

Aus der Hautklinik (Institut für Dermatologie, Venerologie und Allergologie)
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerdts)

**Der Einfluss der leberendothelialen Scavenger-Rezeptoren
Stabilin-1 und Stabilin-2 bei fibrotischen und inflammatori-
schen Erkrankungen der Leber und der Haut**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Jessica Krzistetzko
aus
Bad Cannstatt
2023

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Herr Prof. Dr. med. Cyrill Géraud

Für Dich...

D. & D.

INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
INHALTSVERZEICHNIS.....	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS.....	12
1 EINLEITUNG.....	13
1.1 Die Leber und ihre Funktion.....	13
1.1.1 Anatomie und Aufbau der Leber.....	13
1.1.2 Funktion der Leber.....	15
1.1.3 Lebererkrankungen.....	16
1.1.4 Mausmodelle zu Lebererkrankungen.....	18
1.2 Anatomie der Haut und ihre Funktion.....	19
1.2.1 Anatomie, Histologie und Funktion der Haut.....	19
1.2.2 Hauterkrankungen	23
1.2.3 Mausmodelle zu Hauterkrankungen	25
1.3 Endothelzellen.....	27
1.3.1 Aufbau und Funktion des Endothels	27

1.3.2 Die Heterogenität von Endothelzellen.....	28
1.3.3 Vaskuläre Nische.....	29
1.3.4 Aufbau und Funktion lebersinusoidaler Endothelzellen	31
1.4 Scavenger-Rezeptoren	32
1.4.1 Klassifizierung von Scavenger Rezeptoren	32
1.4.2 Scavenger Rezeptoren Stabilin-1 und Stabilin-2	33
1.4.3 Die Rolle von Stabilin-1 und Stabilin-2 in verschiedenen Erkrankungen ...	35
1.5 Die Proteine TGFB β 1 und Postn	38
1.5.1 Die Proteinfamilie der Fasciclin I - Domäne	38
1.5.2 Das Protein Transforming growth factor beta-induced (TGFB β 1).....	40
1.5.3 Das Protein Periostin (Postn).....	41
1.6 Ziel der Arbeit.....	43
2 MATERIAL UND METHODEN	44
2.1 Materialien.....	44
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer	44
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	45
2.1.3 Geräte.....	46
2.1.4 Primer	48
2.1.5 Antikörper, Kits und Enzyme.....	48
2.1.6 Software.....	51
2.2 Methoden	52
2.2.1 Tierversuche	52
2.2.2 Biochemische Methoden.....	55
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	59
2.2.4 Immunhistologische Methoden	62

2.2.5 Klinische Methoden	65
2.2.6 Bildgebung.....	65
2.2.7 Statistische Analysen.....	66
3 ERGEBNISSE	68
3.1 MCD Fütterung.....	68
3.1.1 Einfluss auf das metabolische Profil	68
3.1.2 Einfluss auf Leberendothelzellen	74
3.1.3 Einfluss auf Makrophagen	81
3.1.4 Einfluss auf Perizyten und hepatische Sternzellen	83
3.1.5 Einfluss auf die Liganden TGFB β 1 und Postn	87
3.2 CDAA Fütterung.....	92
3.2.1 Einfluss auf die Histologie der Leber	92
3.2.2 Einfluss auf Leberendothelzellen	98
3.2.3 Einfluss auf Makrophagen	106
3.2.4 Einfluss auf Perizyten und hepatische Sternzellen	107
3.2.5 Einfluss auf die Liganden TGFB β 1 und Postn	109
3.2.6 Korrelationsanalysen der Liganden TGFB β 1 und Postn mit dem Fibroselevel in der Leber von MCD- und CDAA-gefütterten Mäusen	114
3.3 Imiquimod Behandlung.....	120
3.3.1 Einfluss auf Körpergewicht und Erscheinungsbild	120
3.3.2 Einfluss auf die Histologie der Haut.....	124
3.3.3 Einfluss auf die Liganden TGFB β 1 und Postn	126
3.4 Bleomycin Behandlung.....	134
3.4.1 Einfluss auf die Histologie der Haut.....	134
3.4.2 Einfluss auf andere Organe	139

3.4.3 Einfluss auf die Liganden TGFB β 1 und Postn	144
4 DISKUSSION	149
4.1 Der Einfluss von Stabilin-1 und Stabilin-2 in inflammatorischen und fibrotischen Erkrankungen der Leber	149
4.1.1 Die Bedeutung der MCD und CDAA Fütterung auf die Physiologie.....	149
4.1.2 Die Auswirkungen der MCD und CDAA Fütterung auf die Fibrose hinsichtlich der Stabilin-Defizienz	152
4.1.3 Die Auswirkungen der Fütterungsmodelle auf die Aktivierung von Perizyten und hepatischen Sternzellen in Stabilin-defizienten Mäusen ...	154
4.1.4 Die Auswirkungen von MCD auf die Immunzellreaktion in Stabilin- defizienten Mäusen.....	156
4.1.5 Die Bedeutung der Stabilin-Liganden TGFB β 1 und Postn im Fibrosemodell	157
4.2 Der Einfluss von Stabilin-1 und Stabilin-2 in inflammatorischen und fibrotischen Erkrankungen der Haut.....	163
4.2.1 Die Auswirkungen der topischen Applikation von IMQ auf die Physiologie und die Haut der Mäuse	163
4.2.2 Die Auswirkung der subkutanen Injektion von Bleomycin auf die Haut.....	165
4.2.3 Die Auswirkung der subkutanen Injektion von Bleomycin auf die Lunge.....	165
4.2.4 Die Bedeutung des Liganden TGFB β 1 in Stabilin-defizienten Mäusen in den Erkrankungen Psoriasis und Sklerodermie	166
4.2.5 Die Bedeutung des Liganden Postn in Stabilin-defizienten Mäusen in den Erkrankungen Psoriasis und Sklerodermie	167
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	170

6 LITERATURVERZEICHNIS.....	171
7 LEBENSLAUF	203
8 DANKSAGUNG.....	204

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALT	Alaninaminotransferase
Arg1	Arginase 1
AST	Aspartataminotransferase
CDAА	Cholin-defizient L-Amino-Säure begrenzt
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ctrl	Kontrollen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Emcn	Endomucin
FC	Fold change
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GS	Glutaminsynthetase
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HIER	Hitze-induzierte Epitop-Freilegung
HRP	Meerrettichperoxidase
HSC	hepatische Sternzellen
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IMQ	Imiquimod
ISH	In Situ Hybridisierung
KO	Genetischer Knock-out
LDL	low density Lipoprotein
LSEC	Lebersinusendothelzellen
Lyve-1	Endothelialer Hyaluronsäurerezeptor 1 der Lymphgefäße
MCD	Methionin-Cholin-defizient
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFRB	Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor beta
PFA	Paraformaldehyd
Postn	Periostin
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Seite
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek	Sekunde
Stab1	Stabilin-1
Stab2	Stabilin-2
Tab.	Tabelle
TAE	Tris, Acetat, EDTA
TGFBi	Transforming growth factor beta-induced
TGS	Tris-Glycin-SDS
WT	Wildtyp

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Leber	14
Abb. 2: Entwicklung von nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen	17
Abb. 3: Schematische Darstellung der Haut-Histologie und deren Besiedelung mit verschiedenen Mikroorganismen	20
Abb. 4: Schematische Darstellung der Hautschichten	21
Abb. 5: Vergleich der Struktur von humaner und muriner Haut	22
Abb. 6: Klinische Erscheinungsformen von Psoriasis beim Menschen.....	24
Abb. 7: Schematische Darstellung der Mikroumgebung endothelialer Zellen am Beispiel eines Blutgefäßes.....	27
Abb. 8: Heterogenität von Endothelzellen.....	29
Abb. 9: Schematische Darstellung der vaskulären Nische	30
Abb. 10: Schematische Darstellung der Scavenger Rezeptor Klassen	33
Abb. 11: Struktur und Zusammensetzung der Domänen von Stabilin-1 und Stabilin-2.....	35
Abb. 12: Auswirkungen von <i>Stab1/2-/-</i>	36
Abb. 13: Auswirkung der Nierentransplantation einer DKO Maus in eine WT Maus..	37
Abb. 14: Auswirkung der <i>Stab1-</i> und <i>Stab2-</i> Defizienz im <i>ApoE-/-</i> Mausmodell.....	37
Abb. 15: Schematische Darstellung der Proteine TGFB β 1, Postn, Stabilin-1 und Stabilin-2.....	40
Abb. 16: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von TGFB β 1	41
Abb. 17: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Postn	42
Abb. 18: Genkonstrukte der verwendeten Knockouts Stabilin-1 und Stabilin-2	52
Abb. 19: Schema des Aufbaus eines Western Blots	56
Abb. 20: Gewichtsverlauf während der MCD Fütterung und Lebergewichte	68
Abb. 21: Plasmalevels von MCD-gefütterten Mäusen	69
Abb. 22: Analyse der Leberenzyme von MCD-gefütterten Mäusen.....	70
Abb. 23: H&E Färbung der Leber von MCD-gefütterten Mäusen	71
Abb. 24: Öl-Rot O Färbung der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	72
Abb. 25: Kollagenbestimmung in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen	73
Abb. 26: IF-Färbung von <i>Emcn</i> in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	75
Abb. 27: <i>Emcn</i> Western Blot von Leberprotein von MCD-gefütterten Mäusen.....	76
Abb. 28: IF-Färbung von Lyve-1 in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen	77

Abb. 29: IF-Färbung von CD31 um die zentralen Gefäße in der Leber von MCD- gefütterten Mäusen.....	78
Abb. 30: IF-Färbung von ICAM-1 in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	79
Abb. 31: IF-Färbung von CD32b in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	80
Abb. 32: IF-Färbung von Arg1 und GS in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen..	81
Abb. 33: IF-Färbung von F4/80 und CD68 in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	82
Abb. 34: IF-Färbung von CD11b in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	83
Abb. 35: IF-Färbung von α -SMA in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	84
Abb. 36: IF-Färbung von Desmin in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	85
Abb. 37: In Situ Hybridisierung von PDGFRB in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	86
Abb. 38: IF-Färbung von TGFB β 1 in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen.....	88
Abb. 39: TGFB β 1 Analyse von Leberprotein und Plasma von MCD-gefütterten Mäusen.....	89
Abb. 40: IF-Färbung von Postn in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen	90
Abb. 41: Postn Analyse von Leberprotein und Plasma von MCD-gefütterten Mäusen.....	91
Abb. 42: Einfluss von CDAA auf den Gewichtsverlauf, sowie Leber- und Milz- gewichte.....	92
Abb. 43: Makroskopische Veränderung der Leber durch CDAA Fütterung	93
Abb. 44: H&E Färbung der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen.....	94
Abb. 45: Öl-Rot O Färbung der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	95
Abb. 46: Kollagenbestimmung in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	97
Abb. 47: IHC-Färbung von Emcn in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	99
Abb. 48: Emcn Western Blot von Leberprotein von CDAA-gefütterten Mäusen	100
Abb. 49: IHC-Färbung von Lyve-1 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	101
Abb. 50: IHC-Färbung von CD31 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	102
Abb. 51: IHC-Färbung von CD32b in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen...	103
Abb. 52: IHC-Färbung von ICAM-1 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen....	104
Abb. 53: IF-Färbung von Arg1 und GS in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen.....	105
Abb. 54: IHC-Färbung von F4/80 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	106
Abb. 55: IHC-Färbung von α -SMA in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	107

Abb. 56: IHC-Färbung von Desmin in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen ...	108
Abb. 57: IHC-Färbung von TGFBi in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen.....	110
Abb. 58: TGFBi Analyse von Leberprotein und Plasma von CDAA-gefütterten Mäusen	111
Abb. 59: IHC-Färbung von Postn in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen	112
Abb. 60: Postn Analyse von Leberprotein und Plasma von CDAA-gefütterten Mäusen	113
Abb. 61: Korrelationsanalyse der Liganden TGFBi und Postn mit dem Fibroselevel	116
Abb. 62: Korrelationsanalyse der Liganden TGFBi und Postn mit dem Fibroselevel, nach Fütterungsmodellen getrennt	117
Abb. 63: Korrelationsanalyse der Liganden TGFBi und Postn mit dem Fibroselevel, nach Genotypen getrennt	118
Abb. 64: Korrelationsanalyse des Liganden TGFBi mit dem Liganden Postn.....	119
Abb. 65: Gewichtsverlauf von Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen.....	121
Abb. 66: Makroskopischer Vergleich von Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen	121
Abb. 67: PASI Scoring der Haut von IMQ-behandelten Mäusen	122
Abb. 68: Makroskopische Veränderung der Haut über die Dauer der IMQ Behandlung.....	123
Abb. 69: H&E Färbung der Haut von IMQ-behandelten Mäusen.....	124
Abb. 70: Veränderung der epidermalen Dicke der Haut von IMQ-behandelten Mäusen	125
Abb. 71: IF-Färbung von TGFBi in der Haut von IMQ-behandelten Mäusen	127
Abb. 72: Quantifizierung der TGFBi IF-Färbung der Haut von IMQ-behandelten Mäusen	128
Abb. 73: TGFBi Analyse aus Plasma von IMQ-behandelten Mäusen	129
Abb. 74: IF-Färbung von Postn in der Haut von IMQ-behandelten Mäusen	131
Abb. 75: Quantifizierung der Postn IF-Färbung der Haut von IMQ-behandelten Mäusen	132
Abb. 76: Postn Analyse aus Plasma von IMQ-behandelten Mäusen.....	133
Abb. 77: H&E Färbung der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen	135
Abb. 78: Dermale und epidermale Dicke der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen	135

Abb. 79: EvG Färbung der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen	136
Abb. 80: Masson Trichrom Färbung der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen	137
Abb. 81: Veränderung des Bindegewebes durch die Behandlung mit Bleomycin ..	138
Abb. 82: H&E Färbung der Lunge von Bleomycin-behandelten Mäusen.....	140
Abb. 83: Sirius Rot Färbung der Lunge von Bleomycin-behandelten Mäusen.....	141
Abb. 84: Sirius Rot Färbung der Niere von Bleomycin-behandelten Mäusen.....	142
Abb. 85: PAS Färbung der Niere von Bleomycin-behandelten Mäusen	143
Abb. 86: IF-Färbung von TGFB α in der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen	145
Abb. 87: TGFB α Analyse aus Plasma und Hautprotein von Bleomycin- behandelten Mäusen	146
Abb. 88: IF-Färbung von Postn in der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen .	147
Abb. 89: Postn Analyse aus Plasma und Hautprotein von Bleomycin- behandelten Mäusen	148

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Gekaufte Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	44
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien.....	45
Tab. 3: Geräte	46
Tab. 4: Primer für Genotypisierung.....	48
Tab. 5: Primärantikörper	48
Tab. 6: Sekundärantikörper	49
Tab. 7: Sekundärantikörper mit HRP gekoppelt	50
Tab. 8: Sekundärantikörper für Simple Western.....	50
Tab. 9: Sonden für In Situ Hybridisierung	50
Tab. 10: Kits und Enzyme.....	50
Tab. 11: Verwendete Software	51

1 EINLEITUNG

1.1 Die Leber und ihre Funktion

1.1.1 Anatomie und Aufbau der Leber

Die Leber (Hepar) gilt als das schwerste innere Organ und die größte Drüse im menschlichen Körper und macht mit circa anderthalb Kilogramm zwei bis drei Prozent des gesamten Körpergewichts eines Erwachsenen aus (Skandalakis et al., 2004). Die Leber befindet sich im rechten oberen Quadranten des Abdomens, unterhalb des Zwerchfells. Anatomisch gesehen, wird die Leber in vier Lappen aufgeteilt: den rechten Leberlappen (*Lobus dexter*), der den Größten darstellt, gefolgt von dem linken Leberlappen (*Lobus sinister*) und den zwei kleinsten Lappen, nämlich dem quadratischen Leberlappen (*Lobus quadratus*) und dem „geschwänzten“ Leberlappen (*Lobus caudatus*) (Vernon et al., 2022).

Die Leber wird auf zwei Arten mit Blut versorgt, mit arteriellem und portal venösem Blut, diese doppelte Versorgung ist bei den parenchymatösen Organen einzigartig (Shetty et al., 2018; Augustin et al., 2017). Über die Leberarterie gelangt sauerstoffreiches Blut in die Leber, dies macht circa 25 - 30 % der Blutversorgung aus (Vernon et al., 2022; Kubes et al., 2018; Knolle et al., 2016). Der größte Anteil der Blutversorgung (70 - 75 %) findet über die Portalvene statt (Cheng et al., 2021). Dieses Blut ist sowohl reich an Nährstoffen aus der Verdauung, als auch an Toxinen, sowie pathogenen Bestandteilen aus dem Darm, Viren und verschiedenen Abfallprodukten (Kubes et al., 2018; Crispe, 2009; Bhandari et al., 2020).

Die Leber besteht aus vielen verschiedenen Zellen, den größten Anteil an Leberzellen bilden dabei die Hepatozyten, die circa 70 – 85 % der hepatischen Zellpopulation ausmachen (Zhou et al., 2016). Sie spielen eine wichtige Rolle in metabolischen, sekretorischen und endokrinen Prozessen. Die restlichen rund 30 % der Zellen, die in der Leber zu finden sind, bestehen größtenteils aus Endothelzellen, Lymphozyten und spezialisierten Makrophagen, den sogenannten Kupffer-Zellen (Wang et al., 2017; Racanelli et al., 2006; Smedsrød et al., 1990).

Die Leberlappen sind in kleine Leberläppchen unterteilt, welche ca. 1 – 2 mm groß sind. Im Querschnitt zeigen sich diese Leberläppchen als Hexagone und stellen die kleinste funktionelle Einheit der Leber dar (s. Abb. 1 A). In der Mitte jedes Läppchens befindet sich eine Verästelung der Zentralvene, deren Eckpunkte als Portalfelder bezeichnet werden, in denen Abzweigungen der Portalvene, der Leberarterie und des

Gallenganges verlaufen. Diese drei Äste werden zusammen als Glisson-Trias bezeichnet. Sauerstoffreiches Blut aus der Leberarterie und nährstoffreiches Blut aus der Portalvene fließt aus dem Portalfeld in die Lebersinusoide.

Die Gallenflüssigkeit, die in den Hepatozyten produziert wird, wird über die sogenannten Hering-Kanälchen, in entgegengesetzter Richtung zum Blutstrom, von der Leberpforte über die Gallenblase zum Duodenum transportiert (s. Abb. 1 B) (Trefts et al., 2017; Farina et al., 2014; Hundt et al., 2022).

Die verschiedenen Bereiche innerhalb eines Leberläppchens werden in drei unterschiedliche Zonen eingeteilt (Zone 1 - 3). Je nach Zone, finden unterschiedliche Stoffwechselprozesse statt, diese Einteilung in die verschiedenen Bereiche wird auch als „metabolische Zonierung“ bezeichnet (Trefts et al., 2017).

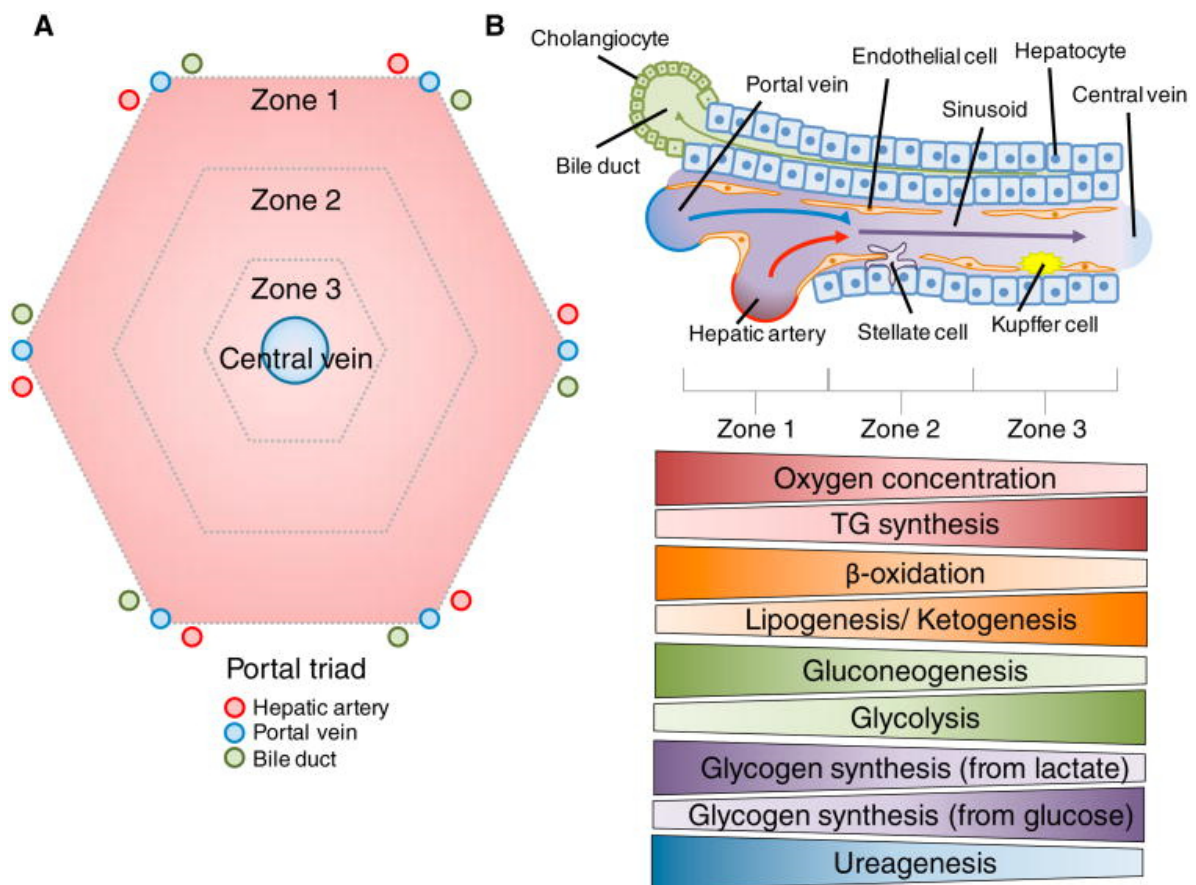


Abb. 1: Leber. (A) Leberläppchen geometrisch dargestellt als Hexagon. Ein Leberläppchen ist unterteilt in drei Zonen, in der Mitte befindet sich die Zentralvene. Jede Triade besteht aus Ästen der Leberarterie, der Portalvene und des Gallenganges. (B) Schematische Darstellung eines hepatischen Sinusoids mit entsprechender Zonierung und zugehörigen metabolischen Prozessen innerhalb des Sinusoids. Blut aus der Portalvene (blauer Pfeil) vermischt sich mit Blut aus der Leberarterie (roter Pfeil) und fließt durch das sinusoidale Gefäß Richtung Portalvene (lila Pfeil).
Abbildung und Beschriftung übernommen aus Trefts et al., 2017 (Lizenznummer: 5537070057320) und Bildunterschrift teilweise übernommen aus Augustin et al., 2017.

Vergleicht man die humane Leber mit der murinen Leber, sind überwiegend Gemeinsamkeiten zu sehen. Ein Unterschied der beiden Lebern ist jedoch die Architektur. So ist die murine Leber in Lappen gegliedert, während es sich bei der humanen Leber um eine „nicht-gelappte“ Leber handelt. Diese Lappung der murinen Leber, macht die Entnahme und Untersuchung der Leber sehr einfach. In der mikroskopischen Architektur sind sich die beiden Lebern vergleichsweise ähnlich (Kruepunga et al., 2019).

1.1.2 Funktion der Leber

Als größtes inneres Organ, ist die Leber für eine Vielzahl biologischer Prozesse verantwortlich. Sie ist beteiligt an verschiedenen Stoffwechselfvorgängen, Entgiftung, Gallenbildung und Proteinproduktion (Cheng et al., 2021; Trefts et al., 2017). Die besondere Eigenschaft der Leber ist, dass sie das einzige feste Organ ist, welches dazu in der Lage ist, sich selbst zu „regenerieren“ (Michalopoulos et al., 2021; Deng et al., 2018). Der Begriff Leberregeneration ist allgemein bekannt, doch ist eine korrektere Beschreibung des Vorganges „kompensatorische Hyperplasie“, denn dabei wird nicht das ursprüngliche Gewebe des Organs ersetzt, sondern Zellen des verbleibenden Gewebes proliferieren und / oder vergrößern sich um die ursprüngliche Lebermasse zu ersetzen (Kang et al., 2012). Da Hepatozyten die Hauptzellart der Leber sind, hängt die Leberregeneration maßgeblich von der Proliferation dieser Zellen ab (Miyaoka et al., 2012). Des Weiteren ist die Leber immunologisch sehr aktiv und bildet eine systemische Barriere für Pathogene und Giftstoffe aus dem Darm (Kubes et al., 2018; Bhandari et al., 2020). Wie in 1.1.1 beschrieben, gelangen Nährstoffe aus dem Darm über die Portalvene in die Lebersinusoide. Über die Sinusoide der Leber treten Sauerstoff und Nährstoffe aus, welche dann über den Disse-Raum in die Hepatozyten gelangen, wo sie aufgenommen werden und zum Beispiel für die Herstellung von Proteinen verwendet werden (Poisson et al., 2017). Zum Beispiel produzieren und sekretieren Hepatozyten eine Vielzahl von Proteinen, die eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem spielen. Die Hepatozyten reagieren dabei auf pathogene- und Entzündungssignale und antworten darauf, indem sie Proteine des Immunsystems in den Blutfluss sekretieren. Zu diesen Proteinen gehören zum Beispiel verschiedene Proteinaseinhibitoren, wie Antitrypsin oder Antichymotrypsin, welche Proteasen inhibieren die von Pathogenen freigesetzt wurden (Zhou et al., 2016).

Weiterhin produzieren Hepatozyten Gallenflüssigkeit, die zum einen vom menschlichen Körper benötigt wird um die Fette in der Nahrung verdaulich zu machen und zum anderen um exogene potentiell schädliche Substanzen, aber auch endogene Substrate wie Bilirubin, aus dem Körper auszuschleiden (Hundt et al., 2021; Boyer, 2013; Farina et al., 2014). Des Weiteren schützt die Galle den Organismus auch vor Darminfektionen, indem sie inflammatorische Zytokine und Immunglobulin A ausscheidet und das angeborene Immunsystem im Darm stimuliert (Boyer, 2013).

Eine weitere wichtige Funktion der Leber ist die Entgiftung. Durch viele Stoffwechselprozesse entstehen verschiedene giftige Substanzen wie zum Beispiel Ammoniak, der von der Leber in Harnstoff umgewandelt wird (De Chiara et al., 2018). Auch Ethanol wird von der Leber abgebaut. Durch das Enzym Alkoholdehydrogenase wird der Alkohol zunächst in ein Zwischenprodukt umgewandelt und anschließend von dem Enzym Aldehyddehydrogenase zu Essigsäure abgebaut (Crabb et al., 2004).

1.1.3 Lebererkrankungen

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) ist heutzutage einer der Haupterkrankungen in den westlichen Ländern und betrifft circa 25 % der Bevölkerung, was sie zu der am meisten verbreiteten chronischen Lebererkrankung weltweit macht (Cotter et al., 2020; Li et al., 2018; Gao et al., 2013). Charakterisiert ist diese Erkrankung durch eine exzessive Fettablagerung in der Leber, welche nicht durch den Konsum von Alkohol verursacht wurde. Zu den häufigsten Risikofaktoren, die zu einer NAFLD führen können, zählen Fettleibigkeit, Insulinresistenz und verschiedene Erscheinungen des metabolischen Syndroms (Chalasanani et al., 2012; Angulo et al., 2007; Schierwagen et al., 2015).

Im Jahre 2013 wurde davon ausgegangen, dass rund eine Milliarde Menschen weltweit an einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung leiden (Loomba et al., 2013). Haldar et al. konnte 2019 zeigen, dass zwischen 2002 und 2016 die Verbreitung der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung um das 7-fache angestiegen ist, was sie zu einer der führenden Krankheiten macht, in deren Verlauf eine Lebertransplantation notwendig wird (Haldar et al., 2019). Der Begriff nicht-alkoholische Fettlebererkrankung bezeichnet den Krankheitsverlauf, welcher sich von der nicht-alkoholischen Fettleber (*non-alcoholic fatty liver*, NAFL) zu einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) entwickeln kann, welche

wiederum zu einer Fibrose (ein Teil des Lebergewebes wird durch Bindegewebe ersetzt) und letztendlich in eine Zirrhose (das Endstadium der Leberfibrose, bei der es zu einer starken Vernarbung und Verhärtung des Organs kommt) übergehen kann (s. Abb. 2). Eine Leberzirrhose ist oft die Ursache für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (*hepatocellular carcinoma*, HCC) (Cotter et al., 2020).

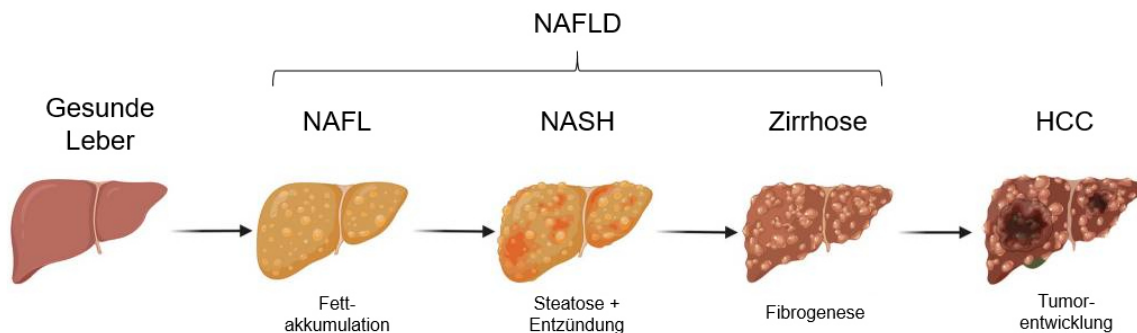


Abb. 2: Entwicklung von nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen. Eine nicht-alkoholische Fettleber (NAFL) entsteht beispielsweise durch Fettleibigkeit. Der weitere Krankheitsverlauf ist eine weitere Verfettung der Leber mit zusätzlicher Entzündung (NASH), welche im weiteren Verlauf zu der Vernarbung der Leber (Zirrhose) und schlussendlich zum hepatozellulären Karzinom (HCC) führen kann. *Abbildung übernommen aus Engelmann et al., 2022 (Lizenzfrei: CC BY 4.0) und Beschriftung modifiziert.*

Bei der NAFL handelt es sich um eine relativ harmlose Lebererkrankung, mit einem nur sehr geringfügigen Risiko in ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium überzugehen. Im Gegensatz dazu, zeigt die NASH ein erheblich gesteigertes Risiko für eine Leberfibrose (Singh et al., 2015). Gekennzeichnet ist die NASH durch eine starke Fettakkumulation in den Hepatozyten, welche dazu führt, dass der Fettabbau und die Reinigungsfunktion der Leber gestört sind. Durch die Verfettung der Leber kommt es vermehrt zu oxidativem Stress und einer abnormalen Produktion von Zytokinen, was zusätzlich zur Steatose noch zu einer Entzündung der Leber führt (Matsumoto et al., 2013; Schierwagen et al., 2015). Die Zirrhose ist das Endstadium einer Vielzahl chronischer Lebererkrankungen und zeigt sich durch nekrotische Entzündung, Fibrose und regenerative Knoten, welche die normale Leberstruktur so modifizieren, dass die Funktion der Leber stark eingeschränkt ist und die vaskuläre Architektur der Leber sich maßgeblich verändert (de la Garza et al., 2017). Im Jahre 2017 war Leberzirrhose die dreizehnt-häufigste Todesursache weltweit (Abbas et al., 2017). Menschen mit einer Leberzirrhose haben ein sehr hohes Risiko an einem HCC zu erkranken (Estes et al.,

2018). Das HCC ist die am stärksten vertretene primäre Form von Leberkrebs und macht circa 90 % der Fälle von Leberkrebs aus (Llovet et al., 2021). Neben einer NASH, können auch Infektionen mit dem Hepatitis B oder Hepatitis C Virus für die Entwicklung eines HCCs verantwortlich sein, allerdings wird vor allem in der westlichen Welt die NASH zu einer immer stärker werdenden Krankheitsursache für ein HCC (Estes et al., 2018).

1.1.4 Mausmodelle zu Lebererkrankungen

Eines der meist verwendeten Mausmodelle, um die NASH zu untersuchen, ist die Fütterung mit einer Methionin- / Cholin-defizienten Diät (MCD Diät). Diese Diät zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Sucrose (40 %) und Fett (10 %) und dem Fehlen von Methionin und Cholin aus (Ibrahim et al., 2016; Machado et al., 2015). Bei Methionin handelt es sich um eine essentielle Aminosäure, welche eine Schlüsselrolle in vielen zellulären Prozessen spielt, sie wird benötigt bei der Proteinsynthese und spielt ebenfalls eine Rolle in der S-Adenosylmethionin- (SAM) und Gluthation-Synthese (GSH). Bei SAM und GSH handelt es sich um zwei wichtige Metaboliten, in der zellulären Homeostase und der Leberfunktion (Caballero et al., 2010; Mari et al., 2010). Cholin hingegen ist essentiell für die de novo Synthese von Phosphatidylcholin und wird für den Export von Triglyzeriden aus den Hepatozyten über die *low density* Lipoproteine (LDL) benötigt (Caballero et al., 2010; Li et al., 2008). Das Fehlen von Cholin wirkt sich auf die Sekretion der *very low density* Lipoproteine (VLDL) aus, was zu einer verstärkten Fettakkumulation in der Leber und einer Abnahme der VLDL-Synthese führt (Yao et al., 1990). Charakteristisch für dieses Modell ist die Ausbildung einer makrovesikulären Steatose, hepatozellulärer Tod, Entzündung, oxidativer Stress und Fibrose (Caballero et al., 2010; Matsumoto et al., 2013; Leclercq et al., 2000). Bei der MCD Diät handelt es sich um eine gut reproduzierbare Methode zur Nachahmung einer NASH, deren Vorteil es ist, dass es möglich ist innerhalb kürzester Fütterungszeit einen histologischen NASH-Phänotyp zu produzieren. Allerdings gibt es auch einen Nachteil: Das metabolische Profil der NASH von MCD-behandelten Mäusen unterscheidet sich stark von einer echten NASH (Ibrahim et al., 2016). So kommt es in MCD-behandelten Mäusen zu einem sehr starken Gewichtsverlust (bis zu 40 % innerhalb von zehn Wochen), was auch zu einer Abnahme der Skelettmuskulatur führt und es somit zu einem erhöhten Sterberisiko bei den Mäusen kommt (Kashireddy et

al., 2004; Rizki et al., 2006; Tølbøl et al., 2019; Wei et al., 2020). Des Weiteren zeigen sich Unterschiede im Blutzucker, der peripheren Insulinsensitivität, dem Leptin-Level, den Blut-Triglyzeriden und im Cholesterolverwert (Ibrahim et al., 2016).

Ein weiteres NASH-Modell, welches diese Problematik umgeht, ist die Cholin-defiziente, L-Aminosäure-definierte Diät (CDAA Diät). Dieser Diät fehlt das Cholin, allerdings ist diesem Futter eine Mischung aus verschiedenen L-Aminosäuren beigefügt (Nakae et al., 1995). Ebenso wie bei der MCD Diät, kommt es bei der Fütterung mit CDAA Futter zu einer Blockade der Fettsäureoxidation in den Hepatozyten, zu einer Steigerung der Lipidsynthese, oxidativem Stress und Entzündung, was letztendlich in Leberfibrose endet. Ein weiterer Vorteil ist, dass es bei dieser Diät zu keinem Gewichtsverlust in den gefütterten Mäusen kommt (Ibrahim et al., 2016; Matsumoto et al., 2012; Wei et al., 2020; Kodama et al., 2009).

1.2 Anatomie der Haut und ihre Funktion

1.2.1 Anatomie, Histologie und Funktion der Haut

Die Haut ist das größte Organ und macht rund 16 % des gesamten Körpergewichtes aus (Roger et al., 2019). Sie bedeckt die gesamte Oberfläche des Körpers und stellt eine schützende physikalische Barriere zwischen dem Körper und der Umwelt dar, verhindert den Verlust von Wasser und Elektrolyten, reduziert das Eindringen von Chemikalien und schützt den Körper vor pathogenen Mikroorganismen (Khavkin et al., 2011, Chiller et al., 2001). Die Haut ist besiedelt mit einer Vielzahl verschiedenster Mikroorganismen, wovon die meisten harmlos oder sogar notwendig für ihren Wirt sind (Grice et al., 2013; Roth et al., 1988) (s. Abb. 3).

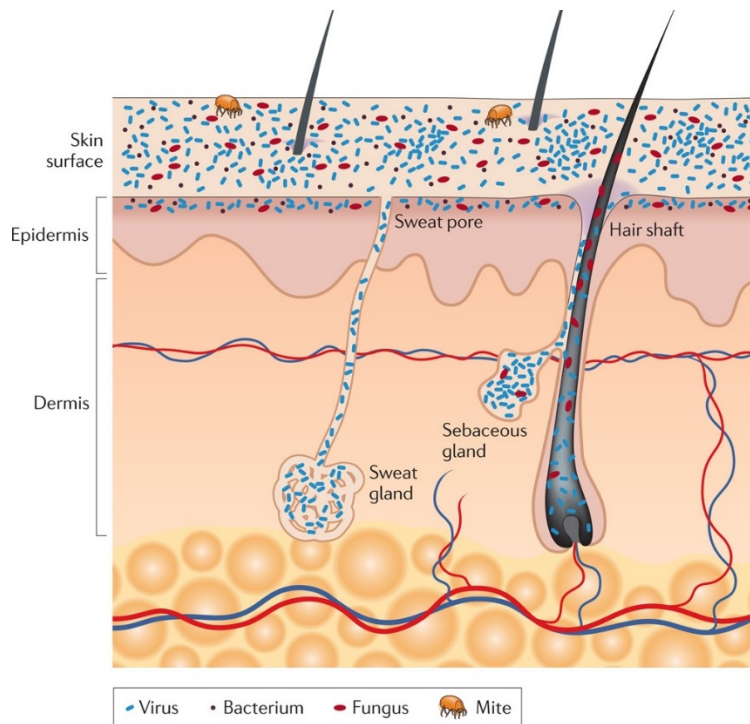


Abb. 3: Schematische Darstellung der Haut-Histologie und deren Besiedelung mit verschiedenen Mikroorganismen.

Abbildung und Beschriftung übernommen aus Grice et al., 2013 (Lizenznummer: 5537080801541).

Des Weiteren ist die Haut wichtig, um die Körpertemperatur zu regulieren und die Immunabwehr zu unterstützen. Die Haut enthält sensorische und autonome Nerven und sensorische Rezeptoren, welche Stimuli wie Berührungen, Vibrationen, Druck, Temperatur oder Schmerz wahrnehmen (Khavkin et al., 2011).

Die Haut wird in insgesamt drei Schichten unterteilt: die Epidermis, die Dermis und die Subkutis. Dabei wird die Epidermis noch in vier weitere Unterschichten unterteilt: die Hornschicht, die Körnerzellschicht, die Stachelzellschicht und die Basalzellschicht. Unterhalb der Basalzellschicht befindet sich die Basalmembran (s. Abb. 4) (Fuchs et al., 2002; Roger et al., 2019).

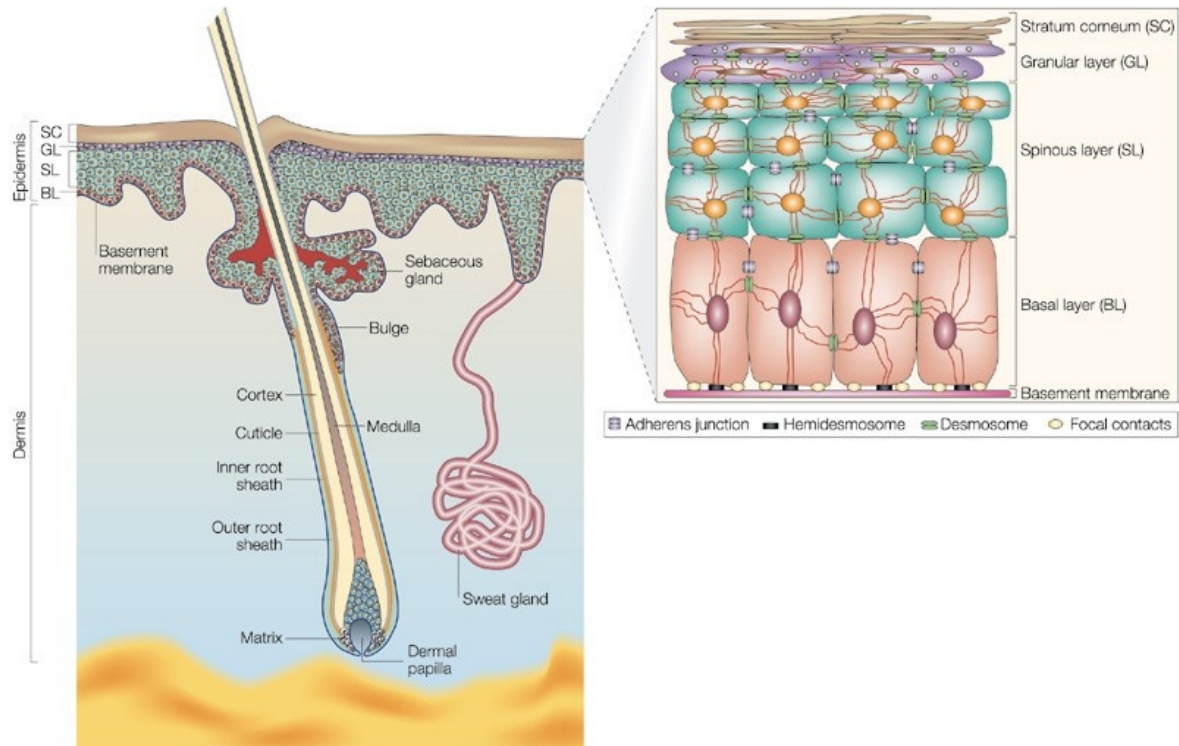


Abb. 4: Schematische Darstellung der Hautschichten. Die Haut besteht aus drei Hauptschichten, der Epidermis, der Dermis und der Subkutis (in der Abbildung die unterste Schicht in gelb dargestellt). Die Epidermis wird in weitere Schichten unterteilt: die Hornschicht, die Körnerzellschicht, die Stachelzellschicht, die Basalzellschicht und die Basalmembran.
 Abbildung übernommen aus Fuchs et al., 2002 (Lizenznummer: 5537090264384).

Die zwei Hauptschichten der Haut sind die Epidermis und die Dermis. Die Epidermis ist die oberste Hautschicht. In der Epidermis sind vor allem vier Arten von Zellen vertreten: Die am häufigsten vorkommenden Zellen sind die Keratinozyten, sie bilden ein mehrschichtiges, verhornendes Epithel, produzieren Keratin und sind verantwortlich für die epidermale Wasserbarriere indem sie Lipide produzieren und sekretieren (Arda et al., 2014; Piipponen et al., 2020; Yousef et al., 2022). Zusammen mit Fibroblasten spielen Keratinozyten außerdem eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (Piipponen et al., 2020; Werner et al., 2007). Des Weiteren finden sich in der Epidermis Melanozyten die Melanin produzieren, welches für die Pigmentierung der Haut verantwortlich ist (Yousef et al., 2022). Merkelzellen, die als Tastzellen fungieren sind nur in geringer Anzahl in der Basalmembran der Epidermis zu finden, weiterhin finden sich Antigen-präsentierende Langerhans-Zellen (Arda et al., 2014; Boulais et al., 2007; Streilein et al., 1984).

Die Dermis ist die zweite Hautschicht, die sich direkt unterhalb der Epidermis befindet. Bei ihr handelt es sich um ein faserartiges, kollagenhaltiges und elastisches Gewebe.

In der Dermis befinden sich viele Gefäße, Nerven und sensorische Rezeptoren. Sie unterstützt die Verschieblichkeit der Epidermis und versorgt sie mit Nährstoffen. Die Subkutis ist die unterste Hautschicht, die hauptsächlich aus Fettgewebe besteht (Arda et al., 2014).

Die Dicke der unterschiedlichen Schichten variiert und hängt von der Körperregion ab, so sind die haarlosen Hautschichten an der Handflächeninnenseite und den Fußsohlen die dicksten Hautschichten, da an diesen Stellen das *Stratum corneum* und das *Stratum spinosum* verdickt sind (Yousef et al., 2022).

Die murine Haut unterscheidet sich von der humanen Haut in der Mikrostruktur der Dermis. Während der Mensch, abgesehen von der Kopfhaut, nur eine sehr geringe Haarfolikeldichte auf der Haut zeigt, besitzt die murine Haut eine sehr hohe Haarfolikeldichte.

Des Weiteren gibt es in der humanen Haut Ausstülpungen der Epidermis, die in die darunterliegende Dermis hineinragen, diese Ausstülpungen werden als Reteleisten bezeichnet und sind in der murinen Haut nicht vorhanden (s. Abb. 5) (Lynch et al., 2018).

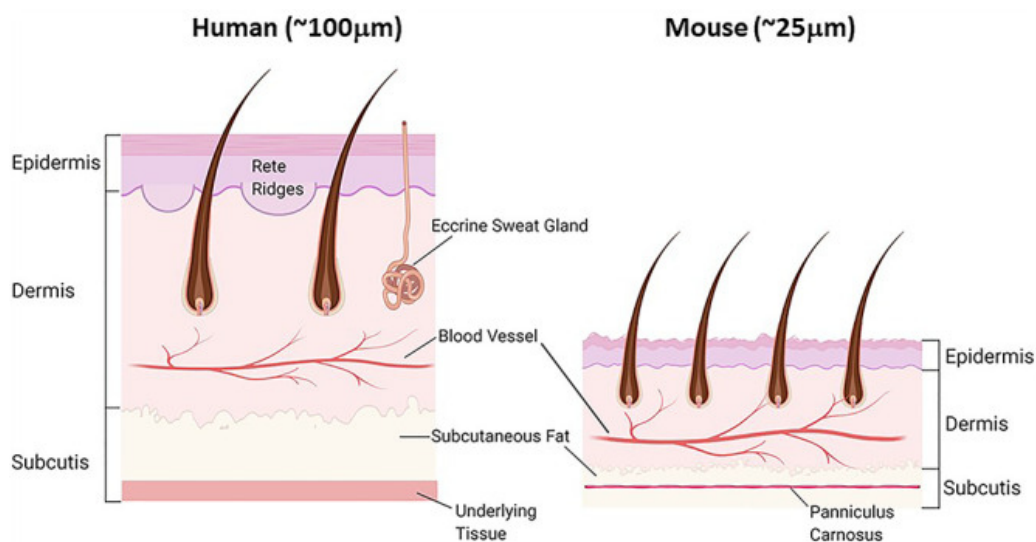


Abb. 5: Vergleich der Struktur von humaner und muriner Haut. Die Epidermis und Dermis im Menschen sind dicker als in der Maus. Abgesehen von der Kopfhaut des Menschen, zeigt die Haut der Maus eine deutlich höhere Haarfolikeldichte als die menschliche Haut. Die humane Epidermis besitzt Ausstülpungen (Reteleisten, „rete ridges“), welche in der murinen Haut nicht vorkommen.

Abbildung übernommen aus Shi et al., 2021 (Lizenzfrei: CC BY 4.0) und Bildunterschrift teilweise übernommen aus Lynch et al., 2018.

1.2.2 Hauterkrankungen

1.2.2.1 Psoriasis

Circa 2 – 5 % der Weltbevölkerung leidet unter der Hauterkrankung Psoriasis (Schuppenflechte) (Duffin et al., 2008; Christophers, 2001; Wagner et al., 2010; Raychaudhuri et al., 2014). Dabei handelt es sich um eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die sich histologisch vor allem mit epidermaler Hyperplasie (Akanthose), Leukozyten-Infiltration der Epidermis (Parakeratose), starker Hyperproliferation der Keratinozyten, Entzündung und verstärkter Vaskularität der Haut äußert (Lin et al., 2015; Nickoloff et al., 2004; Boehncke et al., 2015; Moos et al., 2019). Diese immunvermittelte Erkrankung liegt einer Dysregulation der Immunzellen und der Keratinozyten zu Grunde, allerdings ist die Pathogenese zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt (Jabeen et al., 2020). 70 – 80 % der Patienten mit Psoriasis leiden an einer leichten Form der Erkrankung und können mit topischen Therapien behandelt werden (Boehncke et al., 2015). Es ist bekannt, dass es durch Psoriasis in der Haut zu funktionellen und strukturellen Veränderungen kommt. Es ist davon auszugehen, dass Faktoren wie das Klima, Sonnenstrahlen und auch Ethnizität einen Einfluss auf die Entwicklung von Psoriasis haben (Jacobson et al., 2011; Christophers, 2002). Psoriasis kann jede Stelle des Körpers betreffen, typischerweise betrifft es aber vor allem die Streckseiten der Unterarme und Schienenbeine, die Gegend um den Bauchnabel herum, sowie peri-anale und retroaurikuläre Regionen (Boehncke et al., 2015) (s. Abb. 6). Um die Schwere der Psoriasis-Erkrankung zu erfassen, wird der sogenannte PASI-Score (*Psoriasis Area and Severity Index*) verwendet. Dieses Scoring Verfahren bewertet die Rötung, die Infiltration bzw. die Dicke und die Schuppung der Haut (Schmitt et al., 2005).



Abb. 6: Klinische Erscheinungsformen von Psoriasis beim Menschen.
Abbildung übernommen aus Boehncke et al., 2015 (Lizenznummer: 5537091137219).

1.2.2.2 Sklerodermie

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine rheumatische, autoimmun-vermittelte Erkrankung, die sich durch eine umfangreiche Fibrose zeigt, einhergehend mit einer verstärkten Kollagensynthese in der Haut, in Gelenken und verschiedenen inneren Organen, wie zum Beispiel in der Lunge, im Herz, in der Niere und im Gastrointestinaltrakt (Denton et al., 2017; Yamamoto et al., 1999; Haynes & Gershwin, 1982; Krieg & Meurer, 1988; Zawatsky et al., 2021). Die vielfältige Beeinträchtigung der inneren Organe kann zu einer fatalen Dysfunktion der Organe führen, wodurch diese Erkrankung auch mit einer hohen Sterblichkeitsrate einhergeht (Błyszczuk et al., 2019). Ein typisches Symptom der systemischen Sklerose ist die Sklerodermie (Sklerose der Haut). Es kommt zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten, da die Erkrankung trotz neuer Behandlungsmöglichkeiten oft fortschreitet (Yamamoto et al., 1999).

Die Sklerodermie stellt eine sehr komplexe Erkrankung dar, die eine Vielzahl klinischer Auswirkungen zeigt. Es kommt zu einer Bindegewebsstörung, die sich klassischerweise durch eine Verdickung und Verhärtung der Haut zeigt. Neben diesen Symptomen kommt es bei manchen Patienten zu geschwollenen Fingern, Entzündungen des Bewegungsapparates, starken Müdigkeitserscheinungen und vaskulären Dysfunktionen (Denton et al., 2017; Bellando-Randone et al., 2012; Katsumoto et al., 2011).

Eingeteilt wird die Sklerodermie in zwei Haupttypen: die lokale und die systemische Sklerodermie. Während bei der lokalen Sklerodermie hauptsächlich die Haut betroffen ist, zeigt die systemische Sklerodermie auch Auswirkungen auf verschiedene innere Organe (Odonwodo et al., 2022; Careta et al., 2015; Denton et al., 2017). Welche Faktoren die Entstehung einer Sklerodermie beeinflussen, ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Während der Erkrankung kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems, was den Effekt hat, dass Blutgefäße und Gewebe beschädigt werden, was dann zur Folge hat, dass es zu Narbengewebs-Formationen und der Akkumulation von überschüssigem Kollagen kommt (Odonwodo et al., 2022).

1.2.3 Mausmodelle zu Hauterkrankungen

Um die Hauterkrankung Psoriasis im Mausmodell nachzuahmen, gibt es verschiedene Modelle. Das Bekannteste und am häufigsten verwendete Modell stellt die topische Anwendung des Wirkstoffs Imiquimod (IMQ) dar (Chamcheu et al., 2016). Bei diesem Wirkstoff handelt es sich um einen Liganden der beiden *Toll-like*-Rezeptoren 7 und 8,

der dafür bekannt ist, eine Psoriasis-ähnliche Dermatitis zu induzieren (El Malki et al., 2013; Gilliet et al., 2004). IMQ ist ein sehr wirksamer Immunaktivator und wird in der Klinik bei der Behandlung von Genitalwarzen, denen eine Infizierung mit dem humane Papilloma Virus (HPV) zu Grunde liegt, eingesetzt (Van der Fits et al., 2009). Eingesetzt wird dafür Aldara® 5 % Creme, welche fünf Prozent des Wirkstoffes IMQ enthält. Die Creme wird jeden Tag auf die Haut der Maus aufgetragen (Moos et al., 2019). Ein großer Vorteil dieses Modells ist die kurze Behandlungsdauer die benötigt wird, um eine Psoriasis-ähnliche Erkrankung zu induzieren. Bereits 12 – 24 Stunden nach der ersten Applikation zeigen sich die ersten mikroskopischen Veränderungen in der Epidermis und nach zwei bis drei Tagen zeigen sich die ersten makroskopischen Veränderungen der Haut (Jabeen et al., 2020; van der Fits et al., 2009). Ein weiterer großer Vorteil ist, dass es sich dabei um ein sehr kostengünstiges Modell handelt (Jabeen et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass das IMQ-Modell in Mäusen zu einer, dem Menschen sehr ähnlichen, Plaque-typischen Psoriasis führt, die sich charakteristisch äußert in Hautrötung, einer Verdickung und Schuppung der Haut und epidermalen Veränderungen, wie Akanthose und Parakeratose. Des Weiteren kommt es durch die topische Applikation von IMQ zu inflammatorischen Infiltraten, die aus T-Zellen, Neutrophilen und dendritischen Zellen bestehen (Jabeen et al., 2020, Van der Fits et al., 2009; Griffiths et al., 2007).

Eines der am meisten verwendeten Modelle, um Sklerodermie-ähnliche Symptome in Mäusen zu induzieren, ist die Verwendung von Bleomycin (BLM). BLM gehört zu einer Subfamilie von Glykopeptid-Antibiotika und stammt aus dem Bakterium *Streptomyces verticillus*. In der Klinik wird BLM zur Behandlung verschiedener Tumore, wie zum Beispiel bei Hodenkrebs oder dem Hodgkin-Lymphom eingesetzt (Brandt et al., 2022; Avouac et al, 2012; Yamamoto et al., 1999). Der primäre Mechanismus der Wirkungsweise von BLM, liegt in seiner Fähigkeit die DNA zu schädigen, indem es Metallionen bindet, um dann Metallobleomycin-Komplexe zu bilden. Die reaktiven Sauerstoffspezies die durch diese Komplexe generiert werden, führen zu Einzelstrang- und Doppelstrang-Brüchen in bestimmten Bereichen der DNA. Es kommt dadurch vor allem zur Freisetzung der Base Thymin, was zum Stillstand des Zellzyklus in der G2 Phase führt. Der Stillstand in dieser Phase des Zyklus blockiert die Zellreplikation, was dazu führt, dass das Wachstum und die Reparatur von Gewebe verhindert wird (Brandt et al., 2022; Petering et al., 1990; Murray et al., 2018).

Im Mausmodell führt die subkutane Injektion von BLM, neben den Sklerodermie-ähnlichen Symptomen, ebenfalls zu einer Fibrose der Lunge (Yamamoto et al., 1999; Liang et al., 2014).

1.3 Endothelzellen

1.3.1 Aufbau und Funktion des Endothels

Das Endothel ist eine Schicht aus Endothelzellen (ECs), die das Innerste von Arterien, Kapillaren und Venen auskleidet (s. Abb. 7) (Krüger-Genge et al., 2019; Félétou, 2011). Durch das Endothel wird das Blut von fast allen anderen Geweben und Zellen abgegrenzt (Fodil et al., 2022). ECs, die mit rund 1000 m² die größte Gewebegrenzfläche des Körpers darstellen, sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen funktionell beteiligt (Géraud et al., 2014; Jaffe et al., 1987). Zum Beispiel besitzen ECs eine Barrierefunktion und sind an dem Transport verschiedener Nährstoffe beteiligt, tragen zur *Clearance* Funktion von LSECs bei und sind auch an Abwehrmechanismen beteiligt oder kommen bei der vaskulären Reparatur zum Einsatz, um nur einige wenige Aufgaben des Endothels zu nennen (Géraud et al., 2014; Minshall et al., 2006; Galley et al., 2004).

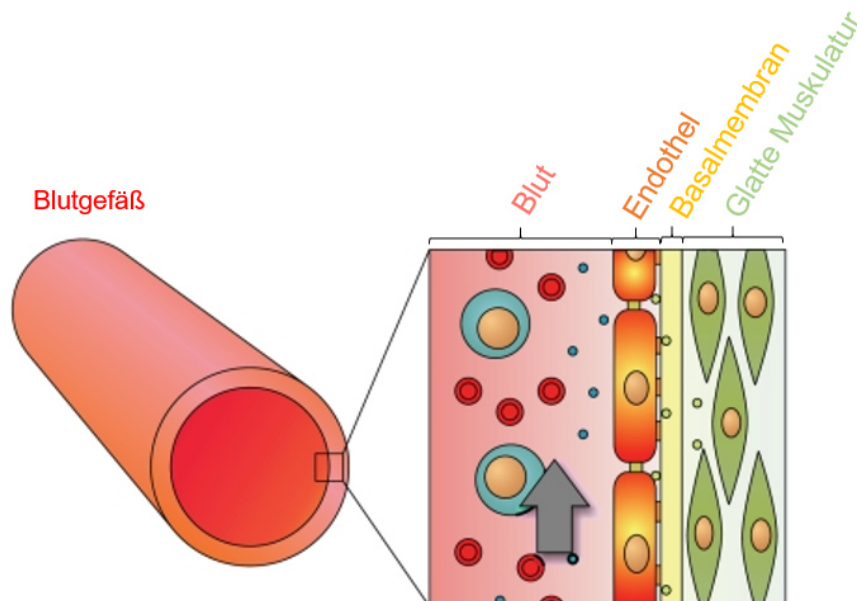


Abb. 7: Schematische Darstellung der Mikroumgebung endothelialer Zellen am Beispiel eines Blutgefäßes. Im Blut befinden sich unter anderem rote Blutzellen, Leukozyten und Signalmoleküle. Das Endothel bildet die Grenzfläche zwischen dem Blut und der glatten Muskulatur.

Abbildung übernommen und modifiziert aus van der Meer et al., 2009 (Lizenzfrei: CC BY 3.0).

1.3.2 Die Heterogenität von Endothelzellen

Eine Besonderheit von ECs stellt ihre Heterogenität dar (Géraud et al., 2010; Jambusaria et al., 2020; Gunawardana et al., 2021). Diese Heterogenität umfasst sowohl morphologische, als auch molekulare und funktionelle Eigenschaften (Géraud et al., 2014; Aird et al., 2007). Morphologisch unterscheiden sich ECs in ihrer Dicke, Form und Ausrichtung. Die endotheliale Zelldicke variiert von weniger als 0,1 μm in Kapillaren und Venen, bis hin zu einer Dicke von 1 μm in der Aorta (Florey et al., 1966). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sich ECs in den verschiedenen Organen auch in ihrer Zusammensetzung verschiedener subzellulärer Strukturen, wie zum Beispiel clathrinbeschichteter Vesikel, Fenestration und Basalmembran unterscheiden (Géraud et al., 2014; Krüger-Genge et al., 2019; Galley et al., 2004). Aufgrund dieser unterschiedlichen Merkmale, lassen sich die ECs in drei unterschiedliche Subtypen einteilen: das kontinuierliche Endothel, das fenestrierte Endothel und das diskontinuierliche, sinusoidale Endothel (s. Abb. 8) (Géraud et al., 2014; Augustin et al., 2017). Kontinuierliche ECs kommen in Arterien, Venen und Kapillaren der meisten Organe vor. Sie besitzen eine Basalmembran und sind nicht fenestriert. Der zweite Subtyp, die kontinuierlich fenestrierten ECs, sind in Kapillaren des Gastrointestinaltrakts, in Glomeruli der Niere und im *Plexus choroideus* des Gehirns zu finden. Sie zeichnen sich durch den Besitz einer Basalmembran und Fenestrationen mit 5 – 6 nm dünnen nicht membranartigen Diaphragmen aus (Géraud et al., 2014; Rostgaard et al., 1997; Augustin et al., 2017). Bei dem diskontinuierlichen sinusoidalen Endothel, welches in Kapillaren der Lebersinusoiden, der Milz und des Knochenmarks zu finden ist, ist keine Basalmembran vorhanden und die Fenestrationen besitzen keine Diaphragmen. Aufgrund dieser starken Variationen unterscheiden sich die drei Subtypen sehr stark in ihrer Permeabilität (Krüger-Genge et al., 2019; Géraud et al., 2014; Aird et al., 2007). Zum Beispiel ist das Endothel von Mikrogefäßen des Gehirns aufgrund seiner fehlenden Fenestrationen nur durchlässig für Moleküle mit einer Größe von bis zu 1 nm. Sinusoidale, diskontinuierliche Leberendothelien hingegen erlauben den Durchtritt von Molekülen bis zu einer Größe von 60 nm (Géraud et al., 2014). Diese signifikanten Unterschiede in der Morphologie, führen zu Unterschieden in der Funktion der ECs. Man kann die Funktionen von ECs auf zwei unterschiedliche Arten betrachten: Die organspezifischen ECs, die spezifische Aufgaben nur für ein ganz bestimmtes Gewebe übernehmen oder die ECs, die allgemeine Funktionen auf eine ganz gewebespezifische Weise ausüben. Ein Beispiel für eine gewebespezifische Funktion ist die Reinigung zellulärer Abfallprodukte

aus dem Kreislauf durch die Lebersinusoide über spezifischen *Scavenger* Rezeptoren, wie zum Beispiel Stabilin-1 und -2 (Géraud et al., 2014; Schledzewski et al., 2011).

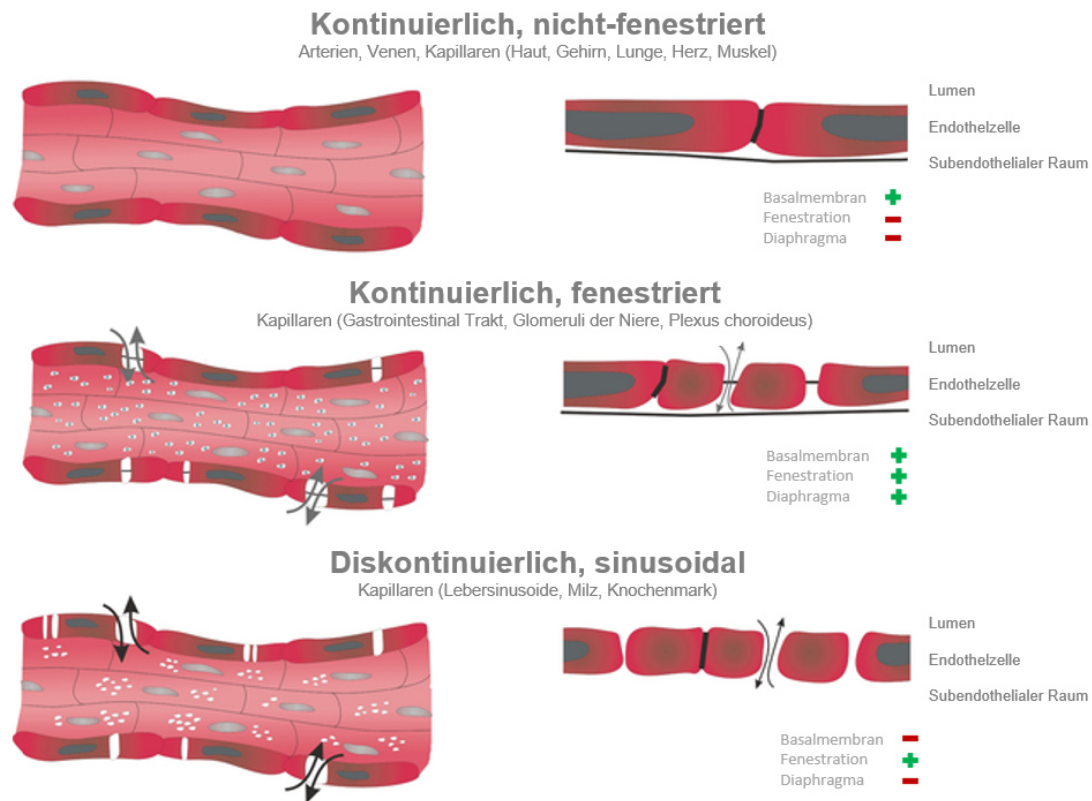


Abb. 8: Heterogenität von Endothelzellen. Kontinuierlich, nicht-fenestrierte Endothelzellen besitzen eine Basalmembran, aber keine Fenestrationsen und Diaphragmen. Bei kontinuierlichen und fenestrierten Endothelzellen sind sowohl Basalmembran, als auch Fenestrationsen mit Diaphragmen vorhanden. Die diskontinuierlichen, sinusoidalen Endothelzellen zeichnen sich durch Fenestrationsen ohne Diaphragmen und fehlender Basalmembran aus.

Abbildung übernommen und modifiziert aus Géraud et al., 2014 (Lizenznummer: 5537100236992).

1.3.3 Vaskuläre Nische

Die Bezeichnung „Nische“ wird in der Biologie verwendet um eine bestimmte Umgebung zu beschreiben, in der spezifische Interaktionen zwischen verschiedenen Zellpopulationen stattfinden (Ribatti et al., 2020). Dabei beinhaltet die vaskuläre Nische die physikalische und biochemische Mikroumgebung um die Blutgefäße herum. Endothelzellen, Parenchymzellen, Stromazellen sowie Tumorzellen interagieren dabei über parakrine Signale (auch angiokrine Signale genannt) miteinander (s. Abb. 9) (Ribatti et al., 2020; Géraud et al., 2014; Koch et al., 2017). Bei der parakrinen Signalübermittlung gelangen Botenstoffe durch Diffusion von der sezernierenden auf die benachbarten

Zellen, welche über einen spezifischen Rezeptor verfügen müssen. Zu solchen Botenstoffen gehören zum Beispiele Gewebshormone und Zytokine (Löffler, 6. Auflage). Die vaskuläre Nische bei der Leberregeneration gehört zu den am besten untersuchten gewebespezifischen vaskulären Nischen. Dabei sind vor allem Lebersinusoidale-endothelzellen (LSECs) an der Regulation der regenerativen Reparatur und der pathologischen Fibrose nach einer Gewebeschädigung beteiligt. Während der regenerativen Reparatur nach akutem Leberschaden führt eine Id-1-Aktivierung in LSECs zu einer Sekretion von Angiokinen wie Wnt-2 und HGF, welche die Leberregeneration und die Wiederherstellung der Organfunktion fördern (Géraud et al., 2014; Ding et al., 2014).

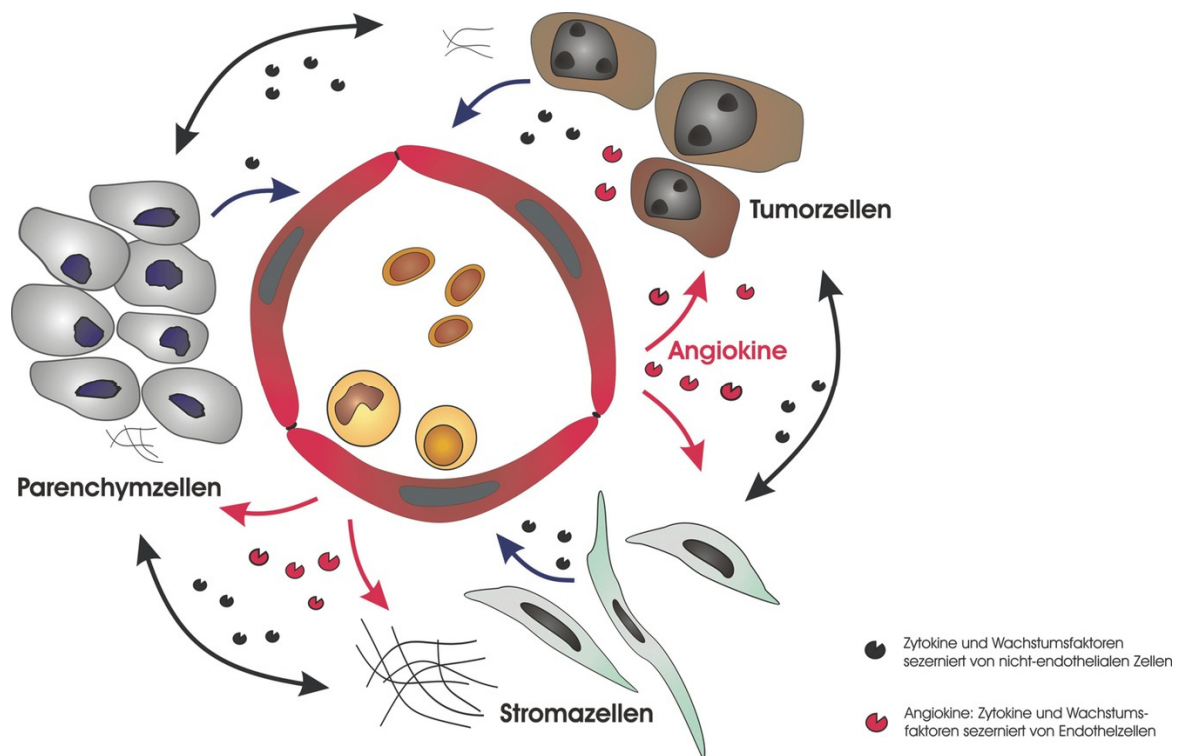


Abb. 9: Schematische Darstellung der vaskulären Nische. Spezifische Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen, wie Endothelzellen, Parenchymzellen, Stromazellen und Tumorzellen. *Abbildung und Beschriftung übernommen aus Géraud et al., 2014 (Lizenznummer: 5537100236992).*

1.3.4 Aufbau und Funktion lebersinusoidaler Endothelzellen

Sinusendothelzellen der Leber (*liver sinusoidal endothelial cells*; LSECs) sind hoch spezialisierte ECs und stellen die Schnittstelle zwischen den Blutzellen auf der einen Seite und den Hepatozyten und den hepatischen Sternzellen auf der anderen Seite dar (Poisson et al., 2017). Typischerweise sind sie charakterisiert durch das Vorhandensein von Poren, den sogenannten Fenestrationsen und dem Fehlen von Diaphragmen und einer Basalmembran, was sie zu den am stärksten durchlässigen ECs im Körper eines Säugetieres macht (s. Abb. 8) (Géraud et al., 2014; Baiocchini et al., 2019; Poisson et al., 2017; DeLeve, 2011; Wisse, 1970; Braet et al., 2002). Die durchlässigen Poren erlauben den freien Fluss von Blut in den Disse-Raum, mit direktem Zugang zu der Oberfläche der Hepatozyten (Augustin et al., 2017). LSECs sind ein Beispiel für einzigartig differenzierte mikrovaskuläre ECs, welche sowohl physiologische als auch immunologische Funktionen übernehmen, darunter fallen die Aufnahme von endogenen und exogenen Abfallprodukten aus dem Blutstrom, Endozytose, Antigen-Präsentation und Leukozyten-Rekrutierung (Smedsrød et al., 2004; Géraud et al., 2010; Shetty et al., 2018). Dabei zeigen LSECs eine außerordentlich hohe Kapazität für die Aufnahme von löslichen Makromolekülen und Nanopartikeln wie zum Beispiel Viren (Bhandari et al., 2020; Mellko et al., 1994). Um dieser Aufgabe nachzukommen, exprimieren LSECs eine Vielzahl verschiedener Endozytose-Rezeptoren, zu diesen gehören der Makrophagen-Mannoserezeptor CD206, der endozytotische Fc-gamma Rezeptor CD32b und die *Scavenger* Rezeptoren Stabilin-1 und Stabilin-2, (Sørensen et al., 2012; Bhandari et al., 2020; Politz et al., 2002; Géraud et al., 2010; Olsavszky et al., 2021; Malovic et al., 2007; Mousavi et al., 2007). Die Aufgabe dieser *Scavenger* Rezeptoren ist es, Abfallprodukte aus der Blutzirkulation zu entfernen (Knolle et al., 2016). Des Weiteren exprimieren LSECs auch verschiedene *Toll-like*-Rezeptoren (Uhrig et al., 2005; Martin-Armas et al., 2006). In Mäusen ist bekannt, dass LSECs auch Funktionen im adaptiven Immunsystem aufweisen (Knolle et al., 2016). Im Gegensatz zu Kupffer-Zellen, besitzen LSECs im Normalfall keine phagozytotische Funktion, allerdings können sie im Notfall, wenn nicht ausreichend Kupffer-Zellen vorhanden sind, bis zu 1 µm große Partikel aufnehmen (Steffan et al., 1986). Trotz ihrer hoch spezialisierten mikrovaskulären Differenzierung, besitzen LSECs eine erstaunliche phänotypische und funktionelle Verformbarkeit. Bei der Leberzirrhose zum Beispiel, führt die endotheliale Verformbarkeit dazu, dass LSECs sich morphologisch transdifferenzieren – dieser Vorgang wird auch als sinusoidale Kapillarisation bezeichnet (Géraud et al.,

2010). Der Vorgang der Kapillarisation ist dadurch charakterisiert, dass es zum Verlust der Fenestrations kommt und die LSECs dadurch einen vaskulären Phänotyp annehmen (Baiocchi et al., 2019).

1.4 Scavenger-Rezeptoren

1.4.1 Klassifizierung von Scavenger Rezeptoren

Das erste Mal beschrieben wurden *Scavenger* Rezeptoren (SRs) im Jahre 1979 von Goldstein und Brown (Canton et al., 2013; Brown et al., Jul 1979; Brown et al., Sep 1979). Dabei entdeckten sie Rezeptoren in Makrophagen welche modifizierte (acetylierte) *low-density* Lipoproteine (LDL) endozytierten und zersetzten (PrabhuDas et al., 2017; van Berkel et al., 2005). Sie konnten zeigen, dass diese Rezeptoren für das acetylierte LDL eine Vielzahl von polyanionischen Liganden erkennen (PrabhuDas et al., 2017; Brown et al., 1983). Kurze Zeit darauf, folgte die Identifizierung weiterer LDL Rezeptoren mit einem breiten Spektrum an Bindungsspezifität, was zu einem späteren Zeitpunkt dazu führte, dass die Rezeptoren in verschiedene Klassen unterteilt wurden (PrabhuDas et al., 2017). Heutzutage werden die SRs in insgesamt zwölf Klassen aufgeteilt (Klassen A – L) (s. Abb. 10) (PrabhuDas et al., 2017; van Berkel et al., 2005). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um eine strukturell sehr heterogene Superfamilie von Proteinen, die sich vor allem hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Domänen unterscheiden (Taban et al., 2022). Klassifiziert werden sie basierend auf der Anordnung ihrer Nukleotidsequenz und ihrer Proteinstruktur (PrabhuDas et al., 2017; Zani et al., 2015). Ursprünglich wurden SRs definiert als Oberflächenproteine, welche chemisch modifizierte Lipoproteine mit einer sehr hohen Affinität binden, doch mit der Zeit wurden den Rezeptoren weitere Fähigkeiten zugesagt. Die allgemeine Definition von SRs lautet wie folgt: *Scavenger* Rezeptoren sind Zelloberflächen-Rezeptoren, die typischerweise eine Vielzahl von Liganden binden und für die Beseitigung von veränderten Stoffen zuständig sind. Sie sind an unterschiedlichen zellulären Vorgängen beteiligt wie der Endozytose, Phagozytose, Adhäsion und in der Signalübermittlung, welche dazu führt, dass degradierte oder gefährliche Substanzen eliminiert werden (PrabhuDas et al., 2017).

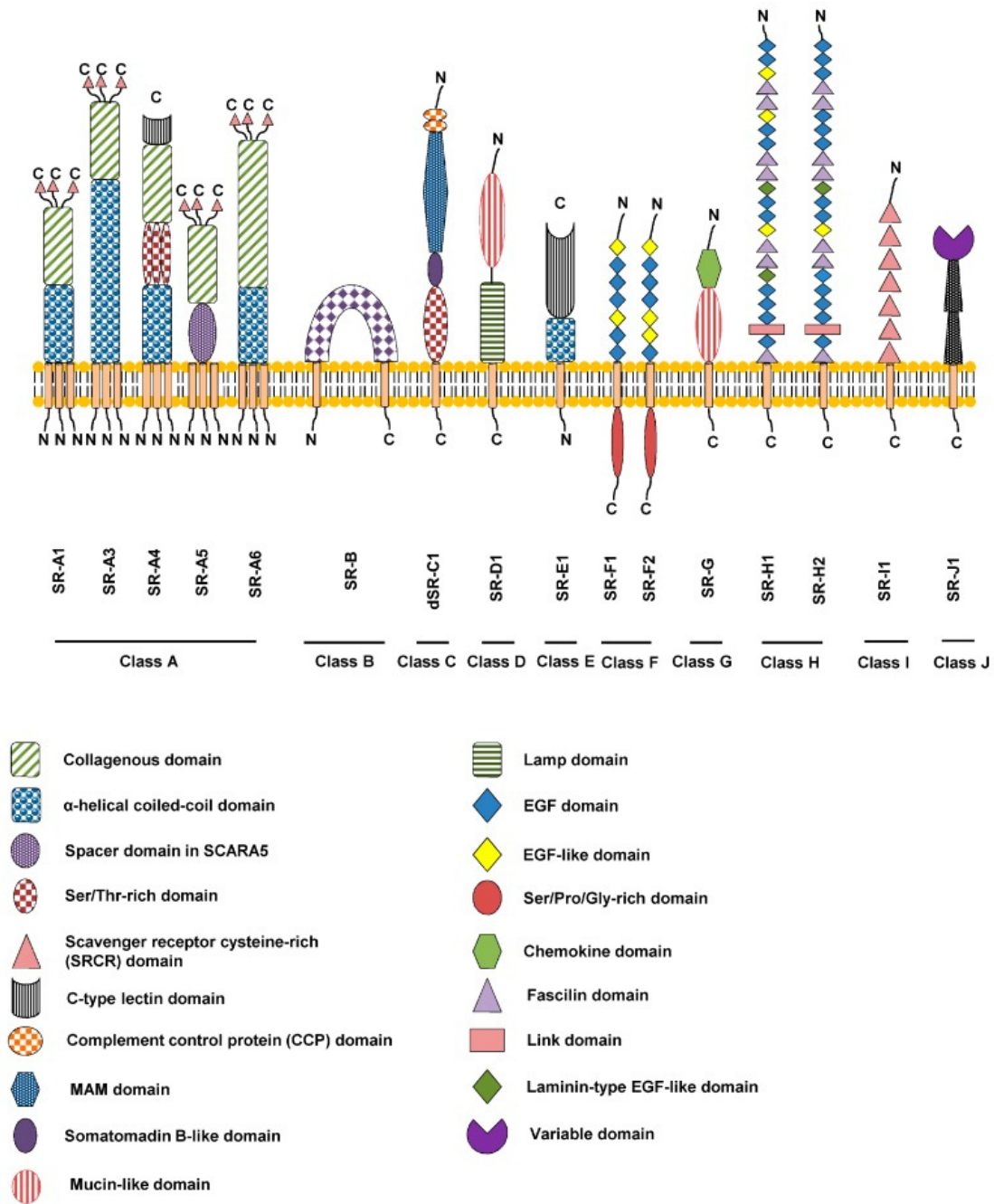


Abb. 10: Schematische Darstellung der Scavenger Rezeptor Klassen.
Abbildung und Beschriftung übernommen aus Zani et al., 2015 (Lizenzfrei: CC BY 4.0).

1.4.2 Scavenger Rezeptoren Stabilin-1 und Stabilin-2

Bei Stabilin-1 und Stabilin-2 handelt es sich um Scavenger Rezeptoren (SRs), die hauptsächlich von LSECs exprimiert werden (Schledzewski et al., 2011). Diese Rezeptoren gehören zur SR Klasse H (Patten et al., 2019; Miller et al., 2016). Beide Rezeptoren besitzen mehrere verschiedene Namen. Stabilin-1 wurde als erstes beschrieben als “MS-1 *high-molecular weight protein*” und ist des Weiteren auch bekannt als

FEEL-1 (*fasciclin, EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1*) und CLEVER-1 (*common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1*) (Goerdt et al., 1991; Adachi et al., 2002; Irjala et al., 2003). Stabilin-2 ist weiterhin bekannt als FEEL-2 und HARE (*hyaluronan receptor for endocytosis*) (Politz et al., 2002; McCourt et al., 1999).

Bei beiden Rezeptoren handelt es sich um sehr große Membranproteine die eine Sequenzidentität von rund 40 % zeigen (Horiuchi et al., 2003). Der extrazelluläre Teil der beiden Proteine ist zu 55 % homolog, während die kurzen intrazellulären Domänen sehr unterschiedlich sind, was ihre teilweise unterschiedliche Lokalisation und Signalaktivität erklärt (Miller et al., 2016; Hirose et al., 2012). Auf DNA-Ebene zeigen die beiden Proteine keine Homologie (Schledzewski et al., 2011). Beide Rezeptoren sind dazu in der Lage Gram-negative und Gram-positive Bakterien zu binden (Adachi et al., 2002). Die Rezeptoren binden zum Teil dieselben Liganden, wie zum Beispiel AGEs (*Advanced Glycation Endproduct*), Heparin und andere Glykosaminoglykane (Tamura et al., 2003; Harris et al., 2008; Pempe et al., 2012). Allerdings gibt es auch Liganden, die nur von einem der beiden Rezeptoren gebunden werden, wie zum Beispiel Laktogen und SPARC, welches nur von Stabilin-1 gebunden wird oder Hyaluronsäure (HA), die nur von Stabilin-2 gebunden wird (Kzhyshkowska et al., 2006; Kzhyshkowska et al., 2008; Zhou et al., 2000; Palani et al., 2016).

Stabilin-1 ist ein 280 kDa großes, hoch evolutionär konserviertes Typ-1 Transmembranprotein und war das erste Mitglied der SR Klasse H, das beschrieben wurde (Politz et al., 2002; Patten et al., 2019). Im normalen vaskulären Endothel wird die Expression von Stabilin-1 durch angiogene und proinflammatorische Stimuli induziert (Goerdt et al., 1993). Konstitutiv exprimiert wird Stabilin-1 in diskontinuierlichen sinusoidalen Endothelzellen der Leber, der Milz, den Lymphknoten und von Makrophagen (Patten et al., 2019; Shetty et al., 2011; Goerdt et al., 1991; Salmi et al., 2004; Tamura et al., 2003). Stabilin-1 wird von einer großen mRNA mit circa 7800 Nukleotiden translatiert. Das Protein besitzt sieben Fasciclin-Domänen (FAS1), eine Proteoglykan-Link Domäne und 22 Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-ähnliche Wiederholungen (Ruoslahti, 1996; Salmi et al., 2004; Irjala et al., 2003) (s. Abb. 11). Die HA-bindende X-Link Domäne von Stabilin-1 ist nicht funktional, weshalb Hyaluronsäure von Stabilin-1 nicht gebunden wird (Politz et al., 2002; Hansen et al., 2005).

Stabilin-2 ist mit seinen 275 kDa etwas kleiner als Stabilin-1 (Politz et al., 2002). Stabilin-2 besitzt ebenfalls sieben FAS1-Domänen und eine Proteoglykan-Link-Domäne,

allerdings nur 20 EGF-ähnliche Domänen (s. Abb. 11). In Tieren wird Stabilin-2 hoch exprimiert in LSECs, Lymphknoten, Milz und dem Knochenmark (Miller et al., 2016; Prevo et al., 2004; Falkowski et al., 2003). Stabilin-2 ist der primäre *Scavenger* Rezeptor für Hyaluronsäure, woher sich auch die Namensgebung HARE (*hyaluronan receptor for endocytosis*) ableitet (Prevo et al., 2004; Politz et al., 2002). Außerdem bindet Stabilin-2 noch acetyliertes LDL, Heparin, apoptotische und bakterielle Mikropartikel (Patten et al., 2019; Adachi et al., 2002; Zhou et al., 2000; Harris et al., 2008; Park et al., 2008; Kim et al., 2010).

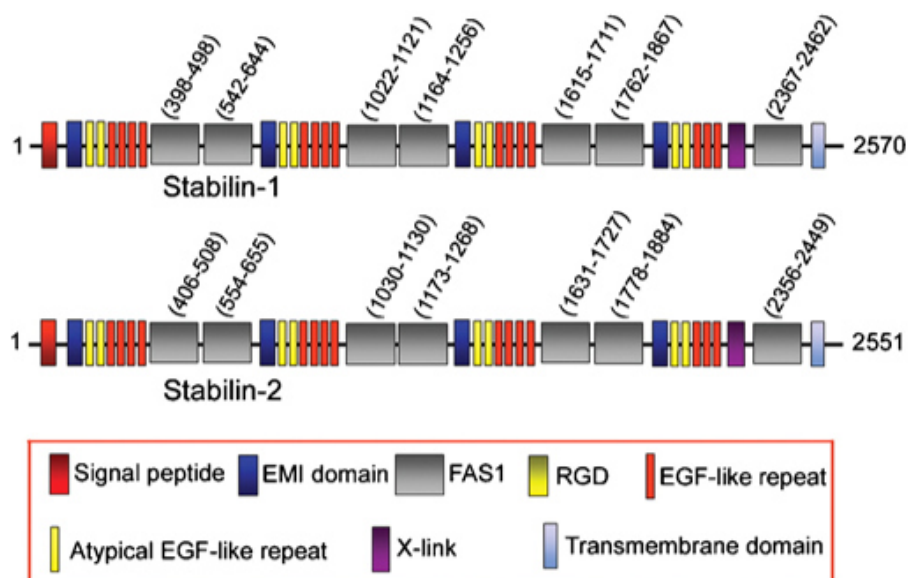


Abb. 11: Struktur und Zusammensetzung der Domänen von Stabilin-1 und Stabilin-2. Beide Stabiline zeigen eine ähnliche Größe, sowie mehrere Fasciclin- und EGF-Domänen. *Abbildung übernommen aus Thapa et al., 2007 (Lizenznummer: 5537110970706).*

1.4.3 Die Rolle von Stabilin-1 und Stabilin-2 in verschiedenen Erkrankungen

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Stabilin-1 und Stabilin-2 in verschiedenen Organen und Erkrankungen unterschiedliche Wirkungsweisen zeigen. So konnte gezeigt werden, dass der kombinierte Knockout von Stabilin-1 und Stabilin-2 (*Stab1/Stab2*^{-/-}) zu einer schweren renalen Glomerulofibrose, Albuminurie und einer milden perisinusoidalen Leberfibrose, sowie zum verfrühten Tod der Mäuse führt (Schledzewski et al., 2011) (s. Abb. 12).

Es wurden Nieren aus 7-Wochen alten *Stab1/Stab2*^{-/-} Mäusen in 7-Wochen alte WT Mäuse transplantiert. Im Alter von 15 Wochen wurden die Mäuse getötet und deren Nieren mit den Nieren von 7- und 15-Wochen alten *Stab1/Stab2*^{-/-} Nieren verglichen. Es war zu beobachten, dass transplantierte Nieren aus *Stab1/Stab2*^{-/-} Mäusen in WT Mäuse, 7 Wochen nach der Transplantation, eine deutliche Verbesserung der renalen Glomerulofibrose zeigten, im Vergleich zu den 7- und 15-Wochen alten *Stab1/Stab2*^{-/-} Mäusen (s. Abb. 13), was darauf schließen lässt, dass die Stabilin-1 und Stabilin-2 vermittelte Clearance Funktion in LSECs erforderlich ist für die physiologische Homeostase in entfernten Organen (Schledzewski et al., 2011).

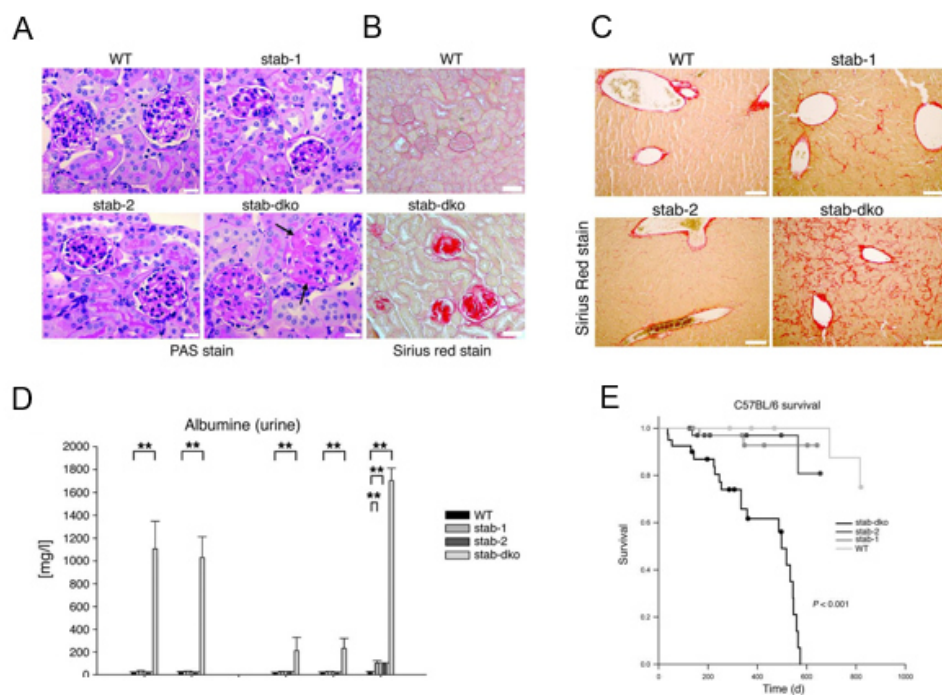


Abb. 12: Auswirkungen von *Stab1/2*^{-/-}. (A) PAS Färbung von WT, *Stab1*^{-/-}, *Stab2*^{-/-} und *Stab1/Stab2*^{-/-} der Niere. (B) Sirius Rot Färbung von WT und *Stab1/Stab2*^{-/-} der Niere. (C) Sirius Rot Färbung von WT, *Stab1*^{-/-}, *Stab2*^{-/-} und *Stab1/Stab2*^{-/-} der Leber. (D) Albuminwerte von WT, *Stab1*^{-/-}, *Stab2*^{-/-} und *Stab1/Stab2*^{-/-}. (E) Überleben von WT, *Stab1*^{-/-}, *Stab2*^{-/-} und *Stab1/Stab2*^{-/-}.
Abbildungen und Beschriftung übernommen aus Schledzewski et al., 2011 (Lizenzfrei: CC BY 4.0).

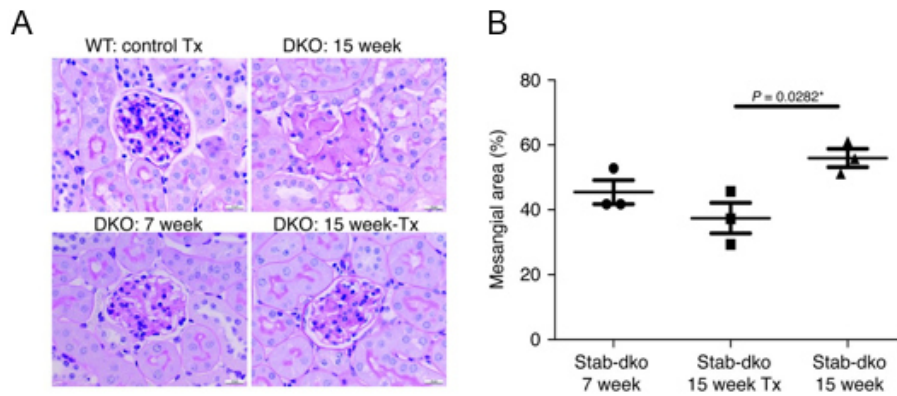


Abb. 13: Auswirkung der Nierentransplantation einer DKO Maus in eine WT Maus. (A) PAS Färbung der Niere von einer WT Maus (links oben), einer DKO Maus nach 7 Wochen (links unten), einer DKO Maus nach 15 Wochen (rechts oben) und einer transplantierten Niere aus einer DKO Maus in eine WT Maus (rechts unten). (B) Quantitative Evaluation der glomerulären Fibrose von DKO Mäusen nach 7 Wochen, nach 15 Wochen und transplantierten DKO Nieren in WT Mäuse. *Abbildungen und Beschriftung übernommen aus Schledzewski et al., 2011 (Lizenzfrei: CC BY 4.0).*

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Einzel-Knockout von Stabilin-1 oder Stabilin-2 im Atherosklerose-Mausmodell *ApoE*^{-/-} eine schützende Funktion für die Mäuse zeigt. In Stabilin-1- oder Stabilin-2-defizienten Mäusen konnte eine Plaque Bildung in der Aorta signifikant verringert werden (s. Abb. 14) (Manta et al., 2022).

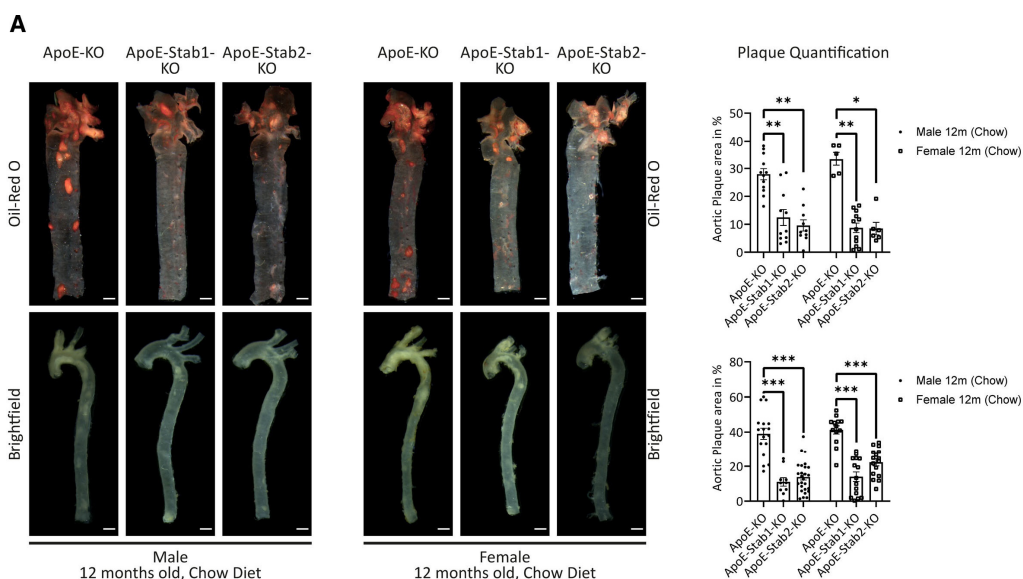


Abb. 14: Auswirkung der Stab1- und Stab2-Defizienz im ApoE^{-/-} Mausmodell. (A) Öl-Rot O Färbung und Hellfeld Aufnahmen der Aorten von *ApoE*^{-/-}, *ApoE/Stab1*^{-/-} und *ApoE/Stab2*^{-/-} männlicher Mäuse. (B) Öl-Rot O Färbung und Hellfeld Aufnahmen der Aorten von *ApoE*^{-/-}, *ApoE/Stab1*^{-/-} und *ApoE/Stab2*^{-/-} weiblicher Mäuse. (C) Quantifizierung der Plaques in Aorten von Öl-Rot O und Hellfeld Aufnahmen. *Abbildungen und Beschriftung übernommen aus Manta et al., 2022 (Lizenznummer: 5537120224540).*

Karikoski et al. konnte 2014 zeigen, dass die Defizienz von Stabilin-1 zu einem verzögerten Wachstum von Melanometastasen führte. Des Weiteren zeigten sie, dass das Tumorstadium durch die prophylaktische therapeutische Behandlung von WT Mäusen mit Anti-Stabilin-1 Antikörpern verhindert werden konnte.

Diese Ergebnisse zeigen einen möglichen therapeutischen Ansatz für verschiedene Krankheiten durch eine Stabilin-gehemmte Behandlung.

Es ist bekannt, dass Stabilin-1 in einer Gruppe von Tumor-assoziierten Makrophagen hoch exprimiert wird. In Mäusen unterstützt Stabilin-1 das Tumorstadium und die Metastasenbildung, während das Fehlen oder das Blockieren von Stabilin-1 zu einer Induktion von T-Zellen führt, welche die Krebszellen angreifen und töten, dies konnte auch *ex vivo* in humanen Zellen gezeigt werden (Hollmén et al., 2022; Viitala et al., 2019). Aufgrund dieser Ergebnisse, könnte die Blockierung von Stabilin-1 und die damit einhergehende T-Zell-Aktivierung auch in Krebspatienten zu einer Wiederherstellung der Immunantwort führen. Um diese These zu überprüfen, generierten Hollmén et al., 2022 Bexmarilimab, ein humanisierter IgG4 Antikörper, der gegen das humane Stabilin-1 gerichtet ist. Bexmarilimab zeigt eine hohe Affinität zu Stabilin-1 und bindet dieses auf der Oberfläche von klassischen Monozyten aus dem gesunden humanen Blut. In ihrer Studie wurde die Humanisierung, die nicht-klinische Charakterisierung der physiochemischen Vorteile biologischer Potenz und der Sicherheit überprüft. Sie konnten zeigen, dass Bexmarilimab die Immunantwort stimuliert und diese wiederum zu einer anti-Tumor Wirksamkeit ohne große Sicherheitsbedenken führt. Eine aktuell laufende und noch nicht veröffentlichte klinische Studie zeigte bereits vielversprechende Ergebnisse zur Sicherheit und Wirksamkeit von Bexmarilimab in Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren (Hollmén et al., 2022).

1.5 Die Proteine TGFBI und Postn

1.5.1 Die Proteinfamilie der Fasciclin I - Domäne

Mitglieder der Fasciclin I Proteinfamilie (FAS1) sind in vielen Vertebraten, Invertebraten und Mikroorganismen vertreten, was vermuten lässt, dass diese Domäne eine evolutionäre Adhäsionsdomäne repräsentiert (Moody et al., 2013; Ruan et al., 2009). Das am frühesten und gleichzeitig am besten studierte Beispiel ist *Drosophila* FAS1, expri-

miert wird es während der Embryonalentwicklung und leitet Axone von Axon-generierenden Nervenzellen zu anderen Zielneuronen oder Muskelzellen (Moody et al., 2013; Elkins et al., 1990; McAllister et al., 1992).

Die FAS1 Domäne ist ein altes strukturelles Motiv in extrazellulären Proteinen und bietet eine Vielzahl von Interaktions-Oberflächen, was das Binden verschiedener Liganden ermöglicht (Seifert, 2018). Die FAS1 Domäne spielt eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion (Moody et al., 2013). Für gewöhnlich treten FAS1 Domänen in Tieren fast immer in zweier-Paaren auf: *Drosophila* FAS1 besitzt zwei Tandem-Paare, genauso wie TGFBI und Postn, anders in den Stabilinen – dort treten die FAS1 Domänen in sieben Kopien auf (Thapa et al., 2007) (s. Abb. 15). Jede dieser FAS1 Domänen besteht aus 150 Aminosäuren (Takeshita et al., 1993).

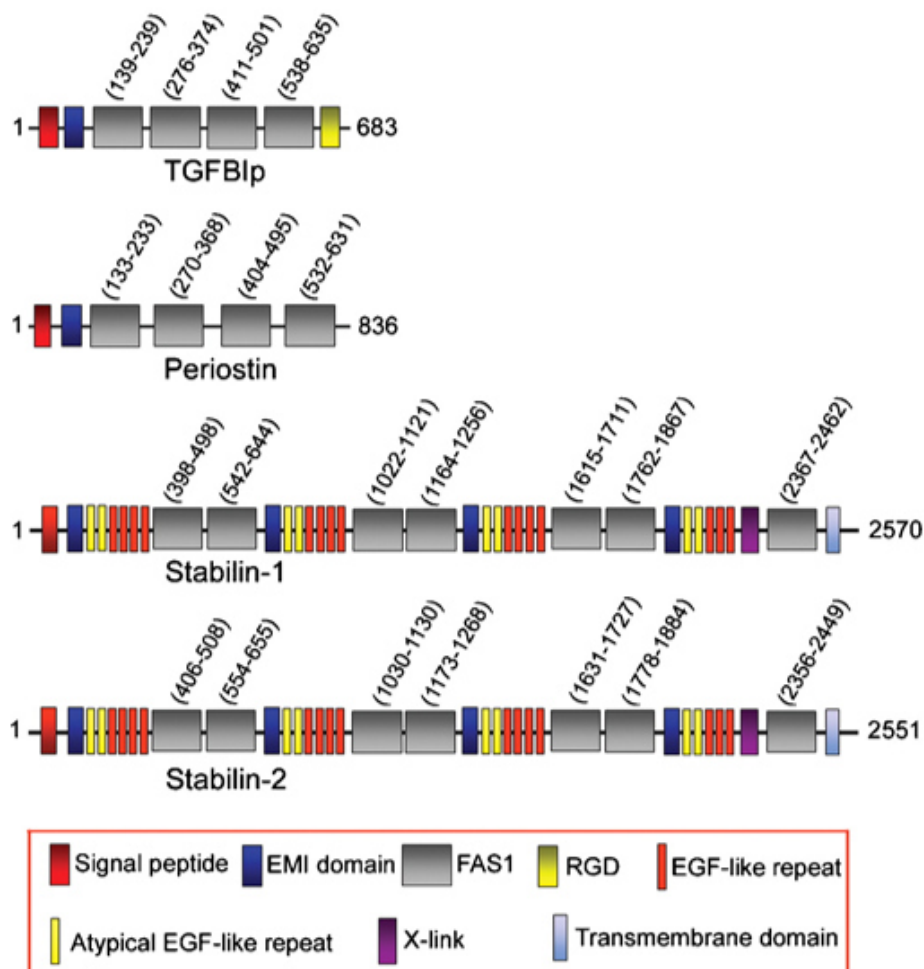


Abb. 15: Schematische Darstellung der Proteine TGFBI, Postn, Stabilin-1 und Stabilin-2. TGFBI und Postn besitzen vier Tandem Wiederholungen der FAS1 Domäne, während Stabilin-1 und Stabilin-2 sieben FAS1 Domänen besitzen.

Abbildung und Beschriftung übernommen aus Thapa et al., 2007 (Lizenznummer: 5537110970706).

Beispiele für FAS1 Domänen Proteine sind neben Stabilin-1 und Stabilin-2, *Transforming growth factor beta-induced* (TGFBi) und Periostin (Postn) (Moody et al., 2013, Adachi et al., 2002). Diese vier Proteine sind die einzigen Fasciclin-Domänen Proteine die in Säugetieren auftreten (Moody et al., 2013).

1.5.2 Das Protein Transforming growth factor beta-induced (TGFBi)

Transforming growth factor beta-induced (TGFBi), auch bekannt unter dem Namen β ig-H3, ist ein extrazelluläres Matrixprotein, welches durch *transforming growth factor- β* (TGF β) induziert werden kann und erstmals von Skonier et al., 1992 in der humanen Adenokarzinom Zelllinie A549, isoliert aus der Lunge, identifiziert wurde (Kim et al., 2000; Skonier et al., 1992; Han et al., 2014). Es besteht aus 683 Aminosäuren und besitzt eine sekretorische Signalsequenz am N-Terminus (Aminosäuren 1 – 23), vier FAS1 homologe interne Domänen und eine Zell-anhaftende RGD Domäne (Arg-Gly-Asp) an seinem C-Terminus, welche als Liganden-Erkennungsstelle für verschiedene Integrine dient, wie zum Beispiel für das Integrin $\alpha_3\beta_1$ (Skonier et al., 1992; Skonier et al., 1994; Han et al., 2015; Bing et al., 2014; Lee et al., 2003) (s. Abb. 16).



Abb. 16: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von TGFBi. TGFBi besitzt eine Cysteinreiche EMI Domäne am N-Terminus, gefolgt von vier hoch konservierten Fasciclin (FAS1) Domänen und einem C-terminalen Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) Motif.

Abbildung und Beschriftung übernommen aus Tumbarello et al., 2012 (Lizenzfrei: CC BY 2.0).

TGFBi ist im Zellzytoplasma und dem Nukleus lokalisiert und wird von vielen verschiedenen Zelltypen, wie zum Beispiel den glatten Muskelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten produziert (Bing et al., 2014; Park et al., 2004; Billings et al., 2000). Lee et al. konnte mit Hilfe von In Situ Hybridisierung zeigen, dass TGFBi im Herzen, in Blutgefäßen, im Intestinum, in den Augen und anderem Gewebe mesenchymalen Ursprungs, exprimiert wird. Das gibt den Hinweis darauf, dass dieses Gen eine wichtige Rolle in verschiedenen Organen während der Ontogenese spielt (Lee et al., 2003; Bing et al., 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass TGFBI eine fibrillenartige Struktur bildet und mit vielen verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen, wie zum Beispiel Fibronectin, Laminin und Typ-1 Kollagen interagiert (Kim et al., 2002; Lee et al., 2003). TGFBI ist auch bekannt dafür Zellwachstum, Differenzierung und Wundheilung zu beeinflussen (Lee et al., 2003; Skonier et al., 1994; Dieudonné et al., 1999; Kim et al., 2000; Rawe et al., 1997).

1.5.3 Das Protein Periostin (Postn)

Periostin (Postn) ist ein rund 93 kDa schweres matrizelluläres Sekretionsprotein, welches ebenso wie TGFBI eine EMI Domäne an seinem N-Terminus und vier Fasciclin Domänen besitzt (Zhao et al., 2014; Hoersch et al., 2010) (s. Abb. 17). Seine EMI Domäne interagiert mit Kollagen und Fibronectin, während die Fasciclin Domänen Integrine binden kann. Die C-terminale Domäne unterliegt einem hohen Grad an alternativem Spleißen und kann Heparin, Heparansulfat Proteoglykane (HSPGs), Fibronectin und Kollagen I binden (Sonnenberg-Riethmacher et al., 2021; Sugiura et al., 1995; Takayama et al., 2006; Norris et al., 2007).



Abb. 17: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Postn. Postn besitzt eine Cysteinreiche EMI Domäne am N-Terminus, gefolgt von vier hoch konservierten Fasciclin (FAS1) Domänen. *Abbildung und Beschriftung übernommen aus Tumbarello et al., 2012 (Lizenzfrei: CC BY 2.0).*

Die unterschiedlichen Splice-Varianten sorgen dafür, dass unterschiedliche Isoformen von Postn generiert werden, was dazu führt, dass die unterschiedlichen Isoformen auch unterschiedliche Funktionen besitzen. Zum Beispiel hat Postn eine Funktion in chronischer Inflammation und Fibrose verschiedener Gewebe und ist an der Entwicklung von Knochen, Zähnen und Knorpel beteiligt (Sonnenberg-Riethmacher et al., 2021; Hoersch et al., 2010; Ruan et al., 2009). Ursprünglich wurde Postn aus Osteoblasten isoliert und wird hauptsächlich im Periost exprimiert, weshalb Postn auch unter dem Namen OSF-2 (*osteoblast-specific factor-2*) bekannt ist (Sonnenberg-Riethmacher et al., 2021; Takeshita et al., 1993). Als matrizelluläres Protein ist Postn vor allem in der Extrazellulären Matrix lokalisiert und einige seiner Aktivitäten liegen der Bindung

an Zelloberflächenrezeptoren der Integrinfamilie zu Grunde, beispielsweise ist Postn ein Ligand für das $\alpha_v\beta_5$ Integrin (Sonnenberg-Riethmacher et al., 2021; Kudo et al., 2018; Kim et al., 2002).

1.6 Ziel der Arbeit

Die Stabilin-vermittelte *Scavenging* Funktion von LSECs ist dafür zuständig, die molekulare Zusammensetzung des zirkulierenden Blutes zu regulieren. Dabei werden die Homeostase und die Funktionen verschiedener Organe kontrolliert. Vorausgehende Daten zeigen, dass Stabilin-abhängige zirkulierende Moleküle, in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Settings, sowohl schützende als auch schädliche Eigenschaften besitzen können.

So führt der kombinierte genetische Knockout beider Stabiline (*Stab1/Stab2*^{-/-}) zu einer schweren renalen Glomerulofibrose, Albuminurie und einer leichten perisinusoidalen Leberfibrose, sowie zum frühzeitigen Tod der Mäuse (Schledzewski et al., 2011). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass sowohl das genetische Fehlen von Stabilin-1 oder Stabilin-2, als auch die anti-Stabilin-1 oder anti-Stabilin-2 gerichtete Antikörpertherapie, die Plaque Bildung in *ApoE*^{-/-} Mäusen reduziert, was einen interessanten Therapieansatz im Menschen liefert. Dabei wurde beobachtet, dass es in den Stabilin-KO Mäusen bzw. in den Mäusen die mit einer anti-Stabilin gerichteten Therapie behandelt wurden, zu einer Veränderung des Plasmaproteoms kommt, in dem zirkulierendes TGFB β 1 und Postn dysreguliert sind. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei TGFB β 1 und Postn um Liganden von Stabilin-1 und Stabilin-2 handelt, was mit Hilfe von Endozytose-Assays nachgewiesen werden konnte. In verschiedenen Settings der ApoE-KOs, führte das Fehlen von einer der beiden Stabiline zu einem Anstieg von TGFB β 1 oder Postn, was darauf schließen lässt, dass die *Clearance* der Moleküle auch von diesen beiden Liganden beeinflusst wird (Manta et al., 2022).

Ziel dieser Arbeit war es, diese entgegengesetzten Eigenschaften von Stabilin-1 und Stabilin-2 und den Einfluss der beiden Liganden TGFB β 1 und Postn in metabolischen und fibrotischen Erkrankungen der Leber und der Haut zu untersuchen. Um die Leber zu untersuchen, wurden die Mäuse mit MCD oder CDAA Futter gefüttert, dabei ist MCD ein leicht fibrotisches Modell, in dem auch leicht entzündliche Prozesse zu beobachten sind und CDAA ein Fibrose-Modell. Um die entzündlichen Prozesse in der Haut zu untersuchen wurden die Mäuse topisch mit dem Wirkstoff Imiquimod behandelt, um eine Psoriasis-ähnliche Entzündung zu induzieren und durch die Behandlung mit Bleomycin sollten fibrotische Prozesse in der Haut in Gang gesetzt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tab. 1: Gekaufte Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
2x Laemmli Proben Puffer	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
50x TAE-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, DE
AEC Substrat Chromogen	Agilent, Santa Clara, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Antikörper-Diluent	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fitzgerald Industries, Acton, USA
cOmplete EDTA-freie Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DC™ Protein Assay Reagenz A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DC™ Protein Assay Reagenz S	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
dH ₂ O DNase/RNase frei	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNA Loading Dye (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol, 60 % Glycerol, 60 mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DPBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einbettmedium Tissue-Tek ©	Sakura Finetek, Tokyo, JP
Ethanol 96 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fluoreszenz-Eindeckmedium	Agilent, Santa Clara, USA
HIER Tris-EDTA-Puffer pH 6 (10x)	Biozol, Eching, DE
HIER Tris-EDTA-Puffer pH 9 (10x)	Biozol, Eching, DE
Luminol-S	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Milchpulver (fettfrei)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Milk-Free Antibody Diluent	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Nancy-520	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Ölrot O rein	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PBS (10x), pH 7,4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Peroxidase Block	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Protein Assay Reagenz B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Protein Normalization Reagent	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Protein Normalization Reconstitution Agent	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNAscope® Hydrogen Peroxide Reagent	ACDbio-Bio-Techne, Wiesbaden, DE
RNAscope® Protease Plus Reagent	ACDbio-Bio-Techne, Wiesbaden, DE
RNAscope® Target Retrieval Reagent	ACDbio-Bio-Techne, Wiesbaden, DE
SDS-Lösung 10 % (w/v)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Streptavidin-HRP	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
TGS-Puffer 10x (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Tris-HCl-Puffer 0,5 M, pH 6,8	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween© 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wässriges Eindeckmedium	Agilent, Santa Clara, USA
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, DE

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Adhäsionsobjektträger mit Mattrand, geschnitten und Super-Frost© Plus, geschliffen	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Blottingpapier 3MM Chr	Whatman©, Maidstone, GB

Deckgläser, mikroskopisch	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Einwegskalpelle	FEATHER©, Osaka, JP
Förmchen für Organeinbettung in O.C.T.	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, NL
ImmEdge Pen	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Kryoröhrchen Nunc™ 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lithium/Heparin Microvetten 500 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikrotierplatte 96-well, F-Bottom	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Mini-Protean TGX Gele, 4 – 20 %	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Pipettenspitzen mit Filter®, steril	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Pipettenspitzen SafeSeal-Tips® professional	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Pipettenspitzen TipOne®	Starlab, Hamburg, DE
Probenkassetten für Paraffineinbettung	Sarstedt, Nümbrecht, DE
PVDF-Membran Immun-Blot®	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifugenröhrchen Falcon™, konisch (15 ml / 50 ml)	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

2.1.3 Geräte

Tab. 3: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresesystem MupidR One	Advance, Tokyo, JP
Autoklav Systec VX-95	Microbiology International, Frederick, USA
Autostainer XL	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Chemilumineszenz-System ChemoCam Imager	Intas, Göttingen, DE
Flockeneismaschine AF100	Scotsman Ice, Otley, GB
Gefrierschränke	Sanyo, Osaka, JP
Gelelektrophoresesystem WB	BioRad Laboratories, Hercules, USA

Gelfluoreszenzdetektor Azure Imager C400	Azure Biosystems, Dublin, USA
Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Hellfeld Mikroskop, Nikon Eclipse Ci-L	Nikon, Düsseldorf, DE
Homogenisator PrecellysR Evolution	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, FR
Inverses Fluoreszenzmikroskop Nikon DS-Qi2	Nikon, Düsseldorf, DE
Inverses Forschungsmikroskop DM IR	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Inverses Phasenkontrastmikroskop DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Jess	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, DE
Kryotom CM3050S	Leica, Wetzlar, DE
Kühlplatte pfm 4100	Pfm Medical, Köln, DE
Kühlschränke	Liebherr, Bulle FR, CH
Mikropipetten Eppendorf ResearchR	Eppendorf, Hamburg, DE
Mikropipetten GilsonR PipetmanR	Gilson R, Middleton, USA
Mikrowellenherd R-332	Sharp, Osaka, JP
Nano Drop™ 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nukleinsäureamplifikator Thermocycler T100	Bio-Rad, Hercules, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Zizers, CH
Plastikkämme für Agarosegelprobetaschen	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Plattenlesegerät Plate reader infinite 200pro	Tecan Group, Mannedorf, CH
Probenschüttler Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Real Time PCR Cyler qTower ³ G	Analytik Jena, Jena, DE
Rotationsmikrotom pfm rotary 3006 EM	Pfm Medical, Köln, DE
Sterilizer Stericell	MMM Group, Planeg, DE
Thermoblock ThermoMixer	Eppendorf, Hamburg, DE
Timer	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tischzentrifuge 3-1810	NeoLab, Heidelberg, DE
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Vortexer REAX top	Heidolph, Schwabach, DE
Waage Analytical balance R300S	Satorius AG, Göttingen, DE
Wärmeschrank Heraeus® T6120	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wasserbad für FFPE Schnitte pfm 1000	Pfm Medical, Köln, DE
Wasserbad PURA 14	Julabo, Seelbach, DE
Wasserbad TW8	Julabo GmbH, Seelbach, DE
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, DE

2.1.4 Primer

Tab. 4: Primer für Genotypisierung

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
mStab1-A1FW	AGACTATGGTCTCAGTCTGGGA
mStab1-B461-REV	CTGCAATCACTGTCCCCACACT
mStab1-C1224-REV	TTATTTTCATACCCGCCAGTTCTGA
mStab2-Mut-75536-FW	TGGGGACACACTGGGTATTAG
mStab2-Mut-77693-REV	GTGTGAGTGCCTGATGGATTT
mStab2-WT76932-FW	TCCGCTAGGCACAGAAATCC
mStab2-WT77138-REV	CAGGCTCCCCTCAGGGTGA

2.1.5 Antikörper, Kits und Enzyme

Tab. 5: Primärantikörper

Epitop	Spezies	Katalog-Nr.	Hersteller
α-SMA	Kaninchen	ab5694	Abcam, Milton, GB
Arg1	Ziege	Sc-18351	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
CD11b	Ratte	101202	BioLEGEND, San Diego, USA
CD19	Ratte	ab25232	Abcam, Milton, GB
CD3	Ratte	100201	BioLEGEND, San Diego, USA
CD31	Ratte	DIA310	Dianova, Hamburg, DE

CD32b	Ziege	AF1460	Bio-Techne, Minneapolis, USA
CD34	Kaninchen	ab81289	Abcam, Milton, GB
CD45	Kaninchen	ab10558	Abcam, Milton, GB
CD68	Kaninchen	ab125212	Abcam, Milton, GB
Desmin	Kaninchen	ab15200	Abcam, Milton, GB
Emcn	Ratte	14-5851-85	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
F4/80	Ratte	123102	BioLEGEND, San Diego, USA
GAPDH	Kaninchen	2118s	Cell Signaling, Danvers, USA
GS	Kaninchen	G2781	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
ICAM-1	Ziege	AF796	Bio-Techne, Minneapolis, USA
ICAM-1	Kaninchen	10020-1-AP	Protein-Tech, Rosemont, USA
Lyve-1	Kaninchen	103-PA50	Relia Tech, Wolfenbüttel, DE
Postn	Ziege	AF2955	Bio-Techne, Minneapolis, USA
TGFBi	Kaninchen	ab170874	Abcam, Milton, GB
TGFBi	Kaninchen	NBP1-88606	Novus, Wiesbaden, DE

Tab. 6: Sekundärantikörper

Epitop	Readout	Spezies	Katalog-Nr.	Hersteller
Anti-Kaninchen	AF488	Esel	711-545-152	Dianova, Hamburg, DE
Anti-Kaninchen	Cy3	Esel	711-165-152	Dianova, Hamburg, DE
Anti-Ratte	AF488	Esel	712-545-153	Dianova, Hamburg, DE
Anti-Ratte	Cy3	Esel	712-165-153	Dianova, Hamburg, DE
Anti-Ziege	AF488	Esel	705-545-147	Dianova, Hamburg, DE
Anti-Ziege	Cy3	Esel	705-165-147	Dianova, Hamburg, DE
Anti-Ziege	AF647	Esel	705-175-147	Dianova, Hamburg, DE

Tab. 7: Sekundärantikörper mit HRP gekoppelt

Epitop	Katalog-Nr.	Hersteller
Anti-Kaninchen-HRP (DAKO, ready to use)	K400311-2	Agilent, Santa Clara, USA
Anti-Ratte-HRP	DAB-87238	Dianova, Hamburg, DE
Anti-Ziege-HRP	R21459	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Tab. 8: Sekundärantikörper für Simple Western

Epitop	Readout	Katalog-Nr.	Hersteller
Anti-Kaninchen-HRP	Chemilumineszenz	042-206	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Anti-Ziege-HRP	Chemilumineszenz	043-522	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Anti-Maus	NIR	043-821	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Anti-Hase	NIR	043-819	Bio-Techne, Wiesbaden, DE

Tab. 9: Sonden für In Situ Hybridisierung

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller
RNAscope PDGFRb	19319C	Bio-Techne, Wiesbaden, DE

Tab. 10: Kits und Enzyme

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller
12 – 230 kDa Separation	SM-W004-1	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
DFS Taq DNA Polymerase	101100	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
EZ Standard Pack 1, 12 – 230 kDa	PS-ST01EZ-8	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
High Pure RNA Isolation Kit	11828665001	Roche, Basel, CH
Mouse BIGH3 (TGFB β) ELISA Kit	EMTGFB β	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Mouse Postn/OSF-2 ELISA Kit	MOSF20	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Precellys ceramic Kit 1.4/2.8 mm 2 ml tubes	91-PCS-CKM	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, FR
Protein Normalization Separation 12 – 230 kDa	SM-PNO1-1	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Proteinase K (10 mg/ml)	RPROTK-RO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
RNA Scope Multiplex Fluoreszenz Reagenz Kit v2 Assay	323100-USM	Bio-Techne, Wiesbaden, DE
Sensitive Tissue Collagen Assay	QZBtisco15	QuickZyme, Leiden, NL
SuperScript® II Reverse Transkriptase	18064-071	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
SYBR® Green PCR Master Mix	4309155	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

2.1.6 Software

Tab. 11: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
JMP Version15	SAS Institute, Cary NC, USA
Nanodrop 2000/2000c Software, Version 1.6.198	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
ImageJ 1.50i	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Micron-Scan Software V2.0 BE	Bitabis, Pforzheim, DE
Nikon NIS Elements AR, Version 7.3	Nikon, Minato, USA
Leica Application Suite, Version 2.7.3.9723	Leica, Wetzlar, DE
Compass for Simple Western 5.0.0	Protein Simple, Kalifornien, USA
GraphPad Prism Version 9.0	GraphPad Software, San Diego, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Alle Tierexperimente wurden von dem Regierungspräsidium Karlsruhe unter folgenden Aktenzeichen genehmigt: 35-9185.81/G-144/19, 35-9185.81/G-158/17 und 35-9185.81/G-325/19.

2.2.1.1 Mauslinien

In den folgenden Tierversuchen wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J von dem Züchter Janvier verwendet. Die transgenen Mauslinien Stabilin1-KO und Stabilin2-KO wurden von uns generiert und zeigen folgendes Genkonstrukt:

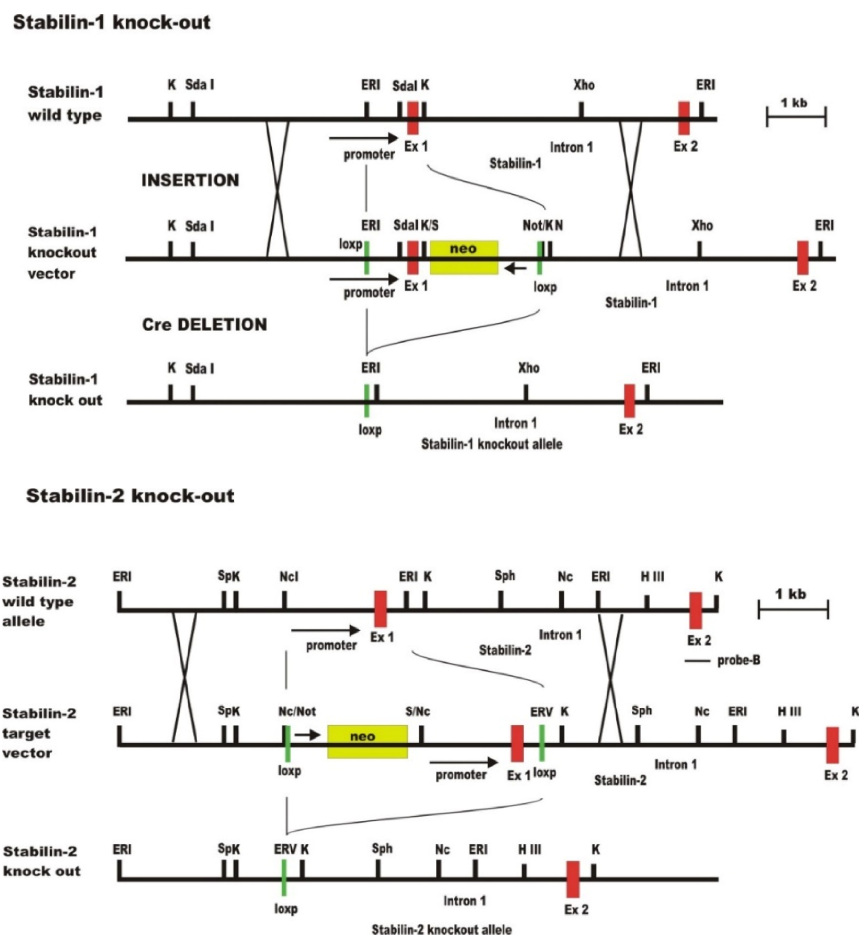


Abb. 18: Genkonstrukte der verwendeten Knockouts Stabilin-1 und Stabilin-2.

Nach der Cre-Deletion fehlt sowohl der Stabilin1-KO Maus, wie auch der Stabilin2-KO Maus das Exon1 und die Promotorsequenz. Somit handelt es sich bei beiden Knockouts um konstitutive Knockouts (Schledzewski et al., 2011).

2.2.1.2 Maushaltung

Die Mäuse waren zu Beginn der Versuche zwischen 9 und 12 Wochen alt, je nach Behandlung (das genaue Alter der Mäuse ist dem jeweiligen Abschnitt der Versuchsteile zu entnehmen). Die Mäuse wurden unter spezifiziert Pathogen-freien Bedingungen und mit einem 12 Stunden Tag- / Nachtrhythmus gehalten. Dabei hatten die Mäuse freien Zugang zu Standardfutter (ssniffR/M-H autoklavierbar, V1534-000; Ssniff) und Wasser. Zusätzlich wurde den Mäusen halbierte Nierenschalen aus Presspappe, Papiertücher und Holzstäbchen als Unterschlupf und Spielzeug bereitgestellt.

2.2.1.3 Blutentnahme und Organentnahme

Zu Beginn der Tierexperimente wurde den Mäusen aus der *Vena facialis* eine geringe Menge an Blut abgenommen (bis zu 200 µl). Am Ende eines jeden Versuches wurde den Mäusen final retrobulbär Blut abgenommen. Vor jeder Blutentnahme wurden die Mäuse mit 1 – 2 % (v/v) Isofluran betäubt.

Das entnommene Blut wurde in heparinisierten Microvetten (500 LH) gesammelt und anschließend bei 2000 x g für sechs Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma entnommen und bei -20 °C gelagert.

Nach der finalen Blutabnahme wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation geopfert und anschließend die Organe entnommen. Die Haut wurde mit Hautstanzen entnommen. Jedes Organ wurde in drei Teile geteilt. Ein Teil wurde für mindestens 24 Stunden in 4 % PFA in PBS (pH 7,4) fixiert und anschließend in der Core Facility für Präklinische Modelle im Gewebeeinfiltrationsautomat entwässert und anschließend paraffinisiert. Der zweite Teil wurde in Tissue-Tek™ O.C.T Compound über flüssigem Stickstoff tiefgefroren und der dritte Teil wurde für spätere Analysen (Protein- und RNA-Isolation und Kollagenbestimmung) ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.1.4 Experimentalfütterungen

Um den zeitlichen Verlauf der Leberschädigung und der Entzündung im metabolischen Leberfibrosemodell zu untersuchen, wurden männliche Mäuse der entsprechenden Versuchsgruppen (WT, *Stab1*^{-/-} und *Stab2*^{-/-}) entweder mit Methionin-Cholin-defizientem Futter (MCD Diät, ssniff E15653-94) oder Cholin-defizientem, Aminosäure-angepassten Futter (CDAA Diät, ssniff E15666-94) gefüttert. Die Kontrollgruppen wurden mit Normalfutter (ssniff V1534-000) ernährt.

Im Falle der MCD Fütterung wurden die Mäuse im Alter von neun Wochen über einen Zeitraum von 14 Tagen ernährt.

Im Falle der CDAA Fütterung wurden die Mäuse im Alter von neun bis zehn Wochen über einen Zeitraum von zehn Wochen ernährt.

2.2.1.5 Imiquimod Behandlung

Männlichen und weiblichen Mäusen der entsprechenden Versuchsgruppen (WT, *Stab1*^{-/-} und *Stab2*^{-/-}) wurde im Alter von zehn Wochen der Rücken rasiert. Anschließend wurde den Mäusen über einen Zeitraum von vier Tagen der Rücken täglich mit 5 % Imiquimod (AldaraTM Creme, von der Firma Meda) eingecremt. Dabei wurde jeder Maus jeden Tag dieselbe Menge an Creme verabreicht (ca. 62,5 mg), dabei entsprach die Menge des aktiven Wirkstoffes Imiquimod, die täglich verabreicht wurde ca. 3,125 mg. Die Kontrollmäuse wurden mit Vaseline (Linola) behandelt. An den Tagen 2 und 4 wurde den Mäusen zusätzlich 250 µl PBS intraperitoneal verabreicht. An Tag 5 wurden die Mäuse geopfert.

2.2.1.6 Bleomycin Behandlung

Männlichen Mäusen der entsprechenden Versuchsgruppen (WT, *Stab1*^{-/-} und *Stab2*^{-/-}) wurde im Alter von zehn Wochen der Rücken rasiert. Mit einem speziellen Hautmarker wurden zwei Punkte am Rücken der Maus markiert, um einen einheitlichen Injektionspunkt zu markieren. Den Mäusen wurde über einen Zeitraum von insgesamt zehn Tagen täglich an jeweils zwei Stellen subkutan 200 µl Bleomycin (in einer Konzentration von 0,6 mg/ml) injiziert. Den Kontrollmäusen wurde subkutan PBS injiziert. An Tag 7 wurde den Mäusen nichts verabreicht. Die Mäuse wurden an Tag 11 geopfert.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Plasmadaten Analyse aus dem Blut

Das Plasma der Mäuse wurde wie in 2.2.1.3 beschrieben aus dem Blut gewonnen. Die Plasmadaten wurden von der Core Facility Präklinische Modelle (CFPM), der Medizinischen Fakultät Mannheim mit einem Hitachi automatic Analyzer bestimmt.

2.2.2.2 SDS-PAGE

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden 4 – 20 % Fertiggele von BioRad verwendet und in die dafür vorgesehenen Gelkammern eingebaut. Die Gelvorrichtung mit den eingebauten Gelen wurde mit 1 x TGS Puffer bis zur entsprechenden Fülllinie befüllt. Anschließend wurden die Taschen der Gele mit den Proben befüllt. Als Marker wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard verwendet, von dem 5 µl in die erste Tasche des Gels geladen wurde. Die Proteine die zuvor aus dem Gewebe isoliert wurden (s. 2.2.3.5), wurden mit 2-fach Lämmli-Puffer 1:1 (1 Teil Lämmli plus 1 Teil Protein) versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C im Heizblock gekocht und danach auf das Gel aufgetragen. Jede Tasche wurde mit insgesamt 50 µg Protein beladen. Die Gele wurden zunächst für 10 min bei 50 mA gestartet und anschließend auf 100 mA hochgestellt. Kurz bevor die blaue Lauffront der Proben das Ende des Gels erreicht hatten, wurde die Gelelektrophorese beendet und die Gele in PBS gegeben.

2.2.2.3 Western Blot

Am Anschluss an die SDS-PAGE (s. 2.2.2.2) wurde ein Western Blot durchgeführt. Dabei wurde das *Semi-dry Blotting* Verfahren von BioRad verwendet, um die Proteine auf eine PVDF-Membran zu übertragen.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel zwischenzeitlich in PBS gelagert und wurde dann in Blotting-Puffer (bestehend aus 20 % TGS und 20 % Methanol in dH₂O) überführt. Die beiden *Whatman Paper*, die für den Blot benötigt wurden, wurden ebenfalls vor dem Zusammenbau des Blots in Blotting Puffer eingeweicht. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung kurz in 100 % Methanol gelegt.

Der Blot wurde wie folgt zusammengebaut:

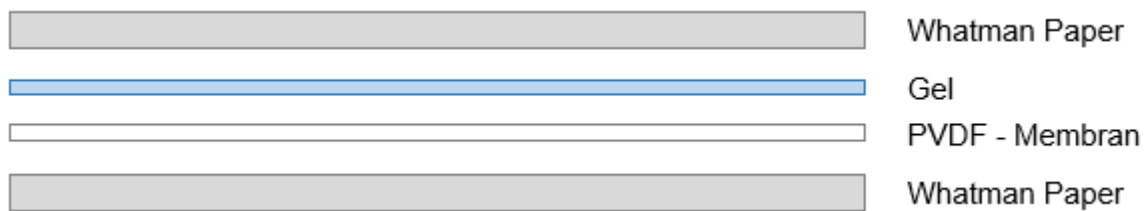


Abb. 19: Schema des Aufbaus eines Western Blots.

Vor dem Schließen der Blotkammer wurden mit Hilfe eines kleinen Rollers alle Luftblasen aus dem „Sandwich“ gerollt. Für den Blotting Vorgang wurde ein standardisiertes Programm verwendet, bei dem 0,4 A Strom fließen und dabei die Proteine innerhalb von 35 min von dem Gel auf die Membran transferiert werden. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in PBS gelegt und anschließend für 30 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in Blockierungs-Lösung (5 % Milchpulver in PBS) geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung in der Blockierungs-Lösung über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in 0,1 % PBS-Tween gewaschen. Danach wurde die Membran kurz in PBS gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper, der 1:5000 in der Blockierungs-Lösung vom Vortag verdünnt wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal für jeweils 10 min in 0,1 % PBS-Tween gewaschen. Daraufhin folgte das *Imagen* der Membran. Dafür wurde die Membran für zwei bis drei Minuten in ECL Substrat inkubiert und anschließend in einem Intas Chemilumineszenz-System entwickelt und digitalisiert.

2.2.2.4 Simple Western

Für das Simple Western Verfahren wurde das JESS System, von Bio-Techne verwendet. Um die Antikörper und die Gewebemenge zu titrieren, wurde das von der Firma hergestellte Kit *Separation Modul* verwendet und wie vom Hersteller im Protokoll beschrieben durchgeführt. Nachdem die Antikörper und die Gewebemenge titriert wurden, wurde das Modul *Protein Normalization* verwendet, um die Menge bestimmter

Proteine in den Proben zu bestimmen. Auch dieses Modul wurde wie im Protokoll des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode wurden Konzentrationen von TGF β 1 und Postn in Gewebelysaten untersucht.

2.2.2.5 Immunhistochemische Färbung (IHC) von Paraffinschnitten

In Paraffin eingebettetes Gewebe wurde in 3 bis 4 μ m Schnittdicke geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde im 60 °C Inkubator getrocknet. Darauf folgte die Rehydratation des Gewebes. Dafür wurde das Gewebe dreimal für jeweils 5 min im Xylolbad inkubiert, woraufhin eine Alkoholreihe mit abfallender Alkoholkonzentration (2 x 100 % Ethanol, 1 x 90 % Ethanol, 1 x 80 % Ethanol, 1 x 70 % Ethanol jeweils für 3 min) folgte. Das Ethanol wurde mit Reinstwasser verdünnt.

Nach der Rehydratation des Gewebes wurde das Gewebe zur Freilegung der Epitope in HIER (*heat-induced-epitope-retrieval*) Puffer bei 95 °C im Wasserbad für 30 min inkubiert. Der pH-Wert des HIER Puffers richtete sich dabei nach der Art des Gewebes. Leberschnitte wurden für gewöhnlich in HIER Puffer mit pH 6 und Hautschnitte mit pH 9 inkubiert. Nach dem Wasserbad wurden die Schnitte für 20 min bei Raumtemperatur im HIER Puffer stehen gelassen, um abzukühlen und anschließend zweimal für jeweils 3 min in PBS gewaschen. Um das Gewebe wurde eine hydrophobe Barriere gezogen. Die Schnitte wurden für 10 min mit Peroxidase-Block geblockt und anschließend wieder zweimal für jeweils 3 min in PBS gewaschen. Die primären Antikörper (pro Färbung wurden meistens zwei Antikörper verwendet, mit verschiedenen Spezies für je ein Zielprotein) wurden dann in Antikörper-*Diluent* in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration verdünnt und auf den Schnitt aufgebracht und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gewebe dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper mit HRP gekoppelt wurde auf die Schnitte gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Falle des Sekundärantikörpers Anti-Kaninchen-HRP, wurde ein *ready-to-use* Antikörper von Dako verwendet und im Falle der Sekundärantikörper Anti-Ziege-HRP oder Anti-Ratte-HRP wurden die Stock-Antikörper 1:200 in 1 % BSA in 1x PBS verdünnt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Das Gewebe wurde anschließend mit AEC Substrat Chromogen für 5 – 30 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert.

Anschließend folgte die Kernfärbung mit einer 1:1 verdünnten Hämatoxylin-Lösung (verdünnt in Reinstwasser) für 90 sek. Die Schnitte wurden dann für 15 min in Leitungswasser gewaschen und dann in destilliertes Wasser überführt. Das Präparat wurden danach mit auf Wasser-basiertem Eindeckmedium eingedeckt.

2.2.2.6 Immunfluoreszenz-Färbung (IF) von Paraffinschnitten

Nach der Rehydratation des Gewebes und der Freilegung der Epitope (s. 2.2.2.5) wurden die Schnitte ebenfalls für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um abzukühlen und danach zweimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Um das Gewebe wurde eine hydrophobe Barriere gezogen. Anschließend wurden die primären Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration in *Antikörper-Diluent* verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gewebe dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden 1:400 in *Antikörper-Diluent* verdünnt, zu dieser Lösung wurde noch DAPI (in einer Verdünnung von 1:1000) für die Kernfärbung zugegeben. Die Sekundärantikörper-Lösung wurde auf die Schnitte gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen und danach noch kurz in destilliertes Wasser überführt. Um die Präparate einzudecken, wurde Fluoreszenz-Eindeckmedium verwendet.

2.2.2.7 Immunfluoreszenz-Färbung (IF) von Kryoschnitten

Von den Kryo-konservierten Gewebeblöcken wurden 8 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden für circa eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde eine hydrophobe Barriere um das Gewebe gezogen. Die Schnitte wurden dann für 10 min in 4 % PFA (in PBS) und bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Schnitte einmal für 5 min in PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur in Blockierungs-Puffer (5 % Esel-Serum in PBS) geblockt. Nach dem Blocken, wurden die primären Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration in *Antikörper-Diluent* (20 % Blockierungs-Puffer in PBS) verdünnt, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe

dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden 1:400 in dem Antikörper-*Diluent*, der am Vortag hergestellt wurde, verdünnt und auf die Schnitte gegeben und für 45 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Danach wurde das Gewebe dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen und anschließend in Reinstwasser überführt. Um die Präparate einzudecken, wurde Fluoreszenz-Eindeckmedium verwendet.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 In Situ Hybridisierung

Für die In Situ Hybridisierung wurde das RNAscope 2.5 HD Detection Kit (RED) der Firma ACDbio verwendet. In Paraffin eingebettetes Gewebe wurde in 3 bis 4 μm Schnittstärke geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Um das Gewebe vorzubereiten, wurden die Schnitte bei 60 °C für eine Stunde im Inkubator gebacken. Um das Gewebe zu entparaffinisieren, wurden die Schnitte zweimal in Xylol für jeweils 5 min und zweimal in 100 % Ethanol für jeweils 1 min gebadet und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Hybridisierung erfolgte dann nach Herstellerangaben.

2.2.3.2 RNA Extraktion aus Gewebe

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurde das High Pure RNA Isolations-Kit von Roche verwendet und nach Herstelleranweisungen durchgeführt. Anschließend wurde die Konzentration der RNA mit Hilfe des NanoDrop 2000 bestimmt, indem die Absorption bei 260 nm Wellenlänge gemessen wurde. Dabei gab der Quotient A_{260}/A_{280} , der sich zusammensetzt aus der Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}), Informationen über die Reinheit der RNA. Gelagert wurde die extrahierte RNA bei -80 °C.

2.2.3.3 cDNA Synthese

Die cDNA wurde aus zuvor isolierter RNA (s. 2.2.3.2) mit Hilfe des SuperScript® II Reverse Transkriptase Kits nach Herstelleranweisung hergestellt und anschließend bei -20 °C gelagert. Eingesetzt wurden dafür 1 – 2 μg RNA pro Probe.

2.2.3.4 DNA Isolation und PCR zur Genotypisierung

Zur Überprüfung des Genotypes der verwendeten Mäuse wurde mit Hilfe von Ohrmarkierungsstanzen Gewebe entnommen. Das entnommene Gewebe wurde dann mit 50 µl Lysispuffer und 1,5 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 56 °C und über Nacht in einem Thermocycler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lyse durch Zugabe von 500 µl Reinstwasser und kochen bei 95 °C für 10 min gestoppt.

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1 µl der zuvor gewonnen DNA zusammen mit 19 µl der Polymerisationslösung (bestehend aus 0,6 µl der jeweiligen Primer, 0,4 µl dNTP, 2 µl *Complete* Puffer und 0,2 µl Polymerase, anschließend wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 19 µl aufgefüllt) gemischt und anschließend im Nukleinsäureamplifikator inkubiert. Dabei richtete sich das Protokoll nach der jeweiligen PCR.

Das PCR Programm für die Stabilin-1 PCR: 95 °C für 3 min, danach folgten 35 Zyklen mit jeweils 20 sek bei 95 °C, 30 sek bei 60 °C und 1 min bei 72 °C. Nach den 35 Zyklen wurden die Proben für 10 min bei 72 °C inkubiert und anschließend bei 10 °C gekühlt. Gelagert wurden die Proben bei 4 °C.

Das PCR Programm für die Stabilin-2 PCR: 95 °C für 5 min, danach folgten 34 Zyklen mit jeweils 30 sek bei 95 °C, 30 sek bei 60 °C und 1 min bei 72 °C. Nach den 34 Zyklen wurden die Proben für 5 min bei 72 °C inkubiert und anschließend bei 10 °C gekühlt. Gelagert wurden die Proben bei 4 °C.

Die PCR Produkte wurden anschließend auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Für die Herstellung des Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle aufgelöst. Im noch flüssigen und heißen Zustand wurde der Mischung 8 µl Nancy-520 zugegeben. Anschließend wurde die noch flüssige Agarose in eine Gelform mit eingesetzten Kämmen gefüllt und für ca. 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen um auszuhärten. Während der Aushärtung des Gels, wurden die PCR Produkte mit 3 – 4 µl 6-fach *Loading Dye* versehen und anschließend nach Entfernen der eingesetzten Kämmen in die entstandenen Taschen des ausgehärteten Gels pipettiert. Dabei wurden von den Proben 8 – 12 µl (je nach Größe der Taschen) und vom Marker 6 – 8 µl (ebenfalls je nach Größe der Taschen) pipettiert.

Anschließend wurde das Gel für ca. 30 min bei 100 V Gleichstromspannung laufen gelassen. Mit Hilfe des Gelfluoreszenzdetektors Azure Imager C400 wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese mit UV-Licht angeregt und fotografiert.

2.2.3.5 Protein-Extraktion aus Gewebe

Für die Protein-Extraktion aus Gewebe wurde ein RIPA-Protease-Inhibitor Puffer benötigt. Dazu wurde nach Herstellerangaben eine Protease-Inhibitor Tablette in 2 ml Reinstwasser aufgelöst und anschließend mit 38 ml RIPA Puffer gemischt.

Zur Proteinisolation wurden pro Probe 200 µl des RIPA-Protease-Inhibitor Puffers in ein Precelleys Reaktionsgefäß vorgelegt, dazu wurden in etwa 2 mm² große Gewebestücke gegeben. Die Lyse des Gewebes wurde dann in dem Homogenisator PrecellysR Evolution bei 5000 rpm für 20 sek durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die Proteinkonzentration bestimmt (s. 2.2.3.6).

2.2.3.6 Proteinkonzentrations-Bestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein BSA Standard verwendet. Dazu wurde aus einem BSA Stock (10 mg/ml) eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 8 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,15 mg/ml und 0 mg/ml. Von der Standardreihe und den Proteinproben wurden jeweils Dubletten für die 96-Well Platte benötigt. Zu 1 ml Reagenz A wurden 20 µl Reagenz S zugegeben. Von dieser Lösung wurden 25 µl in jedes Well gegeben und anschließend 5 µl des Proteinlysates hinzugegeben. 200 µl des Reagenz B wurden in jedes Well gegeben und dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Messung der Absorption mit Hilfe des TECAN *Microplate-Reader* bei einer Wellenlänge von 655 nm.

2.2.3.7 ELISA

Für alle verwendeten ELISA Kits wurde Plasma verwendet. Das Plasma wurde aus dem gewonnenen Blut isoliert wie in 2.2.1.3 beschrieben. Alle ELISAs wurden laut

Herstellerangaben durchgeführt. Im Falle des TGFBI ELISAs wurde das Plasma 1:500 verdünnt und im Falle des Postn ELISAs wurde das Plasma 1:2000 verdünnt. Die optische Dichte (OD) wurde mit Hilfe des TECAN *Microplate-Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.2.3.8 Kollagenassay

Für die Bestimmung des Kollagengehaltes in der Leber wurde das sensitive *Tissue Collagen Assay Kit* von QuickZyme verwendet. Für die Durchführung des Assays wurde Lebergewebe, das bei -80 °C gelagert wurde aufgetaut und verwendet. Der Assay wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Die optische Dichte (OD) wurde mit Hilfe des TECAN *Microplate-Reader* bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

2.2.4 Immunhistologische Methoden

Die Standardfärbungen Hämatoxylin/Eosin (H&E) und Sirius Rot wurden in Kooperation mit dem Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF) in einem Färbeautomat durchgeführt.

Die Masson-Trichrome Färbung wurde in Kooperation mit dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie in München durchgeführt.

Für die H&E-, Sirius-Rot- und Masson-Trichrome Färbung wurde das in Paraffin-eingebettet Gewebe mit 4 µm Schnittdicke geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht und im Anschluss für 60 min bei 60 °C im Inkubator inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal für je zwei Minuten in Xylobädern entfettet und anschließend in Ethanolbädern mit absteigender Konzentration (verdünnt mit Reinstwasser) (100 %, 96 %, 80 % und 70 %) rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für eine Minute in Reinstwasser gewaschen.

2.2.4.1 Hämatoxylin/Eosin Färbung (H&E)

Nach der Rehydratation des Gewebes (wie in 2.2.4 beschrieben) erfolgte die Kernfärbung für 4 min mit Hämatoxylin. Das Gewebe wurde dann für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Danach wurde das Gewebe für 2 min mit Eosin gefärbt,

dann in Leitungswasser und anschließend in 80 % Ethanol für jeweils 30 sek gewaschen. Darauf folgte eine Minute in 96 % Ethanol, zweimal für jeweils eine Minute in 100 % Ethanol und abschließend zweimal für jeweils eine Minute in Xylol. Das Präparat wurde dann mit Eukitt eingedeckt.

2.2.4.2 Sirius Rot Färbung

Nach der Rehydratation des Gewebes (wie in 2.2.4 beschrieben) wurde das Gewebe für 60 min in Pikro-Siriusrot inkubiert und anschließend für jeweils 30 sek erst in 0,5 % Essigsäure und dann in 80 % Ethanol gewaschen. Darauf folgte 96 % Ethanol, zweimal 99 % Ethanol und zweimal Xylol für jeweils eine Minute. Das Präparat wurde dann mit Eukitt eingedeckt.

2.2.4.3 Masson-Trichrom Färbung

Nach der Rehydratation des Gewebes (wie in 2.2.4 beschrieben) wurde das Gewebe für 15 min in Weigerts Eisenhämatoxylin inkubiert, um die Kerne anzufärben. Danach wurden die Schnitte für 10 sek in Reinstwasser gewaschen und danach für 8 min in Leitungswasser überführt. Um das Zellplasma anzufärben wurden die Schnitte für 4 min in Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin inkubiert und danach für 30 sek in 1 % Essigsäure differenziert. Daraufhin folgte die Inkubation in Phosphormolybdänsäure-Orange G (GOLDNER II) für 30 min und anschließend wieder eine 30 sekündige Differenzierung in 1 % Essigsäure. Zum Anfärben des Gewebes wurden die Schnitte für 6 min in Lichtgrün-Lösung (GOLDNER III) inkubiert. Daraufhin folgte wieder das Waschen in 1 % Essigsäure für 2 min und danach für 1 min in Reinstwasser. Das Gewebe wurde dann wieder entwässert, indem zweimal in 96 % Ethanol für jeweils 2 min, einmal in Isopropanol für 2 min und zweimal in Xylol für jeweils 5 min inkubiert wurde. Das Präparat wurde dann mit xylolhaltigem Eindeckmittel eingedeckt.

2.2.4.4 Öl-Rot O Färbung

Am Tag vor der Färbung wurde für die Stammlösung 0,5 g Ölrot O in 99 % 2-Propanol gelöst. Für die Gebrauchslösung wurden 6 Teile der Stammlösung mit 4 Teilen Reinstwasser gemischt und über Nacht stehen gelassen. Die fertige Lösung wurde

kurz vor Gebrauch frisch filtriert.

Im Kryotom frisch geschnittenes Lebergewebe (8 µm dick geschnitten) wurde auf einen Objektträger aufgebracht und für ca. 30 min getrocknet und anschließend für 5 min in Reinstwasser gewässert. Anschließend wurde das Gewebe für 5 min in 60 % Isopropanol inkubiert. Das Gewebe wurde dann für 10 min in der frisch filtrierten Gebrauchslösung gefärbt, danach kurz in 60 % Isopropanol differenziert und anschließend für 1 min in Reinstwasser gewaschen. Für die Kernfärbung wurde das Gewebe für 7 min in einer 1:10 mit Reinstwasser verdünnten Hämatoxylin-Lösung inkubiert und anschließend für 10 sek in Reinstwasser gewaschen. Das Gewebe wurde anschließend mit einem Tropfen wässrigen Einbettmedium versehen und mit einem Eindeckglas eingedeckt.

2.2.4.5 PAS Färbung

Nach der Rehydratation des Gewebes (wie in 2.2.4 beschrieben) wurden die Schnitte dreimal für je 2 min in Xylol inkubiert. Anschließend erfolgte eine absteigende Alkoholreihe (1 x 100 %, 2 x 96 % und 1 x 70 % für jeweils 25 sek). Die Schnitte wurden danach für 25 sek in Reinstwasser gewaschen. Daraufhin folgte ein Inkubationsschritt in 0,5 % Perjodsäure für 15 min. Danach wurden die Schnitte für 3 min in Leitungswasser und anschließend für 10 sek in Reinstwasser gewaschen. Es erfolgte ein Inkubationsschritt in Schiffsche Reagenz für 15 sek. Danach wurden die Schnitte wieder für 3 min in Leitungswasser und danach für 10 sek in Reinstwasser gewaschen. Die Schnitte wurden dann für 8 min in HTY Mayer Lösung inkubiert und anschließend wieder in Leitungswasser für 6 min gewaschen. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (30 sek in 96 % und danach 2 x in 100 % für jeweils 25 sek). Anschließend wurden die Schnitte zwei Mal für je 1,5 min in Xylol inkubiert. Das Gewebe wurde anschließend mit einem Tropfen wässrigen Einbettmedium versehen und mit einem Eindeckglas eingedeckt.

2.2.4.6 Elastica van Gieson Färbung (EvG)

Nach der Rehydratation des Gewebes (wie in 2.2.4 beschrieben) wurden die Schnitte dreimal für je 2 min in Xylol inkubiert. Anschließend erfolgte eine absteigende Alkoholreihe (1 x 100 %, 2 x 96 % und 1 x 70 % für jeweils 25 sek). Die Schnitte wurden dann

für 25 sek in Reinstwasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 20 min in Resorcinfuchsin-Lösung inkubiert. Es folgten zwei Inkubationsschritte in 96 % Alkohol für jeweils 1,5 min. Danach wurden die Schnitte für 8 min in HTX-Weigert Lösung inkubiert und kamen dann für 5 min in ein Wasserbad. Danach wurden die Schnitte für 2 min in Pikrofuchsin inkubiert. Darauf folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (30 sek in 96 % und danach 2 x in 100 % für jeweils 25 sek). Die Schnitte wurden danach zweimal für je 1,5 min in Xylol inkubiert. Das Gewebe wurde anschließend mit einem Tropfen wässrigen Einbettmedium versehen und mit einem Eindeckglas eingedeckt.

2.2.5 Klinische Methoden

2.2.5.1 PASI Scoring

Für die Ermittlung des Schweregrades der Hautentzündung von Imiquimod-behandelten Mäusen wurde der sogenannte PASI Score (***P**сориа́сис **A**rea and **S**everity **I**ndex*) verwendet, der normalerweise in der Humanmedizin zur klinischen Beurteilung einer Psoriasis eingesetzt wird.

Dabei wurde die Haut einer jeden Maus jeden Tag fotografiert und anschließend für die Art der Behandlung, den Behandlungstag, den Genotyp und das Geschlecht verblindet. Mitarbeiter des Institutes für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Mannheim haben daraufhin die verblindeten Bilder nach Rötung, Dicke und Schuppung der Haut von 0 – 4 bewertet (dabei entsprach 0 keiner Veränderung der Haut und 4 einer sehr starken Veränderung und Entzündung der Haut). Anschließend wurde aus allen Bewertungen der Mäuse eines Geschlechts, eines Genotypes und einer Behandlung der Mittelwert ermittelt.

2.2.6 Bildgebung

2.2.6.1 Lichtmikroskopie

Konventionelle, nicht fluoreszenz-gefärbte Schnitte wurden mit dem Mikroskop Nikon Eclipse Ci-L bei automatischer Belichtung fotografiert. Mit Hilfe der Aufnahmesoftware Nikon NIS Elements, Version 4.6 Imaging Software erfolgte vor der Aufnahme ein Weißabgleich.

2.2.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz-gefärbte Schnitten wurden mit dem inversen Fluoreszenz-Mikroskop von Nikon DS-Qi2 mikroskopiert und mit Hilfe der NIS-Elements Advanced Research 7.30 Software aufgenommen. Die Bilder wurden über die Einstellung der Z-Stacks fokussiert.

2.2.6.3 Bildbearbeitung und Quantifizierung

Die Hellfeldaufnahmen (Immunhistochemische Färbungen, H&E, Sirius Rot, Masson Trichrom, sowie In Situ Hybridisierungs Aufnahmen) wurden in der Bildbearbeitungssoftware Fiji ImageJ bearbeitet. Um die Färbung zu quantifizieren, wurden die am Mikroskop aufgenommenen Bilder in Fiji ImageJ geöffnet und in die Einzelkanäle (rot, grün, blau) gesplittet. Mit Hilfe der *Threshold*-Funktion wurde im gewünschten Kanal, der die zu quantifizierende Farbe enthielt, die gefärbte Fläche markiert und eingestellt und anschließend über die *Measure*-Funktion gemessen. Mit Hilfe der Software wurde auch die Maßstableiste eingefügt.

Die Immunofluoreszenz (IF)-Färbungen wurden zunächst direkt nach der Aufnahme am Mikroskop mit der NIS-Elements Advanced Research 7.30 Software bearbeitet, indem der Hintergrund mit Hilfe der *Rolling Ball Substraction*-Funktion reduziert wurde. Die Quantifizierung der IF-Färbungen erfolgte ebenfalls über die Bildbearbeitungssoftware Fiji ImageJ. Dafür wurden die Färbungen über die *Threshold*-Funktion und nach prozentual gefärbter Fläche quantifiziert und anschließend in den zu sehenden Graphen dargestellt. Mit Hilfe der Software wurde auch die Maßstableiste eingefügt.

2.2.7 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism, Version 9.0 ausgewertet.

Um die Mittelwerte von maximal zwei Gruppen miteinander zu vergleichen wurde ein t-Test durchgeführt. Eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way-Anova) wurde durchgeführt, um zwei oder mehrere Gruppen mit einer abhängigen Variablen miteinander zu vergleichen. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way-Anova) wurde durchge-

führt, wenn zwei oder mehr Gruppenvariablen mit einer abhängigen Variablen miteinander verglichen werden sollten. Um das Signifikanzniveau anzuzeigen, wurde eine Šidák-Korrektur gemacht. Die Sternchen und Rauten Symbole kennzeichnen folgende Signifikanzen: $p \leq 0,05 = */#$; $p < 0,01 = **/##$; $p < 0,001 = ***/###$; $p < 0,0001 = ****/####$; ns steht für nicht signifikant.

Die statistische Auswertung der Gewichte der Mäuse (aller vier Teilversuche) wurde von Frau Prof. Dr. Christel Weiß aus der Abteilung für Medizinische Statistik, Bioinformatik und Informationsverarbeitung der Medizinischen Fakultät Mannheim durchgeführt. Um den Einfluss der verschiedenen Variablen auf das Gewicht zu überprüfen, wurden 3-faktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholungen durchgeführt. Da es zahlreiche Interaktionen gab, wurden zwei Varianzanalysen separat nach Fütterungs- bzw. Behandlungsart durchgeführt. Im Falle der mit Imiquimod-behandelten Mäuse wurde aufgrund der Interaktion zwischen den Genotypen bei den Männchen noch für jeden Genotyp eine eigene Analyse durchgeführt.

Für den PASI Score und die Korrelationsanalysen wurde die Statistik-Software JMP verwendet.

Im Falle des PASI Scores wurde analog zu der statistischen Auswertung der Gewichte eine 3-faktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Die Sternchen Symbole kennzeichnen die Signifikanzen nach dem p-Wert: $p \leq 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$; $p < 0,0001 = ****$; ns steht für nicht signifikant.

Die Korrelationsanalysen wurden nach dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson bewertet, dabei ergeben sich folgende Korrelationen (r): $r < 0,1 =$ keine Korrelation, $0,1 < r < 0,3 =$ geringe Korrelation, $0,3 < r < 0,5 =$ moderate Korrelation, $0,5 < r < 0,7 =$ starke Korrelation, $r > 0,7 =$ sehr starke Korrelation. Anhand des Korrelationskoeffizienten kann allerdings keine Aussage über die Signifikanz getroffen werden, daher wurden auch noch die p-Werte miteinbezogen. Dabei ergaben sich folgende Signifikanzen: $p \leq 0,05 =$ geringe Signifikanz, $p < 0,01 =$ moderate Signifikanz, $p < 0,001 =$ hohe Signifikanz, $p < 0,0001 =$ sehr hohe Signifikanz.

3 ERGEBNISSE

3.1 MCD Fütterung

3.1.1 Einfluss auf das metabolische Profil

Bei der Fütterung mit Methionin-Cholin-defizientem Futter (MCD) nahmen die Kontrollgefütterten Mäuse während der Fütterung zu. Dabei hatte die Woche zwar einen signifikanten Einfluss auf das Gewicht, nicht aber der Genotyp. Das Gewicht der Kontrollmäuse stieg im Durchschnitt um 0,5 g pro Woche. Die MCD-gefütterten Mäuse zeigten bereits nach einer Woche eine starke Gewichtsreduktion im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Bei den MCD-gefütterten Mäusen zeigte sich eine Interaktion zwischen den Genotypen und der Woche, hier hatte die Fütterungsdauer einen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht bei allen drei Genotypen, allerdings waren die durchschnittlichen Änderungen pro Woche in den drei Genotypen unterschiedlich stark ausgeprägt (s. Abb. 20 A). Bei allen drei Genotypen war ein verringertes Lebergewicht nach der Fütterung mit MCD zu sehen im Vergleich zu den Kontrollmäusen (s. Abb. 20 B).

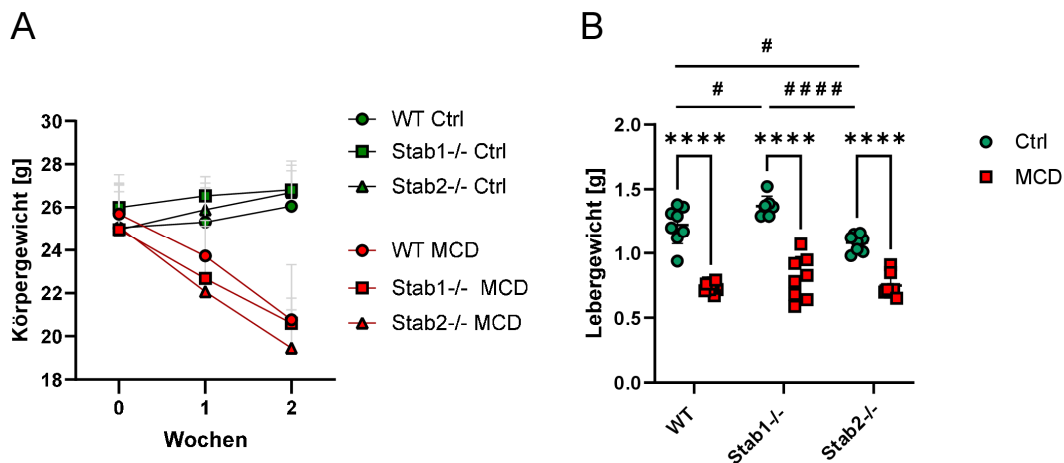


Abb. 20: Gewichtsverlauf während der MCD Fütterung und Lebergewichte. (A) Verlauf des Körpergewichtes von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. (B) Lebergewichte im Verhältnis zu dem Gesamt-Körpergewicht von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen.

Das Plasma der Mäuse wurde auf unterschiedliche Parameter untersucht. Durch die Fütterung mit MCD kam es in allen Genotypen zu einer Abnahme der Cholesterol-, Triglycerid- und Glukosewerte (s. Abb. 21 A – C). Nach der Fütterung mit MCD zeigten

alle Genotypen ein erhöhtes Level an Cholinesterase im Vergleich zu den Kontrollmäusen (s. Abb. 21 D).

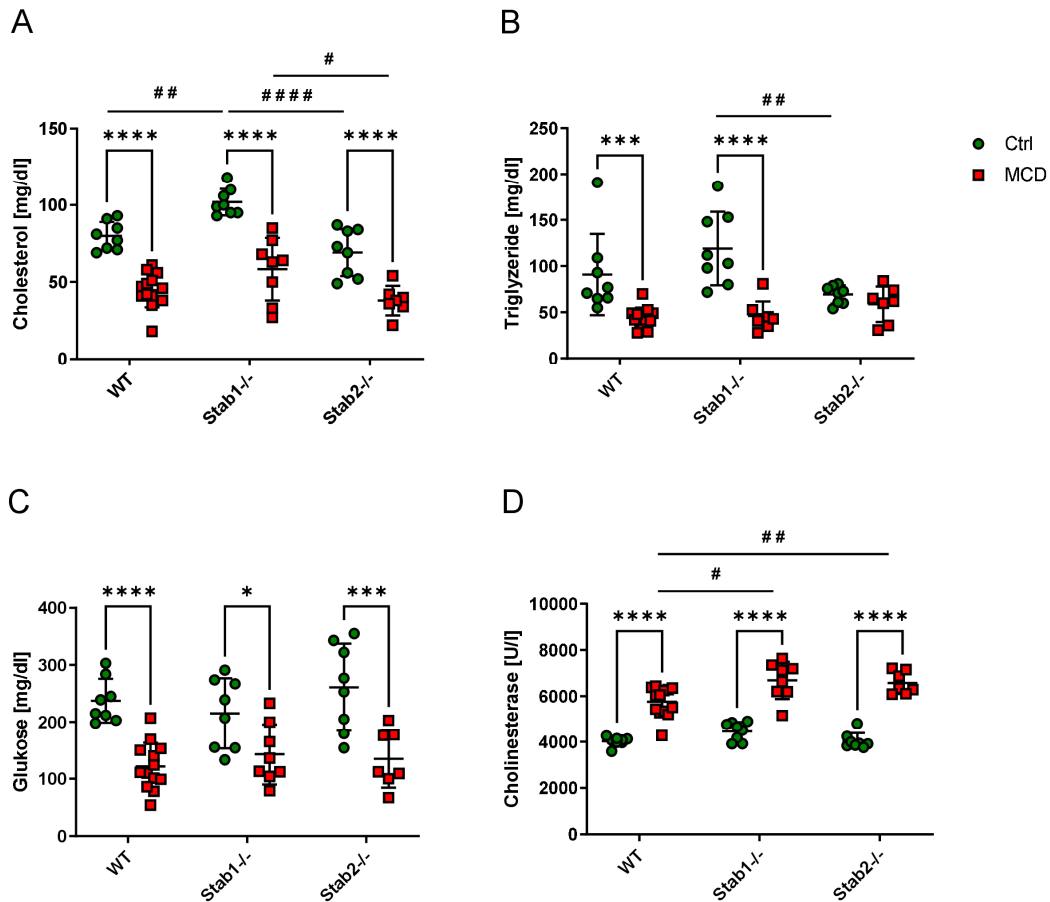


Abb. 21: Plasmalevels von MCD-gefütterten Mäusen. Plasmalevels von (A) Cholesterol, (B) Triglyzeriden, (C) Glukose und (D) Cholinesterase von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen.

Die Analyse der Leberenzyme ALT, AST und GLDH zeigte bei allen drei Genotypen eine signifikante Erhöhung der Werte nach der Fütterung mit MCD (s. Abb. 22). *Stab1*^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu den WT Mäusen und den *Stab2*^{-/-} Mäusen ein signifikant höheres ALT-Level nach der Fütterung mit MCD (s. Abb. 22 A).

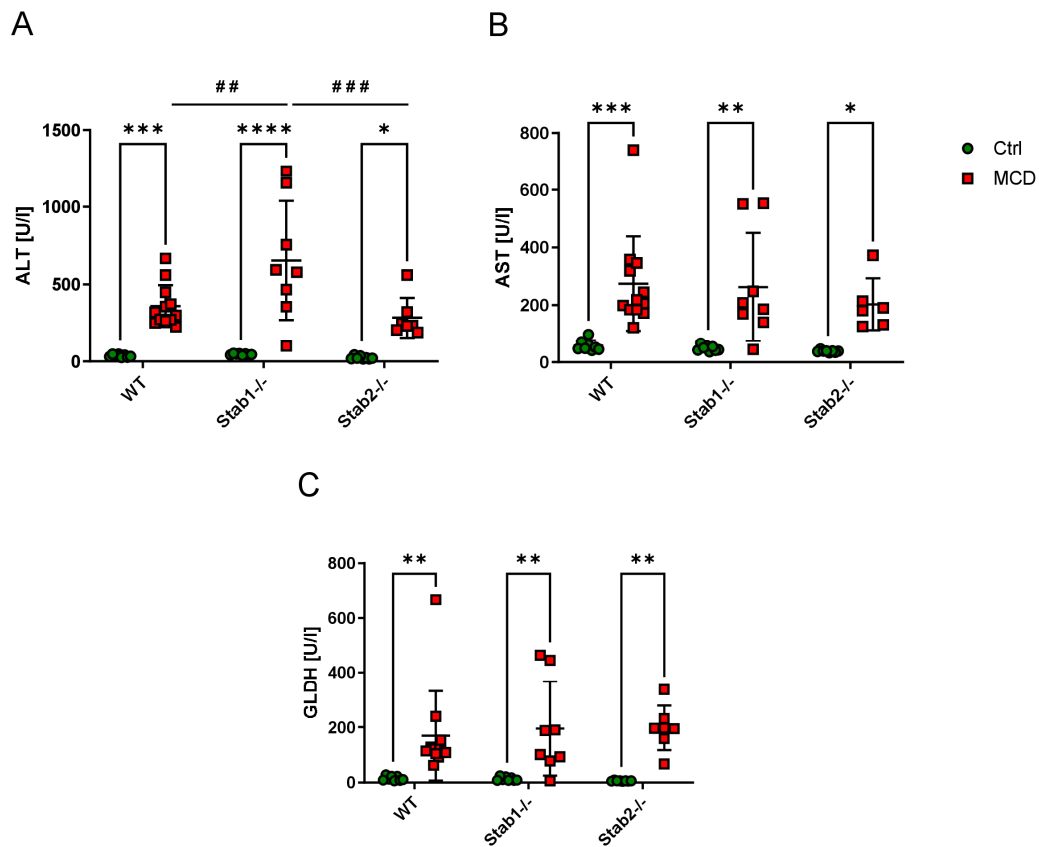


Abb. 22: Analyse der Leberenzyme von MCD-gefütterten Mäusen. Plasmalevels von (A) ALT, (B) AST und (C) GLDH von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen.

Die histologischen Färbungen H&E und Öl-Rot O zeigten nach der Fütterung mit MCD grundsätzlich in allen drei Genotypen eine Vermehrung von Lipidtröpfchen, dabei schwankte die Stärke der Öl-Rot O Färbung in den Schnitten (s. Abb. 23 – 24). Ansonsten waren keine morphologischen Veränderungen der Leber zu sehen.

Um den Kollagengehalt in den Lebern zu untersuchen, wurden Leberschnitte mit Sirius Rot gefärbt, dabei war zu sehen, dass die Lebern der Stabilin-defizienten Kontrollmäuse, und insbesondere die Lebern der *Stab1*^{-/-} Mäuse, signifikant mehr Kollagen aufzeigten, als die WT Kontrollmäuse (s. Abb. 25 A – B). Nach der Fütterung mit MCD stieg das Kollagenlevel in allen drei Genotypen signifikant an. Dies wurde ebenfalls durch den Kollagenassay bestätigt (s. Abb. 25 C).

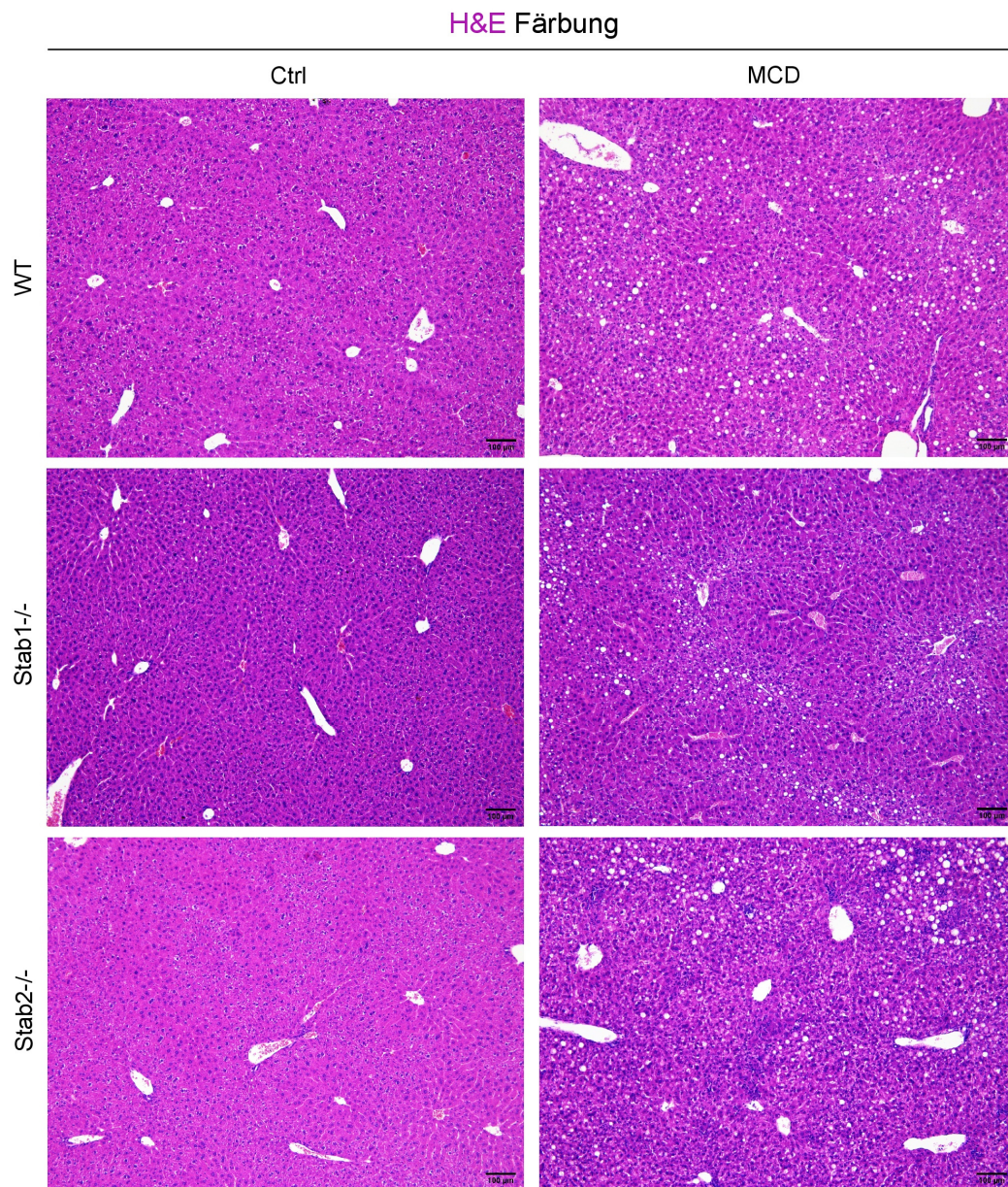


Abb. 23: H&E Färbung der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabelle entspricht 100 µm.

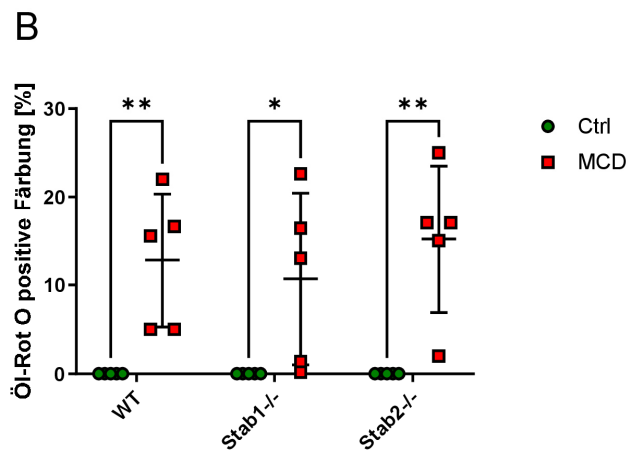
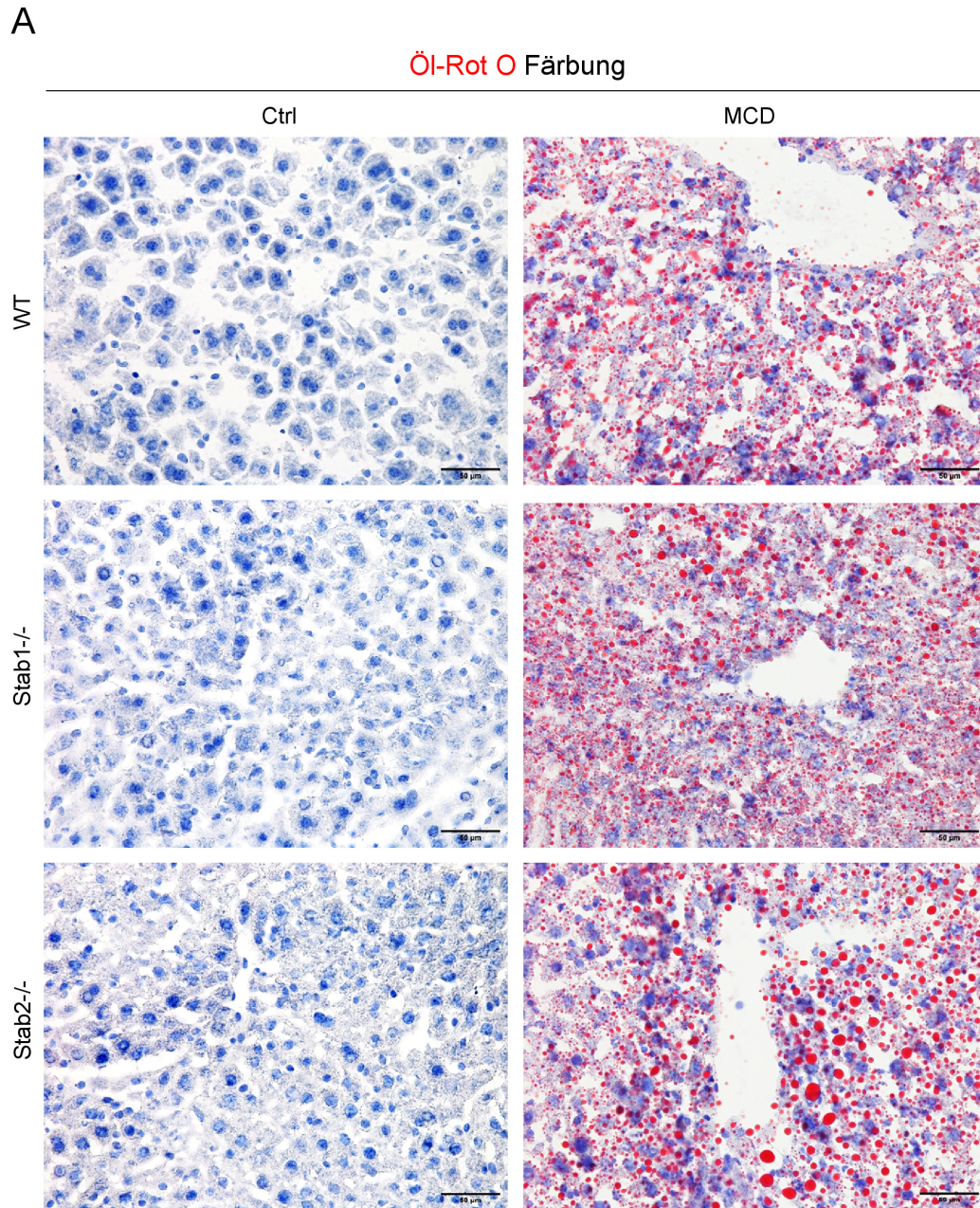


Abb. 24: Öl-Rot O Färbung der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabelle entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der Öl-Rot-O positiven Färbung.

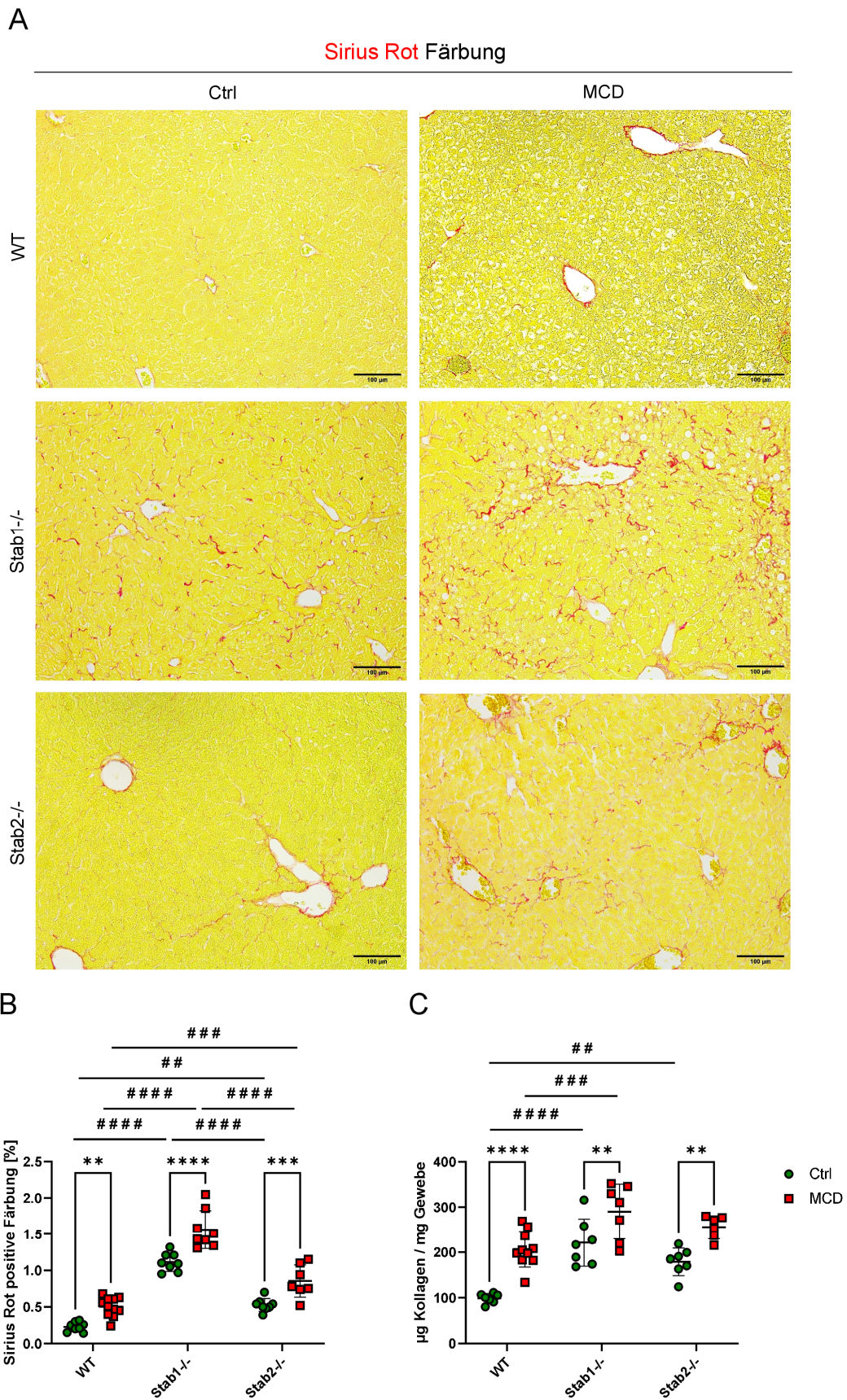


Abb. 25: Kollagenbestimmung in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen mit Sirius Rot gefärbt. Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm. (B) Quantifizierung der Sirius Rot positiven Färbung. (C) Quantifizierung des Kollagenassays von Lebergewebe.

3.1.2 Einfluss auf Leberendothelzellen

Um den Einfluss auf Leberendothelzellen zu untersuchen, wurden verschiedene Leberendothelzell Marker mit Hilfe von IF-Färbungen analysiert.

Die Färbung des kontinuierlichen EC Markers Endomucin (Emcn) zeigte in allen Genotypen und bei beiden Fütterungen ein Signal in den perizentralen LSECs und den Endothelzellen der Zentralvene (s. Abb. 26). In den Westernblot-Analysen zeigten sich zwischen den Genotypen und den beiden Fütterungen ebenfalls keine Unterschiede (s. Abb. 27).

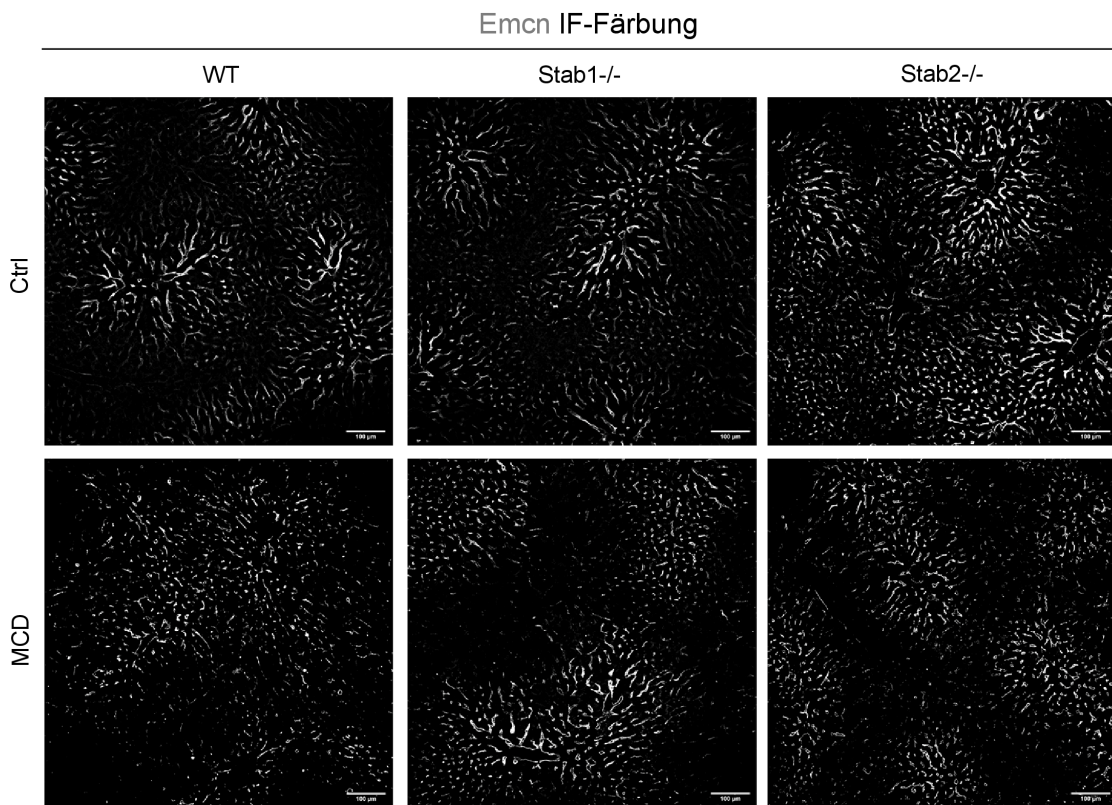
Bei der Färbung mit dem endothelialen Zonierungsmarker Lyve-1 zeigte sich ein Signal auf Endothelzellen der Zone 2. Nach der Fütterung mit MCD, zeigten *Stab1*^{-/-} Mäuse ein leicht erhöhtes Lyve-1 Signal im Vergleich zu den WT Mäusen (s. Abb. 28). Die IF-Färbung von CD31 zeigte in allen drei Genotypen und in beiden Fütterungen, ein Signal um die Zentralvene herum und in allen kontinuierlichen Endothelien (s. Abb. 29).

Die IF Färbung von ICAM-1 zeigte in den Kontrollmäusen aller drei Genotypen ein Signal in den LSECs der Zone 1, 2 und 3. Durch die Fütterung mit MCD kam es in allen drei Genotypen zu einer starken Reduktion der Expression von ICAM-1. Ein Signal zeigte sich in den MCD gefütterten Mäusen vor allem in den Endothelzellen der Zentralvene. Zwischen den Genotypen waren keine Unterschiede zu sehen (s. Abb. 30).

In der IF-Färbung von CD32b zeigte sich eine ubiquitäre Expression in LSECs in allen Genotypen und beiden Fütterungsgruppen (s. Abb. 31).

Bei der Ko-IF-Färbung von Arginase1 (*Arg1*) und Glutaminsynthetase (*GS*) war das *Arg1* Signal in allen Hepatozyten außer den perizentralen Hepatozyten zu sehen und *GS* zeigte sich nur in den perizentralen Hepatozyten. Zwischen den Genotypen und den beiden Fütterungsgruppen zeigten sich dabei keine Unterschiede (s. Abb. 32).

A



B

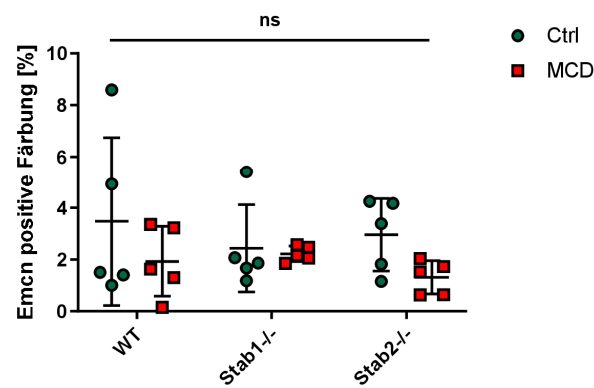


Abb. 26: IF-Färbung von Emcn in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 100 μm . (B) Quantifizierung der Emcn positiven Färbung.

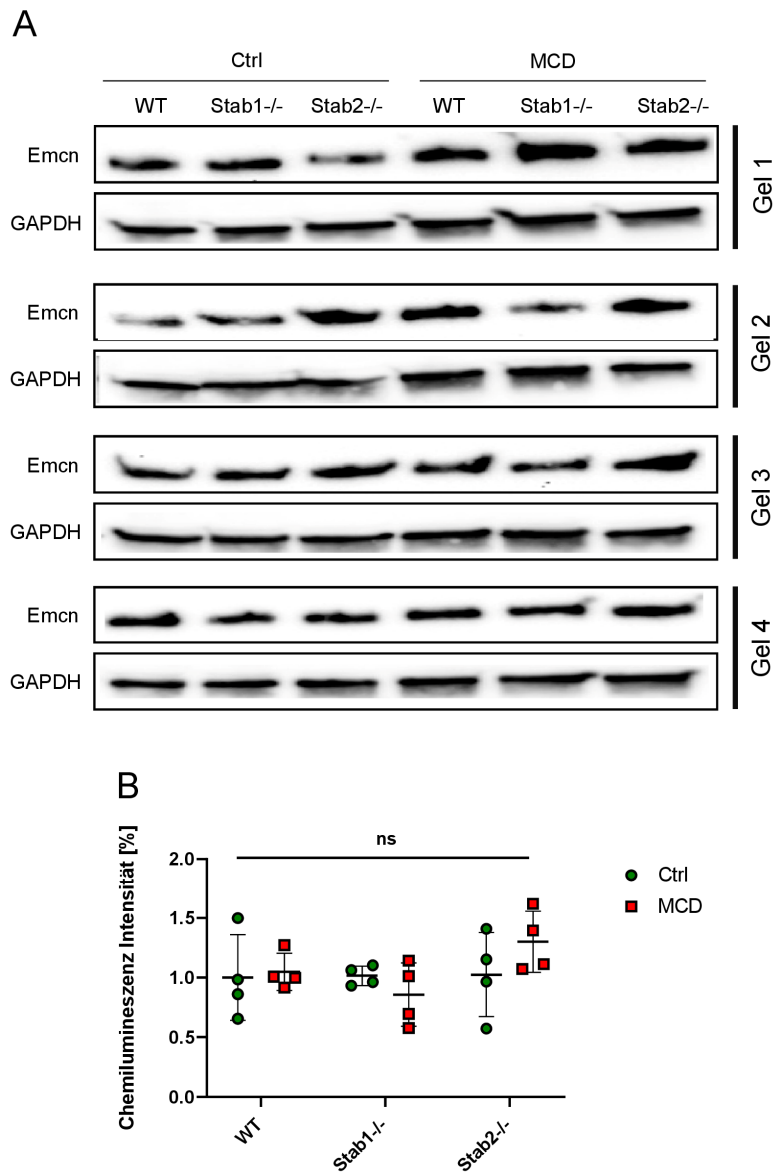
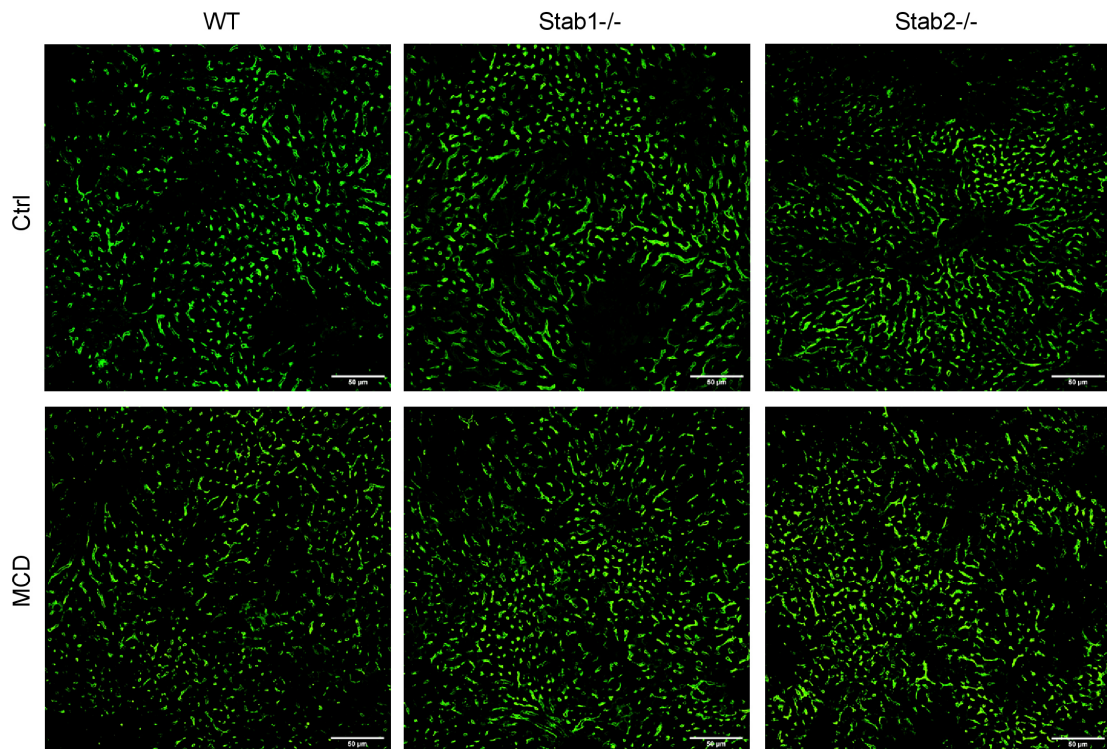


Abb. 27: Emcn Western Blot von Leberprotein von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Western Blots von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen, für jeden Blot wurden unterschiedliche Mäuse verwendet. (B) Quantifizierung der vier Western Blots, die Werte wurden auf den Mittelwert der WT Kontrollmäuse normiert.

A

Lyve-1 IF-Färbung



B

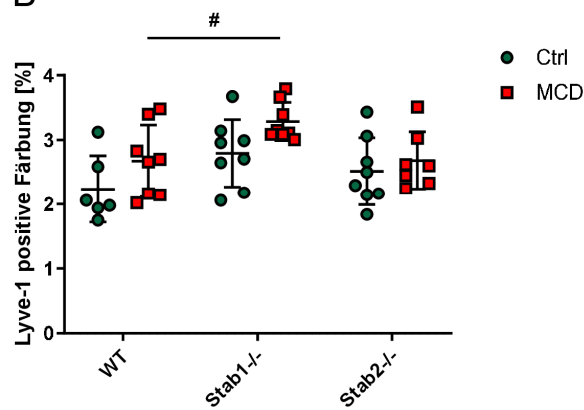


Abb. 28: IF-Färbung von Lyve-1 in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der Lyve-1 positiven Färbung.

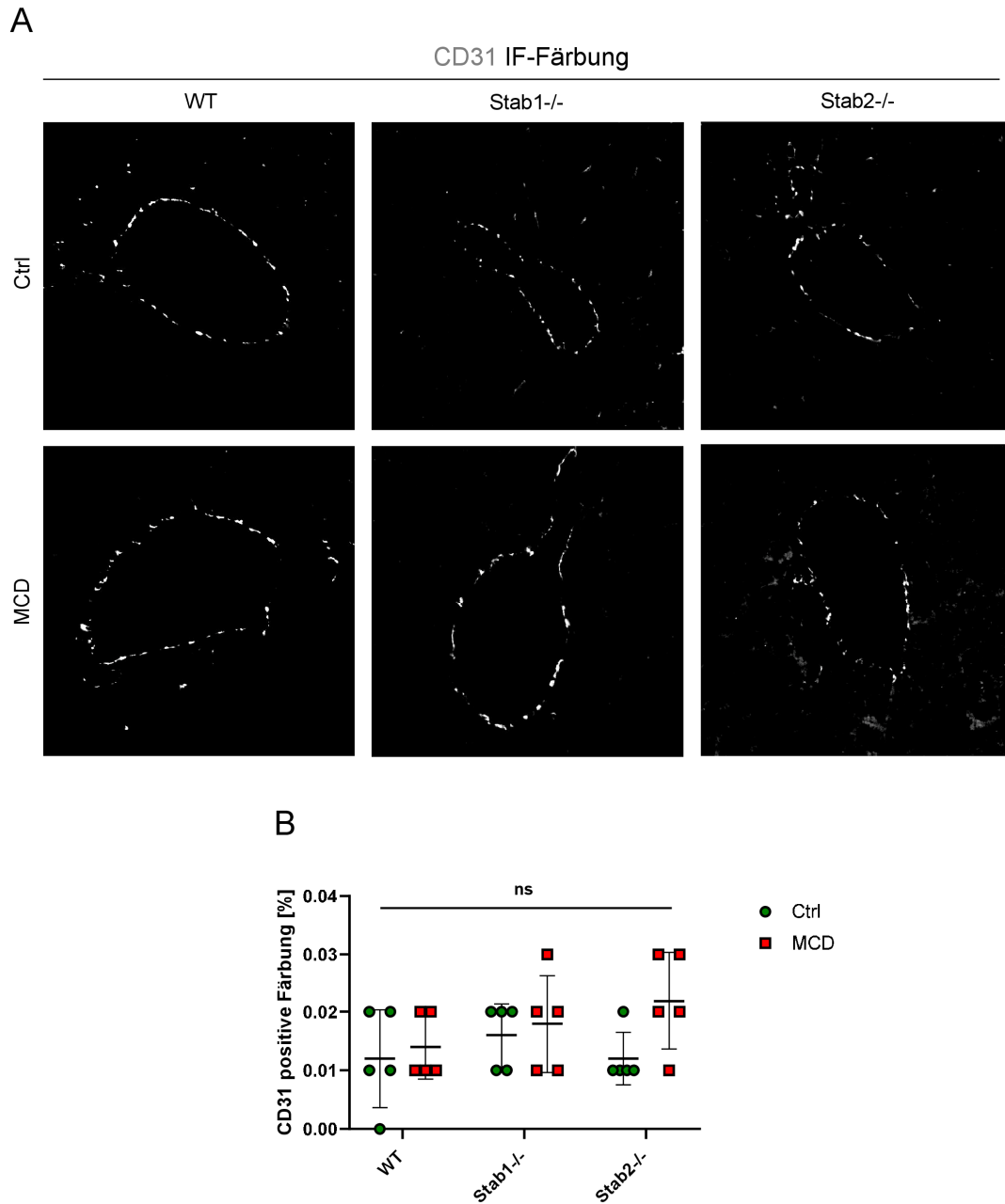


Abb. 29: IF-Färbung von CD31 um die zentralen Gefäße in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Gezeigt sind rausgezoomte Ausschnitte aus 20-fach aufgenommenen Aufnahmen. (B) Quantifizierung der CD31 positiven Färbung.

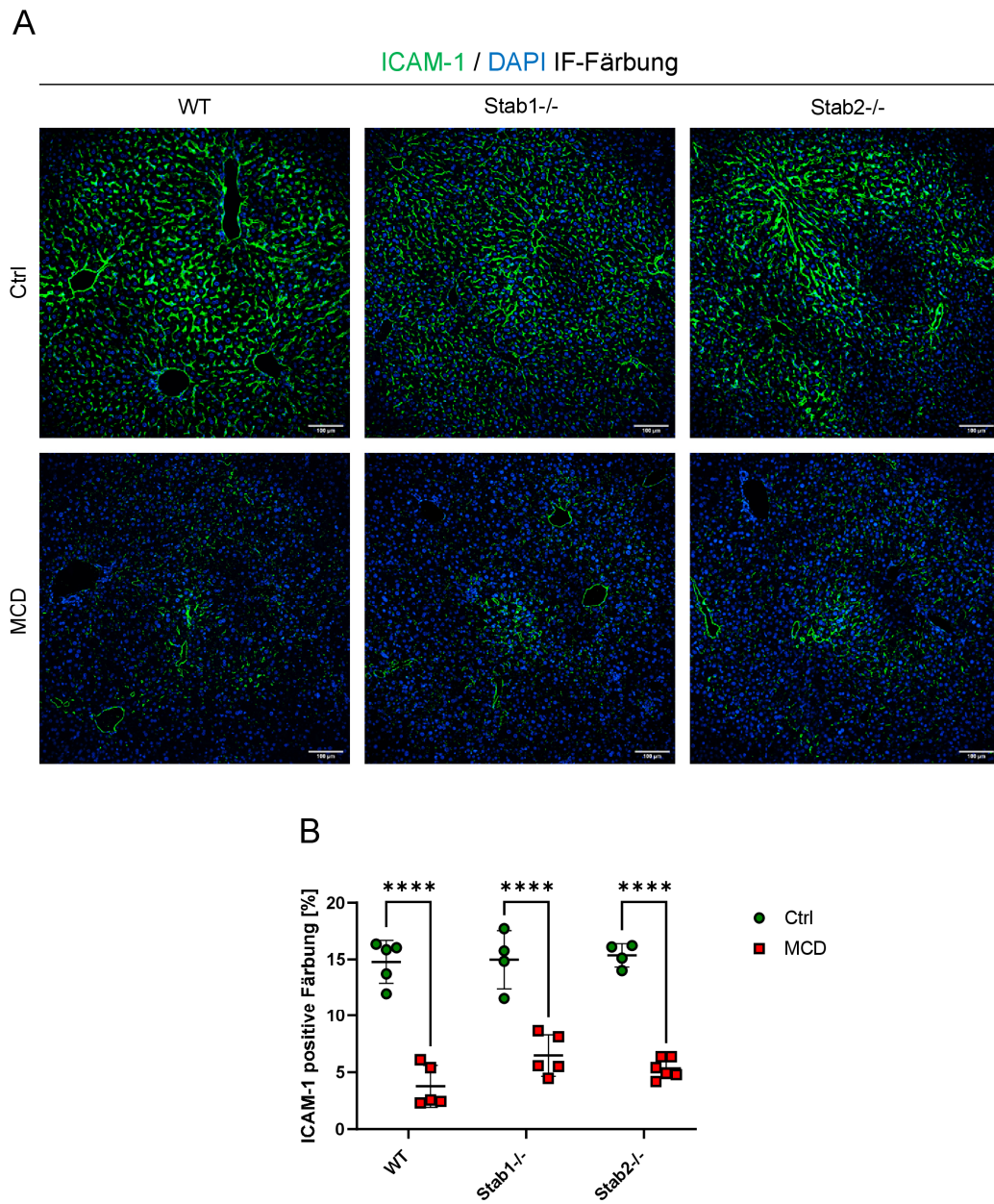


Abb. 30: IF-Färbung von ICAM-1 in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 100 µm. (B) Quantifizierung der ICAM-1 positiven Färbung.

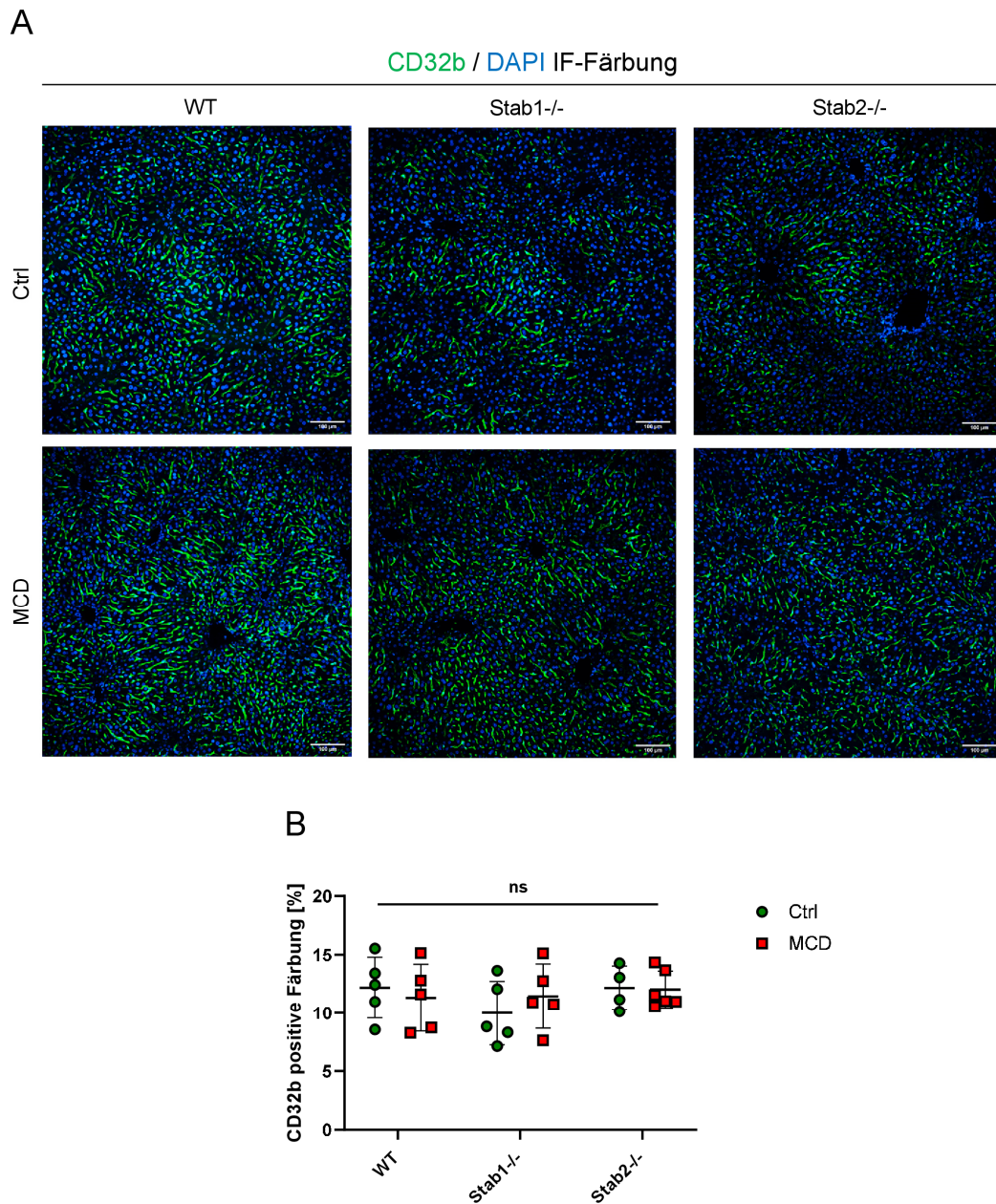


Abb. 31: IF-Färbung von CD32b in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabelle entspricht 100 μ m. (B) Quantifizierung der CD32b positiven Färbung.

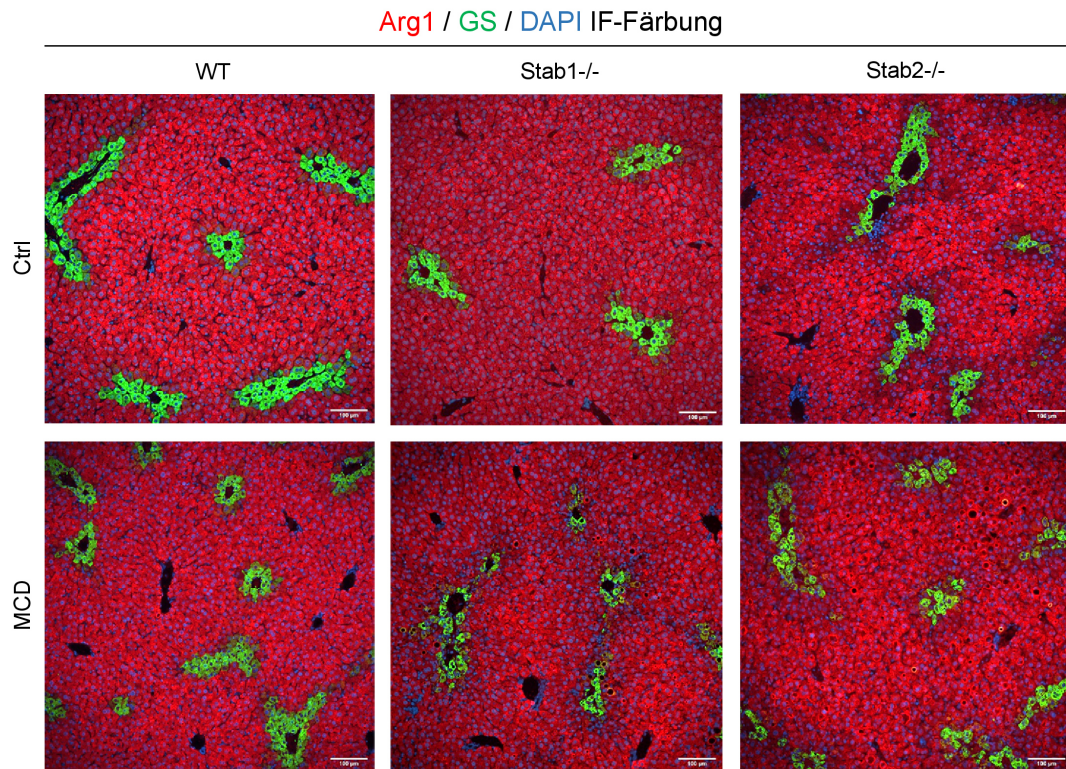


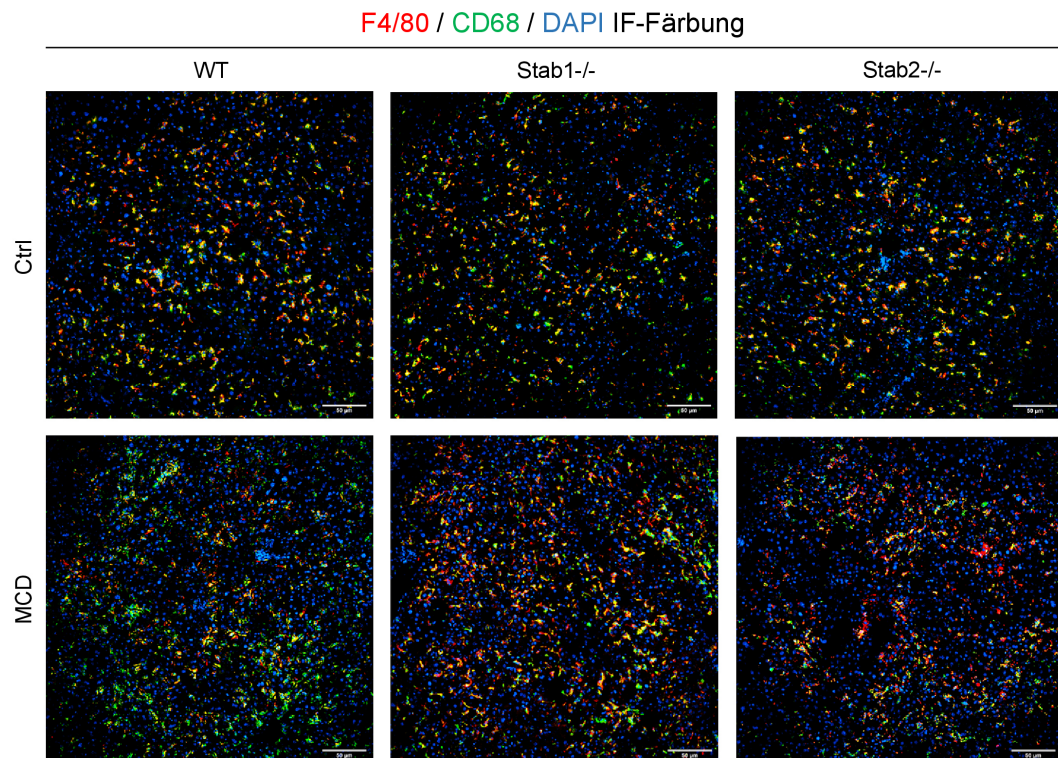
Abb. 32: IF-Färbung von Arg1 und GS in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm.

3.1.3 Einfluss auf Makrophagen

Die Ko-IF-Färbung der Makrophagenmarker F4/80 und CD68 zeigte bei beiden Markern ein Signal in den Kupffer-Zellen, zwischen den Hepatozyten. Zwischen den Genotypen und den beiden Fütterungsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen (s. Abb. 33).

Die IF-Färbung von CD11b zeigte in Stabilin-defizienten Mäusen eine leicht erhöhte, aber nicht signifikante, Infiltration CD11b positiver Zellen. Durch die Fütterung mit MCD kam es in WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen zu einer signifikant verstärkten Infiltration CD11b positiver Zellen (s. Abb. 34).

A



B

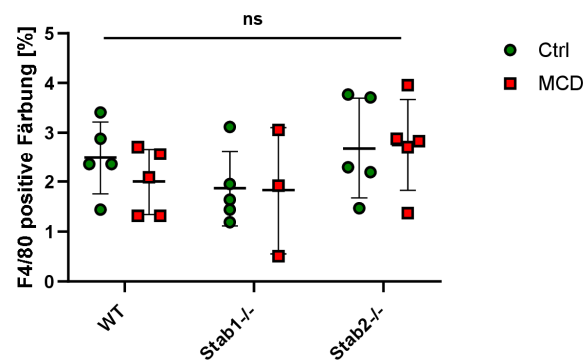


Abb. 33: IF-Färbung von F4/80 und CD68 in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μm . (B) Quantifizierung der F4/80 positiven Zellen.

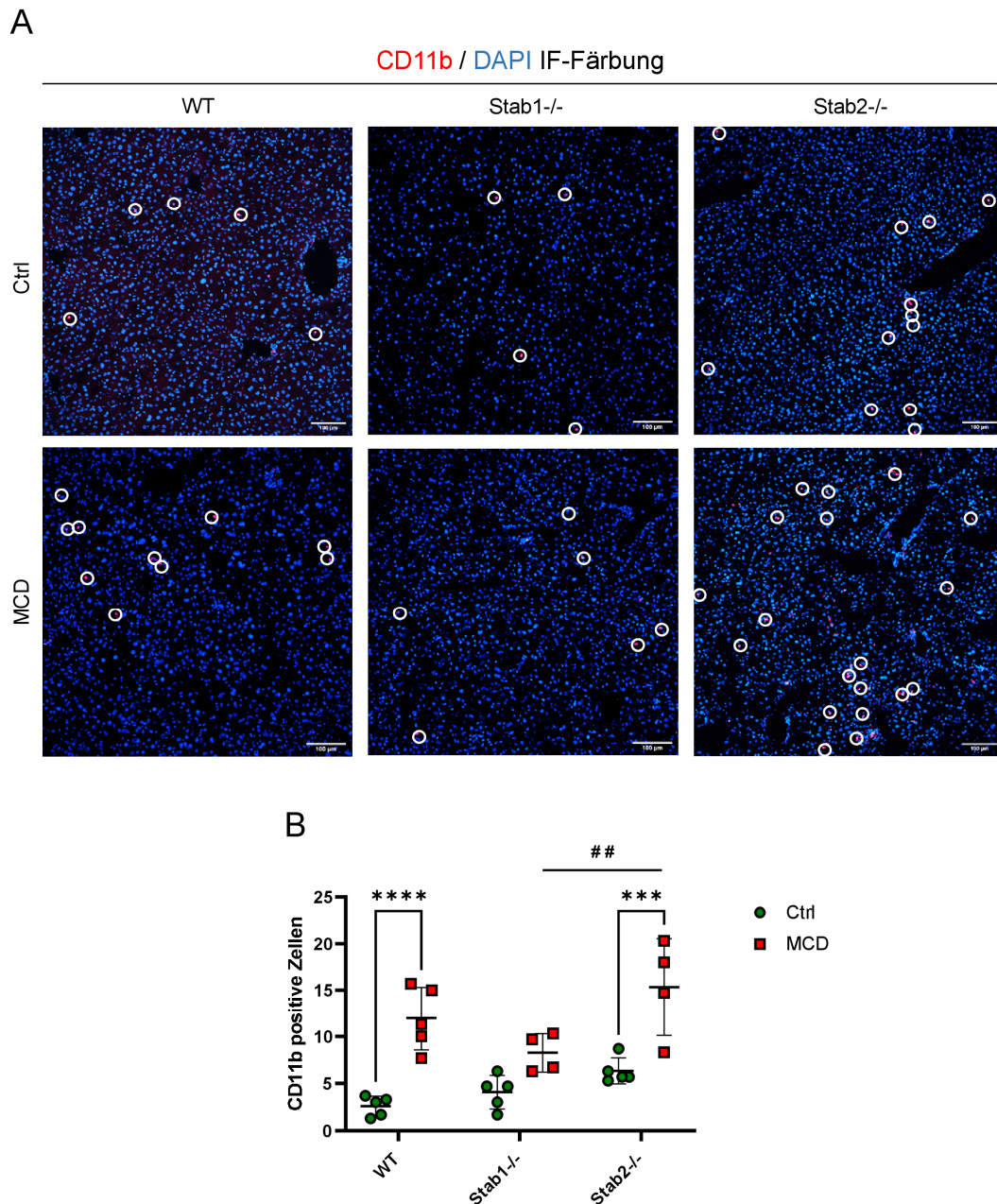


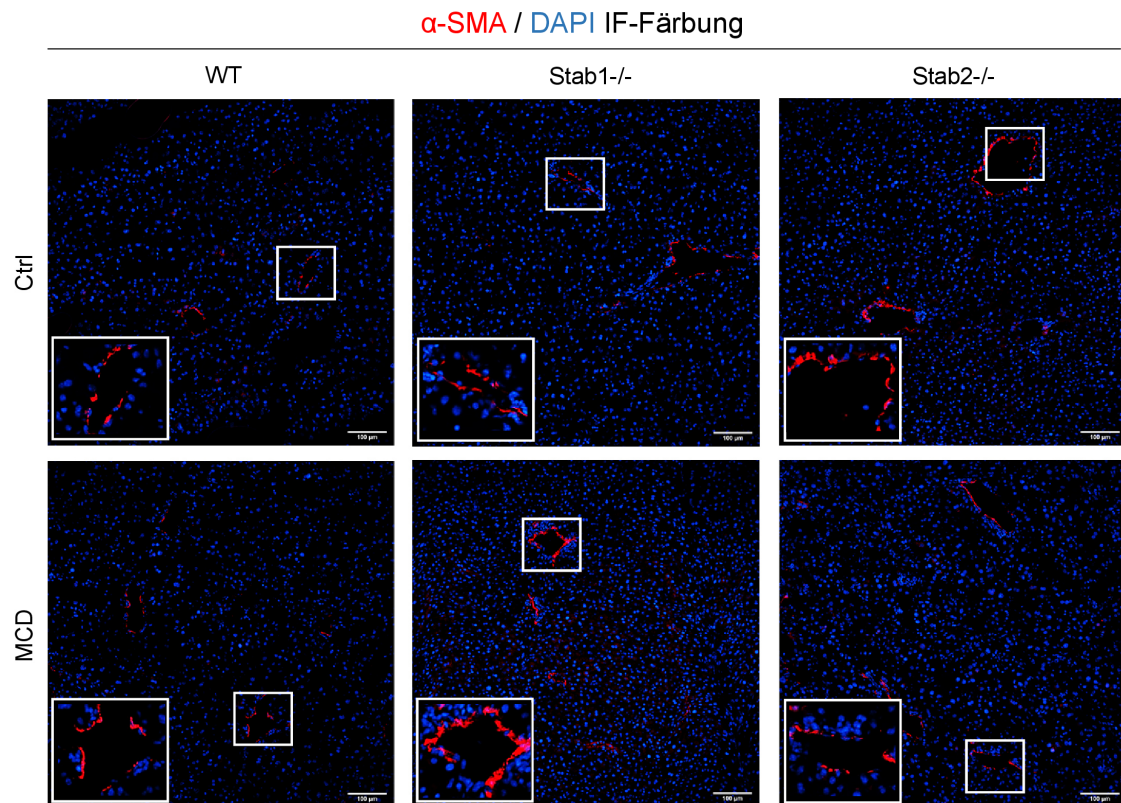
Abb. 34: IF-Färbung von CD11b in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Weiße Kreise markieren CD11b positive Zellen. Die Maßstableiste entspricht 100 μ m. (B) Quantifizierung der CD11b positiv gefärbten Zellen.

3.1.4 Einfluss auf Perizyten und hepatische Sternzellen

Um die Aktivierung hepatischer Sternzellen (HSCs) zu überprüfen, wurden IF-Färbungen mit α -SMA und Desmin und eine In Situ Hybridisierung von PDGFRB durchgeführt. Dabei waren α -SMA positive Zellen um die Zentralvenen herum zu sehen, zwischen den Genotypen und den Fütterungen waren keine Unterschiede erkennbar (s. Abb. 35). Die IF-Färbung mit Desmin zeigte eine breite Expression in den HSCs in

allen Genotypen und beiden Fütterungsmodellen (s. Abb. 36). In der In Situ Hybridisierung von PDGFRB zeigte sich ein Signal in den HSCs in allen drei Zonen der Leber. Zwischen den verschiedenen Gruppen waren keine Unterschiede zu sehen (s. Abb. 37).

A



B

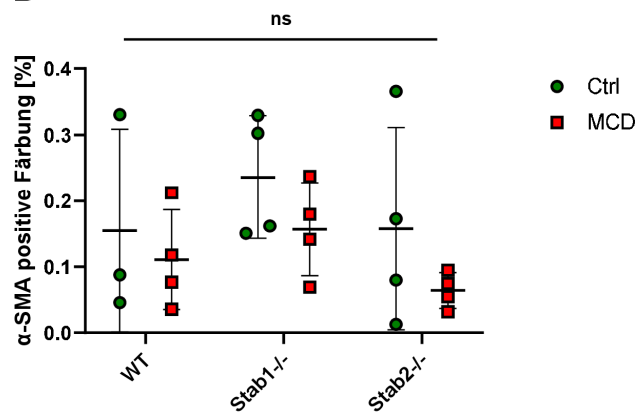
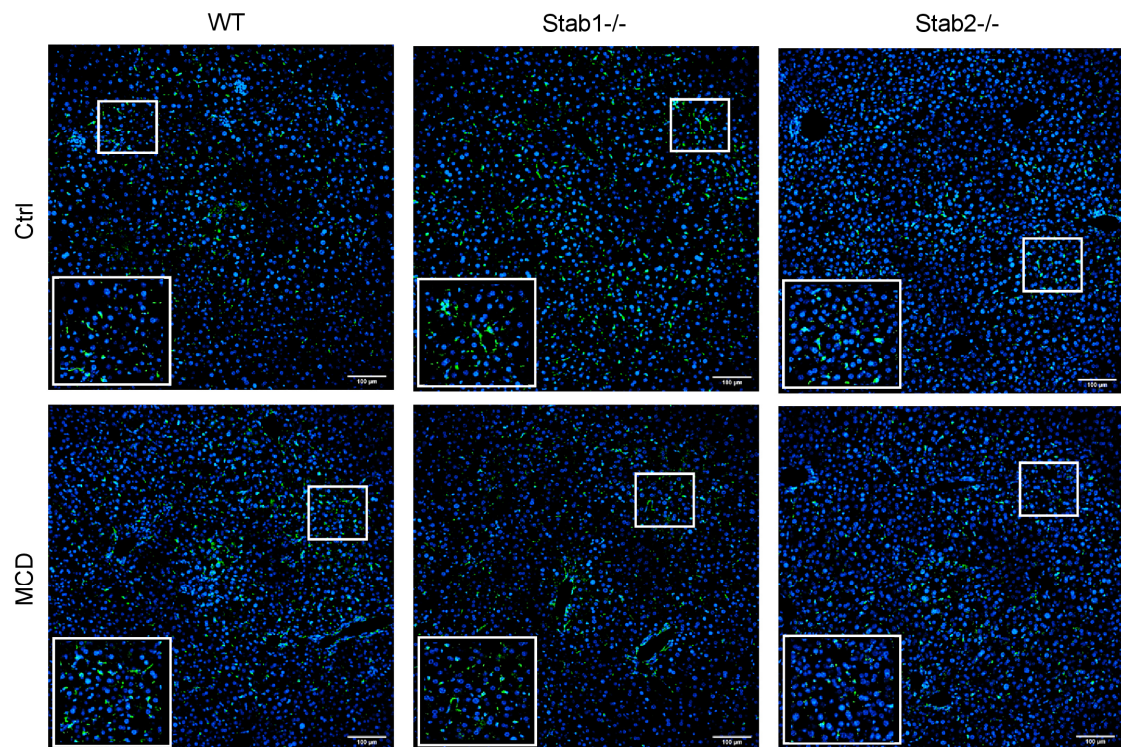


Abb. 35: IF-Färbung von α -SMA in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. (B) Quantifizierung der α -SMA positiven Färbung.

A

Desmin / DAPI IF-Färbung



B

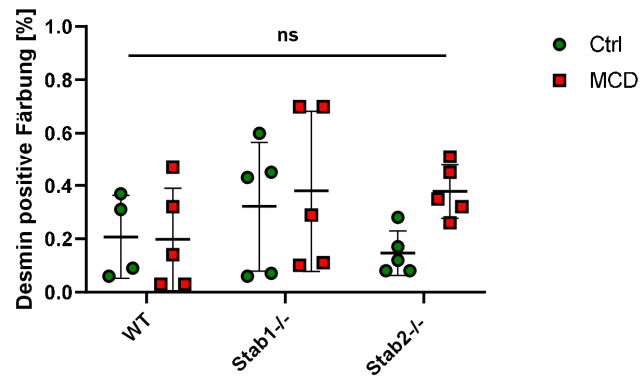
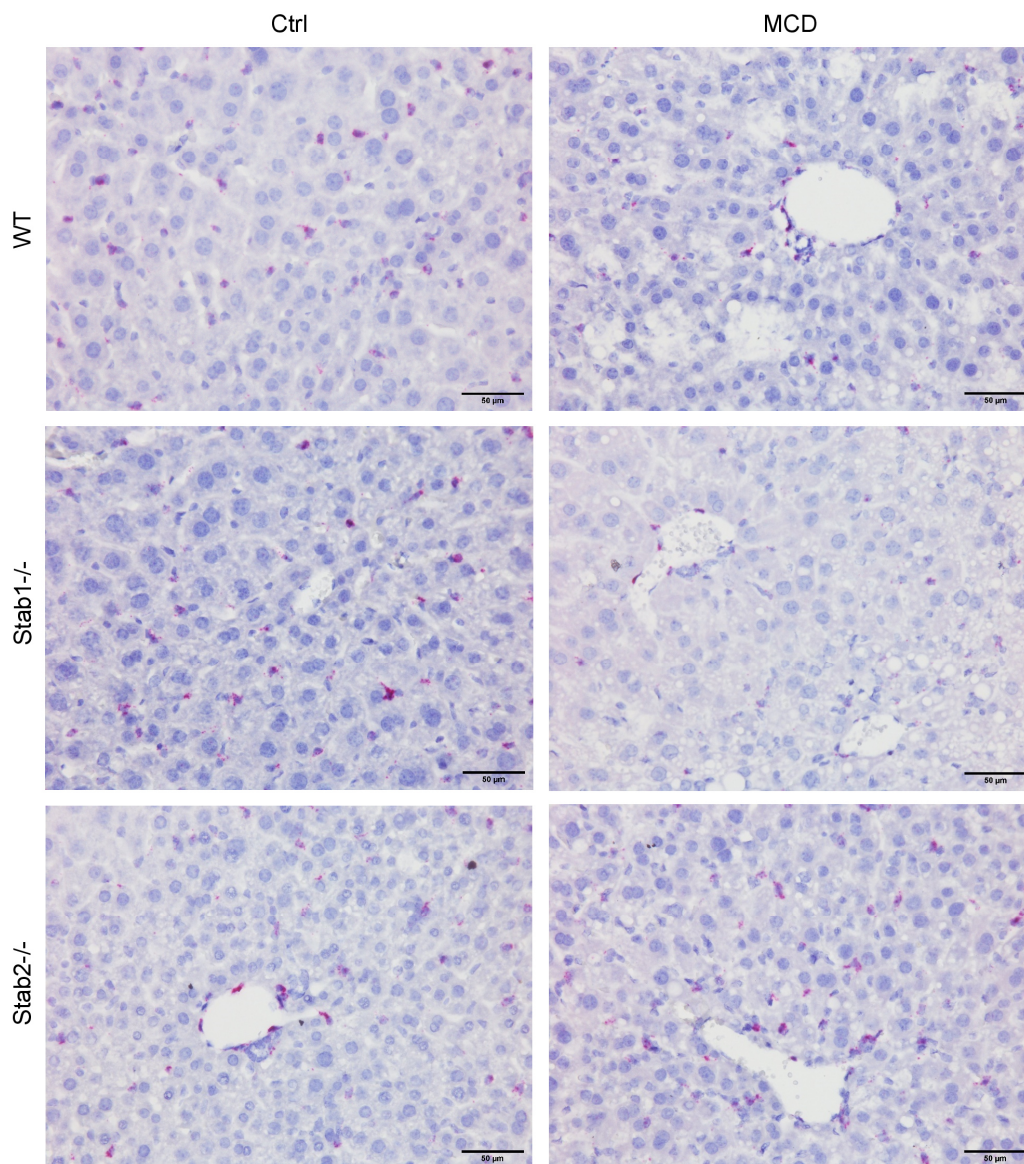


Abb. 36: IF-Färbung von Desmin in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabelle entspricht 100 µm. (B) Quantifizierung der Desmin positiven Färbung.

A

PDGFRB In Situ Hybridisierung



B

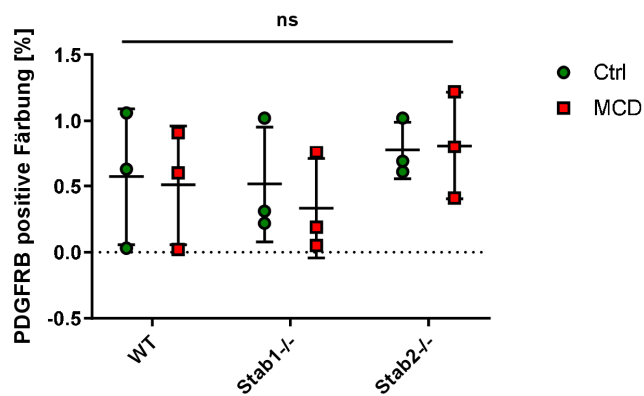


Abb. 37: In Situ Hybridisierung von PDGFRB in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der PDGFRB positiven Färbung.

3.1.5 Einfluss auf die Liganden TGFB β 1 und Postn

Die IF-Färbung von TGFB β 1 zeigte in den WT Mäusen, sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der MCD-gefütterten Gruppe ein Signal in den Zellen um die Zentralvene herum. In den Stabilin-defizienten Mäusen war das TGFB β 1 Signal sowohl in den perizentralen Zellen, als auch extrazellulär zu sehen. Bei den Kontrollmäusen zeigten die *Stab1*^{-/-} Mäuse ein leicht erhöhtes, aber nicht signifikantes, TGFB β 1 Signal im Vergleich zu den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen. Durch die Fütterung mit MCD kam es in allen drei Genotypen zu einer Zunahme des TGFB β 1 Signals, doch nur in *Stab1*^{-/-} Mäusen war diese Zunahme signifikant. Auch nach der Fütterung mit MCD zeigten die *Stab1*^{-/-} Mäuse das stärkste TGFB β 1 Signal, dieser Unterschied war signifikant im Vergleich zu den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen (s. Abb. 38).

Der Simple Western von Leberprotein zeigte ein ähnliches Ergebnis. Auch hier war zu sehen, dass *Stab1*^{-/-} Mäuse, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der MCD-gefütterten Gruppe, ein erhöhtes Level an TGFB β 1 aufwiesen. Nach der Fütterung mit MCD zeigten alle drei Genotypen ein signifikant erhöhtes TGFB β 1 Level im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen (s. Abb. 39 A – B).

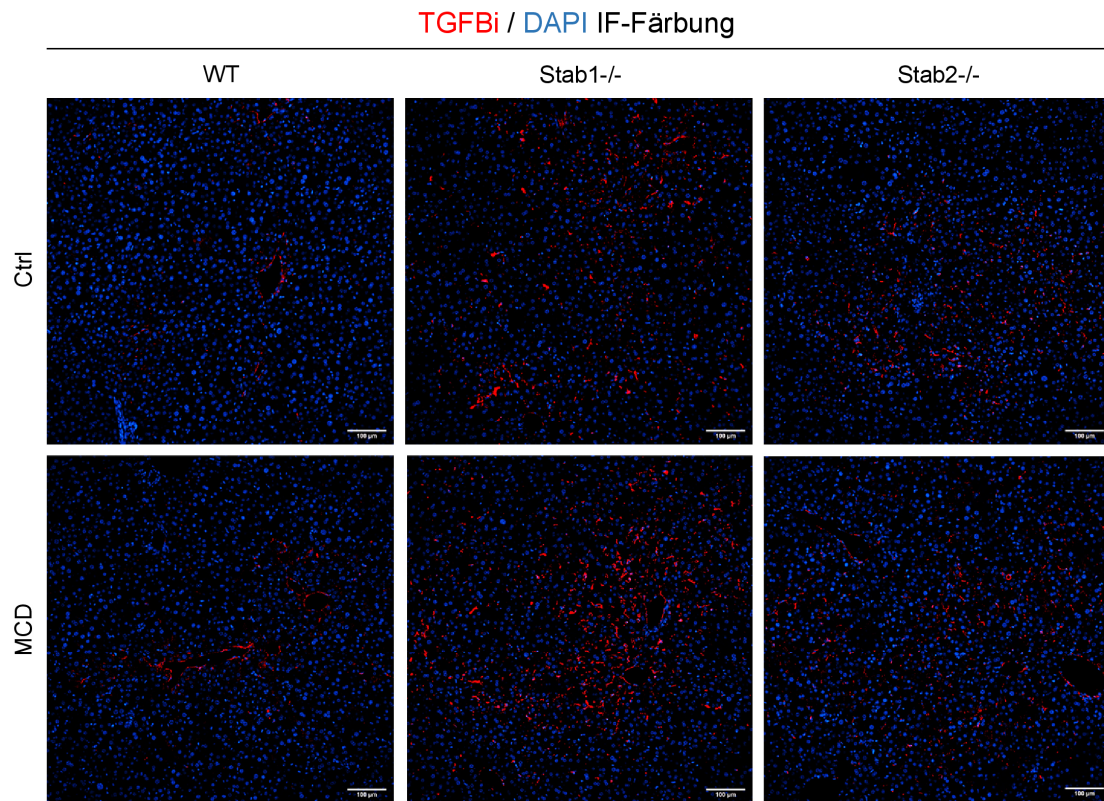
Der ELISA vom Plasma der Mäuse zeigte in der Kontrollgruppe, dass *Stab1*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen ein signifikant erhöhtes TGFB β 1 Level hatten. In der MCD-gefütterten Gruppe zeigten *Stab2*^{-/-} Mäuse ein leicht, aber nicht signifikant, erhöhtes TGFB β 1 Level im Vergleich zu den *Stab2*^{-/-} Kontrollmäusen (s. Abb. 39 C).

Die IF-Färbung von Postn zeigte in der Leber kein Signal. Als Positivkontrolle wurde dabei die Niere eines *Stab1/2*^{-/-} DKO mitgeführt, Glomeruli der Niere von DKO Mäusen zeigten ein positives Postn Signal (s. Abb. 40).

Der Simple Western von Leberprotein zeigte, dass in der Kontrollgruppe *Stab1*^{-/-} und *Stab2*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen ein leicht erhöhtes Level an Postn hatten, doch nur bei *Stab2*^{-/-} Mäusen war dieser Unterschied signifikant. Durch die Fütterung mit MCD kam es in den WT und *Stab1*^{-/-} Mäusen zu einer leichten, aber nicht signifikanten, Erhöhung des Postn Levels, bei den *Stab2*^{-/-} Mäusen kam es zu einer leichten, aber auch nicht signifikanten, Abnahme des Postn Levels (s. Abb 41 A – B).

Der ELISA vom Plasma der Mäuse zeigte in der Kontrollgruppe bei den *Stab1*^{-/-} Mäusen ein signifikant erhöhtes Level an Postn im Vergleich zu den WT Mäusen. Durch die Fütterung mit MCD kam es zu keinen signifikanten Unterschieden (s. Abb. 41 C).

A



B

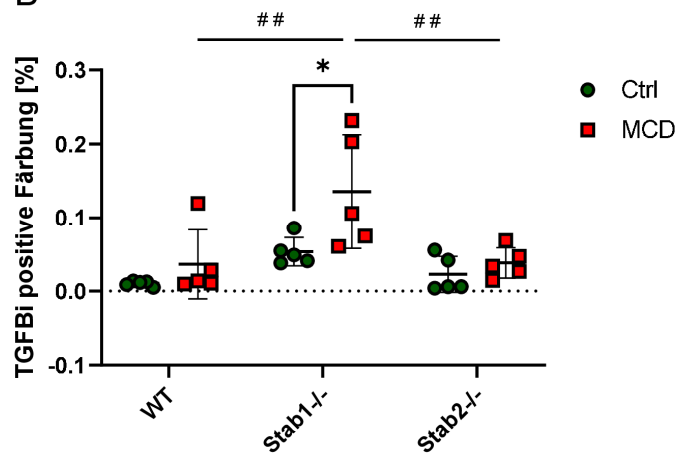


Abb. 38: IF-Färbung von TGFBi in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabelle entspricht 100 μ m. (B) Quantifizierung der TGFBi positiven Färbung.

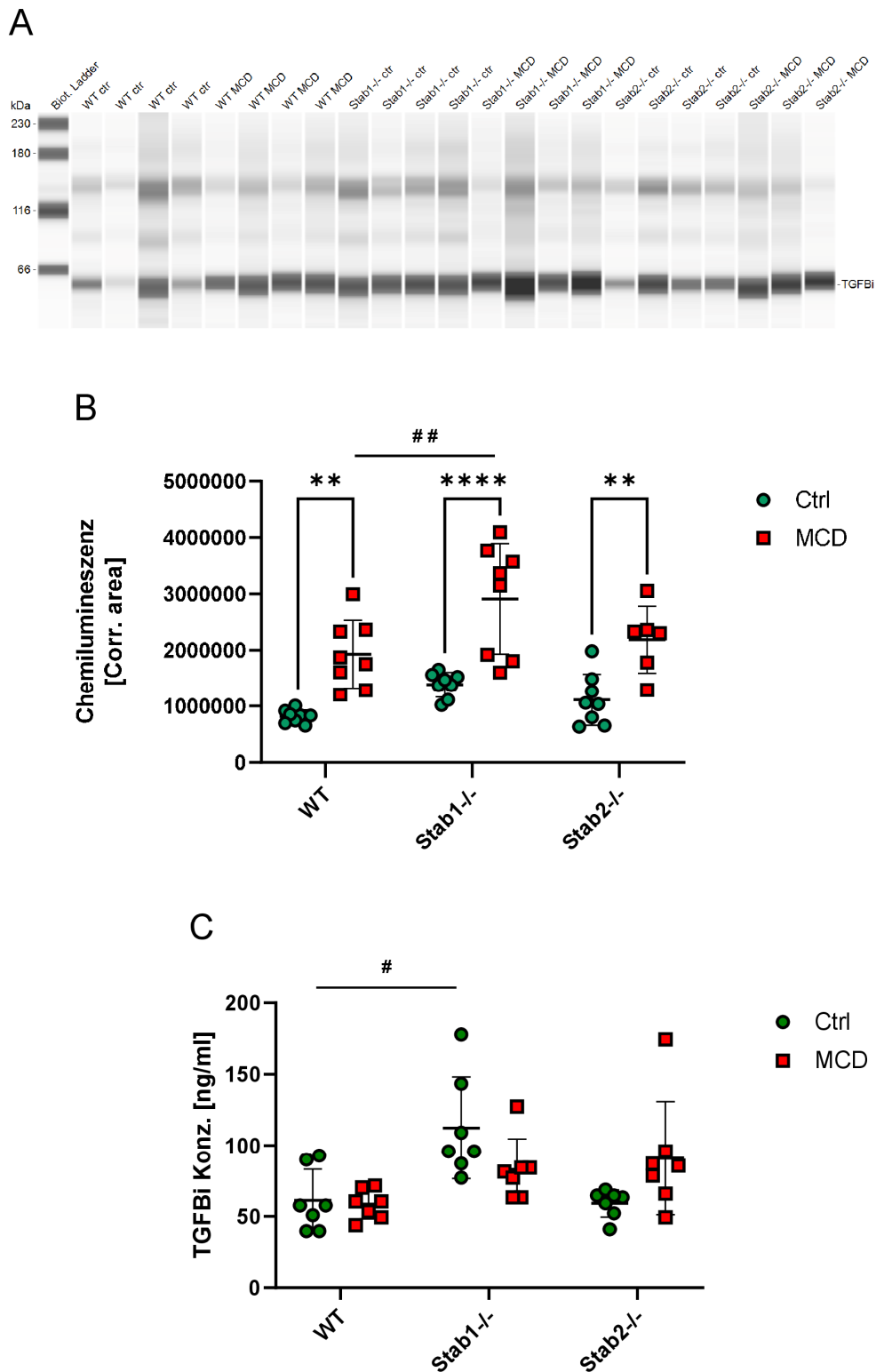


Abb. 39: TGFBi Analyse von Leberprotein und Plasma von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Beispiel für die Banden-Ansicht eines TGFBi Simple Western von Leberprotein. (B) Quantifizierung von TGFBi Simple Western, normiert auf die Gesamtproteinmenge. (C) Quantifizierung von TGFBi ELISA aus Plasma.

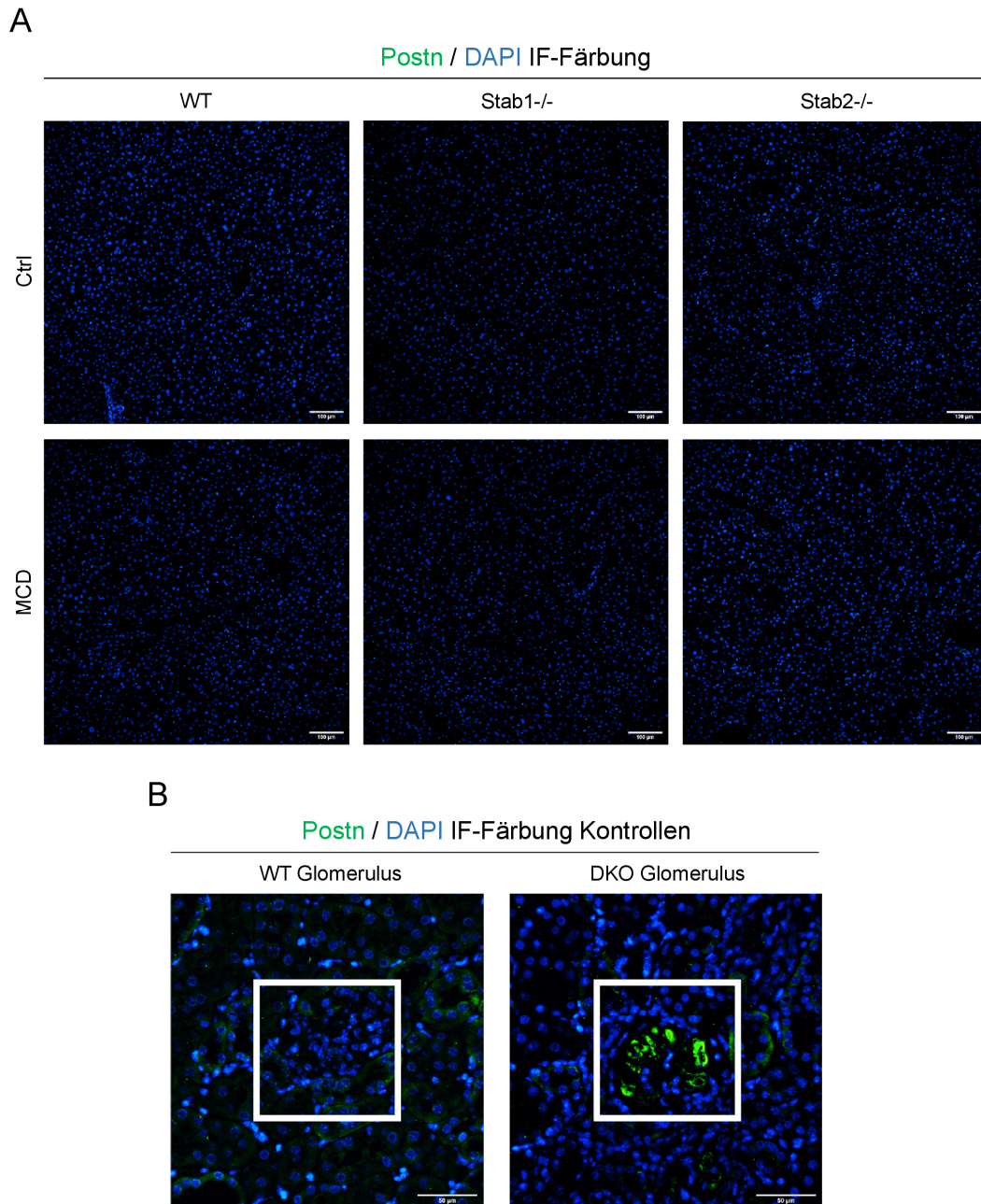


Abb. 40: IF-Färbung von Postn in der Leber von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und MCD-gefütterten Mäusen. Die Maßstabeleiste entspricht 100 μm . (B) IF-Färbung eines Glomerulus einer WT Maus (links) als Negativkontrolle und eines Glomerulus einer *Stabilin1/2*^{-/-} DKO Maus (rechts) als Positivkontrolle. Die Maßstabeleiste entspricht 50 μm .

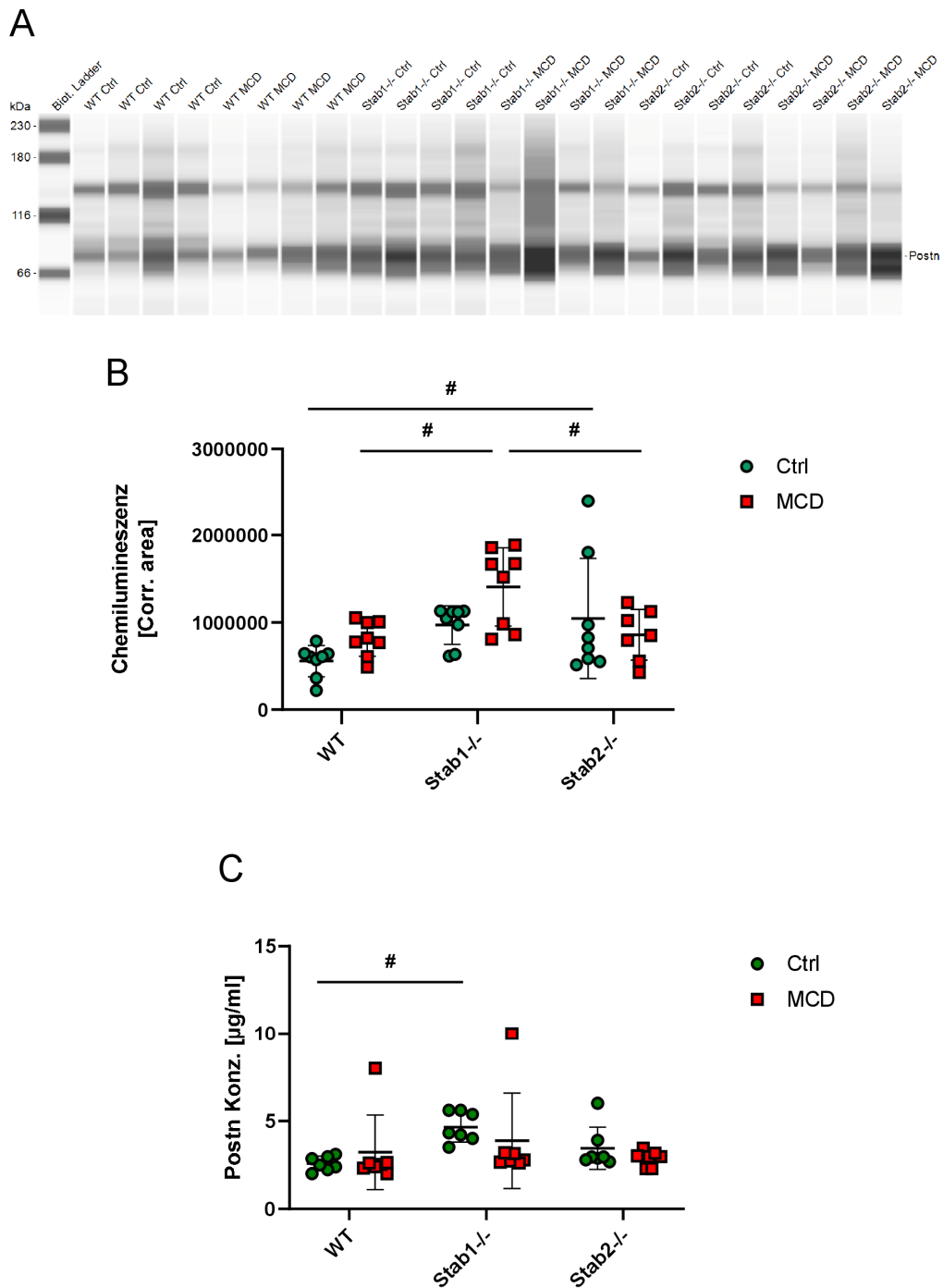


Abb. 41: Postn Analyse von Leberprotein und Plasma von MCD-gefütterten Mäusen. (A) Beispiel für die Banden-Ansicht eines Postn Simple Western von Leberprotein. (B) Quantifizierung von Postn Simple Western, normiert auf die Gesamtproteinmenge. (C) Quantifizierung von Postn ELISA aus Plasma.

3.2 CDAA Fütterung

3.2.1 Einfluss auf die Histologie der Leber

Bei der Fütterung mit Cholin-defizientem, Aminosäure-angepassten Futter (CDAA), zeigten die Mäuse aller drei Genotypen innerhalb der ersten 1 – 2 Wochen der Fütterung eine leichte Gewichtsabnahme im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Nach circa zwei Wochen war eine Stabilisierung des Gewichtes zu sehen, alle Mäuse zeigten dann einen normalen Gewichtsverlauf, der dem der Kontrollmäuse entsprach. Zwischen den Genotypen gab es im Gewichtsverlauf keine signifikanten Unterschiede, weder in der Kontrollgruppe, noch in der CDAA-gefütterten Gruppe (s. Abb. 42 A). Die Mäuse aller drei Genotypen die mit CDAA gefüttert wurden, zeigten ein signifikant höheres Leber- und Milzgewicht im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Zwischen den Genotypen war jedoch kein Unterschied zu sehen (s. Abb. 42 B – C).

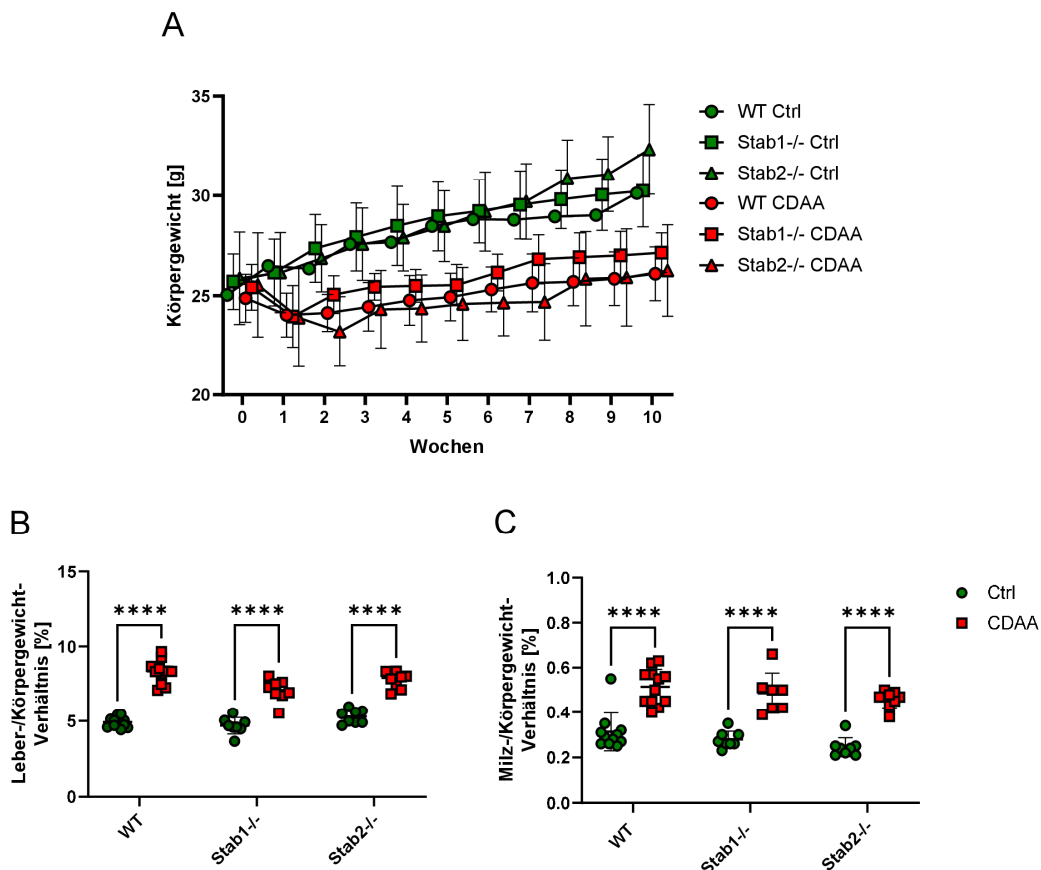


Abb. 42: Einfluss von CDAA auf den Gewichtsverlauf, sowie Leber- und Milzgewichte. (A) Gewichtsverlauf von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen. (B) Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen. (C) Verhältnis von Milz- zu Körpergewicht von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen.

Neben der Zunahme des Lebergewichtes, kam es durch die Fütterung mit CDAA auch zu einer starken Verfettung der Leber, dies zeigte sich makroskopisch durch die helle Farbe der Leber nach der Fütterung im Vergleich zu den Kontrolllebern (s. Abb. 43).

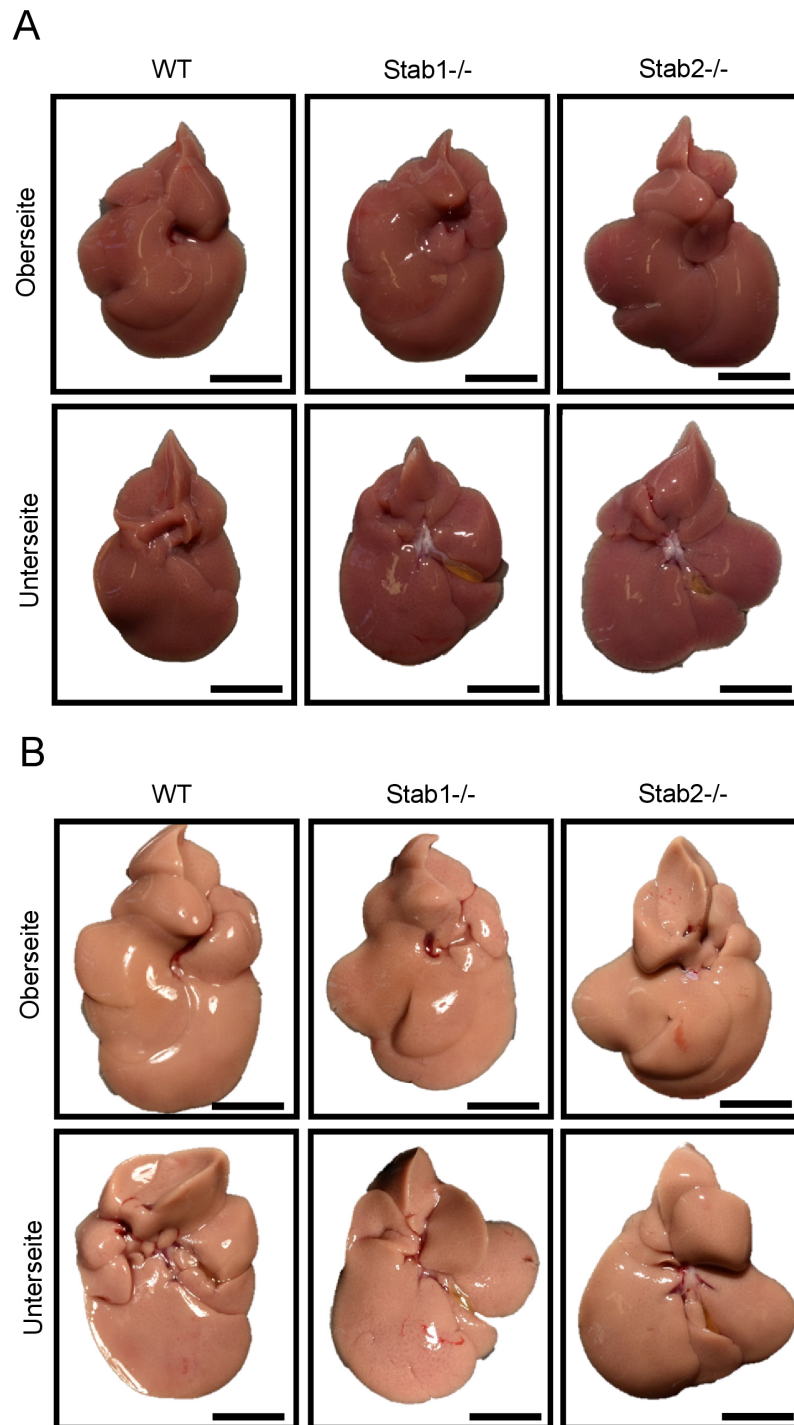


Abb. 43: Makroskopische Veränderung der Leber durch CDAA Fütterung. (A) Ober- und Unterseite der Lebern von Kontrollmäusen aller drei Genotypen. (B) Ober- und Unterseite der Lebern von CDAA-gefütterten Mäusen aller drei Genotypen. Die Maßstabelle entspricht 1 cm.

Die histologischen Färbungen H&E und Öl-Rot O der Leber zeigten nach der Fütterung mit CDAA eine starke Steatose in der Leber, was sich in beiden Färbungen in der Größe der Lipidtröpfchen in den Hepatozyten zeigte (s. Abb. 44 – 45).

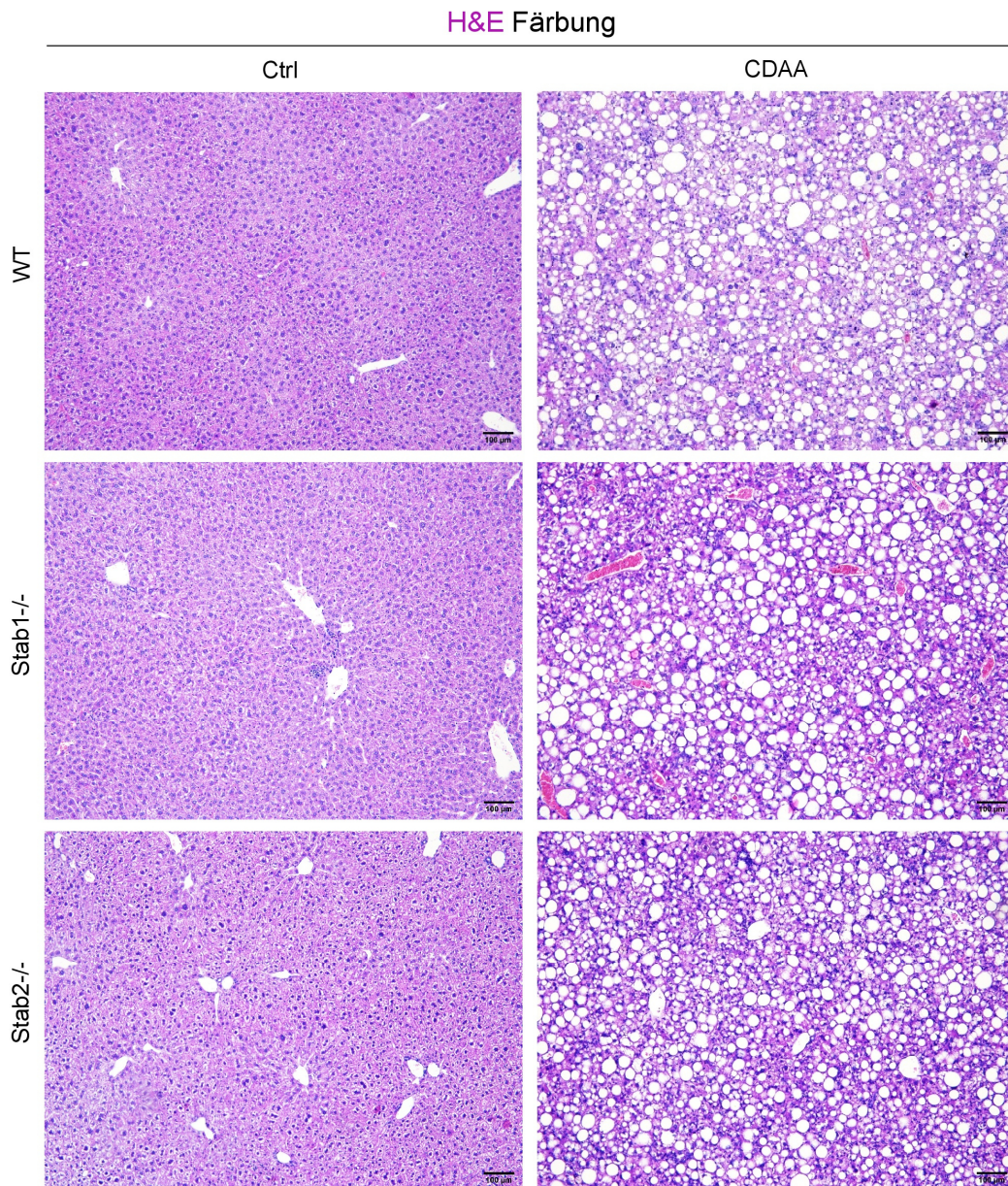
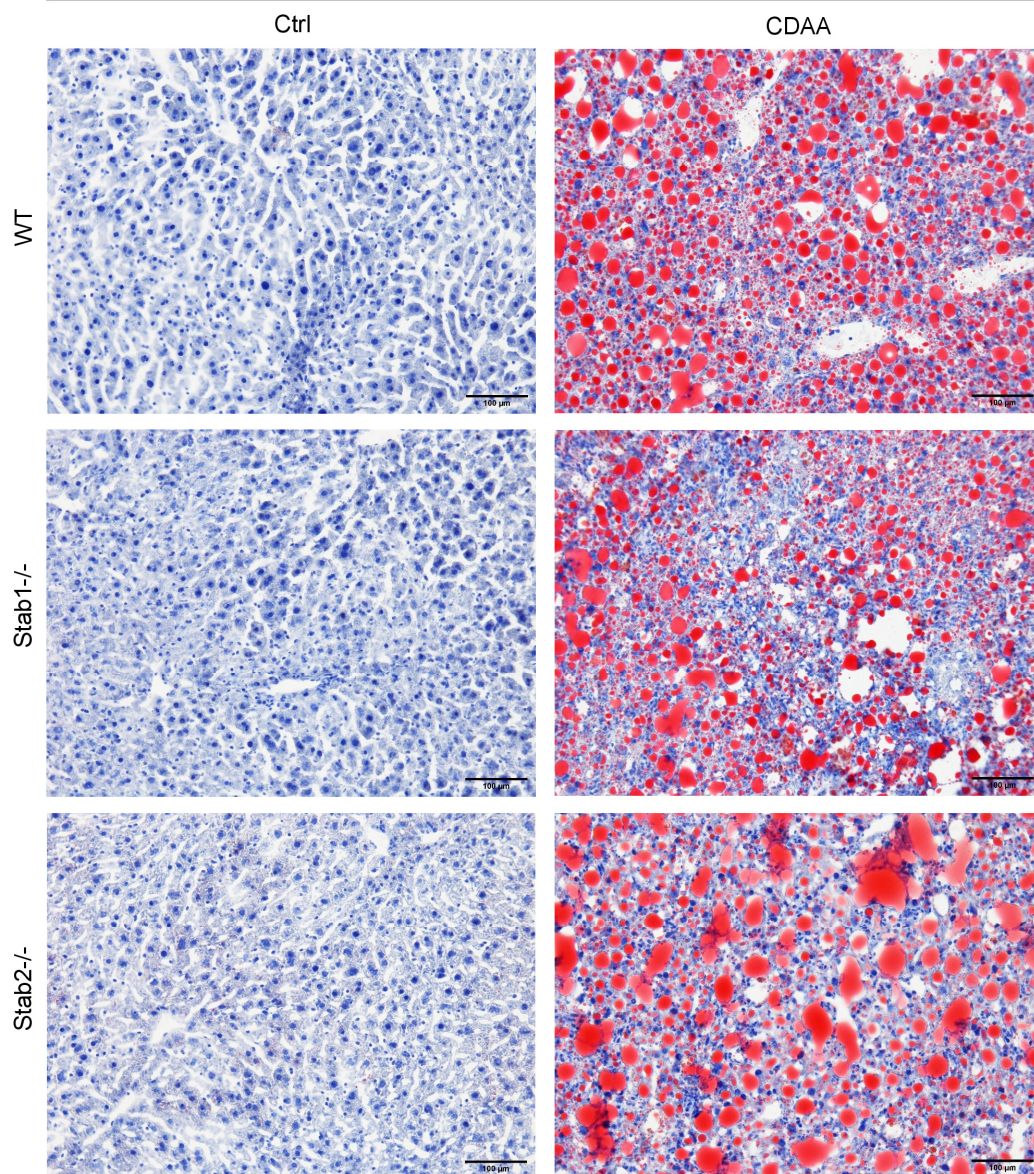


Abb. 44: H&E Färbung der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 100 µm.

A

Öl-Rot O Färbung



B

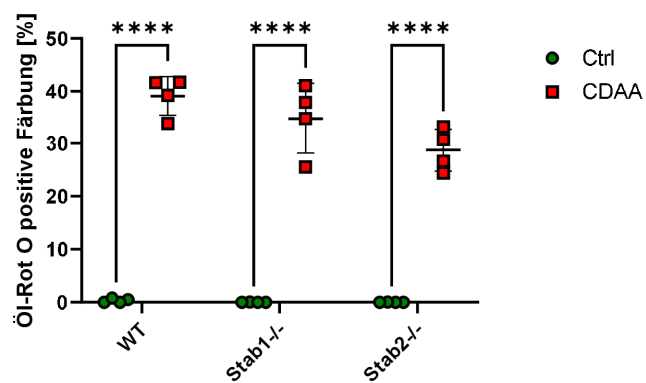


Abb. 45: Öl-Rot O Färbung der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 100 µm. (B) Quantifizierung der Öl-Rot O positiven Färbung.

Die Sirius Rot Färbung zeigte in der Kontrollgruppe bei den *Stab1*^{-/-} Mäusen ein signifikant stärkeres Signal als in den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen. Nach der CDAA Fütterung stieg das Sirius Rot Signal in allen drei Genotypen signifikant an, allerdings zeigte sich zwischen den Genotypen kein Unterschied mehr (s. Abb. 46 A – B).

Die Quantifizierung des Kollagenassays zeigte in der Kontrollgruppe einen signifikant höheren Kollagengehalt in beiden Stabilin-KOs im Vergleich zu den WT Mäusen. Durch die Fütterung mit CDAA stieg in allen drei Genotypen der Kollagengehalt in der Leber signifikant an. Nach der Fütterung mit CDAA zeigten alle drei Genotypen ein ähnlich hohes Level an Kollagen (s. Abb. 46 C).

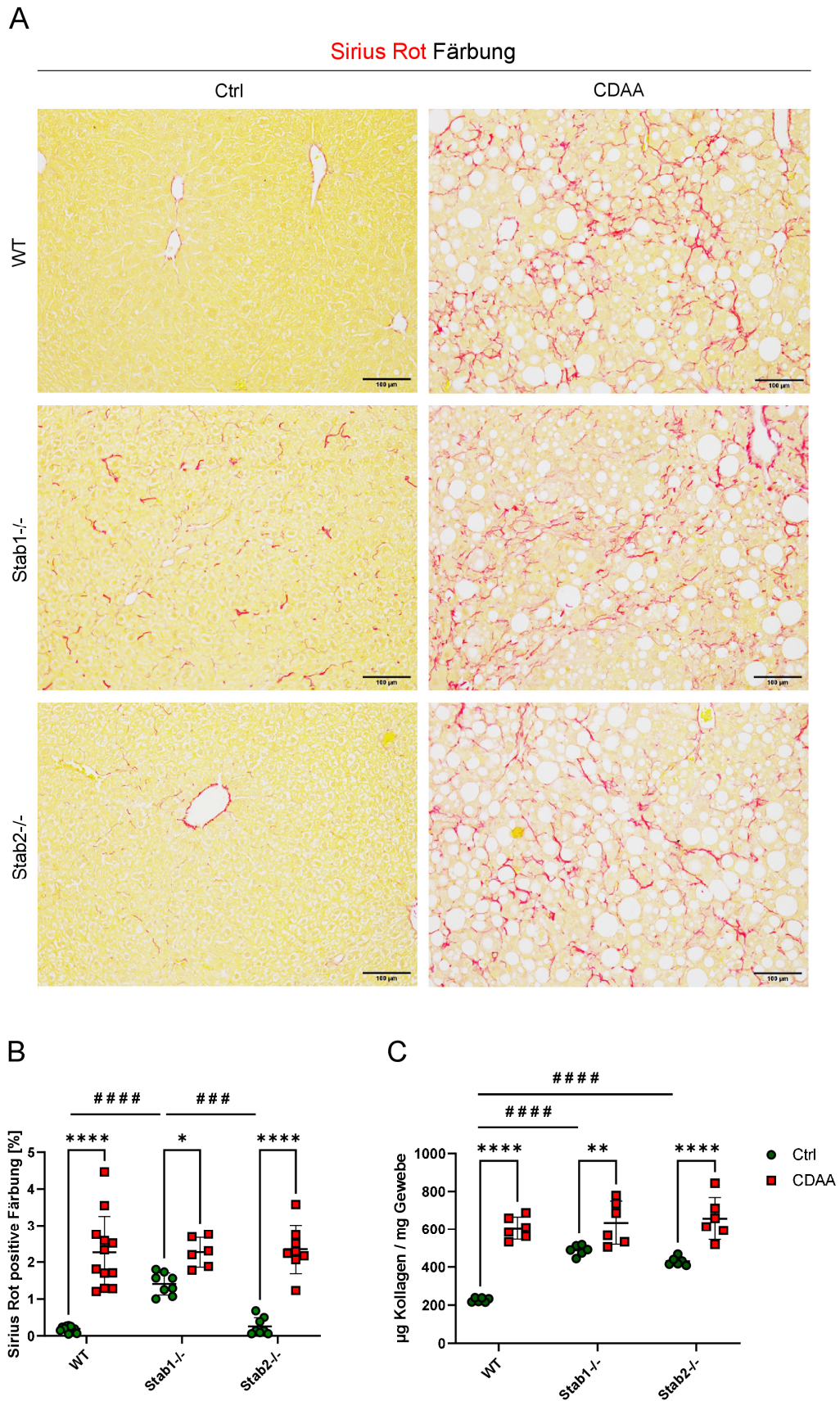


Abb. 46: Kollagenbestimmung in der Leber von CDA4-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDA4-gefütterten Mäusen mit Sirius Rot gefärbt. Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm. (B) Quantifizierung der Sirius Rot positiven Färbung. (C) Quantifizierung des Kollagenassays von Lebergewebe.

3.2.2 Einfluss auf Leberendothelzellen

Die IHC-Färbung von Emcn zeigte in den Kontrollmäusen und den CDAA-gefütterten Mäusen ein positives Signal auf den Endothelzellen der Zentralvene und den perizentralen LSECs. CDAA-gefütterte Mäuse zeigten ein deutlich geringeres Emcn Signal, als die Kontrollmäuse. Zwischen den Genotypen der jeweiligen Fütterungsgruppen waren keine Unterschiede erkennbar (s. Abb. 47). Die Western Blots von Emcn zeigten in allen drei Genotypen eine starke Heterogenität in der Intensität des Emcn Signals. Bezogen auf die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen zeigten sich auch keine Unterschiede zwischen den Genotypen oder den Fütterungsgruppen (s. Abb. 48).

Die IHC-Färbung von Lyve-1 zeigte in den Kontrollmäusen vor allem ein Signal in den periportalen LSECs der Zone 2. Zwischen den Genotypen zeigte sich in der Kontrollgruppe kein Unterschied. Über die Lokalisation des Lyve-1 Signals in den CDAA-gefütterten Mäusen konnte aufgrund des starken Hintergrundes der Färbung keine Aussage getroffen werden, die Quantifizierung der Färbung war ebenfalls nicht möglich. Rein optisch, waren keine morphologischen Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen (s. Abb. 49).

Die IHC-Färbung von CD31 zeigte in allen Mäusen ein schwaches Signal auf den kontinuierlichen Endothelien der Zentralvene, dabei war zwischen den Genotypen oder den Fütterungen kein Unterschied zu sehen (s. Abb. 50).

Die IHC-Färbung von CD32b zeigte in allen Mäusen ein Signal auf den LSECs aller drei Zonen. In den Kontrollmäusen waren zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede zu sehen, in den CDAA-gefütterten Mäusen jedoch, zeigten *Stab1*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen ein schwächeres Signal, dabei war der Unterschied zu den *Stab2*^{-/-} Mäusen signifikant (s. Abb. 51 A – C). In der CDAA-gefütterten Gruppe zeigten alle Genotypen deutlich weniger CD32b Signal als die jeweilige Kontrollgruppe (s. Abb. 51 D).

Die IHC-Färbung von ICAM-1 zeigte in allen Genotypen und in beiden Fütterungsgruppen ein positives Signal in den LSECs aller drei Leberzonen. Zwischen den Genotypen innerhalb der jeweiligen Fütterungsgruppe und auch zwischen den beiden Fütterungen waren keine Unterschiede in der Signalintensität zu sehen (s. Abb. 52).

In der Ko-IF-Färbung von GS und Arg1, war das Arg1 Signal in allen Hepatozyten, außer den perizentralen Hepatozyten, zu sehen und das GS Signal zeigte sich in allen perizentralen Hepatozyten. Zwischen den Genotypen oder den beiden Fütterungen zeigten sich keine Unterschiede (s. Abb. 53).

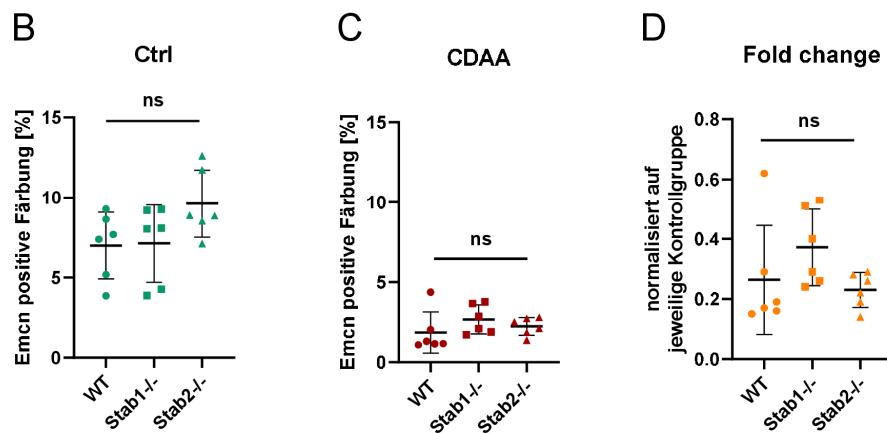
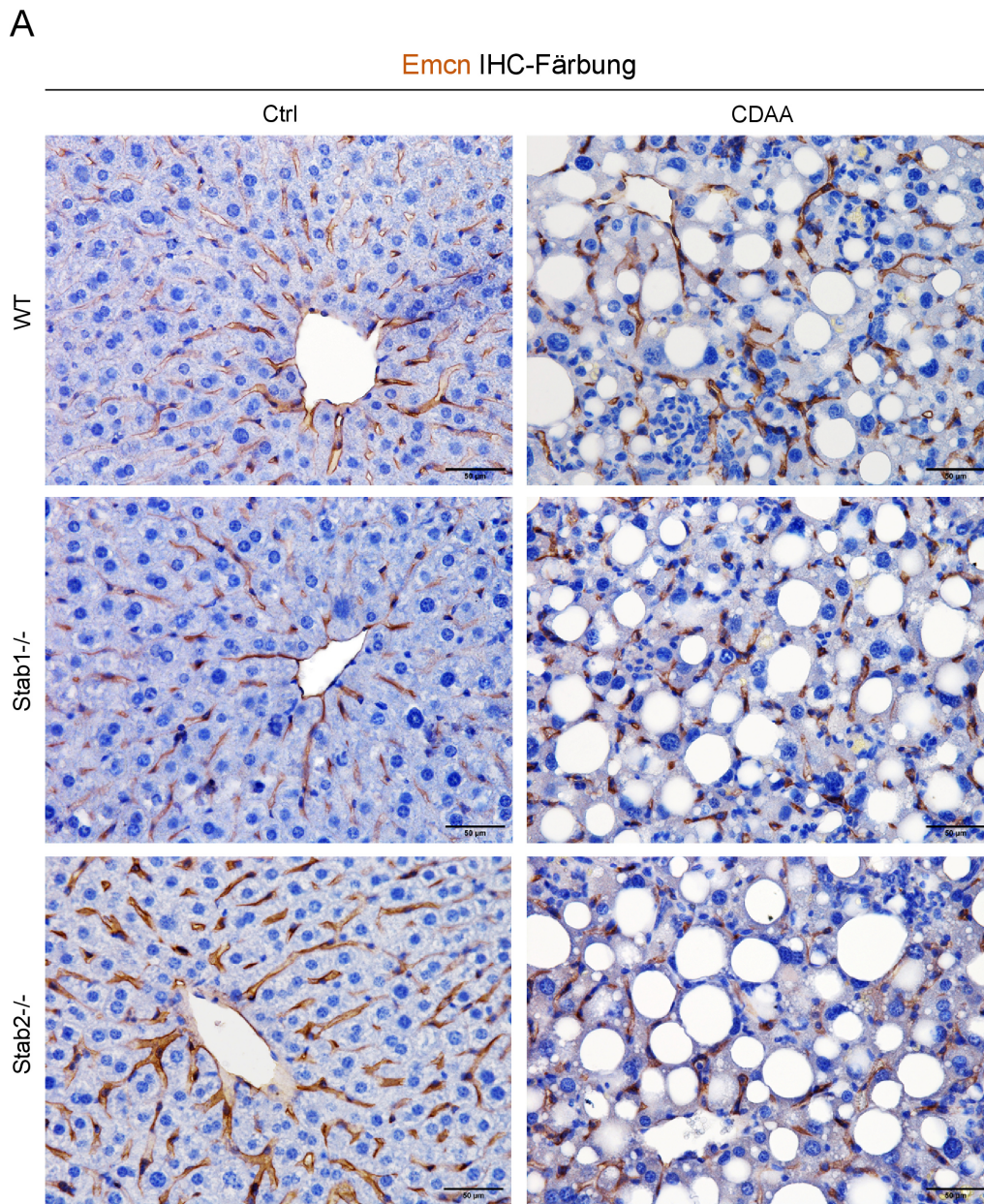


Abb. 47: IHC-Färbung von Emcn in der Leber von CDA4-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDA4-gefütterten Mäusen. Die Maßstabelleiste entspricht 50 μ m. Quantifizierung der Emcn positiven Färbung (B) der Kontrollmäuse und (C) der CDA4-gefütterten Mäuse. (D) Fold change der Emcn positiven Färbung.

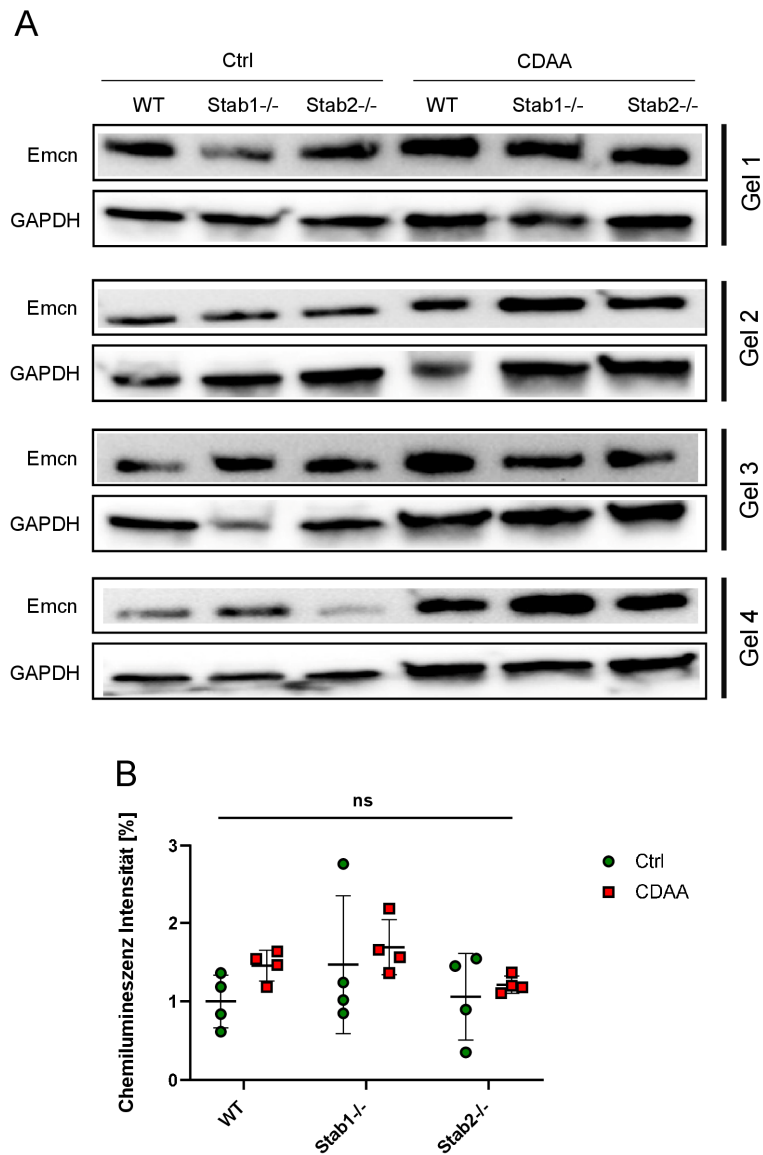


Abb. 48: Emcn Western Blot von Leberprotein von CDAA-gefütterten Mäusen. (A) Western Blots von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen, für jeden Blot wurden unterschiedliche Mäuse verwendet. (B) Quantifizierung der vier Western Blots, die Werte wurden auf den Mittelwert der WT Kontrollmäuse normiert.

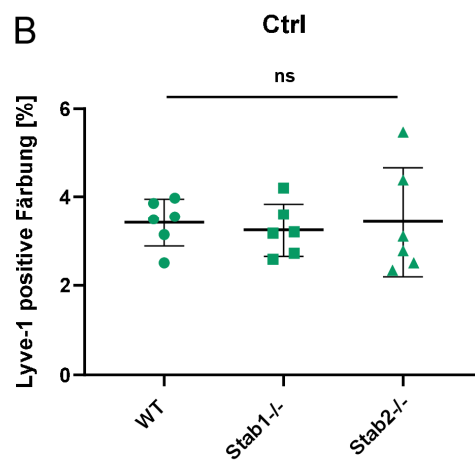
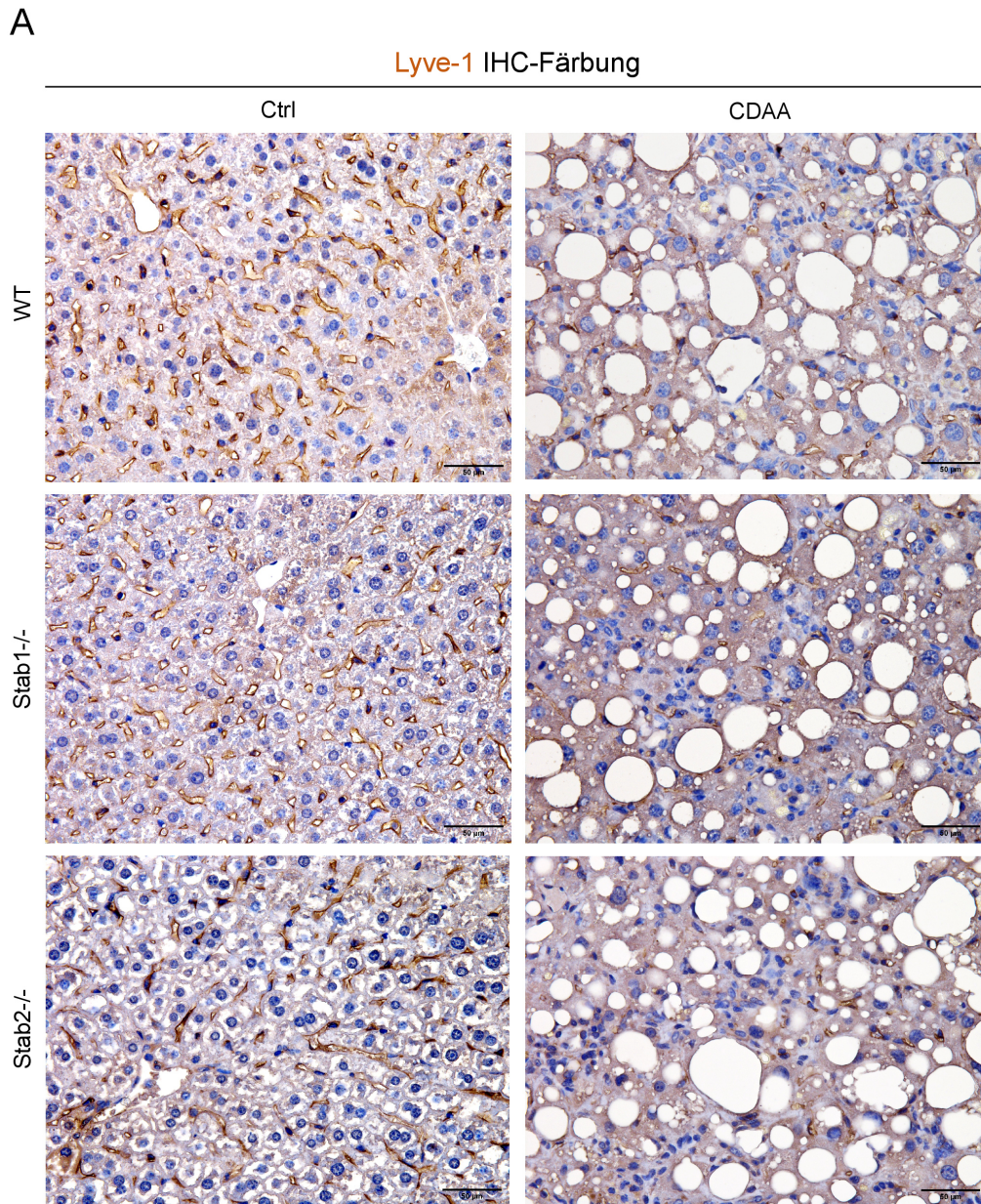


Abb. 49: IHC-Färbung von Lyve-1 in der Leber von CDA4-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDA4-gefütterten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der Lyve-1 positiven Färbung von Kontrollmäusen.

A

CD31 IHC-Färbung

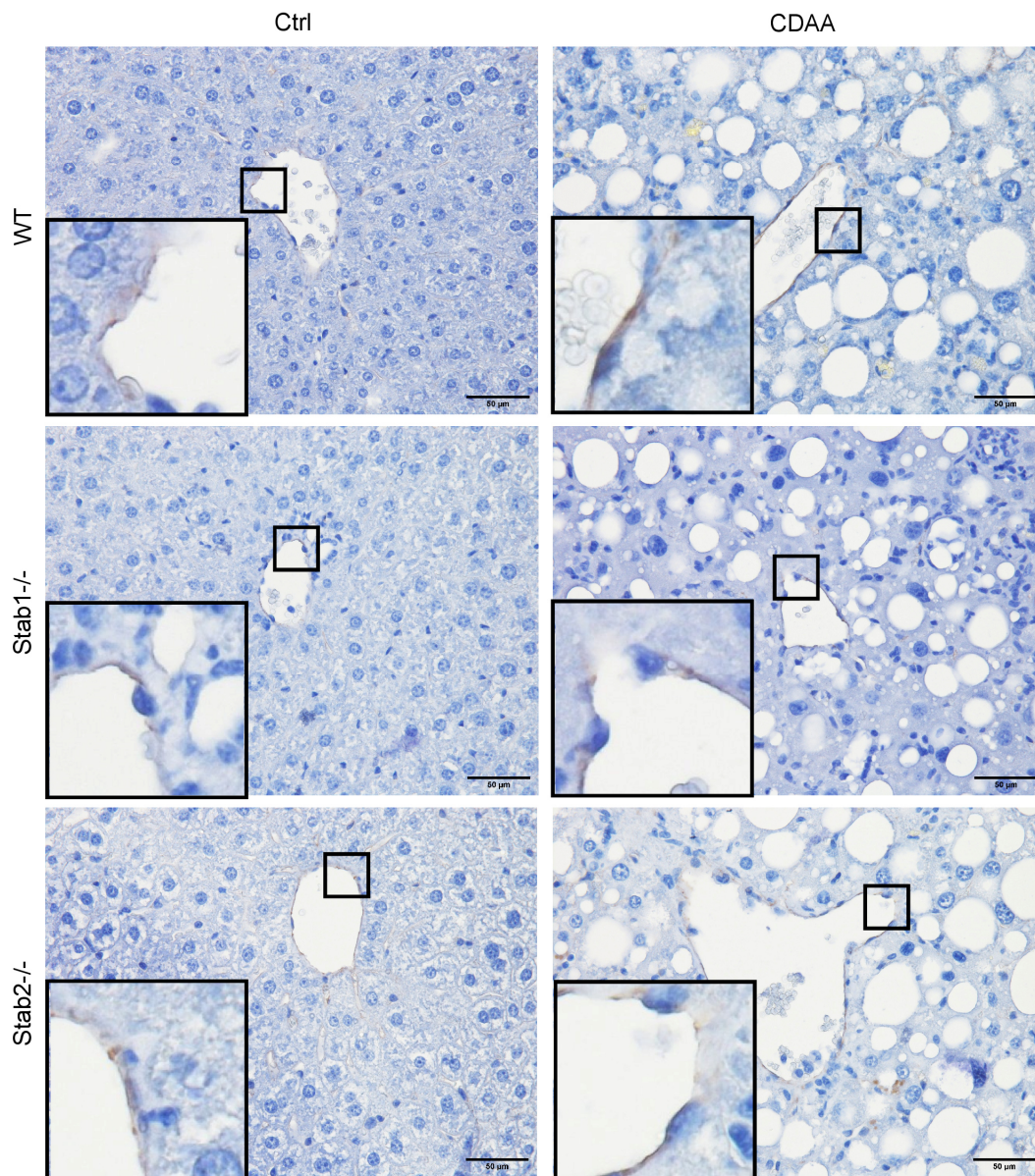


Abb. 50: IHC-Färbung von CD31 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen. Schwarze Kästen stellen die vergrößerten Bereiche im Bild dar. Die Maßstableiste entspricht 50 µm.

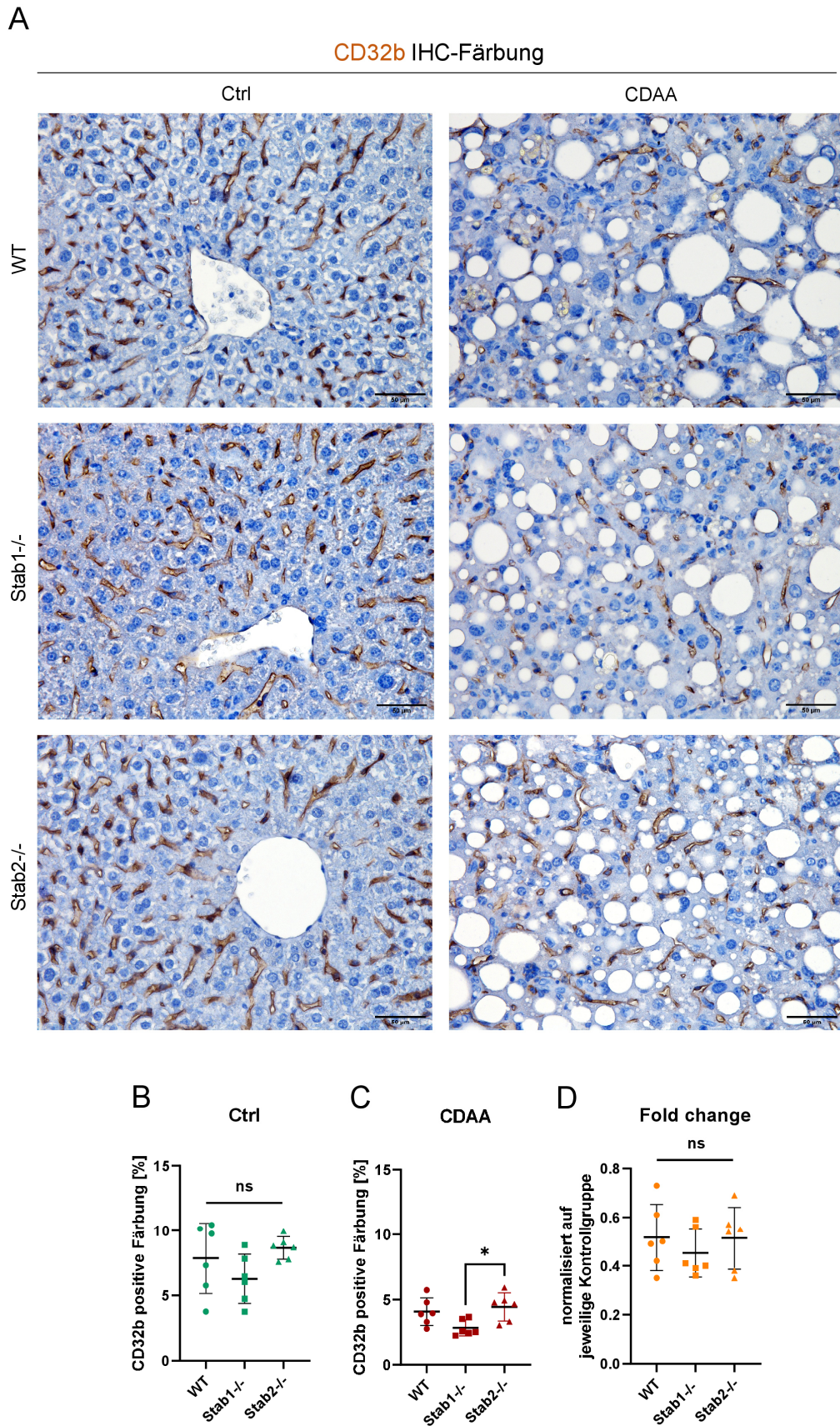
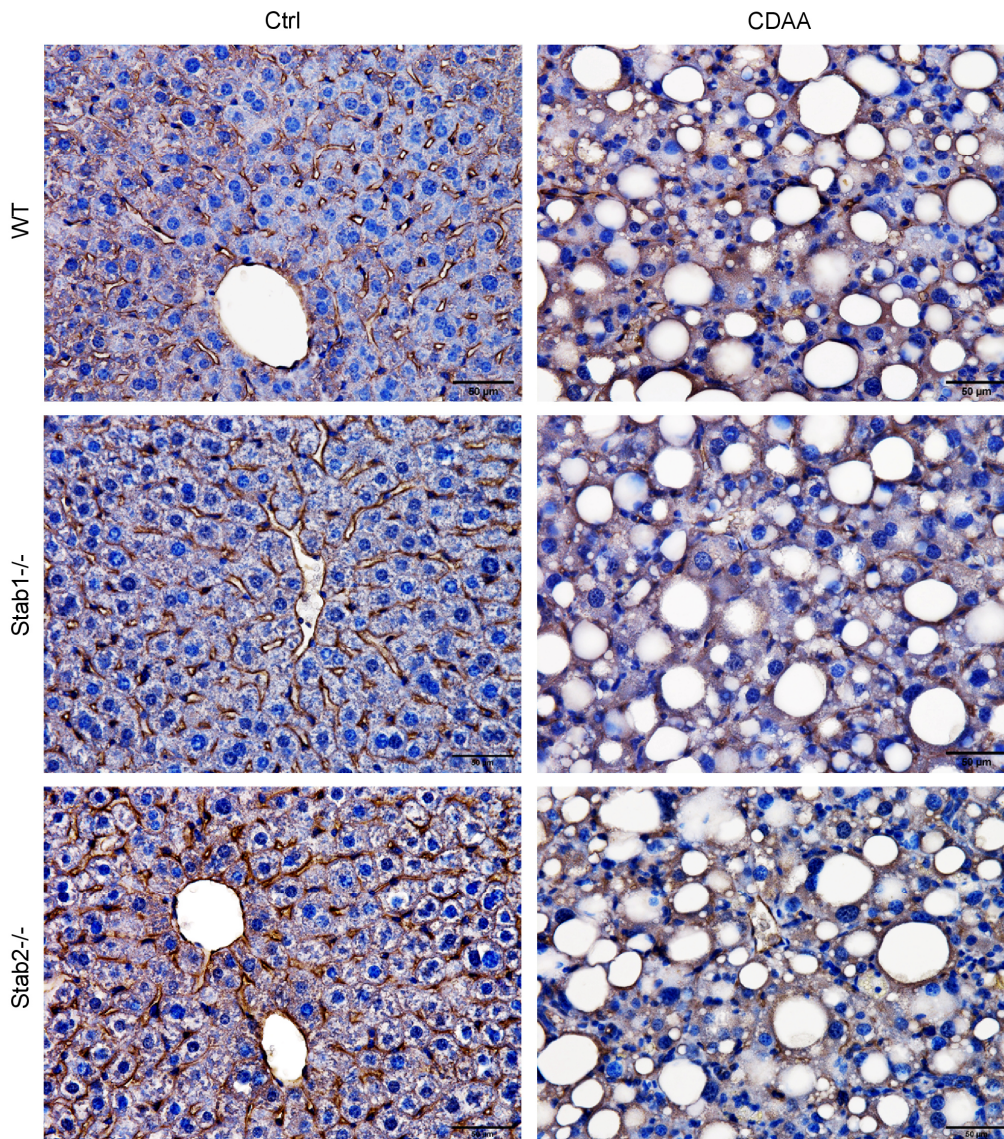


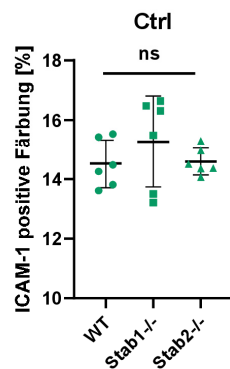
Abb. 51: IHC-Färbung von CD32b in der Leber von CDA4-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDA4-gefütterten Mäusen. Die Maßstabelleiste entspricht 50 µm. Quantifizierung der CD32b positiven Färbung (B) der Kontrollmäuse und (C) der CDA4-gefütterten Mäuse. (D) Fold change der CD32b positiven Färbung.

A

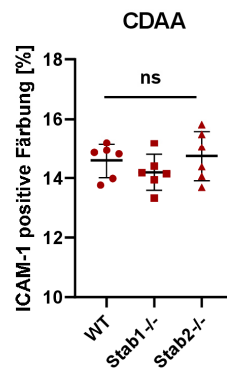
ICAM-1 IHC-Färbung



B



C



D

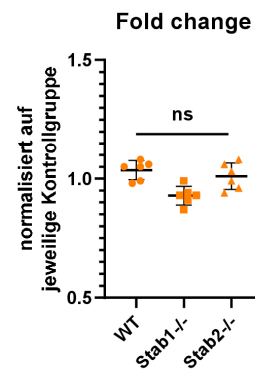


Abb. 52: IHC-Färbung von ICAM-1 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDAA gefütterten Mäusen. Die Maßstabelle entspricht 100 µm. Quantifizierung der ICAM-1 positiven Färbung (B) der Kontrollmäuse und (C) der CDAA-gefütterten Mäuse. (D) Fold change der ICAM-1 positiven Färbung.

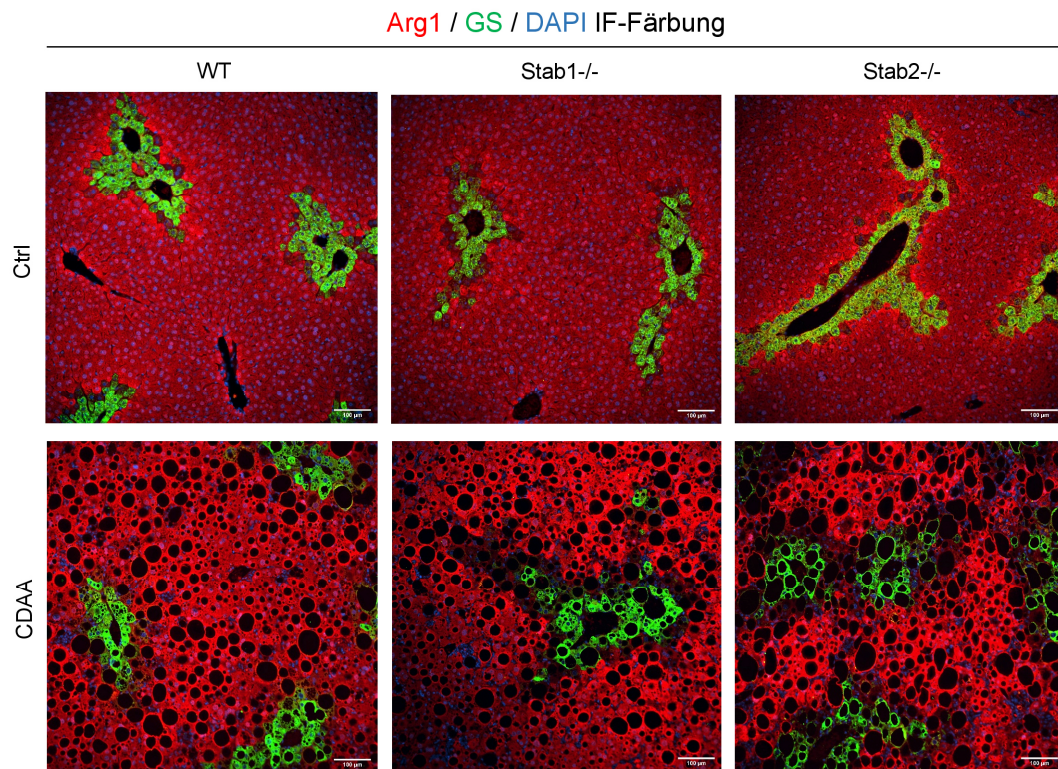


Abb. 53: IF-Färbung von Arg1 und GS in der Leber von CDA4-gefütterten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDA4-gefütterten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 100 μm .

3.2.3 Einfluss auf Makrophagen

Die IHC-Färbung von F4/80 zeigte in den Kontrollgruppen ein positives Signal in den Kupffer-Zellen der Leber, die sich zwischen den Hepatozyten befinden. Aufgrund des starken Hintergrundes konnte das F4/80 Signal der CDAA-gefütterten Mäuse nicht quantifiziert werden. Innerhalb der jeweiligen Fütterungsgruppen waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu sehen (s. Abb. 54).

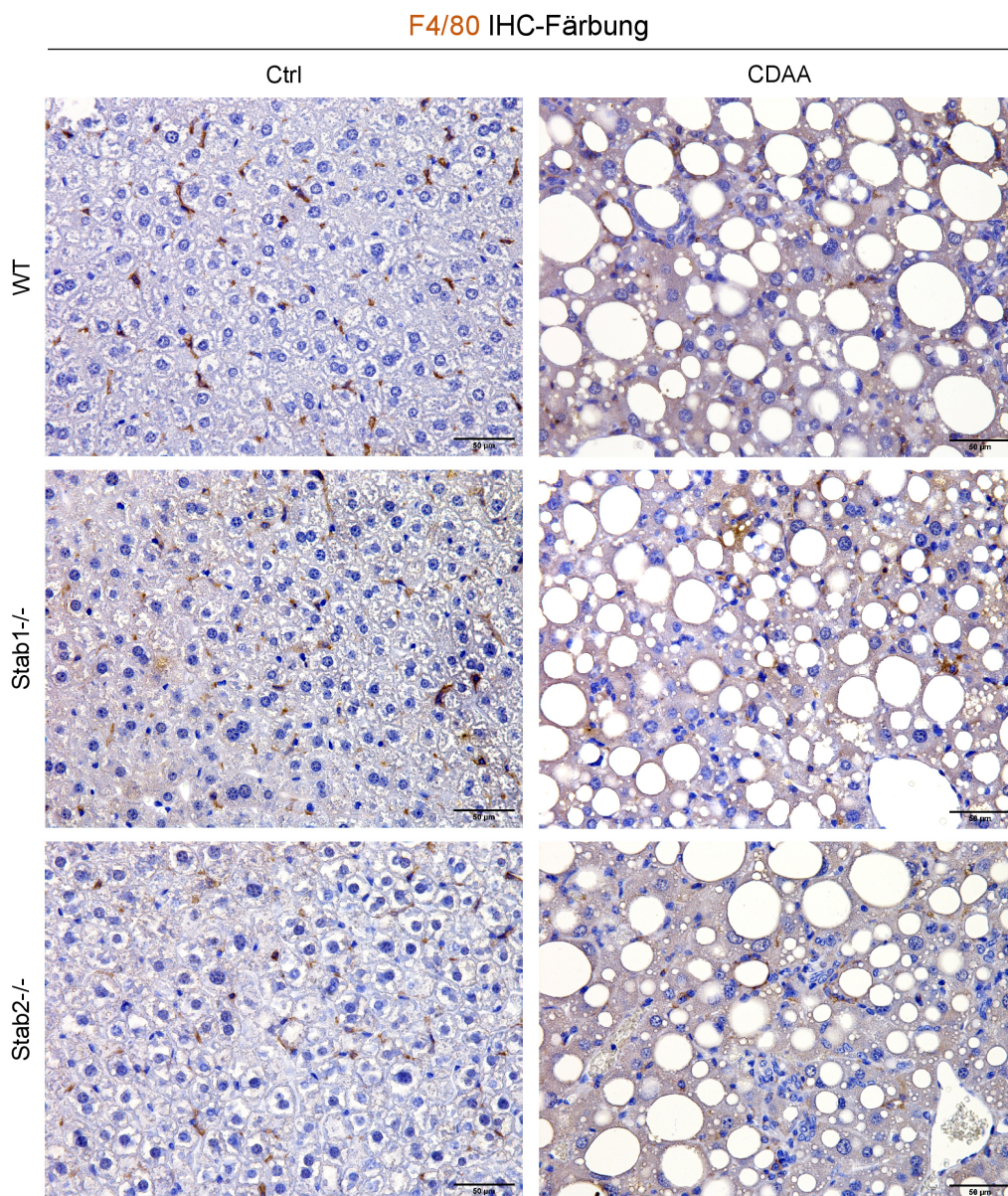


Abb. 54: IHC-Färbung von F4/80 in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 50 µm.

3.2.4 Einfluss auf Perizyten und hepatische Sternzellen

In der IHC-Färbung von α -SMA, war das Signal in allen Genotypen und in beiden Fütterungsgruppen nur um die großen Gefäße herum zu sehen, dabei zeigten sich weder zwischen den Genotypen, noch zwischen den beiden Fütterungsgruppen Unterschiede (s. Abb. 55). Die IHC-Färbung von Desmin zeigte ein Signal in den Sternzellen und war in allen drei Leberzonen vertreten. Zwischen den Genotypen und den beiden Fütterungsgruppen zeigten sich keine Unterschiede (Abb. 56).

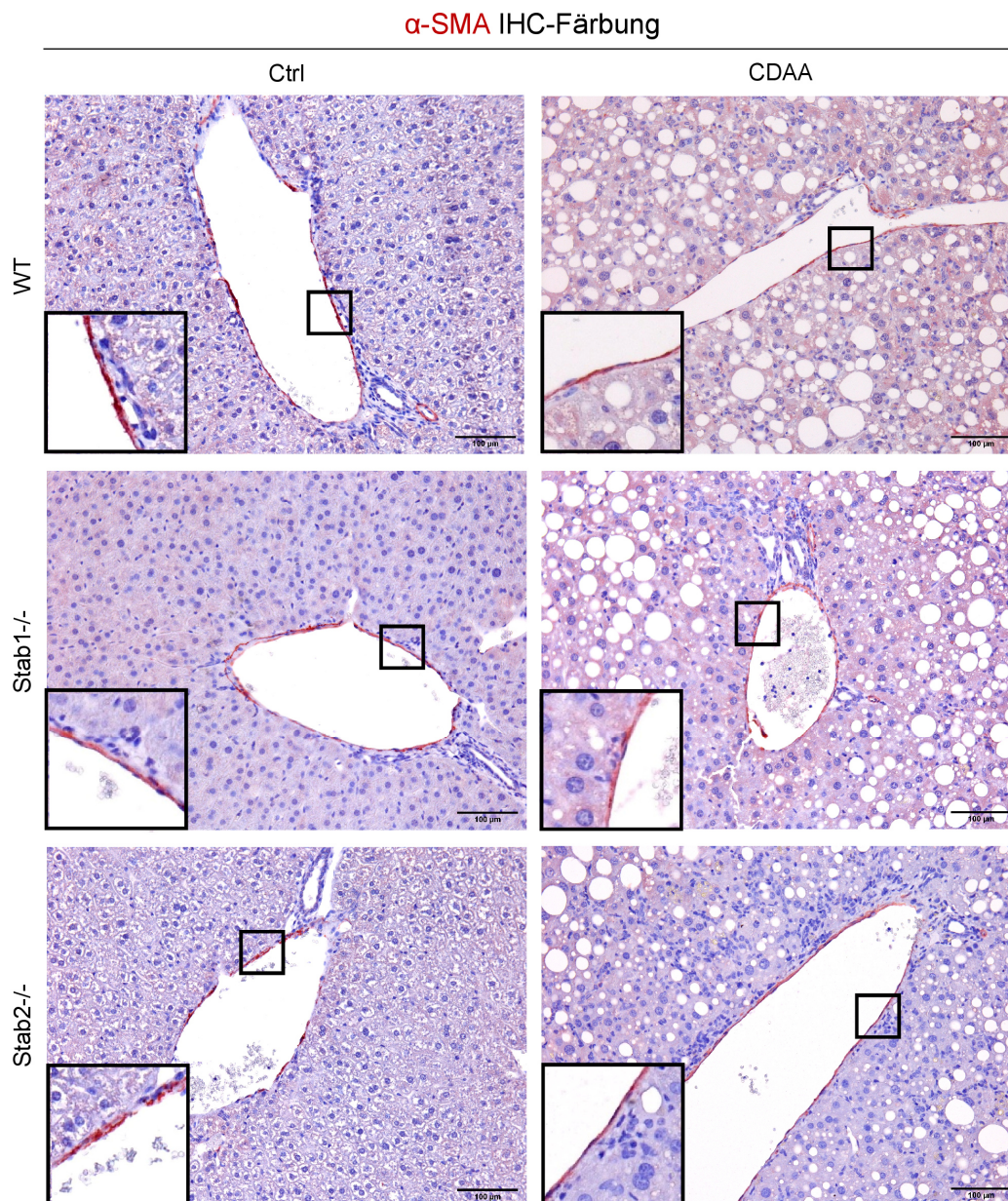
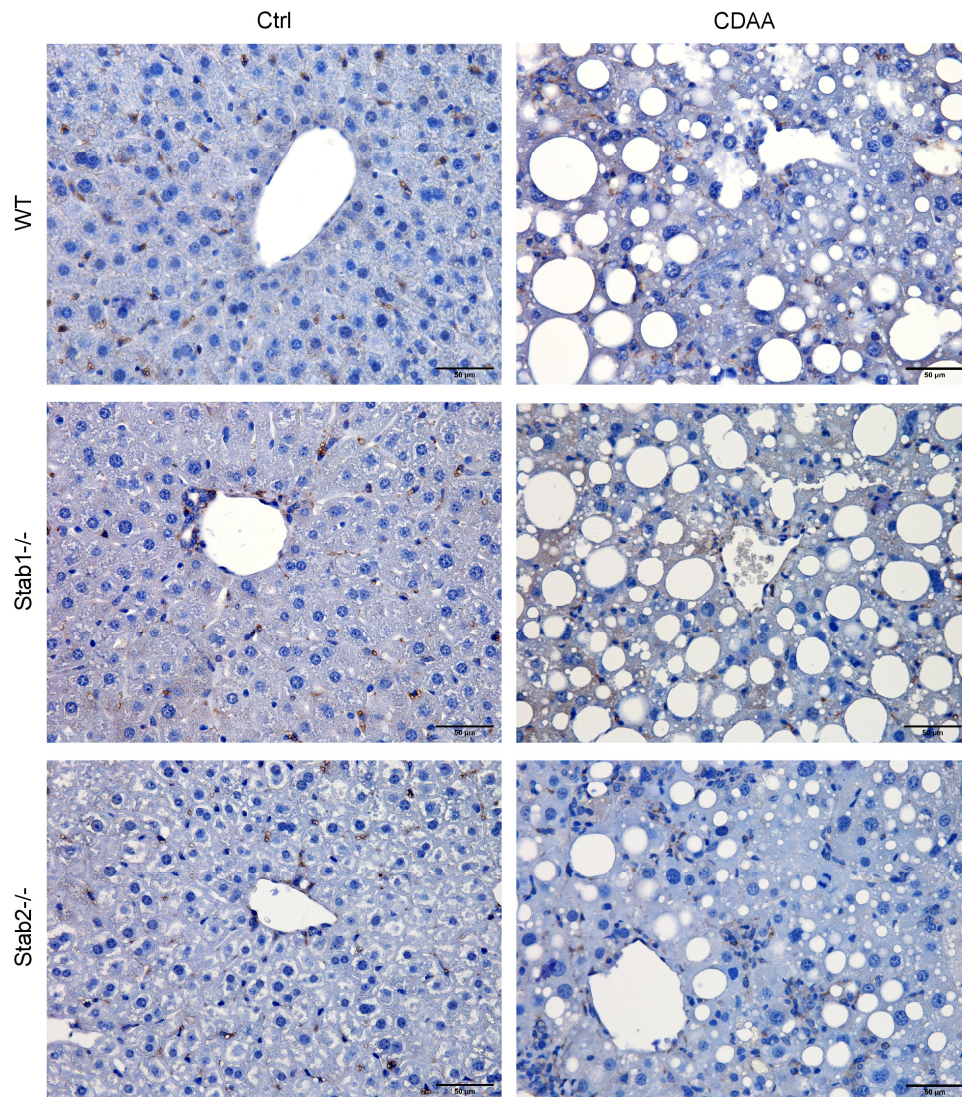


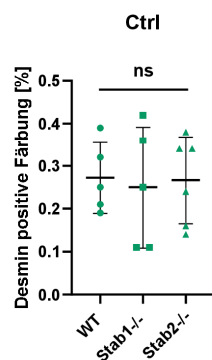
Abb. 55: IHC-Färbung von α -SMA in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen. Schwarze Kästen stellen die vergrößerten Bereiche im Bild dar. Die Maßstableiste entspricht 100 μ m.

A

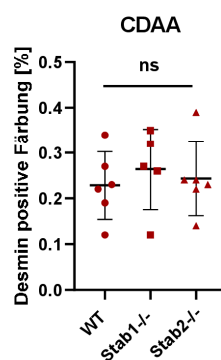
Desmin IHC-Färbung



B



C



D

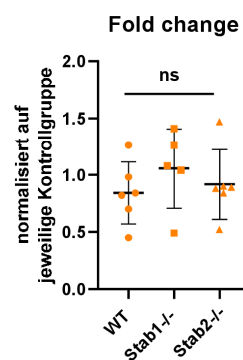


Abb. 56: IHC-Färbung von Desmin in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 50 µm. Quantifizierung der Desmin positiven Färbung (B) der Kontrollmäuse und (C) der CDAA-gefütterten Mäuse. (D) Fold change der Desmin positiven Färbung.

3.2.5 Einfluss auf die Liganden TGFB β 1 und Postn

Die IHC-Färbung des Stabilin Liganden TGFB β 1 zeigte in der Kontrollgruppe kein Signal in den WT Mäusen. In den Stabilin-KO Mäusen der Kontrollgruppe, sowie der CDAA-gefütterten Gruppe, zeigte sich ein extrazelluläres Signal. Bei den CDAA-gefütterten Mäusen zeigten alle Genotypen, besonders die WT Mäuse, ein erhöhtes TGFB β 1 Signal (s. Abb. 57).

Der Simple Western von Leberprotein zeigte in den Kontrollmäusen ein leicht erhöhtes, aber nicht signifikantes, Signal in den *Stab1*^{-/-} Mäusen. Bei den CDAA-gefütterten Mäusen stieg in allen drei Genotypen das TGFB β 1 Signal signifikant an, im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollmäusen, dabei war zwischen den Genotypen kein Unterschied zu sehen (s. Abb. 58 A – B).

Auch der TGFB β 1 ELISA vom Plasma der Mäuse zeigte, dass in der Kontrollgruppe *Stab1*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen ein signifikant erhöhtes TGFB β 1 Level hatten. Durch die Fütterung mit CDAA stiegen die TGFB β 1 Werte in allen Genotypen an, dabei war der Anstieg nur in *Stab2*^{-/-} Mäusen signifikant (s. Abb. 58 C).

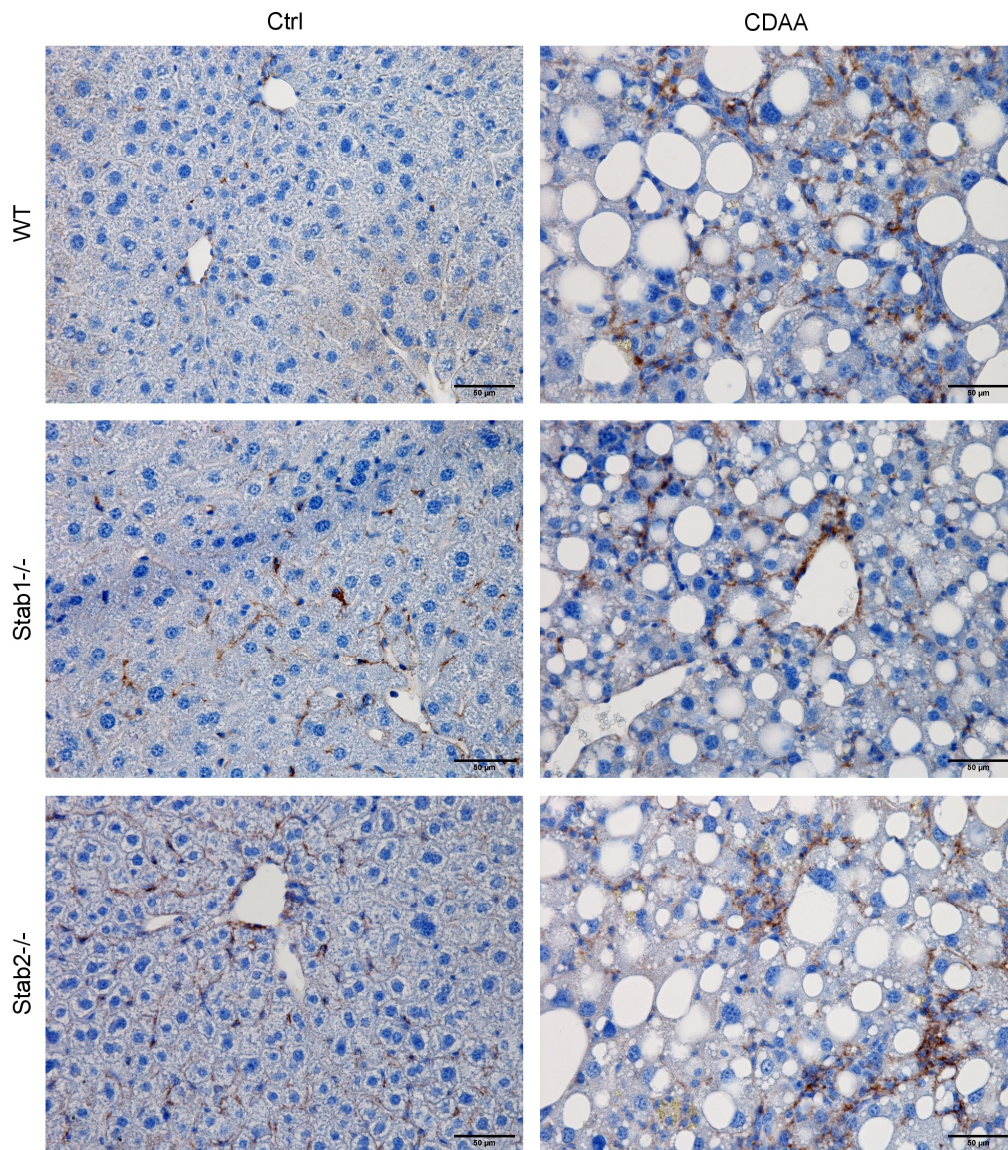
Die IHC-Färbung von Postn zeigte in der Leber kein Signal, weder in den Kontrollmäusen, noch in den CDAA-gefütterten Mäusen (s. Abb. 59).

Der Simple Western von Leberprotein zeigte, dass in der Kontrollgruppe die *Stab1*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen ein leicht erhöhtes, aber nicht signifikantes, Level an Postn hatten. Durch die Fütterung mit CDAA kam es in allen drei Genotypen zu einem leichten Anstieg des Postn Levels, bei den WT Mäusen war dieser Anstieg signifikant (s. Abb. 60 A – B).

Der Postn ELISA vom Plasma der Mäuse zeigte in der Kontrollgruppe bei *Stab1*^{-/-} Mäusen das höchste Level an Postn, dieser Unterschied war im Vergleich zu den *Stab2*^{-/-} Mäusen signifikant. Durch die Fütterung mit CDAA kam es in WT und *Stab1*^{-/-} Mäusen zu einer signifikanten Abnahme des Postn Levels, während sich das Postn Level bei den *Stab2*^{-/-} Mäusen nicht veränderte (s. Abb. 60 C).

A

TGFBi IHC-Färbung



B

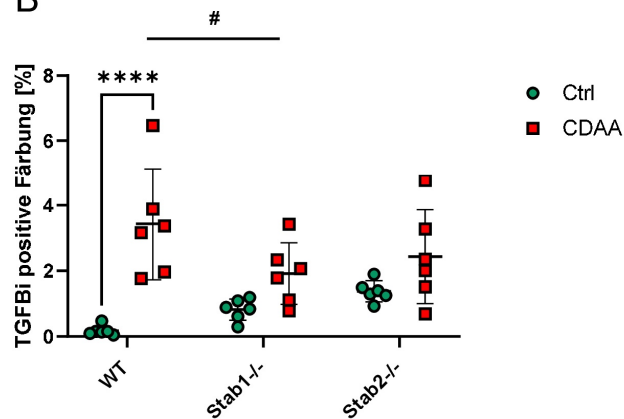


Abb. 57: IHC-Färbung von TGFBi in der Leber von CDAA-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDAA-gefütterten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der TGFBi positiven Färbung.

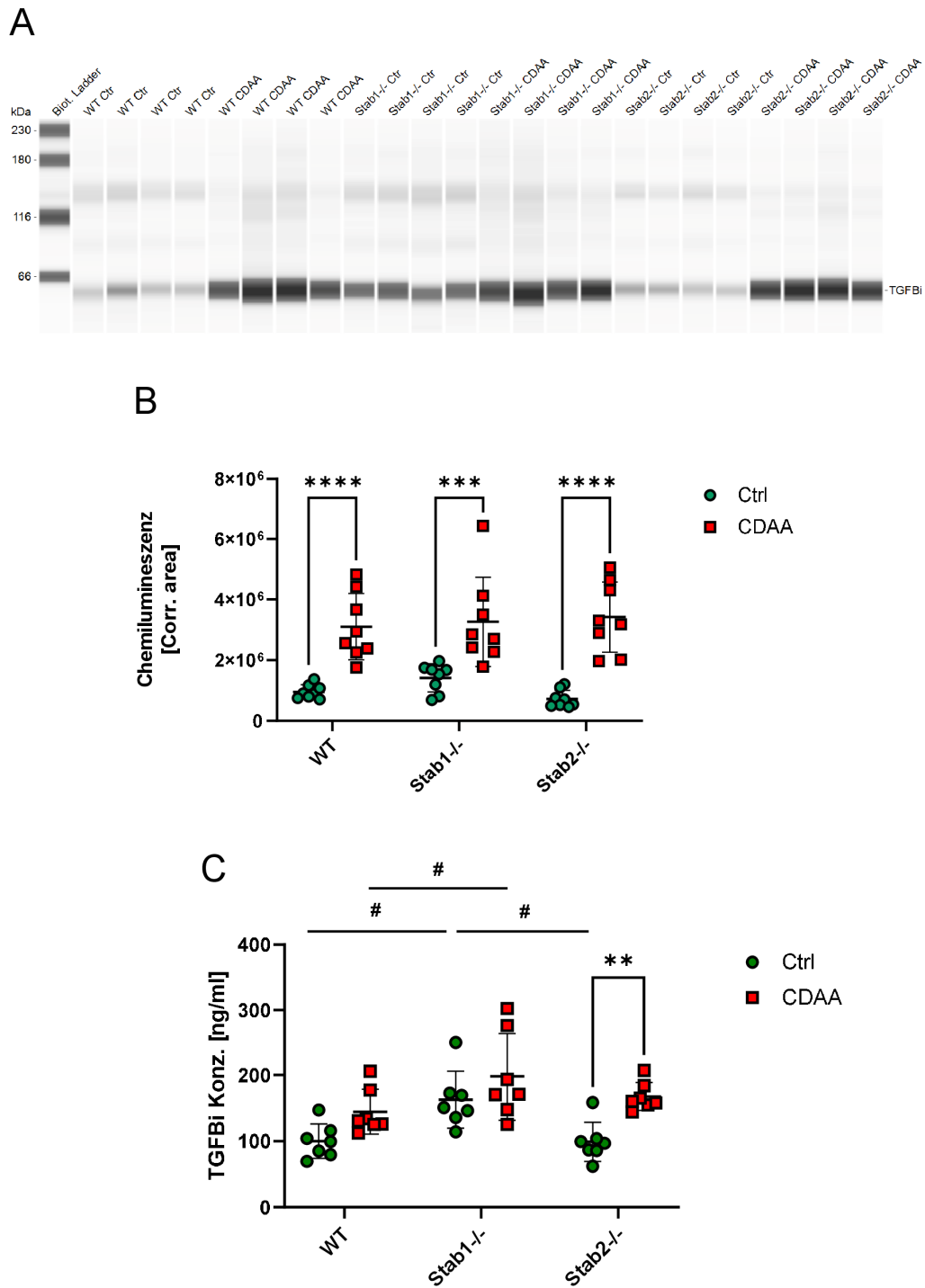


Abb. 58: TGFBi Analyse von Leberprotein und Plasma von CDAA-gefütterten Mäusen. (A) Banden-Ansicht eines TGFBi Simple Western von Leberprotein. (B) Quantifizierung von TGFBi Simple Western, normiert auf die Gesamtproteinmenge. (C) Quantifizierung von TGFBi ELISA aus Plasma.

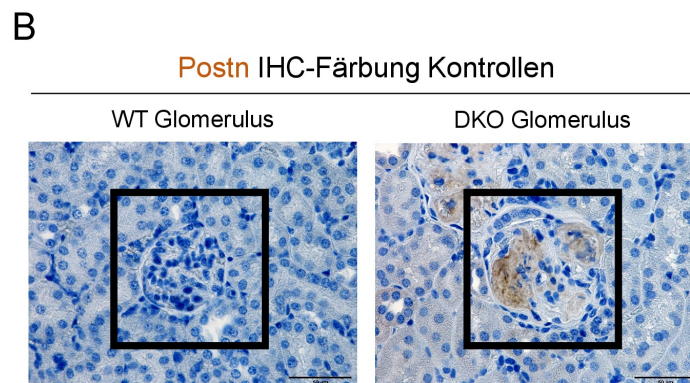
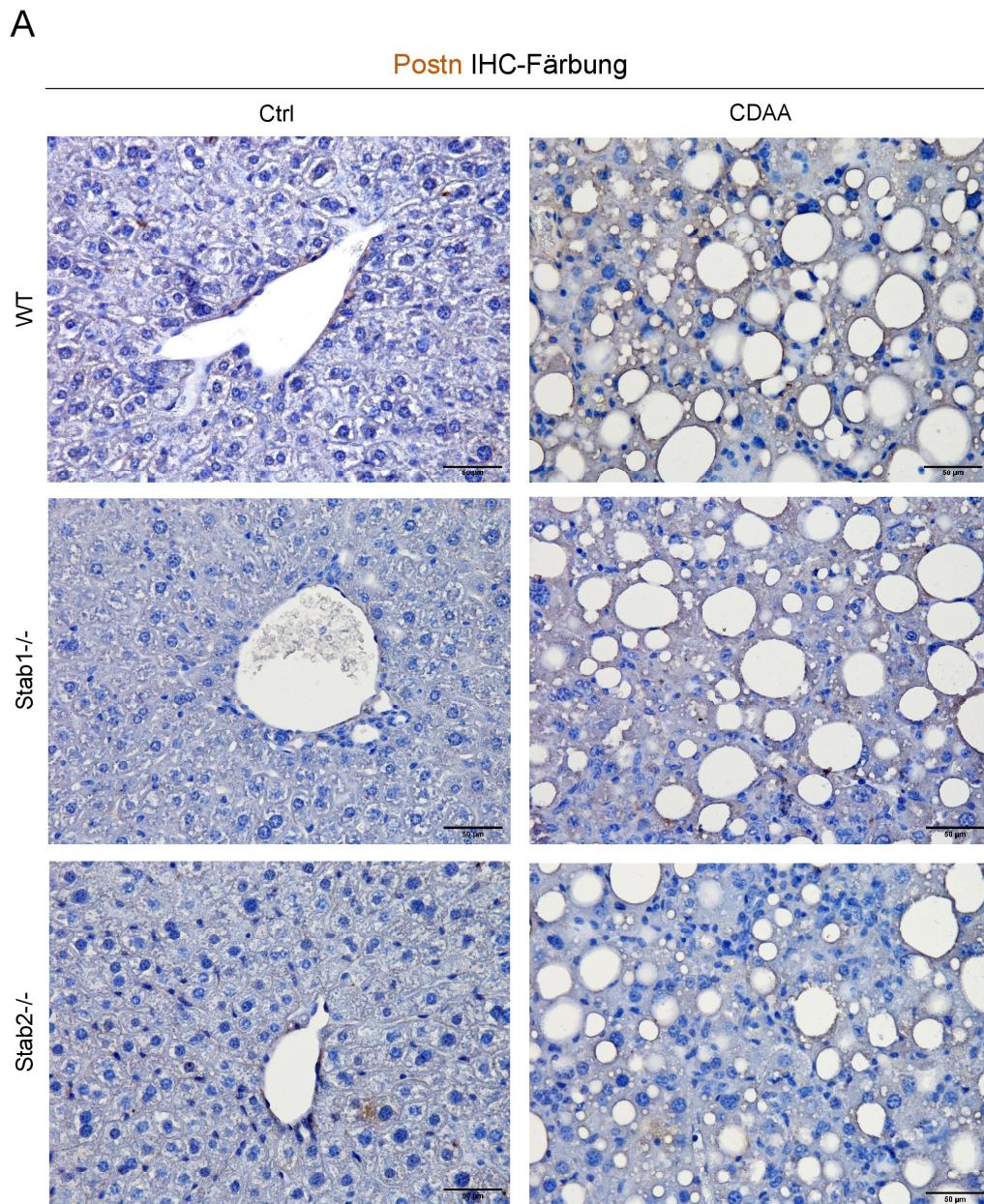


Abb. 59: IHC-Färbung von Postn in der Leber von CDA4-gefütterten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Leberschnitten von Kontrollmäusen und CDA4-gefütterten Mäusen. Die Maßstabelle entspricht 50 µm. (B) Repräsentative Auswahl eines Glomerulus einer WT Maus (links) als Negativkontrolle und eines Glomerulus einer *Stabilin1/2^{-/-}* DKO Maus (rechts) als Positivkontrolle. Die Maßstabelle entspricht 50 µm.

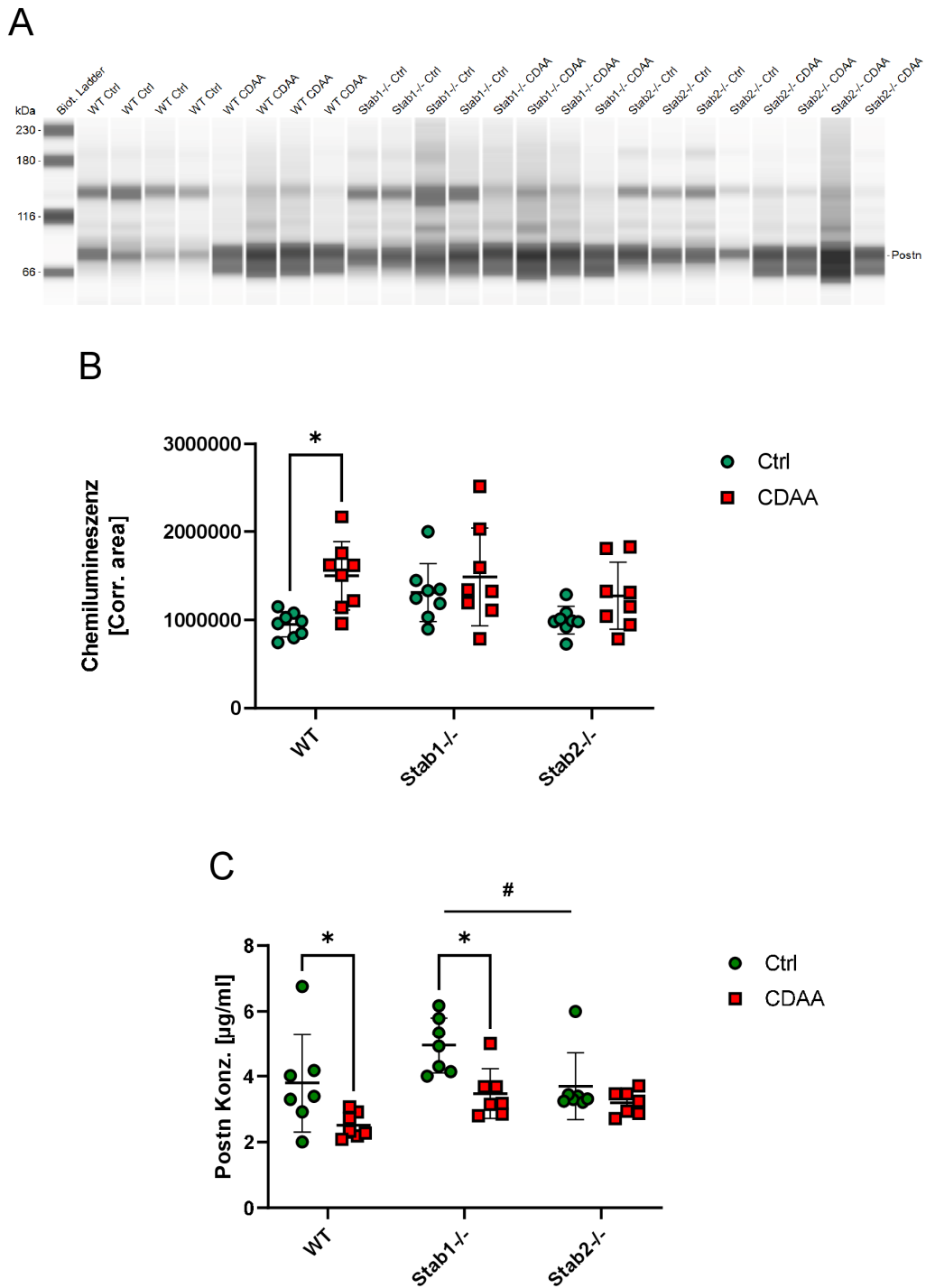


Abb. 60: Postn Analyse von Leberprotein und Plasma von CDAA-gefütterten Mäusen. (A) Banden-Ansicht eines Postn Simple Western von Leberprotein. (B) Quantifizierung von Postn Simple Western, normiert auf die Gesamtproteinmenge. (C) Quantifizierung von Postn ELISA aus Plasma.

3.2.6 Korrelationsanalysen der Liganden TGFB β 1 und Postn mit der Fibrose in der Leber von MCD- und CDAA-gefütterten Mäusen

Die TGFB β 1 und Postn Färbungen in der Leber und auch die Ergebnisse des Simple Western, sowohl aus den MCD als auch aus den CDAA Fütterungen, ließen gewisse Tendenzen vermuten, dass das Signal bzw. das Level der Liganden mit dem Fibroselevel der Leber korrelieren könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt (s. Abb. 61 – 64).

Die Analysen der beiden Liganden mit dem Fibroselevel zeigten unterschiedlich starke Korrelationen (s. Abb. 61 – 62). So zeigten die Werte aller Genotypen (WT, *Stab1*^{-/-} und *Stab2*^{-/-}) und beider Versuche (MCD und CDAA, sowie deren Kontroll-gefütterten Mäuse), bei dem Liganden TGFB β 1 eine hoch signifikante und sehr starke Korrelation mit dem Fibroselevel (s. Abb. 61 A), während sich bei dem Liganden Postn nur eine moderate, aber dennoch sehr hoch signifikante, Korrelation mit dem Fibroselevel zeigte (s. Abb. 61 B).

Abb. 62 zeigt die jeweilige Korrelation der beiden Liganden mit dem Fibroselevel nach den beiden Fütterungsmodellen aufgetrennt. Im Falle von TGFB β 1 zeigte sich bei der CDAA Fütterung eine sehr starke und hoch signifikante Korrelation zum Fibroselevel, während sich bei der MCD Fütterung eine etwas schwächere, aber dennoch starke und hoch signifikante, Korrelation zum Fibroselevel zeigte (s. Abb. 62 A).

Der Ligand Postn zeigte ebenfalls bei den Mäusen die mit CDAA gefütterten wurden eine stärkere Korrelation zum Fibroselevel als die MCD-gefütterten Mäuse. Im Falle der CDAA-gefütterten Mäuse gab es eine starke und hoch signifikante Korrelation, während die MCD-gefütterten Mäuse eine eher moderate und nicht signifikante Korrelation mit dem Fibroselevel zeigten (s. Abb. 62 B).

In Abb. 63 sind die Korrelationen beider Liganden mit dem Fibroselevel, nach Genotypen aufgetrennt, dargestellt. Bei dem Liganden TGFB β 1 zeigten die WT und die *Stab2*^{-/-} Mäuse eine sehr starke und hoch signifikante (WT) bis sehr hoch signifikante (*Stab2*^{-/-}) Korrelation mit dem Fibroselevel. Die *Stab1*^{-/-} Mäuse zeigten von allen drei Genotypen die geringste Korrelation, dennoch korrelierte auch hier das TGFB β 1 mit dem Fibroselevel stark und mit einer hohen Signifikanz (s. Abb. 63 A).

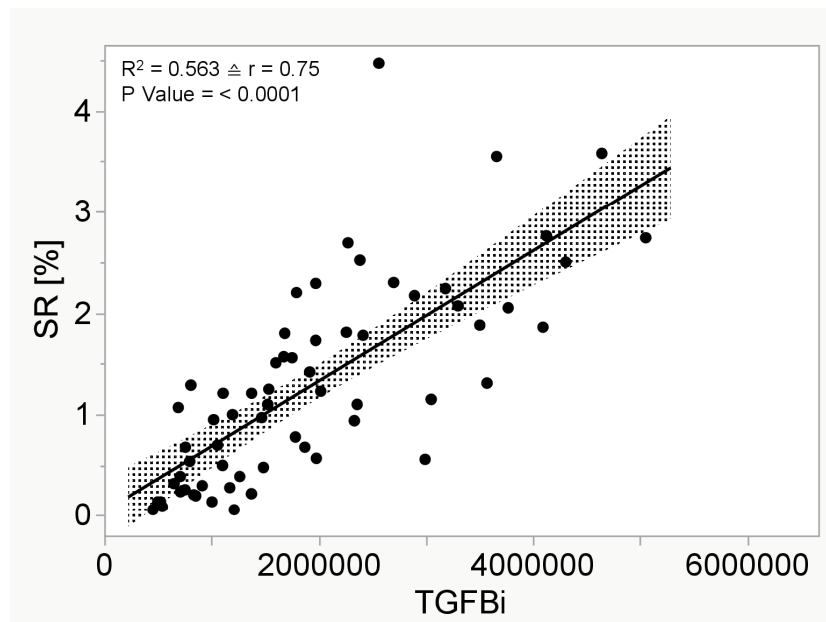
Bei dem Liganden Postn zeigten die WT Mäuse eine sehr starke und sehr hoch signifikante Korrelation, während es sich bei den *Stab1*^{-/-} Mäusen um eine moderate Korrelation mit einer sehr geringen Signifikanz handelte. Die *Stab2*^{-/-} Mäuse zeigten keine

Korrelation zwischen dem Liganden Postn und dem Fibroselevel (s. Abb. 63 B).

Des Weiteren wurde die Korrelation zwischen den beiden Liganden untersucht (s. Abb. 64). In der Analyse in der sowohl alle verwendeten Mäuse der MCD und CDAA Fütterung, als auch alle Kontroll-gefütterten Mäuse beider Fütterungen verwendet wurden zeigte sich, dass die beiden Liganden mit einer hohen Signifikanz stark miteinander korrelieren (s. Abb. 64 A).

Aufgetrennt nach den jeweiligen Genotypen, zeigten sich Unterschiede in der Korrelation. Im Falle der WT Mäuse korrelierten die beiden Liganden sehr stark miteinander und die Korrelation war hoch signifikant. Bei den Stabilin-defizienten Mäusen korrelierten die beiden Liganden eher moderat miteinander, und in beiden Fällen war die Korrelation sehr schwach signifikant (*Stab1*^{-/-}) bis garnicht signifikant (*Stab2*^{-/-}) (s. Abb. 64 B).

A



B

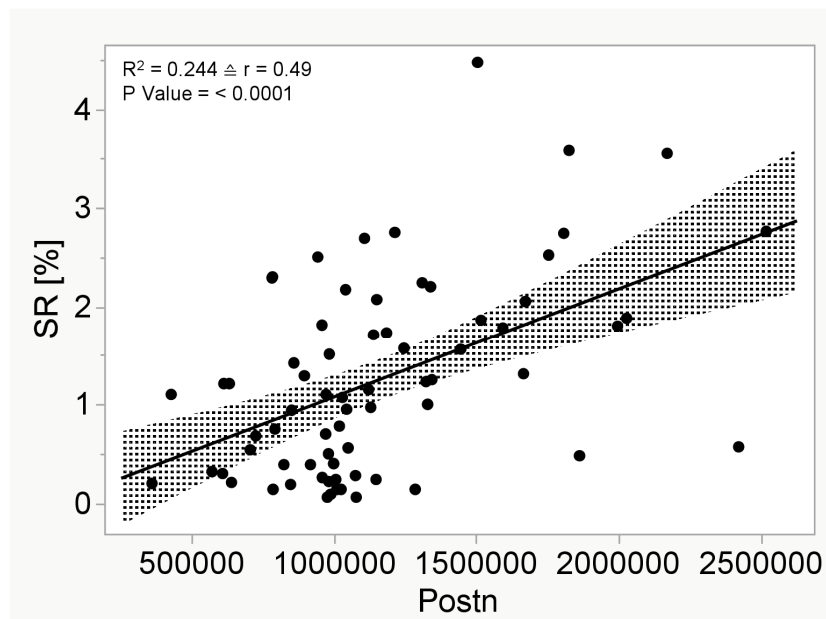
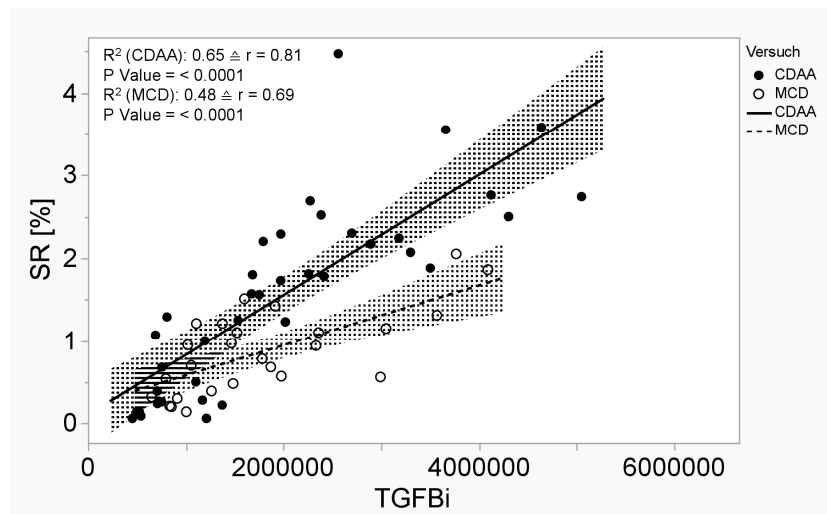


Abb. 61: Korrelationsanalyse der Liganden TGFBi und Postn mit dem Fibroselevel. (A) Korrelation zwischen TGFBi Werten aus dem Simple Western und der Quantifizierung aus der Sirius Rot Färbung. (B) Korrelation zwischen Postn Werten aus dem Simple Western und der Quantifizierung aus der Sirius Rot Färbung. Die Werte erfassen alle Genotypen und sowohl MCD- und CDAA-gefütterte Mäuse, als auch die Kontroll-gefütterten Mäuse aus beiden Fütterungsexperimenten.

A



B

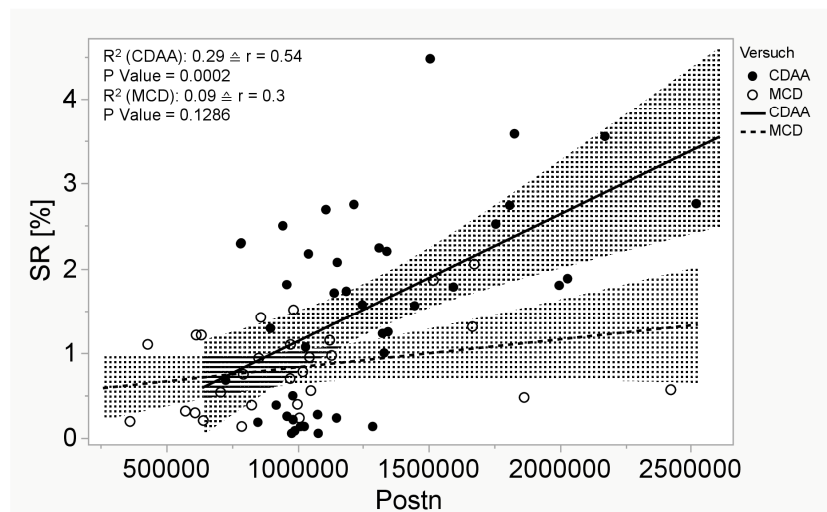
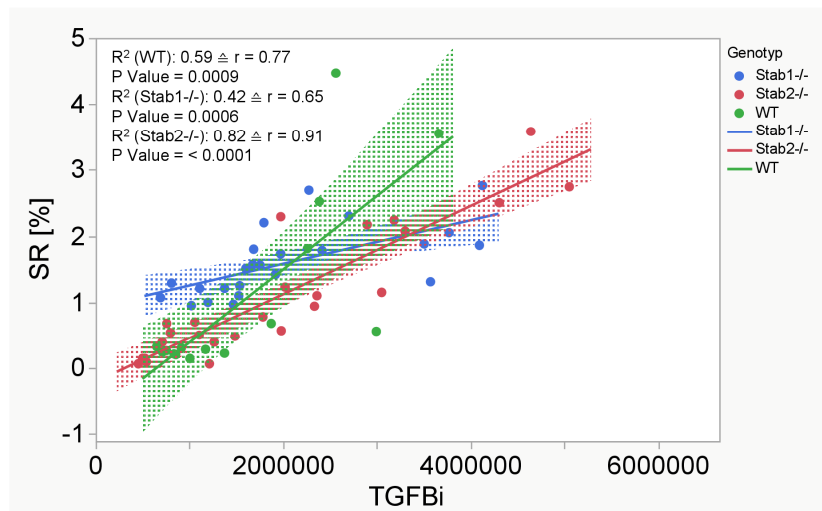


Abb. 62: Korrelationsanalyse der Liganden TGFBi und Postn mit dem Fibroselevel, nach Fütterungsmodellen getrennt. (A) Korrelation zwischen TGFBi Werten aus dem Simple Western und der Quantifizierung aus der Sirius Rot Färbung, nach Fütterung getrennt: MCD (weiße Punkte) und CDAA (schwarze Punkte). (B) Korrelation zwischen Postn Werten aus dem Simple Western und der Quantifizierung aus der Sirius Rot Färbung, nach Fütterungen getrennt: MCD (weiße Punkte) und CDAA (schwarze Punkte). Die Werte der einzelnen Kurven erfassen aus den jeweiligen Fütterungen alle Genotypen und sowohl MCD- bzw. CDAA-gefütterte Mäuse, als auch die Kontroll-gefütterten Mäuse aus dem jeweiligen Fütterungsexperiment.

A



B

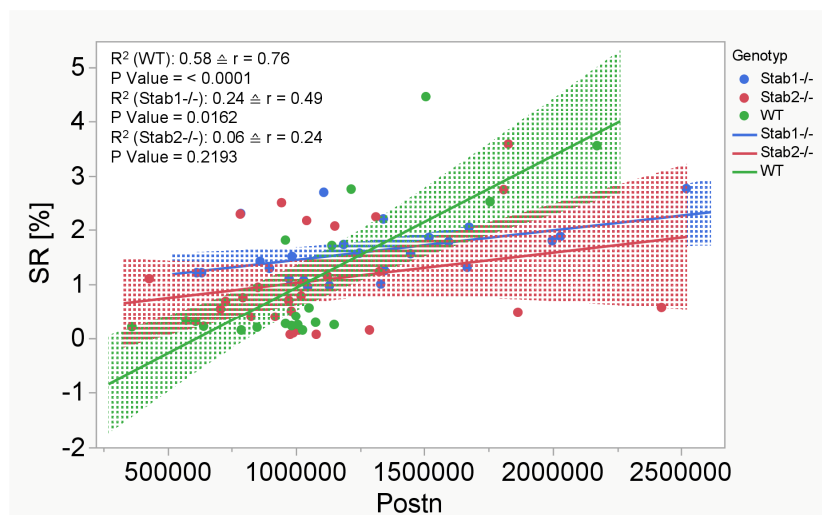
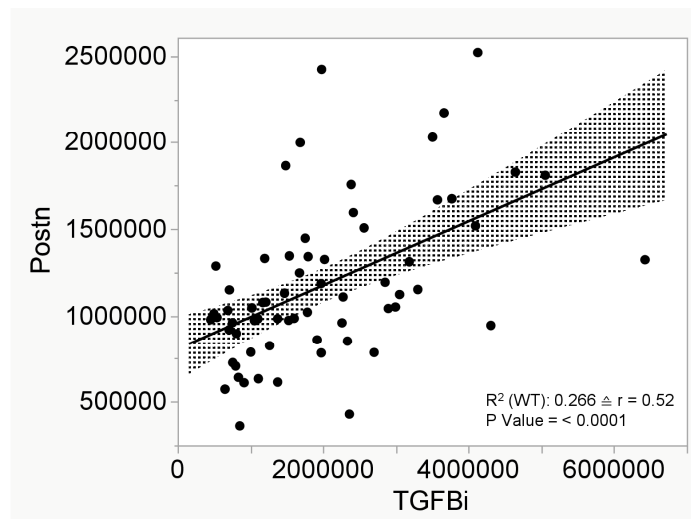


Abb. 63: Korrelationsanalyse der Liganden TGFBi und Postn mit dem Fibroselevel, nach Genotypen getrennt. (A) Korrelation zwischen TGFBi Werten aus dem Simple Western und der Quantifizierung aus der Sirius Rot Färbung, nach Genotypen getrennt: WT (grün), *Stab1*^{-/-} (blau) und *Stab2*^{-/-} (rot). (B) Korrelation zwischen Postn Werten aus dem Simple Western und der Quantifizierung aus der Sirius Rot Färbung, nach Genotypen getrennt: WT (grün), *Stab1*^{-/-} (blau) und *Stab2*^{-/-} (rot). Die Werte der einzelnen Kurven erfassen alle gefütterten Mäuse zusammengefasst, sowohl MCD- und CDAA-gefütterte Mäuse, als auch Kontroll-gefütterte Mäuse.

A



B

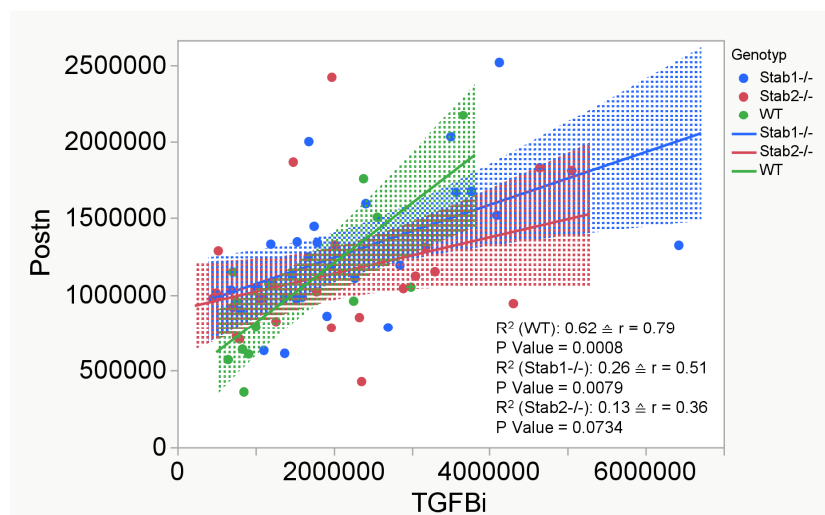


Abb. 64: Korrelationsanalyse des Liganden TGFBi mit dem Liganden Postn. (A) Korrelation zwischen den TGFBi und Postn Werten aus dem Simple Western. Die Werte erfassen alle Genotypen und sowohl MCD- und CDAA-gefütterte Mäuse, als auch die Kontroll-gefütterten Mäuse aus beiden Fütterungsexperimenten. (B) Korrelation zwischen den TGFBi und Postn Werten aus dem Simple Western nach Genotypen getrennt: WT (grün), *Stab1*^{-/-} (blau) und *Stab2*^{-/-} (rot). Die Werte der einzelnen Kurven erfassen alle gefütterten Mäuse zusammengefasst, sowohl MCD- und CDAA-gefütterte Mäuse, als auch Kontroll-gefütterte Mäuse.

3.3 Imiquimod Behandlung

3.3.1 Einfluss auf Körpergewicht und Erscheinungsbild

Die topische Applikation der Aldara Creme, mit dem Wirkstoff Imiquimod (IMQ), führte bei allen Mäusen zu einem erheblichen Gewichtsverlust, der in beiden Geschlechtern schon ab dem zweiten Tag deutlich sichtbar wurde, jedoch reagierten beide Geschlechter unterschiedlich stark auf den Wirkstoff. Auch die Genotypen der beiden Geschlechter reagierten unterschiedlich. Während bei den Männchen die Behandlung mit IMQ, vor allem bei den beiden Stabilin-KOs, zu einer stärkeren Gewichtsabnahme führte, als bei den WT Mäusen, so reagierten bei den Weibchen die WT Mäuse mit einer deutlich stärkeren Gewichtsabnahme, als die beiden Stabilin-KOs (s. Abb. 65). Makroskopisch war deutlich zu sehen, dass die Behandlung mit IMQ zu einer starken Veränderung der Haut führte. Durch den Wirkstoff kam es zu einer starken Rötung und Schuppung der Haut. Außerdem verhärtete sich die Haut durch die Creme extrem und bildete starke Falten. Das umliegende Fell wurde im Laufe der Behandlung struppig und fettig (s. Abb. 66).

Das PASI Scoring zeigte, dass die Genotypen der beiden Geschlechter unterschiedlich auf die Behandlung mit IMQ reagierten. Bei den Weibchen zeigten die WT und *Stab1*^{-/-} Mäuse bereits ab dem zweiten Tag einen höheren Scoring Wert als die *Stab2*^{-/-} Mäuse. Bei den Männchen zeigten die *Stab1*^{-/-} Mäuse den mit Abstand höchsten Scoring Wert (s. Abb. 67 A). Bei der separierten Betrachtung der Scoring Parameter Dicke, Rötung und Schuppung war zu sehen, dass die Genotypen die am stärksten auf IMQ reagierten, in allen drei Parametern die höchsten Werte zeigten (s. Abb. 67 B – C).

Die Nahaufnahmen der Haut zeigten, dass die Weibchen mit Rötung und Schuppung deutlich stärker auf den Wirkstoff reagierten als die Männchen (s. Abb. 68).

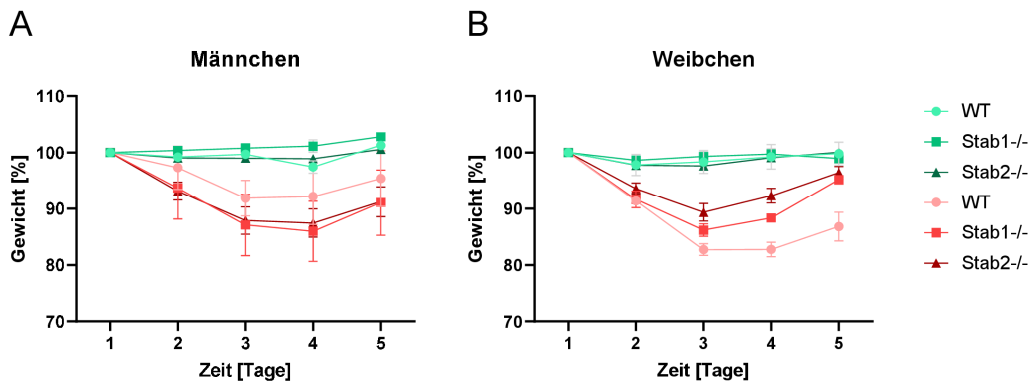


Abb. 65: Gewichtsverlauf von Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen. (A) Gewichtsverlauf von Männchen. (B) Gewichtsverlauf von Weibchen. Grün zeigt Vaseline-behandelte Mäuse und rot zeigt IMQ-behandelte Mäuse.

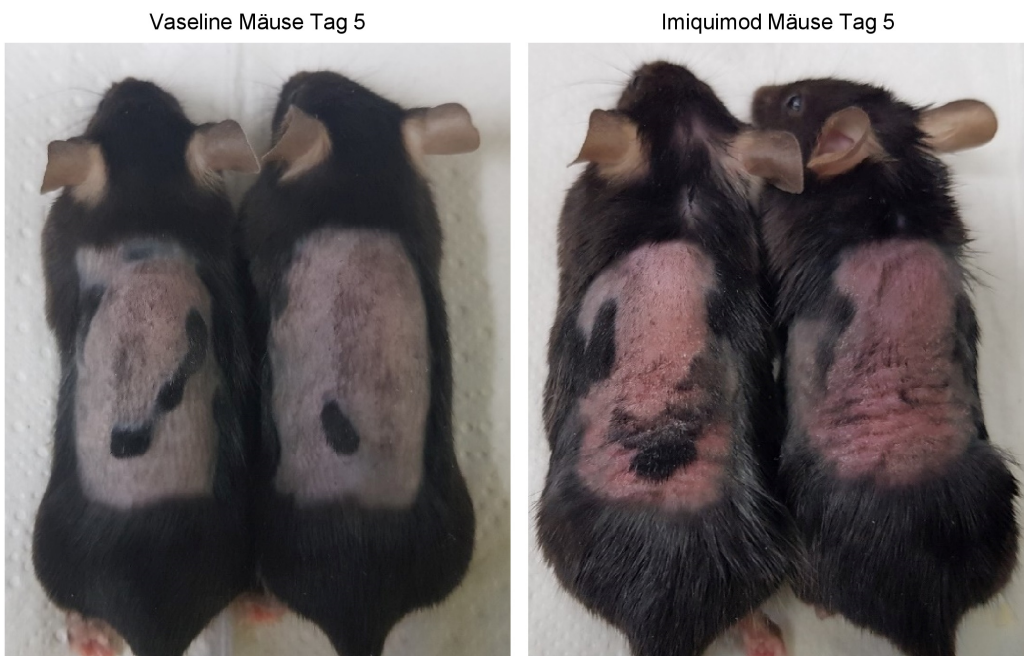
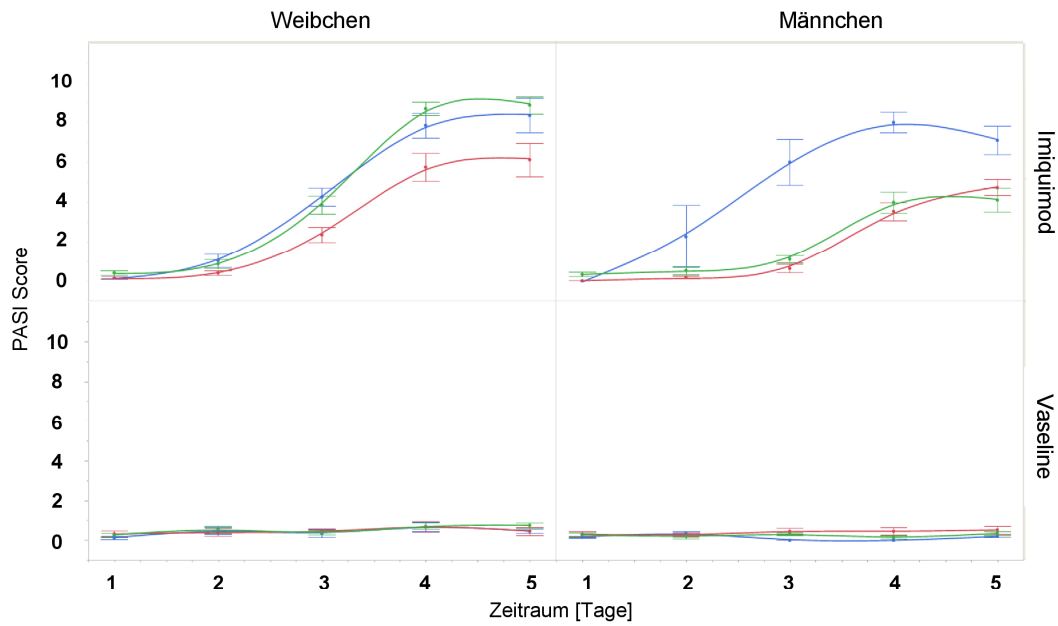
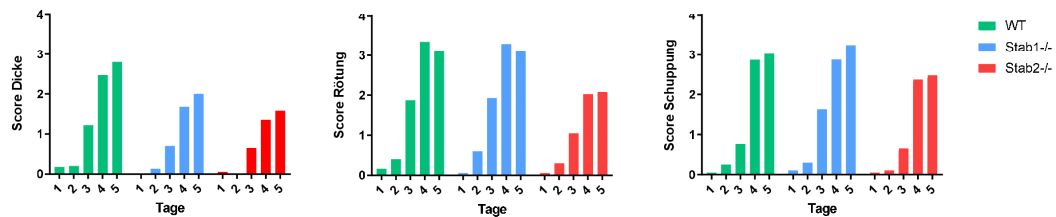


Abb. 66: Makroskopischer Vergleich von Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen. Beispiele von WT Mäusen nach 5 Tagen mit Vaseline behandelt (links) und nach 5 Tagen mit IMQ behandelt (rechts).

A



B



C

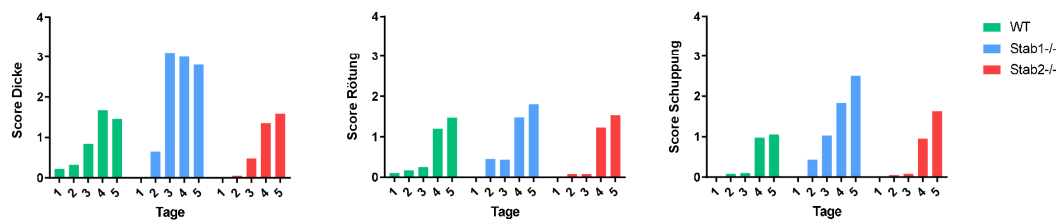


Abb. 67: PASI Scoring der Haut von IMQ-behandelten Mäusen. (A) Auswertung der Mittelwerte der Parameter Dicke, Rötung und Schuppung aller Mäuse. (B) Analyse der Mittelwerte der Einzelparameter der Weibchen, die mit IMQ behandelt wurden. (C) Analyse der Mittelwerte der Einzelparameter der Männchen, die mit IMQ behandelt wurden. In allen drei Abbildungen ist der WT in grün dargestellt, *Stab1*^{-/-} in blau und *Stab2*^{-/-} in rot.

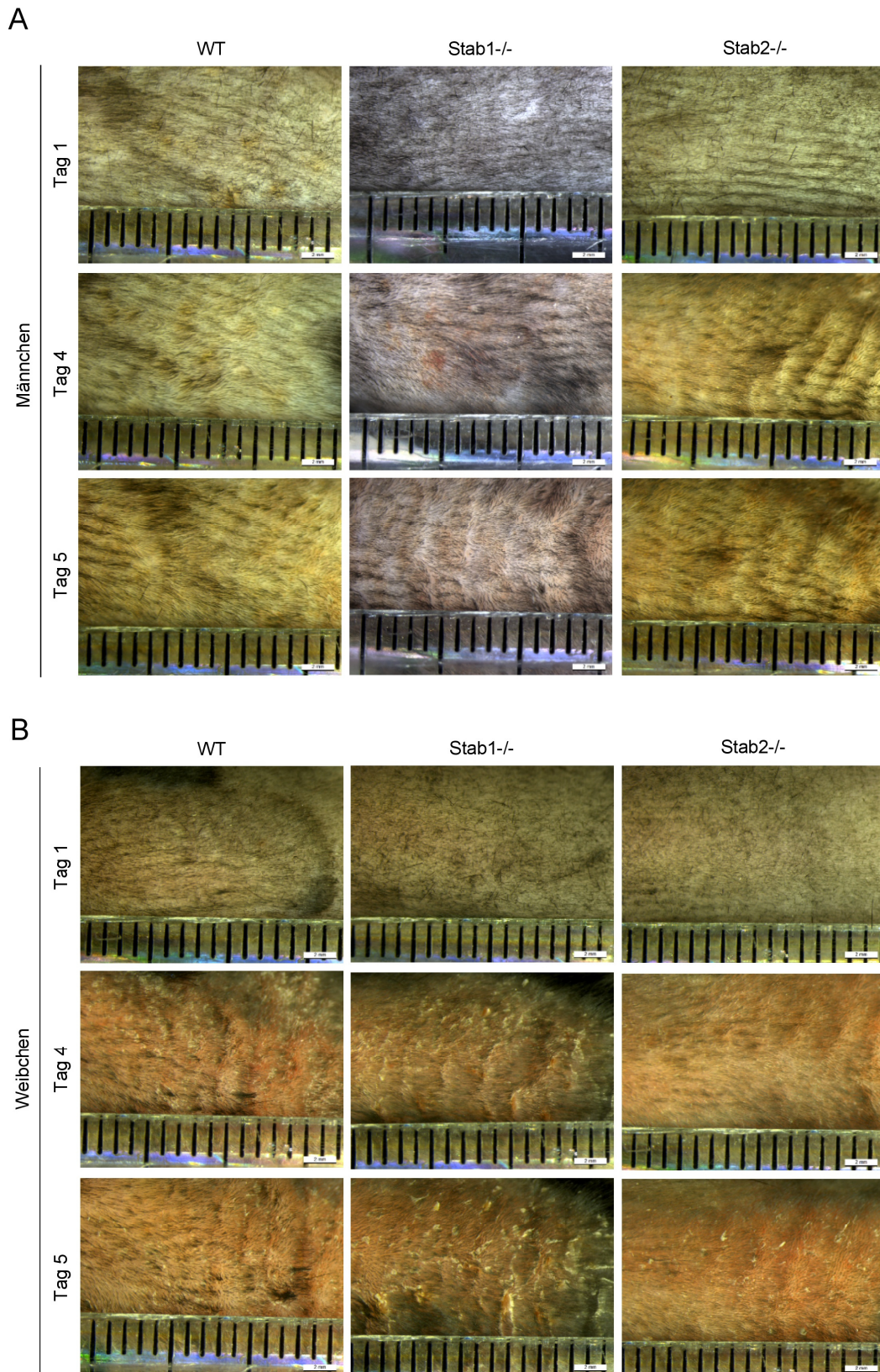


Abb. 68: Makroskopische Veränderung der Haut über die Dauer der IMQ Behandlung. Repräsentative Auswahl an Hautschnitten der Tage 1, 4 und 5 von IMQ-behandelten (A) Männchen und (B) Weibchen. Die Maßstableiste entspricht 2 mm.

3.3.2 Einfluss auf die Histologie der Haut

Die histologische Färbung H&E der Haut zeigte deutlich, dass die Behandlung mit IMQ zu einer starken Akanthose führte, teilweise mit einer leichten Spongiose. In manchen Schnitten war eine Parakeratose mit teils neutrophilen Granulozyten zu beobachten (s. Abb. 69). Die Quantifizierung der Epidermisdicke zeigte, dass es bei allen Mäusen die mit IMQ behandelt wurden zu einer starken Zunahme der Epidermisdicke kam, zwischen den Genotypen innerhalb der beiden Geschlechter gab es jedoch keine Unterschiede. In den Weibchen führte IMQ zu einer etwas stärkeren Zunahme der Epidermisdicke, als in den Männchen. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant (s. Abb. 70).

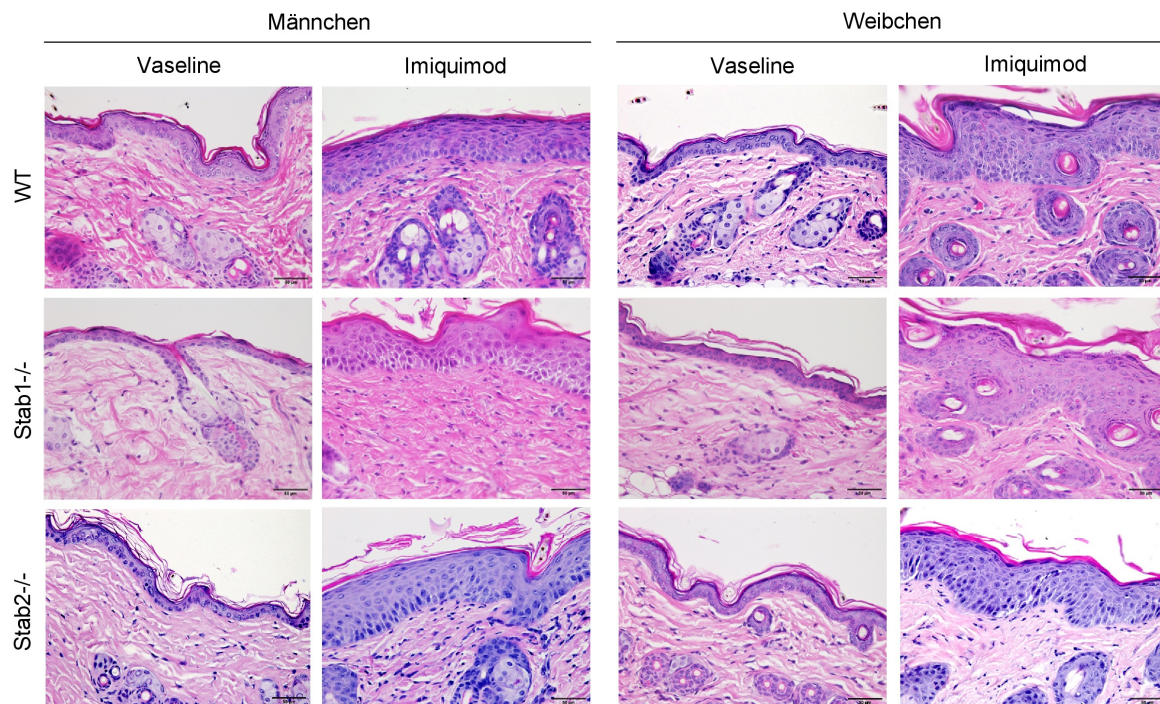


Abb. 69: H&E Färbung der Haut von IMQ-behandelten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Hautschnitten von Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen, nach Geschlechtern getrennt. Die Maßstableiste entspricht 50 μ m.

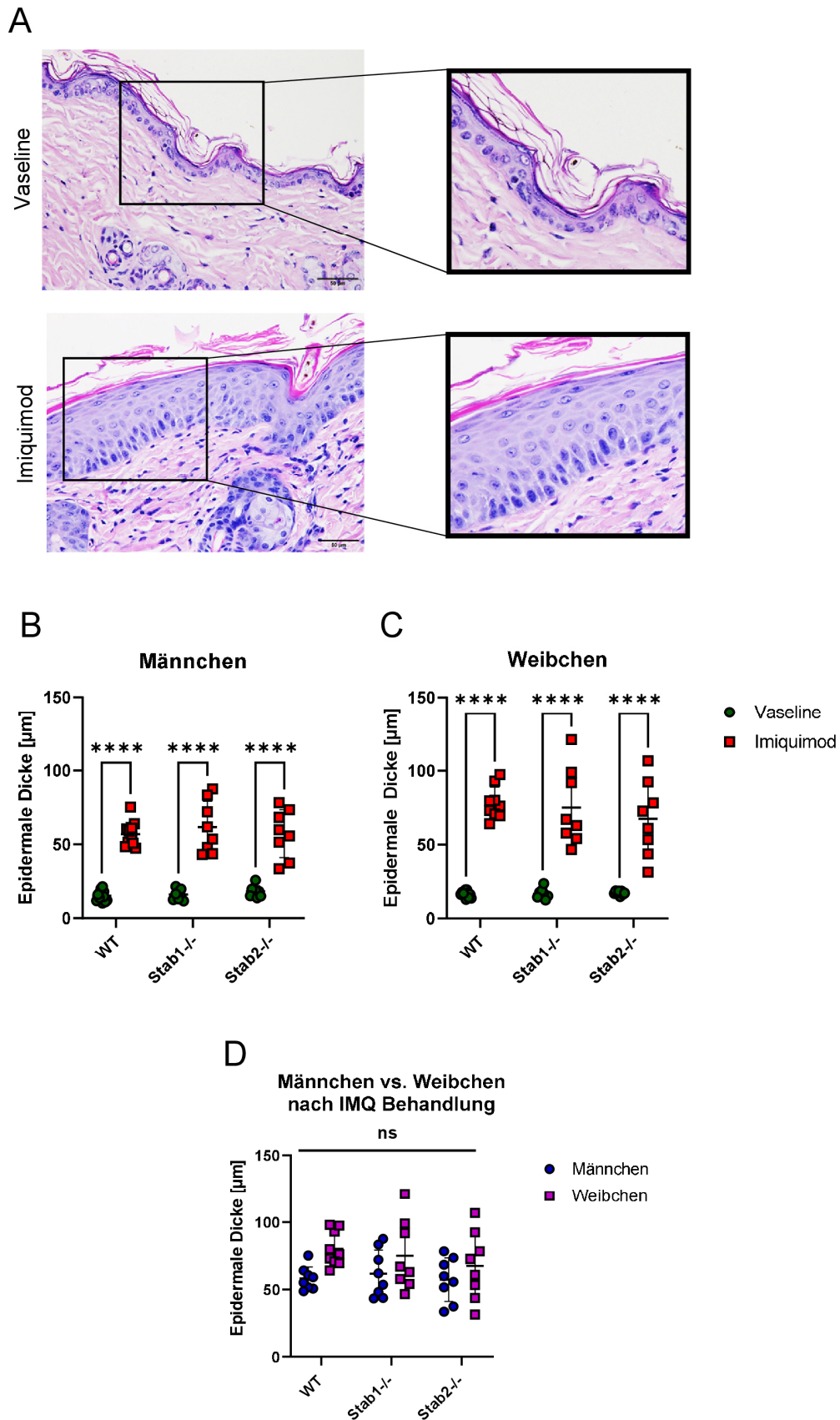


Abb. 70: Veränderung der epidermalen Dicke der Haut von IMQ-behandelten Mäusen. (A) Vergrößerung eines Ausschnittes der Epidermis einer Vaseline-behandelten und einer IMQ-behandelten *Stab2*^{-/-} Maus. **(B)** Quantifizierung der epidermalen Dicke von Vaseline- und IMQ-behandelten Männchen. **(C)** Quantifizierung der epidermalen Dicke von Vaseline- und IMQ-behandelten Weibchen. **(D)** Vergleich der epidermalen Dicken zwischen Männchen und Weibchen nach der Behandlung mit IMQ.

3.3.3 Einfluss auf die Liganden TGFB β 1 und Postn

Die IF-Färbung von TGFB β 1 zeigte in allen Kontrollmäusen ein positives Signal sowohl in der Basalmembran, als auch vereinzelt in der tieferen Dermis. Nach der Behandlung mit IMQ war nur noch ein Signal unterhalb der Epidermis zu sehen. Es zeigten sich Unterschiede der Signalintensität zwischen Männchen und Weibchen (s. Abb. 71). Die Quantifizierung des TGFB β 1 Signals aus der IF-Färbung zeigte geringe Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Sowohl in den Kontrollmäusen, als auch in den IMQ-behandelten Mäusen, zeigten die *Stab1*^{-/-} Männchen ein höheres TGFB β 1 Signal als die *Stab1*^{-/-} Weibchen (s. Abb. 72 A). Des Weiteren war bei den Männchen in der Kontrollgruppe ein leicht erhöhtes TGFB β 1 Signal in den *Stab1*^{-/-} Mäusen zu sehen, im Vergleich zu den WT Mäusen. Ansonsten waren innerhalb der Geschlechter keine Unterschiede zwischen den Genotypen und den Behandlungen zu sehen (s. Abb. 72 B). Der TGFB β 1 ELISA vom Plasma der Mäuse zeigte auch hier einen leichten Unterschied zwischen den *Stab1*^{-/-} Mäusen der Männchen und Weibchen. Männliche *Stab1*^{-/-} Mäuse zeigten in der Kontrollgruppe ein leicht erhöhtes TGFB β 1 Signal im Vergleich zu den weiblichen *Stab1*^{-/-} Mäusen. Bei den IMQ-behandelten Mäusen war dieser Unterschied nicht mehr zu sehen (s. Abb. 73 A). Bei der Betrachtung der jeweiligen Geschlechter war zu sehen, dass in der Kontrollgruppe der Männchen, *Stab1*^{-/-} Mäuse mehr TGFB β 1 Signal zeigten als die WT und die *Stab2*^{-/-} Mäuse. Durch die Behandlung mit IMQ kam es bei den Männchen nur in den *Stab2*^{-/-} Mäusen zu einem Anstieg des TGFB β 1 Signals (s. Abb. 73 B). Bei den Weibchen war nur ein Unterschied in den *Stab2*^{-/-} Mäusen zu sehen. Hier kam es durch die Behandlung mit IMQ zu einem leichten Anstieg des TGFB β 1 Signals im Vergleich zu den *Stab2*^{-/-} Kontrollmäusen (s. Abb. 73 B).

Beide Geschlechter zusammen betrachtet ergaben, dass bei den Kontrollmäusen die *Stab1*^{-/-} Mäuse signifikant mehr TGFB β 1 Signal zeigten, als die WT und die *Stab2*^{-/-} Mäuse. Durch die Behandlung mit IMQ kam es nur in *Stab2*^{-/-} Mäusen zu einer Signalerhöhung (s. Abb. 73 C).

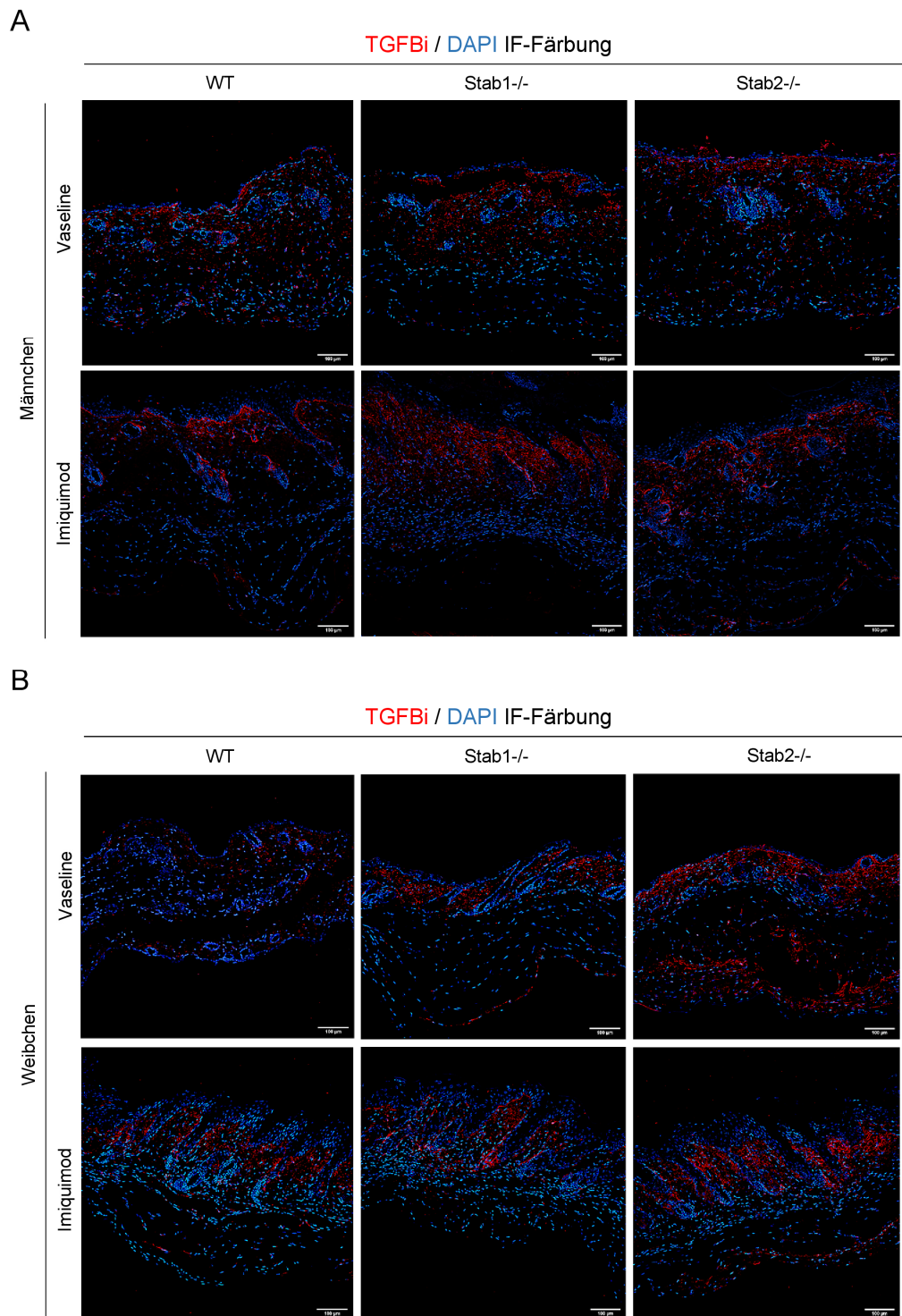


Abb. 71: IF-Färbung von TGFB β der Haut von IMQ-behandelten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Hautschnitten von Vaseline- und IMQ-behandelten (A) Männchen und (B) Weibchen. Der Maßstab entspricht 100 μ m.

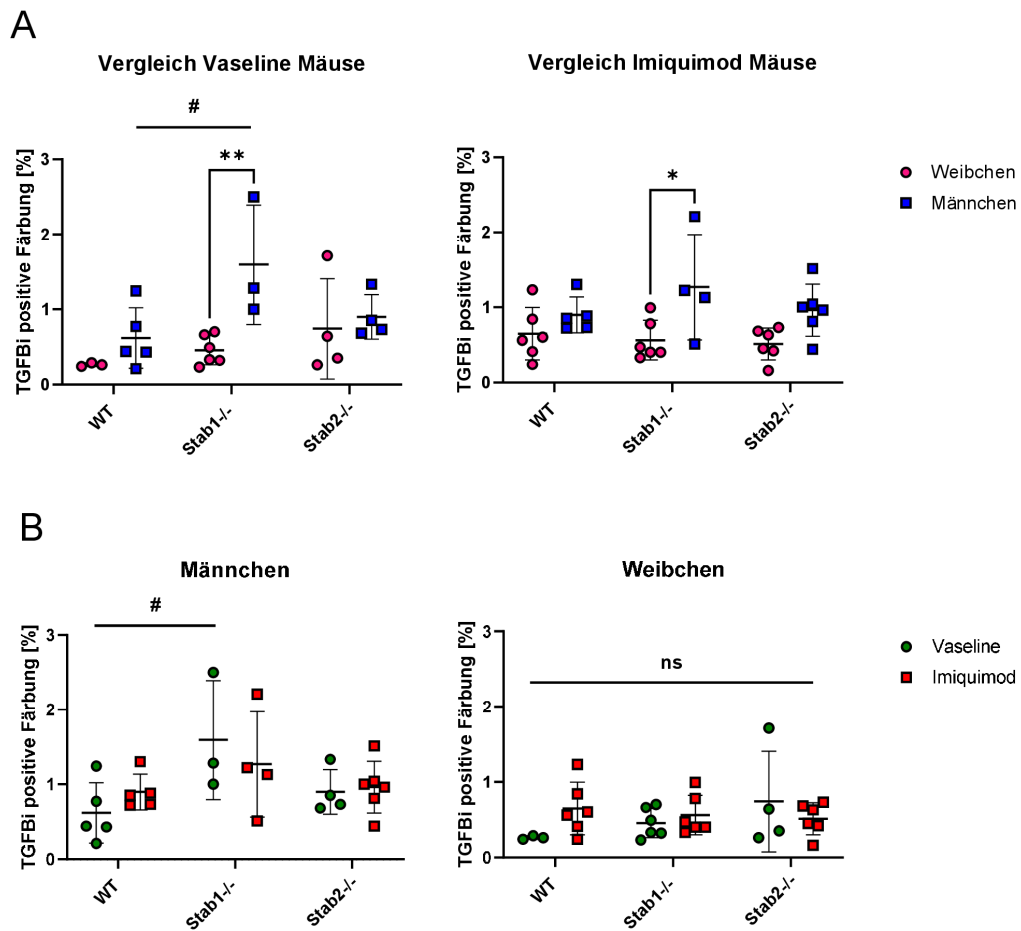


Abb. 72: Quantifizierung der TGFBi IF-Färbung der Haut von IMQ-behandelten Mäusen. (A) Vergleich des TGFBi Signals zwischen Männchen und Weibchen in Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen. (B) Vergleich des TGFBi Signals zwischen Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen nach Geschlechtern getrennt.

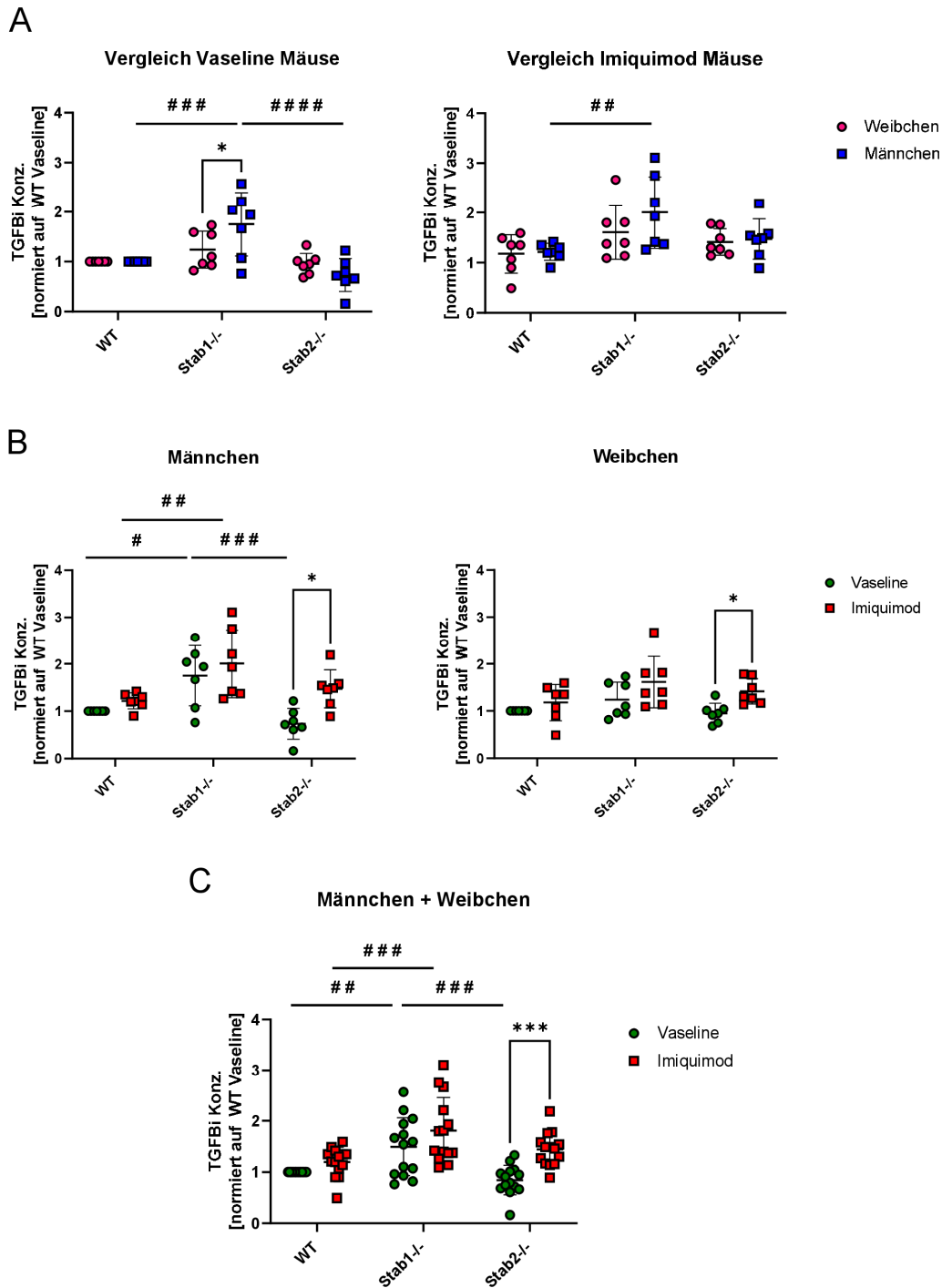


Abb. 73: TGFBi Analyse aus Plasma von IMQ-behandelten Mäusen. (A) Vergleich des TGFBi Levels zwischen Männchen und Weibchen in Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen, normiert auf den Mittelwert der WT Kontrollen. (B) Vergleich des TGFBi Levels zwischen Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen nach Geschlechtern getrennt, normiert auf den Mittelwert der WT Kontrollen. (C) Vergleich des TGFBi Levels zwischen Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen bestehend aus beiden Geschlechtern, normiert auf den Mittelwert der WT Kontrollen.

Die IF-Färbung des Liganden Postn in der Haut zeigte ein sehr heterogen verteiltes Signal. Eine positive Färbung war in den Kontrollgruppen und den behandelten Gruppen aller Genotypen sowohl unterhalb der Epidermis, als auch in der tieferen Dermis und um die Haarfollikel herum zu sehen (s. Abb. 74). Die Quantifizierung der Postn Färbung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern weder in den Kontrollmäusen, noch in den IMQ-behandelten Mäusen. Auch zwischen den Kontrollgruppen und den IMQ-behandelten Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen (s. Abb. 75).

Der Postn ELISA vom Plasma zeigte, dass es innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen (Vaseline und Imiquimod) zu leichten Unterschieden zwischen den Geschlechtern und Genotypen kam. So zeigten bei den Vaseline-behandelten Mäusen die *Stab1*^{-/-} Männchen das höchste Postn Signal. Bei den IMQ-behandelten Mäusen gab es keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern, auch hier zeigten die *Stab1*^{-/-} Mäuse, sowohl bei den Männchen, als auch bei den Weibchen das tendenziell stärkste Postn Signal (s. Abb. 76 A).

Bei den Männchen zeigte sich in der Kontrollgruppe ein signifikant erhöhtes Postn Level in den *Stab1*^{-/-} Mäusen, welches durch die Behandlung mit IMQ signifikant abnahm. Bei den Weibchen zeigte sich nach der Behandlung mit IMQ in den Stabilin-KOs ein signifikant höheres Postn Level als in den WT Mäusen (s. Abb. 76 B).

Bei Außerachtlassung der Geschlechter zeigte sich, dass in der Kontrollgruppe *Stab1*^{-/-} Mäuse ein signifikant erhöhtes Postn Level zeigten im Vergleich zu den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen. Die Behandlung mit IMQ führte in WT und *Stab1*^{-/-} Mäusen zu einer signifikanten Abnahme des Postn Levels. In der IMQ-behandelten Gruppe zeigten beide Stabilin-KOs signifikant mehr Postn als die WT Mäuse (s. Abb. 76 C).

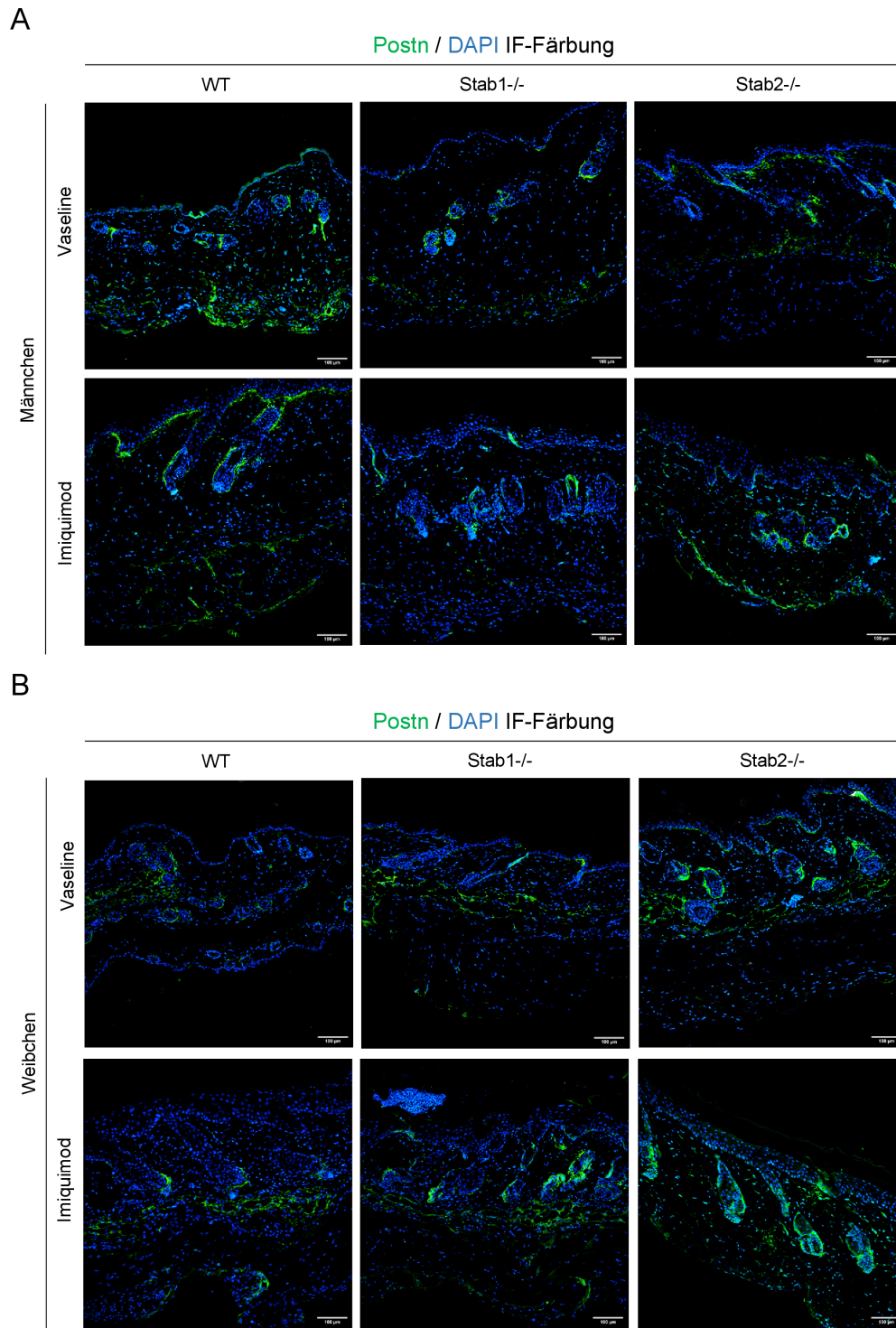


Abb. 74: IF-Färbung von Postn der Haut von IMQ-behandelten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Hautschnitten von Vaseline- und IMQ-behandelten (A) Männchen und (B) Weibchen. Der Maßstab entspricht 100 µm.

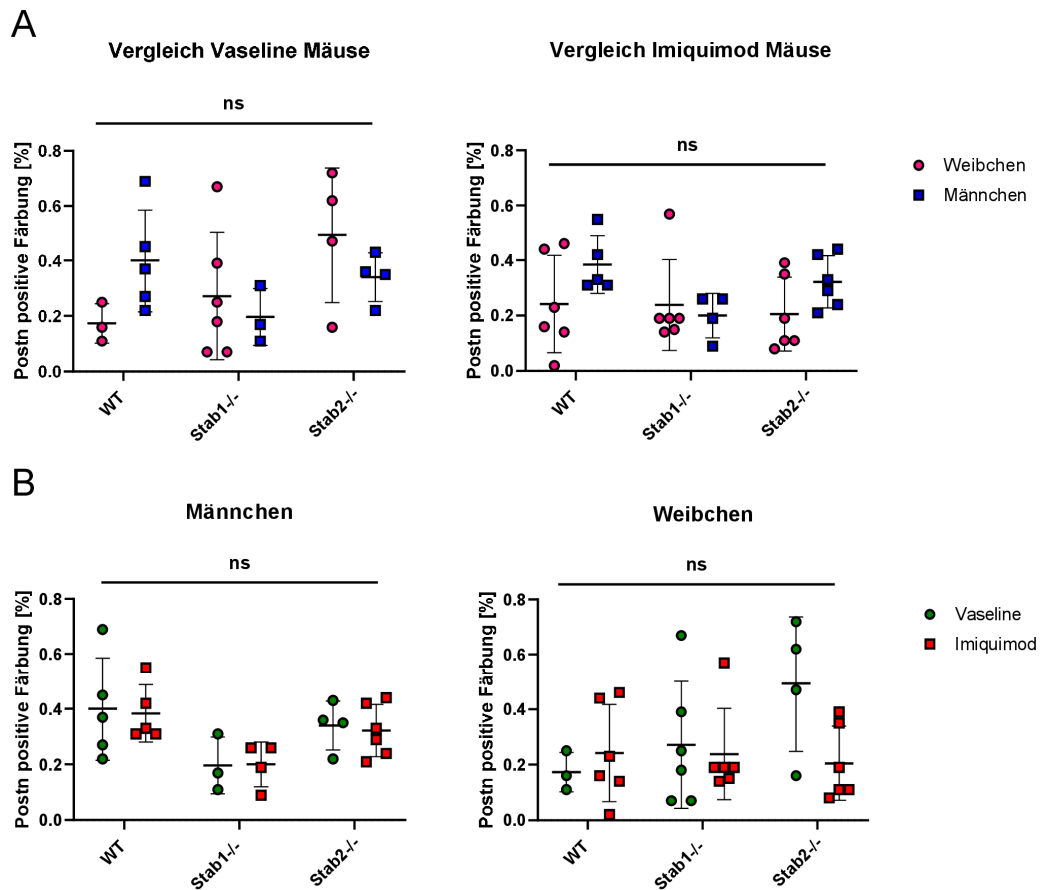


Abb. 75: Quantifizierung der Postn IF-Färbung der Haut von IMQ-behandelten Mäusen. (A) Vergleich des Postn Signals zwischen Männchen und Weibchen in Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen. (B) Vergleich des Postn Signals zwischen Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen nach Geschlechtern getrennt.

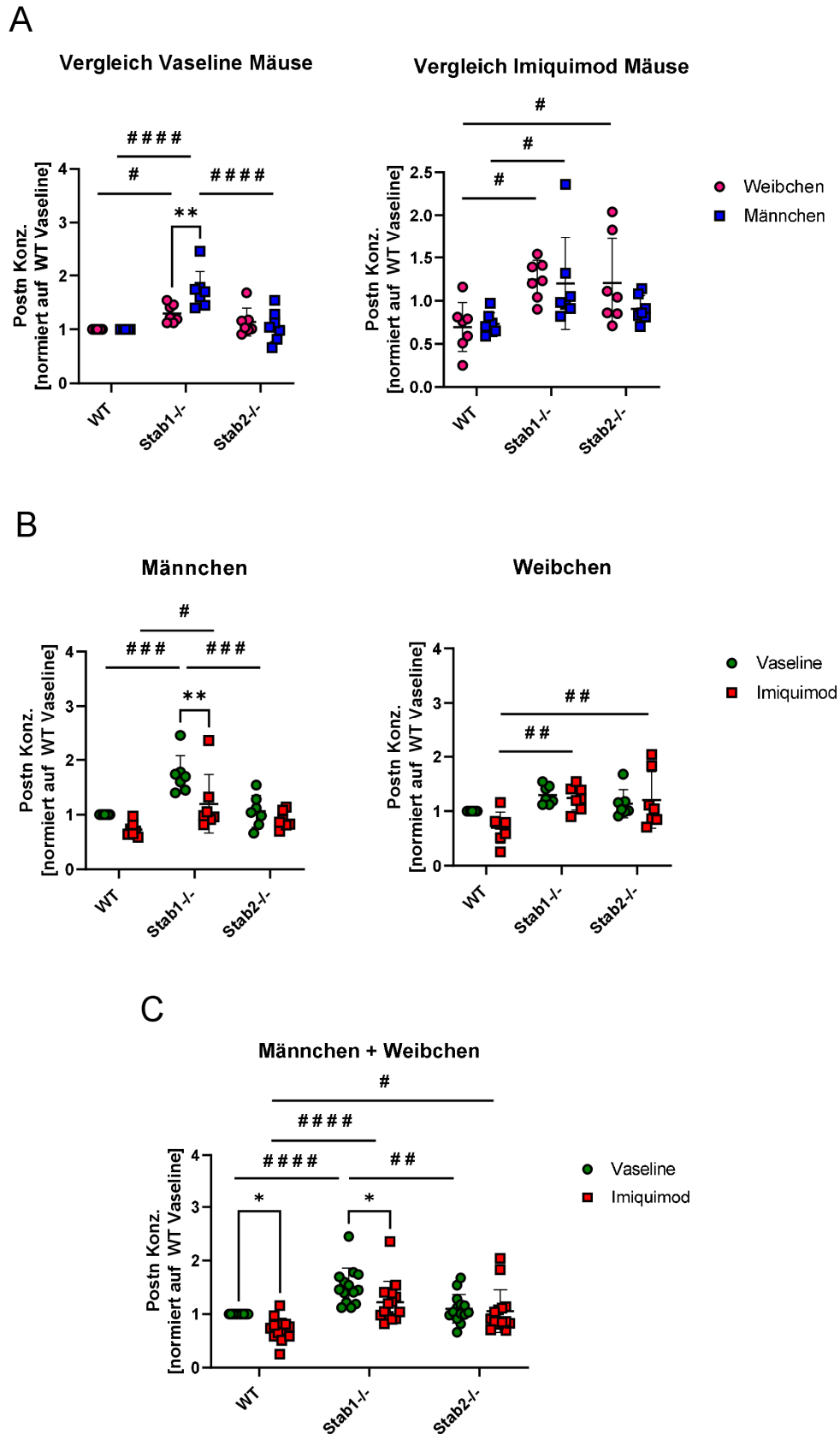


Abb. 76: Postn Analyse aus Plasma von IMQ-behandelten Mäusen. (A) Vergleich des Postn Levels zwischen Männchen und Weibchen in Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen, normiert auf den Mittelwert der WT Kontrollen. (B) Vergleich des Postn Levels zwischen Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen nach Geschlechtern getrennt, normiert auf den Mittelwert der WT Kontrollen. (C) Vergleich des Postn Levels zwischen Vaseline- und IMQ-behandelten Mäusen mit beiden Geschlechtern, normiert auf den Mittelwert der WT Kontrollen.

3.4 Bleomycin Behandlung

3.4.1 Einfluss auf die Histologie der Haut

Die histologische Färbung H&E der Haut zeigte deutlich, dass die subkutane Injektion des Chemotherapeutikums Bleomycin in allen drei Genotypen zu stark toxischen Effekten in der Haut führte. So waren in allen drei Genotypen nach der Behandlung mit Bleomycin nekrotische Keratinozyten und starke Entzündungsreaktionen in Form von Pusteln mit Infiltraten neutrophiler Granulozyten zu sehen. Es kam in allen behandelten Mäusen zu einer Verdickung der Hornschicht und teilweise zu einer Parakeratose mit Spongiose (s. Abb. 77).

Durch die Behandlung mit Bleomycin nahm die dermale Dicke in allen drei Genotypen nur geringfügig, aber nicht signifikant zu (s. Abb. 78 A). Die epidermale Dicke jedoch stieg in allen drei Genotypen durch die Behandlung mit Bleomycin signifikant an (s. Abb. 78 B). Zwischen den Genotypen innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen waren weder in Bezug auf die dermale, noch auf die epidermale Dicke, Unterschiede zu sehen (s. Abb. 78).

Die histologischen Färbungen EvG (s. Abb. 79) und Masson Trichrom (s. Abb. 80 – 81) zeigten neben der starken Zunahme der epidermalen Dicke, außerdem die Verdickung der Kollagenfasern und das somit einhergehende dichtere Bindegewebe nach der Bleomycin Behandlung in allen drei Genotypen. Des Weiteren war in der Masson Trichrom Färbung zu sehen, dass es durch die Behandlung mit Bleomycin zu einem starken Verlust der Haarfollikel kam (s. Abb. 80).

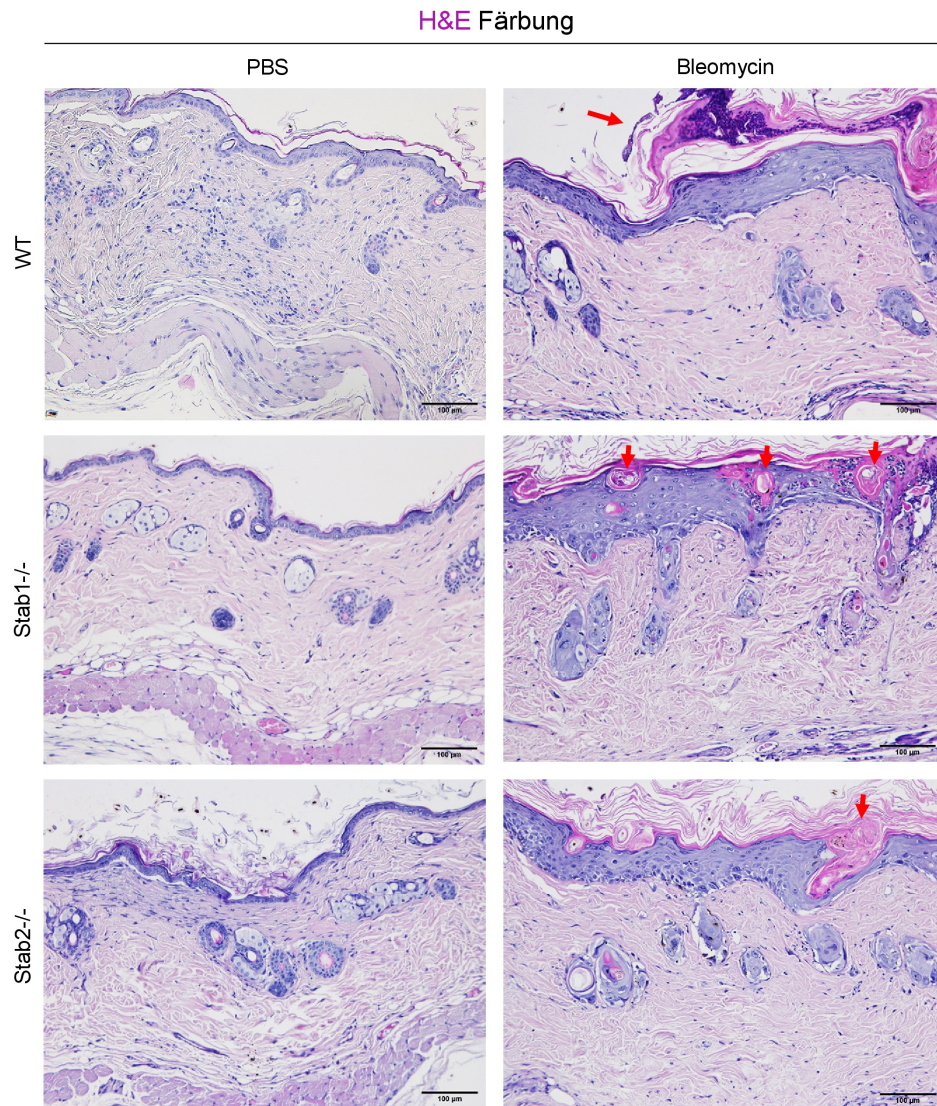


Abb. 77: H&E Färbung der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Hautschnitten von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Die Maßstabelleiste entspricht 100 µm. Rote Pfeile markieren die toxischen Effekte des Bleomycins in der Epidermis.

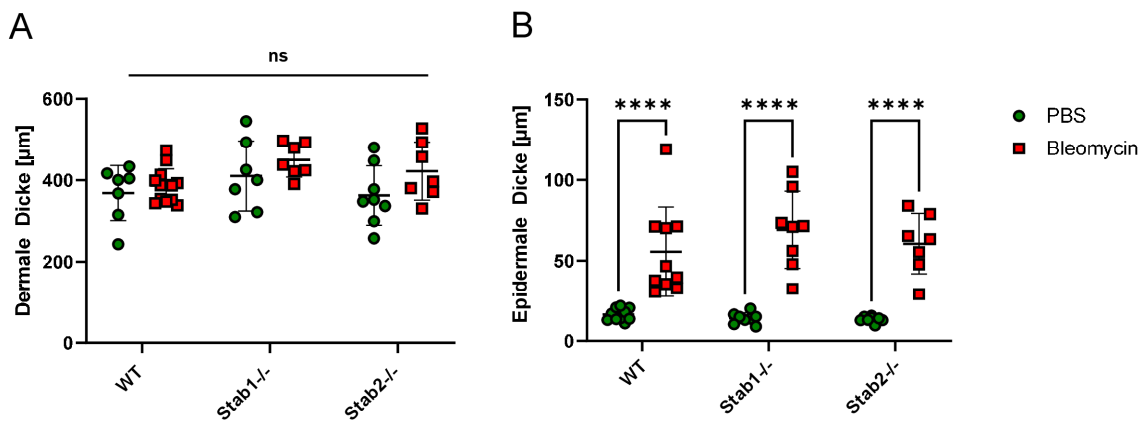


Abb. 78: Dermale und epidermale Dicke der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen. (A) Quantifizierung der dermalen Dicke der Haut von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. (B) Quantifizierung der epidermalen Dicke der Haut von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen.

EvG Färbung

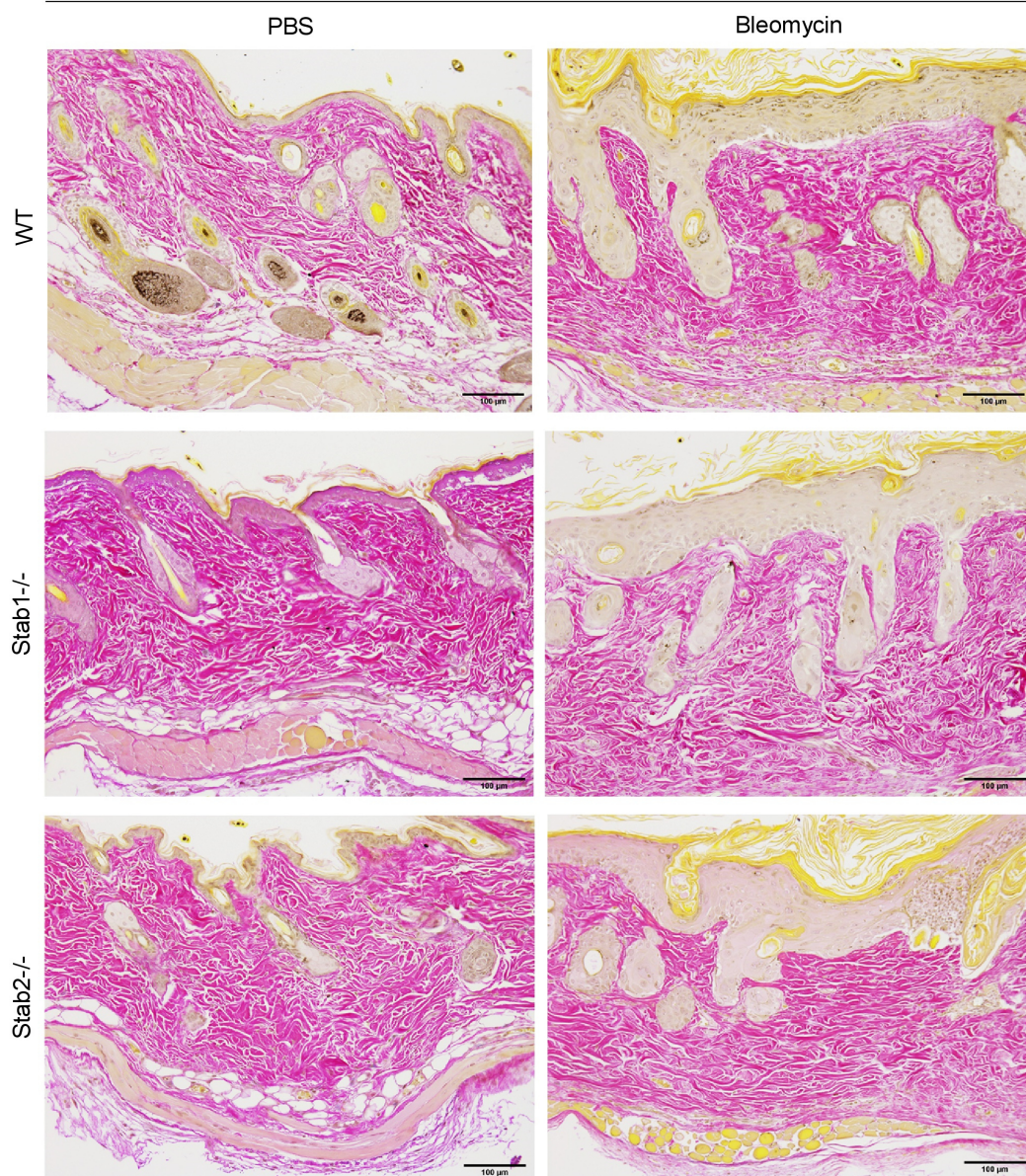


Abb. 79: EvG Färbung der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Hautschnitten von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 100 µm.

Masson Trichrom Färbung

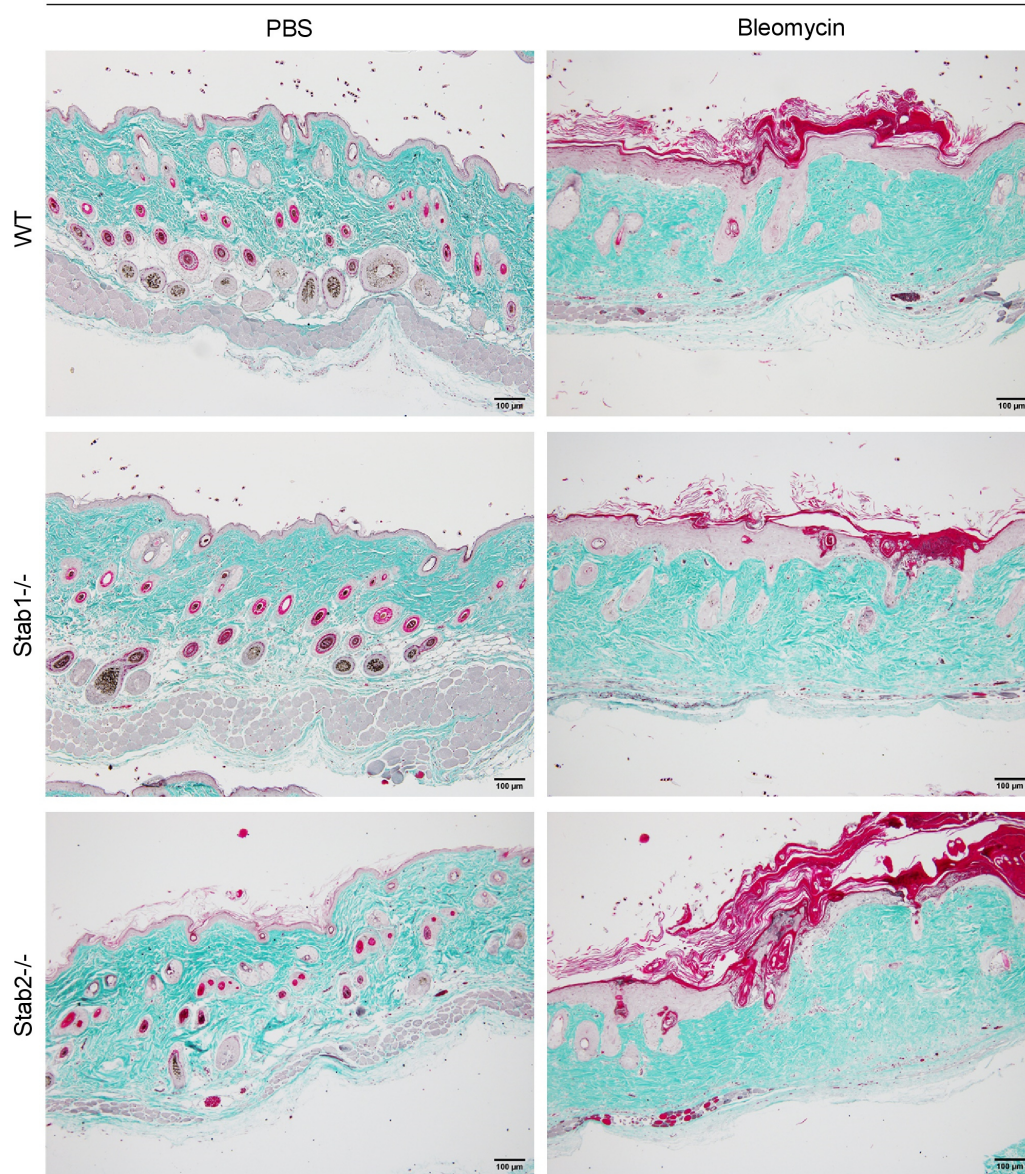


Abb. 80: Masson Trichrom Färbung der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen. Repräsentative Auswahl von Hautschnitten von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 100 µm.

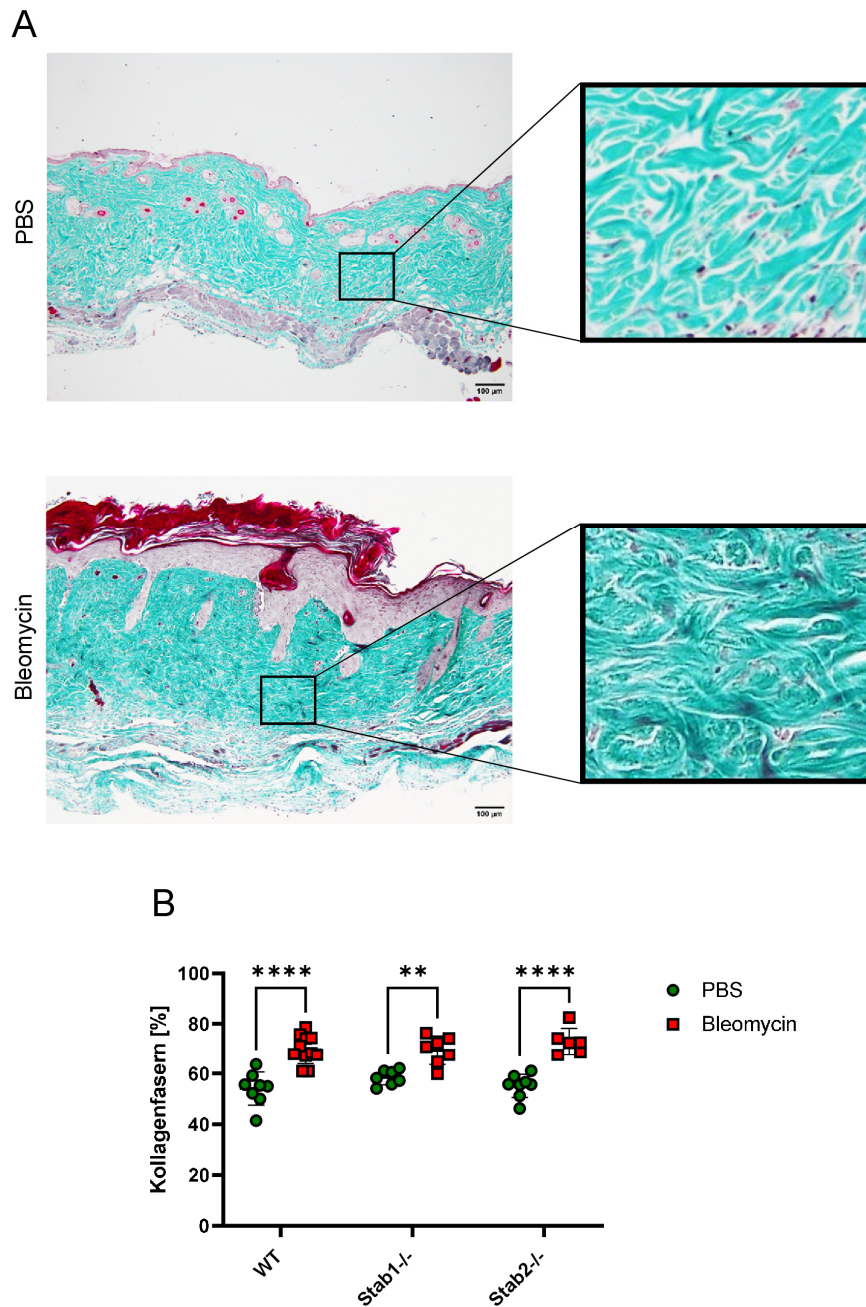


Abb. 81: Veränderung des Bindegewebes durch die Behandlung mit Bleomycin. (A) Vergrößerung eines Ausschnittes des Bindegewebes einer PBS-behandelten und einer Bleomycin-behandelten WT Maus (B) Quantifizierung der Kollagenfasern von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen.

3.4.2 Einfluss auf andere Organe

Die subkutane Injektion von Bleomycin hatte auch einen Einfluss auf andere Organe. Die histologische Färbung H&E der Lunge zeigte, dass die Behandlung mit Bleomycin die Morphologie der Alveolen veränderte und es zu einer Abnahme der Alveolen-Fläche in allen drei Genotypen kam, diese Abnahme war nur in WT Mäusen signifikant. In manchen Mäusen waren Immuneinfiltrate zu sehen (s. Abb. 82). Die histologische Färbung Sirius Rot der Lunge zeigte in den WT Mäusen eine leichte, aber nicht signifikante, Zunahme von Kollagen. In den Stabilin-defizienten Mäusen zeigte die Lunge durch die Behandlung von Bleomycin keine Veränderungen (s. Abb. 83).

Die histologische Färbung Sirius Rot der Niere zeigte, dass es bereits in *Stab2*^{-/-} Kontrollmäusen zu einer signifikant verstärkten Kollagenablagerung in den Glomeruli kam, im Gegensatz zu den WT und *Stab1*^{-/-} Kontrollmäusen. Auch in den Bleomycin-behandelten Mäusen zeigte sich dieses Phänomen, allerdings war in den behandelten Mäusen der Unterschied nur noch zu den WT Mäusen signifikant (s. Abb. 84).

Die histologische Färbung PAS der Niere zeigte keine Auffälligkeiten oder Unterschiede, weder zwischen den Genotypen, noch zwischen den beiden Behandlungsgruppen (s. Abb. 85).

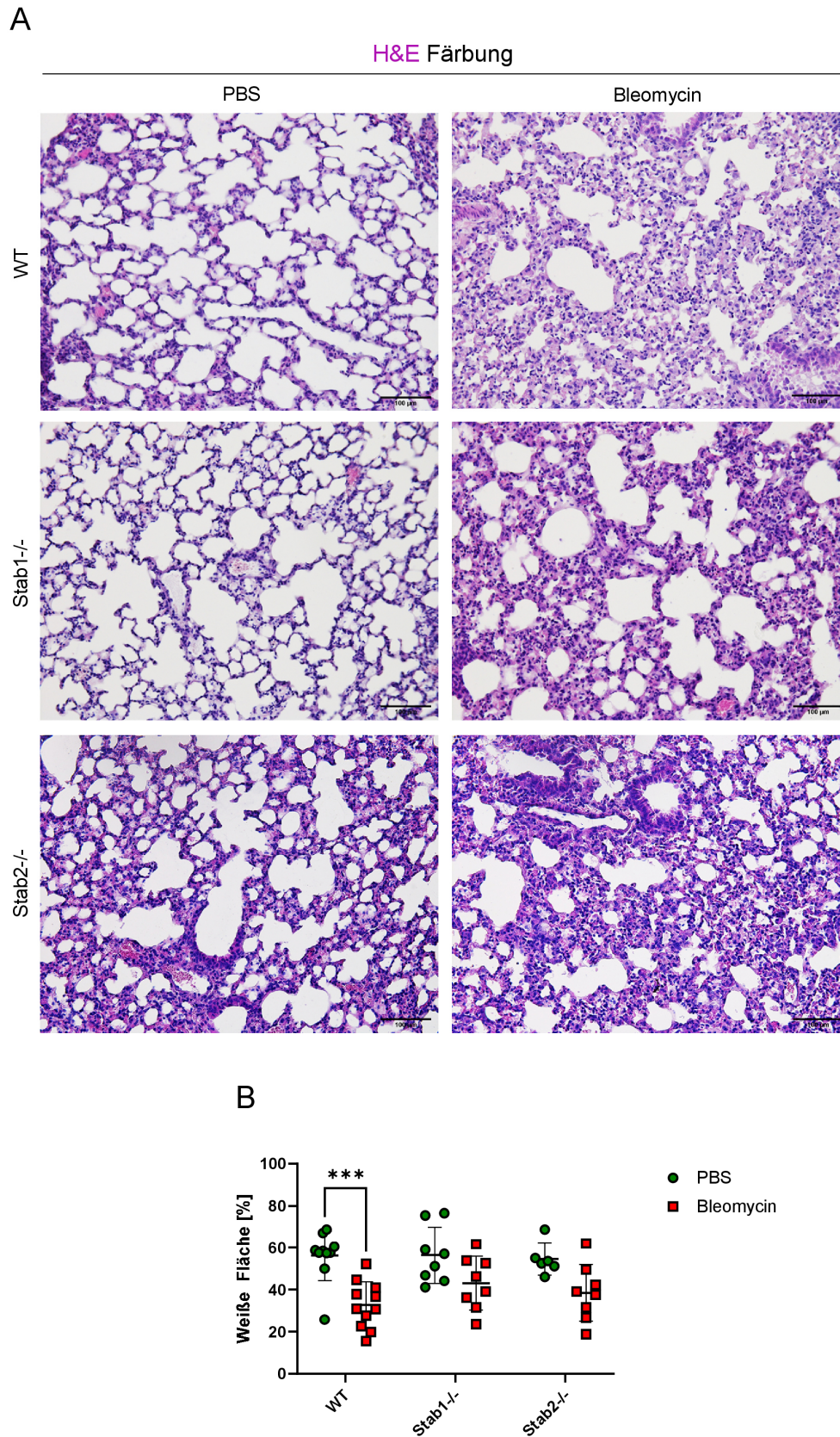


Abb. 82: H&E Färbung der Lunge von Bleomycin-behandelten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Lungenschnitten von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. (B) Quantifizierung der alveolaren Fläche (weiße Fläche).

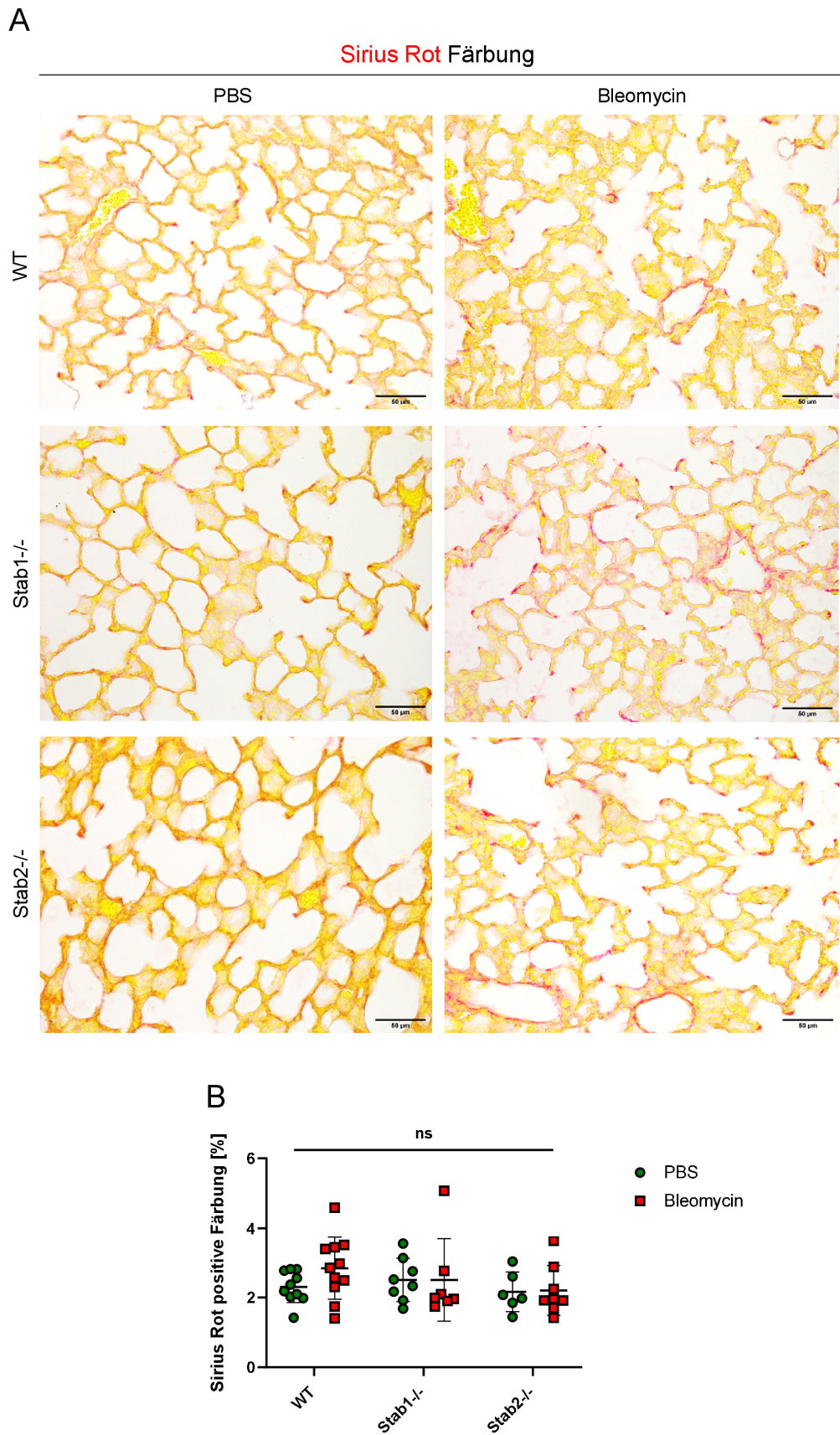
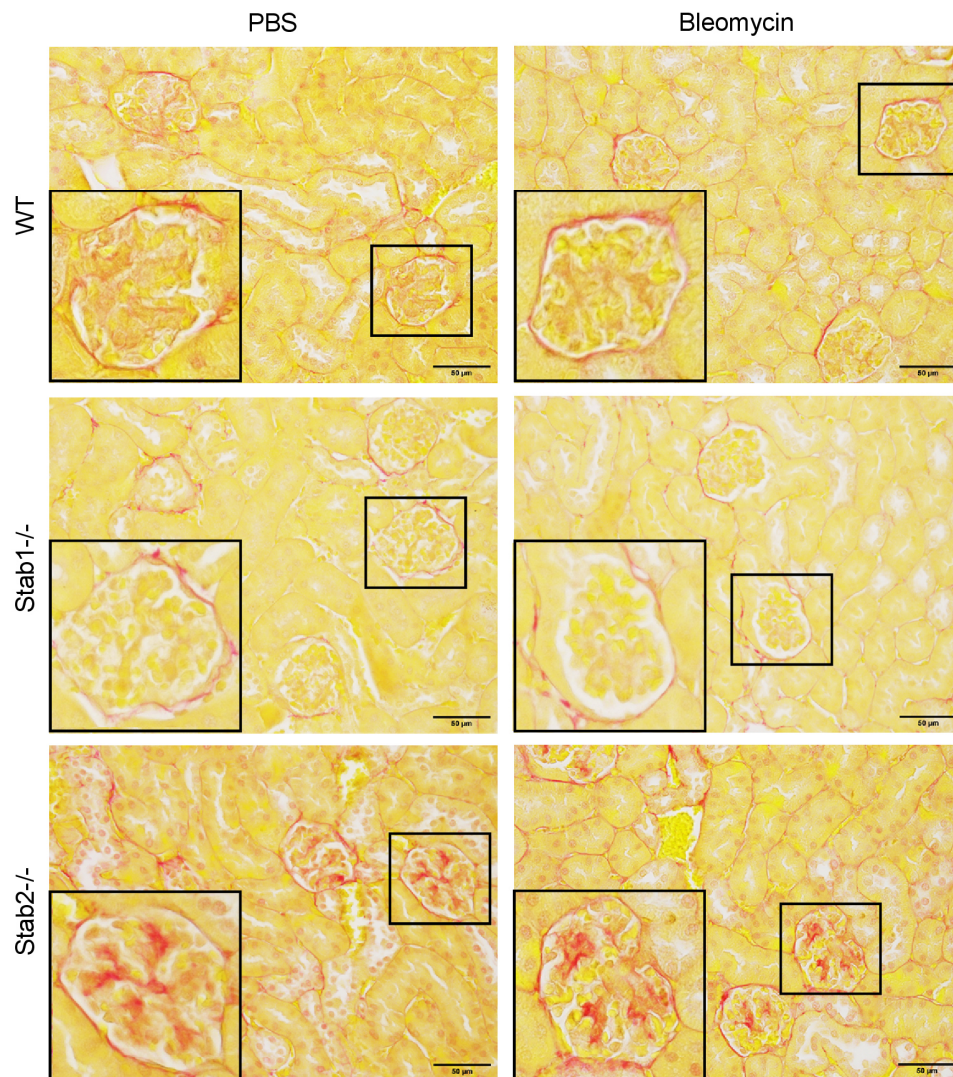


Abb. 83: Sirius Rot Färbung der Lunge von Bleomycin-behandelten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Lungenschnitten von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 50 µm. (B) Quantifizierung der Sirius Rot positiven Färbung.

A

Sirius Rot Färbung



B

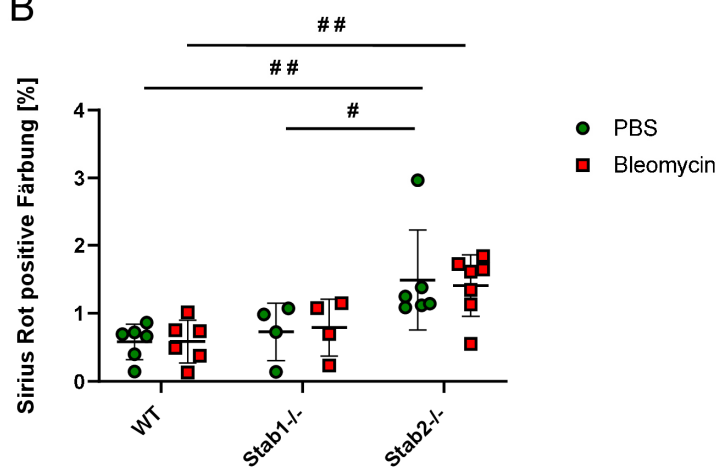


Abb. 84: Sirius Rot Färbung der Niere von Bleomycin-behandelten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Nierenschnitten von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 50 μm. (B) Quantifizierung der Sirius Rot positiven Färbung.

PAS Färbung

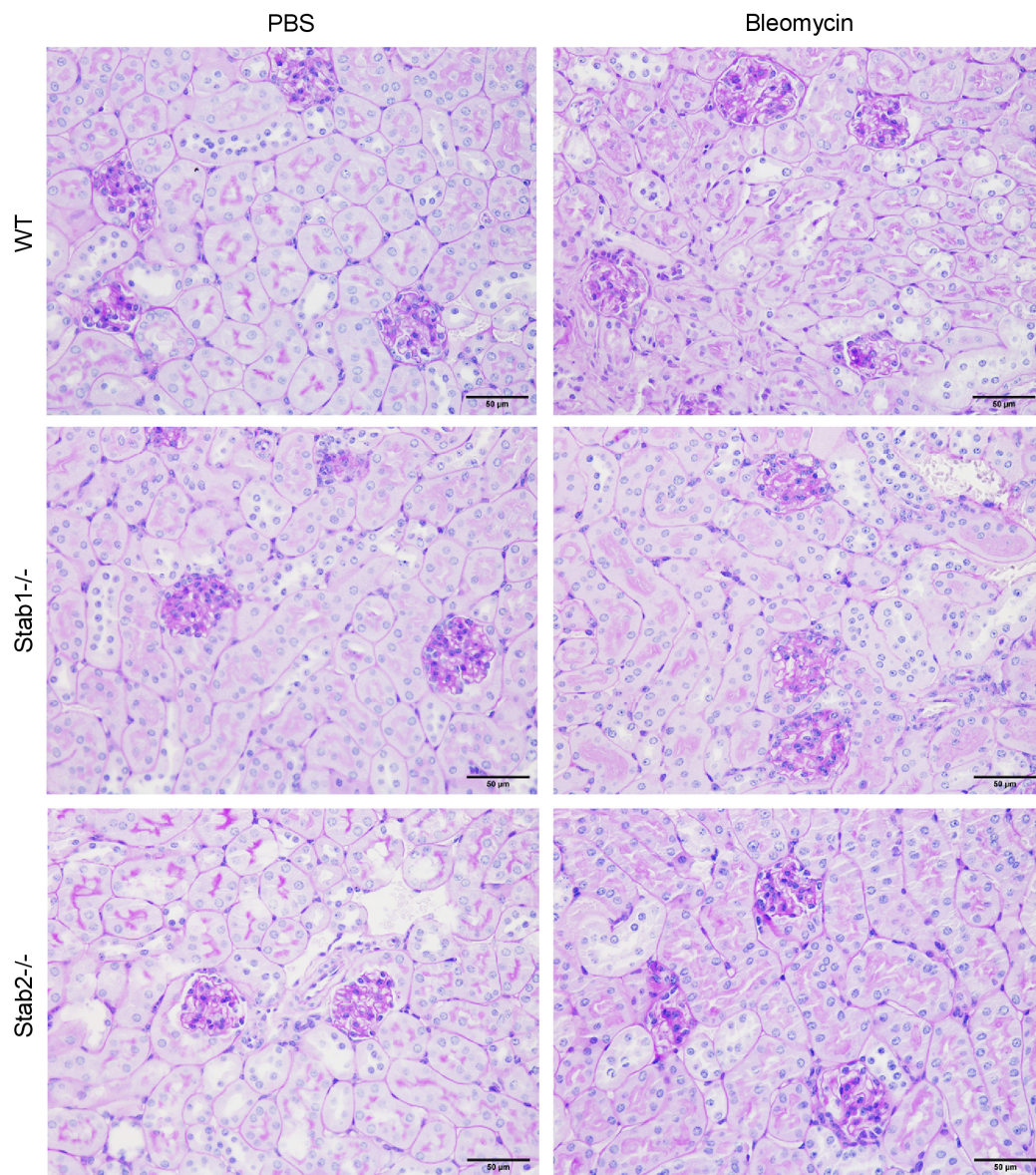


Abb. 85: PAS Färbung der Niere von Bleomycin-behandelten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Nierenschnitten von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Die Maßstabelle entspricht 50 μm.

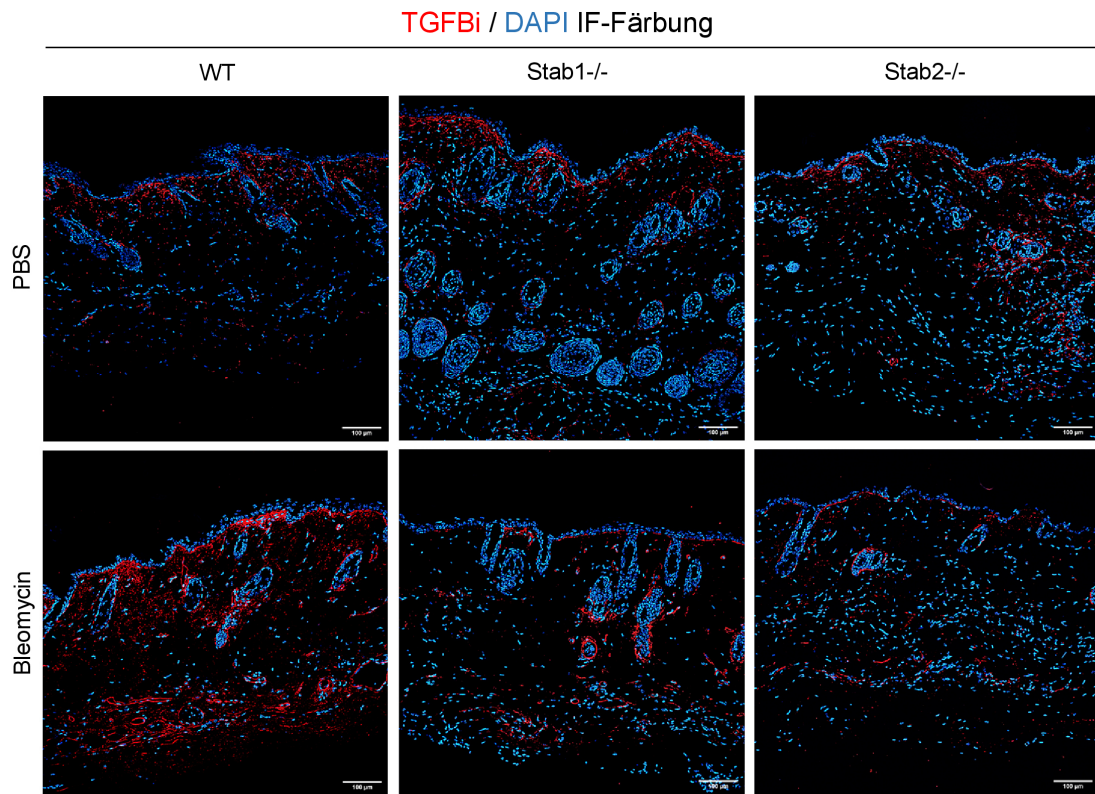
3.4.3 Einfluss auf die Liganden TGF β 1 und Postn

Die IF-Färbung des Stabilin Liganden TGF β 1 in der Haut zeigte ein sehr heterogen verteiltes Signal in der Basalmembran und der darunterliegenden Dermis. In der Kontrollgruppe gab es zwischen den Genotypen keine Unterschiede. Durch die Behandlung mit Bleomycin stieg das TGF β 1 Signal nur in den WT und den *Stab1*^{-/-} Mäusen an, dieser Anstieg war allerdings nur in den WT Mäusen signifikant. Auf die *Stab2*^{-/-} Mäuse hatte die Behandlung mit Bleomycin keinen Einfluss. In der Bleomycin-behandelten Gruppe zeigten *Stab1*^{-/-} Mäuse ein signifikant erhöhtes TGF β 1 Signal im Vergleich zu den *Stab2*^{-/-} Mäusen (s. Abb. 86).

Der TGF β 1 ELISA vom Plasma der Mäuse zeigte, dass in der Kontrollgruppe *Stab1*^{-/-} Mäuse ein signifikant erhöhtes Level an TGF β 1 hatten, im Vergleich zu den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen. Durch die Behandlung mit Bleomycin kam es in allen drei Genotypen zu einer Abnahme des TGF β 1 Levels, diese Abnahme war allerdings nur in *Stab1*^{-/-} Mäusen signifikant (s. Abb. 87 A).

Die TGF β 1 Western Blots aus Haut isoliertem Protein zeigten ein sehr heterogenes Signal. Auch die Banden der Ladekontrolle GAPDH waren sehr heterogen. Aufgrund der schlechten Qualität war es nicht möglich, die Western Blots auszuwerten (s. Abb. 87 B).

A



B

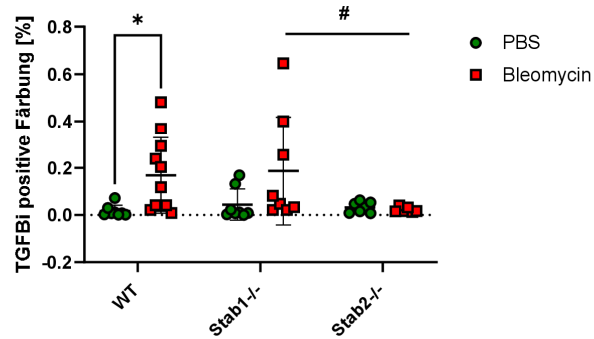


Abb. 86: IF-Färbung von TGFBi in der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Hautschnitten von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Die Maßstableiste entspricht 100 μ m. (B) Quantifizierung der TGFBi positiven Färbung.

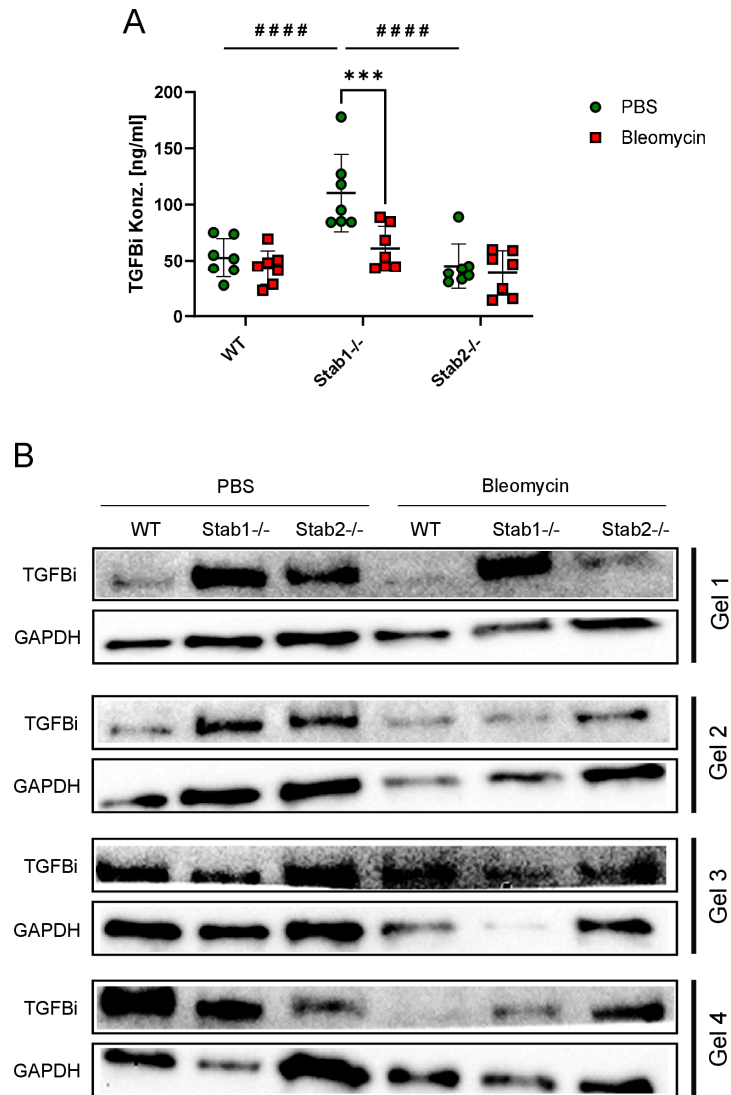


Abb. 87: TGFβ1 Analyse aus Plasma und Hautprotein von Bleomycin-behandelten Mäusen. (A) Quantifizierung von TGFβ1 ELISA aus Plasma. (B) TGFβ1 Western Blots von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Für jeden Blot wurden unterschiedliche Mäuse verwendet.

In der IF-Färbung des Stabilin Liganden Postn in der Haut war in den Kontrollmäusen vorwiegend ein Signal in der tieferen Dermis und um die Haarfollikel herum zu sehen. Nach der Behandlung mit Bleomycin war das Postn Signal nur noch direkt unterhalb der Epidermis zu sehen.

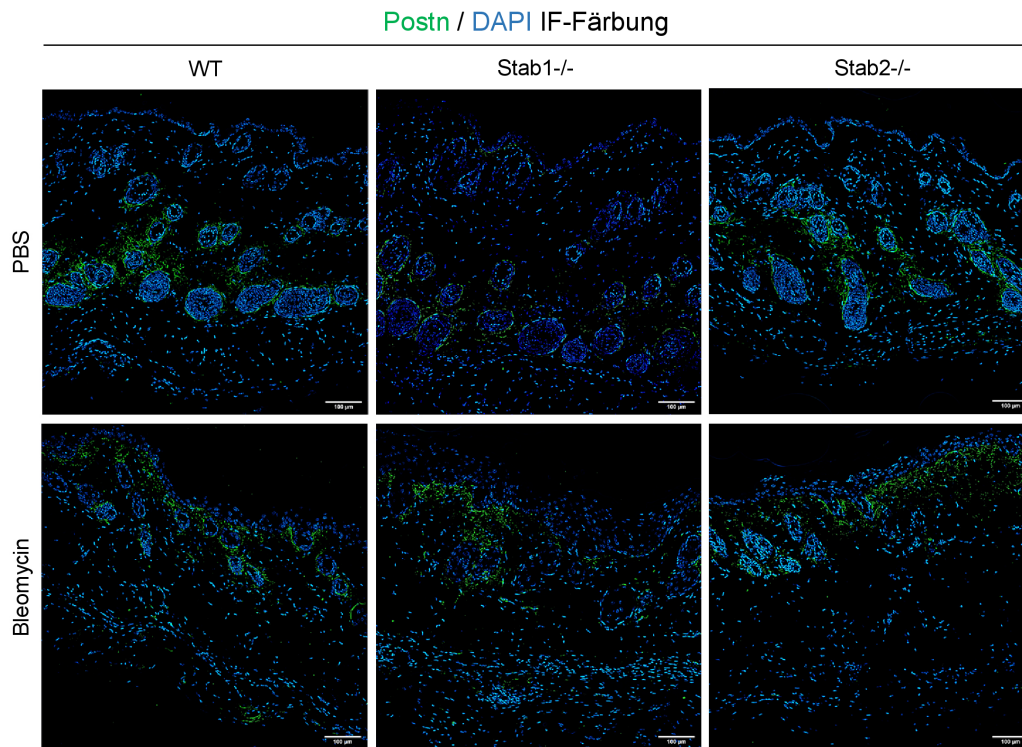
Sowohl die WT Kontrollmäuse, als auch die mit Bleomycin behandelten WT Mäuse zeigten ein leicht erhöhtes, aber nicht signifikantes, Postn Signal im Vergleich zu den Stabilin-defizienten Mäusen. Durch die Behandlung mit Bleomycin kam es jedoch in keinem der drei Genotypen zu Veränderungen (s. Abb. 88).

Der Postn ELISA vom Plasma der Mäuse zeigte, dass in der Kontrollgruppe *Stab1^{-/-}* Mäuse ein signifikant erhöhtes Level an Postn zeigten, im Vergleich zu den WT und

den *Stab2*^{-/-} Mäusen. Durch die Behandlung mit Bleomycin kam es in allen drei Genotypen zu einer Abnahme des Postn Levels. In WT und *Stab1*^{-/-} Mäusen war diese Abnahme signifikant. Bei den mit Bleomycin behandelten Mäusen zeigten *Stab2*^{-/-} Mäuse ein signifikant erhöhtes Postn Level im Vergleich zu den WT Mäusen (s. Abb. 89 A).

Ebenso wie die TGFB β Western Blots zeigten auch die Postn Western Blots, von aus Haut isoliertem Protein, ein sehr heterogenes Signal (s. Abb. 89 B). Aufgrund der schlechten Qualität war es nicht möglich, die Western Blots auszuwerten

A



B

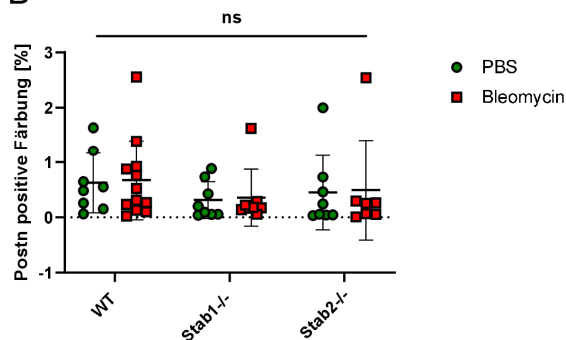


Abb. 88: IF-Färbung von Postn in der Haut von Bleomycin-behandelten Mäusen. (A) Repräsentative Auswahl von Hautschnitten von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μm. (B) Quantifizierung der Postn positiven Färbung.

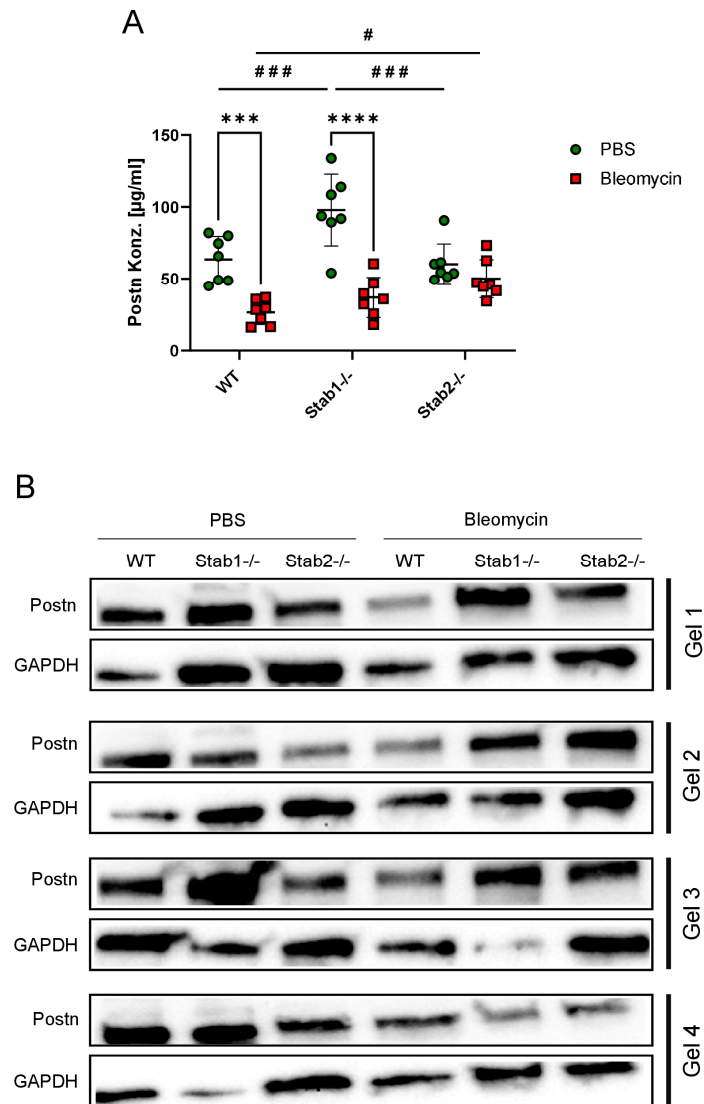


Abb. 89: Postn Analyse aus Plasma und Hautprotein von Bleomycin-behandelten Mäusen. (A) Quantifizierung von Postn ELISA aus Plasma. (B) Postn Western Blots von PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen. (C) Quantifizierung der Western Blots. Für jeden Blot wurden unterschiedliche Mäuse verwendet.

4 DISKUSSION

4.1 Der Einfluss von Stabilin-1 und Stabilin-2 in inflammatorischen und fibrotischen Erkrankungen der Leber

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der gleichzeitige genetische Knockout der beiden Scavenger Rezeptoren Stabilin-1 und Stabilin-2 (*Stab1/Stab2*^{-/-}) einen Einfluss auf die Leber und die Niere hat und es durch den Doppel-Knockout zu einer schweren renalen Glomerulofibrose und einer leichten perisinusoidalen Fibrose kommt (Schledzewski et al., 2011), während die Niere weder in *Stab1*-KO noch in *Stab2*-KO geschädigt zu sein schien. Nach diesem Ergebnis stellte sich die Frage, welchen Einfluss ein einzelner Knockout von Stabilin-1 oder Stabilin-2 auf die Leber in präklinischen Krankheitsmodellen hat.

Die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) kann als pandemische Lebererkrankung unserer Zeit betrachtet werden (Machado et al., 2015; Kucsera et al., 2021). NASH ist gekennzeichnet durch Leberzellschädigung / -tod, Entzündung und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Leberfibrose (Machado et al., 2015; Singh et al., 2015). Bisher gibt es noch kein optimales Modell, welches alle Teilaspekte einer typischen NASH abdeckt. Um mehrere Merkmale einer NASH zu untersuchen, wurden zwei Fütterungsmodelle angewendet und miteinander verglichen: Eine Gruppe von Mäusen wurde für zwei Wochen mit einer Methionin-Cholin-defizienten Diät (MCD) gefüttert und eine andere Gruppe über eine Dauer von zehn Wochen mit einer Cholin-defizienten, L-Aminosäure-definierten Diät (CDAA) gefüttert. Es ist bekannt, dass MCD in Mäusen eine schnelle und sehr schwere Form einer Steatohepatitis induziert und dabei eher die entzündlichen Aspekte einer NASH zeigt (Itagaki et al., 2013; Matthews et al., 2021; Varela-Rey et al., 2009), während CDAA stärker die fibrotischen Aspekte beleuchtet (Wei et al., 2020).

4.1.1 Die Bedeutung der MCD und CDAA Fütterung auf die Physiologie

Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass die Fütterung mit MCD zu einem sehr starken Gewichtsverlust (von bis zu 40 %) in Mäusen führt (Machado et al., 2015; Itagaki et al., 2013; Matthews et al., 2021; Wei et al., 2020). Dabei zeigte sich in der Arbeit

von Machado et al., die größte Gewichtsabnahme vor allem in den ersten beiden Wochen der Fütterung, in der die Gewichtsabnahme ca. 10 % pro Woche betrug, während das Gewicht in der dritten Woche der Fütterung um ca. 5 % sank und in der vierten Woche nur noch um 2,5 %. Dieser Gewichtsverlust durch die Fütterung mit MCD ist zurückzuführen auf einen Hypermetabolismus, bei dem es zu einer gesteigerten Stoffwechselaktivität kommt (Machado et al., 2015; Larsen, 2016).

Im Gegensatz dazu führt die Fütterung mit CDAA bei den Mäusen nur in den ersten zwei Wochen zu einem sehr geringen Gewichtsverlust. Danach verhält sich das Gewicht der Mäuse entsprechend dem Gewicht der Kontrollmäuse (Kucsera et al., 2021; De Minicis et al., 2014). Dies konnte auch in einem Experiment mit Ratten gezeigt werden (Tølbøl et al., 2019).

Einhergehend mit dem starken Gewichtsverlust durch die MCD Fütterung zeigen die Mäuse auch ein geringeres Leber-Körpergewicht-Verhältnis (Machado et al., 2015). Des Weiteren zeigt das Serum von MCD-gefütterten Mäusen einen starken Anstieg der Aminotransferasen ALT und AST und von Glutamat Dehydrogenase (GLDH), welche als Biomarker für Leberschädigung fungieren (Machado et al., 2015; Schomaker et al., 2020; Antoine et al., 2013). Außerdem kommt es zu einem Abfall der Glukose- und Triglyceridwerte im Serum (Machado et al., 2015). Die Arbeit von Schledzewski et al. konnte zeigen, dass *Stab1*^{-/-} Mäuse leicht erhöhte Leber Transaminasenwerte aufzeigen, im Vergleich zu WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen (Schledzewski et al., 2011). Die Arbeit von Rantakari et al. zeigte, dass es in *Stab1*^{-/-} Mäusen während der Leberschädigung (induziert durch die Behandlung mit CCl₄) zu erhöhten ALT Werten kommt im Vergleich zu den *Stab1*^{-/-} Kontrollmäusen, sowie im Vergleich zu den CCl₄ behandelten WT Mäusen (Rantakari et al., 2016).

MCD- oder CDAA-gefütterte Mäuse zeigen eine verstärkte Fettablagerung in der Leber (Ibrahim et al., 2016). Dabei zeigt sich in den CDAA-gefütterten Mäusen eine deutlich stärkere Steatose als in den MCD-gefütterten Mäusen (Van Herck et al., 2017).

In den Experimenten dieser Arbeit zeigten die MCD-gefütterten Mäuse, wie in der Literatur beschrieben, einen sehr starken Gewichtsverlust. Der von Machado et al. beschriebene Gewichtsverlust von circa 20 % in den ersten beiden Wochen (Machado et al., 2015), zeigte sich auch in unseren Ergebnissen. Aufgrund der starken Gewichtsabnahme zeigten die Mäuse auch eine starke Abnahme der Lebergewichte in allen

Genotypen. Durch die Fütterung mit MCD kam es zu verringerten Glukose-, Triglycerid- und Cholesterolverwerten im Plasma MCD-gefütterter Mäuse. Die Unterschiede, die sich zwischen den Genotypen zeigten, waren dabei nur geringfügig. Durch die Fütterung mit MCD kam es in allen Genotypen zu einem sehr starken Anstieg der Leberenzyme ALT, AST und GLDH. Ein Unterschied zwischen den Genotypen war dabei nur bei den ALT Werten zu sehen: *Stab1*^{-/-} Mäuse zeigten ein höheres ALT Level als WT und *Stab2*^{-/-} Mäuse, was übereinstimmt mit den Ergebnissen aus der Arbeit von Rantakari et al. (Rantakari et al., 2016).

Die Fütterung mit CDAA zeigte den entgegengesetzten Effekt beim Körpergewicht: Die CDAA-gefütterten Mäuse zeigten nur einen anfänglichen Gewichtsverlust innerhalb der ersten Woche, danach zeigten alle Mäuse eine Gewichtszunahme, die sich ähnlich zu der der Kontrollmäuse verhielt. Durch die Zunahme des Körpergewichtes kam es ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme des Leber- und Milzgewichtes. Zwischen den Genotypen waren dabei keine starken Unterschiede erkennbar.

Beide Modelle führten zu einer Steatohepatitis, was sich in den histologischen Färbungen H&E und Öl-Rot O zeigte. CDAA-gefütterte Mäuse entwickelten eine deutlich stärkere Steatose der Leber, als MCD-gefütterte Mäuse, was sich in der Menge und Größe der Lipidtröpfchen zeigte. Die CDAA-induzierte Steatose der Leber war auch makroskopisch erkennbar, durch die deutlich hellere Farbe der Lebern im Vergleich zu den Lebern der Kontrollmäuse, was typisch für die Fütterung mit CDAA ist (Endo et al., 2013).

Im Vergleich der beiden Modelle konnten vor allem Unterschiede hinsichtlich des Stärkegrades an Steatose in der Leber festgestellt werden. Dies liegt daran, dass beide Diäten unterschiedliche Aspekte der NASH beleuchten: Während es sich bei MCD um ein eher inflammatorisches Modell handelt, ist CDAA ein eher fibrotisches Modell. Zwischen den Genotypen waren allerdings hinsichtlich der Serumdaten und der Steatose nur leichte bis keine Unterschiede zu sehen. Die Stabilin-Defizienz scheint also keinen Einfluss auf den Fettsäuremetabolismus beziehungsweise den Grad der Steatose in diesen Modellen zu haben.

4.1.2 Die Auswirkungen der MCD und CDAA Fütterung auf die Fibrose hinsichtlich der Stabilin-Defizienz

Wie bereits oben beschrieben, handelt es sich bei MCD um ein Modell, welches die inflammatorischen Aspekte einer NASH betrachtet, wohin gegen CDAA ein Modell ist, welches die fibrotischen Aspekte beleuchtet. Die Arbeit von Schledzewski et al. konnte zeigen, dass *Stab1*^{-/-} Mäuse ein leicht erhöhtes Fibroselevel in der Leber zeigen. Für *Stab2*^{-/-} Mäuse konnte das in dieser Studie nicht nachgewiesen werden (Schledzewski et al., 2011). In der Arbeit von Rantakari et al. wurden WT und *Stab1*^{-/-} Mäuse acht Wochen lang mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) behandelt. Es wurde sowohl der Schweregrad der Fibrose nach der acht-wöchigen Behandlung untersucht, als auch die Entwicklung der Fibrose in den Mäusen während einer vier-wöchigen Regenerationsphase, nach der Behandlung mit CCl₄. Dabei zeigte ein Hydroxy-Prolin-Assay, dass in der Kontrollgruppe bereits *Stab1*^{-/-} Mäuse ein erhöhtes Kollagenlevel aufzeigen, im Vergleich zu den WT Mäusen. Der größte Unterschied im Kollagenlevel der Leber zwischen WT und *Stab1*^{-/-} Mäusen zeigt sich jedoch nach der Regenerationsphase. Während die WT Mäuse nach der Regeneration ein niedrigeres Kollagenlevel zeigen, als nach der CCl₄ Behandlung und sich somit scheinbar wieder erholen, steigt das Kollagenlevel in den *Stab1*^{-/-} Mäusen in der Regenerationsphase sogar deutlich an, im Vergleich zu dem Kollagenlevel direkt nach der CCl₄ Behandlung (Rantakari et al., 2016).

In den hier durchgeführten Versuchen zeigten sowohl *Stab1*^{-/-}, als auch *Stab2*^{-/-} Mäusen in den Kontrollgruppen der MCD und CDAA Fütterungen ein leicht erhöhtes Fibroselevel im Vergleich zu den WT Kontrollmäusen. Die histologische Färbung Sirius Rot zeigte sowohl bei der MCD als auch bei der CDAA Fütterung, dass vor allem *Stab1*^{-/-} Mäuse ein signifikant höheres Fibroselevel zeigten als die WT und auch die *Stab2*^{-/-} Mäuse. Auch der Kollagenassay zeigte in den Kontrollgruppen der beiden Fütterungsmodellen in beiden Stabilin-KOs ein erhöhtes Fibroselevel im Vergleich zu den WT Mäusen.

Sowohl Stabilin-1, als auch Stabilin-2 binden Kollagen Propeptide (Manta et al., 2022; Lit et al., 2011; Sørensen et al., 2015), daher könnte es sich bei dem vermehrten Fibrose-Signal in den Kontrollmäusen der Stabilin-KOs auch um eine veränderte lokale oder systemische Clearance von Kollagenpeptiden handeln, welche verstärkte Kollagenablagerungen im Disse-Raum zur Folge haben könnte.

Ein weiterer möglicher Grund für den erhöhten Ausgangsfibrosegrad in *Stab1*^{-/-} Mäusen könnten Histozytenveränderungen sein, was genauer in Abschnitt 4.1.4 beschrieben wird. In der Arbeit von Rantakari et al. wurde gezeigt, dass der Knockout von Stabilin-1 einen Einfluss auf die Makrophagen hat, was dazu führt, dass das profibrotische Chemokin CCL3 in der Leber signifikant ansteigt, was eine mögliche Erklärung dafür sein könnte, dass in *Stab1*^{-/-} Mäusen baseline ein erhöhtes Fibroselevel in der Leber zu beobachten ist (Rantakari et al., 2016).

Wie in Abschnitt 4.1.5 beschrieben, zeigen auch die Liganden TGFB β 1 und Postn einen gewissen Einfluss auf die Fibrose. Durch die Defizienz einer der beiden Stabiline und den damit einhergehend vermehrten zirkulierenden oder auch lokal abgelagerten Liganden könnte es zu einer Aktivierung der Fibrose kommen. Da TGFB β 1 ebenfalls ein Kollagen-bindendes Protein ist (Decaris et al., 2015), könnte das vermehrte Vorhandensein von TGFB β 1 zusätzlich zu einer verstärkten Kollagenablagerung führen.

Durch die Fütterung mit MCD stieg in allen drei Genotypen der Kollagengehalt im Vergleich zu den Kontroll-gefütterten Mäusen an. Auch nach der Fütterung mit MCD zeigten die Stabilin-defizienten Mäuse ein höheres Fibroselevel als die WT Mäuse.

Die Fütterung mit CDAA hatte allerdings einen anderen Effekt auf das Fibroselevel: Nach der Fütterung befanden sich alle drei Genotypen auf einem ähnlich hohen Level an Fibrose, dies bestätigte sich sowohl durch die Sirius Rot Färbung, als auch durch den Kollagenassay. Insgesamt war die Fibroseinduktion durch die Fütterung mit CDAA in allen Genotypen deutlich stärker als durch die Fütterung mit MCD.

Für die leicht unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Fibrosegrade nach den beiden Fütterungen gibt es mehrere Erklärungsansätze: Da bei der MCD Fütterung nur die initiale, entzündliche Phase der Fibroseinduktion nach zwei Wochen betrachtet wird, spielt hier möglicherweise der Ausgangskollagengehalt der Leber eine größere Rolle, als die Fibroseinduktion. Ein Faktor welcher bei MCD, aber nicht bei CDAA berücksichtigt werden muss, ist der enorme Gewichtsverlust der Mäuse. Möglicherweise spielen auch Immunzellreaktionen, die bei Stabilin-defizienten Mäusen bereits beobachtet wurden (Manta et al., 2022; Rantakari et al., 2016), in diesem Modell eine größere Rolle. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Stabilin-defiziente Mäuse nicht empfindlicher gegenüber chronischen Fibrosemodellen wie CDAA sind, da hier kein Unterschied zwischen den Genotypen gesehen wurde. Dies sollte in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

Möglicherweise fungieren in den beiden Modellen unterschiedliche Fibrose-fördernde Mechanismen. So könnten die Stabiline in einem dieser Mechanismen involviert sein und in dem anderen nicht. Die CDAA Diät könnte die Funktion der Stabiline partiell herunterregulieren was dazu führen könnte, dass sich die Unterschiede die sich im MCD Modell gezeigt haben ausgleichen.

Ein alternativer Erklärungsansatz wäre eine stärkere Reaktion der WT Mäuse auf die CDAA Fütterung, sodass das niedrigere Ausgangsniveau der Fibrose sich mit der Zeit angleicht.

4.1.3 Die Auswirkungen der Fütterungsmodelle auf die Aktivierung von Perizyten und hepatischen Sternzellen in Stabilin-defizienten Mäusen

In einer gesunden Leber machen ruhende, also nicht aktivierte, hepatische Sternzellen (HSCs) ca. 8 – 14 % der Leberzellpopulation aus. Während einer chronischen Leberschädigung jedoch, sind aktivierte HSCs und portale Myofibroblasten die primären Zelltypen, die an der fibrogenen Antwort beteiligt sind. Nach einem fibrogenen Stimulus, transdifferenzieren die nicht aktivierten HSCs in einen Myofibroblasten-ähnlichen Zelltyp und werden dann als aktivierte HSCs bezeichnet (Kumar et al., 2018).

Aktivierte HSCs produzieren im Gegensatz zu ruhenden HSCs α -SMA sowie Kollagen Typ I und sekretieren pro-fibrotische Zytokine und Inhibitoren von Matrix-degradierenden Enzymen, was zur Folge hat, dass es zu einer Ablagerung von extrazellulärer Matrix kommt (Kisseleva et al., 2006; Bataller et al., 2005; Lin et al., 2009).

Die Arbeit von Machado et al. zeigte auf mRNA Ebene und durch IHC-Färbung der Leber, dass es in männlichen WT Mäusen nach einer acht-wöchigen Fütterung mit MCD, zu einem signifikanten Anstieg von α -SMA und Desmin in der Leber und somit zu einer verstärkten Sternzell-Aktivierung kommt, im Vergleich zu den Kontroll-gefütterten Mäusen (Machado et al., 2015). In der Arbeit von Schierwagen et al. konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es nach einer sieben-wöchigen MCD Fütterung zu einem leichten Anstieg des α -SMA Signals in der Leber kommt. Auf mRNA Ebene war dieser Anstieg nur sehr geringfügig und die Quantifizierung der IHC-Färbung zeigte eine sehr hohe Standardabweichung (Schierwagen et al., 2015).

Eine weitere Studie, in der die Mäuse nur für drei Wochen mit MCD gefüttert wurden und somit besser vergleichbar mit unserem Modell ist, zeigte in einem Western Blot

von Leberprotein, dass sich zwischen den MCD-gefütterten Mäusen und den Kontrollmäusen kein Unterschied im α -SMA Level zeigte (Lee et al., 2013).

In der Arbeit von Tølbøl et al. wurden Ratten mit verschiedenen Varianten der CDAA Diät über unterschiedliche Zeiträume gefüttert. Sie zeigten durch IHC-Färbung, dass es in Ratten, die über 12 Woche mit einer normalen CDAA Diät gefüttert wurden, zu einem Anstieg von α -SMA in der Leber kommt. Dieses Ergebnis verifizierten sie auch auf mRNA Ebene für die Zeiträume 4 Wochen, 8 Wochen und 12 Wochen (Tølbøl et al., 2019).

Die Arbeit von Bae et al. zeigte mit der Quantifizierung einer IHC-Färbung, dass es in Mäusen die drei Wochen mit einer CDAA Diät gefüttert wurden, zu einem starken Anstieg des α -SMA Signals in der Leber kommt. Eine weitere Gruppe von Mäusen wurde für sechs Wochen mit CDAA gefüttert. Diese Mäuse zeigten im Vergleich zu der drei Wochen gefütterten Gruppe ein stark reduziertes α -SMA Signal (Bae et al., 2020).

In einer Studie von Nakanishi et al. war zu sehen, dass sich das α -SMA Signal nach 16 Wochen CDAA Fütterung nur geringfügig und nicht signifikant erhöhte im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Nakanishi et al., 2019).

Bei unseren Fütterungsmodellen zeigte sich weder durch die Fütterung mit MCD, noch durch die Fütterung mit CDAA ein Unterschied im α -SMA-, Desmin- oder PDGFRB-Signal in der Leber. Im Falle der MCD Fütterung, deckt sich unser Ergebnis mit dem Ergebnis der Arbeit von Lee et al., die ihre Mäuse über einen ähnlich langen Zeitraum fütterten wie wir (Lee et al., 2013). Vermutlich reicht eine Fütterung von zwei Wochen noch nicht aus, um eine Aktivierung der Sternzellen zu induzieren. Im Falle der CDAA Fütterung, war es schwer eine quantitative Aussage über unsere Ergebnisse zu treffen, da die Steatose der Leber durch die Fütterung so stark war, dass es eine Quantifizierung der Färbungen stark erschwerte, was die hohen Standardabweichungen der Desmin Färbung erklärt. Die α -SMA Färbung der CDAA-gefütterten Mäuse zeigte nur ein Signal um die großen Gefäße herum. Um die Aktivierung der Sternzellen im CDAA Modell genauer zu untersuchen und eine quantitative Aussage treffen zu können, wären weitere Analysemethoden wie zum Beispiel die Untersuchung der Sternzellmarker auf mRNA Level durch eine quantitative PCR hilfreich.

4.1.4 Die Auswirkungen von MCD auf die Immunzellreaktion in Stabilin-defizienten Mäusen

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) beinhaltet ein großes Spektrum an verschiedenen Lebererkrankungen, dazu gehört die inflammatorische Erkrankung, die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH). In diesem Stadium der Erkrankung, spielen Monozyten, Neutrophile, T-Zellen und auch Makrophagen eine wichtige Rolle (Reid et al., 2016; Heymann et al., 2016; Rantakari et al., 2016). In der Arbeit von Reid et al. wurde die dynamische Veränderung der Makrophagen in der Leber im MCD Modell untersucht. Dazu wurden die Mäuse über verschieden lange Zeiträume mit MCD gefüttert (0 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage). Mit Hilfe von FACS Analysen konnte gezeigt werden, dass es bereits nach 14 Tagen zu einem starken Anstieg von CD11b und Ly-6C positiven Zellen (also Monozyten) kommt. Nach 21 Tagen stieg die Anzahl dieser Zellen noch einmal stark an. Im Falle der Makrophagenpopulation zeigten die doppelt positiven Zellen für Ly-6C und F4/80, dass es nach 7 Tagen der MCD Fütterung zu einer leichten Abnahme der Makrophagenanzahl kam, dann aber nach 14 Tagen wieder anstieg und dann dasselbe Level wie in den Kontrollmäusen zeigten. Erst nach 21 Tagen Fütterung kam es zu einem enormen Anstieg der Makrophagen (Reid et al., 2016).

In der Arbeit von Rantakari et al. wurde, wie bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, die Rolle von Stabilin-1 während der Leberschädigung und Leberfibrose untersucht. Ein weiterer Teil dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von Makrophagen während der Leberschädigung nach der Behandlung mit CCl₄ und insbesondere der Zusammenhang zwischen Stabilin-1 und Makrophagen.

Sie zeigten, dass die Expression von Stabilin-1 dazu führt, dass Makrophagen modifizierte LDLs aufnehmen was wiederum die Sekretion des profibrotischen Chemokins CCL3 unterdrückt und dadurch zu einem reduzierten Grad an Fibrose führt. Im Umkehrschluss dazu, konnte Rantakari et al. zeigen, dass der Knockout von Stabilin-1 zu einem signifikanten Anstieg von CCL3 in der Leber führt. Dieser Mechanismus erklärt unter anderem, warum es in Stabilin-1 defizienten Mäusen auch ohne exogene Schädigung bereits zu einem erhöhten Fibroselevel in der Leber kommen kann (Rantakari et al., 2016).

In unseren Ergebnissen zeigte die IF-Färbung von Leberschnitten nach 14 Tagen MCD Fütterung keinen Unterschied in der Anzahl von F4/80 positiven Zellen. Auch

zwischen den Genotypen war kein Unterschied zu sehen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Reid et al. (Reid et al., 2016). Wie bei dieser Arbeit zeigte sich auch bei uns bereits schon nach zwei Wochen MCD Fütterung ein Unterschied im CD11b Signal. Während es bei den *Stab1*^{-/-} Mäusen durch die MCD Fütterung nur zu einem leichten, aber nicht signifikanten, Anstieg der CD11b positiven Zellen kam, stieg die Anzahl bei den WT Mäusen und den *Stab2*^{-/-} Mäusen signifikant an. Dabei zeigten die WT und *Stab2*^{-/-} Mäuse ein ähnliches Level an CD11b positiven Zellen. Scheinbar führte der Stabilin1-Knockout, zumindest hinsichtlich der CD11b Färbung, zu einer verminderten Immunreaktion. Um die Immunzellen zu charakterisieren, sollten Ko-Färbungen gemacht werden. Da bei der Einzelfärbung von CD11b keine genaue Aussage darüber gemacht werden kann, um welche Immunzellen es sich genau handelt, könnte beispielsweise mit Ly-6C / Ly-6G oder F4/80 ko-gefärbt werden. Des Weiteren könnten FACS Analysen mehr Aufschluss darüber geben, welche Immunzellen konkret durch die MCD Fütterung aktiviert werden.

Die Arbeit von Reid et al. konnte in Bezug auf viele Entzündungsmarker zeigen, dass es durch die letzte Woche der MCD Fütterung (also nach 21 Tagen) noch einmal zu einem starken Anstieg verschiedener Marker kommt, im Vergleich zu der Gruppe die nur 14 Tage gefüttert wurde (Reid et al., 2016). Daher wäre es sicher sinnvoll die MCD Fütterung über einen längeren Zeitraum durchzuführen, um somit die Entzündungsreaktion zu verstärken, um dann verschiedene Parameter zu überprüfen. Dies ist jedoch auf Grund des zu erwartenden hohen Gewichtsverlusts aus Tierschutzgründen hochgradig problematisch.

4.1.5 Die Bedeutung der Stabilin-Liganden TGFBi und Postn im Fibrosemodell

Transforming growth factor beta-induced (TGFBi) und Periostin (Postn) sind Mitglieder der Fasciclin1 (Fas1) Proteinfamilie (Runager et al., 2011; Yu et al., 2021). Die Arbeit von Manta et al. zeigte durch Plasmaproteomanalysen, dass es sich bei diesen beiden Proteinen um direkte Stabilin-Liganden handelt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Stabiline einen Einfluss auf das TGFBi und Postn Level im Plasma haben (Manta et al., 2022).

TGFBi ist ein Kollagen-bindendes Protein welches als Antwort auf die Aktivierung von *Transforming growth factor beta* (TGF β) sekretiert wird (Decaris et al., 2015). In den letzten Jahren konnten Wissenschaftler zeigen, dass TGFBi eine große Rolle in verschiedenen Krankheiten spielt. So wird TGFBi in Zusammenhang gebracht mit Nephropathie, Atherosklerose und verschiedenen Krebserkrankungen, wie zum Beispiel Lungenkrebs (Ween et al., 2012; Li et al., 2005; O'Brien et al., 1996; Manta et al., 2022; Yang et al., 2022; Corona et al., 2021). TGFBi spielt auch bei der Leberfibrose eine Rolle und wurde bereits als Gewebemarker für Leberfibrose publiziert (Baker et al., 2014).

In der Arbeit von Niu et al. wurde durch Plasmaproteomanalysen gezeigt, dass es ein Panel von fünf Plasmaproteinen gibt, welche mit den Leberenzymen ALT, AST und GLDH korrelieren, darunter auch TGFBi. Unter anderem konnten sie zeigen, dass ein erhöhter ALT Wert auch zu einem erhöhten TGFBi Wert führt, was dieses Protein bei Nicht-alkoholischen Lebererkrankungen hoch relevant macht (Niu et al., 2019). Eine weitere Publikation zeigte ebenfalls durch Plasmaanalysen, dass TGFBi auch im Menschen ein Kollagen-assoziiertes Protein ist (Decaris et al., 2015).

In dieser Arbeit zeigten die Färbungen der Leber in beiden Fütterungsmodellen (MCD und CDAA), dass in den Kontrollfuttergruppen die Stabilin-defizienten Mäuse ein leicht erhöhtes TGFBi Signal in der Leber aufwiesen im Vergleich zu den WT Mäusen.

Nach der Fütterung mit MCD stieg in der IF-Färbung das TGFBi Signal innerhalb aller Genotypen an, wobei nur MCD-gefütterte *Stab1*^{-/-} Mäuse eine Signifikanz zeigten. Dabei zeigten die *Stab1*^{-/-} Mäuse sowohl den stärksten Anstieg an TGFBi nach der MCD Fütterung, als auch das höchste TGFBi Signal im Vergleich zu den MCD-gefütterten WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen.

Nach der CDAA Fütterung stieg das TGFBi Signal in der IHC-Färbung in allen drei Genotypen deutlich an, nur in den WT Mäusen war das Signal nach der CDAA Fütterung im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Aufgrund der starken Steatose, die sich durch die CDAA Fütterung entwickelte, wurde die Auswertung der Färbung erheblich erschwert, was ein Grund für die hohen Standardabweichungen sein könnte.

Da die Quantifizierungen der Färbungen vergleichsweise hohe Standardabweichungen zeigten, wurde mit Hilfe des Simple Westerns TGFBi, normalisiert auf Geamtprotein, in der Leber quantifiziert, wodurch es anhand der molekularen Größe möglich war

die Spezifität der Färbung zu überprüfen. Dabei war zu sehen, dass es sowohl in MCD- als auch in CDAA-gefütterten Mäusen in allen drei Genotypen zu einem signifikanten Anstieg des TGFBi Levels auf einer etwaigen Höhe von 60 kDa in der Leber kam. Im MCD Modell zeigten die gefütterten *Stab1*^{-/-} Mäuse ein leicht höheres TGFBi Level als WT und *Stab2*^{-/-} Mäuse, während es im CDAA Modell zu keinen Unterschieden zwischen den Genotypen der gefütterten Mäuse kam. Somit wurden die Ergebnisse der Färbungen bestätigt und weiter präzisiert.

Wie von Baker et al., 2014 bereits beschrieben, lies sich auch in unseren Versuchen ein Zusammenhang zwischen dem TGFBi- und dem Fibroselevel vermuten. Um dies zu untersuchen wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Diese zeigten eine starke bis sehr starke Korrelation zwischen TGFBi und dem Fibroselevel in beiden Fütterungen und in allen drei Genotypen. Dabei zeigte das CDAA Modell tendenziell eine stärkere Korrelation zwischen dem TGFBi- und dem Fibroselevel als das MCD Modell. Hinsichtlich der Genotypen zeigte die Korrelationsanalyse in allen Genotypen eine Korrelation von TGFBi und der Fibrose. Dabei zeigten die WT und die *Stab2*^{-/-} Mäuse eine sehr starke Korrelation, während die *Stab1*^{-/-} Mäuse eine etwas schwächere, aber dennoch starke Korrelation zeigten.

Ein Grund für die teilweise leichten Unterschiede des TGFBi Signals in der Leber zwischen den Genotypen könnte beispielsweise ein Unterschied in der Clearance im Plasma oder dem Scavenging im Mikromillieu der Leber sein, was auch die unterschiedlichen Korrelationsstärken innerhalb der Genotypen zwischen TGFBi mit dem Fibroselevel erklären könnte. Hierzu sind weitere Experimente mit unterschiedlichen Fibrosemodellen notwendig.

Vergleicht man die ALT Werte aus dem Plasma der MCD Mäuse, so zeigte sich auch hier, wie in der Literatur beschrieben, eine Übereinstimmung mit dem TGFBi Level und den ALT Werten der MCD Mäuse.

Bei den TGFBi ELISAs aus dem Plasma der Mäuse zeigten bei den Kontroll-gefütterten Mäusen beider Fütterungsmodelle *Stab1*^{-/-} Mäuse das höchste TGFBi Level. Nach der MCD Fütterung kam es in keinem der drei Genotypen zu einer signifikanten Veränderung im TGFBi Level, tendenziell kam es zu einer leichten Reduktion des TGFBi Levels in *Stab1*^{-/-} Mäusen und zu einem leichten Anstieg in *Stab2*^{-/-} Mäusen. Die MCD Fütterung zeigte keine Auswirkung auf das TGFBi Level im Plasma der WT Mäuse. Nach der CDAA Fütterung allerdings, stieg das TGFBi Level im Plasma der WT und *Stab1*^{-/-} Mäuse leicht und im Falle der *Stab2*^{-/-} Mäuse sogar signifikant an. Dieses

Ergebnis zeigt, dass die beiden Diäten unterschiedlich starke Effekte auf die systemische Clearance von TGF β 1 haben. Microarray-Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Fütterung mit CDAA zu einer milden Herunterregulierung von Stabilin-1 und Stabilin-2 führt (Winkler et al., 2021). Da bereits gezeigt wurde, dass Stabilin-1 und Stabilin-2 sich gegenseitig teilweise kompensieren können (Schledzewski et al., 2011; Leibing et al., 2023), könnte ein Grund für die veränderten TGF β 1 Werte in CDAA-gefütterten *Stab2*^{-/-} Mäusen sein, dass Stabilin-1 durch CDAA herunterreguliert wird. Interessanterweise zeigt die wahrscheinliche Herunterregulierung von Stabilin-2 in *Stab1*^{-/-} durch CDAA keinen Effekt auf das Plasmalevel von TGF β 1. Möglicherweise deutet dies auf unterschiedliche Kompensationseffekte hin.

Der starke Unterschied in Bezug auf das TGF β 1-Signal im Lebergewebe (IF-Färbung und Simple Western Analyse aus Leberprotein) und dem TGF β 1 Level im Plasma lässt vermuten, dass beide Diäten vielmehr eine Auswirkung auf die lokale Bindung von TGF β 1 in der Leber haben könnten, anstatt die Clearance Funktion der beiden Stabiline gravierend zu beeinträchtigen.

Periostin (Postn) ist ein sekretorisches Matrixprotein und gehört ebenso wie TGF β 1 zur Gruppe der Fasciclin-Proteine (Kumar et al., 2017; Conway et al., 2014). Es ist bekannt, dass Postn funktionell ist während einer Vielzahl von Vorgängen, wie zum Beispiel während verschiedener inflammatorischer Settings, bei der Gewebereparatur, der Wundheilung oder auch verschiedenen Krebserkrankungen (Conway et al., 2014). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Postn auch die Fähigkeit besitzt, mit Schlüssel-molekülen fibrotischer Matrix, wie zum Beispiel Fibronectin, Typ I Kollagen oder Elastin, direkt zu interagieren und somit die Fibrillogenese zu fördern (Kumar et al., 2017; Kudo, 2011). Diese Tatsache macht Postn in Bezug auf die Fibrose zu einem interessanten Kandidaten. Einige Studien zeigen, dass Postn in den Prozess der Fibrose direkt involviert ist.

So zeigt die Arbeit von Kumar et al. in einer Sirius Rot Färbung, dass Postn-Knockout Mäuse nach einer sechs-wöchigen CCl₄-Behandlung signifikant weniger Fibrose entwickeln als WT Mäuse (Kumar et al., 2017). In einer anderen Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es durch den Knockout von Postn zu einer deutlich schwächeren Leberfibrose kommt, als in den Kontrollmäusen (Kobayashi et al., 2020). Die Arbeit von Li et al. zeigte mittels IHC-Färbung und Western Blot, dass nach einer vier-wöchigen MCD Fütterung ein stark erhöhtes Postn Signal in der Leber der Mäuse vorhanden

war, im Gegensatz zu den Kontroll-gefütterten Mäusen. Außerdem zeigte die Sirius Rot Färbung, dass es in Postn-Knockout Mäusen durch die MCD Fütterung zu keinen erhöhten Kollagenablagerungen in der Leber kommt (Li et al., 2015). In der Publikation von Huang et al. wurde mittels IF-Färbung, Western Blot und auf mRNA Ebene gezeigt, dass das Expressionslevel von Postn in Mäusen mit einer akuten oder chronischen Leberfibrose (durch CCl₄ induziert) erhöht ist. In der IF-Färbung der Kontrolllebern, war kein Postn zu sehen (Huang et al., 2015).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht eine andere Arbeit. Aufgrund der Ergebnisse verschiedener asiatischer Studien, welche darauf hindeuten, dass Postn ein möglicher Biomarker in NAFLD sein könnte, beschloss Smirne et al., die Postn Konzentrationen aus dem Plasma von hellhäutigen NAFLD-Patienten zu untersuchen. Ihre Ergebnisse zeigten, dass es keine Unterschiede in der Postn Konzentration zwischen NAFLD Patienten und gesunden Menschen gab. Allerdings konnten sie zeigen, dass die Postn Konzentration in HCC Patienten signifikant erhöht waren (Smirne et al., 2020).

In dieser Arbeit zeigten weder die IF-Färbungen der MCD-gefütterten Mäuse, noch die IHC-Färbung der CDAA-gefütterten Mäuse eine nachweisbare Postn Ablagerung, wobei Lebern von Stab-DKO Mäusen als Positivkontrolle mitgeführt wurden und diese ein positives Signal zeigten, wie auch aus vorangegangenen Arbeiten bereits gezeigt (Leibing et al., 2023).

Um eventuell eine quantitative Aussage über das Postn Level in der Leber zu treffen, wurde Simple Western von Leberproteinen durchgeführt. Die Ergebnisse der MCD-gefütterten Mäuse zeigten, dass es durch die Fütterung in den WT und den *Stab1*^{-/-} Mäusen zu einem leichten Anstieg des Postn Levels bei ca. 80 kDa kam. Nach der Fütterung war das Postn Level in den *Stab1*^{-/-} Mäusen am höchsten im Vergleich zu den WT und *Stab2*^{-/-} Mäusen. Der Simple Western von Leberprotein der CDAA-gefütterten Gruppe zeigte einen leichten Anstieg des Postn Levels in beiden Stabilin-Knockouts und einen etwas stärkeren Anstieg in den WT Mäusen. Nach der Fütterung zeigten alle Genotypen dasselbe Postn Level.

Der ELISA aus dem Plasma der MCD-gefütterten Gruppe zeigte, dass es durch die Fütterung zu keiner Veränderung des Postn Levels im Plasma kam. Bei den CDAA-gefütterten Mäusen zeigte der ELISA aus dem Plasma in den WT und den *Stab1*^{-/-}

Mäusen durch die Fütterung ein leicht verminderten Postn Wert, bei den *Stab2*^{-/-} Mäusen veränderte sich der Postn Wert durch die Fütterung nicht.

Die enormen Auswirkungen von MCD auf das Postn Level, die in der Arbeit von Li et al. beschrieben werden, waren bei uns nicht zu sehen. Allerdings fütterte diese Arbeitsgruppe ihrer Mäuse auch doppelt so lange wie wir (Li et al., 2015). Es ist also gut möglich, dass der Schweregrad der Inflammation bei unserer Fütterung noch zu gering war, um starke Auswirkungen sehen zu können. Dass sich bei beiden Fütterungen keine bis nur minimale Veränderungen des Postn Signals im Plasma zeigten, könnte bedeuten, dass die Fütterungen keine Auswirkungen auf die Clearance von Postn haben und dabei noch andere Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Eine mögliche Annahme war, dass es sich vielmehr um lokale Ablagerungen von Postn im Lebergewebe handelt. Allerdings gelang es uns nicht Postn in der IF- oder der IHC-Färbung des Lebergewebes nachzuweisen. Da bei beiden Färbungen DKO-Nieren als Positivkontrollen mitgeführt wurden und diese auch ein deutliches Postn Signal zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass diese Methode sensitiv genug ist, um Postn nachzuweisen wenn es vorhanden ist. Das negative Postn Signal könnte also darauf schließen lassen, dass Postn sich nicht im Lebergewebe ablagert. Im Simple Western von Leberprotein konnte in beiden Fütterungsmodellen Postn Signal nachgewiesen werden und es zeigten sich ebenfalls leichte Unterschiede zwischen den Kontrollgefütterten Mäusen und den MCD- bzw. CDAA-gefütterten Mäusen. Allerdings sollte man hier mit einer konkreten Aussage sehr vorsichtig sein, da bei keinem der Simple Western Durchgänge Positivkontrollen mitgeführt wurden und man keine Aussage darüber treffen kann, ob es sich eventuell um Varianzen von Nullwerten handelt. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, die Simple Western Durchgänge mit entsprechenden Positivkontrollen zu wiederholen, um dann genauere Aussage über das Postn Signal in der Leber treffen zu können.

Wie auch beim TGFB β Signal, waren augenscheinlich leichte Korrelationen zwischen Postn und dem Fibroselevel zu sehen. So zeigten Stabilin-defiziente Kontrollmäuse leicht erhöhte Postn Werte im Simple Western und im ELISA, entsprechend dem Fibroselevel. Um dies zu überprüfen wurden ebenfalls Korrelationsanalysen für Postn durchgeführt. Dabei zeigte sich eine moderate Korrelation zwischen Postn und dem Fibroselevel, welche bei den CDAA-gefütterten Mäusen stärker war, als bei den MCD-

gefütterten Mäusen. Nach Genotypen aufgetrennt zeigte sich allerdings, dass nur bei den WT Mäusen eine signifikante Korrelation zwischen Postn und dem Fibroselevel bestand. Was darauf schließen lässt, dass das Postn Level nicht unbedingt mit dem Fibroselevel zusammenhängt, sondern vielmehr mit dem Stabilin-Knockout korreliert.

4.2 Der Einfluss von Stabilin-1 und Stabilin-2 in inflammatorischen und fibrotischen Erkrankungen der Haut

Ungefähr 3 % der Weltbevölkerung leidet an inflammatorischen Hauterkrankungen, wie beispielsweise der Psoriasis (Schuppenflechte). Psoriasis ist eine chronische Erkrankung, welche von lokalen Entzündungen, epidermaler Hyperplasie, Leukozyteninfiltration und einer erhöhten Vaskularität der Dermis geprägt ist (Jabeen et al., 2020). Ein gängiges und das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Nachstellung humaner Psoriasis in Mäusen ist die topische Applikation des Wirkstoffs Imiquimod (IMQ), ein Ligand der beiden *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) 7 und 8 (Jabeen et al., 2020; Lin et al., 2015).

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine Autoimmunstörung die durch eine erhebliche Fibrose mit einer verstärkten Kollagensynthese und -akkumulation charakterisiert ist. Betroffen ist dabei die Haut, aber auch viele andere Organe wie die Lunge, das Herz, die Niere oder der Gastrointestinaltrakt. Ein typisches Symptom der SSc ist die Sklerodermie, also die Sklerose der Haut (Yamamoto et al., 1998). Ein gängiges Tiermodell um eine Fibroseinduktion nachzustellen, welche der SSc nahekommt, ist die Verabreichung von Bleomycin im Tiermodell. Es handelt sich dabei um ein Krebs-Chemotherapeutikum, dass im Tiermodell unterschiedlich verabreicht werden kann: intravenös, intraperitoneal, subkutan oder intratracheal (Avouac et al., 2012). Zur Induktion einer Hautfibrose wurde den Mäusen in dieser Arbeit Bleomycin subkutan verabreicht.

4.2.1 Die Auswirkungen der topischen Applikation von IMQ auf die Physiologie und die Haut der Mäuse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die topische Applikation von IMQ eine Dermatitis induziert werden konnte, welche Ähnlichkeiten zu humaner Psoriasis aufweist. Mäuse die mit IMQ behandelt wurden, zeigten die typischen Merkmale einer

Psoriasis: Rötung, Schuppung, eine Verdickung der Haut, sowie histologisch Psoriasis-typische Hautveränderungen wie Akanthose und Parakeratose. Diese Ergebnisse sind deckungsgleich mit den Ergebnissen anderer Studien (van der Fits et al., 2008; Lin et al., 2015; Jabeen et al., 2020). Auch die Gewichtsabnahme, die durch die Behandlung mit IMQ zu sehen war, ist in der Literatur beschrieben (Alvarez et al., 2016; Hou et al., 2018). Eine weitere Beobachtung in dieser Arbeit war der Unterschied in der Intensität der Reaktion auf IMQ zwischen den beiden Geschlechtern: Sowohl die Gewichtsabnahme, als auch der PASI Score fielen bei den Weibchen stärker aus, als bei den Männchen. Dieses Ergebnis ist konträr zu humanen Psoriasis Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass die Entwicklung von Psoriasis zwar sehr wahrscheinlich geschlechterabhängig ist, jedoch der Schweregrad der Psoriasis bei Männern tendenziell höher ist als bei Frauen (Adachi et al., 2022; Lee et al., 2017; Tsai et al., 2011). Ein direkter Vergleich der humanen Psoriasis mit unserem Modell, welches eine Psoriasis-ähnliche Hautentzündung induzieren soll, sollte allerdings nicht gezogen werden. Aufgrund der Kürze der Behandlungsdauer und der künstlichen Induktion kann davon ausgegangen werden, dass bestenfalls bestimmte histologische und klinische Phänomene der Psoriasis nachgestellt werden konnten. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen den Geschlechtern in unserer Arbeit könnte in dem Unterschied der Immunantwort in den Geschlechtern liegen. Es ist bekannt, dass beim Menschen, abhängig vom Geschlecht, erhebliche Unterschiede in der Immunantwort auftreten. Zum Beispiel treten rund 80 % der Autoimmunerkrankungen bei Frauen auf und außerdem zeigen diese auch eine stärkere angeborene und auch adaptive Immunantwort als Männer. Dieser Umstand beinhaltet auch eine schnellere Clearance von Pathogenen und eine stärkere Impfwirksamkeit bei Frauen, als bei Männern, was den Nachteil mit sich bringt, dass die Anfälligkeit für inflammatorische Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen bei Frauen höher ist, als bei Männern. Des Weiteren ist bekannt, dass die stärkere Immunantwort (sowohl die des angeborenen, als auch die des adaptiven Immunsystems) des weiblichen Geschlechts auch in anderen Spezies wie zum Beispiel in Insekten, in Echsen, Vögeln und anderen Säugetieren zu beobachten ist (Klein et al., 2016). Ein Grund für diese Unterschiede zwischen den Geschlechtern könnten die Sexualhormone Östrogen, Progesteron und Testosteron sein, aber auch die unterschiedlich starke Produktion von Cytokinen und Chemokinen in den beiden Geschlechtern (Whitacre, 2001; Lockshin, 2006). Eine weitere Erklärung für den Unterschied zwischen den Geschlechtern in unserer Arbeit könnte sein, dass es sich

nur um einen kurzfristigen Effekt in der Anfangsphase der Entzündung handelt, in der die Weibchen stärker reagierten als die Männchen. Es wäre sinnvoll die Behandlung für einen längeren Zeitraum zu wiederholen, um zu überprüfen, ob es sich dabei um einen langfristigen Effekt handelt oder sich die Unterschiede in den Geschlechtern nach einer längeren Behandlungsdauer angleichen.

4.2.2 Die Auswirkungen der subkutanen Injektion von Bleomycin auf die Haut

Durch die tägliche subkutane Injektion von Bleomycin kam es in den hier gezeigten Mäusen zu einer leichten Sklerose der Haut und starken toxischen Effekten im Organismus. Teilweise zeigten die Mäuse starke Entzündungsreaktionen und in fast allen Mäusen war eine Verdickung der Hornschicht zu beobachten. Durch die Behandlung mit Bleomycin kam es in der Dermis zu einer Verdickung und Verdichtung der Kollagenfasern, was auch ein typisches Anzeichen der humanen Sklerodermie ist (Yamamoto et al., 1999; Liu et al., 2010). In der Literatur wird beschrieben, dass es durch die Behandlung mit Bleomycin in Mäusen zu einer Verdickung der Epidermis und der Dermis kommt (Yamamoto et al., 1999; Liu et al., 2010; Avouac et al., 2012). In den hier gezeigten Mäusen war allerdings nur eine Verdickung der Epidermis, nicht aber der Dermis zu beobachten. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Mäuse in den meisten Publikationen über einen längeren Zeitraum mit Bleomycin behandelt wurden, als das bei uns der Fall war. Trotz der verhältnismäßig kurzen Zeit der Behandlung, waren in den Mäusen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche jedoch starke toxische Effekte der Haut zu beobachten, was in anderen Publikationen nicht zu sehen war. In allen drei Genotypen kam es zu einer ähnlich starken Veränderung der Haut, was darauf hindeutet, dass die Stabilin-Defizienz in diesem Modell keinen starken Einfluss auf die Haut nimmt.

4.2.3 Die Auswirkung der subkutanen Injektion von Bleomycin auf die Lunge

In unserem Modell konnten nicht nur lokale Effekte des Bleomycins, sondern auch systemische Auswirkungen beobachtet werden. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die subkutane Injektion von Bleomycin, neben der Sklerodermie, auch zu

einer Lungenfibrose sowie zu einer Veränderung in der Alveolenstruktur der Mäuse führt (Yamamoto et al., 1999; Meng et al., 2019; Liang et al., 2015). Die Auswertung der Sirius Rot Färbung der Lunge zeigte in den Mäusen dieser Arbeit einen leichten, aber nicht signifikanten, Anstieg des Fibroselevels in der Lunge von WT Mäusen. Zukünftig könnten Experimente mit einer längeren Behandlungsdauer eine stärkere Wirkung auf die Lungenfibrose sichtbar machen. Deutlich zeigte sich jedoch bereits ein starker Einfluss auf die Alveolenstruktur der Lunge. Wie in der Literatur beschrieben, kam es in allen drei Genotypen zu einer deutlichen Abnahme der Gesamt-Alveolenfläche. Diese Abnahme war allerdings nur in WT Mäusen signifikant. Bezogen auf diese beiden Ergebnisse, scheinen die Lungen der WT Mäuse etwas stärker auf die subkutane Injektion von Bleomycin zu reagieren, als die Lungen der Stabilin-defizienten Mäuse. Um diese Vermutung zu bestätigen, wäre es sinnvoll, die Behandlung über einen längeren Zeitraum durchzuführen und größere Tierzahlen zu behandeln, um stärkere Effekte mit geringerer Streuung in den Mäusen zu erzielen.

4.2.4 Die Bedeutung des Liganden TGFB β 1 in Stabilin-defizienten Mäusen in den Erkrankungen Psoriasis und Sklerodermie

Es wurde bereits gezeigt, dass TGFB β 1 in der humanen und murinen Haut exprimiert wird (LeBaron et al., 1995; Han et al., 2008). Immunofluoreszenz-Analysen zeigen, dass TGFB β 1 vorwiegend in der Region um die Basalmembran herum exprimiert wird und subepidermal lokalisiert ist (Li et al., 2022). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass TGFB β 1 neben dem Zellwachstum und der Apoptose, auch an der Wundheilung beteiligt ist (Li et al., 2022; Bae et al., 2002).

In welchem Zusammenhang TGFB β 1 mit inflammatorischen und fibrotischen Erkrankungen der Haut steht, ist in der Literatur bisher kaum beschrieben.

Im inflammatorischen Modell IMQ zeigte die IF-Färbung der Haut, dass es in den Männchen (besonders den *Stab1*^{-/-} Mäusen) zu einer leicht höheren TGFB β 1 Ablagerung in der Haut kommt als in den Weibchen, dies war sowohl bei den Kontrollmäusen, als auch bei den behandelten Mäusen der Fall. Dieses Ergebnis könnte vermuten lassen, dass TGFB β 1 in Männchen stärker abgelagert wird, als in Weibchen. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten allerdings noch weitere Untersuchungen gemacht werden, dafür käme ein TGFB β 1 ELISA oder Western Blot aus dem Gewebelysate der

Haut in Frage. Allerdings stellte sich während der Weiterverarbeitung der Proben heraus, dass es aufgrund der unterschiedlichen Strukturen der Haut äußerst schwer ist, die Haut zu lysieren und eine „saubere“ Probe zu erhalten, weshalb zunächst einmal wichtig wäre, dieses Verfahren zu optimieren, um dann weitere Untersuchungen auf Proteinebene durchführen zu können. Die Plasmaanalysen der gepoolten Proben aus beiden Geschlechtern zeigten, dass es durch die Behandlung mit IMQ in allen drei Genotypen zu einem Anstieg des TGFB β Levels im Plasma kam. Dieser Anstieg war in den *Stab2*^{-/-} Mäusen signifikant. Die Behandlung mit IMQ hatte also einen leichten Einfluss auf das TGFB β Level im Plasma. Dass die Auswirkung in den *Stab2*^{-/-} Mäusen am stärksten war, lässt vermuten, dass dieser Scavenger Rezeptor im inflammatorischen Modell am stärksten TGFB β aus dem Plasma bindet. Dasselbe Ergebnis zeigte sich auch in den Plasmaanalysen der Mäuse aus dem inflammatorischen MCD Modell, indem es nur in den *Stab2*^{-/-} Mäusen zu einem Anstieg des TGFB β Levels im Plasma kam.

Im fibrotischen Modell der Bleomycin-Injektion zeigte die IF-Färbung der Haut durch die Behandlung mit Bleomycin nur einen leichten Anstieg des TGFB β Signals in den WT und den *Stab1*^{-/-} Mäusen, auf die *Stab2*^{-/-} Mäuse hatte Bleomycin keine Auswirkung. In der Plasmaanalyse zeigte sich ein eher gegensätzliches Ergebnis. So hatte die Behandlung mit Bleomycin keine Auswirkung auf das TGFB β Level im Plasma der WT und der *Stab2*^{-/-} Mäuse und es kam zu einer signifikanten Reduktion des TGFB β Levels in den *Stab1*^{-/-} Mäusen. Alles in allem ist es schwierig die Ergebnisse der TGFB β Ablagerungen in diesen beiden Modellen eindeutig zu interpretieren, da es so gut wie keine Literatur zu TGFB β in der Haut gibt, welches es zu einem interessanten Themengebiet macht, welches noch deutlich besser erforscht werden sollte.

4.2.5 Die Bedeutung des Liganden Postn in Stabilin-defizienten Mäusen in den Erkrankungen Psoriasis und Sklerodermie

Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass Postn in humaner und muriner Haut exprimiert wird und für die normale Entwicklung und Homöostase der Haut benötigt wird (Zhou et al., 2010; Jackson-Boeters et al., 2009). Während der Embryonalentwicklung und den neonatalen Stadien, wird Postn in der Dermis, der Basalmembran und den Haarfollikeln exprimiert. In Erwachsenen findet sich Postn nur noch in der Dermis und den Haarfollikeln (Zhou et al., 2010).

In der Literatur ist beschrieben, dass Postn in verschiedenen Hauterkrankungen und der Wundheilung eine Rolle spielt, so auch in der Psoriasis und der Sklerodermie (Zhou et al., 2010; Murota et al., 2017).

Die Arbeit von Zhou et al. konnte zeigen, dass es in chronisch entzündeter Haut zu einem signifikant reduzierten Postn Proteinlevel kommt. Dabei korrelierte das Fehlen von Postn im chronisch entzündeten Gewebe mit einem Anstieg von inflammatorischen Zellinfiltrationen. In gesunder Haut und in Haut mit Psoriasis zeigte sich die Postn Ablagerung vor allem entlang der dermal-epidermalen-Junktionszone (DEJ), während bei einer atopischen Dermatitis, einer chronischen Entzündung der oberen Hautschicht, Postn Ablagerungen in der ganzen Dermis zu finden sind (Zhou et al., 2010). Dasselbe Ergebnis zeigte auch eine weitere Studie (Lee et al., 2022).

Die Studie von Arima et al. zeigte, dass das Postn Level im Serum von Psoriasis Patienten signifikant höher ist als im gesunden Menschen. Um die Rolle von Postn im Psoriasis Mausmodell zu untersuchen, wurden WT und *Postn*^{-/-} Mäuse über einen Zeitraum von sieben Tagen mit IMQ behandelt. Dabei zeigte sich, dass *Postn*^{-/-} Mäuse mildere makroskopische Veränderungen, wie Rötung und Schuppung, zeigten als die WT Mäuse. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Postn bei IMQ-induzierter Inflammation der Haut benötigt wird. In dieser Studie zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (Arima et al., 2015).

Die IF-Färbung des Liganden Postn in der Haut zeigte in dieser Arbeit keine Unterschiede zwischen den behandelten Mäusen und den Kontrollmäusen. Der direkte Zusammenhang zwischen Postn und Psoriasis konnte in dieser Arbeit nicht deutlich gemacht werden, was sehr wahrscheinlich auch auf die kurze Behandlungsdauer zurückzuführen ist. Dass es, wie in der Literatur beschrieben, zwischen den Geschlechtern in der Dermis keine Unterschiede im Psoriasismodell gibt, zeigte sich auch in dieser Arbeit. Die Lokalisation von Postn zeigte sich in dieser Arbeit nicht wie in der Literatur beschrieben in der DEJ-Zone (Zhou et al., 2010). Hier befanden sich die Postn Ablagerungen nicht nur ausschließlich in der DEJ-Zone, sondern auch um die Haarfollikel herum und in der Dermis verteilt, was laut Literatur eher zu dem Krankheitsbild der atopischen Dermatitis passen würde. Möglicherweise würden sich durch eine längere Behandlung mit IMQ deutlichere Unterschiede in den Ablagerungsorten zeigen. Bezogen auf das Postn Level im Plasma, zeigte sich nur ein sehr geringer Unterschied zwischen den Kontrollmäusen und den IMQ behandelten Mäusen in den WT und den

Stab1^{-/-} Mäusen. Bei den *Stab2*^{-/-} Mäusen zeigte sich durch die Behandlung mit IMQ kein Unterschied im Postn Level. Daher scheint die Stabilin-Defizienz in diesem Modell keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu haben.

Die Arbeit von Yang et al. zeigte mit Western Blots und IHC-Färbungen, dass es in systemischer Sklerodermie (SSc) Patienten zu einer Postn Überexpression kommt. Aufgrund dieser Ergebnisse kam die Frage auf, ob Postn eine essentielle oder nebensächliche Rolle in der Pathophysiologie von SSc spielt. Um dieser Frage nachzugehen wurden sowohl WT als auch *Postn*^{-/-} Mäuse für vier Wochen mit Bleomycin behandelt. Dabei zeigte sich, dass mit Bleomycin-behandelte *Postn*^{-/-} Mäuse deutlich reduzierte Sklerodermie Symptome zeigen als WT Mäuse. Dies äußerte sich in einer verminderten dermalen Dicke und deutlich weniger Kollagenablagerungen in der Dermis der Bleomycin-behandelten *Postn*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Bleomycin-behandelten WT Mäusen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Postn in fibrotische Prozesse der Haut involviert ist (Yang et al., 2012). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass Patienten mit einer SSc eine verstärkte Postn Expression in der Dermis aufweisen, sowie ein erhöhtes Postn Level im Serum (Yamaguchi et al., 2013).

In dieser Arbeit zeigte die subkutane Injektion von Bleomycin in der IF-Färbung der Haut keine Veränderung des Postn Signals, allerdings zeigte der ELISA aus dem Plasma der Mäuse, dass es nach der Behandlung mit Bleomycin in WT und *Stab1*^{-/-} Mäusen zu einem verringerten Postn Level kam, im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Dieses Ergebnis ist konträr zu den Ergebnissen der Literatur, die zeigt, dass es in Sklerodermie Patienten zu einem signifikanten Anstieg der Postn Expression in der Haut wie auch des Postn Levels im Serum kommt (Yamaguchi et al., 2013). Dass die Ergebnisse dieser Arbeit, bezogen auf das Postn Level in der Haut, so konträr zu den Ergebnissen in der Literatur ist, lässt sich wahrscheinlich nur durch die Länge der Behandlung erklären. In den meisten Studien wurden die Mäuse täglich über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen mit Bleomycin behandelt um eine Sklerodermie zu induzieren (Yang et al., 2012; Park et al., 2021; Yamamoto et al., 2005; Błyszczuk et al., 2019). Eine längere Behandlungsdauer würde mit Sicherheit zu einem stärkeren Grad an Fibrose führen und in Folge dessen wahrscheinlich auch eine Auswirkung auf das Postn Level in der Haut zeigen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit ging es darum, den Einfluss der beiden Scavenger Rezeptoren Stabilin-1 und Stabilin-2 in fibrotischen und inflammatorischen Erkrankungen der Leber und der Haut zu untersuchen. Ein weiterer Teilaspekt dieser Arbeit war es die Auswirkungen auf deren Liganden TGF β 1 und Postn zu untersuchen.

In den Lebermodellen konnte gezeigt werden, dass Stabilin-defiziente Mäuse bereits baseline mehr Fibrose zeigen, als die WT Mäuse. Des Weiteren zeigte sich, dass die Fibrose durch die MCD Fütterung weiterhin in den Stabilin-defizienten Mäusen signifikant höher war als in den WT Mäusen. Dies zeigte sich jedoch nicht im CDAA Modell. Nach der Fütterung mit CDAA befanden sich alle drei Genotypen auf einem ähnlich hohen Fibroselevel. Ebenfalls konnte durch Korrelationsanalysen ein Zusammenhang zwischen dem Fibroselevel und den TGF β 1 Ablagerungen, sowie den Postn Ablagerungen hergestellt werden.

In den Hautmodellen konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Stabiline im inflammatorischen IMQ Modell nur einen sehr leichten Einfluss auf die Physiologie der Mäuse hatte und dieser Einfluss auch geschlechterspezifisch war. Auf die Bleomycin-induzierte Fibrose hatte die Stabilin-Defizienz keinen Einfluss. In beiden Modellen zeigte sich nur ein leichter Einfluss auf die beiden Liganden TGF β 1 und Postn.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass es in Stabilin-defizienten Mäusen Modell-abhängig nur zu einer sehr leicht veränderten beziehungsweise zu keiner veränderten Anfälligkeit für pro-fibrotische Stimuli in der Leber kommt. Des Weiteren zeigte sich nur ein sehr leichter Einfluss der Stabilin-Defizienz in Hautentzündungen. Ein Stabilin-Einzelknockout erhöht also in den untersuchten Mausmodellen die Anfälligkeit für fibrotische und inflammatorische Schädigungen in der Leber und der Haut allenfalls gering bzw. in den meisten Modellen nicht signifikant. Dies ist für den zum Teil in Phase 2 Studien bereits befindlichen Einsatz der Antikörper-medierten Stabilin-Inhibition von Bedeutung. Hierfür geben die vorliegenden präklinischen Ergebnisse keine starken Hinweise auf ein ungünstiges Risikoprofil hinsichtlich der Prädisposition für fibrotische und entzündliche Erkrankungen der Haut und Leber.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas N., Makker J., Abbas H., Balar B. Perioperative care of patients with liver cirrhosis: a review. *Health Services Insights*. 2017;G1–G12.

Adachi A, Honda T, Egawa G, Kanameishi S, Takimoto R, Miyake T, Hossain MR, Komine M, Ohtsuki M, Gunzer M, Ikuta K, Kabashima K. Estradiol suppresses psoriatic inflammation in mice by regulating neutrophil and macrophage functions. *J Allergy Clin Immunol*. 2022 Oct;150(4):909-919.e8.

Adachi H, Tsujimoto M. FEEL-1, a novel scavenger receptor with in vitro bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities. *J Biol Chem*. 2002 Sep 13;277(37):34264-70.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007 Feb 2;100(2):174-90.

Alvarez P, Jensen LE. Imiquimod Treatment Causes Systemic Disease in Mice Resembling Generalized Pustular Psoriasis in an IL-1 and IL-36 Dependent Manner. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6756138.

Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, Enders F, Saksena S, Burt AD, Bida JP, Lindor K, Sanderson SO, Lenzi M, Adams LA, Kench J, Therneau TM, Day CP. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007 Apr;45(4):846-54.

Antoine DJ, Dear JW, Lewis PS, Platt V, Coyle J, Masson M, Thanacoody RH, Gray AJ, Webb DJ, Moggs JG, Bateman DN, Goldring CE, Park BK. Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology*. 2013 Aug;58(2):777-87.

Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol*. 2014 Jan-Feb;32(1):3-13.

Arima K, Ohta S, Takagi A, Shiraishi H, Masuoka M, Ontsuka K, Suto H, Suzuki S, Yamamoto K, Ogawa M, Simmons O, Yamaguchi Y, Toda S, Aihara M, Conway SJ, Ikeda S, Izuhara K. Periostin contributes to epidermal hyperplasia in psoriasis common to atopic dermatitis. *Allergol Int.* 2015 Jan;64(1):41-8.

Augustin HG, Koh GY. Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. *Science.* 2017 Aug 25;357(6353):eaal2379.

Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine.* 2013 Jan;80(1):23-8.

Bae CR, Zhang H, Kwon YG. The endothelial dysfunction blocker CU06-1004 ameliorates choline-deficient L-amino acid diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice. *PLoS One.* 2020 Dec 4;15(12):e0243497.

Bae JS, Lee SH, Kim JE, Choi JY, Park RW, Yong Park J, Park HS, Sohn YS, Lee DS, Bae Lee E, Kim IS. Betaig-h3 supports keratinocyte adhesion, migration, and proliferation through alpha3beta1 integrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jun 28;294(5):940-8.

Baiocchini A, Del Nonno F, Taibi C, Visco-Comandini U, D'Offizi G, Piacentini M, Falasca L. Publisher Correction: Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) modifications in patients with chronic hepatitis C. *Sci Rep.* 2020 Jan 24;10(1):1420.

Baker ES, Burnum-Johnson KE, Jacobs JM, Diamond DL, Brown RN, Ibrahim YM, Orton DJ, Piehowski PD, Purdy DE, Moore RJ, Danielson WF 3rd, Monroe ME, Crowell KL, Slysz GW, Gritsenko MA, Sandoval JD, Lamarche BL, Matzke MM, Webb-Robertson BJ, Simons BC, McMahon BJ, Bhattacharya R, Perkins JD, Carithers RL Jr, Strom S, Self SG, Katze MG, Anderson GA, Smith RD. Advancing the high throughput identification of liver fibrosis protein signatures using multiplexed ion mobility spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Apr;13(4):1119-27.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):209-18.

Bellando-Randone S, Guiducci S, Matucci-Cerinic M. Very early diagnosis of systemic sclerosis. *Pol Arch Med Wewn.* 2012;122 Suppl 1:18-23.

Bhandari S, Li R, Simón-Santamaría J, McCourt P, Johansen SD, Smedsrød B, Martínez-Zubiaurre I, Sørensen KK. Transcriptome and proteome profiling reveal complementary scavenger and immune features of rat liver sinusoidal endothelial cells and liver macrophages. *BMC Mol Cell Biol.* 2020 Nov 27;21(1):85.

Bhandari S, Li R, Simón-Santamaría J, McCourt P, Johansen SD, Smedsrød B, Martínez-Zubiaurre I, Sørensen KK. Transcriptome and proteome profiling reveal complementary scavenger and immune features of rat liver sinusoidal endothelial cells and liver macrophages. *BMC Mol Cell Biol.* 2020 Nov 27;21(1):85.

Billings PC, Herrick DJ, Kucich U, Engelsberg BN, Abrams WR, Macarak EJ, Rosenbloom J, Howard PS. Extracellular matrix and nuclear localization of beta ig-h3 in human bladder smooth muscle and fibroblast cells. *J Cell Biochem.* 2000 Aug 2;79(2):261-73.

Błyszczuk P, Kozlova A, Guo Z, Kania G, Distler O. Experimental Mouse Model of Bleomycin-Induced Skin Fibrosis. *Curr Protoc Immunol.* 2019 Sep;126(1):e88.

Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. *Lancet.* 2015 Sep 5;386(9997):983-94.

Boulais N, Misery L. Merkel cells. *J Am Acad Dermatol.* 2007 Jul;57(1):147-65.

Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol.* 2013 Jul;3(3):1035-78.

Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol.* 2002 Aug 23;1(1):1.

Brandt JP, Gerriets V. Bleomycin. 2022 May 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–.

Brown MS, Goldstein JL, Krieger M, Ho YK, Anderson RG. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biol.* 1979 Sep;82(3):597-613.

Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:223-61.

Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Jul;76(7):3330-7.

Caballero F, Fernández A, Matías N, Martínez L, Fucho R, Elena M, Caballeria J, Morales A, Fernández-Checa JC, García-Ruiz C. Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *J Biol Chem.* 2010 Jun 11;285(24):18528-36.

Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Sep;13(9):621-34.

Careta MF, Romiti R. Localized scleroderma: clinical spectrum and therapeutic update. *An Bras Dermatol.* 2015 Jan-Feb;90(1):62-73.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ; American Gastroenterological Association; American Association for the Study of Liver Diseases; American College of Gastroenterology. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology.* 2012 Jun;142(7):1592-609.

Chamcheu JC, Chaves-Rodriguez MI, Adhami VM, Siddiqui IA, Wood GS, Longley BJ, Mukhtar H. Upregulation of PI3K/AKT/mTOR, FABP5 and PPAR β/δ in Human Psoriasis and Imiquimod-induced Murine Psoriasiform Dermatitis Model. *Acta Derm Venereol.* 2016 Aug 23;96(6):854-6.

Cheng ML, Nakib D, Perciani CT, MacParland SA. The immune niche of the liver. *Clin Sci (Lond)*. 2021 Oct 29;135(20):2445-2466.

Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2001 Dec;6(3):170-4.

Christophers E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol*. 2001 Jun;26(4):314-20.

Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, Arron JR, Holweg CT, Kudo A. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Apr;71(7):1279-88.

Corona A, Blobe GC. The role of the extracellular matrix protein TGFBI in cancer. *Cell Signal*. 2021 Aug;84:110028.

Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*. 2020 May;158(7):1851-1864.

Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc*. 2004 Feb;63(1):49-63.

Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:147-63.

De Chiara F, Heebøll S, Marrone G, Montoliu C, Hamilton-Dutoit S, Ferrandez A, Andreola F, Rombouts K, Grønbæk H, Felipe V, Gracia-Sancho J, Mookerjee RP, Vilstrup H, Jalan R, Thomsen KL. Urea cycle dysregulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018 Oct;69(4):905-915.

De la Garza RG, Morales-Garza LA, Martin-Estal I, Castilla-Cortazar I. Insulin-Like Growth Factor-1 Deficiency and Cirrhosis Establishment. *J Clin Med Res*. 2017 Apr;9(4):233-247.

De Minicis S, Agostinelli L, Rychlicki C, Sorice GP, Saccomanno S, Candelaresi C, Giaccari A, Trozzi L, Pierantonelli I, Mingarelli E, Marzioni M, Muscogiuri G, Gaggini M, Benedetti A, Gastaldelli A, Guido M, Svegliati-Baroni G. HCC development is associated to peripheral insulin resistance in a mouse model of NASH. *PLoS One*. 2014 May 22;9(5):e97136.

Decaris ML, Emson CL, Li K, Gatmaitan M, Luo F, Cattin J, Nakamura C, Holmes WE, Angel TE, Peters MG, Turner SM, Hellerstein MK. Turnover rates of hepatic collagen and circulating collagen-associated proteins in humans with chronic liver disease. *PLoS One*. 2015 Apr 24;10(4):e0123311.

DeLeve, L.D. (2011). Vascular Liver Disease and the Liver Sinusoidal Endothelial Cell. In: DeLeve, L., Garcia-Tsao, G. (eds) *Vascular Liver Disease*. Springer, New York, NY.

Deng X, Zhang X, Li W, Feng RX, Li L, Yi GR, Zhang XN, Yin C, Yu HY, Zhang JP, Lu B, Hui L, Xie WF. Chronic Liver Injury Induces Conversion of Biliary Epithelial Cells into Hepatocytes. *Cell Stem Cell*. 2018 Jul 5;23(1):114-122.e3.

Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet*. 2017 Oct 7;390(10103):1685-1699.

Dieudonné SC, Kerr JM, Xu T, Sommer B, DeRubeis AR, Kuznetsov SA, Kim IS, Gehron Robey P, Young MF. Differential display of human marrow stromal cells reveals unique mRNA expression patterns in response to dexamethasone. *J Cell Biochem*. 1999 Dec;76(2):231-43.

Ding BS, Cao Z, Lis R, Nolan DJ, Guo P, Simons M, Penfold ME, Shido K, Rabbany SY, Rafii S. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature*. 2014 Jan 2;505(7481):97-102.

Duffin KC, Chandran V, Gladman DD, Krueger GG, Elder JT, Rahman P. Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis: update and future direction. *J Rheumatol*. 2008 Jul;35(7):1449-53.

El Malki K, Karbach SH, Huppert J, Zayoud M, Reissig S, Schüler R, Nikolaev A, Kar-ram K, Münzel T, Kuhlmann CR, Luhmann HJ, von Stebut E, Wörtge S, Kurschus FC, Waisman A. An alternative pathway of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflam-mation in the absence of interleukin-17 receptor a signaling. *J Invest Dermatol.* 2013 Feb;133(2):441-51.

Elkins T, Zinn K, McAllister L, Hoffmann FM, Goodman CS. Genetic analysis of a Dro-sophila neural cell adhesion molecule: interaction of fasciclin I and Abelson tyrosine kinase mutations. *Cell.* 1990 Feb 23;60(4):565-75.

Endo H, Niioka M, Kobayashi N, Tanaka M, Watanabe T. Butyrate-producing probiot-ics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the pro-biotics for the gut-liver axis. *PLoS One.* 2013 May 16;8(5):e63388.

Engelmann C, Tacke F. The Potential Role of Cellular Senescence in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 7;23(2):652.

Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of non-alcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of dis-ease. *Hepatology.* 2018 Jan;67(1):123-133.

Falkowski M, Schledzewski K, Hansen B, Goerd S. Expression of stabilin-2, a novel fasciclin-like hyaluronan receptor protein, in murine sinusoidal endothelia, avascular tissues, and at solid/liquid interfaces. *Histochem Cell Biol.* 2003 Nov;120(5):361-9.

Farina A, Delhaye M, Lescuyer P, Dumonceau JM. Bile proteome in health and dis-ease. *Compr Physiol.* 2014 Jan;4(1):91-108.

Félétou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Fo-cus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA): Morgan & Clay-pool Life Sciences; 2011.

Florey. The endothelial cell. *Br Med J.* 1966 Aug 27;2(5512):487-90.

Fodil S, Arnaud M, Vaganay C, Puissant A, Lengline E, Mooney N, Itzykson R, Zafrani L. Endothelial cells: major players in acute myeloid leukaemia. *Blood Rev.* 2022 Jul;54:100932.

Fuchs E, Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet.* 2002 Mar;3(3):199-209.

Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004 Jul;93(1):105-13.

Gao X, Fan JG; Study Group of Liver and Metabolism, Chinese Society of Endocrinology. Diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease and related metabolic disorders: consensus statement from the Study Group of Liver and Metabolism, Chinese Society of Endocrinology. *J Diabetes.* 2013 Dec;5(4):406-15.

Géraud C, Koch PS, Goerdts S. Vascular niches: endothelial cells as tissue- and site-specific multifunctional team players in health and disease. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014 Aug;12(8):685-9. English, German.

Géraud C, Schledzewski K, Demory A, Klein D, Kaus M, Peyre F, Sticht C, Evdokimov K, Lu S, Schmieder A, Goerdts S. Liver sinusoidal endothelium: a microenvironment-dependent differentiation program in rat including the novel junctional protein liver endothelial differentiation-associated protein-1. *Hepatology.* 2010 Jul;52(1):313-26.

Gilliet M, Conrad C, Geiges M, Cozzio A, Thürlimann W, Burg G, Nestle FO, Dummer R. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch Dermatol.* 2004 Dec;140(12):1490-5.

Goerdts S, Bhardwaj R, Sorg C. Inducible expression of MS-1 high-molecular-weight protein by endothelial cells of continuous origin and by dendritic cells/macrophages in vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 1993 May;142(5):1409-22.

Goerdts S, Walsh LJ, Murphy GF, Pober JS. Identification of a novel high molecular weight protein preferentially expressed by sinusoidal endothelial cells in normal human tissues. *J Cell Biol.* 1991 Jun;113(6):1425-37.

Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Apr;9(4):244-53.

Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet.* 2007 Jul 21;370(9583):263-271.

GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet.* 2013 Jun;45(6):580-5.

Gunawardana H, Romero T, Yao N, Heidt S, Mulder A, Elashoff DA, Valenzuela NM. Tissue-specific endothelial cell heterogeneity contributes to unequal inflammatory responses. *Sci Rep.* 2021 Jan 21;11(1):1949.

Hägg D, Sundström A, Eriksson M, Schmitt-Egenolf M. Severity of Psoriasis Differs Between Men and Women: A Study of the Clinical Outcome Measure Psoriasis Area and Severity Index (PASI) in 5438 Swedish Register Patients. *Am J Clin Dermatol.* 2017 Aug;18(4):583-590.

Haldar D, Kern B, Hodson J, Armstrong MJ, Adam R, Berlakovich G, Fritz J, Feurstein B, Popp W, Karam V, Muiesan P, O'Grady J, Jamieson N, Wigmore SJ, Pirenne J, Malek-Hosseini SA, Hidalgo E, Tokat Y, Paul A, Pratschke J, Bartels M, Trunecka P, Settmacher U, Pinzani M, Duvoux C, Newsome PN, Schneeberger S; European Liver and Intestine Transplant Association (ELITA). Outcomes of liver transplantation for non-alcoholic steatohepatitis: A European Liver Transplant Registry study. *J Hepatol.* 2019 Aug;71(2):313-322.

Han B, Cai H, Chen Y, Hu B, Luo H, Wu Y, Wu J. The role of TGFBI (β ig-H3) in gastrointestinal tract tumorigenesis. *Mol Cancer.* 2015 Mar 24;14:64.

Han B, Luo H, Raelson J, Huang J, Li Y, Tremblay J, Hu B, Qi S, Wu J. TGFBI (β IG-H3) is a diabetes-risk gene based on mouse and human genetic studies. *Hum Mol Genet.* 2014 Sep 1;23(17):4597-611.

Han MS, Kim JE, Shin HI, Kim IS. Expression patterns of betaig-h3 in chondrocyte differentiation during endochondral ossification. *Exp Mol Med.* 2008 Aug 31;40(4):453-60.

Hansen B, Longati P, Elvevold K, Nedredal GI, Schledzewski K, Olsen R, Falkowski M, Kzhyshkowska J, Carlsson F, Johansson S, Smedsrød B, Goerdts S, Johansson S, McCourt P. Stabilin-1 and stabilin-2 are both directed into the early endocytic pathway in hepatic sinusoidal endothelium via interactions with clathrin/AP-2, independent of ligand binding. *Exp Cell Res.* 2005 Feb 1;303(1):160-73.

Harris EN, Weigel JA, Weigel PH. The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin. *J Biol Chem.* 2008 Jun 20;283(25):17341-50.

Harris EN, Weigel PH. The ligand-binding profile of HARE: hyaluronan and chondroitin sulfates A, C, and D bind to overlapping sites distinct from the sites for heparin, acetylated low-density lipoprotein, dermatan sulfate, and CS-E. *Glycobiology.* 2008 Aug;18(8):638-48.

Haynes DC, Gershwin ME. The immunopathology of progressive systemic sclerosis (PSS). *Semin Arthritis Rheum.* 1982 Feb;11(3):331-51.

Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016 Feb;13(2):88-110.

Hirose Y, Saijou E, Sugano Y, Takeshita F, Nishimura S, Nonaka H, Chen YR, Sekine K, Kido T, Nakamura T, Kato S, Kanke T, Nakamura K, Nagai R, Ochiya T, Miyajima A. Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar 13;109(11):4263-8.

Hoersch S, Andrade-Navarro MA. Periostin shows increased evolutionary plasticity in its alternatively spliced region. *BMC Evol Biol.* 2010 Jan 28;10:30.

Hollmén M, Maksimow M, Rannikko JH, Karvonen MK, Vainio M, Jalkanen S, Jalkanen M, Mandelin J. Nonclinical Characterization of Bexmarilimab, a Clever-1-Targeting Antibody for Supporting Immune Defense Against Cancers. *Mol Cancer Ther.* 2022 Jul 5;21(7):1207-1218.

Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):283-92.

Hou Y, Zhu L, Tian H, Sun HX, Wang R, Zhang L, Zhao Y. IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis. *Protein Cell.* 2018 Dec;9(12):1027-1038.

Huang Y, Liu W, Xiao H, Maitikabili A, Lin Q, Wu T, Huang Z, Liu F, Luo Q, Ouyang G. Matricellular protein periostin contributes to hepatic inflammation and fibrosis. *Am J Pathol.* 2015 Mar;185(3):786-97.

Hundt M, Basit H, John S. Physiology, Bile Secretion. 2021 Oct 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29262229.

Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci.* 2016 May;61(5):1325-36.

Irjala H, Elima K, Johansson EL, Merinen M, Kontula K, Alanen K, Grenman R, Salmi M, Jalkanen S. The same endothelial receptor controls lymphocyte traffic both in vascular and lymphatic vessels. *Eur J Immunol.* 2003 Mar;33(3):815-24.

Itagaki H, Shimizu K, Morikawa S, Ogawa K, Ezaki T. Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013 Nov 15;6(12):2683-96.

Jabeen M, Boisgard AS, Danoy A, El Kholti N, Salvi JP, Bouliou R, Fromy B, Verrier B, Lamrayah M. Advanced Characterization of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Mouse Model. *Pharmaceutics*. 2020 Aug 20;12(9):789.

Jackson-Boeters L, Wen W, Hamilton DW. Periostin localizes to cells in normal skin, but is associated with the extracellular matrix during wound repair. *J Cell Commun Signal*. 2009 Jun;3(2):125-33.

Jacobson CC, Kumar S, Kimball AB. Latitude and psoriasis prevalence. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Oct;65(4):870-873.

Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol*. 1987 Mar;18(3):234-9.

Jambusaria A, Hong Z, Zhang L, Srivastava S, Jana A, Toth PT, Dai Y, Malik AB, Rehman J. Endothelial heterogeneity across distinct vascular beds during homeostasis and inflammation. *Elife*. 2020 Jan 16;9:e51413.

Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. Physiology, Liver. 2022 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan—. PMID: 30571059.

Kang LI, Mars WM, Michalopoulos GK. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells*. 2012 Dec 13;1(4):1261-92.

Karikoski M, Marttila-Ichihara F, Elima K, Rantakari P, Hollmén M, Kelkka T, Gerke H, Huovinen V, Irjala H, Holmdahl R, Salmi M, Jalkanen S. Clever-1/stabilin-1 controls cancer growth and metastasis. *Clin Cancer Res*. 2014 Dec 15;20(24):6452-64.

Kashireddy PV, Rao MS. Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2004 Oct;30(2):104-110.

Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:509-37.

Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011 May;19(2):229-34.

Kim JE, Kim SJ, Lee BH, Park RW, Kim KS, Kim IS. Identification of motifs for cell adhesion within the repeated domains of transforming growth factor-beta-induced gene, betaig-h3. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30907-15.

Kim JE, Park RW, Choi JY, Bae YC, Kim KS, Joo CK, Kim IS. Molecular properties of wild-type and mutant betaIG-H3 proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Mar;43(3):656-61.

Kim S, Bae DJ, Hong M, Park SY, Kim IS. The conserved histidine in epidermal growth factor-like domains of stabilin-2 modulates pH-dependent recognition of phosphatidylserine in apoptotic cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Jul;42(7):1154-63.

Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Oct;21 Suppl 3:S84-7.

Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2016 Oct;16(10):626-38.

Knolle PA, Wohlleber D. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. *Cell Mol Immunol.* 2016 May;13(3):347-53.

Kobayashi T, Kanno K, Nguyen PT, Sugiyama A, Kawahara A, Otani Y, Kishikawa N, Ito M, Tazuma S. Periostin antisense oligonucleotide prevents hepatic steatosis and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2020 Dec;35(12):2140-2150.

Koch PS, Olsavszky V, Ulbrich F, Sticht C, Demory A, Leibing T, Henzler T, Meyer M, Zierow J, Schneider S, Breitkopf-Heinlein K, Gaitantzi H, Spencer-Dene B, Arnold B, Klapproth K, Schledzewski K, Goerdts S, Géraud C. Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis. *Blood.* 2017 Jan 26;129(4):415-419.

Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Miura K, Taura K, De Minicis S, Osterreicher CH, Schnabl B, Seki E, Brenner DA. c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2009 Oct;137(4):1467-1477.e5.

Krieg T, Meurer M. Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiologic aspects. *J Am Acad Dermatol*. 1988 Mar;18(3):457-81.

Kruepunga N, Hakvoort TBM, Hikspoors JPJM, Köhler SE, Lamers WH. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 May 1;1865(5):869-878.

Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 7;20(18):4411.

Kubes P, Jenne C. Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:247-277.

Kucsera D, Tóth VE, Gergő D, Vörös I, Onódi Z, Görbe A, Ferdinandy P, Varga ZV. Characterization of the CDAA Diet-Induced Non-alcoholic Steatohepatitis Model: Sex-Specific Differences in Inflammation, Fibrosis, and Cholesterol Metabolism in Middle-Aged Mice. *Front Physiol*. 2021 Feb 22;12:609465.

Kudo A, Kii I. Periostin function in communication with extracellular matrices. *J Cell Commun Signal*. 2018 Mar;12(1):301-308.

Kudo A. Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Oct;68(19):3201-7.

Kumar P, Smith T, Raeman R, Chopyk DM, Brink H, Liu Y, Sulchek T, Anania FA. Periostin promotes liver fibrogenesis by activating lysyl oxidase in hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2018 Aug 17;293(33):12781-12792.

Kzhyshkowska J, Gratchev A, Schmuttermaier C, Brundiars H, Krusell L, Mamidi S, Zhang J, Workman G, Sage EH, Anderle C, Sedlmayr P, Goerd S. Alternatively activated macrophages regulate extracellular levels of the hormone placental lactogen via receptor-mediated uptake and transcytosis. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):3028-37.

Kzhyshkowska J, Workman G, Cardó-Vila M, Arap W, Pasqualini R, Gratchev A, Krusell L, Goerd S, Sage EH. Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC. *J Immunol*. 2006 May 15;176(10):5825-32.

Larsen R. Ernährung und Infusionstherapie. Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege. 2016 Jun 14:600–7. German.

LeBaron RG, Bezverkov KI, Zimmer MP, Pavelec R, Skonier J, Purchio AF. Beta IG-H3, a novel secretory protein inducible by transforming growth factor-beta, is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro. *J Invest Dermatol*. 1995 May;104(5):844-9.

Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(8):1067-75.

Lee CH, Choe SJ, Kim DH, Kim EJ, Eom M, Hong SP, Choi EH. Skin atrophy caused by topical glucocorticoids is less common in patients with atopic dermatitis than in those with psoriasis. *Exp Dermatol*. 2022 Feb;31(2):182-190.

Lee JY, Kang S, Park JS, Jo SJ. Prevalence of Psoriasis in Korea: A Population-Based Epidemiological Study Using the Korean National Health Insurance Database. *Ann Dermatol*. 2017 Dec;29(6):761-767.

Lee SH, Bae JS, Park SH, Lee BH, Park RW, Choi JY, Park JY, Ha SW, Kim YL, Kwon TH, Kim IS. Expression of TGF-beta-induced matrix protein betaig-h3 is up-regulated in the diabetic rat kidney and human proximal tubular epithelial cells treated with high glucose. *Kidney Int*. 2003 Sep;64(3):1012-21.

Lee SJ, Kang JH, Choi SY, Suk KT, Kim DJ, Kwon OS. PKC δ as a regulator for TGF β 1-induced α -SMA production in a murine nonalcoholic steatohepatitis model. *PLoS One*. 2013;8(2):e55979.

Leibing T, Riedel A, Xi Y, Adrian M, Krzistetzko J, Kirkamm C, Dormann C, Schledzewski K, Goerdts S, Géraud C (2023). Deficiency for scavenger receptors Stabilin-1 and Stabilin-2 leads to age-dependent renal and hepatic depositions of fasciclin domain proteins TGFBI and Periostin in mice. *Aging Cell*, 00, e13914.

Li B, Zhang C, Zhan YT. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Cirrhosis: A Review of Its Epidemiology, Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis, Management, and Prognosis. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jul 2;2018:2784537.

Li C, Lim SW, Choi BS, Lee SH, Cha JH, Kim IS, Kim J, Yang CW. Inhibitory effect of pravastatin on transforming growth factor beta1-inducible gene h3 expression in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol*. 2005 Nov-Dec;25(6):611-20.

Li J, Ma J, Zhang Q, Gong H, Gao D, Wang Y, Li B, Li X, Zheng H, Wu Z, Zhu Y, Leng L. Spatially resolved proteomic map shows that extracellular matrix regulates epidermal growth. *Nat Commun*. 2022 Jul 11;13(1):4012.

Li R, Oteiza A, Sørensen KK, McCourt P, Olsen R, Smedsrød B, Svistounov D. Role of liver sinusoidal endothelial cells and stabilins in elimination of oxidized low-density lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Jan;300(1):G71-81.

Li Y, Wu S, Xiong S, Ouyang G. Deficiency of periostin protects mice against methionine-choline-deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2015 Feb;62(2):495-7.

Li Z, Vance DE. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J Lipid Res*. 2008 Jun;49(6):1187-94.

Liang M, Lv J, Zou L, Yang W, Xiong Y, Chen X, Guan M, He R, Zou H. A modified murine model of systemic sclerosis: bleomycin given by pump infusion induced skin and pulmonary inflammation and fibrosis. *Lab Invest.* 2015 Mar;95(3):342-50.

Lin J, Zheng S, Chen A. Curcumin attenuates the effects of insulin on stimulating hepatic stellate cell activation by interrupting insulin signaling and attenuating oxidative stress. *Lab Invest.* 2009 Dec;89(12):1397-409.

Lin YK, Yang SH, Chen CC, Kao HC, Fang JY. Using Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin as a Model to Measure the Skin Penetration of Anti-Psoriatic Drugs. *PLoS One.* 2015 Sep 10;10(9):e0137890.

Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2021 Jan 21;7(1):6.

Lockshin MD. Sex differences in autoimmune disease. *Orthop Clin North Am.* 2006 Oct;37(4):629-33.

Löffler (2004). Taschenbuch Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 6. Komplette überarbeitete und aktualisierte Auflage (Regensburg, Springer Medizin Verlag Heidelberg).

Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013 Nov;10(11):686-90.

Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest.* 2018 Jan 2;128(1):26-35.

Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know. *World J Gastroenterol.* 2014 Sep 28;20(36):12956-80.

Machado MV, Michelotti GA, Xie G, Almeida Pereira T, Boursier J, Bohnic B, Guy CD, Diehl AM. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One*. 2015 May 27;10(5):e0127991.

Malovic I, Sørensen KK, Elvevold KH, Nedredal GI, Paulsen S, Erofeev AV, Smedsrød BH, McCourt PA. The mannose receptor on murine liver sinusoidal endothelial cells is the main denatured collagen clearance receptor. *Hepatology*. 2007 Jun;45(6):1454-61.

Manta CP, Leibing T, Friedrich M, Nolte H, Adrian M, Schledzewski K, Krzistetzko J, Kirkamm C, David Schmid C, Xi Y, Stojanovic A, Tonack S, de la Torre C, Hammad S, Offermanns S, Krüger M, Cerwenka A, Platten M, Goerdts S, Géraud C. Targeting of Scavenger Receptors Stabilin-1 and Stabilin-2 Ameliorates Atherosclerosis by a Plasma Proteome Switch Mediating Monocyte/Macrophage Suppression. *Circulation*. 2022 Dec 6;146(23):1783-1799.

Marí M, Colell A, Morales A, von Montfort C, Garcia-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jun 1;12(11):1295-331.

Martin-Armas M, Simon-Santamaria J, Pettersen I, Moens U, Smedsrød B, Sveinbjörnsson B. Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides. *J Hepatol*. 2006 May;44(5):939-46.

Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, Ito T, Katsume A, Sudoh M. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol*. 2013 Apr;94(2):93-103.

Matthews DR, Li H, Zhou J, Li Q, Glaser S, Francis H, Alpini G, Wu C. Methionine- and Choline-Deficient Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Is Associated with Increased Intestinal Inflammation. *Am J Pathol*. 2021 Oct;191(10):1743-1753.

McAllister L, Goodman CS, Zinn K. Dynamic expression of the cell adhesion molecule fasciclin I during embryonic development in *Drosophila*. *Development*. 1992 May;115(1):267-76.

McCourt PA, Smedsrød BH, Melkko J, Johansson S. Characterization of a hyaluronan receptor on rat sinusoidal liver endothelial cells and its functional relationship to scavenger receptors. *Hepatology*. 1999 Nov;30(5):1276-86.

Melkko J, Hellevik T, Risteli L, Risteli J, Smedsrød B. Clearance of NH₂-terminal propeptides of types I and III procollagen is a physiological function of the scavenger receptor in liver endothelial cells. *J Exp Med*. 1994 Feb 1;179(2):405-12.

Meng M, Tan J, Chen W, Du Q, Xie B, Wang N, Zhu H, Wang K. The Fibrosis and Immunological Features of Hypochlorous Acid Induced Mouse Model of Systemic Sclerosis. *Front Immunol*. 2019 Aug 20;10:1861.

Michalopoulos GK, Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jan;18(1):40-55.

Miller CM, Donner AJ, Blank EE, Egger AW, Kellar BM, Østergaard ME, Seth PP, Harris EN. Stabilin-1 and Stabilin-2 are specific receptors for the cellular internalization of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides (ASOs) in the liver. *Nucleic Acids Res*. 2016 Apr 7;44(6):2782-94.

Minshall RD, Malik AB. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(176 Pt 1):107-44.

Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol*. 2012 Jul 10;22(13):1166-75.

Moody RG, Williamson MP. Structure and function of a bacterial Fasciclin I Domain Protein elucidates function of related cell adhesion proteins such as TGFBIp and perlestin. *FEBS Open Bio*. 2013 Jan 11;3:71-7.

Moos S, Mohebiany AN, Waisman A, Kurschus FC. Imiquimod-Induced Psoriasis in Mice Depends on the IL-17 Signaling of Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2019 May;139(5):1110-1117.

Mousavi SA, Sporstøl M, Fladeby C, Kjekken R, Barois N, Berg T. Receptor-mediated endocytosis of immune complexes in rat liver sinusoidal endothelial cells is mediated by FcγRIIb2. *Hepatology.* 2007 Sep;46(3):871-84.

Murota H, Lingli Y, Katayama I. Periostin in the pathogenesis of skin diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Dec;74(23):4321-4328.

Murray V, Chen JK, Chung LH. The Interaction of the Metallo-Glycopeptide Anti-Tumour Drug Bleomycin with DNA. *Int J Mol Sci.* 2018 May 4;19(5):1372.

Nakae D, Mizumoto Y, Andoh N, Tamura K, Horiguchi K, Endoh T, Kobayashi E, Tsujiuchi T, Denda A, Lombardi B, Konishi Y. Comparative changes in the liver of female fischer-344 rats after short-term feeding of a semipurified or a semisynthetic l-amino acid-defined choline-deficient diet. *Toxicol Pathol.* 1995;23:583–590.

Nakanishi K, Kaji K, Kitade M, Kubo T, Furukawa M, Saikawa S, Shimosato N, Sato S, Seki K, Kawaratani H, Moriya K, Namisaki T, Yoshiji H. Exogenous Administration of Low-Dose Lipopolysaccharide Potentiates Liver Fibrosis in a Choline-Deficient l-Amino-Acid-Defined Diet-Induced Murine Steatohepatitis Model. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 3;20(11):2724.

Nickoloff BJ, Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2004 Jun;113(12):1664-75.

Niu L, Geyer PE, Wewer Albrechtsen NJ, Glud LL, Santos A, Doll S, Treit PV, Holst JJ, Knop FK, Vilsbøll T, Junker A, Sachs S, Stemmer K, Müller TD, Tschöp MH, Hofmann SM, Mann M. Plasma proteome profiling discovers novel proteins associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Syst Biol.* 2019 Mar 1;15(3):e8793.

Norris RA, Damon B, Mironov V, Kasyanov V, Ramamurthi A, Moreno-Rodriguez R, Trusk T, Potts JD, Goodwin RL, Davis J, Hoffman S, Wen X, Sugi Y, Kern CB, Mjaatvedt CH, Turner DK, Oka T, Conway SJ, Molkentin JD, Forgacs G, Markwald RR. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem.* 2007 Jun 1;101(3):695-711.

O'Brien ER, Bennett KL, Garvin MR, Zderic TW, Hinohara T, Simpson JB, Kimura T, Nobuyoshi M, Mizgala H, Purchio A, Schwartz SM. Beta ig-h3, a transforming growth factor-beta-inducible gene, is overexpressed in atherosclerotic and restenotic human vascular lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Apr;16(4):576-84.

Odonwodo A, Badri T, Hariz A. Scleroderma. 2022 May 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–.

Olsavszky V, Sticht C, Schmid CD, Winkler M, Wohlfeil SA, Olsavszky A, Schledzewski K, Géraud C, Goerdts S, Leibing T, Koch PS. Exploring the transcriptomic network of multi-ligand scavenger receptor Stabilin-1- and Stabilin-2-deficient liver sinusoidal endothelial cells. *Gene.* 2021 Feb 5;768:145284.

Palani S, Elima K, Ekholm E, Jalkanen S, Salmi M. Monocyte Stabilin-1 Suppresses the Activation of Th1 Lymphocytes. *J Immunol.* 2016 Jan 1;196(1):115-23.

Park GT, Yoon JW, Yoo SB, Song YC, Song P, Kim HK, Han J, Bae SJ, Ha KT, Mishchenko NP, Fedoreyev SA, Stonik VA, Kim MB, Kim JH. Echinochrome A Treatment Alleviates Fibrosis and Inflammation in Bleomycin-Induced Scleroderma. *Mar Drugs.* 2021 Apr 23;19(5):237.

Park SW, Bae JS, Kim KS, Park SH, Lee BH, Choi JY, Park JY, Ha SW, Kim YL, Kwon TH, Kim IS, Park RW. Beta ig-h3 promotes renal proximal tubular epithelial cell adhesion, migration and proliferation through the interaction with alpha3beta1 integrin. *Exp Mol Med.* 2004 Jun 30;36(3):211-9.

Park SY, Kim SY, Jung MY, Bae DJ, Kim IS. Epidermal growth factor-like domain repeat of stabilin-2 recognizes phosphatidylserine during cell corpse clearance. *Mol Cell Biol.* 2008 Sep;28(17):5288-98.

Patten DA, Shetty S. The Role of Stabilin-1 in Lymphocyte Trafficking and Macrophage Scavenging in the Liver Microenvironment. *Biomolecules.* 2019 Jul 16;9(7):283.

Pempe EH, Xu Y, Gopalakrishnan S, Liu J, Harris EN. Probing structural selectivity of synthetic heparin binding to Stabilin protein receptors. *J Biol Chem.* 2012 Jun 15;287(25):20774-83.

Petering DH, Byrnes RW, Antholine WE. The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin. *Chem Biol Interact.* 1990;73(2-3):133-82.

Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 20;21(22):8790.

Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, Rautou PE. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol.* 2017 Jan;66(1):212-227.

Politz O, Gratchev A, McCourt PA, Schledzewski K, Guillot P, Johansson S, Svineng G, Franke P, Kannicht C, Kzhyshkowska J, Longati P, Velten FW, Johansson S, Goerdts S. Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues. *Biochem J.* 2002 Feb 15;362(Pt 1):155-64.

PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, Bowdish DME, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, Krieger M, Loike J, McVicker B, Means TK, Moestrup SK, Post SR, Sawamura T, Silverstein S, Speth RC, Telfer JC, Thiele GM, Wang XY, Wright SD, El Khoury J. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol.* 2017 May 15;198(10):3775-3789.

Prevo R, Banerji S, Ni J, Jackson DG. Rapid plasma membrane-endosomal trafficking of the lymph node sinus and high endothelial venule scavenger receptor/homing receptor stabilin-1 (FEEL-1/CLEVER-1). *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):52580-92.

Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S54-62.

Rantakari P, Patten DA, Valtonen J, Karikoski M, Gerke H, Dawes H, Laurila J, Ohlmeier S, Elima K, Hübscher SG, Weston CJ, Jalkanen S, Adams DH, Salmi M, Shetty S. Stabilin-1 expression defines a subset of macrophages that mediate tissue homeostasis and prevent fibrosis in chronic liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 16;113(33):9298-303.

Rawe IM, Zhan Q, Burrows R, Bennett K, Cintron C. Beta-ig. Molecular cloning and in situ hybridization in corneal tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997 Apr;38(5):893-900.

Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun Rev*. 2014 Apr-May;13(4-5):490-5.

Reid DT, Reyes JL, McDonald BA, Vo T, Reimer RA, Eksteen B. Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. *PLoS One*. 2016 Jul 25;11(7):e0159524.

Ribatti D, Tamma R, Annese T. The role of vascular niche and endothelial cells in organogenesis and regeneration. *Exp Cell Res*. 2021 Jan 1;398(1):112398.

Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, Turner SM, Badger TM, Pitas RE, Maher JJ. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res*. 2006 Oct;47(10):2280-90.

Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, Darling N, Ritchie P, Määttä A, Karakesisoglou I, Nelson G, von Zglinicki T, Dicolandrea T, Isfort R, Bascom C, Przyborski S. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat.* 2019 Apr;234(4):438-455.

Rostgaard J, Qvortrup K. Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvasc Res.* 1997 Jan;53(1):1-13.

Roth RR, James WD. Microbial ecology of the skin. *Annu Rev Microbiol.* 1988;42:441-64.

Ruan K, Bao S, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jul;66(14):2219-30.

Runager K, Basaiawmoit RV, Deva T, Andreasen M, Valnickova Z, Sørensen CS, Karring H, Thøgersen IB, Christiansen G, Underhaug J, Kristensen T, Nielsen NC, Klintworth GK, Otzen DE, Enghild JJ. Human phenotypically distinct TGFBI corneal dystrophies are linked to the stability of the fourth FAS1 domain of TGFBIp. *J Biol Chem.* 2011 Feb 18;286(7):4951-8.

Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:697-715.

Salmi M, Koskinen K, Henttinen T, Elima K, Jalkanen S. CLEVER-1 mediates lymphocyte transmigration through vascular and lymphatic endothelium. *Blood.* 2004 Dec 15;104(13):3849-57.

Saxena R, Theise ND, Crawford JM. Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces. *Hepatology.* 1999 Dec;30(6):1339-46.

Schierwagen R, Maybüchen L, Zimmer S, Hittatiya K, Bäck C, Klein S, Uschner FE, Reul W, Boor P, Nickenig G, Strassburg CP, Trautwein C, Plat J, Lütjohann D, Sauerbruch T, Tacke F, Trebicka J. Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci Rep*. 2015 Aug 11;5:12931.

Schledzewski K, Géraud C, Arnold B, Wang S, Gröne HJ, Kempf T, Wollert KC, Straub BK, Schirmacher P, Demory A, Schönhaber H, Gratchev A, Dietz L, Thierse HJ, Kzhyshkowska J, Goerdts S. Deficiency of liver sinusoidal scavenger receptors stabilin-1 and -2 in mice causes glomerulofibrotic nephropathy via impaired hepatic clearance of noxious blood factors. *J Clin Invest*. 2011 Feb;121(2):703-14.

Schmitt J, Wozel G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology*. 2005;210(3):194-9.

Schomaker S, Potter D, Warner R, Larkindale J, King N, Porter AC, Owens J, Tomlinson L, Sauer JM, Johnson K, Aubrecht J. Serum glutamate dehydrogenase activity enables early detection of liver injury in subjects with underlying muscle impairments. *PLoS One*. 2020 May 14;15(5):e0229753.

Seifert GJ. Fascinating Fasciclins: A Surprisingly Widespread Family of Proteins that Mediate Interactions between the Cell Exterior and the Cell Surface. *Int J Mol Sci*. 2018 May 31;19(6):1628.

Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells - gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Sep;15(9):555-567.

Shetty S, Weston CJ, Oo YH, Westerlund N, Stamataki Z, Youster J, Hubscher SG, Salmi M, Jalkanen S, Lalor PF, Adams DH. Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium. *J Immunol*. 2011 Apr 1;186(7):4147-55.

Shi H, Cheer K, Simanainen U, Lesmana B, Ma D, Hew JJ, Parungao RJ, Li Z, Cooper MS, Handelsman DJ, Maitz PK, Wang Y. The contradictory role of androgens in cutaneous and major burn wound healing. *Burns Trauma*. 2021 Apr 20;9:tkaa046.

Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015 Apr;13(4):643-54.e1-9; quiz e39-40.

Skandalakis JE, Skandalakis LJ, Skandalakis PN, Mirilas P. Hepatic surgical anatomy. *Surg Clin North Am*. 2004 Apr;84(2):413-35, viii.

Skonier J, Bennett K, Rothwell V, Kosowski S, Plowman G, Wallace P, Edelhoff S, Disteche C, Neubauer M, Marquardt H, et al. beta ig-h3: a transforming growth factor-beta-responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell attachment in vitro and suppresses the growth of CHO cells in nude mice. *DNA Cell Biol*. 1994 Jun;13(6):571-84.

Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennett K, Plowman GD, Purchio AF. cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol*. 1992 Sep;11(7):511-22.

Smedsrød B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent TC. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem J*. 1990 Mar 1;266(2):313-27.

Smedsrød B. Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol*. 2004 Jan 14;3 Suppl 1(Suppl 1):S22.

Smirne C, Mulas V, Barbaglia MN, Mallela VR, Minisini R, Barizzone N, Burlone ME, Pirisi M, Grossini E. Periostin Circulating Levels and Genetic Variants in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Nov 25;10(12):1003.

Sonnenberg-Riethmacher E, Mieke M, Riethmacher D. Periostin in Allergy and Inflammation. *Front Immunol*. 2021 Aug 27;12:722170.

Sørensen KK, McCourt P, Berg T, Crossley C, Le Couteur D, Wake K, Smedsrød B. The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Dec 15;303(12):R1217-30.

Sørensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrød B. Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Compr Physiol*. 2015 Sep 20;5(4):1751-74.

Steffan AM, Gendrault JL, McCuskey RS, McCuskey PA, Kirn A. Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology*. 1986 Sep-Oct;6(5):830-6.

Streilein JW, Bergstresser PR. Langerhans cells: antigen presenting cells of the epidermis. *Immunobiology*. 1984 Dec;168(3-5):285-300.

Sugiura T, Takamatsu H, Kudo A, Amann E. Expression and characterization of murine osteoblast-specific factor 2 (OSF-2) in a baculovirus expression system. *Protein Expr Purif*. 1995 Jun;6(3):305-11.

Taban Q, Mumtaz PT, Masoodi KZ, Haq E, Ahmad SM. Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action. *Cell Commun Signal*. 2022 Jan 3;20(1):2.

Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, McKenzie AN, Nagai H, Hotokebuchi T, Izuhara K. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jul;118(1):98-104.

Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J*. 1993 Aug 15;294 (Pt 1)(Pt 1):271-8.

Tamura Y, Adachi H, Osuga J, Ohashi K, Yahagi N, Sekiya M, Okazaki H, Tomita S, Iizuka Y, Shimano H, Nagai R, Kimura S, Tsujimoto M, Ishibashi S. FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2003 Apr 11;278(15):12613-7.

Thapa N, Lee BH, Kim IS. TGFBIp/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(12):2183-94.

Tølbøl KS, Stierstorfer B, Rippmann JF, Veidal SS, Rigbolt KTG, Schönberger T, Gillum MP, Hansen HH, Vrang N, Jelsing J, Feigh M, Broermann A. Disease Progression and Pharmacological Intervention in a Nutrient-Deficient Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2019 May;64(5):1238-1256.

Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017 Nov 6;27(21):R1147-R1151.

Tsai TF, Wang TS, Hung ST, Tsai PI, Schenkel B, Zhang M, Tang CH. Epidemiology and comorbidities of psoriasis patients in a national database in Taiwan. *J Dermatol Sci*. 2011 Jul;63(1):40-6.

Tumbarello DA, Temple J, Brenton JD. β 3 integrin modulates transforming growth factor beta induced (TGFBI) function and paclitaxel response in ovarian cancer cells. *Mol Cancer*. 2012 May 28;11:36.

Uhrig A, Banafsche R, Kremer M, Hegenbarth S, Hamann A, Neurath M, Gerken G, Limmer A, Knolle PA. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol*. 2005 May;77(5):626-33.

Van Berkel TJ, Out R, Hoekstra M, Kuiper J, Biessen E, van Eck M. Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*. 2005 Oct;16(5):525-35.

Van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5836-45.

Van der Meer AD, Poot AA, Duits MH, Feijen J, Vermes I. Microfluidic technology in vascular research. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:823148.

Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients*. 2017 Sep 27;9(10):1072.

Vernon H, Wehrle CJ, Kasi A. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Liver. 2021 Jul 31. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 29763190.

Viitala M, Virtakoivu R, Tadayon S, Rannikko J, Jalkanen S, Hollmén M. Immunotherapeutic Blockade of Macrophage Clever-1 Reactivates the CD8⁺ T-cell Response against Immunosuppressive Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019 Jun 1;25(11):3289-3303.

Wagner EF, Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Tschachler E. Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Dec;6(12):704-14.

Wang H, Liang X, Gravot G, Thorling CA, Crawford DH, Xu ZP, Liu X, Roberts MS. Visualizing liver anatomy, physiology and pharmacology using multiphoton microscopy. *J Biophotonics*. 2017 Jan;10(1):46-60.

Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. Transforming growth Factor-Beta-Induced Protein (TGFB1)/(βig-H3): a matrix protein with dual functions in ovarian cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(8):10461-10477.

Wei G, An P, Vaid KA, Nasser I, Huang P, Tan L, Zhao S, Schuppan D, Popov YV. Comparison of murine steatohepatitis models identifies a dietary intervention with robust fibrosis, ductular reaction, and rapid progression to cirrhosis and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020 Jan 1;318(1):G174-G188.

Wei G, An P, Vaid KA, Nasser I, Huang P, Tan L, Zhao S, Schuppan D, Popov YV. Comparison of murine steatohepatitis models identifies a dietary intervention with robust fibrosis, ductular reaction, and rapid progression to cirrhosis and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020 Jan 1;318(1):G174-G188.

Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007 May;127(5):998-1008.

Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2001 Sep;2(9):777-80.

Winkler M, Staniczek T, Kürschner SW, Schmid CD, Schönhaber H, Cordero J, Kessler L, Mathes A, Sticht C, Neßling M, Uvarovskii A, Anders S, Zhang XJ, von Figura G, Hartmann D, Mogler C, Dobрева G, Schledzewski K, Géraud C, Koch PS, Goerdts S. Endothelial GATA4 controls liver fibrosis and regeneration by preventing a pathogenic switch in angiocrine signaling. *J Hepatol*. 2021 Feb;74(2):380-393.

Wisse E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res*. 1970 Apr;31(1):125-50.

Yamaguchi Y, Ono J, Masuoka M, Ohta S, Izuhara K, Ikezawa Z, Aihara M, Takahashi K. Serum periostin levels are correlated with progressive skin sclerosis in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol*. 2013 Apr;168(4):717-25.

Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol*. 2005 Feb;14(2):81-95.

Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol*. 1999 Apr;112(4):456-62.

Yang K, Huang N, Sun J, Dai W, Chen M, Zeng J. Transforming growth factor- β induced protein regulates pulmonary fibrosis via the G-protein signaling modulator 2 /Snail axis. *Peptides*. 2022 Sep;155:170842.

Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, Matsui S, Kudo A, Naka T, Murota H, Katayama I. Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma. *PLoS One*. 2012;7(7):e41994.

Yao ZM, Vance DE. Reduction in VLDL, but not HDL, in plasma of rats deficient in choline. *Biochem Cell Biol*. 1990 Feb;68(2):552-8.

Yousef H, Alhajj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. 2021 Nov 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–.

Yu L, Wang J, Liu K. Role of periostin in ECRS. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021 Aug;278(8):2665-2672.

Yu RZ, Kim TW, Hong A, Watanabe TA, Gaus HJ, Geary RS. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug Metab Dispos*. 2007 Mar;35(3):460-8.

Zani IA, Stephen SL, Mughal NA, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft SB, Ponnambalam S. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells*. 2015 May 22;4(2):178-201.

Zawatsky CN, Park JK, Abdalla J, Kunos G, Iyer MR, Cinar R. Peripheral Hybrid CB₁R and iNOS Antagonist MRI-1867 Displays Anti-Fibrotic Efficacy in Bleomycin-Induced Skin Fibrosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Sep 28;12:744857.

Zhao S, Wu H, Xia W, Chen X, Zhu S, Zhang S, Shao Y, Ma W, Yang D, Zhang J. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J Cardiol*. 2014 May;63(5):373-8.

Zhou B, Weigel JA, Fauss L, Weigel PH. Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). *J Biol Chem*. 2000 Dec 1;275(48):37733-41.

Zhou HM, Wang J, Elliott C, Wen W, Hamilton DW, Conway SJ. Spatiotemporal expression of periostin during skin development and incisional wound healing: lessons for human fibrotic scar formation. *J Cell Commun Signal*. 2010 Jun;4(2):99-107.

Zhou Z, Xu MJ, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2016 May;13(3):301-15.

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Krzistetzko Jessica

Geburtsdatum: 26.06.1989

Geburtsort: Bad Cannstatt

SCHULISCHER WERDEGANG

1995 – 2012

21.06.2012 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2012 - 2015 Beginn des Studiums Biologie an der Universität Hohenheim

12.10.2015 Bachelor

2015 – 2017 Masterarbeit (Der Einfluss von Calprotectin auf das Wachstum pathogener Darmbakterien)

26.09.2017 Master, Note: 1.5

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Cyrill Géraud bedanken, für die Möglichkeit an diesem interessanten und gut strukturierten Projekt zu arbeiten. Ebenfalls möchte ich mich dafür bedanken, dass er als Ansprechpartner immer zur Verfügung stand und es immer genug Raum für eigene Ideen gab.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Thomas Leibing! Thomas, du warst mir in den letzten 4 Jahren immer eine Stütze und ich konnte mich in jeder Situation zu hundert Prozent auf dich verlassen. Du hast deine Aufgabe als Betreuer mehr als erfüllt und ich kann dir nicht sagen wie froh ich bin, dass du mich durch die gesamte Doktorarbeit begleitet hast. Vielen Dank für alles!

Ein großes Dankeschön gilt auch unseren technischen Assistenten Hiltrud Schönhaber, Christof Dormann und Janina Ritz für die Unterstützung in experimentellen Angelegenheiten, sowie Dr. Kai Schledzewski in organisatorischen Angelegenheiten. Ebenso ein besonderes Dankeschön an Frau Prof. Dr. Christel Weiß für ihre Hilfe und Mühe bei statistischen Fragestellungen.

Ich möchte mich bei allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Géraud und Goerdt ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren bedanken und die immer vorhandene Unterstützung!

Aus tiefstem Herzen gilt mein persönlicher Dank noch zwei ganz besonderen Menschen: Anna und Janina! Mädels ich danke euch beiden für unzählige Mittagspausen voller Leichtigkeit, tiefsinnigen Gesprächen, Lachen und Weinen. Ihr zwei habt die Arbeit hier zu etwas Besonderem gemacht und ich bin unendlich froh, euch beide kennengelernt zu haben – ihr wart nicht nur Kolleginnen, sondern seid zu Freundinnen geworden! Ich hab euch lieb!

Des Weiteren möchte ich mich herzlichst bei Yang bedanken! Du hast dir so viel Mühe gegeben meine Arbeit „Wort für Wort“ Korrektur zu lesen und sie dadurch zu einer besseren Arbeit gemacht! Ich weiß das sehr zu schätzen – vielen Dank!

Abschließend gilt der größte Dank dem Menschen in meinem Leben, der mich nun schon am längsten begleitet: meinem Papa!

Daddy du hast mich immer unterstützt in den letzten 34 Jahren und ich bin dir für alles so unglaublich dankbar, dass ich es in Worten nicht ausdrücken kann! Du hast immer an mich geglaubt, auch wenn ich es nicht getan habe. Du bist immer da, wenn mir mal wieder alles zu viel wird und ich nicht weiß wie es weitergehen soll. Durch deine Unterstützung und deinen Glauben an mich, konnte ich mein Studium machen und diese Doktorarbeit schreiben. Ich bin so froh, dass ich dich habe und danke dir von ganzem Herzen! Ich hab dich unendlich lieb!