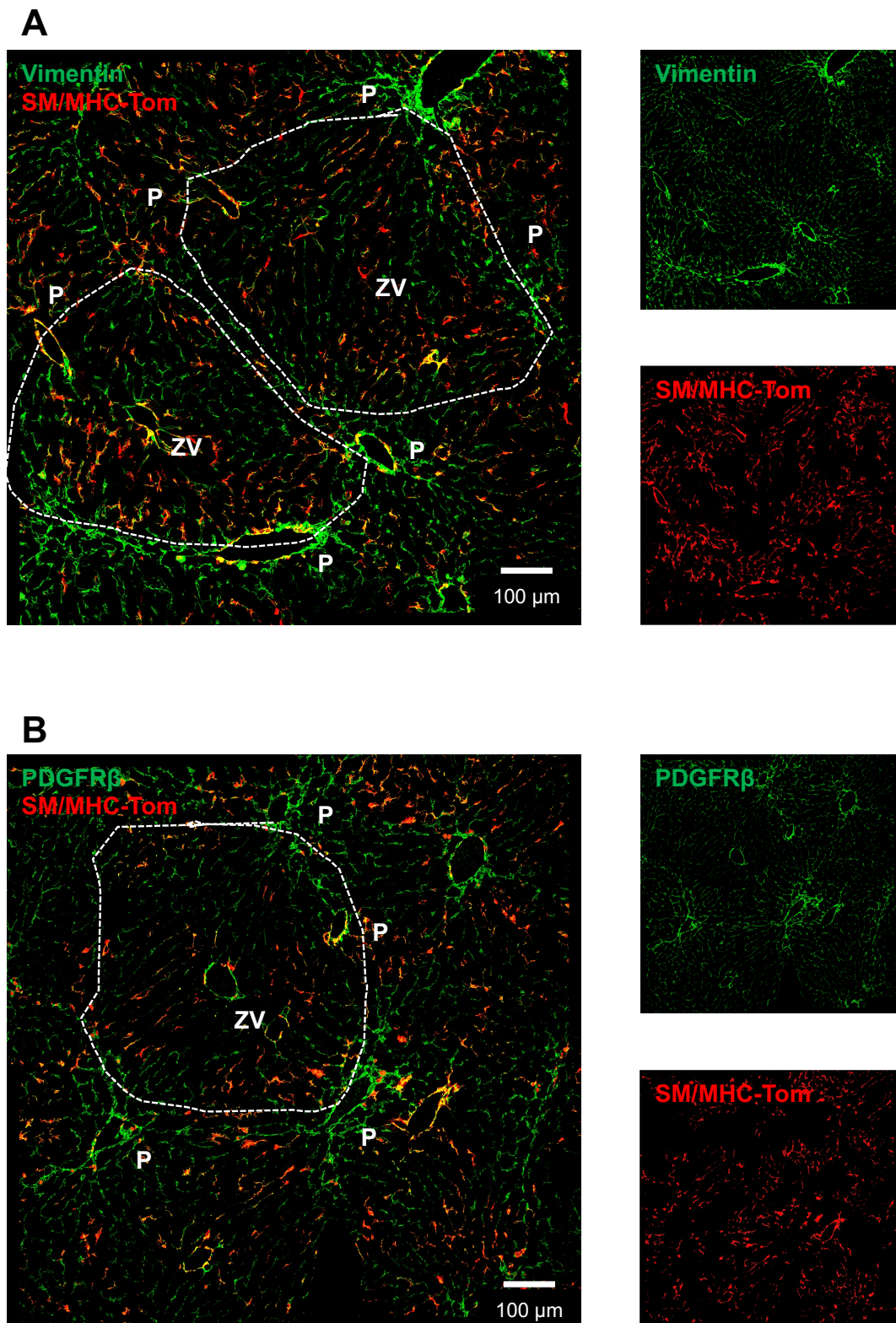


Abbildung 4.29: Verteilung der SM/MHC-Tomato-Zellen nach der Auflösung der Leberfibrose
 Leberschnitte aus SM/MHC-Tomato-Reporterermäusen nach Auflösung der Leberfibrose wurden mit Anti-
 körpern gegen Vimentin (A) und PDGFR β (B) gefärbt (beide in Grün). In beiden Überlagerungsbildern
 ist erkennbar, dass sich die SM/MHC-Tomato⁺-Zellen homogen über das Leberläppchen (weiße Linie)
 verteilt haben. Zudem wurden die Zentralvene (ZV) und die Portalfelder (P) kenntlich gemacht.

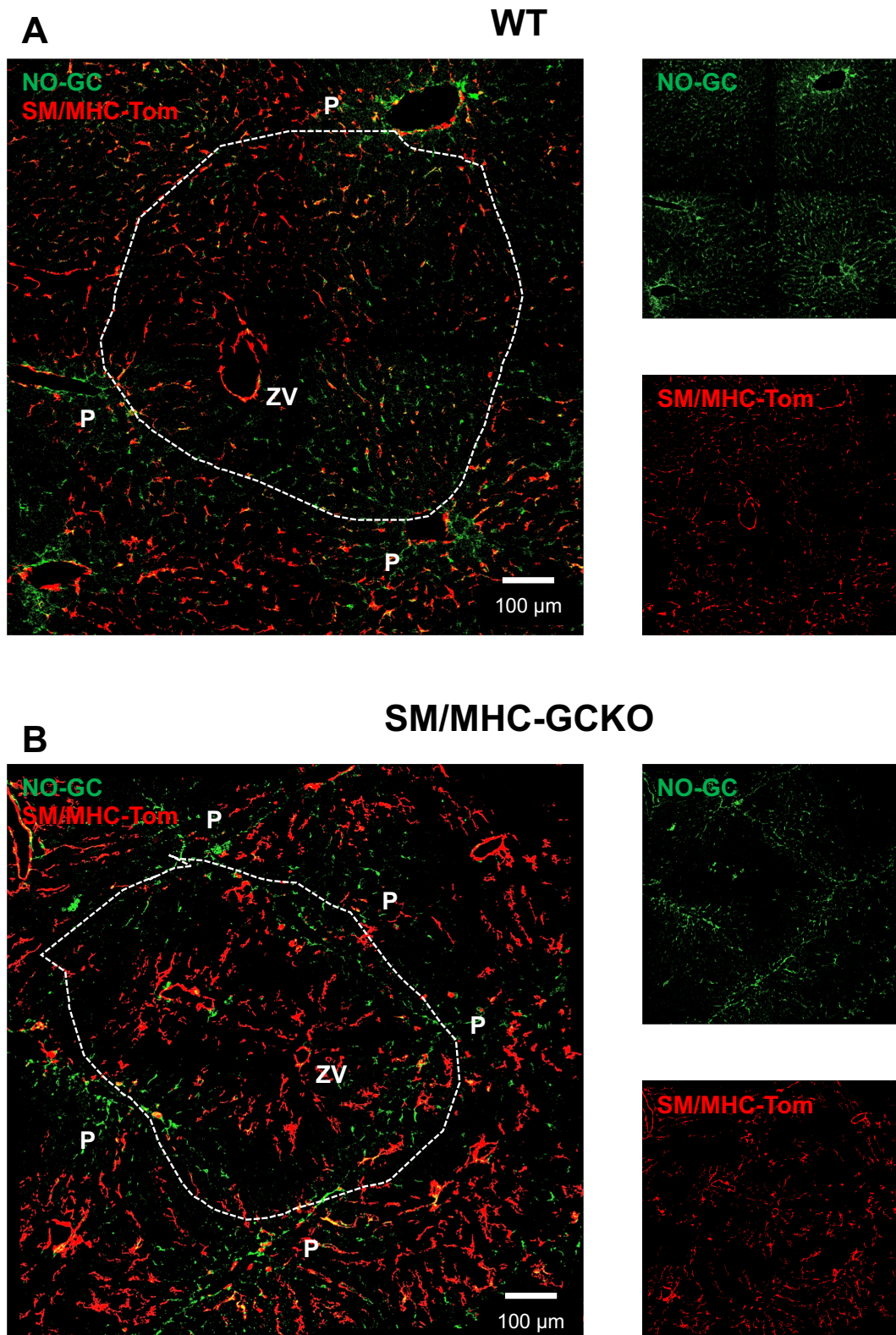


Abbildung 4.30: Die NO-GC-Expression in SM/MHC-Tomato-WT- und -GCKO-Tieren nach Auflösung der Leberfibrose

Leberschnitte aus SM/MHC-Tomato-WT- (A) und GCKO-Tieren (B) nach Auflösung der Leberfibrose wurden mit einem spezifischen Antikörpern gegen die $\alpha 1$ -UE der NO-GC (grün) gefärbt. Im Überlagerungsbild A können nur wenige Zellen ausgemacht werden, die nicht NO-GC- und SM/MHC-Tomato⁺ sind. In Überlagerungsbild B können nur noch in den ehemaligen fibrotischen Bereichen NO-GC⁺ und SM/MHC-Tomato⁻-Zellen gesehen werden. In beiden Überlagerungsbildern wurden die Leberläppchen mittels weißer Linie eingezeichnet. Zudem wurden die Zentralvene (ZV) und die Portalfelder (P) markiert.

4.3.2.5 Einfluss der NO-GC-Deletion in SM/MHC-GCKO auf die Leberfibrose

Es wurde untersucht, auf welche Signalwege die NO-GC einen Einfluss in der Leberfibrose hat. Ein Weg von Interesse ist der TGF- β 1-Signalweg, da dieser eine zentrale Rolle bei der Fibrose einnimmt (Eddy, 2005). Durch TGF- β 1 – über SMAD2/3 vermittelt – wird z. B. die Col1 α 1-Expression in der Fibrose stimuliert (Rachfal und Brigstock, 2003). Als Gegenspieler von TGF- β 1 in der Leber gilt PPAR γ (Wagner et al., 2011). In der gesunden Leber blockiert PPAR γ den TGF- β 1-Signalweg, sodass kein Col1 α 1 gebildet wird. Kommt es jedoch zur Fibrose, wird die Expression von PPAR γ herunterreguliert, wodurch der TGF- β 1-Signalweg nicht mehr inhibiert ist und es zur Expression von Col1 α 1 kommt.

Bei der Betrachtung der RNA-Expression von TGF- β 1 mittels qPCR (Abbildung 4.31A) konnte gesehen werden, dass es im Vergleich zum WT im SM/MHC-GCKO bereits in der gesunden Leber zu einer signifikant höheren Expression kam. Im SM/MHC-GCKO überstieg die RNA-Expression die Expression im WT um das 3-Fache. Auch in der Leberfibrose überstieg die RNA-Expression von TGF- β 1 im SM/MHC-GCKO die Expression im WT. Während die RNA-Expression im fibrotischen WT 8-fach höher war als im gesunden WT, war die Expression von TGF- β 1 im SM/MHC-GCKO um das 10-Fache höher. Die Expression von PPAR γ – dem Gegenspieler von TGF- β 1 – wurde in gesunder und fibrotischer Leber aus WT und SM/MHC-GCKO untersucht (Abbildung 4.31B). Dazu wurde ein Western-Blot angefertigt, in dem PPAR γ mithilfe eines Antikörpers markiert wurde. In der Spur für den gesunden WT konnte bei 53 kDa eine Bande für PPAR γ entdeckt werden, in der Spur für den gesunden SM/MHC-GCKO war die Bande nur sehr schwach. Bei der Untersuchung der fibrotischen Proteinhomogenate aus den WT- und den SM/MHC-GCKO-Mäusen, war bei beiden auf der Höhe von 53 kDa nur sehr schwache Banden zu sehen.

Anhand dieser Beobachtungen lässt sich schließen, dass es durch die Deletion der NO-GC unter dem SM/MHC-Promotor zu einer verringerten PPAR γ -Expression in der Leber von SM/MHC-GCKO-Tieren kam, was in einer erhöhten Expression von TGF- β 1 resultierte.

Dabei stellt sich die Frage, wie die erhöhte Expression von TGF- β 1 in der Leberfibrose bei SM/MHC-GCKO zustande kommt. Bekannt ist, dass Makrophagen in der Leber TGF- β 1 exprimieren und sekretieren (Cheng et al., 2009). Um den Sachverhalt der erhöhte TGF- β 1 RNA-Expression zu ermitteln, wurde die Anzahl der Makrophagen in gesunden und fibrotischen WT und SM/MHC-GCKO immunhistochemisch untersucht und mittels Flächenauswertung quantifiziert.

Hierzu wurden Leberschnitte aus fibrotischen WT- und SM/MHC-GCKO-Mäusen mit Antikörper gegen F4/80 (grün) und PDGFR β (rot) gefärbt (Abbildung 4.32A-B). Zunächst ist festzuhalten, dass es zu keiner Kolokalisation zwischen F4/80 und PDGFR β kam. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass es im gesunden SM/MHC-GCKO zu deutlich mehr Signalen für F4/80 kam als im WT, d. h., in der gesunden Leber lagen signifikant mehr Makrophagen vor (Abbildung 4.32C). Während im WT ein Wert von 3% ermittelt werden konnte, wurde im

SM/MHC-GCKO ein Wert von 4,5% bestimmt. Durch die Leberfibrose kam es sowohl im WT als auch im SM/MHC-GCKO zu einer signifikanten Erhöhung der F4/80-Signale. Dabei war der Wert im SM/MHC-GCKO mit 30% signifikant höher als beim WT, bei dem die Flächenbelegung bei 12% lag.

Durch den Ausschnitt der NO-GC unter dem SM/MHC-Promotor kam es zu einer erhöhten Infiltration an Makrophagen. Diese sind vor allem in der Leber die Quelle von TGF- β 1. Das bedeutet, dass das vermehrte Auftreten der Makrophagen wahrscheinlich die erhöhten TGF- β 1-Expression verantwortet.

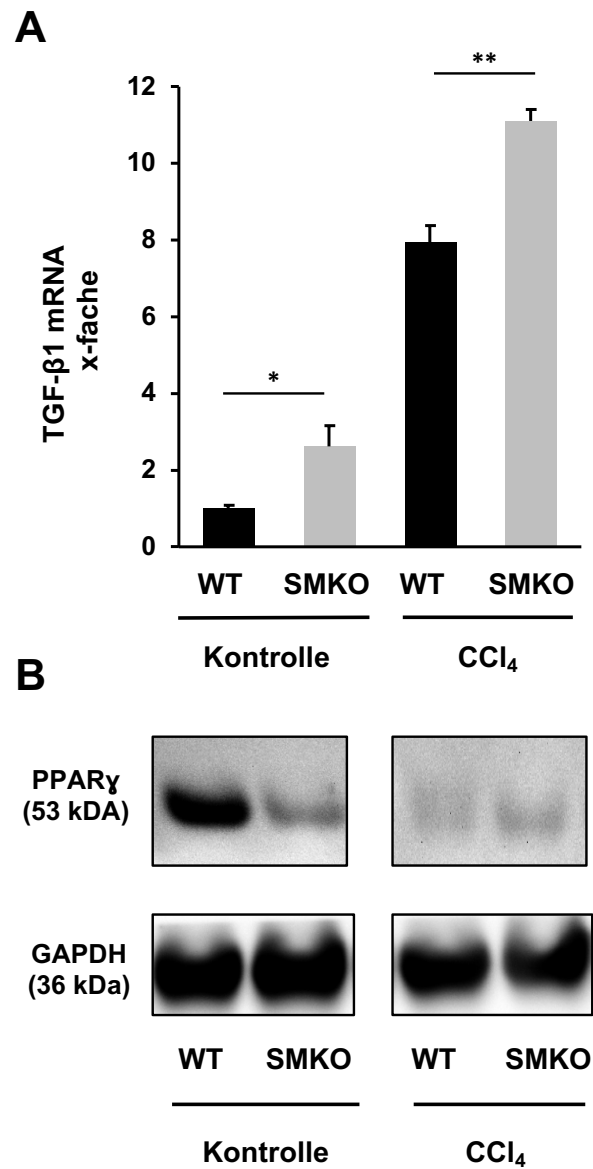


Abbildung 4.31: Untersuchung des Einflusses der Deletion der NO-GC in SM/MHC-GCKO-Tieren qPCR für TGF- β 1 in gesunden und fibrotischen WT- und SM/MHC-GCKO-(SMKO-)Tieren (A) sowie ein Western-Blot für PPAR γ . Zu sehen ist ein repräsentativer Western-Blot (B). Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von n=4–5 pro Genotyp (ns=nicht signifikant; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001).

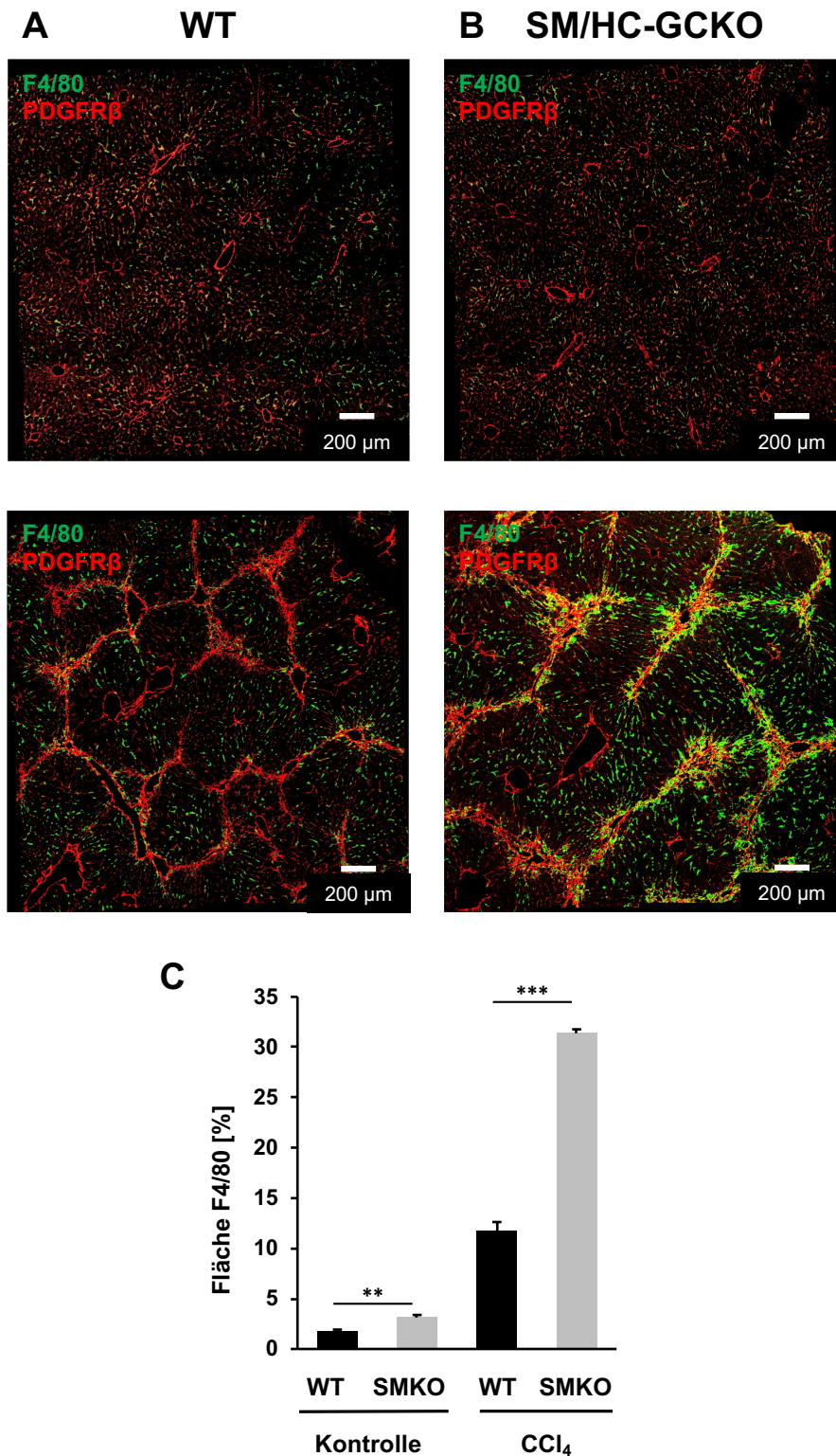


Abbildung 4.32: Verteilung der Kupffer-Zellen in gesunder und fibrotischer Leber aus WT und SM/MHC-GCKO

Leberschnitte aus gesunden und fibrotischen WT und SM/MHC-GCKO-(SMKO-)Tieren wurden mit Antikörpern gegen F4/80 (grün) und PDGFR β (rot) gefärbt. Überlagerungsbild für gesunden und fibrotischen WT (A). Überlagerungsbild für gesunden und fibrotischen SM/MHC-GCKO (B). Es konnte keine Kolo-kalisation zwischen F4/80 und PDGFR β festgestellt werden. Dafür war die Zahl der F4/80-Signale in fibrotischen SM/MHC-GCKO stark erhöht im Vergleich zum WT. Flächenauswertung für F4/80 in gesunden und fibrotischen WT und SM/MHC-GCKO (C). Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von $n=4-5$ pro Genotyp (ns =nicht signifikant; $*$ = $p<0,05$; $**$ = $p<0,01$; $***$ = $p<0,001$).

5 Diskussion

Die Aktivierung und Transdifferenzierung von Myofibroblasten-Vorläuferzellen ist ein entscheidender Schritt in der Pathogenese von Organfibrosen, denn die Myofibroblasten sind für den übermäßigen Einbau von EZM verantwortlich und folglich für die Ersetzung des gesunden Parenchyms durch Narbengewebe, was zum Verlust der Organfunktion führen kann. Verschiedene Zellen werden als Vorläuferzellen der Myofibroblasten vermutet: Dabei handelt es sich unter anderem um Epithelzellen, Fibroblasten sowie um portale Fibrozyten. Jedoch sind in letzter Zeit vor allem Perizyten in den Fokus der Forschung gerückt. Es konnte mithilfe von *Lineage Tracing*-Versuchen gezeigt werden, dass diese in EZM sezernierende Myofibroblasten differenzieren. In verschiedenen Organen konnte ein protektiver Effekt von cGMP auf fibrotische Prozesse beobachtet werden (Beyer et al., 2015; Beyer et al., 2012; Noguchi et al., 2014). Dies ist deshalb von Interesse, da die Expression der NO-GC in Perizyten nachgewiesen werden konnte. Perizyten wiederum kommen in einer hohen Dichte in Organen vor, die besonders von Fibrose betroffen sind, wie z. B. Lunge und Leber.

Die Vermutung, dass die NO-GC/cGMP-Signalkaskade – in Perizyten (HSC) – möglicherweise Einfluss auf die Pathogenese der Organfibrosen nimmt, sollte in dieser Arbeit sowohl in der Lunge als auch in der Leber untersucht werden. Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Wird die NO-GC in Perizyten exprimiert?
2. Wie verhalten sich Perizyten in den Organfibrosen?
3. Welchen Einfluss nimmt die NO-GC auf den Verlauf der fibrotischen Reaktion?

Von Vorteil bei dieser Arbeit war, dass spezifische NO-GC-Knockout Mäuse zur Verfügung standen, die bei der Beantwortung dieser Fragen halfen. Unter anderem war eine GCKO-Mutante vorhanden, bei der die NO-GC ubiquitär ausgeschaltet war. Zusätzlich konnte der zellspezifische Einfluss der NO-GC, dank Perizyten-spezifischer Knockouts (PDGFR β - und SM/MHC-GCKO) untersucht werden. Zudem konnten *Lineage Tracing*-Versuche durchgeführt werden, bei denen unter Perizyten-spezifischen Promotoren das Fluorophor tdTomato exprimiert wurde.

5.1 Die NO-GC-Expression in isolierten Perizyten aus der Lunge

Zunächst soll hier auf die Frage eingegangen werden, ob es zu einer Expression der NO-GC in Perizyten der Lunge kommt, was *in vitro* überprüft werden sollte. Eine Untersuchung von Zellen *in vitro* lohnt sich deshalb, da hier Zellen spezifisch isoliert und dann mit Substanzen stimuliert werden können, während die Zellen *in vivo* immer nur in ihrer Gesamtheit im Gewebe betrachtet werden können. Ebenfalls können Marker *in vitro* exklusiv in den isolierten Zellen untersucht werden, während *In-vivo*-Marker nur für das gesamte Gewebe betrachtet werden können.

Bei der Isolierung der Perizyten aus der Lunge mussten verschiedene Aspekte beachtet werden. Es musste ein Protokoll erstellt werden, mit dem es möglich war, ausschließlich Perizyten zu isolieren, sodass es nicht zu einer Mischkultur aus Perizyten mit anderen Zellen, wie z. B.

Fibroblasten oder VSMC, kam. Besonders die Verunreinigung mit VSMC ist ein Problem bei der Isolierung von Perizyten. Diese fällt später auch nur schwer auf, da Perizyten und VSMC – abhängig vom Gewebe, aus dem sie isoliert werden – eine hohe morphologische Ähnlichkeit aufweisen (Bryan und D'Amore, 2008; Armulik et al., 2005) und nur schwer durch einen spezifischen Marker unterschieden werden können (Chan-Ling et al., 2004; Hughes und Chan-Ling, 2004; Gerhardt et al., 2000). Jedoch ist dies kein spezifisches Problem bei der Betrachtung von Perizyten *in vitro*, denn auch im Gewebe können Perizyten nur mithilfe eines Elektronenmikroskops eindeutig von VSMC unterschieden werden (Sims, 1986). Es wurden mehrere Schritte unternommen, um das Ziel einer ‚reinen‘ Perizytenkultur zu erreichen (Abbildung 4.3).

Ein bedeutsamer Punkt, um eine nahezu ausschließlich aus Perizyten bestehende Kultur zu gewinnen, war es, die Zellen nur aus den Rändern der Lungenlappen zu isolieren. Dies ist damit zu begründen, dass die Ränder der Lungenlappen eine besonders hohe Perizyten-dichte aufweisen und dass dort durch die geringe Vaskularisierung nur wenige VSMC vorkommen (D'Amore, 1990; Speyer et al., 1999). Nachdem die Zellen aus den Rändern der Lungenlappen isoliert und in Kultur gebracht worden waren, enthielt die Zellpopulation nicht nur Perizyten, sondern auch andere Zellen. Damit jedoch nur Perizyten adhären konnten, musste die Selektion der Zellen über das Kulturmedium erfolgen. Es standen zwei Kulturmedien zur Auswahl: (1) DMEM und (2) PM-M. Charakteristisch für beide Medien war, dass sie nur eine geringe Konzentration von 1 g/l Glukose enthielten. Liegt eine zu hohe Konzentration an Glukose im Medium vor (4,5 g/l) so kommt es durch Fragmentierung der Mitochondrienmembran zu einer vermehrten Apoptose bei Perizyten (Trudeau et al., 2011). Das PM-M-Medium enthielt zusätzlich Perizyten-Wachstumsfaktoren, da Tigges et al. (2012) zeigen konnten, dass es durch den Einsatz von PM-M zu einer deutlich homogeneren Zellkultur kommt. Sie verglichen dabei die Expression von α -SMA in DMEM und in PM-M. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Perizyten bis zu einer Konfluenz von 90% in DMEM oder PM-M kultiviert. Dabei zeigte sich analog zu der o. g. Studie, dass es in PM-M-Medium zu einer deutlich geringeren α -SMA-Expression kam als im DMEM (Abbildung 4.3). Das bedeutet: Durch die Zugabe von Perizyten-Wachstumsfaktoren werden das Wachstum und die Adhärenz der Perizyten gefördert, während die VSMC nicht adhären werden. Die VSMC wurden aufgrund dieser Tatsache 24 h nach dem Aussäen der Zellen durch zwei Waschschrte aus der Kultur entfernt, wodurch eine homogene Perizytenkultur erzielt wurde. Dementsprechend wurden alle Perizytenversuche in dieser Arbeit mit dem PM-M-Medium durchgeführt.

Zudem mussten noch weitere Parameter bei der Kultivierung der Perizyten beachtet werden. Ein bedeutender Faktor war, dass die Zellen nicht passagiert wurden, sondern dass es einzig zum Einsatz von primären Zellen kam. Der Grund dafür war, dass Perizyten mit jedem Passage Schritt ihren Phänotyp weiter verändern und kaum noch dem *In-vivo*-Phänotyp ähneln. Wären passagierete Perizyten untersucht worden, so hätten demnach nur schwer Rückschlüsse auf den *In-vivo*-Zustand gezogen werden können. Neben dem Problem der Änderung des Phänotyps liegt zudem das Problem vor, dass Perizyten sich nur schwer trypsinisieren lassen bzw. dass die Trypsinisierungs-Effizienz gering ist (Antonelli-Orlidge et al., 1989). Ein weiterer bedeutsamer Aspekt, auch im Hinblick auf die Stimulation der Perizyten mit TGF- β 1, waren die Kultivierungs-

bedingungen. Normalerweise werden Zellen in Kultur entweder auf Plastik, oder – falls sie immunhistochemisch untersucht werden sollen – auf Glas gezüchtet. Das Problem dabei ist, dass die Zellen hierbei einem Druck ausgesetzt sind, der den Druck, dem sie im Gewebe ausgesetzt sind, um ein Vielfaches übersteigt. Während die Zellen im Lungengewebe einen Druck von 1 bis 5 kPa erfahren, liegt in Kultur ein deutlich höherer Druck vor (Liu et al., 2010). Dies führt dazu, dass die Zellen ihren Phänotyp verändern bzw. kontraktile Proteine exprimieren (z. B. α -SMA), die sie *in vivo* nicht exprimieren würden, denn der erhöhte Druck in der Zellkultur simuliert den erhöhten Druck, der durch das Auftreten von EZM entsteht und *in vivo* dafür sorgt, dass die Zellen kontraktile Proteine exprimieren (Hinz, 2012; Balestrini et al., 2012; Engler et al., 2006). Diese Tatsache macht es schwierig, später Aussagen über die Differenzierung der Zellen zu treffen, da diese dann nicht aus den zugegebenen Stimulanzen resultiert, sondern aus den Kulturbedingungen. Deshalb musste eine Wachstumsumgebung für die Zellen geschaffen werden, die den im Gewebe vorherrschenden Druck simuliert. Dies wurde durch eine Kollagen-Beschichtung erzielt, wobei die Kollagen-Konzentration so gewählt wurde, dass ein Druck von 1 bis 5 kPa erreicht wurde (Tigges et al., 2012; Wipff et al., 2009).

Nachdem die genannten Parameter (Kulturmedium, Kollagen-Beschichtung und primäre Zellen) festgelegt waren, konnten die isolierten Zellen immunzytochemisch charakterisiert werden. Dabei war es das Ziel, zunächst Perizyten-Marker zu identifizieren, die aus der Lunge isolierte Perizyten in Zellkultur markieren. Hierbei wurde sich an Tabelle 1.1 orientiert. Bei PDGFR β und Desmin handelt es sich um die am besten etablierten Perizyten-Marker. Dementsprechend wurden die isolierten Zellen mit diesen Markern untersucht. Dabei ließ sich feststellen, dass alle Zellen in Kultur sowohl positiv für Desmin als auch für PDGFR β waren (Abbildung 4.1). Somit konnte die Aussage getroffen werden, dass dank der vorher festgelegten Kulturbedingungen eine homogene Perizytenkultur generiert werden konnte. Neben den genannten Perizyten-Markern wurden auch noch weitere Marker untersucht. Dabei ließ sich feststellen, dass ein Teil der Perizyten positiv für SM/MHC war. Zwar ist SM/MHC eigentlich als Marker für VSMC bekannt, doch aufgrund der Tatsache, dass Perizyten wie VSMC vom Mesoderm abstammen, kommt es zu einer Überschneidung von Perizyten- und VSMC-Markern. In unserer Arbeitsgruppe konnte *in vivo* gezeigt werden, dass ein Teil der Perizytenpopulation der Lunge SM/MHC exprimiert, was auch *in vitro* bestätigt werden konnte. Neben PDGFR β , SM/MHC und Desmin waren die isolierten Perizyten auch positiv für Vimentin was analog zur Literatur ist (Armulik et al., 2011).

Infolge der Charakterisierung der Perizyten und der Sicherstellung, dass es sich um eine reine Perizytenkultur handelt, wurden die Perizyten auf die Expression der NO-GC untersucht. Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, ließ sich die bereits für andere Gewebe getätigte Aussage bestätigen, dass es zur Expression von NO-GC in Perizyten kommt (Bettaga et al., 2015). Dieses Ergebnis konnte erzielt werden, da als Negativkontrolle Perizyten aus dem GCKO isoliert und genauso kultiviert und auf die Expression der NO-GC überprüft wurden wie die Perizyten aus dem WT. Hier ließ sich feststellen, dass es in den Perizyten aus dem GCKO nicht zu einer Expression der NO-GC kam. Jedoch ist festzuhalten, dass ansonsten keine phänotypischen Unterschiede zwischen den Perizyten aus WT und aus dem GCKO bestanden. Dies lässt den Rückschluss zu,

dass die physiologische Aufgabe der NO-GC in Perizyten keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen *in vitro* hat. Perizyten stehen über verschiedene Zell-Zell-Kontakte mit EZ in Verbindung. Durch die Generierung von cGMP über die NO-GC sorgen Perizyten für die Steuerung des Blutdrucks (Bergers und Song, 2005; Rucker et al., 2000).

Isolierte Perizyten exprimieren die Marker PDGFR β , Desmin, zum Teil SM/MHC, NO-GC, Vimentin und in einem geringen Maße α -SMA. Um zu überprüfen, ob Perizyten zu Myofibroblasten differenzieren, wurden diese mit TGF- β 1 stimuliert. Deshalb wurden die Zellen für 72 h mit einer physiologischen Konzentration von TGF- β 1 inkubiert (Beyer et al., 2012). Der Zeitraum von 72 h wurde gewählt, da die Zellen sich in dieser Zeit mindestens einmal verdoppeln, sodass die neu entstanden Zellen somit immer TGF- β 1 ausgesetzt waren. Bei der Untersuchung der Stimulation mit TGF- β 1 war des Weiteren zu beachten, dass die FCS-Konzentration im Medium nicht zu hoch war; denn kommt es zu einer zu hohen FCS-Konzentration – in der Regel 10% – so liegt schon ausreichend TGF- β 1 im Medium vor, was die Zellen zur Differenzierung bringt. Aus diesem Grund wurde in allen Versuchen eine FCS-Konzentration von 2% verwendet. Durch die Stimulation mit TGF- β 1 blieb das α -SMA-Signal auf dem gleichen geringen Niveau wie bei den Zellen, die ohne TGF- β 1 inkubiert wurden (Abbildung 4.4). Daraus lässt sich schließen, dass Perizyten nicht in dem erwarteten Rahmen auf TGF- β 1 reagieren; d. h., dass sie nicht verstärkt α -SMA exprimieren. Dank Studien, in deren Rahmen mittels Bleomycin eine Fibrose in der Lunge induziert wurde, kann diese Tatsache erklärt werden. In der Lungenfibrose entstehen zwei Subtypen von Myofibroblasten. Der eine Subtyp exprimiert stark α -SMA, ist aber gleichzeitig negativ für NO-GC. Der andere Subtyp exprimiert nur schwach α -SMA, ist aber positiv für NO-GC und ist der Zelltyp, der Col1 α 1 exprimiert und sezerniert. Diese *In-vivo*-Aussagen lassen sich mit den *In-vitro*-Aussagen aus dieser Arbeit in Einklang bringen.

In Zukunft sollten die isolierten Perizyten mit TGF- β 1 inkubiert und auf eine verstärkte Col1 α 1-Synthese untersucht werden. Dabei bietet es sich an, dies mittels qPCR vorzunehmen. Die Untersuchung von Col1 α 1 mittels Western-Blot gestaltet sich schwierig, da Col1 α 1 verschiedene Spleißvarianten besitzt, die sich alle im Western-Blot zeigen, sodass eine Quantifizierung von Col1 α 1 mit dieser Methode problematisch ist.

5.2 Die NO-GC-Expression in der Leber

Analog zur Lunge sollte auch in der Leber herausgefunden werden, welche Zellen die NO-GC exprimieren, da bekannt ist, dass die NO-GC auch in der Leber zu einem hohen Maße exprimiert wird (Theilig et al., 2001). Ähnlich wie in der Lunge wurden die HSC – Perizyten der Leber – als NO-GC-exprimierende Zellen vermutet (Theilig et al., 2001) jedoch auch LSEC (Kawada et al., 1993; DeLeve und Maretta-Mira, 2017). Deshalb sollte die NO-GC-Expression in der Leber *in vivo* analysiert werden. Hier wurden, anders als bei der Lunge, keine *In-vitro*-Versuche durchgeführt, da zum einen die Isolation der HSC aufwendig und kostenintensiv ist (Mederacke et al., 2015) und weil *Lineage Tracing*-Versuche durchgeführt werden sollten.

Bevor die Lokalisation der Expression der NO-GC bestimmt werden konnte, mussten die verschiedenen Zellen der Leber durch spezifische Marker eindeutig identifiziert und unterschieden werden. Als Marker für die HSC wurden die Perizyten-Marker aus Tabelle 1.1 getestet. Dabei wurde schnell klar, dass der geeignetste Marker für HSC PDGFR β ist, was durch Henderson et al. (2013) ebenfalls demonstriert wurde. Dies konnte dadurch bestätigt werden, dass es zu keiner Kolo-kalisation zwischen PDGFR β und den Markern für die LSEC oder den Kupffer-Zellen kam. Zum anderen konnte durch die Lage der PDGFR β^+ -Zellen nahe den LSEC bestätigt werden, dass es sich um HSC handelt – denn die HSC liegen im Disse-Raum in engem Kontakt zu den LSEC (Tsukada et al., 2006). Auch mit dem anderen Perizyten/HSC-Marker Desmin konnte das gleiche Ergebnis erzielt werden. Zu beachten ist jedoch, dass PDGFR β ebenfalls die GefäÙe der Leber anfärbt. Die Zellen der GefäÙe können aber klar, durch ihre Lage und Form, von den HSC unterschieden werden.

Nachdem der Marker für die HSC bestimmt war, wurde die NO-GC-Expression in der Leber untersucht. Hier zeigte sich analog zu den Ergebnissen aus der Lunge, dass die NO-GC nur in HSC bzw. in Perizyten exprimiert wird. Es war keine Expression in LSEC auszumachen. Um dies zu bestätigen, wurde eine Negativkontrolle angefertigt. Hierbei wurde die Expression der NO-GC in der Leber von GCKO-Tieren untersucht. Zunächst ist zu bemerken, dass es zu keinem Unterschied bei der Markerexpression bei den HSC kam. Deshalb konnte auch hier als HSC-Marker PDGFR β eingesetzt werden. Nach vollständiger Deletion der NO-GC konnte erwartungsgemäÙ keine NO-GC-Expression in der Leber von GCKO-Mäusen festgestellt werden. Dadurch konnte die Beobachtungen über die NO-GC-Expression in WT-Mäusen bestätigt werden. Die Aufgabe der NO-GC in der Leber lässt sich physiologisch erklären: In der Leber nehmen die HSC eine ähnliche Tätigkeit ein wie Perizyten an GefäÙen. Durch die Generierung von cGMP über den NO-GC/cGMP-Signalweg sorgen die HSC für die Fenestrierung der LSEC (DeLeve, 2015).

5.3 Die CCl₄-induzierte Leberfibrose

Tiermodelle sind essenziell bei der Untersuchung von pathologischen Krankheiten des Menschen. Auch bei der Leberfibrose sind sie von unschätzbbarer Bedeutung, bieten sie doch den Vorteil der Generierung einer Vielzahl von Proben, die die Auswertung erleichtern und es möglich machen, zelluläre und molekulare Prozesse im Rahmen der Fibrose zu untersuchen (Constandinou et al., 2005).

Die wiederholte Gabe von Noxen und damit die toxische Schädigung der Leber ist ein Weg, in dieser eine Fibrose zu induzieren. Dazu werden Stoffe wie CCl₄ (Melhem et al., 2006; Starkel und Leclercq, 2011; Liedtke et al., 2013), Thioacetamid (TAA) (Reif et al., 2004; Li et al., 2002) oder Dimethylnitrosamin (DMN) (Newell et al., 2008; George et al., 2001) verwendet. Vorteil dieser genannten Modelle ist, dass sie robust sowie unkompliziert auszuführen sind und dass die Reproduzierbarkeit hoch ist. Dies kann aber nur gewährleistet werden, wenn die Noxe i.p. gegeben wird – bei *Ad-libitum*-Gabe ist damit zu rechnen, dass es zu einer hohen Varianz kommt (Starkel und Leclercq, 2011). Neben den genannten Methoden kann eine Leberfibrose experimentell mittels Gallengangligatur (Zhang et al., 2003), durch Gabe von Alkohol (Mathews et al., 2014;

Brandon-Warner et al., 2012) oder durch immunologischen Schaden (Ballardini et al., 1983; Yokoi et al., 1988) erzielt werden.

In dieser Arbeit wurde sich für das CCl₄-Modell entschieden, um eine Leberfibrose in der Maus zu induzieren. Der Vorteil dieses Modells ist, dass es bereits umfassend charakterisiert ist und in vielen Aspekten die Fibrose im Menschen widerspiegelt. Des Weiteren ist durch das Modell gegeben, dass es immer zu einer reproduzierbaren und vorhersehbaren fibrotischen Antwort kommt (Tsukamoto et al., 1990; Pérez Tamayo, 1983). Wie andere Haloalkane wird CCl₄ von Oxidasen aktiviert, im Fall des CCl₄ ist es die CYP2E1. Diese wandelt CCl₄ in das Radikal CCl₃[•] um, das in Hepatozyten in Zone 1 des Leberazinus eine Lipidperoxidation und eine reduzierte Proteinsynthese auslöst – was schlussendlich zur Schädigung der Hepatozyten führt, sodass eine inflammatorische Antwort ausgelöst wird, die in einer Fibrose resultiert (Weber et al., 2003).

Als Applikationsmodell wurde sich für die i.p.-Gabe entschieden. Zwar kann die Gabe von CCl₄ auch inhalativ oder über das Futter erfolgen, jedoch ist mit der i.p.-Gabe eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet (Liedtke et al., 2013). Ziel war es, eine schwere Fibrose in den Versuchstieren zu erzielen. Deshalb wurde als Zeitraum ein Abschnitt von 4 Wochen gewählt, in dem es zu einer wiederholten Gabe von CCl₄ kam (Iredale et al., 1996; Iredale et al., 1998); wird jedoch die Gabe von CCl₄ auf 12 Wochen ausgeweitet, so kommt es zu einer Zirrhose (Domenicali et al., 2009; Constandinou et al., 2005). Als Dosis wurden 1 µl pro g Körpergewicht gewählt. Mit dieser Dosis war gewährleistet, dass es zu keiner akuten Intoxikation der Tiere kam (Liu et al., 2009; Henderson et al., 2013). Das Vehikel war Miglyol[®] 812, das die Bioverfügbarkeit von CCl₄ erhöht und somit gewährleistet, dass CCl₄ in die Leber eindringen kann, um dort metabolisiert zu werden (Seki et al., 2009; Wasmuth et al., 2009).

Immunhistochemisch zeigten sich bei der durch CCl₄-induzierten Fibrose in der murinen Leber fibrotische Areale in Zone 1 des Leberazinus. Diese waren durch eine hohe Anzahl an PDGFRβ⁺-Zellen gekennzeichnet, die sich von den Gefäßen der periportalen Felder entlang der Achse zwischen den Leberläppchen erstreckten. Die PDGFRβ⁺-Zellen haben sich zudem stark vermehrt, was mittels Flächenauswertung und qPCR überprüft werden konnte. Der Ursprung dieser Zellen waren die HSC, die durch den fibrotischen Stimulus proliferiert und zum fibrotischen Areal migriert sind. Dass es sich hierbei um HSC handelt, konnte von Henderson et al. (2013) sowie von Kisseleva und Brenner (2008) mittels *Lineage Tracing*-Versuchen gezeigt werden. Ebenfalls wurde postuliert, dass die PDGFRβ⁺-Zellen in den fibrotischen Arealen zu Myofibroblasten differenzieren. Dabei gilt auch in der Leber α-SMA als der Marker für Myofibroblasten (Kisseleva et al., 2012). Dies konnte ebenfalls in dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell bestätigt werden. Kam es zu einer Doppelfärbung mit PDGFRβ und α-SMA, so war ein großer Teil der PDGFRβ⁺-Zellen in der fibrotischen Region α-SMA⁺. Durch Myofibroblasten kommt es in der Fibrose zu einer übermäßigen Produktion von EZM. Ein Bestandteil der EZM ist Col1α1. Auch in dem hier verwendeten Modell konnte eine hohen Einlagerung von Col1α1 in den fibrotischen Arealen beobachtet werden.

Alle getroffenen Beobachtungen lassen darauf schließen, dass es durch das gewählte Applikationsmodell zu einer Fibrose in der murinen Leber kam. Ebenso wie in der Literatur gezeigt, kam es zu einer massiven Proliferation von PDGFR β^+ -Zellen, zu deren Migration in die verletzte Region, zu der Differenzierung zu Myofibroblasten und zu einer übermäßigen Synthese von EZM.

5.3.1 Die NO-GC-Expression in der fibrotischen Leber

Der Ort der Expression der NO-GC in der Leber konnte in dieser Arbeit erstmals eindeutig bestimmt werden. An diese Erkenntnis schloss sich die Fragestellung an, was mit der NO-GC-Expression in der fibrotischen Leber passiert. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine Leberfibrose mittels CCl₄ induziert. In Folge der Fibrose und der starken Proliferation der HSC kam es zu einer deutlich gesteigerten Expression der NO-GC in den HSC im Vergleich zum unfibrotischen Zustand. Durch eine Doppelfärbung konnte des Weiteren herausgefunden werden, dass es zu einer Kolo-kalisation zwischen α -SMA und den NO-GC⁺-Zellen in den fibrotischen Arealen kam. Das bedeutet, dass die NO-GC auch in den EZM sezernierenden Myofibroblasten exprimiert wurde. Daneben wurde die NO-GC aber auch weiterhin in den HSC in den Zonen 2 und 3 exprimiert. Als Negativkontrolle wurde in einem GCKO-Tier ebenfalls mittels CCl₄ die Fibrose der Leber induziert. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild bei der Verteilung der Zellen und der Marker (PDGFR β , Col1 α 1, α -SMA); jedoch konnte keine Expression der NO-GC in den HSC bzw. Myofibroblasten in der Leber aus GCKO festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage, welche physiologische Rolle die NO-GC in der Leberfibrose einnimmt. Während die NO-GC in der unfibrotischen Leber wahrscheinlich für die Fenestrierung der LSEC verantwortlich ist, muss sie in der Leberfibrose noch eine andere Rolle übernehmen. Zu vermuten ist eine antifibrotische Aufgabe, in dem die NO-GC den TGF- β 1-Signalweg inhibiert (Schinner et al., 2017). In Abschnitt 5.6 soll näher auf die physiologischen Aufgaben der NO-GC in der Fibrose eingegangen werden.

5.4 Die HSC in der CCl₄-induzierten Leberfibrose

Ein Ziel im Rahmen dieser Arbeit war es, das Wissen um die Herkunft der PDGFR β^+ -Zellen in den fibrotischen Arealen zu klären. Es ist aus der Literatur bekannt, dass HSC in der Fibrose zu Myofibroblasten differenzieren und für den Einbau der EZM zuständig sind. Dies konnte mittels Reportertermäusen bestätigt werden. Zum anderen wurde unter dem PDGFR β -Promotor ein Fluorophor exprimiert, der alle HSC in der Leber markierte. Nach der Gabe von CCl₄ wurden alle PDGFR β^+ -Zellen in der fibrotischen Region mit dem Fluorophor markiert (Henderson et al., 2013). Daraus schlossen die Autoren, dass die Myofibroblasten von den HSC abstammen. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Reportertermäuse mit dem gleichen Promotor verwendet. Der Unterschied war jedoch, dass unter dem PDGFR β -Promotor eine induzierbare Cre (CreER^{T2}) exprimiert wurde. Während es bei Henderson et al. (2013) in allen Zellen, in denen jemals der PDGFR β -Promotor abgelesen wurde, zur Expression des Fluorophors kam, wurde das Fluorophor (tdTomato) in dem Model der vorliegenden Arbeit nur dann exprimiert, wenn der PDGFR β -Promotor abgelesen wurde, bei gleichzeitiger Gabe von Tamoxifen. Nur durch Tamoxi-

fen kann die CreER^{T2} aktiviert werden und das Stopcodon vor dem Fluorophor ausschneiden.

Aufgrund der genannten Tatsache kam es dazu, dass nicht – wie bei Henderson et al. (2013) – alle HSC mit dem Fluorophor markiert wurden, sondern nur ein kleiner Teil (ca. 20%) der HSC. Das bedeutet, dass der PDGFR β -Promotor während der Tamoxifen-Gabe nur in den besagten Zellen abgelesen wurde. Bei den Zellen, die hier markiert wurden, könnte es sich um die handeln, die sich zur Zeit der Tamoxifen-Gabe geteilt haben und/oder wuchsen – denn PDGFR β spielt bei Zellwachstum- und proliferation eine bedeutende Rolle (Pinzani et al., 1989). Die markierten HSC befanden sich hauptsächlich in der Zone 1 des Leberazinus. Neben den HSC wurden auch die Zellen der Gefäße mittels tdTomato markiert. Dies war nicht verwunderlich, da diese bereits bei der Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen PDGFR β (stark) positiv waren.

Nach Induzierung einer Leberfibrose in den PDGFR β -Tomato-Tieren nahm die Anzahl an Fluorophor-markierten HSC zwar zu, aber viele HSC blieben weiterhin Fluorophor⁻. Ebenfalls wurden die tdTomato-markierten HSC nicht zu Myofibroblasten, da sie auch in der Leberfibrose α -SMA⁻ waren. Weiterhin lagen die markierten Zellen in Zone 1 des Leberazinus und wenige auch im fibrotischen Bereich. Zusätzlich konnte mittels tdTomato ein vergrößerter Durchmesser der Gefäße in der Leberfibrose beobachtet werden, da diese durch tdTomato markiert waren. Anhand dieser Ergebnisse kann den Zellen keine spezifische Aufgabe im Rahmen der Leberfibrose zugeordnet werden.

Da durch die PDGFR β -CreER^{T2}-Reportermaus nur ein kleiner Teil der HSC markiert wurde, wurde nach anderen Reporterstäusen gesucht, mit denen mehr bzw. andere HSC nachverfolgt werden können. Es wurden unter anderem die NG2-Tomato-, die FoxD1-Tomato- und die GFAP/GFP-Reportermaus untersucht. Bei allen genannten Mäusen konnte keine Markierung der HSC festgestellt werden. Die HSC stammen analog zu den Perizyten vom Mesoderm und vom Mesothel ab (Armulik et al., 2011; Asahina et al., 2009; Asahina et al., 2011). Das bedeutet, dass in HSC Promotoren für Protein abgelesen werden, die eigentlich als VSMC-Marker bekannt sind. Deshalb wurde die Expression des Fluorophors tdTomato unter dem Promotor SM/MHC untersucht. Tatsächlich konnten dabei HSC in der gesunden Leber markiert werden. Ähnlich wie bei der PDGFR β -Reportermaus wurden auch hier nicht alle HSC markiert, sondern nur ca. 20% der HSC-Population. Auffällig dabei war, dass die markierten HSC alle in der Zone 1 des Leberazinus lagen, während die HSC im Leberparenchym unmarkiert blieben. An diese Entdeckung schloss sich die Frage an, ob sich die mittels PDGFR β markierten HSC mit den mittels SM/MHC-markierten decken. Um dies zu beantworten, wurde eine Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen SM/MHC in den Reporterstäusen durchgeführt. Allerdings konnten nur VSMCs in den Gefäßen der Leber hiermit markiert werden. Die HSC, die mittels SM/MHC-Promotor markiert worden waren, blieben bei der Färbung mit dem Antikörper negativ. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich, dass der Promotor für SM/MHC zwar abgelesen wird, aber nur in einem geringen Maße, sodass das Protein SM/MHC nur wenig gebildet wird. Dies ist aber bei dem Reportermodell irrelevant. Kommt es einmal zum Ausschnitt des Stopcodons, so wird das Fluorophor immer exprimiert. Die tdTomato-Expression spiegelt deshalb nicht die aktuelle Synthese des Proteins

unter dem verwendeten Promotor sondern die Aktivität des Promotors während der Tamoxifen-Gabe wider.

In SM/MHC-Reporter-mäusen wurde ebenfalls die Fibrose mittels CCl_4 induziert. Es kam auch hier zu einer starken Proliferation der markierten HSC. Jedoch waren auch in diesem Modell nicht alle HSC markiert: Alle HSC, die sich im fibrotischen Bereich befanden, einschließlich der Myofibroblasten, blieben unmarkiert. Dagegen waren die meisten HSC im Leberparenchym, also in den Zonen 2 und 3 des Leberazinus, tdTomato^+ und die Zellkörper waren in Richtung der fibrotischen Areale ausgerichtet. Daraus kann geschlossen werden, dass die SM/MHC-Tomato⁺-HSC durch den fibrotischen Stimulus aus Zone 1 in die Zonen 2 und 3 des Leberazinus eingewandert sind. Dort haben sie die Position der zu Myofibroblasten differenzierten und zur fibrotischen Region migrierten HSC eingenommen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die HSC in der Leber in Subpopulationen unterteilt werden können. Es ist festzuhalten, dass alle HSC die NO-GC exprimieren. Des Weiteren kann ein Teil der HSC als SM/MHC-Tomato⁺ und ein anderer Teil als PDGFR β -Tomato⁺ deklariert werden, wobei nicht eindeutig ist, wie stark sich die beiden Populationen überschneiden. Eine 100%ige Überschneidung ist aber nicht gegeben, wie die Betrachtung der Verteilung der Zellen – besonders in der Fibrose – zeigt. Die meisten PDGFR β -Tomato-markierten HSC liegen in der Zone 1 bzw. in der fibrotischen Zone, während die SM/MHC-Tomato⁺-HSC an der fibrotischen Zone sowie in den Zonen 2 und 3 liegen. Zusätzlich festzuhalten ist, dass die beiden tdTomato -markierten Zellpopulationen nicht zu Myofibroblasten werden (sie sind negativ für α -SMA). Deshalb ist davon auszugehen, dass es drei verschiedene HSC-Populationen in der Leber gibt: die HSC, die weder durch PDGFR β -Tomato noch durch SM/MHC-Tomato markiert werden, jedoch positiv für NO-GC sind und in der Fibrose zu Myofibroblasten werden, sowie die entweder durch PDGFR β -Tomato oder durch SM/MHC-Tomato markierten HSC, die auch positiv für NO-GC sind, aber in der Fibrose nicht zu Myofibroblasten werden, sondern an jeweils spezifischen Stellen anzutreffen sind (Tabelle 5.1).

5.5 Die HSC in der Auflösung der Leberfibrose

Kommt es zur Auflösung der Leberfibrose so kann für die drei identifizierten HSC Subpopulationen ein spezifisches Verhalten bzw. Schicksal ausgemacht werden. Die NO-GC⁺-HSC, die sowohl negativ für PDGFR β -Tomato als auch für SM/MHC-Tomato sind, stellen in der Fibrose die Myofibroblasten dar. In der Literatur wird diskutiert, was mit diesen Myofibroblasten bei der Auflösung der Leberfibrose passiert. Es wird zum einen vermutet, dass die Myofibroblasten nach Verschwinden des fibrotischen Stimulus in Apoptose gehen. Dies geschieht vornehmlich über den Fas- und den TNF-verwandten-Apoptose-induzierenden-Ligand-(TRAIL-)Signalweg und führt zur Phagozytose der apoptotischen Myofibroblasten durch die Makrophagen (Fischer et al., 2002; Iredale et al., 1998). Ein anderes postuliertes Schicksal ist, dass die Myofibroblasten zu seneszenten Zellen werden, die sich dadurch auszeichnen, dass sie keine fibrotischen Marker mehr exprimieren und keine EZM mehr sekretieren (Krizhanovsky et al., 2008). Ein weiteres Schicksal der Myofibroblasten in der Auflösung der Leberfibrose ist, dass sie in einen ruhenden Zustand

übergehen und – kommt es zum Fall einer erneuten Schädigung der Leber – schnell wieder in einen aktiven Zustand zurückkehren und EZM synthetisieren (Kisseleva et al., 2012). Bei Betrachtung der Auflösung der Fibrose im SM/MHC-Tomato-GCKO ließ sich feststellen, dass die Myofibroblasten (NO-GC⁺ sowie PDGFR β -Tomato⁻ und SM/MHC-Tomato⁻) in Apoptose gehen, denn 7 Tage nach der letzten Injektion von CCl₄ konnten in SM/MHC-GCKO Tieren entweder nur SM/MHC-Tomato⁺/NO-GC⁻- oder nur SM/MHC-Tomato⁻/NO-GC⁺-Zellen gefunden werden. Dabei hatten die NO-GC⁺-Zellen im Vergleich zum fibrotischen Zustand in ihrer Menge deutlich abgenommen. Durch die Kombination mit den Daten aus dem SM/MHC-Tomato-WT-Tier, bei dem ebenfalls nur noch wenige NO-GC⁺- und SM/MHC-Tomato⁻-Zellen zu sehen waren, lässt sich diese These unterstreichen.

Das Schicksal der SM/MHC-Tomato⁺/PDGFR β -Tomato⁻- und NO-GC⁺-HSC ähnelt bei der Auflösung der Leberfibrose dem Schicksal dieser Zellen bei bestehender Leberfibrose. Nachdem diese Zellen durch den fibrotischen Stimulus in die Zonen 2 und 3 des Leberazinus gewandert sind, verblieben sie auch nach der Auflösung der Leberfibrose dort. Damit kann angenommen werden, dass sie im Leberparenchym an die Stelle der HSC wandern, die sich zu Myofibroblasten differenziert haben und zur fibrotischen Region gewandert sind, die wiederum durch Apoptose aus dem Gewebe verschwunden sind. Somit haben die SM/MHC-Tomato⁺-HSC in der Leber die Aufgabe die zu Myofibroblasten gewordenen Zellen zu ersetzen und die regulären physiologischen Funktionen der Leber aufrechtzuerhalten.

Den PDGFR β -Tomato⁺/SM/MHC-Tomato⁻- und NO-GC⁺-HSC lässt sich keine genauere Funktion zu ordnen. Auch nach der Auflösung der Leberfibrose befanden sie sich in Zone 1 und ihre Anzahl hat im Vergleich zum Zustand vor der Leberfibrose nicht wesentlich zugenommen. Da sie in der Fibrose nicht zu Myofibroblasten werden – sie bleiben negativ für α -SMA – lässt sich mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten keine Aussage über die Funktion dieser Zellen in der Fibrose und in der Auflösung der Fibrose treffen (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: HSC-Subpopulationen und deren Schicksale

HSC (NO-GC ⁺)	Gesunde Leber	Fibrotische Leber	Auflösung der Leberfibrose
SM/MHC-Tomato ⁻ / PDGFR β -Tomato ⁻	HSC in den Zonen 2 und 3	Myofibroblasten (α -SMA ⁺) im fibrotischen Foci	Apoptose der Zellen
SM/MHC-Tomato ⁺ / PDGFR β -Tomato ⁻	HSC in Zone 1	Wanderungen in Zonen 2 und 3; Ersatz der SM/MHC-Tomato ⁻ /PDGFR β -Tomato ⁻ -HSC	Verbleib in den Zonen 2 und 3
SM/MHC-Tomato ⁻ / PDGFR β -Tomato ⁺	HSC in Zone 1	In Zone 1 und im fibrotischen Foci, keine Myofibroblasten	Verbleib in Zone 1

5.6 Der Einfluss der NO-GC auf die Pathogenese der Leberfibrose

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Aufgabe/Rolle die NO-GC in der Leberfibrose einnimmt. Nachdem in den vorherigen Teilen die Expression der NO-GC in den HSC lokalisiert sowie in der CCl₄-induzierten Fibrose (NO-GC wird hochreguliert und besonders stark in der fibrotischen Region und dort auch in Myofibroblasten exprimiert) bestimmt werden konnte, sollte die Rolle der NO-GC über ihren globalen und zellspezifischen Ausschnitt genauer festgelegt werden.

Zunächst wurde der WT mit dem GCKO verglichen. Beim GCKO kommt es durch die globale Deletion der NO-GC zu einem Ausbleiben der NO-GC-Expression in den HSC sowohl vor als auch während der Fibrose. Bei der Betrachtung und dem Vergleich von Fibrosemarkern zwischen WT und GCKO fällt auf, dass bei der Flächenauswertung im Vergleich zum WT nur das Kollagen (PSR und Col1 α 1) signifikant erhöht war. Bei der qPCR-Analyse konnte auch für die Marker PDGFR β und Acta2 (das Gen von α -SMA) ein signifikant erhöhter Wert festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen nur darauf schließen, dass es durch die globale Deletion der NO-GC zu einer vermehrten Kollagen- bzw. EZM-Einlagerung kommt, was für eine schwere Fibrose im GCKO spricht. Es stellt sich jedoch die Frage, wie das Fehlen der NO-GC mit einem erhöhten Kollageneinbau zusammenhängt. Bei der Untersuchung von TGF- β 1 im WT und von GCKO mittels qPCR ließ sich im GCKO eine signifikant erhöhte TGF- β 1-Expression feststellen. Ebenfalls war pSMAD3, das durch TGF- β 1 phosphoryliert wird, erhöht – ein Zeichen für einen aktiveren TGF- β 1-Signalweg. In der Leberfibrose ist TGF- β 1 an der Stimulation der Kollagensynthese beteiligt. Daraus lässt sich schließen, dass NO-GC einen protektiven Effekt hat. Über einen nicht näher bekannten Mechanismus inhibiert NO-GC den TGF- β 1-Signalweg. Eine weitere interessante Beobachtung im GCKO war, dass die Apoptose-Rate (mittels TUNEL-Test gemessen) um ein Vielfaches höher war als im WT (Daten nicht gezeigt). Dies kann darauf hindeuten, dass die NO-GC auch eine Rolle bei der Apoptose spielt. Diese Vermutung muss aber noch genauer untersucht werden.

Durch die *Lineage Tracing*-Versuche ist bekannt, dass die HSC in Subpopulationen eingeteilt werden können. Um genauer zu bestimmen, welche Aufgaben die NO-GC in diesen Subpopulationen bei der Leberfibrose hat, wurde die NO-GC unter den Promotoren PDGFR β und SM/MHC mittels CreER^{T2} ausgeschnitten. In beiden Fällen war die NO-GC nur in den tdTomato-markierten Zellen entfernt. Jedoch konnte in einigen Zellen immer noch eine Kolokalisation zwischen den NO-GC und dem tdTomato-Signal gesehen werden. Dies deutet darauf hin, dass fast vollständig war. Der Phänotyp der beiden zellspezifischen Knockouts war aber dem des WT gleich. Bei einem Vergleich zwischen PDGFR β -GCKO und WT konnte beobachtet werden, dass es weder bei der Flächenauswertung noch bei der qPCR-Analyse zu signifikanten Unterschieden für die Fibrosemarker PDGFR β , Col1 α 1 und α -SMA kam. Solch ein Unterschied bestand lediglich bei der qPCR-Analyse für α -SMA. Anhand dieser Ergebnisse kann die Aufgabe der PDGFR β -Tomato⁺-HSC nicht näher präzisiert werden. Die Aufgabe der Zellen in der Leberfibrose sowie die Rolle der NO-GC in den HSC muss noch weiter untersucht werden.

Es wurden ebenfalls die Fibrosemarker zwischen dem SM/MHC-GCKO und dem WT verglichen. Hier konnte sowohl bei der Flächenauswertung als auch bei der qPCR-Analyse eine verstärkte Einlagerung von Col1 α 1 in der Leber beobachtet werden. Auch das TGF- β 1-mRNA-Niveau war im SM/MHC-GCKO signifikant erhöht. Dies war sowohl in der gesunden Leber als auch in der fibrotischen Leber zu sehen. Zur weiteren Untersuchung, wie die NO-GC den TGF- β 1-Signalweg inhibiert, wurde das Protein PPAR γ analysiert. Aus Podozyten ist bekannt, dass cGMP PPAR γ über PKG vermittelt aktiviert (Sonneveld et al., 2017). Der PPAR γ wird vor allem in der Leber in den HSC exprimiert (Hazra et al., 2004b) und sorgt neben seiner Rolle in der Adipogenese und in dem Energiemetabolismus für die Inhibierung des TGF- β 1-Signalweges (Fu et al., 2003). Mittels Western-Blot konnte festgestellt werden, dass es bereits im unfibrotischen SM/MHC-GCKO zu einer verringerten Expression von PPAR γ kommt; dadurch ist das TGF- β 1-Niveau bereits im unfibrotischen Zustand gegenüber dem WT signifikant erhöht.

Aus den gewonnenen Daten lässt sich schließen, dass die NO-GC in der Leberfibrose einen protektiven Effekt hat, indem sie über cGMP/PKG vermittelt PPAR γ stimuliert, was dazu führt, dass der TGF- β 1-Signalweg inhibiert und dass weniger Col1 α 1 gebildet wird – ein bedeutsamer Bestandteil der EZM. In Folgestudien sollten den Versuchstieren NO-GC-Stimulatoren/Aktivatoren gegeben, dann sollte die Fibrose induziert und im Anschluss sollten die Fibrosemarker untersucht werden. Dies wurde bereits mit WT erfolgreich durchgeführt. Dort konnten Fibrosemarker durch die Gabe eines NO-GC-Stimulators gesenkt werden (Flores-Costa et al., 2018). Um diese Ergebnisse zu präzisieren, sollten auch GCKO- und SM/MHC-GCKO-Tieren NO-GC-Stimulatoren gegeben und deren Auswirkungen auf die Fibrose untersucht werden. Bei den PDGFR β -GCKO ist die jedoch nicht vonnöten, da die PDGFR β -Tomato⁺-HSC augenscheinlich keine Rolle in der CCl₄-induzierten Fibrose spielen. Daneben sollte die Expression der NO-GC auch in anderen Fibrosemodellen untersucht werden, um die Aufgabe der NO-GC in der Leber und besonders in der Fibrose noch weiter aufzuklären.

6 Zusammenfassung

Mittels der im Rahmen dieser Arbeit behandelten Untersuchungen konnten neue Erkenntnisse über die Rolle der NO-GC bei der Pathogenese der Lungen- und der Leberfibrose gewonnen werden. Infolge einer Fibrose in Lunge und Leber kommt es zu einer übermäßigen Akkumulation von EZM, die zum Organversagen führen kann. Bis jetzt existieren nur wenige Therapiemöglichkeiten, die zur Behandlung von Organfibrose dienen. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass durch den Einsatz von NO-GC-Stimulatoren/Aktivatoren es zu Verbesserung/Heilung bei verschiedenen Organfibrosen kommt. Deshalb wird vermutet, dass die NO-GC eine modulatorische Rolle bei der Entwicklung einer Organfibrose einnimmt. Die Effektorzellen sind bisher unbekannt.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die Effektorzellen der Lunge *in vitro* untersucht werden. Da bekannt ist, dass in der Lunge Perizyten NO-GC exprimieren, wurde ein Protokoll etabliert, das es ermöglichte, Perizyten spezifisch aus der Lunge zu isolieren und in Kultur zu bringen. Durch den Einsatz von verschiedenen Markern wurden im Anschluss diese isolierten Perizyten weiter charakterisiert. Zum einen konnte festgestellt werden, dass die NO-GC in diesen isolierten Zellen exprimiert wird. Zum anderen stellte sich heraus, dass die Perizyten auch durch einen Marker (SM/MHC) identifiziert werden können, der eigentlich als VSMC-Marker gilt. Diese Daten waren analog zu den *In-vivo*-Daten von Aue *et al.* Zusätzlich sollte untersucht werden, ob diese NO-GC-exprimierenden Perizyten in Kultur zu Myofibroblasten differenziert werden können. Dies gelang jedoch nicht durch Stimulation mit TGF- β 1.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, in welchen Zellen in der Leber die NO-GC exprimiert wird. Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die NO-GC in der Leber in den HSC exprimiert wird. Da bekannt ist, dass die NO-GC Einfluss auf die Organfibrose nimmt, sollte die NO-GC-Expression in der Leberfibrose untersucht werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass es zu einer gesteigerten NO-GC-Expression in der CCl₄-induzierten Leberfibrose kommt. Diese war vor allem in den Myofibroblasten lokalisiert – den Zellen, die wahrscheinlich für den übermäßigen Einbau der EZM sorgen. Um den Einfluss der NO-GC auf die Leberfibrose genauer zu untersuchen, wurde die Fibrose zwischen WT- und GCKO-Tieren verglichen. Dabei konnte beobachtet werden, dass es in den GCKO-Tieren zu einer stärkeren Fibrose als in WT-Tieren kam, die sich durch eine vermehrte Einlagerung von Kollagen und einer erhöhten Expression von TGF- β 1 auszeichnete. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die NO-GC eine wahrscheinlich protektive Rolle in der Leberfibrose einnimmt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der HSC in der Leberfibrose genauer untersucht. Dabei konnte zum ersten mal festgestellt werden, dass sich die HSC in Subpopulation unterteilen lassen. Durch den Einsatz von Reportermausen, bei denen unter dem SM/MHC- oder PDGFR β -Promotor das Fluorophor tdTomato exprimiert wurde, ließen sich die HSC in 3 Subpopulationen einteilen: (1) SM/MHC-Tomato⁻ und PDGFR β -Tomato⁻; (2) SM/MHC-Tomato⁻ und PDGFR β -Tomato⁺ und (3) SM/MHC-Tomato⁺ und PDGFR β -Tomato⁻. Durch *Lineage-Tracing*-Versuche konnte den beschriebenen Subpopulationen Aufgaben in der Leberfibrose und in deren

Auflösung zugeordnet werden. Die Subpopulation 1 ist in der gesunden Leber hauptsächlich in den Zonen 2 und 3 des Leberazinus lokalisiert. In der Fibrose wandern diese Zellen zu den fibrotischen Regionen und differenzieren dort zu Myofibroblasten. In der Auflösung der Fibrose verschwinden diese Zellen durch Apoptose aus der Leber. Die HSC-Subpopulation 2 befindet sich in der gesunden Leber in der Zone 1 des Leberazinus. Auch in und nach Auflösung der Leberfibrose verweilen diese Zellen dort. Zwar befindet sich die HSC-Subpopulation 3 in der gesunden Leber ebenfalls nur in Zone 1 des Leberazinus, jedoch wandern die Zellen in der Fibrose in die Zone 2 und 3 und ersetzen dort die HSC-Subpopulation 1, die in die fibrotische Region gewandert ist. Nach Auflösung der Leberfibrose hat die HSC-Subpopulation 3 die Population 1 vollständig ersetzt.

Nach Identifizierung der HSC-Subpopulationen stellte sich die Frage, ob ein spezifischer Ausschnitt der NO-GC zu einer veränderten Leberfibrose führt im Vergleich zum WT. Dazu wurde unter dem SM/MHC- und PDGFR β -Promotor die NO-GC deletiert und die Fibrose in diesen Knockouts untersucht. Während bei der Deletion der NO-GC unter dem PDGFR β -Promotor kein Unterschied im Vergleich zum WT gesehen werden konnte, ließ sich beim SM/MHC-GCKO Unterschiede feststellen. Durch den Ausschnitt der NO-GC in den Zellen der HSC-Subpopulation 3 kam es zu einer verringerten Expression von PPAR γ in der gesunden Leber. Da PPAR γ als Gegenspieler von TGF- β 1 fungiert, konnte eine erhöhte TGF- β 1-Expression in der gesunden und fibrotischen Leber des SM/MHC-GCKO im Vergleich zum WT-Tier gesehen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die NO-GC über die Steuerung des PPAR γ ihren protektiven Effekt auf die Leberfibrose ausübt.

7 Summary

By means of the questions addressed in this work, new insights were gained on the role of NO-GC in the pathogenesis of lung and liver fibrosis. As a result of fibrosis in the lungs and liver, there is an excessive accumulation of EZM, which can lead to organ failure. So far, there are only a few treatment options available for the treatment of organ fibrosis. However, it has recently been shown that the use of NO-GC-stimulators/activators can improve/heal diverse organ fibrosis. Therefore, NO-GC is thought to play a modulatory role in the development of organ fibrosis, however effector cells are still not known.

In the first part of this work, the effector cells of the lung were examined *in vitro*. Since it is known that NO-GC in the lung is expressed in pericytes, a protocol was established that allowed to specifically isolate pericytes from the lung and bring them into culture. By using different markers, these isolated pericytes were further characterized. Furthermore, NO-GC-expression was detected in these isolated cells. In addition, pericytes can also be marked by a marker (SM/MHC), which is actually known as a VSMC-marker. These data were analogous to the *in vivo* data of Aue et al.. Although, it was investigated whether these NO-GC-expressing pericytes differentiated into myofibroblasts in culture. This was not been achieved by stimulation with TGF- β 1.

In the second part of this work it was investigated in which cells in of the liver NO-GC is expressed. *In vivo* it could be shown that NO-GC is expressed in HSC of the liver. Since it is known that the NO-GC has an influence on organ fibrosis, NO-GC-expression in liver fibrosis was investigated. It was found that there is an increased NO-GC-expression in CCl₄-induced liver fibrosis. Expression was mainly found in myofibroblasts - the cells likely responsible for production of EZM. To further investigate the influence of NO-GC on liver fibrosis, fibrosis between WT and GCKO animals was compared. It could be observed that there was a stronger fibrosis in GCKO-animals than in WT-animals, as seen by an increased accumulation of collagen and an increased expression of TGF- β 1. This demonstrated that NO-GC plays a likely protective role in liver fibrosis.

In the third part of this work, the role of HSC in liver fibrosis was examined in more detail. For the first time, it was found that HSC can be subdivided into subpopulations. Reporter mice expressing the tdTomato fluorophore under the SM/MHC- or PDGFR β -promoter allowed the subdivision of the HSC into 3 subpopulations: (1) SM/MHC-Tomato⁻ and PDGFR β -Tomato⁻; (2) SM/MHC-Tomato⁻ and PDGFR β -Tomato⁺ and (3) SM/MHC-Tomato⁺ and PDGFR β -Tomato⁻. HSC lineage tracing-experiments, showed that these subpopulations have different roles during liver fibrosis and the resolution. In the healthy liver subpopulation 1 is mainly located to zones 2 and 3 of the liver acinus. In fibrosis these cells migrate to the fibrotic regions and differentiate into myofibroblasts. In the dissolution phase of fibrosis these cells disappear by apoptosis. Under physiological conditions HSC-subpopulation 2 are located to zone 1 of the liver acinus. Even in and after the dissolution of liver fibrosis these cells persist. HSC-subpopulation 3 in the healthy liver is also only in zone 1 of the liver acinus. In fibrosis these cells migrate to zone 2 and 3 where they replace HSC-subpopulation 1 that has migrated into the fibrotic region. After dissolving of

liver fibrosis, subgroup 3 has completely replaced population 1.

After identifying the HSC-subpopulation, the question was whether a specific section of the NO-GC leads to altered liver fibrosis compared to WT. For this purpose, NO-GC was deleted under SM/MHC- and PDGFR β -promoter and fibrosis was investigated in these knockouts. While there was no difference in the deletion of NO-GC under the PDGFR β -promoter compared to WT, SM/MHC-GCKO showed different results. The excision of NO-GC in the cells of HSC-subpopulation 3 resulted in a decreased expression of PPAR γ in the healthy liver. Since PPAR γ acts as an antagonist of the TGF- β 1-pathway, increased TGF- β 1-expression in SM/MHC-GCKO was seen in the healthy and fibrotic liver compared to WT-liver. These results suggest that NO-GC has a protective effect on liver fibrosis by the control of PPAR γ .

Literaturverzeichnis

- Aaij, C und P Borst (Mai 1972). „The gel electrophoresis of DNA.“ In: *Biochimica et biophysica acta* 269 (2), S. 192–200. ISSN: 0006-3002.
- Adams, M, M J Reginato, D Shao, M A Lazar und V K Chatterjee (Feb. 1997). „Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site.“ In: *The Journal of biological chemistry* 272 (8), S. 5128–5132. ISSN: 0021-9258.
- Alderton, W K, C E Cooper und R G Knowles (Aug. 2001). „Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.“ In: *The Biochemical journal* 357 (Pt 3), S. 593–615. ISSN: 0264-6021.
- Alioua, A, Y Tanaka, M Wallner, F Hofmann, P Ruth, P Meera und L Toro (Dez. 1998). „The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo.“ In: *The Journal of biological chemistry* 273 (49), S. 32950–32956. ISSN: 0021-9258.
- Allt, G und J G Lawrenson (2001). „Pericytes: cell biology and pathology.“ In: *Cells, tissues, organs* 169 (1), S. 1–11. ISSN: 1422-6405. DOI: 10.1159/000047855.
- Ammendola, A, A Geiselhöringer, F Hofmann und J Schlossmann (Juni 2001). „Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase Ibeta.“ In: *The Journal of biological chemistry* 276 (26), S. 24153–24159. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M101530200.
- Antonelli-Orlidge, A, K B Saunders, S R Smith und P A D'Amore (Juni 1989). „An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (12), S. 4544–4548. ISSN: 0027-8424.
- Armulik, Annika, Alexandra Abramsson und Christer Betsholtz (Sep. 2005). „Endothelial/pericyte interactions.“ In: *Circulation research* 97 (6), S. 512–523. ISSN: 1524-4571. DOI: 10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7.
- Armulik, Annika, Guillem Genové und Christer Betsholtz (Aug. 2011). „Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises.“ In: *Developmental cell* 21 (2), S. 193–215. ISSN: 1878-1551. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
- Arndt, H, C W Smith und D N Granger (Mai 1993). „Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats.“ In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 21 (5), S. 667–673. ISSN: 0194-911X.

- Asahina, Kinji, Shirley Y Tsai, Peng Li, Mamoru Ishii, Robert E Maxson, Henry M Sucov und Hidekazu Tsukamoto (März 2009). „Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development.“ In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (3), S. 998–1011. ISSN: 1527-3350. DOI: 10.1002/hep.22721.
- Asahina, Kinji, Bin Zhou, William T Pu und Hidekazu Tsukamoto (März 2011). „Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver.“ In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (3), S. 983–995. ISSN: 1527-3350. DOI: 10.1002/hep.24119.
- Balestrini, Jenna L, Sidharth Chaudhry, Vincent Sarrazy, Anne Koehler und Boris Hinz (Apr. 2012). „The mechanical memory of lung myofibroblasts.“ In: *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 4 (4), S. 410–421. ISSN: 1757-9708. DOI: 10.1039/c2ib00149g.
- Ballardini, G, S Degli Esposti, F B Bianchi, L B de Giorgi, A Faccani, L Biolchini, C A Busachi und E Pisi (Feb. 1983). „Correlation between Ito cells and fibrogenesis in an experimental model of hepatic fibrosis. A sequential stereological study.“ In: *Liver* 3 (1), S. 58–63. ISSN: 0106-9543.
- Bataller, Ramón, Kari E North und David A Brenner (März 2003). „Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal.“ In: *Hepatology* 37.3, S. 493–503. ISSN: 0270-9139. DOI: 10.1053/jhep.2003.50127.
- Beavo, Joseph A (1995). „Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms“. In: *Physiological reviews* 75.4, S. 725–748.
- Bender, Andrew T und Joseph A Beavo (Sep. 2006). „Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use.“ In: *Pharmacological reviews* 58 (3), S. 488–520. ISSN: 0031-6997. DOI: 10.1124/pr.58.3.5.
- Benninghoff, Alfred und Detlev Drenckhahn (16. Apr. 2008). *Anatomie: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. Elsevier, Urban & Fischer. 968 S. ISBN: 9783437423420. URL: <https://books.google.de/books?id=WdMyzMK3bFEC>.
- Bergers, Gabriele und Steven Song (2005). „The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance.“ In: *Neuro-oncology* 7.4, S. 452–64. ISSN: 1522-8517.
- Bettaga, Noomen, Ronald Jäger, Sarah Dünnes, Dieter Groneberg und Andreas Friebe (Juli 2015). „Cell-specific impact of nitric oxide-dependent guanylyl cyclase on arteriogenesis and angiogenesis in mice.“ In: *Angiogenesis* 18 (3), S. 245–254. ISSN: 1573-7209. DOI: 10.1007/s10456-015-9463-8.
- Beyer, Christian, Nicole Reich, Sonia C Schindler, Alfiya Akhmetshina, Clara Dees, Michal Tomcik, Claudia Hirth-Dietrich, Georges von Degenfeld, Peter Sandner, Oliver Distler, Georg Schett

- und Jörg H W Distler (Juni 2012). „Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis.“ In: *Annals of the rheumatic diseases* 71 (6), S. 1019–1026. ISSN: 1468-2060. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200862.
- Beyer, Christian, Christoph Zenzmaier, Katrin Palumbo-Zerr, Rossella Mancuso, Alfiya Distler, Clara Dees, Pawel Zerr, Jingang Huang, Christiane Maier, Milena L Pachowsky, Andreas Friebe, Peter Sandner, Oliver Distler, Georg Schett, Peter Berger und Jörg H W Distler (Juli 2015). „Stimulation of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibits fibrosis by blocking non-canonical TGF signalling.“ In: *Annals of the rheumatic diseases* 74 (7), S. 1408–1416. ISSN: 1468-2060. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204508.
- Birbrair, Alexander, Tan Zhang, Daniel Clark Files, Sandeep Mannava, Thomas Smith, Zhong-Min Wang, Maria Laura Messi, Akiva Mintz und Osvaldo Delbono (Nov. 2014). „Type-1 pericytes accumulate after tissue injury and produce collagen in an organ-dependent manner.“ In: *Stem cell research & therapy* 5 (6), S. 122. ISSN: 1757-6512. DOI: 10.1186/scrt512.
- Blomhoff, Rune und Heidi Kiil Blomhoff (Juni 2006). „Overview of retinoid metabolism and function.“ In: *Journal of neurobiology* 66 (7), S. 606–630. ISSN: 0022-3034. DOI: 10.1002/neu.20242.
- Bochaton-Piallat, Marie-Luce, Giulio Gabbiani und Boris Hinz (2016). „The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions.“ In: *F1000Research* 5. ISSN: 2046-1402. DOI: 10.12688/f1000research.8190.1.
- Bonnard, P, F X Lescure, C Amiel, J-B Guiard-Schmid, P Callard, S Gharakhanian und Gilles Pialoux (Nov. 2007). „Documented rapid course of hepatic fibrosis between two biopsies in patients coinfecting by HIV and HCV despite high CD4 cell count.“ In: *Journal of viral hepatitis* 14 (11), S. 806–811. ISSN: 1352-0504. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2007.00874.x.
- Bonner, James C (Aug. 2004). „Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases.“ In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 15.4, S. 255–73. ISSN: 1359-6101. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.006.
- Borne, Susanne W M van den, Javier Diez, W Matthijs Blankesteijn, Johan Verjans, Leo Hofstra und Jagat Narula (Jan. 2010). „Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts.“ In: *Nature reviews. Cardiology* 7 (1), S. 30–37. ISSN: 1759-5010. DOI: 10.1038/nrcardio.2009.199.
- Branda, Catherine S und Susan M Dymecki (Jan. 2004). „Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice.“ In: *Developmental cell* 6 (1), S. 7–28. ISSN: 1534-5807.
- Brandon-Warner, Elizabeth, Laura W Schrum, C Max Schmidt und Iain H McKillop (Dez. 2012). „Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men.“ In: *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* 46 (8), S. 715–725. ISSN: 1873-6823. DOI: 10.1016/j.alcohol.2012.08.004.

- Brenner, David A, Tatiana Kisseleva, David Scholten, Yong H Paik, Keiko Iwaisako, Sayaka Inokuchi, Bernd Schnabl, Ekihiro Seki, Samuele De Minicis, Christoph Oesterreicher und Kojiro Taura (2012). „Origin of myofibroblasts in liver fibrosis.“ In: *Fibrogenesis Tissue Repair* 5.Suppl 1, S17. ISSN: 1755-1536. DOI: 10.1186/1755-1536-5-S1-S17.
- Brew, Keith und Hideaki Nagase (Jan. 2010). „The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity.“ In: *Biochimica et biophysica acta* 1803 (1), S. 55–71. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
- Brunt, Elizabeth M (Feb. 2004). „Nonalcoholic steatohepatitis.“ In: *Seminars in liver disease* 24 (1), S. 3–20. ISSN: 0272-8087. DOI: 10.1055/s-2004-823098.
- Bryan, Brad A und Patricia A D'Amore (2008). „Pericyte isolation and use in endothelial/pericyte coculture models.“ In: *Methods in enzymology* 443, S. 315–331. ISSN: 1557-7988. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)02016-8.
- Bryan, Nathan S, Ka Bian und Ferid Murad (2009). „Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development.“ In: *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, S. 1–18. ISSN: 1093-4715.
- Buchwalow, Igor B, Thomas Podzuweit, Werner Bocker, Vera E Samoilova, Sylvia Thomas, Marlen Wellner, Hideo A Baba, Horst Robenek, Jürgen Schneckeburger und Markus M Lerch (Apr. 2002). „Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase.“ In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (6), S. 500–508. ISSN: 1530-6860.
- Burgermeister, Elke und Rony Seger (Juli 2007). „MAPK- Kinases as Nucleo-Cytoplasmic Shuttles for PPAR“. In: *Cell Cycle* 6.13, S. 1539–1548. ISSN: 1538-4101. DOI: 10.4161/cc.6.13.4453.
- Camp, H S und S R Tafuri (Apr. 1997). „Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase.“ In: *The Journal of biological chemistry* 272 (16), S. 10811–10816. ISSN: 0021-9258.
- Cassiman, David, Louis Libbrecht, Valeer Desmet, Carl Deneef und Tania Roskams (Feb. 2002). „Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers.“ In: *Journal of hepatology* 36 (2), S. 200–209. ISSN: 0168-8278.
- Chan-Ling, Tailoi, Matthew Philip Page, Tom Gardiner, Louise Baxter, Emilia Rosinova und Suzanne Hughes (Okt. 2004). „Desmin ensheathment ratio as an indicator of vessel stability: evidence in normal development and in retinopathy of prematurity.“ In: *The American journal of pathology* 165 (4), S. 1301–1313. ISSN: 0002-9440. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63389-5.
- Chawla, A. (Nov. 2001). „Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files“. In: *Science* 294.5548, S. 1866–1870. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.294.5548.1866.

- Cheng, Kun, Ningning Yang und Ram I Mahato (2009). „TGF-beta1 gene silencing for treating liver fibrosis.“ In: *Molecular pharmaceuticals* 6 (3), S. 772–779. ISSN: 1543-8384. DOI: 10.1021/mp9000469.
- Chu, Andrew S, Rosalyn Diaz, Jia-Ji J Hui, Kilangsun gla Yanger, Yiwei Zong, Gianfranco Alpini, Ben Z Stanger und Rebecca G Wells (Apr. 2011). „Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis.“ In: *Hepatology* 53.5, S. 1685–95. ISSN: 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.24206.
- Coen, Matteo, Giulio Gabbiani und Marie-Luce Bochaton-Piallat (Nov. 2011). „Myofibroblast-mediated adventitial remodeling: an underestimated player in arterial pathology.“ In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31 (11), S. 2391–2396. ISSN: 1524-4636. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.231548.
- Constandinou, Christothea, Neil Henderson und John P Iredale (2005). „Modeling liver fibrosis in rodents.“ In: *Methods in molecular medicine* 117, S. 237–250. ISSN: 1543-1894. DOI: 10.1385/1-59259-940-0:237.
- Coquil, J F, D J Franks, J N Wells, M Dupuis und P Hamet (Aug. 1980). „Characteristics of a new binding protein distinct from the kinase for guanosine 3':5'-monophosphate in rat platelets.“ In: *Biochimica et biophysica acta* 631 (1), S. 148–165. ISSN: 0006-3002.
- Courtoy, P J und J Boyles (Juni 1983). „Fibronectin in the microvasculature: localization in the pericyte-endothelial interstitium.“ In: *Journal of ultrastructure research* 83 (3), S. 258–273. ISSN: 0022-5320.
- Crane, BR, AS Arvai, DK Ghosh, C Wu, ED Getzoff, DJ Stuehr und JA Tainer (1998). „Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate.“ In: *Science* 279.5359, S. 2121–6. ISSN: 0036-8075.
- Craven, P A und F R DeRubertis (Dez. 1978). „Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation.“ In: *The Journal of biological chemistry* 253 (23), S. 8433–8443. ISSN: 0021-9258.
- D'Amore, P. A. (1990). „Culture and Study of Pericytes“. In: *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. Hrsg. von H. M. Piper. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 299–314. ISBN: 978-3-642-75262-9. DOI: 10.1007/978-3-642-75262-9_20. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-642-75262-9_20.
- Daley, William P, Sarah B Peters und Melinda Larsen (Feb. 2008). „Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine.“ In: *Journal of cell science* 121 (Pt 3), S. 255–264. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.006064.

- Dangel, O, E Mergia, K Karlisch, D Groneberg, D Koesling und A Friebe (Juni 2010). „Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition.“ In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 8 (6), S. 1343–1352. ISSN: 1538-7836. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03806.x.
- Darby, Ian A, Noraina Zakuan, Fabrice Billet und Alexis Desmoulière (März 2016). „The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair.“ In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73, S. 1145–1157. ISSN: 1420-9071. DOI: 10.1007/s00018-015-2110-0.
- Das, Amitava, Mithun Sinha, Soma Datta, Motaz Abas, Scott Chaffee, Chandan K Sen und Sashwati Roy (Okt. 2015). „Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration.“ In: *The American journal of pathology* 185 (10), S. 2596–2606. ISSN: 1525-2191. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.06.001.
- Davis, Gary L, James E Albright, Suzanne F Cook und Daniel M Rosenberg (Apr. 2003). „Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States.“ In: *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 9 (4), S. 331–338. ISSN: 1527-6465. DOI: 10.1053/jlts.2003.50073.
- Dechêne, Alexander, Jan-Peter P Sowa, Robert K Gieseler, Christoph Jochum, Lars P Bechmann, Amr El Fouly, Martin Schlattjan, Fuat Saner, Hideo A Baba, Andreas Paul, Volker Dries, Margarethe Odenthal, Guido Gerken, Scott L Friedman und Ali Canbay (Mai 2010). „Acute liver failure is associated with elevated liver stiffness and hepatic stellate cell activation.“ In: *Hepatology* 52.3, S. 1008–16. ISSN: 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.23754.
- DeLeve, Laurie D (Mai 2015). „Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis.“ In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61 (5), S. 1740–1746. ISSN: 1527-3350. DOI: 10.1002/hep.27376.
- DeLeve, Laurie D und Ana C Maretta-Mira (Nov. 2017). „Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update.“ In: *Seminars in liver disease* 37 (4), S. 377–387. ISSN: 1098-8971. DOI: 10.1055/s-0037-1617455.
- Desmoulière, A (Mai 1995). „Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis.“ In: *Cell biology international* 19 (5), S. 471–476. ISSN: 1065-6995. DOI: 10.1006/cbir.1995.1090.
- Desmoulière, Alexis, Christine Chaponnier und Giulio Gabbiani (2005). „Tissue repair, contraction, and the myofibroblast.“ In: *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 13 (1), S. 7–12. ISSN: 1067-1927. DOI: 10.1111/j.1067-1927.2005.130102.x.
- Diradourian, Claire, Jean Girard und Jean-Paul Pégrier (Jan. 2005). „Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance.“ In: *Biochimie* 87 (1), S. 33–38. ISSN: 0300-9084. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.11.010.

- Domenicali, Marco, Paolo Caraceni, Ferdinando Giannone, Maurizio Baldassarre, Giovanna Lucchetti, Carmelo Quarta, Corrado Patti, Lucia Catani, Cristina Nanni, Roberto M Lemoli und Mauro Bernardi (Dez. 2009). „A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse.“ In: *Journal of hepatology* 51 (6), S. 991–999. ISSN: 1600-0641. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.09.008.
- Dranoff, Jonathan A und Rebecca G Wells (Okt. 2010). „Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis.“ In: *Hepatology* 51.4, S. 1438–44. ISSN: 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.23405.
- Eberth, CJ (1871). „Handbuch der Lehre von der Gewegen des Menschen und der Tiere (Vol. 1)“. In: *Leipzig: Engelmann*.
- Eddy, Allison A (Okt. 2005). „Progression in chronic kidney disease.“ In: *Advances in chronic kidney disease* 12 (4), S. 353–365. ISSN: 1548-5595. DOI: 10.1053/j.ackd.2005.07.011.
- Eisenmann, K M, J B McCarthy, M A Simpson, P J Keely, J L Guan, K Tachibana, L Lim, E Manser, L T Furcht und J Iida (Dez. 1999). „Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas.“ In: *Nature cell biology* 1 (8), S. 507–513. ISSN: 1465-7392. DOI: 10.1038/70302.
- Engler, Adam J, Shamik Sen, H Lee Sweeney und Dennis E Discher (Aug. 2006). „Matrix elasticity directs stem cell lineage specification.“ In: *Cell* 126 (4), S. 677–689. ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- Erdmann, Erland, Marc J Semigran, Markku S Nieminen, Mihai Gheorghide, Rahul Agrawal, Veselin Mitrovic und Alexandre Mebazaa (Jan. 2013). „Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure.“ In: *European heart journal* 34 (1), S. 57–67. ISSN: 1522-9645. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs196.
- Evans, Rachel Anna, Ya Chung Tian, Robert Steadman und Aled Owain Phillips (Jan. 2003). „TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins.“ In: *Experimental cell research* 282 (2), S. 90–100. ISSN: 0014-4827.
- Evgenov, Oleg V, Pál Pacher, Peter M Schmidt, György Haskó, Harald H H W Schmidt und Johannes-Peter Stasch (Sep. 2006). „NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential.“ In: *Nature reviews. Drug discovery* 5 (9), S. 755–768. ISSN: 1474-1776. DOI: 10.1038/nrd2038.
- Fallowfield, Jonathan A, Masashi Mizuno, Timothy J Kendall, Christothea M Constandinou, R Christopher Benyon, Jeremy S Duffield und John P Iredale (Apr. 2007). „Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis.“ In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (8), S. 5288–5295. ISSN: 0022-1767.

- Fathke, Carrie, Lynne Wilson, Jonathan Hutter, Vishal Kapoor, Andria Smith, Anne Hocking und Frank Isik (Sep. 2004). „Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair.“ In: *Stem Cells* 22.5, S. 812–22. ISSN: 1066-5099. DOI: 10.1634/stemcells.22-5-812.
- Fehsel, K, A Jalowy, S Qi, V Burkart, B Hartmann und H Kolb (März 1993). „Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide.“ In: *Diabetes* 42 (3), S. 496–500. ISSN: 0012-1797.
- Feil, R, J Wagner, D Metzger und P Chambon (Aug. 1997). „Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains.“ In: *Biochemical and biophysical research communications* 237 (3), S. 752–757. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7124.
- Feil, Susanne, Nadejda Valtcheva und Robert Feil (2009). *Inducible Cre Mice*. Bd. 530. Springer-link. ISBN: 9781934115268. DOI: 10.1007/978-1-59745-471-1_18.
- Feng, Xin-Hua und Rik Derynck (2005). „Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads.“ In: *Annual review of cell and developmental biology* 21, S. 659–693. ISSN: 1081-0706. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018.
- Fernandez, Isis E und Oliver Eickelberg (Aug. 2012). „New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis.“ In: *Lancet (London, England)* 380 (9842), S. 680–688. ISSN: 1474-547X. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61144-1.
- Fischer, Richard, Alexandra Cariers, Roland Reinehr und Dieter Häussinger (Sep. 2002). „Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells.“ In: *Gastroenterology* 123 (3), S. 845–861. ISSN: 0016-5085.
- Flores-Costa, Roger, José Alcaraz-Quiles, Esther Titos, Cristina López-Vicario, Mireia Casulleras, Marta Duran-Güell, Bibiana Rius, Alba Diaz, Katherine Hall, Courtney Shea, Renee Sarno, Mark Currie, Jaime L Masferrer und Joan Clària (März 2018). „The soluble guanylate cyclase stimulator IW-1973 prevents inflammation and fibrosis in experimental non-alcoholic steatohepatitis.“ In: *British journal of pharmacology* 175 (6), S. 953–967. ISSN: 1476-5381. DOI: 10.1111/bph.14137.
- Foerster, John, Christian Harteneck, Jürgen Malkewitz, Günter Schultz und Doris Koesling (1996). „A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits“. In: *European journal of biochemistry* 240.2, S. 380–386.
- Förstermann, U, El Closs, JS Pollock, M Nakane, P Schwarz, I Gath und H Kleinert (1994). „Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.“ In: *Hypertension* 23.6 Pt 2, S. 1121–31. ISSN: 0194-911X.

- Förstermann, U, A Mülsch, E Böhme und R Busse (Apr. 1986). „Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries.“ In: *Circulation research* 58 (4), S. 531–538. ISSN: 0009-7330.
- Förstermann, Ulrich und William C Sessa (Apr. 2012). „Nitric oxide synthases: regulation and function.“ In: *European heart journal* 33 (7), 829–37, 837a–837d. ISSN: 1522-9645. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- Francis, S H, T M Lincoln und J D Corbin (Jan. 1980). „Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung.“ In: *The Journal of biological chemistry* 255 (2), S. 620–626. ISSN: 0021-9258.
- Francis, S H, I V Turko und J D Corbin (2001). „Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function.“ In: *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 65, S. 1–52. ISSN: 0079-6603.
- Frantz, Christian, Kathleen M Stewart und Valerie M Weaver (Dez. 2010). „The extracellular matrix at a glance.“ In: *Journal of cell science* 123 (Pt 24), S. 4195–4200. ISSN: 1477-9137. DOI: 10.1242/jcs.023820.
- Friebe, Andreas und Doris Koesling (2003). „Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase.“ In: *Circ. Res.* 93.2, S. 96–105. ISSN: 0009-7330. DOI: 10.1161/01.RES.0000082524.34487.31.
- (2009). „The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models.“ In: *Nitric oxide : biology and chemistry* 21 (3-4), S. 149–156. ISSN: 1089-8611. DOI: 10.1016/j.niox.2009.07.004.
- Friebe, Andreas, Evanthia Mergia, Oliver Dangel, Alexander Lange und Doris Koesling (Mai 2007). „Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18), S. 7699–7704. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0609778104.
- Friedman, Scott L (1999). „Cytokines and fibrogenesis.“ In: *Seminars in liver disease* 19.02 (2), S. 129–140. ISSN: 0272-8087. DOI: 10.1055/s-2007-1007105.
- (Jan. 2000). „Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury.“ In: *The Journal of biological chemistry* 275 (4), S. 2247–2250. ISSN: 0021-9258.
- (Jan. 2008). „Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver.“ In: *Physiological reviews* 88 (1), S. 125–172. ISSN: 0031-9333. DOI: 10.1152/physrev.00013.2007.
- Friedman, Scott L, F J Roll, J Boyles und D M Bissell (Dez. 1985). „Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (24), S. 8681–8685. ISSN: 0027-8424.

- Friedman, Scott L, Dean Sheppard, Jeremy S Duffield und Shelia Violette (Jan. 2013). „Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line.“ In: *Science translational medicine* 5 (167), 167sr1. ISSN: 1946-6242. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004700.
- Fu, Mingui, Jifeng Zhang, Yimin Lin, Xiaojun Zhu, Luning Zhao, Mushtaq Ahmad, Markus U Ehrengreber und Yuqing E Chen (März 2003). „Early stimulation and late inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene expression by transforming growth factor beta in human aortic smooth muscle cells: role of early growth-response factor-1 (Egr-1), activator protein 1 (AP1) and Smads.“ In: *The Biochemical journal* 370 (Pt 3), S. 1019–1025. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/BJ20021503.
- Fukao, M, H S Mason, F C Britton, J L Kenyon, B Horowitz und K D Keef (Apr. 1999). „Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072.“ In: *The Journal of biological chemistry* 274 (16), S. 10927–10935. ISSN: 0021-9258.
- Furchgott, R F und D Jothianandan (1991). „Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light.“ In: *Blood vessels* 28 (1-3), S. 52–61. ISSN: 0303-6847.
- Furchgott, RF und JV Zawadzki (1980). „The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.“ In: *Nature* 288.5789, S. 373–6. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/288373a0.
- Garbers, D L, T D Chrisman, J L Suddath und J G Hardman (Jan. 1975). „Formation of pyrophosphate by soluble guanylate cyclase from rat lung.“ In: *Archives of biochemistry and biophysics* 166 (1), S. 135–138. ISSN: 0003-9861.
- Garthwaite, J, SL Charles und Chess-Williams R (1988). „Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.“ In: *Nature* 336.6197, S. 385–8. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/336385a0.
- George, J, K R Rao, R Stern und G Chandrakasan (Jan. 2001). „Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen.“ In: *Toxicology* 156 (2-3), S. 129–138. ISSN: 0300-483X.
- Gerhardt, H und C Betsholtz (Okt. 2003). „Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis“. In: *Cell and tissue research* 314.1, S. 15–23. ISSN: 0302-766X. DOI: 10.1007/s00441-003-0745-x.
- Gerhardt, H, H Wolburg und C Redies (Juli 2000). „N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken.“ In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 218 (3), S. 472–479. ISSN: 1058-8388. DOI: 10.1002/1097-0177(200007)218:3<472::AID-DVDY1008>3.0.CO;2-#.

- Gerzer, R, E Böhme, F Hofmann und G Schultz (Sep. 1981). „Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper.“ In: *FEBS letters* 132 (1), S. 71–74. ISSN: 0014-5793.
- Ghofrani, Hossein-Ardeschir, Andrea M D'Armini, Friedrich Grimminger, Marius M Hoeper, Pavel Jansa, Nick H Kim, Eckhard Mayer, Gerald Simonneau, Martin R Wilkins, Arno Fritsch, Dieter Neuser, Gerrit Weimann, Chen Wang und CHEST-1 Study Group (Juli 2013). „Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.“ In: *The New England journal of medicine* 369 (4), S. 319–329. ISSN: 1533-4406. DOI: 10.1056/NEJMoa1209657.
- Ghosh, Asish K, Swati Bhattacharyya, Gabriella Lakos, ShuJen Chen, Yasuji Mori und John Varga (2004). „Disruption of transforming growth factor signaling and profibrotic responses in normal skin fibroblasts by peroxisome proliferator-activated receptor “. In: *Arthritis Rheumatism* 50.4, S. 1305–1318. ISSN: 1529-0131. DOI: 10.1002/art.20104.
- Gibbons, Michael A, Alison C MacKinnon, Prakash Ramachandran, Kevin Dhaliwal, Rodger Duffin, Alexander T Phythian-Adams, Nico van Rooijen, Christopher Haslett, Sarah E Howie, A John Simpson, Nikhil Hirani, Jack Gauldie, John P Iredale, Tariq Sethi und Stuart J Forbes (Sep. 2011). „Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 184 (5), S. 569–581. ISSN: 1535-4970. DOI: 10.1164/rccm.201010-1719OC.
- Gratzke, Christian, Javier Angulo, Kanchan Chitale, Yu-Tian Dai, Noel N Kim, Jaw-Seung Paick, Ulf Simonsen, Stefan Uckert, Eric Wespes, Karl E Andersson, Tom F Lue und Christian G Stief (Jan. 2010). „Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction.“ In: *The journal of sexual medicine* 7 (1 Pt 2), S. 445–475. ISSN: 1743-6109. DOI: 10.1111/j.1743-6109.2009.01624.x.
- Grimminger, F, G Weimann, R Frey, R Voswinckel, M Thamm, D Bölkow, N Weissmann, W Mück, S Unger, G Wensing, R T Schermuly und H A Ghofrani (Apr. 2009). „First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension.“ In: *The European respiratory journal* 33 (4), S. 785–792. ISSN: 1399-3003. DOI: 10.1183/09031936.00039808.
- Groneberg, Dieter, Peter König, Angela Wirth, Stefan Offermanns, Doris Koesling und Andreas Friebe (Jan. 2010). „Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice.“ In: *Circulation* 121 (3), S. 401–409. ISSN: 1524-4539. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.890962.
- Gurtner, Geoffrey C., Sabine Werner, Yann Barrandon und Michael T. Longaker (Mai 2008). „Wound repair and regeneration“. In: *Nature* 453.7193, S. 314–321. DOI: 10.1038/nature07039.
- Han, Robin N N und Duncan J Stewart (Jan. 2006). „Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice.“ In: *Trends in cardiovascular medicine* 16 (1), S. 29–34. ISSN: 1050-1738. DOI: 10.1016/j.tcm.2005.11.004.

- Harteneck, C, B Wedel, D Koesling, J Malkewitz, E Böhme und G Schultz (Nov. 1991). „Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme.“ In: *FEBS letters* 292 (1-2), S. 217–222. ISSN: 0014-5793.
- Hazra, Saswati, Takeo Miyahara, Richard A Rippe und Hidekazu Tsukamoto (Jan. 2004a). „PPAR Gamma and Hepatic Stellate Cells.“ In: *Comparative hepatology* 3 Suppl 1, S7. ISSN: 1476-5926. DOI: 10.1186/1476-5926-2-S1-S7.
- Hazra, Saswati, Shigang Xiong, Jiaohong Wang, Richard A Rippe, V Krishna, K Chatterjee und Hidekazu Tsukamoto (März 2004b). „Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells.“ In: *The Journal of biological chemistry* 279 (12), S. 11392–11401. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M310284200.
- Hecker, Louise, Rajesh Jagirdar, Toni Jin und Victor J Thannickal (Aug. 2011). „Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD.“ In: *Experimental cell research* 317 (13), S. 1914–1921. ISSN: 1090-2422. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.03.016.
- Heldin, C H, K Miyazono und P ten Dijke (Dez. 1997). „TGF- signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins“. In: *Nature* 390 (6659), S. 465–471. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/37284.
- Heldin, CH und B Westermark (Jan. 1999). „Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor.“ In: *Physiol. Rev.* 79.4, S. 1283–316. ISSN: 0031-9333. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.4.1283.
- Hellerbrand, C, B Stefanovic, F Giordano, E R Burchardt und D A Brenner (Jan. 1999). „The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo.“ In: *Journal of hepatology* 30 (1), S. 77–87. ISSN: 0168-8278.
- Hellerbrand, Claus (Juni 2013). „Hepatic stellate cells—the pericytes in the liver.“ In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 465 (6), S. 775–778. ISSN: 1432-2013. DOI: 10.1007/s00424-012-1209-5.
- Henderson, Neil C, Thomas D Arnold, Yoshio Katamura, Marilyn M Giacomini, Juan D Rodriguez, McCarty, Joseph H, Antonella Pellicoro, Elisabeth Raschperger, Christer Betsholtz, Peter G Ruminski, David W Griggs, Michael J Prinsen, Jacquelyn J Maher, John P Iredale, Lacy-Hulbert Adam, Ralf H Adams und Dean Sheppard (2013). „Targeting of αv integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs“. In: *Nature* 19.12, S. 1617–1624. ISSN: 1078-8956. DOI: 10.1038/nm.3282.
- Hinz, B, G Celetta, J J Tomasek, G Gabbiani und C Chaponnier (Sep. 2001). „Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity.“ In: *Molecular biology of the cell* 12 (9), S. 2730–2741. ISSN: 1059-1524. DOI: 10.1091/mbc.12.9.2730.

- Hinz, Boris (Juli 2012). „Mechanical aspects of lung fibrosis: a spotlight on the myofibroblast.“ In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 9 (3), S. 137–147. ISSN: 1943-5665. DOI: 10.1513/pats.201202-017AW.
- (Jan. 2016). „Myofibroblasts.“ In: *Experimental eye research* 142, S. 56–70. ISSN: 1096-0007. DOI: 10.1016/j.exer.2015.07.009.
- Hinz, Boris und Giulio Gabbiani (Nov. 2010). „Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives.“ In: *F1000 biology reports* 2, S. 78. ISSN: 1757-594X. DOI: 10.3410/B2-78.
- Hinz, Boris, Sem H Phan, Victor J Thannickal, Andrea Galli, Marie-Luce Bochaton-Piallat und Giulio Gabbiani (Juni 2007). „The myofibroblast: one function, multiple origins.“ In: *The American journal of pathology* 170 (6), S. 1807–1816. ISSN: 0002-9440. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070112.
- Hinz, Boris, Sem H Phan, Victor J Thannickal, Marco Prunotto, Alexis Desmoulière, John Varga, Olivier De Wever, Marc Mareel und Giulio Gabbiani (Apr. 2012). „Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling.“ In: *The American journal of pathology* 180 (4), S. 1340–1355. ISSN: 1525-2191. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.02.004.
- Hochreiter-Hufford, Amelia und Kodi S Ravichandran (2013). „Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion“. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.1, a008748. ISSN: 1943-0264. DOI: 10.1101/cshperspect.a008748.
- Hofmann, F, A Ammendola und J Schlossmann (Mai 2000). „Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases.“ In: *Journal of cell science* 113 (Pt 10), S. 1671–1676. ISSN: 0021-9533.
- Hofmann, F, R Feil, T Kleppisch und Jens Schlossmann (2006). „Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion“. In: *Physiological reviews* 86.1, S. 1–23.
- Hofmann, Franz, Dominik Bernhard, Robert Lukowski und Pascal Weinmeister (2009). „cGMP regulated protein kinases (cGK).“ In: *Handbook of experimental pharmacology* (191), S. 137–162. ISSN: 0171-2004. DOI: 10.1007/978-3-540-68964-5_8.
- Hosooka, Tetsuya, Tetsuya Noguchi, Ko Kotani, Takehiro Nakamura, Hiroshi Sakaue, Hiroshi Inoue, Wataru Ogawa, Kazutoshi Tobimatsu, Kazuo Takazawa, Mashito Sakai, Yasushi Matsuki, Ryuji Hiramatsu, Tomoharu Yasuda, Mitchell A Lazar, Yuji Yamanashi und Masato Kasuga (Jan. 2008). „Dok1 mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and obesity through modulation of PPAR- phosphorylation“. In: *Nature Medicine* 14.2, S. 188–193. ISSN: 1078-8956. DOI: 10.1038/nm1706.
- Houdebine, Louis-Marie (2007). „Transgenic animal models in biomedical research.“ In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 360, S. 163–202. ISSN: 1064-3745. DOI: 10.1385/1-59745-165-7:163.

- Huang, Feng-Ju, Weon-Kyoo You, Paolo Bonaldo, Thomas N Seyfried, Elena B Pasquale und William B Stallcup (2010). „Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse“. In: *Developmental biology* 344.2, S. 1035–1046.
- Huang, Sharon A und Janette D Lie (Juli 2013). „Phosphodiesterase-5 (PDE5) Inhibitors In the Management of Erectile Dysfunction.“ In: *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* 38 (7), S. 407–419. ISSN: 1052-1372.
- Hughes, Suzanne und Tailoi Chan-Ling (Aug. 2004). „Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo.“ In: *Investigative ophthalmology & visual science* 45 (8), S. 2795–2806. ISSN: 0146-0404. DOI: 10.1167/iovs.03-1312.
- Humbert, P, F Niroomand, G Fischer, B Mayer, D Koesling, K D Hinsch, H Gausepohl, R Frank, G Schultz und E Böhme (Juni 1990). „Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method.“ In: *European journal of biochemistry* 190 (2), S. 273–278. ISSN: 0014-2956.
- Hung, Chi, Geoffrey Linn, Yu-Hua Chow, Akio Kobayashi, Kristen Mittelsteadt, William A Altemeier, Sina A Gharib, Lynn M Schnapp und Jeremy S Duffield (Okt. 2013). „Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis.“ In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 188 (7), S. 820–830. ISSN: 1535-4970. DOI: 10.1164/rccm.201212-2297OC.
- Hwang, Tsong-Long, Chin-Chung Wu und Che-Ming Teng (1998). „Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea“. In: *British journal of pharmacology* 125.6, S. 1158–1163.
- Hynes, Richard O (Nov. 2009). „The extracellular matrix: not just pretty fibrils.“ In: *Science (New York, N.Y.)* 326 (5957), S. 1216–1219. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1176009.
- Ignarro, L J (Juli 1990). „Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling.“ In: *Pharmacology & toxicology* 67 (1), S. 1–7. ISSN: 0901-9928.
- Ignarro, L J, JB Adams, PM Horwitz und KS Wood (1986a). „Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 261.11, S. 4997–5002.
- Ignarro, L J, G M Buga, K S Wood, R E Byrns und G Chaudhuri (Dez. 1987). „Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24), S. 9265–9269. ISSN: 0027-8424.
- Ignarro, L J, P A Bush, G M Buga, K S Wood, J M Fukuto und J Rajfer (Juli 1990). „Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum

- smooth muscle.“ In: *Biochemical and biophysical research communications* 170 (2), S. 843–850. ISSN: 0006-291X.
- Ignarro, L J, R G Harbison, K S Wood und P J Kadowitz (Juni 1986b). „Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid.“ In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 237 (3), S. 893–900. ISSN: 0022-3565.
- limuro, Yuji, Toshihiro Nishio, Taisuke Morimoto, Takashi Nitta, Branko Stefanovic, Sung Kyu Choi, David A Brenner und Yoshio Yamaoka (Feb. 2003). „Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat.“ In: *Gastroenterology* 124 (2), S. 445–458. ISSN: 0016-5085. DOI: 10.1053/gast.2003.50063.
- Iizuka, Norio, Masaaki Oka, Hisafumi Yamada-Okabe, Naohide Mori, Takao Tamesa, Toshimasa Okada, Norikazu Takemoto, Kiichiro Hashimoto, Akira Tangoku, Kenji Hamada, Hironobu Nakayama, Takanobu Miyamoto, Shunji Uchimura und Yoshihiko Hamamoto (Mai 2003). „Differential gene expression in distinct virologic types of hepatocellular carcinoma: association with liver cirrhosis.“ In: *Oncogene* 22 (19), S. 3007–3014. ISSN: 0950-9232. DOI: 10.1038/sj.onc.1206401.
- Iredale, J P, R C Benyon, M J Arthur, W F Ferris, R Alcolado, P J Winwood, N Clark und G Murphy (Juli 1996). „Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis.“ In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 24 (1), S. 176–184. ISSN: 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.510240129.
- Iredale, John P (Aug. 2008). „Defining therapeutic targets for liver fibrosis: exploiting the biology of inflammation and repair.“ In: *Pharmacological research* 58 (2), S. 129–136. ISSN: 1043-6618. DOI: 10.1016/j.phrs.2008.06.011.
- Iredale, John P, R C Benyon, J Pickering, M McCullen, M Northrop, S Pawley, C Hovell und M J Arthur (Aug. 1998). „Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors.“ In: *The Journal of clinical investigation* 102 (3), S. 538–549. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI1018.
- Iredale, John P, Alexandra Thompson und Neil C Henderson (Juli 2013). „Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation.“ In: *Biochimica et biophysica acta* 1832 (7), S. 876–883. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.11.002.
- Ito, Toshio und M. Nemoto (Okt. 1952). „Kupfer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver.“ In: *Okajimas folia anatomica Japonica* 24 (4), S. 243–258. ISSN: 0030-154X.
- Itoh, Toshimasa, Louise Fairall, Kush Amin, Yuka Inaba, Attila Szanto, Balint L Balint, Laszlo Nagy, Keiko Yamamoto und John W R Schwabe (Sep. 2008). „Structural basis for the activation of

- PPARgamma by oxidized fatty acids.“ In: *Nature structural & molecular biology* 15 (9), S. 924–931. ISSN: 1545-9993.
- Iwano, Masayuki, David Plieth, Theodore M Danoff, Chengsen Xue, Hirokazu Okada und Eric G Neilson (Aug. 2002). „Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis.“ In: *The Journal of clinical investigation* 110 (3), S. 341–350. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI15518.
- Jiao, Jingjing, David Sastre, Maria Fiel, Ursula E Lee, GhiassiNejad Zahra, Florent Ginhoux, Eric Vivier, Scott L Friedman, Miriam Merad und Costica Aloman (2012). „Dendritic cell regulation of carbon tetrachlorideinduced murine liver fibrosis regression“. In: *Hepatology* 55.1, S. 244–255. ISSN: 1527-3350. DOI: 10.1002/hep.24621.
- Jonker, Johan W, Catherine A M Stedman, Christopher Liddle und Michael Downes (Juni 2009). „Hepatobiliary ABC transporters: physiology, regulation and implications for disease.“ In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14, S. 4904–4920. ISSN: 1093-4715.
- Jun, Joon-Il und Lester F Lau (Jan. 2018). „Resolution of organ fibrosis.“ In: *The Journal of clinical investigation* 128 (1), S. 97–107. ISSN: 1558-8238. DOI: 10.1172/JCI93563.
- Kannan, MS und DE Johnson (1995). „Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels“. In: *Life sciences* 56.25, S. 2229–2238.
- Karlmark, Karlin Raja, Ralf Weiskirchen, Henning W Zimmermann, Nikolaus Gassler, Florent Ginhoux, Christian Weber, Miriam Merad, Tom Luedde, Christian Trautwein und Frank Tacke (Juli 2009). „Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis.“ In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50 (1), S. 261–274. ISSN: 1527-3350. DOI: 10.1002/hep.22950.
- Kass, David A, Hunter C Champion und Joseph A Beavo (Nov. 2007). „Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation.“ In: *Circulation research* 101 (11), S. 1084–1095. ISSN: 1524-4571. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.162511.
- Kawada, N, T A Tran-Thi, H Klein und K Decker (Apr. 1993). „The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus.“ In: *European journal of biochemistry* 213 (2), S. 815–823. ISSN: 0014-2956.
- Keilbach, A, P Ruth und F Hofmann (Sep. 1992). „Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies.“ In: *European journal of biochemistry* 208 (2), S. 467–473. ISSN: 0014-2956.
- Kim, Kevin K, Matthias C Kugler, Paul J Wolters, Liliane Robillard, Michael G Galvez, Alexis N Brumwell, Dean Sheppard und Harold A Chapman (Aug. 2006). „Alveolar epithelial cell

- mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35), S. 13180–13185. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0605669103.
- Kiss, Balázs und Miklós S Z Kellermayer (Juni 2014). „Stretching desmin filaments with receding meniscus reveals large axial tensile strength.“ In: *Journal of structural biology* 186 (3), S. 472–480. ISSN: 1095-8657. DOI: 10.1016/j.jsb.2014.04.004.
- Kisseleva, Tatiana und David A Brenner (Apr. 2008). „Fibrogenesis of parenchymal organs.“ In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 5 (3), S. 338–342. ISSN: 1546-3222. DOI: 10.1513/pats.200711-168DR.
- Kisseleva, Tatiana, Min Cong, Yonghan Paik, David Scholten, Chunyan Jiang, Chris Benner, Keiko Iwaisako, Thomas Moore-Morris, Brian Scott, Hidekazu Tsukamoto, Sylvia M Evans, Wolfgang Dillmann, Christopher K Glass und David A Brenner (Juni 2012). „Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (24), S. 9448–9453. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1201840109.
- Kluwe, Johannes, Nuttaporn Wongsiriroj, Juliane S Troeger, Geum-Youn Y Gwak, Dianne H Dapito, Jean-Philippe P Pradere, Hongfeng Jiang, Maham Siddiqi, Roseann Piantedosi, O’Byrne, Sheila M, William S Blaner und Robert F Schwabe (Jan. 2011). „Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis.“ In: *Gut* 60.9, S. 1260–8. ISSN: 0017-5749. DOI: 10.1136/gut.2010.209551.
- Knowles, R G, M Palacios, R M Palmer und S Moncada (Juli 1989). „Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (13), S. 5159–5162. ISSN: 0027-8424.
- Koesters, Robert, Brigitte Kaissling, Michel Lehir, Nicolas Picard, Franziska Theilig, Rolf Gebhardt, Adam B Glick, Brunhilde Hähnel, Hiltraud Hosser, Hermann-Josef Gröne und Wilhelm Kriz (Aug. 2010). „Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells.“ In: *The American journal of pathology* 177 (2), S. 632–643. ISSN: 1525-2191. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091012.
- Kretzschmar, Kai und Fiona M Watt (Jan. 2012). „Lineage tracing.“ In: *Cell* 148 (1-2), S. 33–45. ISSN: 1097-4172. DOI: 10.1016/j.cell.2012.01.002.
- Krizhanovsky, Valery, Monica Yon, Ross A Dickins, Stephen Hearn, Janelle Simon, Cornelius Miething, Herman Yee, Lars Zender und Scott W Lowe (2008). „Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis.“ In: *Cell* 134.4, S. 657–67. ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2008.06.049.

- Krueger, Martin und Ingo Bechmann (Jan. 2010). „CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out.“ In: *Glia* 58 (1), S. 1–10. ISSN: 1098-1136. DOI: 10.1002/glia.20898.
- Kubes, P, M Suzuki und D N Granger (Juni 1991). „Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (11), S. 4651–4655. ISSN: 0027-8424.
- Kuhn, Michaela (Okt. 2003). „Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A.“ In: *Circulation research* 93 (8), S. 700–709. ISSN: 1524-4571. DOI: 10.1161/01.RES.0000094745.28948.4D.
- Kupffer, C (Dez. 1876). „Ueber Sternzellen der Leber.“ In: *Archiv Für Mikroskopische Anatomie* 12.1, S. 353–358. ISSN: 0176-7364. DOI: 10.1007/BF02933897.
- Kutcher, Matthew E und Ira M Herman (Mai 2009). „The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow.“ In: *Microvascular research* 77 (3), S. 235–246. ISSN: 1095-9319. DOI: 10.1016/j.mvr.2009.01.007.
- Laemmli, U K (Aug. 1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. ISSN: 0028-0836.
- Lambers, Christopher, Michael Roth, Elisabeth Hofbauer, Venzel Petkov und Lutz-Henning Block (2014). „Anti-remodeling potencies of the soluble guanylate cyclase activator BAY 41-2272 in human lung fibroblasts.“ In: *European Respiratory Journal* 44.Suppl 58. ISSN: 0903-1936. URL: https://erj.ersjournals.com/content/44/Suppl_58/3423.
- Landgraf, W, F Hofmann, J T Pelton und J P Huggins (Okt. 1990). „Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP dependent protein kinase and analysis of the enzyme's amino-terminal domain by far-ultraviolet circular dichroism.“ In: *Biochemistry* 29 (42), S. 9921–9928. ISSN: 0006-2960.
- Leroy, Vincent, Frederique Monier, Serge Bottari, Candice Trocme, Nathalie Sturm, Marie-Noëlle Hilleret, Françoise Morel und Jean-Pierre Zarski (Feb. 2004). „Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid.“ In: *The American journal of gastroenterology* 99 (2), S. 271–279. ISSN: 0002-9270.
- Li, Xiangnong, Irving S Benjamin und Barry Alexander (Apr. 2002). „Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality.“ In: *Journal of hepatology* 36 (4), S. 488–493. ISSN: 0168-8278.
- Li, Z, M Mericskay, O Agbulut, G Butler-Browne, L Carlsson, L E Thornell, C Babinet und D Paulin (Okt. 1997). „Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle.“ In: *The Journal of cell biology* 139 (1), S. 129–144. ISSN: 0021-9525.

- Lichtinghagen, R, T Helmbrecht, B Arndt und K H Böker (Feb. 1995). „Expression pattern of matrix metalloproteinases in human liver.“ In: *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 33 (2), S. 65–71. ISSN: 0939-4974.
- Liedtke, Christian, Tom Luedde, Tilman Sauerbruch, David Scholten, Konrad Streetz, Frank Tacke, René Tolba, Christian Trautwein, Jonel Trebicka und Ralf Weiskirchen (Okt. 2013). „Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects.“ In: *Fibrogenesis & tissue repair* 6 (1), S. 19. ISSN: 1755-1536. DOI: 10.1186/1755-1536-6-19.
- Lies, Barbara, Katharina Beck, Jonas Keppler, Dieter Saur, Dieter Groneberg und Andreas Friebe (Okt. 2015). „Nitroergic signalling via interstitial cells of Cajal regulates motor activity in murine colon.“ In: *The Journal of physiology* 593 (20), S. 4589–4601. ISSN: 1469-7793. DOI: 10.1113/JP270511.
- Lin, C S, A Lau, R Tu und T F Lue (Feb. 2000). „Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum.“ In: *Biochemical and biophysical research communications* 268 (2), S. 628–635. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2187.
- Lincoln, T M (1989). „Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation.“ In: *Pharmacology & therapeutics* 41 (3), S. 479–502. ISSN: 0163-7258.
- Lincoln, T M, M Thompson und T L Cornwell (Nov. 1988). „Purification and characterization of two forms of cyclic GMP-dependent protein kinase from bovine aorta.“ In: *The Journal of biological chemistry* 263 (33), S. 17632–17637. ISSN: 0021-9258.
- Lincoln, Thomas M, Xing Wu, Hassan Sellak, Nupur Dey und Chung-Sik Choi (Jan. 2006). „Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase.“ In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11, S. 356–367. ISSN: 1093-9946.
- Lindhahl, P, BR Johansson, P Levéen und C Betsholtz (1997). „Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice.“ In: *Science* 277.5323, S. 242–5. ISSN: 0036-8075.
- Lindblom, Per, Holger Gerhardt, Stefan Liebner, Alexandra Abramsson, Maria Enge, Mats Hellstrom, Gudrun Backstrom, Simon Fredriksson, Ulf Landegren, Henrik C Nystrom, Goran Bergstrom, Elisabetta Dejana, Arne Ostman, Per Lindahl und Christer Betsholtz (Aug. 2003). „Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall.“ In: *Genes & development* 17 (15), S. 1835–1840. ISSN: 0890-9369. DOI: 10.1101/gad.266803.
- Liu, Fei, Justin D Mih, Barry S Shea, Alvin T Kho, Asma S Sharif, Andrew M Tager und Daniel J Tschumperlin (Aug. 2010). „Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression.“ In: *The Journal of cell biology* 190 (4), S. 693–706. ISSN: 1540-8140. DOI: 10.1083/jcb.201004082.

- Liu, Xiao, Jun Xu, David A Brenner und Tatiana Kisseleva (Sep. 2013). „Reversibility of Liver Fibrosis and Inactivation of Fibrogenic Myofibroblasts.“ In: *Current pathobiology reports* 1 (3), S. 209–214. ISSN: 2167-485X. DOI: 10.1007/s40139-013-0018-7.
- Liu, Yuqing, Eric Lik Hang Lui, Scott L Friedman, Lei Li, Tao Ye, Yongjun Chen, Ronnie T Poon, Jana Wo, Tsz Wai Kok und Sheung Tat Fan (Feb. 2009). „PTK787/ZK22258 attenuates stellate cell activation and hepatic fibrosis in vivo by inhibiting VEGF signaling.“ In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89 (2), S. 209–221. ISSN: 1530-0307. DOI: 10.1038/labinvest.2008.127.
- Lohmann, S M, A B Vaandrager, A Smolenski, U Walter und H R De Jonge (Aug. 1997). „Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases.“ In: *Trends in biochemical sciences* 22 (8), S. 307–312. ISSN: 0968-0004.
- Loughney, K, T R Hill, V A Florio, L Uher, G J Rosman, S L Wolda, B A Jones, M L Howard, L M McAllister-Lucas, W K Sonnenburg, S H Francis, J D Corbin, J A Beavo und K Ferguson (Aug. 1998). „Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase.“ In: *Gene* 216 (1), S. 139–147. ISSN: 0378-1119.
- Lukowski, Robert, Pascal Weinmeister, Dominik Bernhard, Susanne Feil, Michael Gotthardt, Joachim Herz, Steffen Massberg, Alma Zerneck, Christian Weber, Franz Hofmann und Robert Feil (Juli 2008). „Role of smooth muscle cGMP/cGKI signaling in murine vascular restenosis.“ In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28 (7), S. 1244–1250. ISSN: 1524-4636. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.166405.
- Lüllmann-Rauch, R. und F. Paulsen (10. Okt. 2012). *Taschenlehrbuch Histologie*. DeL. Thieme. 694 S. ISBN: 9783131516640. URL: <https://books.google.de/books?id=s8eCBtGUzxcC>.
- Madisen, Linda, Theresa A Zwingman, Susan M Sunkin, Seung Wook Oh, Hatim A Zariwala, Hong Gu, Lydia L Ng, Richard D Palmiter, Michael J Hawrylycz, Allan R Jones, Ed S Lein und Hongkui Zeng (Jan. 2010). „A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain.“ In: *Nature neuroscience* 13.1 (1), S. 133–140. ISSN: 1546-1726. DOI: 10.1038/nn.2467.
- Mandarino, L J, N Sundarraj, J Finlayson und H R Hassell (Nov. 1993). „Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro.“ In: *Experimental eye research* 57 (5), S. 609–621. ISSN: 0014-4835.
- Mantovani, Alberto, Antonio Sica, Silvano Sozzani, Paola Allavena, Annunziata Vecchi und Massimo Locati (2004). „The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.“ In: *Trends Immunol.* 25.12, S. 677–86. ISSN: 1471-4906. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015.

Marra, F (Dez. 1999). „Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation.“ In: *Journal of hepatology* 31 (6), S. 1120–1130. ISSN: 0168-8278.

Marra, F, M C Arrighi, M Fazi, A Caligiuri, M Pinzani, R G Romanelli, E Efsen, G Laffi und P Gentilini (Okt. 1999). „Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor’s actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat.“ In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 30 (4), S. 951–958. ISSN: 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.510300406.

Marra, Fabio und Frank Tacke (Sep. 2014). „Roles for chemokines in liver disease.“ In: *Gastroenterology* 147 (3), 577–594.e1. ISSN: 1528-0012. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.06.043.

Massagué, J (1998). „TGF-beta signal transduction.“ In: *Annual review of biochemistry* 67, S. 753–791. ISSN: 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.

Massion, Paul B, Michel Pelat, Catharina Belge und J-L Balligand (Okt. 2005). „Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide.“ In: *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 142 (2), S. 144–150. ISSN: 1095-6433. DOI: 10.1016/j.cbpb.2005.05.048.

Mathews, Stephanie, Mingjiang Xu, Hua Wang, Adeline Bertola und Bin Gao (Mai 2014). „Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges.“ In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 306 (10), G819–G823. ISSN: 1522-1547. DOI: 10.1152/ajpgi.00041.2014.

Mayer, B, F Brunner und K Schmidt (1993). „Novel actions of methylene blue.“ In: *European heart journal* 14, S. 22–26.

Mazanet, R und C Franzini-Armstrong (Mai 1982). „Scanning electron microscopy of pericytes in rat red muscle.“ In: *Microvascular research* 23 (3), S. 361–369. ISSN: 0026-2862.

Mederacke, Ingmar, Dianne H Dapito, Silvia Affò, Hiroshi Uchinami und Robert F Schwabe (Feb. 2015). „High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers.“ In: *Nature protocols* 10 (2), S. 305–315. ISSN: 1750-2799. DOI: 10.1038/nprot.2015.017.

Mederacke, Ingmar, Christine C Hsu, Juliane S Troeger, Peter Huebener, Xueru Mu, Dianne H Dapito, Jean-Philippe Pradere und Robert F Schwabe (Nov. 2013). „Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology“. In: *Nature* 4.1. ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/ncomms3823.

Mehta, Gautam, Thierry Gustot, Rajeshwar P Mookerjee, Juan Carlos Garcia-Pagan, Michael B Fallon, Vijay H Shah, Richard Moreau und Rajiv Jalan (Juli 2014). „Inflammation and portal

- hypertension - the undiscovered country.“ In: *Journal of hepatology* 61 (1), S. 155–163. ISSN: 1600-0641. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.03.014.
- Melhem, Alaa, Nidal Muhanna, Amal Bishara, Carlos E Alvarez, Yaron Ilan, Taiser Bishara, Amjad Horani, Mithal Nassar, Scott L Friedman und Rifaat Safadi (Juli 2006). „Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC.“ In: *Journal of hepatology* 45 (1), S. 60–71. ISSN: 0168-8278. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.12.025.
- Mellion, B T, L J Ignarro, E H Ohlstein, E G Pontecorvo, A L Hyman und P J Kadowitz (Mai 1981). „Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators.“ In: *Blood* 57 (5), S. 946–955. ISSN: 0006-4971.
- Mergia, Evanthia, Michael Russwurm, Georg Zoidl und Doris Koesling (Feb. 2003). „Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain.“ In: *Cellular signalling* 15 (2), S. 189–195. ISSN: 0898-6568.
- Milam, Jami E, Venkateshwar G Keshamouni, Sem H Phan, Biao Hu, Srinivasa R Gangireddy, Cory M Hogaboam, Theodore J Standiford, Victor J Thannickal und Raju C Reddy (Mai 2008). „PPAR-gamma agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis.“ In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 294 (5), S. L891–L901. ISSN: 1040-0605. DOI: 10.1152/ajplung.00333.2007.
- Milani, S, H Herbst, D Schuppan, C Grappone, G Pellegrini, M Pinzani, A Casini, A Calabró, G Ciancio und F Stefanini (März 1994). „Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver.“ In: *The American journal of pathology* 144 (3), S. 528–537. ISSN: 0002-9440.
- Milani, S, H Herbst, D Schuppan, KY Kim, EO Riecken und H Stein (1990). „Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis.“ In: *Gastroenterology* 98.1, S. 175–84. ISSN: 0016-5085.
- Mittendorf, Joachim, Stefan Weigand, Cristina Alonso-Alija, Erwin Bischoff, Achim Feurer, Michael Gerisch, Armin Kern, Andreas Knorr, Dieter Lang, Klaus Muentner, Martin Radtke, Hartmut Schirok, Karl-Heinz Schlemmer, Elke Stahl, Alexander Straub, Frank Wunder und Johannes-Peter Stasch (Mai 2009). „Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension.“ In: *ChemMedChem* 4 (5), S. 853–865. ISSN: 1860-7187. DOI: 10.1002/cmdc.200900014.
- Moncada, S. und Higgs Palmer RMJ. (Dez. 1989). „The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator“. In: *Journal of Cardiothoracic Anesthesia* 3.3, S. 377. ISSN: 0888-6296. DOI: 10.1016/0888-6296(89)90133-6.

- Moore, Carolina, Xiu-Da Shen, Feng Gao, Ronald W Busutil und Ana J Coito (Feb. 2007). „Fibronectin-alpha4beta1 integrin interactions regulate metalloproteinase-9 expression in steatotic liver ischemia and reperfusion injury.“ In: *The American journal of pathology* 170 (2), S. 567–577. ISSN: 0002-9440. DOI: 10.2353/ajpath.2007.060456.
- Moro, M A, R J Russel, S Cellek, I Lizasoain, Y Su, V M Darley-USmar, M W Radomski und S Moncada (Feb. 1996). „cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (4), S. 1480–1485. ISSN: 0027-8424.
- Murad, F, U Forstermann, M Nakane, H Schmidt, J Pollock, H Sheng, T Matsumoto, T Warner, J Mitchell und R Tracey (1992). „The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction pathway in vascular smooth muscle preparations and other tissues.“ In: *Japanese journal of pharmacology* 58 Suppl 2, 150P–157P. ISSN: 0021-5198.
- Nakane, M, K Arai, S Saheki, T Kuno, W Buechler und F Murad (Okt. 1990). „Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung.“ In: *The Journal of biological chemistry* 265 (28), S. 16841–16845. ISSN: 0021-9258.
- Nakane, M, H H Schmidt, J S Pollock, U Förstermann und F Murad (Jan. 1993). „Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle.“ In: *FEBS letters* 316 (2), S. 175–180. ISSN: 0014-5793.
- Nakao, A, M Afrakhte, A Morén, T Nakayama, JL Christian, R Heuchel, S Itoh, M Kawabata, NE Heldin, CH Heldin und P ten Dijke (Okt. 1997). „Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling.“ In: *Nature* 389.6651, S. 631–5. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/39369.
- Nehls, V und D Drenckhahn (1993). „The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle?“ In: *Histochemistry* 99.1, S. 1–12. ISSN: 0301-5564.
- Newell, Philippa, Augusto Villanueva, Scott L Friedman, Kazuhiko Koike und Josep M Llovet (Mai 2008). „Experimental models of hepatocellular carcinoma.“ In: *Journal of hepatology* 48 (5), S. 858–879. ISSN: 0168-8278. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.01.008.
- Noguchi, Shingo, Kazuhiro Yatera, Ke-Yong Wang, Keishi Oda, Kentarou Akata, Kei Yamasaki, Toshinori Kawanami, Hiroshi Ishimoto, Yumiko Toyohira, Hiroaki Shimokawa, Nobuyuki Yanagihara, Masato Tsutsui und Hiroshi Mukae (Aug. 2014). „Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.“ In: *Respiratory research* 15, S. 92. ISSN: 1465-993X. DOI: 10.1186/s12931-014-0092-3.
- Nolte, Robert T., G. Bruce Wisely, Stefan Westin, Jeffery E. Cobb, Millard H. Lambert, Riki Kurokawa, Michael G. Rosenfeld, Timothy M. Willson, Christopher K. Glass und Michael V. Milburn (Sep. 1998). „Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-“. In: *Nature* 395.6698, S. 137–143. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/25931.

- O'Dell, T J, R D Hawkins, E R Kandel und O Arancio (Dez. 1991). „Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (24), S. 11285–11289. ISSN: 0027-8424.
- Oakley, Fiona, Jelena Mann, Sarah Nailard, David E Smart, Narendra Mungalsingh, Christothea Constandinou, Shakir Ali, Susan J Wilson, Harry Millward-Sadler, John P Iredale und Derek A Mann (März 2005). „Nuclear factor-kappaB1 (p50) limits the inflammatory and fibrogenic responses to chronic injury.“ In: *The American journal of pathology* 166 (3), S. 695–708. ISSN: 0002-9440.
- Øie, Cristina I, Viola Mönkemöller, Wolfgang Hübner, Mark Schüttpelz, Hong Mao, Balpreet S Ahluwalia, Thomas R Huser und McCourt Peter (Feb. 2018). „New ways of looking at very small holes using optical nanoscopy to visualize liver sinusoidal endothelial cell fenestrations“. In: *Nanophotonics-berlin* 7.3, S. 575–596. ISSN: 2192-8614. DOI: 10.1515/nanoph-2017-0055.
- Ozerdem, U, K A Grako, K Dahlin-Huppe, E Monosov und W B Stallcup (Okt. 2001). „NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis.“ In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 222 (2), S. 218–227. ISSN: 1058-8388. DOI: 10.1002/dvdy.1200.
- Page-McCaw, Andrea, Andrew J Ewald und Zena Werb (März 2007). „Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.“ In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (3), S. 221–233. ISSN: 1471-0072. DOI: 10.1038/nrm2125.
- Pages, G, P Lenormand und L'Allemain - G of the (Sep. 1993). „Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation“. In: *Proceedings of the* 90.18, S. 8319–8323. DOI: 10.1073/pnas.90.18.8319.
- Palmer, R. M. J., A. G. Ferrige und S. Moncada (Juni 1987). „Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor“. In: *Nature* 327.6122, S. 524–526. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/327524a0.
- Pankov, Roumen und Kenneth M Yamada (Okt. 2002). „Fibronectin at a glance.“ In: *Journal of cell science* 115 (Pt 20), S. 3861–3863. ISSN: 0021-9533.
- Pellicoro, Antonella, Prakash Ramachandran, John P Iredale und Jonathan A Fallowfield (März 2014). „Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ.“ In: *Nature reviews. Immunology* 14 (3), S. 181–194. ISSN: 1474-1741. DOI: 10.1038/nri3623.
- Pérez Tamayo, R (1983). „Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis?“ In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 3 (1), S. 112–120. ISSN: 0270-9139.

- Perri, Roman E, Daniel A Langer, Suvro Chatterjee, Simon J Gibbons, Jay Gadgil, Sheng Cao, Gianrico Farrugia und Vijay H Shah (März 2006). „Defects in cGMP-PKG pathway contribute to impaired NO-dependent responses in hepatic stellate cells upon activation.“ In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290 (3), G535–G542. ISSN: 0193-1857. DOI: 10.1152/ajpgi.00297.2005.
- Picard, Nicolas, Oliver Baum, Alexander Vogetseder, Brigitte Kaissling und Michel Le Hir (Juli 2008). „Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat.“ In: *Histochemistry and cell biology* 130 (1), S. 141–155. ISSN: 0948-6143. DOI: 10.1007/s00418-008-0433-8.
- Piek, E, U Westermark, M Kastemar, C H Heldin, E J van Zoelen, M Nistér und P Ten Dijke (März 1999). „Expression of transforming-growth-factor (TGF)-beta receptors and Smad proteins in glioblastoma cell lines with distinct responses to TGF-beta1.“ In: *International journal of cancer* 80 (5), S. 756–763. ISSN: 0020-7136.
- Pieper, Christian, Jasmin Jacqueline Marek, Marlies Unterberg, Tanja Schwerdtle und Hans-Joachim Galla (März 2014). „Brain capillary pericytes contribute to the immune defense in response to cytokines or LPS in vitro.“ In: *Brain research* 1550, S. 1–8. ISSN: 1872-6240. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.01.004.
- Pinzani, M (Aug. 2002). „PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells“. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7, S. d1720–d1726. ISSN: 1093-9946.
- Pinzani, M, L Gesualdo, GM Sabbah und HE Abboud (Dez. 1989). „Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells.“ In: *Journal of Clinical Investigation* 84.6, S. 1786–1793. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI114363.
- Poulsom, R, S J Forbes, K Hodivala-Dilke, E Ryan, S Wyles, S Navaratnasah, R Jeffery, T Hunt, M Alison, T Cook, C Pusey und N A Wright (Sep. 2001). „Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration.“ In: *The Journal of pathology* 195 (2), S. 229–235. ISSN: 0022-3417. DOI: 10.1002/path.976.
- Rachfal, Amy W. und David R. Brigstock (Mai 2003). „Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis.“ In: *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 26 (1), S. 1–9. ISSN: 1386-6346.
- Ramachandran, Prakash, Antonella Pellicoro, Madeleine A Vernon, Luke Boulter, Rebecca L Aucott, Aysha Ali, Stephen N Hartland, Victoria K Snowdon, Andrea Cappon, Timothy T Gordon-Walker, Mike J Williams, Donald R Dunbar, Jonathan R Manning, Nico van Rooijen, Jonathan A Fallowfield, Stuart J Forbes und John P Iredale (Nov. 2012). „Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (46), E3186–E3195. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1119964109.

- Rapoport, R M, M B Draznin und F Murad (1983). „Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation.“ In: *Nature* 306 (5939), S. 174–176. ISSN: 0028-0836.
- Reif, Shimon, Hussein Aeed, Yael Shilo, Reuven Reich, Yoel Kloog, Young Oh Kweon und Rafael Bruck (Aug. 2004). „Treatment of thioacetamide-induced liver cirrhosis by the Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid.“ In: *Journal of hepatology* 41 (2), S. 235–241. ISSN: 0168-8278. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.04.010.
- Reisner, H. (16. Nov. 2014). *Pathology: A Modern Case Study*. McGraw-Hill Education. ISBN: 9780071621564. URL: <https://books.google.de/books?id=L64tnwEACAAJ>.
- Ricard-Blum, Sylvie und Florence Ruggiero (Sep. 2005). „The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane.“ In: *Pathologie-biologie* 53 (7), S. 430–442. ISSN: 0369-8114. DOI: 10.1016/j.patbio.2004.12.024.
- Ricard, Nicolas, Ly Tu, Morane Le Hiress, Alice Huertas, Carole Phan, Raphaël Thuillet, Caroline Sattler, Elie Fadel, Andrei Seferian, David Montani, Peter Dorfmueller, Marc Humbert und Christophe Guignabert (Apr. 2014). „Increased pericyte coverage mediated by endothelial-derived fibroblast growth factor-2 and interleukin-6 is a source of smooth muscle-like cells in pulmonary hypertension.“ In: *Circulation* 129.15, S. 1586–97. ISSN: 0009-7322. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007469.
- Rider, Christopher C und Barbara Mulloy (Juli 2010). „Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists.“ In: *The Biochemical journal* 429 (1), S. 1–12. ISSN: 1470-8728. DOI: 10.1042/BJ20100305.
- Rinkevich, Yuval, Taisuke Mori, Debashis Sahoo, Pin-Xian Xu, John R Bermingham und Irving L Weissman (Dez. 2012). „Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature.“ In: *Nature cell biology* 14 (12), S. 1251–1260. ISSN: 1476-4679. DOI: 10.1038/ncb2610.
- Robertson, B E, R Schubert, J Hescheler und M T Nelson (Juli 1993). „cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells.“ In: *The American journal of physiology* 265 (1 Pt 1), S. C299–C303. ISSN: 0002-9513. DOI: 10.1152/ajpcell.1993.265.1.C299.
- Rock, Jason R, Christina E Barkauskas, Michael J Cronic, Yan Xue, Jeffrey R Harris, Jiurong Liang, Paul W Noble und Brigid L M Hogan (Dez. 2011). „Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (52), E1475–E1483. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1117988108.

- Rockey, Don C, P Darwin Bell und Joseph A Hill (März 2015). „Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure.“ In: *The New England journal of medicine* 372 (12), S. 1138–1149. ISSN: 1533-4406. DOI: 10.1056/NEJMra1300575.
- Rouget, Charles (1873). „Memoire sur le developpement, la structure et les propietes physiologiques des capillaries senguins et lymphatiques“. In: *Arch. Physiol. Norm. Pathol.* 5, S. 603–663. URL: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008604094/en/>.
- Rucker, H K, H J Wynder und W E Thomas (März 2000). „Cellular mechanisms of CNS pericytes.“ In: *Brain research bulletin* 51 (5), S. 363–369. ISSN: 0361-9230.
- Saiki, R K, C A Chang, C H Levenson, T C Warren, C D Boehm, H H Kazazian und H A Erlich (Sep. 1988). „Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes.“ In: *The New England journal of medicine* 319 (9), S. 537–541. ISSN: 0028-4793. DOI: 10.1056/NEJM198809013190903.
- Sandner, Peter und Johannes Peter Stasch (Jan. 2017). „Anti-fibrotic effects of soluble guanylate cyclase stimulators and activators: A review of the preclinical evidence.“ In: *Respiratory medicine* 122 Suppl 1, S1–S9. ISSN: 1532-3064. DOI: 10.1016/j.rmed.2016.08.022.
- Sauer, B und N Henderson (Juli 1988). „Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (14), S. 5166–5170. ISSN: 0027-8424.
- Sausbier, M, R Schubert, V Voigt, C Hirneiss, A Pfeifer, M Korth, T Kleppisch, P Ruth und F Hofmann (Okt. 2000). „Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation.“ In: *Circulation research* 87 (9), S. 825–830. ISSN: 1524-4571.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean-Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak und Albert Cardona (Juni 2012). „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.“ In: *Nature methods* 9 (7), S. 676–682. ISSN: 1548-7105. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Schinner, Elisabeth, Veronika Wetzl, Andrea Schramm, Frieder Kees, Peter Sandner, Johannes-Peter Stasch, Franz Hofmann und Jens Schlossmann (Apr. 2017). „Inhibition of the TGF signalling pathway by cGMP and cGMP-dependent kinase I in renal fibrosis.“ In: *FEBS open bio* 7 (4), S. 550–561. ISSN: 2211-5463. DOI: 10.1002/2211-5463.12202.
- Schlossmann, J, A Ammendola, K Ashman, X Zong, A Huber, G Neubauer, G X Wang, H D Allescher, M Korth, M Wilm, F Hofmann und P Ruth (März 2000). „Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β .“ In: *Nature* 404 (6774), S. 197–201. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/35004606.

- Schluger, LK, PA Sheiner, SN Thung, JY Lau, A Min, DC Wolf, I Fiel, D Zhang, MA Gerber, CM Miller und HC Bodenheimer (Mai 1996). „Severe recurrent cholestatic hepatitis C following orthotopic liver transplantation.“ In: *Hepatology* 23.5, S. 971–6. ISSN: 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.510230505.
- Schmidt, H H und F Murad (Dez. 1991). „Purification and characterization of a human NO synthase.“ In: *Biochemical and biophysical research communications* 181 (3), S. 1372–1377. ISSN: 0006-291X.
- Schmidt, Peter, Matthias Schramm, Henning Schröder und Johannes-Peter Stasch (Mai 2003). „Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase.“ In: *European journal of pharmacology* 468 (3), S. 167–174. ISSN: 0014-2999.
- Scholten, David, Donna Reichart, Yong H Paik, Jens Lindert, Jahar Bhattacharya, Christopher K Glass, David A Brenner und Tatiana Kisseleva (Juli 2011). „Migration of fibrocytes in fibrogenic liver injury.“ In: *Am. J. Pathol.* 179.1, S. 189–98. ISSN: 0002-9440. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.03.049.
- Schrammel, Astrid, Sonke Behrends, Kurt Schmidt, Doris Koesling und Bernd Mayer (1996). „Characterization of 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3-a] quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase.“ In: *Molecular pharmacology* 50.1, S. 1–5.
- Schwarz, U R, U Walter und M Eigenthaler (Nov. 2001). „Taming platelets with cyclic nucleotides.“ In: *Biochemical pharmacology* 62 (9), S. 1153–1161. ISSN: 0006-2952.
- Seki, Ekihiro, Samuele de Minicis, Sayaka Inokuchi, Kojiro Taura, Katsumi Miyai, Nico van Rooijen, Robert F Schwabe und David A Brenner (Juli 2009). „CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice.“ In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50 (1), S. 185–197. ISSN: 1527-3350. DOI: 10.1002/hep.22952.
- Senoo, Haruki, Kiwamu Yoshikawa, Mayako Morii, Mitsutaka Miura, Katsuyuki Imai und Yoshihiro Mezaki (Nov. 2010). „Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative past, present and future“. In: *Cell Biology International* 34.12, S. 1247–1272. DOI: 10.1042/CBI20100321. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1042/CBI20100321>.
- Shepro, D und N M Morel (Aug. 1993). „Pericyte physiology.“ In: *The FASEB Journal* 7.11, S. 1031–1038. DOI: 10.1096/fasebj.7.11.8370472.
- Sims, D E (1986). „The pericyte—a review.“ In: *Tissue & cell* 18 (2), S. 153–174. ISSN: 0040-8166.
- (Okt. 2000). „Diversity within pericytes.“ In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 27 (10), S. 842–846. ISSN: 0305-1870.
- Smart, David E, Karen Green, Fiona Oakley, Jonathan B Weitzman, Moshe Yaniv, Gary Reynolds, Jelena Mann, MillwardSadler Harry und Derek A Mann (Dez. 2006). „JunD is a profibro-

- genic transcription factor regulated by Jun Nterminal kinaseindependent phosphorylation“. In: *Hepatology* 44.6, S. 1432–1440. ISSN: 1527-3350. DOI: 10.1002/hep.21436.
- Sonneveld, Ramon, Joost G Hoenderop, Andrea M Isidori, Carole Henique, Henry B Dijkman, Jo H Berden, Pierre-Louis Tharaux, Johan van der Vlag und Tom Nijenhuis (Mai 2017). „Sildenafil Prevents Podocyte Injury , javax.xml.bind.JAXBElement@4826f28c, PPAR-, javax.xml.bind.JAXBElement@443d7a51, -Mediated TRPC6 Inhibition.“ In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 28 (5), S. 1491–1505. ISSN: 1533-3450. DOI: 10.1681/ASN.2015080885.
- Southgate, K und A C Newby (Mai 1990). „Serum-induced proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells from the contractile state is inhibited by 8-Br-cAMP but not 8-Br-cGMP.“ In: *Atherosclerosis* 82 (1-2), S. 113–123. ISSN: 0021-9150.
- Speyer, C L, C P Steffes und J L Ram (März 1999). „Effects of vasoactive mediators on the rat lung pericyte: quantitative analysis of contraction on collagen lattice matrices.“ In: *Microvascular research* 57 (2), S. 134–143. ISSN: 0026-2862. DOI: 10.1006/mvre.1998.2134.
- Stark, Konstantin, Annkathrin Eckart, Selgai Haidari, Anca Tirniceriu, Michael Lorenz, Marie-Luise von Brühl, Florian Gärtner, Alexander Georg Khandoga, Kyle R Legate, Robert Pless, Ingrid Hepper, Kirsten Lauber, Barbara Walzog und Steffen Massberg (Jan. 2013). „Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs.“ In: *Nature immunology* 14 (1), S. 41–51. ISSN: 1529-2916. DOI: 10.1038/ni.2477.
- Starkel, Peter und I A Leclercq (Apr. 2011). „Animal models for the study of hepatic fibrosis.“ In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 25 (2), S. 319–333. ISSN: 1532-1916. DOI: 10.1016/j.bpg.2011.02.004.
- Stasch, J P, E M Becker, C Alonso-Alija, H Apeler, K Dembowski, A Feurer, R Gerzer, T Minuth, E Perzborn, U Pleiss, H Schröder, W Schroeder, E Stahl, W Steinke, A Straub und M Schramm (März 2001). „NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase.“ In: *Nature* 410 (6825), S. 212–215. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/35065611.
- Stramer, Brian M, Ryoichi Mori und Paul Martin (2007). „The InflammationFibrosis Link? A Jekyll and Hyde Role for Blood Cells during Wound Repair“. In: *J Invest Dermatol* 127.5, S. 1009–1017. ISSN: 0022-202X. DOI: 10.1038/sj.jid.5700811.
- Stratman, Amber N, Amy E Schwindt, Kristine M Malotte und George E Davis (Aug. 2010). „Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization.“ In: *Blood* 116.22, S. 4720–30. ISSN: 0006-4971. DOI: 10.1182/blood-2010-05-286872.
- Straub, A, J P Stasch, C Alonso-Alija, J Benet-Buchholz, B Ducke, A Feurer und C Fürstner (März 2001). „NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase.“ In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 11 (6), S. 781–784. ISSN: 0960-894X.

- Sun, Kai-Hui, Yongen Chang, Nilgun I Reed und Dean Sheppard (Mai 2016). „-Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis.“ In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 310 (9), S. L824–L836. ISSN: 1522-1504. DOI: 10.1152/ajplung.00350.2015.
- Supuran, Claudiu T, Antonio Mastrolorenzo, Giuseppe Barbaro und Andrea Scozzafava (2006). „Phosphodiesterase 5 inhibitors–drug design and differentiation based on selectivity, pharmacokinetic and efficacy profiles.“ In: *Current pharmaceutical design* 12 (27), S. 3459–3465. ISSN: 1873-4286.
- Tacke, Frank und Christian Trautwein (Okt. 2015). „Mechanisms of liver fibrosis resolution.“ In: *Journal of hepatology* 63 (4), S. 1038–1039. ISSN: 1600-0641. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.03.039.
- Takashima, T, Y Fujiwara, K Higuchi, T Arakawa, Y Yano, T Hasuma und S Otani (Sep. 2001). „PPAR-gamma ligands inhibit growth of human esophageal adenocarcinoma cells through induction of apoptosis, cell cycle arrest and reduction of ornithine decarboxylase activity.“ In: *International journal of oncology* 19 (3), S. 465–471. ISSN: 1019-6439.
- Talele, Nilesh P, Julie Fradette, John E Davies, Andras Kapus und Boris Hinz (Juni 2015). „Expression of -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells.“ In: *Stem cell reports* 4 (6), S. 1016–1030. ISSN: 2213-6711. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.05.004.
- Tallquist, Michelle D. und Jeffery D. Molkentin (Apr. 2017). „Redefining the identity of cardiac fibroblasts“. In: *Nature Reviews Cardiology* 14.8, S. 484–491. ISSN: 1759-5002. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.57.
- Tang, L, Y Tanaka, F Marumo und C Sato (Apr. 1994). „Phenotypic change in portal fibroblasts in biliary fibrosis.“ In: *Liver* 14 (2), S. 76–82. ISSN: 0106-9543.
- Taura, Kojiro, Kouichi Miura, Keiko Iwaisako, Christoph H Osterreicher, Yuzo Kodama, Penz-Osterreicher Melitta und David A Brenner (März 2010). „Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice.“ In: *Hepatology* 51.3, S. 1027–36. ISSN: 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.23368.
- Theilig, F, M Bostanjoglo, H Pavenstädt, C Grupp, G Holland, I Slosarek, A M Gressner, M Russwurm, D Koesling und S Bachmann (Nov. 2001). „Cellular distribution and function of soluble guanylyl cyclase in rat kidney and liver.“ In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12 (11), S. 2209–2220. ISSN: 1046-6673.
- Tian, Zhigang, Yongyan Chen und Bin Gao (2013). „Natural killer cells in liver disease.“ In: *Hepatology* 57.4, S. 1654–62. ISSN: 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.26115.

- Tigges, Ulrich, Jennifer V Welser-Alves, Amin Boroujerdi und Richard Milner (Juli 2012). „A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain.“ In: *Microvascular research* 84 (1), S. 74–80. ISSN: 1095-9319. DOI: 10.1016/j.mvr.2012.03.008.
- Timpl, R, H Rohde, P G Robey, S I Rennard, J M Foidart und G R Martin (Okt. 1979). „Laminin—a glycoprotein from basement membranes.“ In: *The Journal of biological chemistry* 254 (19), S. 9933–9937. ISSN: 0021-9258.
- Tontonoz, Peter und Bruce M. Spiegelman (Juni 2008). „Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR.“ In: *Annual Review of Biochemistry* 77.1, S. 289–312. ISSN: 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.
- Towbin, H, T Staehelin und J Gordon (Sep. 1979). „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354. ISSN: 0027-8424.
- Troeger, Juliane S, Ingmar Mederacke, Geum-Youn Y Gwak, Dianne H Dapito, Xueru Mu, Christine C Hsu, Jean-Philippe P Pradere, Richard A Friedman und Robert F Schwabe (2012). „Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice.“ In: *Gastroenterology* 143.4, 1073–83.e22. ISSN: 0016-5085. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.06.036.
- Trotter, Jacqueline, Khalad Karram und Akiko Nishiyama (Mai 2010). „NG2 cells: Properties, progeny and origin.“ In: *Brain research reviews* 63 (1-2), S. 72–82. ISSN: 1872-6321. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.12.006.
- Trudeau, Kyle, Anthony J A Molina und Sayon Roy (Nov. 2011). „High glucose induces mitochondrial morphology and metabolic changes in retinal pericytes.“ In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (12), S. 8657–8664. ISSN: 1552-5783. DOI: 10.1167/iovs.11-7934.
- Truett, G E, P Heeger, R L Mynatt, A A Truett, J A Walker und M L Warman (Juli 2000). „Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT).“ In: *BioTechniques* 29 (1), S. 52, 54. ISSN: 0736-6205. DOI: 10.2144/00291bm09.
- Tsukada, Shigeki, Christopher J Parsons und Richard A Rippe (Feb. 2006). „Mechanisms of liver fibrosis.“ In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 364 (1-2), S. 33–60. ISSN: 0009-8981. DOI: 10.1016/j.cca.2005.06.014.
- Tsukamoto, H, M Matsuoka und S W French (Feb. 1990). „Experimental models of hepatic fibrosis: a review.“ In: *Seminars in liver disease* 10 (1), S. 56–65. ISSN: 0272-8087. DOI: 10.1055/s-2008-1040457.
- Vernon, Madeleine A, Katie J Mylonas und Jeremy Hughes (Mai 2010). „Macrophages and renal fibrosis.“ In: *Seminars in nephrology* 30 (3), S. 302–317. ISSN: 1558-4488. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2010.03.004.

- Wagner, Darja Obradovic, Christina Sieber, Raghu Bhushan, Jan H Börgermann, Daniel Graf und Petra Knaus (Feb. 2010). „BMPs: from bone to body morphogenetic proteins.“ In: *Science signaling* 3 (107), mr1. ISSN: 1937-9145. DOI: 10.1126/scisignal.3107mr1.
- Wagner, Martin, Gernot Zollner und Michael Trauner (März 2011). „Nuclear receptors in liver disease.“ In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (3), S. 1023–1034. ISSN: 1527-3350. DOI: 10.1002/hep.24148.
- Wake, Kenjiro (1980). *Perisinusoidal Stellate Cells (Fat-Storing Cells, Interstitial Cells, Lipocytes), Their Related Structure in and around the Liver Sinusoids, and Vitamin A-Storing Cells in Extrahepatic Organs*. Bd. 66. sciencedirect, S. 303–353. ISBN: 9780123644664. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)61977-4.
- Wake, Kenjiro, Kiyoyuki Motomatsu, Haruki Senoo, Akira Masuda und Eijiro Adachi (2009). „Improved Kupffer’s Gold Chloride Method for Demonstrating the Stellate Cells Storing Retinol (Vitamin A) in the Liver and Extrahepatic Organs of Vertebrates“. In: *Stain Technol* 61.4, S. 193–200. ISSN: 0038-9153. DOI: 10.3109/10520298609109937.
- Waldman, S A und F Murad (1988). „Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system.“ In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 12 Suppl 5, S115–S118. ISSN: 0160-2446.
- Walter, U (1989). „Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system.“ In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 113, S. 41–88. ISSN: 0303-4240.
- Walter, Ulrich und Stepan Gambaryan (2009). „cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells.“ In: *Handbook of experimental pharmacology* (191), S. 533–548. ISSN: 0171-2004. DOI: 10.1007/978-3-540-68964-5_23.
- Wandzioch, Ewa, Asa Kolterud, Maria Jacobsson, Scott L Friedman und Leif Carlsson (Nov. 2004). „Lhx2^{-/-} mice develop liver fibrosis.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47), S. 16549–16554. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0404678101.
- Wang, Lan, Lynda Rennie Tankersley, Mei Tang, James J Potter und Esteban Mezey (Mai 2002). „Regulation of the murine alpha(2)(I) collagen promoter by retinoic acid and retinoid X receptors.“ In: *Archives of biochemistry and biophysics* 401 (2), S. 262–270. ISSN: 0003-9861. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00058-9.
- Wang, Shinong und Raimund Hirschberg (März 2004). „Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells.“ In: *J. Biol. Chem.* 279.22, S. 23200–6. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M311998200.

- Wasmuth, Hermann E, Frank Lammert, Mirko Moreno Zaldivar, Ralf Weiskirchen, Claus Hellerbrand, David Scholten, Marie-Luise Berres, Henning Zimmermann, Konrad L Streetz, Frank Tacke, Sonja Hillebrandt, Petra Schmitz, Hildegard Keppeler, Thomas Berg, Edgar Dahl, Nikolaus Gassler, Scott L Friedman und Christian Trautwein (Juli 2009). „Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans.“ In: *Gastroenterology* 137 (1), 309–19, 319.e1–3. ISSN: 1528-0012. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.03.053.
- Watanabe, Takamasa, Norikuni Shibata, Karen A Westerman, Teru Okitsu, Jean E Allain, Masa-kiyo Sakaguchi, Toshinori Totsugawa, Masanobu Maruyama, Toshihisa Matsumura, Hirofumi Noguchi, Shinichiro Yamamoto, Masaki Hikida, Akira Ohmori, Michael Reth, Anne Weber, Noriaki Tanaka, Philippe Leboulch und Naoya Kobayashi (Juni 2003). „Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers.“ In: *Transplantation* 75.11, S. 1873–80. ISSN: 0041-1337. DOI: 10.1097/01.TP.0000064621.50907.A6.
- Weber, Lutz W D, Meinrad Boll und Andreas Stampfl (2003). „Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model.“ In: *Critical reviews in toxicology* 33 (2), S. 105–136. ISSN: 1040-8444. DOI: 10.1080/713611034.
- Wechsler, Jeremy, Young-Hun Choi, Judith Krall, Faiyaz Ahmad, Vincent C Manganiello und Matthew A Movsesian (Okt. 2002). „Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes.“ In: *The Journal of biological chemistry* 277 (41), S. 38072–38078. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M203647200.
- Wells, Rebecca G, Robert F Schwabe und Robert Schwabe (Mai 2015). „Origin and function of myofibroblasts in the liver.“ In: *Seminars in liver disease* 35 (2), S. 97–106. ISSN: 1098-8971. DOI: 10.1055/s-0035-1550061.
- Wilson, Steven E, Shyam S Chaurasia und Fabricio W Medeiros (Sep. 2007). „Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response.“ In: *Experimental eye research* 85 (3), S. 305–311. ISSN: 0014-4835. DOI: 10.1016/j.exer.2007.06.009.
- Wink, DA, KS Kasprzak, CM Maragos, RK Elespuru, M Misra, TM Dunams, TA Cebula, WH Koch, AW Andrews und JS Allen (1991). „DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors.“ In: *Science* 254.5034, S. 1001–3. ISSN: 0036-8075.
- Winkler, Ethan A, Robert D Bell und Berislav V Zlokovic (Aug. 2010). „Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling.“ In: *Molecular neurodegeneration* 5, S. 32. ISSN: 1750-1326. DOI: 10.1186/1750-1326-5-32.
- Wipff, Pierre-Jean, Hicham Majd, Chitrangada Acharya, Lara Buscemi, Jean-Jacques Meister und Boris Hinz (März 2009). „The covalent attachment of adhesion molecules to silicone membranes for cell stretching applications.“ In: *Biomaterials* 30 (9), S. 1781–1789. ISSN: 1878-5905. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.022.

- Wirth, Angela, Zoltán Benyó, Martina Lukasova, Barbara Leutgeb, Nina Wettschureck, Stefan Gorbey, Petra Orsy, Béla Horváth, Christiane Maser-Gluth, Erich Greiner, Björn Lemmer, Günther Schütz, J Silvio Gutkind und Stefan Offermanns (Jan. 2008). „G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension.“ In: *Nature medicine* 14 (1), S. 64–68. ISSN: 1546-170X. DOI: 10.1038/nm1666.
- Wozney, JM, V Rosen, AJ Celeste, LM Mitsock, MJ Whitters, RW Kriz, RM Hewick und EA Wang (1988). „Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.“ In: *Science* 242.4885, S. 1528–34. ISSN: 0036-8075.
- Wynn, T. A. (Aug. 2004). „Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm.“ In: *Nature reviews. Immunology* 4 (8), S. 583–594. ISSN: 1474-1733. DOI: 10.1038/nri1412.
- (Jan. 2008). „Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.“ In: *The Journal of pathology* 214 (2), S. 199–210. ISSN: 0022-3417. DOI: 10.1002/path.2277.
- Wynn, T. A. und K. M. Vannella (März 2016). „Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis.“ In: *Immunity* 44 (3), S. 450–462. ISSN: 1097-4180. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
- Wynn, Thomas A und Luke Barron (Aug. 2010). „Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis.“ In: *Seminars in liver disease* 30 (3), S. 245–257. ISSN: 1098-8971. DOI: 10.1055/s-0030-1255354.
- Yanaka, N, J Kotera, A Ohtsuka, H Akatsuka, Y Imai, H Michibata, K Fujishige, E Kawai, S Takebayashi, K Okumura und K Omori (Juli 1998). „Expression, structure and chromosomal localization of the human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A gene.“ In: *European journal of biochemistry* 255 (2), S. 391–399. ISSN: 0014-2956.
- Yokoi, Y, T Namihisa, K Matsuzaki, A Miyazaki und Y Yamaguchi (Feb. 1988). „Distribution of Ito cells in experimental hepatic fibrosis.“ In: *Liver* 8 (1), S. 48–52. ISSN: 0106-9543.
- Yoon, Seunghee und Rony Seger (2009). „The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions.“ In: *Growth Factors* 24.1, S. 21–44. ISSN: 0897-7194. DOI: 10.1080/02699050500284218.
- Zeisberg, Michael, Jun-ichi Hanai, Hikaru Sugimoto, Tadanori Mammoto, David Charytan, Frank Strutz und Raghu Kalluri (Juli 2003). „BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury.“ In: *Nature medicine* 9 (7), S. 964–968. ISSN: 1078-8956. DOI: 10.1038/nm888.
- Zhang, David Y, Nicolas Goossens, Jinsheng Guo, Ming-Chao C Tsai, Hsin-I I Chou, Civan Altunkaynak, Angelo Sangiovanni, Massimo Iavarone, Massimo Colombo, Masahiro Kobayashi, Hiromitsu Kumada, Augusto Villanueva, Josep M Llovet, Yujin Hoshida und Scott L Friedman (2016). „A hepatic stellate cell gene expression signature associated with outcomes

- in hepatitis C cirrhosis and hepatocellular carcinoma after curative resection.“ In: *Gut* 65.10, S. 1754–64. ISSN: 0017-5749. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309655.
- Zhang, Xue-Jun, Yasumi Katsuta, Toshio Akimoto, Masaru Ohsuga, Takumi Aramaki und Teruo Takano (Nov. 2003). „Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation.“ In: *Journal of hepatology* 39 (5), S. 724–730. ISSN: 0168-8278.
- Zhang, Y, C Riesterer, A M Ayrall, F Sablitzky, T D Littlewood und M Reth (Feb. 1996). „Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells.“ In: *Nucleic acids research* 24 (4), S. 543–548. ISSN: 0305-1048.
- Zhao, Yunde, Philip E Brandish, Marilena DiValentin, Johannes PM Schelvis, Gerald T Babcock und Michael A Marletta (2000). „Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ“. In: *Biochemistry* 39.35, S. 10848–10854.
- Zhou, Li und Dong-Ya Y Zhu (2009). „Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications.“ In: *Nitric Oxide* 20.4, S. 223–30. ISSN: 1089-8603. DOI: 10.1016/j.niox.2009.03.001.
- Zhu, Nian-Ling, Jiaohong Wang und Hidekazu Tsukamoto (Okt. 2010). „The Necdin-Wnt pathway causes epigenetic peroxisome proliferator-activated receptor gamma repression in hepatic stellate cells.“ In: *The Journal of biological chemistry* 285 (40), S. 30463–30471. ISSN: 1083-351X. DOI: 10.1074/jbc.M110.156703.
- Zhuo, M und R D Hawkins (1995). „Long-term depression: a learning-related type of synaptic plasticity in the mammalian central nervous system.“ In: *Reviews in the neurosciences* 6 (3), S. 259–277. ISSN: 0334-1763.
- Zimmermann, K. W. (1923). „Der feinere Bau der Blutkapillaren“. In: *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*.
- Zoraghi, Roya, Emmanuel P Bessay, Jackie D Corbin und Sharron H Francis (März 2005). „Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation.“ In: *The Journal of biological chemistry* 280 (12), S. 12051–12063. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M413611200.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, bei Ihm diese Arbeit durchzuführen. Die stete Bereitschaft zur Diskussion, die konstruktiven Ratschläge sowie das umfassende Wissen seinerseits haben mir sehr weiter geholfen.

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrave möchte ich danken für die Übernahme des Erstgutachtens sowie für die Zeit und Motivation sich mit meiner Arbeit auseinanderzusetzen.

Herrn Prof. Dr. Kai Schuh danke ich für die Übernahme des Drittgutachtens sowie die hilfreiche Unterstützung bei diversen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Herrn Dr. Matthias Schweinlin danke ich für die Erklärung und Zurverfügungstellung der RT-PCR. Herrn Dr. Dieter Groneberg möchte ich für die Einführung in das Labor und in die Immunhistochemie danken. Frau Linda Kehrer danke ich für die Einführung in die Zellkulturexperimenten.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Annemarie Aue und Frau Bianca Röger. Frau Dr. Aue möchte ich für den stets guten und freundschaftlichen Austausch über alle Dinge, die in den letzten drei Jahren rund um das Labor passiert sind, danken. Frau Röger danke ich für die große Hilfe im Labor bei allen kleinen und großen Problemen.

Des Weiteren möchte ich meinen jetzigen und ehemaligen Arbeitskollegen danken, die mich während der drei Jahre begleitet und für eine freundliche Arbeitsatmosphäre gesorgt haben: Frau Dr. Barbara Voußen, Frau Dr. Katharina Beck, Frau Dr. Sarah Dünnes, Herr Dr. Dieter Groneberg und Herr Nils Englert.

Ein besonderer Dank gilt den anderen Mitarbeitern im Institut vor allem, Frau Dr. Melanie Ulrich, Frau Dr. Katharina Spiranec und Herrn Marco Abeßer.