

Aus der II. Medizinischen Klinik  
Gastroenterologie, Hepatologie, Infektiologie, Ernährungsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. Matthias P.A. Ebert)

Bone Morphogenetic Protein (BMP)-9: ein hepatoprotektiver Regulator  
des Fibroblast Growth Factor (FGF) Signals

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Stephan Drexler  
aus  
Baden-Baden  
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referentin: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Katja Breitkopf-Heinlein

## Abkürzungsverzeichnis

<i>αSMA</i>	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
<i>Alb</i>	<i>Albumin</i>
<i>ALK1</i>	<i>Activin receptor-like kinase 1</i>
<i>ALK2</i>	<i>Activin receptor-like kinase 2</i>
<i>B2M</i>	<i>β2-Mikroglobulin</i>
<i>BMP-9</i>	<i>Bone morphogenetic protein-9</i>
<i>Col1α1</i>	<i>Collagen Typ I alpha 1</i>
<i>CXCL14</i>	<i>C-X-C motif chemokine ligand 14</i>
<i>CCL2</i>	<i>C-chemokine ligand 2</i>
<i>CCL4</i>	<i>Tetrachlormethan</i>
<i>CYP7A1</i>	<i>Cytochrome P450 7A1</i>
<i>EZM</i>	<i>Extrazelluläre Matrix</i>
<i>FAS</i>	<i>Fettsäure-Synthase</i>
<i>FGF15</i>	<i>Fibroblast growth factor 15</i>
<i>FGF19</i>	<i>Fibroblast growth factor 19</i>
<i>FGF21</i>	<i>Fibroblast growth factor 21</i>
<i>FGFR4</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 4</i>
<i>FN</i>	<i>Fibronectin</i>
<i>Glut2</i>	<i>Glucose transporter 2</i>
<i>H</i>	<i>Human</i>
<i>HC</i>	<i>Hepatozyten</i>
<i>HCC</i>	<i>Hepatozelluläres Karzinom</i>
<i>HSC</i>	<i>Hepatische Sternzellen</i>
<i>KLB</i>	<i>β-klotho</i>
<i>LGR5</i>	<i>Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5</i>
<i>LSEC</i>	<i>Liver Sinusoidal Endothelial Cells</i>
<i>LYVE</i>	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor</i>
<i>M</i>	<i>Mouse</i>
<i>MF</i>	<i>Myofibroblast</i>
<i>Mif</i>	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>

NAFL.....*Nicht alkoholische Fettleber*  
NAFLD.....*Nicht alkoholische Fettlebererkrankung*  
NASH.....*Nicht alkoholische Steatohepatitis*  
PEPCK.....*Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase*  
RPL19.....*Ribosomale 60S-Protein L19*  
rS18.....*Ribosomal Protein S18*  
Stab.....*Stabilin*  
UCP.....*Uncoupling protein*

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	8
1.1 Nicht- alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) .....	8
1.1.1 Epidemiologie .....	8
1.1.2 Aufbau der Leber .....	8
1.1.2.1 Myofibroblasten und deren Rolle in der Fibroseentstehung .....	9
1.1.3 Terminologie und Pathophysiologie der NAFLD .....	10
1.1.4 Nicht-alkoholische Fettleber (NAFL) .....	11
1.1.5 Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH).....	11
1.1.6 Fibrose, Leberzirrhose und HCC .....	12
1.1.7 Diagnostik .....	13
1.1.8 Prävention und Behandlung.....	13
1.2. Bone morphogenetic protein- 9.....	14
1.2.1 Aufbau und Bildung.....	14
1.2.2 Wirkungsbereiche von BMP-9 .....	15
1.2.4 Rolle von BMP-9 im Glucose- und Fettmetabolismus .....	16
1.2.5 Rolle von BMP-9 in Leberschädigung mit Inflammation .....	19
1.3 FGF- Superfamilie.....	20
1.3.1 Überblick .....	20
1.3.2 Fibroblast Growth Factor 21 .....	21
1.3.3 Fibroblast Growth Factor 19 .....	23
1.3.4 $\beta$ -Klotho als Ko-Rezeptor.....	24
1.4 Leber-Darm-Crosstalk.....	25
1.5 Organoide .....	25
1.6 Versuchsaufbau, Hypothese und Ziel der Arbeit .....	26
2 Material und Methoden.....	28
2.1 Verbrauchsmaterial .....	28
2.2 Geräte .....	29
2.3 Reagenzien .....	30
2.4 Zellkultur .....	31
2.4.1 Auftauen und Kultur .....	32
2.4.2. Passagieren, Zählen und Einfrieren.....	33
2.4.3 Übersicht der verschiedenen Zellkulturen.....	35
2.4.4 Darmorganoide .....	37
2.4.5 Leberorganoide.....	38
2.5 Stimulantien .....	39

2.5.1 Fettsäuren .....	39
2.5.2 BMP-9 .....	40
2.6 Versuchsaufbau .....	40
2.6.1 Monolayer .....	40
2.6.2 Stimulation der Monolayer und der Darmorganoide .....	40
2.6.3 Perfusionssystem.....	42
2.6.3.1 Aufbau des Perfusionssystems.....	42
2.6.3.2 Versuchsablauf .....	42
2.7. Methoden zur Untersuchung auf RNA-Ebene .....	44
2.7.1 RNA-Isolierung.....	44
2.7.2 RNA-Aufreinigung .....	44
2.7.3 RNA-Elution .....	45
2.7.4 RNA Konzentrationsmessung.....	46
2.8 cDNA Synthese.....	46
2.9 Realtime PCR .....	47
2.9.1 Verwendete Primer .....	48
3 Ergebnisse .....	51
3.1 Ursprung von BMP-9 .....	51
3.2 Untersuchungen an humanen hepatischen Sternzellen .....	52
3.2.1 BMP-9 Expression in hHSC unter Stimulation mit Fettsäuren.....	52
3.2.2 Aktivierungszustand von HSC .....	54
3.2.3 Aktivierungsgrad von LSEC .....	54
3.2.3 Die Kombination aus Öl- und Palmitinsäure stimuliert die FGF21- Synthese in hepatischen Sternzellen.....	56
3.3 Einfluss von BMP-9 und Fettsäuren auf Hepatozyten .....	57
3.3.1 FGF21-Expression in Hepatozyten.....	57
3.3.2 Expression von FGF19 in Hepatozyten .....	58
3.3.3 FGF21/FGF19 - Rezeptoren in Hepatozyten.....	59
3.4 Untersuchungen in Darmorganoiden .....	60
3.4.1 FGF19 in Darmorganoiden durch BMP-9 hochreguliert .....	60
3.4.2 Rezeptoren von FGF19 und FGF21 im Darm.....	61
3.4.3 BMP-9 Rezeptorstatus in Hepatozyten und im Darm .....	62
3.4.4 Die LGR5 Expression wird durch BMP-9 in Darmorganoiden reduziert .....	64
3.5 Untersuchungen anhand des Perfusionssystems.....	65
3.5.1 Einfluss des Perfusionssystems auf FGF19 .....	67
3.5.2 FGF19 Expression in Darm- und Leberorganoiden .....	67
3.5.3 FGF21 in Leber-und Darmorganoiden.....	68

3.5.4 Vergleich von FGF19, FGF21 und Ko-Rezeptor $\beta$ -klotho in humanem Leber- und Darmgewebe.....	69
3.5.4 Stammzellmarker der intestinalen Epithelzellen .....	70
3.5.5 BMP-9 -Rezeptoren im Perfusionssystem .....	71
4 Diskussion .....	74
4.1 Ursprung von BMP-9 .....	74
4.2 BMP-9 Expression von hHSC .....	75
4.3 Aktivierung von HSC und LSEC .....	76
4.4 FGF21 und seine Rolle im BMP-9 Stoffwechsel.....	77
4.5.1 Synthese von FGF19 .....	79
4.5.2 Der Einfluss von Fettsäuren und BMP-9 auf FGF19 .....	80
4.6 Rezeptoren von FGF19 und FGF21 .....	82
4.7 Rezeptoren von BMP-9 im Vergleich von Leber und Darm .....	83
4.8 Einfluss von BMP-9 auf die Regenerationsfähigkeit .....	84
5 Zusammenfassung .....	86
6 Literaturverzeichnis .....	88
7 Abbildungsverzeichnis .....	94
8 Tabellenverzeichnis .....	94
9 Lebenslauf .....	96
10 Danksagung .....	98

# 1 Einleitung

## 1.1 Nicht- alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)

### 1.1.1 Epidemiologie

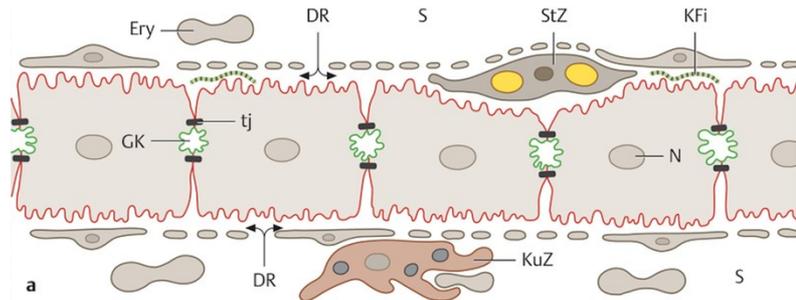
Die nicht- alkoholische Fettlebererkrankung (engl.: non-alcoholic fatty liver disease) kurz NAFLD ist ein Krankheitsbild, welches zunehmend an Bedeutung gewinnt. Ein Grund hierfür ist die steigende Prävalenz von Adipositas. Deren globales Vorkommen hat sich von 1980 bis 2008 nahezu verdoppelt<sup>1</sup>. Fettleibigkeit gilt als einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung einer NAFLD<sup>2</sup>. Da also bei vielen NAFLD Patienten kausal eine Adipositas vorliegt<sup>3</sup>, ist es nicht verwunderlich, dass auch die Prävalenz von NAFLD parallel zur Adipositas in den letzten Jahren stark gestiegen ist. Zum Beispiel stieg in den USA die Prävalenz von ca. 20.0% (1988-1994) auf 31.9% (2013-2016)<sup>4</sup>.

Die globale Prävalenz der NAFLD liegt näherungsweise bei 25%, wobei Regionen wie Südamerika und der mittlere Osten mit näherungsweise 30% die höchste, und Afrika mit 13% die niedrigste Prävalenz aufweisen.<sup>3</sup> Aufgrund von unterschiedlichen Faktoren in den Studien wie z.B. Diagnosetechniken, technologische Unterschiede und Erfahrung des Untersuchers, variieren die Daten der Prävalenzen allerdings stark.

### 1.1.2 Aufbau der Leber

Wer die NAFLD erforschen will, benötigt zu allererst ein gutes Grundverständnis der Anatomie und des mikroskopischen Aufbaus der Leber. Die Leber ist aus mehreren verschiedenen Zellarten aufgebaut: Hepatozyten (HC), Sinusoidalen Endothelzellen (LSEC= liver sinusoidal endothelial cells), hepatischen Sternzellen (HSC= hepatic stellate cells) sowie den Kupfferzellen (KC), welche ortsständige Makrophagen darstellen. Die große Mehrheit bilden die Hepatozyten, welche maßgebend die Struktur der Leber bestimmen sowie die Gallenkanälchen bilden. Sie grenzen an den

Disse-Raum, welcher aus dem Spalt zwischen HC und LSEC besteht. In diesem befinden sich auch die HSC sowie die Kupferzellen. Die LSEC sind fenestriert, wodurch der Stoffaustausch zwischen Blut und



**Abbildung 1 Mikroskopischer Aufbau der Leber** GK, Gallekanälchen; tj, tight junctions; Ery, Erythrozyten; S, Sinusoid-Lumen; DR, Disse-Raum; StZ, Leber-Sternzelle (Ito-Zellen), KuZ, Kupfer-Zelle. Lüllmann-Rauch: Taschenlehrbuch Histologie Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2019.

Lebergewebe im Disse-Raum gewährleistet wird. Die HSC, welche nach Aktivierung auch als Myofibroblasten (MF) bezeichnet werden, können Retinol (Vitamin A) einspeichern und nach Differenzierung zu Myofibroblasten Kollagenfibrillen und andere extrazelluläre Matrixproteine bilden. Durch diese zelluläre Aktivierung sind sie maßgeblich an den pathophysiologischen Prozessen der Fibrose bzw. Leberzirrhose beteiligt<sup>5</sup> (s.u.).

Weiter befinden sich auch Kupferzellen in der Leber. Sie sind ortständige Makrophagen, welche in den Lebersinusoiden an den LSEC lokalisiert sind. Sie stellen eine heterogene Gruppe dar, welche je nach Untergruppe unterschiedliche Aufgabene erfüllen. Z.B. filtern sie pathogene Moleküle aus dem Darm und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Entzündung in der Leber.<sup>6</sup>

### 1.1.2.1 Myofibroblasten und deren Rolle in der Fibroseentstehung

MF sind Zellen, welche sowohl wie Fibroblasten die Möglichkeit der Bildung von extrazellulärer Matrix (EZM) haben, als auch die Fähigkeit zu kontrahieren wie glatte Muskulatur<sup>7</sup>. Aktivierte HSC exprimieren daher wie glatte Muskulatur alpha Smooth Muscle Actin, was als möglicher Marker für den Aktivierungszustand der Zellen genutzt werden kann<sup>7</sup>. Aber woher kommen Myofibroblasten und welche Rolle spielen sie in der Leber?

Ein möglicher Ursprung von Myofibroblasten in der Leber sind die HSC. Während ruhende, gesunde HSC physiologischerweise kaum EZM synthetisieren, hat Kent et al. bereits in den 70er Jahren gezeigt, dass HSC nach Leberschädigung (durch CCL4) vermehrt EZM bilden können.<sup>8</sup> Die Auslöser dieser Differenzierung von HSC zu MF

können vielzählig sein, z.B. biologische Einflüsse wie bakterielle Toxine (Lipopolysaccharide, LPS)<sup>9</sup> oder aber auch mechanische Beeinflussung.<sup>10</sup>

MF können nicht nur aus HSC entstehen. Welche Zellen genau zu MF der Leber differenzieren können ist noch Gegenstand aktueller Forschung. So scheinen portale Mesenchymzellen ebenfalls zu sogenannten portal mesenchymal cell-derived myofibroblasts (PMF) differenzieren zu können.<sup>11</sup> Erst vor kurzem haben Ruan et al. gezeigt, dass ebenfalls auch LSEC zumindest zum Teil eine Transition zu MF unterlaufen können.<sup>12</sup> Neben MF sind grundsätzlich auch HC dazu befähigt, EZM zu bilden.<sup>13</sup>

Da MF durch Bildung von EZM maßgeblich am Entstehen der Fibrose und folglich auch der Zirrhose beteiligt sind, gilt es die Aktivierung der oben genannten Zellen zu MF zu verhindern, um so den pathophysiologischen Prozess direkt am Anfang zu unterbinden.<sup>14</sup>

### 1.1.3 Terminologie und Pathophysiologie der NAFLD

Der Begriff NAFLD stellt einen Überbegriff dar, welcher ein weites Spektrum an progressiven Lebererkrankungen betitelt. Diese haben alle eine zugrundeliegende Leberverfettung (*Steatosis*) gemeinsam. Das Spektrum von NAFLD reicht von einfacher Fettleber, über NASH (non-alcoholic steatohepatitis) und Fibrose, bis hin zur Leberzirrhose. Die Leberzirrhose stellt das gemeinsame Endstadium vieler chronischer Lebererkrankungen dar.

NAFLD ist durch eine pathologische Akkumulation von Fetten, hauptsächlich Triglyzeriden, in den Leberzellen definiert, während zeitgleich kein Alkoholabusus oder sekundäre Ursachen vorliegen dürfen.<sup>15</sup> Alkoholabusus ist dabei als Überschreitung der täglichen Grenzen von 20 g/d bei Männern, bzw. 10 g/d bei Frauen definiert.<sup>16</sup>

Das metabolische Syndrom ist stark mit NAFLD assoziiert. Adipositas und Typ 2 Diabetes erhöhen das Risiko für die Entwicklung einer NAFLD<sup>17</sup>, sowie deren Progression zu höhergradigen Formen wie NASH oder Fibrose.<sup>18</sup> Dabei ist das metabolische Syndrom nicht mehr nur als Summe einzelner getrennter Komponenten anzusehen, sondern vielmehr als ein komplexer, dysregulierter Stoffwechselzustand, bei dem sich Adipositas, Dyslipidämie, Typ 2 Diabetes, Arteriosklerose und andere Faktoren gegenseitig beeinflussen und aggravieren. Die gegenseitige Einflussnahme

schlägt sich in der hohen Komorbidität nieder. 50% der NAFLD Patienten leiden unter Adipositas<sup>3</sup>, während der Typ 2 Diabetes mit 50-85% sogar eine noch höhere Komorbidität aufweist.<sup>19</sup>

#### 1.1.4 Nicht-alkoholische Fettleber (NAFL)

Die Nicht-alkoholische Fettleber, NAFL, stellt eine prinzipiell benigne Form der NAFLD dar und wird in vier Grade eingeteilt. Null stellt den physiologischen Zustand dar, welcher einem Fettgehalt von < 5% entspricht. Der erste Grad gibt einen Fettgehalt unter 33% an, während 2 und 3 einen Fettgehalt von unter bzw. über 66% angeben<sup>20, 21</sup> (siehe Tabelle 1). Der NAFLD Activity Score (NAS) ergibt sich aus Steatose, ballonierten Hepatozyten und lobulärer Inflammation und macht eine Aussage über die Aktivität der Entzündung.<sup>21</sup>

Die NAFL ist eine gutartige und potenziell vollständig reversible Kondition. Sie fällt in der Sonographie durch eine, im Vergleich zum Nierenparenchym, erhöhte Echogenität auf. Trotz der Gutartigkeit besteht mit 5-20%<sup>22</sup> das Risiko einer Progression zur NASH, wobei auch hier die Daten der Studien erheblich variieren. Dabei wird die Progressionsrate durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Typ 2 Diabetes oder Adipositas, erhöht.<sup>23</sup>

#### 1.1.5 Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH)

Bei der NASH (non-alcoholic steatohepatitis) liegt zusätzlich zur Verfettung eine Entzündung vor. Als einzig verlässliche Methodik zur Diagnosestellung gilt die Biopsie, welche deshalb auch als Goldstandard angesehen wird.<sup>24</sup> Die

NAS	Steatose (Prozent Fetteinlagerung in Hepatozyten)	ballonierte Hepatozyten	Inflammation, lobulär
0	< 5 % (0)	keine (0)	keine (0)
3	5 – 33 % (1)	wenig (1)	1 – 2 Foci pro 20-x-Feld (1)
6	34 – 66 % (2)	zahlreich (2)	2 – 4 Foci pro 20-x-Feld (2)
8	> 66 % (3)	zahlreich (2)	> 4 Foci pro 20-x-Feld (3)

**Tabelle 3 Einteilung der Schweregrade der nicht-alkoholischen Fettleber.**

NAS: NAFLD-Aktivitätsgrad (Grading). Roeb E, Steffen HM, Bantel H, et al. [S2k Guideline non-alcoholic fatty liver disease]. Z Gastroenterol. 2015;53(7):668-723.

Biopsie ist aufwendig, für den Patienten unangenehm, geht mit dem Risiko einer Blutung einher und wird demzufolge nur bei ausreichender Indikation durchgeführt.

Das histologische Bild der NASH ist geprägt durch eine Steatosis mit dem morphologischen Korrelat von Fettvesikeln in den Hepatozyten. Infiltrate aus neutrophilen und mononukleären Zellen sowie die Vergrößerung der Hepatozyten (sogenanntes „ballooning“) spiegeln dabei die Entzündung wider.<sup>25</sup>

Sowohl bei einfacher NAFL als auch bei NASH kann es zum fibrotischen Umbau kommen. Näherungsweise ein Drittel der NAFLD Patienten entwickeln eine Fibrose, wobei das Risiko bei NASH höher liegt als bei NAFL.<sup>26</sup>

In der Literatur wird die Progression einer NAFL zur NASH mit sehr unterschiedlichen Häufigkeiten angegeben.<sup>22</sup> Wahrscheinlich sind neben den schwierigen Diagnoseumständen auch die Heterogenität des Krankheitsbildes sowie die verschiedenen Komorbiditäten für die variierenden Daten verantwortlich.

Zur Progression zur Leberzirrhose oder dem hepatozellulären Karzinom (HCC) kommt es allerdings nur zu einem geringen Prozentsatz. In der Literatur werden unterschiedliche Häufigkeiten angegeben. So gehen manche Studien von einer Progressionsrate von ca. 2,4% innerhalb von 7 Jahren aus, andere von 12,8% über 3 Jahre<sup>27</sup>. Bemerkenswerterweise ist die Entwicklung eines HCC auf dem Boden einer NASH auch ohne Zirrhose möglich.<sup>28</sup>

### 1.1.6 Fibrose, Leberzirrhose und HCC

Bei der Fibrose kommt es zum bindegewebigen Umbau des Leberparenchyms, welches dadurch seiner ursprünglichen Funktion nicht mehr nachkommen kann. Sie wird in fünf Schweregrade (F0-F4)<sup>29</sup> eingeteilt und kann elastographisch bestimmt werden. Der Schweregrad F4 wird dabei als Leberzirrhose bezeichnet.<sup>29</sup>

Durch chronische Entzündungsprozesse begünstigen NASH, Fibrose und Leberzirrhose das Entstehen maligner Zellentartung und damit das Entstehen eines hepatozellulären Karzinom (HCC).<sup>27</sup> Wie bereits oben erwähnt, kann ein HCC aber auch aus einer NAFLD ohne Entzündungskomponente entstehen.

Ist die NAFLD bereits bis zur Leberzirrhose fortgeschritten, ist die einzig kurative Therapie die Lebertransplantation.<sup>30</sup> Aufgrund steigender Prävalenz von Leberzirrhose sowie einer begrenzten Anzahl von Spenderorganen können allerdings nicht alle Patienten mit geeigneten Transplantaten versorgt werden. Daher ist es

wichtig, die zugrundeliegenden Leberkrankheiten wie z.B. NALFD bereits vor der Entstehung einer Fibrose und Leberzirrhose zu erkennen und zu behandeln.

### 1.1.7 Diagnostik

Als nicht-invasive Diagnostik stehen Ultraschall, Elastografie, Computertomografie, Magnetresonanztomografie sowie Szintigraphie zur Verfügung.<sup>31</sup> Zur Feststellung der Fettleber wird häufig die Sonographie und für die Fibrose häufig die Elastografie verwendet, da diese Untersuchungen kostengünstig und einfach durchzuführen sind. Allerdings schwanken Sensitivität und Spezifität abhängig von der Erfahrung des Untersuchers, sowie von anderen Faktoren wie z.B. der zu durchdringenden Schichtdicke bei adipösen Patienten.<sup>32</sup> Um die Schwere der Leberschädigung von z.B. einer NASH akkurat einzuschätzen, ist daher nur die Leberbiopsie geeignet und gilt demzufolge als Goldstandard.<sup>33</sup>

Zur Diagnostik geeignete Laborparameter konnten bis jetzt nicht erhoben werden. Zwar können erhöhte Werte der Alanintransaminase (ALT) und Aspartat-transaminase (AST) Hinweise auf Vorliegen einer NAFLD geben, doch zeigten bei einer Bevölkerungsstudie von Browning et al.<sup>34</sup> fast 80% der Patienten mit einer NAFLD normwertige ALT-Level. Während es bei der NASH bereits Ansätze wie z.B. den FIB4-Score gibt, um Fibrose zu diagnostizieren<sup>35</sup>, fehlt es bei der NAFL noch an geeigneten Biomarkern. Um mögliche Biomarker zu definieren, sind weitere Untersuchungen der Pathophysiologie der NAFLD notwendig.

### 1.1.8 Prävention und Behandlung

Da Adipositas einen großen Faktor bei der Entstehung und Unterhaltung der NALFD darstellt<sup>3</sup>, scheint es naheliegend, dem Krankheitsbild mit einer Diät zu begegnen. In der Tat bewirkt ein adäquater Gewichtsverlust eine suffiziente Reduktion von NAFLD assoziierten Parametern.<sup>36</sup> Doch leider können viele Patienten nicht zum notwendigen Gewichtsverlust motiviert werden, bzw. den erreichten Gewichtsverlust nicht aufrechterhalten.

Daher ist die Entwicklung von geeigneten Medikamenten wichtig, um der Progression der NAFL zu NASH und Fibrose bzw. zur Leberzirrhose entgegenzuwirken.

Bestimmte medikamentöse Ansatzpunkte befinden sich bereits in Phase 2 Studien. Allerdings ist die Marktreife noch fern und deren Wirksamkeit auch noch nicht bewiesen.<sup>37, 38</sup>

Deswegen ist es notwendig weiterhin Grundlagenforschung zu betreiben, um die zugrundeliegenden Pathomechanismen besser zu verstehen. Neue Mediatoren müssen gefunden und deren Funktion und Signalwege besser verstanden werden. Nur so können neue Ansätze und Medikamente entwickelt werden, welche schädigende Einflüsse gezielt hemmen bzw. protektive Einflüsse verstärken können.

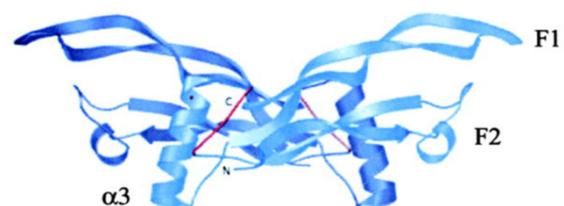
## 1.2. Bone morphogenetic protein- 9

### 1.2.1 Aufbau und Bildung

Einer dieser potenziellen neuen Zielstrukturen könnte Bone morphogenetic protein (BMP)-9 sein. BMP- 9 ist ebenfalls unter dem Namen Growth and differentiation factor (GDF)- 2 bekannt und gehört zur TGF- $\beta$  Superfamilie.<sup>39</sup>

Die TGF- $\beta$  Superfamilie hat verschiedenste Funktionen, v.a. im Bereich der Zelldifferenzierung und -proliferation.<sup>40</sup>

Neben BMP-9 sind über 20 andere BMP's bekannt. Nach Brown et al.<sup>40</sup> zeigt BMP-9 eine schmetterlingsartige Konformation mit einer  $\alpha$ -Helix sowie zwei  $\beta$ -Strangfolien (Finger F1 und F2), welche sich vom Kern des Moleküls aus erstrecken (vgl. Abb. 2).



**Abb. 2 Struktur von BMP-9 nach Brown et al. (2005).** Die prä-helix loop, welche wahrscheinliche spezifische Determinanten codiert, ist rötlich gefärbt. F1, Finger Region 1; F2, Finger Region 2;  $\alpha$ 3,  $\alpha$ -helix 3; C, C Terminus; N, N Terminus.

BMP-9 wird als Pre-Pro-Komplex vom Lebergewebe konstitutiv sezerniert und bildet Homodimere aus<sup>41</sup>. Anschließend wird es von Serin-Endoproteasen zu einer kurzen dimerischen Form (25 kDa) sowie einer Prodomäne prozessiert, welche mit der kurzen Form assoziiert vorliegen kann.<sup>41</sup>

BMP-9 wird konstitutiv gebildet und liegt im Blut zirkulierend immer als aktive Form vor. Während die Leber allgemein als Hauptsyntheseort angenommen wird, und eine Arbeitsgruppe die Hepatozyten als Hauptproduzenten angeben<sup>41</sup>, konnte Breitkopf-Heinlein et al.<sup>39</sup> 2017 zeigen, dass BMP-9 vermutlich hauptsächlich von HSC gebildet wird und eher nicht von Hepatozyten.<sup>39,42, 43</sup>

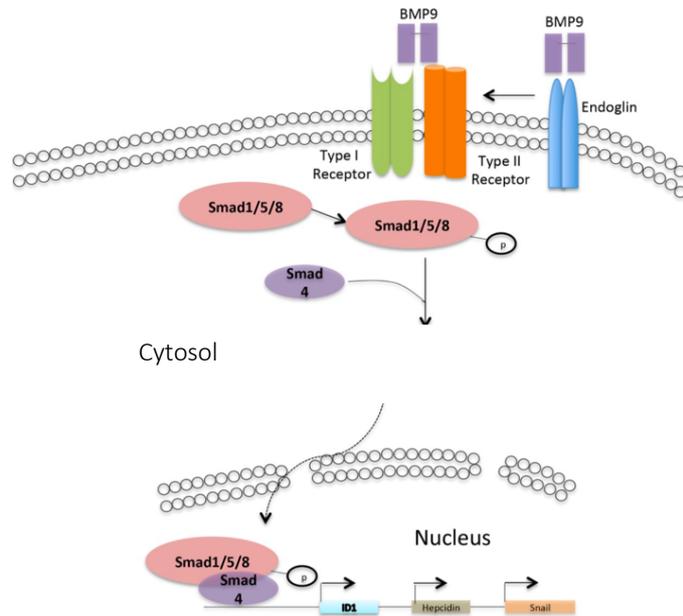
### 1.2.2 Wirkungsbereiche von BMP-9

Die BMP-Familie wirkt in verschiedensten funktionellen Bereichen, wie z.B. Zellwachstum und Differenzierung, Apoptose sowie in zahlreichen weiteren Bereichen.<sup>44</sup> BMP-9 wurde erstmals im Jahre 2000 in der Maus als autokrines und parakrines Zytokin entdeckt.<sup>45</sup> Der bis dato ermittelte Einflussbereich von BMP-9 ist ebenfalls sehr divers. Es ist an der Regulation der Knorpel-<sup>46</sup> und Knochenbildung<sup>47</sup> beteiligt, sowie des Eisenstoffwechsels<sup>48</sup>, der Bildung der Neuronen des basalen Vorderhirns<sup>49</sup>, der Angiogenese<sup>39, 43, 44</sup> und der Lymphklappenbildung.<sup>50</sup> Aktuell wird die Rolle von BMP-9 bezüglich der Entstehung von Zellentartung und Metastasenbildung intensiv untersucht. So konnte ein inhibitorischer Effekt von BMP-9 auf das Wachstum und Metastasieren von Brustkrebs gezeigt werden.<sup>51-53</sup> Auf Blasenkrebs soll BMP-9 wiederum einen proliferativen Effekt haben.<sup>54</sup> Seine möglichen Funktionen beim HCC werden noch untersucht und aktuell kontrovers diskutiert.

### 1.2.3 Signalweg

BMP-9 bindet an verschiedene Rezeptoren, welche als Serin/Threoninkinasen fungieren. Diese können grob in zwei Gruppen eingeteilt werden: Typ 1 und Typ 2. Typ 1 beinhaltet die Activin-like-kinase (ALK)-Rezeptoren mit ALK1 und ALK2. Die Gruppe der Typ 2 Rezeptoren besteht aus Activin-receptor-type-2A (ActIIA), Activin-receptor-type-2B (ActIIB) und Bone-Morphogenetic-Protein Receptor Typ 2

(BMPRII). Die Rezeptorantwort und der Signalweg wurde von Bi et al.<sup>55</sup> (s. Abb. 3) zusammengefasst. Nach der Bindung von BMP-9 an Typ1-Rezeptoren kommt es zu einer Liganden-induzierten Heterodimerisierung von Typ1- und Typ2- Rezeptoren sowie gegenseitiger Phosphorylierung. Dabei besitzt BMP-9 unterschiedliche Affinitäten bezüglich der Rezeptoren.<sup>39, 44, 55</sup>



**Abb. 4 Signalweg von BMP-9.** BMP-9 bindet den Rezeptorkomplex aus Typ I und Typ II Rezeptoren sowie deren Co-Rezeptor Endoglin. Danach kommt es zur Phosphorylierung eines Komplexes aus Smad 1,5 und 8 mit konsekutiver Assoziation von Smad 4. Anschließend erfolgt die Translokation in den Nucleus und die Beeinflussung von Zielgenen wie ID1, Hecpudin und Snail. Bi J, Ge S. Potential roles of BMP9 in liver fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2014;15(11):20656-20667.

Die höchste Affinität besitzt BMP-9 für ALK1<sup>56</sup>, welcher bevorzugt mit ActIIb dimerisiert. Zusätzlich bindet BMP-9, wenn auch mit niedrigerer Affinität, ebenfalls an ALK2, welcher wiederum entweder mit ActIIa oder BMPRII dimersiert.<sup>44, 57</sup>

Der Signalweg beider Typen, kann durch den Co-Rezeptor Endoglin moduliert werden<sup>58</sup>. Nach der Heterodimerisierung erfolgt die Phosphorylierung der Signalproteine Smad 1, 5, oder 8 mit anschließender Assoziation mit Smad 4.<sup>55</sup> Danach erfolgt die gemeinsame Translokation des Komplexes in den Nucleus. Unter den bekannten Zielgenen finden sich z.B. Id1, Hecpudin oder Snail.<sup>44, 59-61</sup>

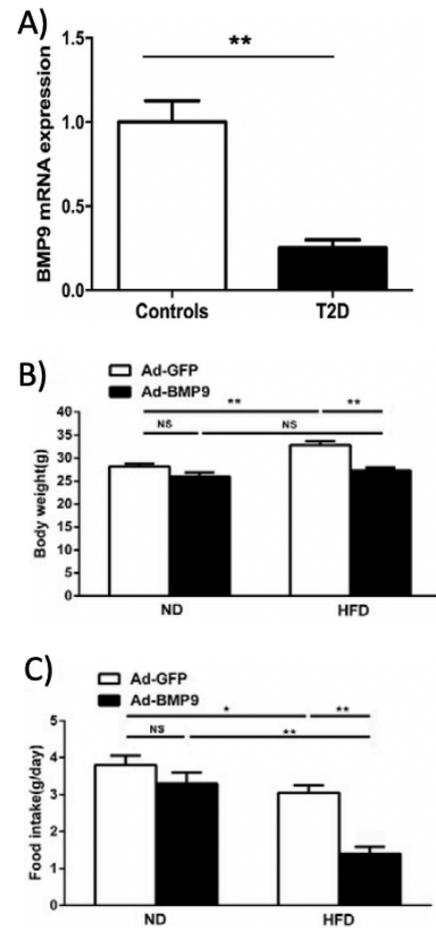
#### 1.2.4 Rolle von BMP-9 im Glucose- und Fettmetabolismus

Ein intakter Metabolismus von Glucose ist eine der Grundlagen für eine funktionierende Stoffwechsel-Homöostase. Verschiedene Komponenten bilden ein komplexes Regulationssystem. Die Hormone Insulin und Glukagon nehmen dabei zentrale Rollen ein. Andere wichtige Hormone sind GLP-1, Somastatin und Gastrin. Kommt es zu einer Störung der Homöostase im Sinne einer Insulinresistenz der

peripheren Gewebe mit kompensatorisch gesteigerter Insulinsekretion des Pankreas, spricht man vereinfacht gesagt von Diabetes Typ 2 (T2D).<sup>62</sup> Wie oben beschrieben, begünstigt T2D das Auftreten einer NAFLD.<sup>17</sup> Für das tiefere Verständnis der Pathophysiologie der Fettleber, sollte daher auch die Pathophysiologie des T2D mit Fokus auf dessen Assoziation zur Leber untersucht werden.

2017 fand die Arbeitsgruppe von Xu et al.<sup>63</sup> einen Zusammenhang zwischen dem Metabolischen Syndrom (MetS) und dem Serumlevel von BMP-9. Sie untersuchten 362 neu diagnostizierte Patienten mit metabolischem Syndrom auf ihre BMP-9 Serumlevel und verglichen diese mit denen von gesunden Probanden. Dabei zeigte sich, dass die Serumlevel von BMP-9 bei den Patienten mit MetS signifikant erniedrigt waren. Weiterhin korrelierten die BMP-9 Serumlevel negativ mit Parametern des metabolischen Syndroms, wie z.B. der Waist-Hip-Ratio, der Nüchternblutglucose, dem 2h-Glucoseserumwert nach einem OGTT (oraler Glucose Toleranz Test), dem HbA1c, den Triglyzeriden sowie dem HOMA-IR. Letztgenannter wird durch die Serumspiegel von Insulin und Glucose berechnet und macht eine Aussage über die  $\beta$ -Zellaktivität des Pankreas und die Insulinresistenz der peripheren Gewebe.<sup>63</sup>

Erniedrigte BMP-9 Serumlevel waren demnach mit schlechteren Kennparametern des Diabetes assoziiert. Diese Ergebnisse lassen einen positiven Einfluss von BMP-9 auf den Metabolismus von Glucose sowie eine protektive Rolle gegenüber dem metabolischen Syndrom vermuten. Passend zu den Ergebnissen von Xu et al., konnte die Arbeitsgruppe von Yang et al.<sup>64</sup> bei Patienten mit T2D ebenfalls erniedrigte Serumlevel von BMP-9 feststellen (s. Abb. 4A). Zur weiteren Untersuchung infizierte



**Abb. 6 BMP-9 in T2D Patienten sowie Einfluss von BMP-9 Überexpression und HFD in Mäusen, Yang et al. 2019.** A) BMP-9 mRNA Expression der Leber von T2D Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe. B) Gewichtszunahme sowie C) Nahrungsaufnahme von Mäusen nach Infektion mit Ad-BMP9 sowie Ernährung mit HFD. T2D, Type 2 Diabetes Patienten; Ad-GFP, Adenovirus expressing green fluorescence protein; Ad-BMP9, Adenovirus expressing BMP-9; ND, normal diet; HFD, high fat diet. Daten sind als Mittelwerte mit +/- Standardabweichung aufgezeigt; NS, nicht signifikant; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ .

die Arbeitsgruppe Mäuse mit einem Adenovirus (Ad-BMP-9), welcher eine Überexpression von BMP-9 verursachte. Zusätzlich wurde eine Gruppe der Mäuse mit normaler Diät, die andere mit einer *High fat diet* (HFD) ernährt. Durch den Versuchsaufbau mit einer Gruppe mit HFD sollte zusätzlich ein möglicher Einfluss von fettreicher Stoffwechsellage auf den Organismus sowie deren Wechselwirkung auf die Effekte der BMP-9 Überexpression untersucht werden.

Dabei zeigte sich, dass die Überexpression von BMP-9 ein reduziertes Gewicht (s. Abb. 4B) sowie eine verringerte Nahrungsaufnahme (s. Abb. 4C) zu Folge hatte. Weiterhin zeigten sich erniedrigte Werte der Blutglucose, des Cholesterols, der Triglyzeride und der freien Fettsäuren.

Bemerkenswert ist allerdings, dass alle diese Effekte nur bei HFD-Mäusen auftraten und nicht bei Mäusen mit normaler Diät. Es scheint, dass die Überexpression vom BMP-9 erst bei gestörter fettreicher Stoffwechsellage einen positiven Effekt erlangt. Ein Umstand, welchen ich in meinem eigenem Versuchsaufbau berücksichtigt habe.

Auf transkriptioneller Ebene beschreiben Yang et al.<sup>64</sup> eine Hemmung von SREBP-1c in den Hepatozyten der Mäuse, welche mit dem Ad-BMP-9 behandelt worden waren. SREBP-1c stellt einen zentralen Schlüsselpunkt für die Expression von verschiedenen Enzymen dar.<sup>65</sup> Die Hemmung von SREBP-1c hemmt dabei sowohl Enzyme der Glykolyse sowie auch der Lipogenese.<sup>65, 66</sup> So korreliert BMP-9 nicht nur mit einer gestörten Stoffwechselhomöostase, sondern eine vermehrte Expression könnte auch zur Verbesserung des Stoffwechsels führen.

Eine weitere Arbeitsgruppe, Kuo et al. 2014<sup>67</sup>, untersuchte, wie sich von extern appliziertes BMP-9 auf die Stoffwechselphysiologie auswirkt. Dafür injizierten sie HFD-Mäusen Mb109, ein rekombinant hergestelltes Fragment von BMP-9. Nach Applikation zeigten die Mäuse ein reduziertes Körpergewicht bei gleichbleibendem Ernährungs- sowie Bewegungsverhalten. Weiter bemerkten Kuo et al. einen erhöhten Anteil von braunem Fettgewebe. Braunes Fettgewebe kennzeichnet sich unter anderem durch das Membranprotein Thermogenin aus, welches in der Lage ist, Fettsäuren unter Wärmebildung zu oxidieren und so von der ATP-Synthese zu entkoppeln.<sup>68</sup>

Daher vermuten Kuo et al., dass BMP-9 eine Umwandlung von WAT (white adipocyte tissue) zu BAT (brown adipocyte tissue) verursacht, und so einen erhöhten Verbrauch von Fettsäuren mit einer negativen Energiebilanz bewirkt.<sup>67</sup>

Zusammenfassend scheinen die bisherigen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen auf eine Begünstigung einer katabolen Stoffwechsellage durch BMP-9 hinzudeuten. Während die Überexpression von BMP-9 das Körpergewicht senkt und über SREBP-1c die Glykolyse sowie die Lipogenese hemmt<sup>64</sup>, scheint es durch einen erhöhten Anteil von braunem Fettgewebe zusätzlich einen protektiven Effekt auf den Energiehaushalt zu haben.<sup>67</sup>

Diese Erkenntnisse könnten BMP-9 als möglichen pharmakologischen Ansatzpunkt in den Krankheitsbildern MetS und NAFLD prädestinieren. Dafür ist es allerdings notwendig, den Signalweg von BMP-9 besser zu verstehen sowie weitere mögliche Zielgene und Mediatoren zu detektieren. Wie genau bewirkt BMP-9 die Umwandlung von braunem in weißes Fettgewebe? Und auf welche Weise nimmt es protektiven Einfluss auf die verschiedenen Parameter des MetS? Sind möglicherweise noch andere Mediatoren zwischengeschaltet und wenn ja welche?

Bezüglich der Mediatoren mehren sich in der aktuellen Literatur Hinweise, dass FGF21 und FGF19, beide Mitglieder der FGF- Superfamilie, in die Signalübertragung von BMP-9 involviert sein könnten (s.u.).

### 1.2.5 Rolle von BMP-9 in Leberschädigung mit Inflammation

Während BMP-9 bei gestörter Stoffwechselhomöostase wie Diabetes oder NAFLD wie oben erwähnt wahrscheinlich eine protektive Rolle einnimmt, untersuchten Breitkopf-Heinlein et al.<sup>39</sup> die Auswirkung von BMP-9 in Mäusen nach Leberschädigung und anhand eines Fibrose-Modells. Injektionen von BMP-9 nach partieller Hepatektomie hatten einen signifikant erhöhten Leberschaden sowie eine verschlechterte Heilungsrate der Hepatektomie zur Folge. Weiterhin induzierten sie bei BMP-9-Knockout Mäusen einen chronischen Leberschaden durch wiederholte CCL4 Injektionen. Die BMP-9-KO Mäuse zeigten dabei signifikant weniger Fibrose als der Wildtyp. Die Ergebnisse lassen auf eine proinflammatorische Wirkung von BMP-9 in der Leber schließen, sofern bereits eine Schädigung mit Inflammation vorliegt. Qi et al.<sup>69</sup> zeigte ebenfalls eine erhöhte Inflammation durch BMP-9 bei Mäusen, welche eine MCD (methionine choline-deficient diet) erhalten hatten. Die MCD induzierte

Leberschädigung ist ein anerkanntes Modell für NASH.<sup>70</sup> Weiter zeigte Jiang et al.<sup>71</sup>, dass bei den MCD-Mäusen die Verstärkung der Leberschädigung durch BMP-9 wahrscheinlich über eine NF-kappaB-abhängige Makrophagen Polarisation zustande kommt. Insgesamt stehen diese Ergebnisse einer proinflammatorischen Rolle von BMP-9 in der Leber zumindest in einem gewissen Widerspruch zu der Theorie einer protektiven Rolle im Glucose- und Fettmetabolismus anderer Arbeitsgruppen. Möglicherweise wirkt BMP-9 in der Homöostase der Leber anders als im Rahmen einer chronischen Schädigung mit Dysregulation der normalen Physiologie.

## 1.3 FGF- Superfamilie

### 1.3.1 Überblick

Die Fibroblast Growth Factor (FGF)-Familie besteht aus 7 Unterfamilien von insgesamt 23 strukturell verwandten Peptiden<sup>72</sup>. Sie übernehmen als Signalmoleküle zahlreiche zentrale Rollen z.B. in der Zelldifferenzierung, im Metabolismus und in der Entwicklung.<sup>73</sup>

Abgesehen von der FGF19 Unterfamilie, binden alle an Heparansulfate<sup>74</sup>, und agieren damit nur in autokriner oder parakriner Funktion. Die FGF19-Unterfamilie, welche mit ihren drei Mitgliedern, FGF19, FGF21 und FGF23 nicht an Heparansulfate bindet, wirkt so in endokriner Funktionsweise<sup>75</sup>. Die FGF19- Unterfamilie ist in Aufgaben wie der Modulation der Gallensäurenbildung<sup>76</sup> und des Glucose- und Fettstoffwechsels involviert.<sup>77</sup>

Es gibt vier verschiedene FGF-Rezeptoren. Alle sind Tyrosinkinase und werden in unterschiedlichen Gewebearten exprimiert.<sup>78</sup> Die FGF19- Unterfamilie braucht zusätzlich die Co-Rezeptoren  $\alpha$ -Klotho oder  $\beta$ -Klotho, um an die Rezeptoren binden zu können.<sup>79</sup>

### 1.3.2 Fibroblast Growth Factor 21

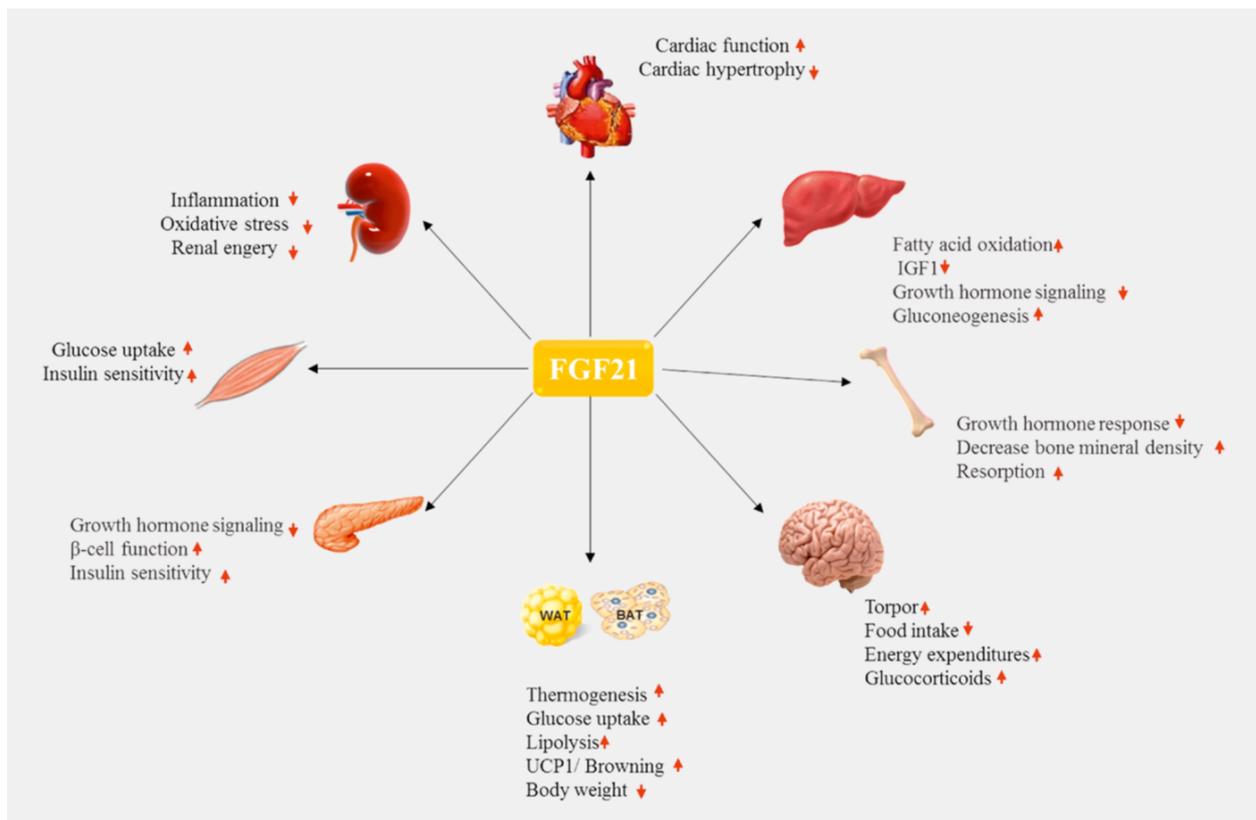
Wie zuvor erwähnt, gehört FGF21 zur FGF19 Subfamilie und kann damit endokrin wirken. Verschiedenen Arbeitsgruppen zufolge wird es vor allem in der Leber gebildet<sup>79-81</sup> und signalisiert vorwiegend über die FGF-Rezeptoren 1- 3.<sup>79</sup>

Verschiedenste positive Auswirkungen von FGF21 auf den Stoffwechsel wurden seit der Entdeckung im Jahr 2000 gefunden.<sup>81</sup> Dazu gehören z.B. eine Reduktion von Glucose, Insulin und Triglyzeriden im Blut sowie eine erhöhte Insulinsensitivität, weiterhin eine verbesserte Fettsäureoxidation in der Leber sowie eine verringerte Steatose.<sup>77, 82-84</sup>

Auch im Gehirn wirkt FGF21 und nimmt dort Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus.<sup>85</sup> Eine Übersicht möglicher Effekte von FGF21 findet sich im Schaubild (s. Abb. 5) von Babaknejad et al.<sup>38</sup>

Die Arbeitsgruppe von Yu et al.<sup>86</sup> konnte eine eigene circadiane Rhythmik der Serumlevel von FGF21 im Menschen zeigen, welche der Arbeitsgruppe zufolge in den frühen Morgenstunden ihren Höhepunkt hat. Weiter folgte das Tagesprofil der Serumlevel von FGF21 denen der freien Fettsäuren und des Cortisols und erwies sich zu den Spiegeln des Insulins als gegensätzlich.<sup>86</sup>

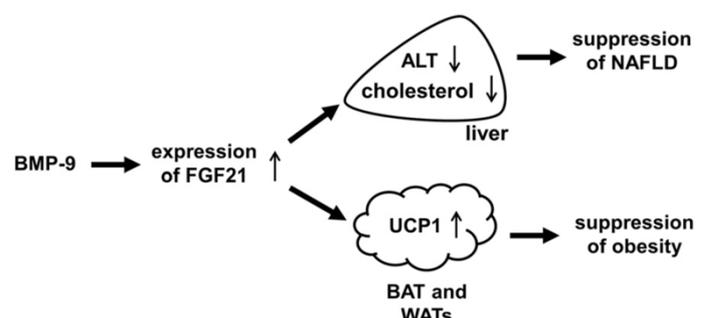
In dem Bestreben, einen Teil ihrer in vivo Ergebnisse in vitro zu reproduzieren, stimulierten sie eine humane Hepatom-Zelllinie (HepG2) mit verschiedenen Fettsäuren. Dort zeigte sich eine Induktion von FGF21 durch Linolsäure, eine zweifach ungesättigte Fettsäure mit 18 Kohlenstoff-Atomen.



**Abb. 5 Physiologische Effekte von FGF21 nach Babaknejad et al. 2018.** FGF21 agiert sowohl in parakriner als auch in endokriner Weise auf verschiedenste Gewebearten. So erhöht FGF21 z.B. in der Leber die Oxidation von Fettsäuren, während es in der Muskulatur die Insulinsensitivität steigert und im Fettgewebe eine Umwandlung von weißem in braunes Fettgewebe bewirkt. Zahlreiche weitere Effekte sind dem Schaubild von Babaknejad et al. 2018 zu entnehmen. UCP1, uncoupling protein 1; IGF1, insulin-like growth factor 1.

FGF21 wirkt in verschiedenen Gewebearten, eines davon ist weißes Fettgewebe (WAT= white adipose tissue).<sup>87</sup> Hier kann FGF21 ein „Browning“ des WAT induzieren, also eine Umwandlung von weißem in braunes Fettgewebe (BAT=brown adipose tissue)<sup>88</sup>. Dabei wird unter anderem das Enzym Uncoupling protein 1 (UCP1) /Thermogenin induziert, welches die Atmungskette von der ATP-Synthese entkoppelt. Die Energie wird so nicht in ATP gespeichert, sondern in Form von Wärme freigesetzt. Das Browning von WAT zu BAT hat damit einen positiven Effekt auf die Stoffwechsellhomöostase.<sup>68, 89, 90</sup>

Wie bereits oben erwähnt, hatten Kuo et al.<sup>67</sup> gezeigt, dass die Applikation von Mb109, einem synthetischen BMP-9, ebenfalls zu



**Abb. 6 Erkenntnisse von Kim et al. (2016) schematisch zusammengefasst.** BMP-9 bewirkt eine erhöhte Expression von FGF21 und wirkt damit protektiv in der Leber. Gleichzeitig kommt es über eine Erhöhung von UCP1 in WAT zum positiven Einfluss auf Übergewicht. ALT, Alanintransaminase; UCP1, uncoupling protein 1, BAT, brown adipose tissue; WAT, white adipose tissue.

einem Browning von WAT führt und dass dies sich positiv auf die Folgen von Übergewicht auswirkt. Da FGF21 bekanntermaßen ebenfalls ein Browning bewirkt, untersuchte die Arbeitsgruppe von Kim et al.<sup>91</sup>, ob das Browning durch BMP-9 durch FGF21 mediiert wird. Dafür applizierten sie HFD-Mäusen Mb109. In der Tat wurde FGF21 durch die Injektion von Mb109 induziert und ein Browning des WAT zu BAT fand statt (s. Abb.6).

### 1.3.3 Fibroblast Growth Factor 19

Wie oben erwähnt, gehören noch zwei weitere FGF's in dieselbe Unterfamilie von FGF21: FGF19 und FGF23. Genau wie FGF21 binden sie ebenfalls keine Heparansulfate und können so gleichermaßen auf endokrine Weise wirken. FGF19 weist darüber hinaus, mit einer zu 35% übereinstimmenden Aminosäuresequenz, eine große strukturelle Ähnlichkeit zu FGF21 auf.<sup>81</sup>

FGF19, in der Maus FGF15 genannt, wurde erstmals 1999 von Nishimura et al.<sup>92</sup> entdeckt. Es wird vom Darm und anderen Geweben gebildet und bindet vorwiegend an die Rezeptoren FGFR1 und FGFR4.<sup>38</sup> Mittlerweile sind viele verschiedene Funktionen von FGF19 beschrieben. Die bekannteste davon ist die Regulation der Gallensäurensynthese mit einem organübergreifenden Signalkreis von Leber und Darm. Gallensäuren werden von der Leber zur besseren Verdauung von Fetten in den Darm sezerniert. Diese werden im Darm, genauer im terminalen Ileum, aufgenommen und binden an den sogenannten Farnesoid X Rezeptor (FXR). Der Rezeptor bewirkt eine Induktion der FGF19 - Expression im terminalen Ileum, vermutlich einem der Hauptsyntheseorte von FGF19.<sup>38, 93, 94</sup>

Über den Blutkreislauf wirkt das sezernierte FGF19 auf endokrine Weise in der Leber, indem es an FGFR4 und dessen Ko-Rezeptor  $\beta$ -Klotho bindet. Es kommt zur Signalkaskade, durch die letztlich das Enzym CYP7A1 gehemmt wird, welches den entscheidenden Schritt der Gallensäuresynthese katalysiert. So entsteht eine Feedback-Kopplung, bei der Gallensäuren durch Induktion von FGF19 im Darm ihre eigene Synthese hemmen.<sup>38, 95-97</sup>

Neben dieser zentralen Rolle im Gallensäurestoffwechsel sind mittlerweile viele Effekte von FGF19 auf den Stoffwechsel bekannt (s. Schaubild von Babaknejad et al. 2018 Abb. 7). Diese erinnern zum Teil an das Wirkungsprofil von FGF21. FGF19 erhöht die Fettsäureoxidation und die

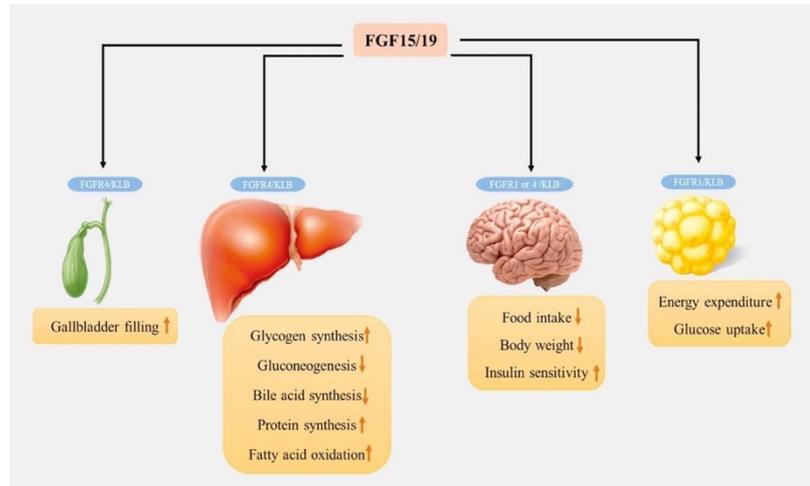


Abb. 7 Unterschiedliche Effekte von FGF15/19 in verschiedenen Organen nach Babaknejad et al. 2018. FGF15/19 nimmt über verschiedene Organe Einfluss auf die Gallensäuresynthese sowie die Stoffwechselhomöostase.

Glykogensynthese in der Leber und hemmt die Gluconeogenese. Im Fettgewebe verursacht es eine erhöhte Aufnahme von Glucose. Weiterhin bewirkt es durch Beeinflussung neuronaler Prozesse eine erhöhte Insulinsensitivität und eine verminderte Nahrungsaufnahme.<sup>38, 93, 98-100</sup>

Die meisten erforschten Effekte von FGF19 wirken sich demnach ähnlich wie FGF21 positiv auf den metabolischen Stoffwechsel aus. Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden Zytokine ist der gemeinsame Co-Rezeptor  $\beta$ -Klotho.<sup>97</sup> Er stellt möglicherweise eine Schnittstelle beider Signalwege dar.

### 1.3.4 $\beta$ -Klotho als Ko-Rezeptor

$\beta$ -Klotho ist ein obligater Ko-Rezeptor von FGF19 und FGF21.<sup>79</sup> Er wird hauptsächlich in Leber, Pankreas und weißem Fettgewebe exprimiert.<sup>101</sup> Da er für beide Signalwege gebraucht wird, stellt er eine Schnittstelle der Signalwege von FGF21 und FGF19 dar. Über eine Beziehung von BMP-9 und  $\beta$ -Klotho ist bis dato nichts bekannt.

## 1.4 Leber-Darm-Crosstalk

Breitkopf-Heinlein et al.<sup>39</sup> konnten 2017 zeigen, dass BMP-9 hauptsächlich von HSC in der Leber gebildet wird.<sup>39</sup> Weiterhin untersuchten Cai et al.<sup>102</sup> ob der Darm ein Zielgewebe von BMP-9 sein könnte. Dafür verglichen sie die Expression des BMP-9 Rezeptors ALK1 in verschiedenen Geweben. Sie konnten zeigen, dass sowohl in der Maus als auch im Menschen ALK1 im Darm um ein Vielfaches stärker exprimiert wird als in der Leber. Ebenfalls war auch Id1, ein Zielgen von BMP-9, im Darm höher exprimiert. Dies legt den Schluss nahe, dass BMP-9 zwar in der Leber gebildet wird, aber (auch) im Darm signalisiert, und dort auf die Genexpression Einfluss nimmt.

## 1.5 Organoide

Viele unserer Versuche mit den verschiedenen Leberzellarten (HC, HSC, LSEC) führten wir grundsätzlich im Monolayer (einer Kultur, die von einem einzelnen Zelltyp in einschichtigem (2D) Wachstum ausgeht) durch. Da Zellen in vivo allerdings nicht wie in der Kultur planar auf einer Matrix ausplattiert sind, fehlt dem Monolayer der physiologische, dreidimensionale Aufbau. Die fehlenden Zell-Zell-Kontakte und die unterschiedliche mechanische Belastung können Einfluss auf die Genexpression nehmen und so mögliche Ergebnisse verfälschen. Weiterhin scheinen zumindest Hepatozyten im Monolayer schnell zu dedifferenzieren<sup>103</sup>, ein Umstand, der die Genexpression ebenfalls beeinträchtigen kann.

Um die physiologischen Bedingungen besser abzubilden und so bessere translationale Ergebnisse zu generieren, nutzten wir deswegen ebenfalls Organoidstrukturen aus Leber- bzw. Darmzellen. Organoide bilden durch den dreidimensionalen Aufbau die physiologischen Bedingungen deutlich besser ab. Durch die Zusammensetzung aus den unterschiedlichen Zelltypen, können sich die Zellen in Organoidkulturen mittels Zell-Zell-Kontakten sowie ihren zellspezifischen Zytokinen gegenseitig beeinflussen, ähnlich wie es auch in vivo der Fall ist.

## 1.6 Versuchsaufbau, Hypothese und Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, mehr über die Aufgaben von BMP-9 im physiologischen Zustand sowie in fettreicher Stoffwechsellage herauszufinden. Während BMP-9 einerseits die Bildung von Fibrose in NASH fördert<sup>39</sup>, zeigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, dass BMP-9 auf den Stoffwechsel wiederum einen protektiven Effekt hat.<sup>38, 64, 67, 91</sup>

Weiterhin scheint dieser Effekt vor allem bei gestörter Stoffwechselhomöostase bzw. in HFD Konditionen zur Geltung zu kommen.<sup>64</sup>

Um dies besser zu verstehen, untersuchten wir im ersten Schritt, wie sich die Exposition von Fetten auf die Expression von BMP-9 in hepatischen Sternzellen (HSC) auswirkt. Dafür stimulierten wir humane, aktivierte HSC (= Myofibroblasten), welche aus Leberproben von Patienten isoliert wurden, mit Fettsäuren.

Weiter wollten wir aufgrund der oben erläuterten Forschungsergebnisse die Auswirkungen von BMP9 (+/- Fettsäuren) auf die Expression der Zytokine FGF21 und FGF19 untersuchen. Dabei stellte sich auch die Frage, welche Zellen überhaupt FGF21 und FGF19 bilden und in welchen Mengen. Dabei konzentrierten wir uns auf Zellen der Leber und des Darms. Die jeweiligen Zellen stimulierten wir mit BMP-9, teilweise auch in Kombination mit Fettsäuren. So wollten wir untersuchen, ob BMP-9 zusätzliche Effekte in fettreicher Stoffwechsellage aufweist, wie es die Ergebnisse von Yang et al.<sup>64</sup> nahelegen.

Da  $\beta$ -Klotho als Ko-Rezeptor von sowohl FGF21 als auch FGF19 fungiert und so womöglich eine gemeinsame Schnittstelle der Signalwege beider Zytokine bildet, war die Auswirkung von BMP-9 auf  $\beta$ -Klotho ebenfalls ein wichtiges Untersuchungsziel.

Da den Ergebnissen von Cai et al.<sup>102</sup> zufolge BMP-9 in Darm bindet und signalisiert, wollten wir auch Aspekte einer möglichen Leber-Darm-Achse untersuchen. Dafür bezogen wir sowohl Leber- als auch Darmorganoide in einen gemeinsamen Versuchsaufbau mit ein. Wie oben bereits erwähnt, bilden Organoiden die physiologischen Bedingungen grundsätzlich besser ab als Monolayer Versuche. Wir platzierten die jeweiligen Organoiden in zwei Kammern, welche mittels elastischer Schläuche verbunden waren, um einen Medium- und Stoffaustausch zu ermöglichen.

Weiter wurde eine Pumpe in Reihe geschaltet, um den Stoffaustausch zu fördern und die physiologische mechanische Belastung des Blutstroms auf die Zellen zu simulieren. Der Darm gibt im menschlichen Körper die Nährstoffe, welche er aufgenommen hat, sowie seine Signalmoleküle über die V. portae hepatis an die Leber ab. Diesen Umstand berücksichtigten wir ebenfalls im Versuchsaufbau, indem wir die Darmorganoide direkt nach der Pumpe und vor den Leberorganoiden in Reihe geschaltet haben. Auf diese Weisen haben wir versucht, den physiologischen Zustand möglichst genau abzubilden.

Die Analyse unserer Versuche führten wir vorwiegend mittels real-time PCR durch. Ziel unserer Arbeit war die Rolle von BMP-9 im physiologischen Stoffwechsel sowie auch unter fettreichen Bedingungen zu untersuchen und neue Downstream-Signalwege von BMP-9 zu entdecken.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterial

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Herstellungsfirma</i>
CELLSTAR® Filter Cap Cell Culture Flasks 75 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one
CELLSTAR® 6-Well-Plate, 9,6 cm <sup>2</sup> sterile with lid	Greiner bio-one
CELLSTAR® 12-Well-Plate, 3,9 cm <sup>2</sup> sterile with lid	Greiner bio-one
Serologische Pipette 5 ml	Greiner bio-one
Serologische Pipette 10 ml	Greiner bio-one
Serologische Pipette 25 ml	Greiner bio-one
Serologische Pipette 50 ml	Greiner bio-one
Pipettenspitzen 10 µl	Star Lab
Pipettenspitzen 200 µl	Star Lab
Pipettenspitzen 1000 µl	Star Lab
Falcons 50ml	Greiner bio-one
Falcons 25ml	Greiner bio-one
Eppendorf Safe-Lock 0,5 ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock 2 ml	Eppendorf
CRYO.S 2ml	Greiner bio-one
Handschuhe Star Guard Sensitive	Star Lab
Perfect Bind RNA Columns	VWR International GmbH
DNA Removing Columns	VWR International GmbH
Collection Tubes 2ml	VWR International GmbH
Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt
Antifect®N Liquid	Schülke

## 2.2 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Herstellungsfirma</i>
Sicherheitswerkbank	HERASafe
Inkubator	Thermo Scientific
Wasserbad 10°C – 100°C	GFL
10µl Pipette	Eppendorf
10µl Pipette	Gilson
20µl Pipette	Eppendorf
100µl Pipette	Labnet
100µl Pipette	Eppendorf
1000µl Pipette	Labnet
1000µl Pipette	Gilson
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Reax top Vortex	Heidolph
Kühlschrank 4°	Liebherr
Kühlschrank -20°	Liebherr
Kühlschrank -40°	Bosch
Hera Freeze -70°C Heraeus	Thermo Scientific
Zählkammer Neubauer Improved	Blau Brand
Lichtmikroskop Leica DM IRB	Leica
Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Scientific
Akku-betriebene Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann
Cell Scraper 25cm	Sarstedt
Große Zentrifuge 3K12	Sigma Aldrich
Infinite M200 Microplate Reader	Tecan
Nanoquant™ Plate	Tecan
Mini Centrifuge GMC-060	LMS Co.
Primus Thermal Cycler	MWG-Biotech
PCR q-Tower <sup>3</sup>	Analytikjena
Perfusionssystem QV500	Kirkstall

Pumpe Perfusionssystem	Parker
------------------------	--------

**Tab.3** Gerätschaften

## 2.3 Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Herstellungsfirma</i>
DMEM Dulbecco's modified Eagle Medium	Gibco
Advanced DMEM/F12	Gibco
Human Endothelial SFM	Gibco
Hepatocyte Culture Medium	Upcyte technologies
Hepatocyte High Performance Medium	Upcyte technologies
PBS Phosphate Buffered Saline pH7.4	Gibco
FBS Fetal Calf Serum 500ml	Life Technologies
L-Glutamin	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich
DMSO Dimethylsulfoxid 10ml	Sigma Aldrich
HGF	PeptoTech Hamburg
VEGF	PeptoTech Hamburg
Trypsin (1:10)	Gibco
TryLE™ Express	Gibco
Matrigel	Corning, USA
BMP-9	Peptotech
Palmitinsäure	Sigma Aldrich
Ölsäure	Sigma Aldrich
Linolsäure	Sigma Aldrich
B27	Gibco
N-Acetyl-L-cysteine (NAC)	Sigma Aldrich
R-Spondin	home-made
Wnt	home-made
Human-EGF	Sigma-Aldrich
Noggin	home-made

Y-27632	Cayman Chemical, USA
SB-202190	Cayman Chemical
A83-01	Sigma-Aldrich
Prostaglandin E2	Cayman Chemical, USA
Human gastrin	Sigma-Aldrich
Nicotinamid (NA)	Sigma-Aldrich
Primocin	InvivoGen, USA
HEPES	Gibco
GlutaMAX	Gibco
RNA Lysis-Buffer T	VWR Life Science
RNA Wash Buffer I	VWR Life Science
RNA Wash Buffer II	VWR Life Science
RNase-free Water	VWR Life Science
DNase I Digestion Buffer	VWR Life Science
RNase-freie DNase (20Kunitz/μl)	VWR Life Science
TransAmp Buffer	BIOLINE
Reverse Transcriptase	BIOLINE
InnuMIX qPCR MasterMix SyGreen	Analytikjena

**Tab.4** Reagenzien

## 2.4 Zellkultur

Für die Kultur der verschiedenen Zelllinien wurden sowohl Upcyte® Zellen als auch eigens im Labor isolierte Zellen verwendet. Die Upcyte® Hepatozyten (upHC) und die Upcyte® LSEC (upLSEC) wurden von der Firma Medicyte bezogen. Es handelt sich um nicht maligne Zellen, welche von primären Zellen abstammen. Die hepatischen Sternzellen (hHSC) wurden aus verschiedenen Leberteilstücken von verschiedenen Patienten eigens im Labor isoliert und in Kultur vermehrt.

Weiter wurden Stammzellen aus Darm-Krypten aus Resektaten von Patienten mit Kolonkarzinom isoliert, um daraus die Darmorganoide herzustellen. Nur gesunde, vom

Tumor weit entfernte Biopsien wurden dabei für die Isolation verwendet. Der Prozess der Isolation erfolgte wie bereits von Cai et al.<sup>102</sup> beschrieben.

Die Gewinnung, Aufbewahrung und Nutzung der Zellen von humanen Spendern entsprachen zu jeder Zeit der aktuellen Gesetzeslage und den ethischen Normen.

#### 2.4.1 Auftauen und Kultur

Die verschiedenen Zellen wurden zur Lagerung im Tiefkühlschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Als erster Schritt erfolgte daher meist das Auftauen der Zellen. Der Prozess des Auftauens und des Resuspendierens der Zellen in Medium sollte dabei so zeitsparend wie möglich erfolgen, da bei zunehmender Zeitdauer vermehrt Zellen absterben. Nach Entnahme des sogenannten Kryoröhrchens aus dem  $-80^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank, sollten die Zellen für ca. 60 Sekunden in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut und dann umgehend in einem Falcon mit 15 ml Medium resuspendiert werden. Ziel der schnellen Resuspension ist es, das potentiell zelltödliche Dimethylsulfoxid (DMSO), welches zum Einfrieren benötigt wird, rasch zu verdünnen und so den potentiellen Zelltod zu begrenzen.

Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Suspension. Die Dauer und die verwendete Zentrifugalkraft ist dabei zellspezifisch (s. Tab. 5). Der Überstand, inklusive dem giftigen DMSO, wurde verworfen und die frisch aufgetauten Zellen wurden mit sauberem Medium ausplattiert. Während bei den hHSC eine reguläre Zellkulturflasche ausreichend ist, benötigen die Hepatozyten und die LSEC Kollagenbeschichtete Flaschen.

Trotz der Vorsichtsmaßnahmen stirbt meistens ein Teil der Zellen beim Auftauprozess ab. Damit die Signalstoffe der abgestorbenen Zellen nicht das Wachstum der lebenden Zellen beeinträchtigen, wurde das Medium bereits am folgenden Tag nach dem Auftauen gewechselt. Nach dem Auftauen benötigen die Zellen einige Zeit, meist 3-4 Tage, um ihre normale Zellteilungsaktivität zu erreichen.

## 2.4.2. Passagieren, Zählen und Einfrieren

Da Zellen konstant Signal- und Abfallstoffe sezernieren, wurde in regelmäßigen Abständen ein Wechsel des Mediums durchgeführt. Der zeitliche Abstand variierte abhängig vom Dichtegrad der Konfluenz (Bedeckung der Oberfläche des Kulturgefäßes mit Zellen), betrug aber meist 48-72 h. Beim Mediumwechsel erfolgte zunächst ein vorsichtiges Waschen mit PBS (phosphate-buffered saline), um tote Zellen und Zelldetritus zu entfernen. Damit die Zellen in ihren Kulturflaschen nicht überwuchern und sich nicht gegenseitig in ihrer Genexpression in unphysiologischer Weise beeinträchtigen, wurden die Zellen in angemessenem Abstand passagiert. Dabei wurden die Zellen entweder in mehrere Kulturgefäße aufgeteilt, in Aliquots eingefroren oder überflüssige Zellen wurden verworfen. Während die Hepatozyten und LSEC bereits ab einer Konfluenz von 70% passagiert wurden, wurde bei den hHSC zunächst die komplette Konfluenz abgewartet.

Zuerst erfolgte das obligatorische Waschen der Zellen mittels PBS. Anschließend wurde Trypsin auf den Zellrasen appliziert (die Menge variiert von 1-5 ml, je nach Anzahl und Adhäsion der Zellen) und die Kulturflasche für 5 min im Inkubator bei 37°C inkubiert. Grund der Inkubation ist das Temperaturoptimum der Enzymaktivität von Trypsin, welches ebenfalls bei 37°C liegt. Nach Inkubation erfolgte durch laterales Beklopfen der Flasche ein Loslösen des Zellrasens.

Um ein vollständiges Ablösen der Zellen zu gewährleisten, wurde der Erfolg der Loslösung im Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen mit ihrem spezifischen Medium von der Matrixoberfläche mittels Pipette gespült und die Zellsuspension zentrifugiert. Beim Zentrifugieren ist auf die zellartspezifische Drehzahl zu achten, die aus der unterschiedlichen Dichte und Größe der Zellarten resultiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und der Zellrückstand mit einer adäquaten Menge Medium suspendiert. Um eine geeignete Umverteilung der Zellen vorzunehmen, ist das Zählen der Zellen unerlässlich.

Zur möglichst genauen Zählung ist es notwendig, die Zellsuspension ausreichend zu vermischen, um so eine möglichst homogene Zelldichte zu erzielen. Beim Mischen mit einer Pipette, ist auf einen ausreichenden Durchmesser der Pipette zu achten (Pipettenvolumen von 25-50 ml), da bei kleinvolumigen Pipetten (z.B. bei einem Pipettenvolumen von 1 ml) aufgrund des geringen Durchmessers der Pipette erhöhte Scherkräfte entstehen, welche womöglich die Zellen schädigen könnten.

Von der gut gemischten Zellsuspension wurden dann 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau vermischt. Von diesem Gemisch wurden wiederum 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, um anschließend die Zellen unter dem Mikroskop zu zählen. Abgestorbene Zellen erschienen aufgrund ihrer Aufnahme von Trypanblau und ihrem fehlendem nach außen gerichtetem Transport als blau gefärbt, intakte Zellen dagegen bleiben hell. Es wurden nur die gesunden Zellen berücksichtigt. Die Gesamtanzahl der Zellen wurde mit folgenden Formeln berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellen in allen 4 Quadranten}}{4} \times 10.000 \times 2$$

**Formel 1**

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \times \text{Volumen der gesamten Zelllösung}$$

**Formel 2**

Nach Entnahme der benötigten Zellzahl für die weitere Kultur bzw. für einen Versuch, wurden die restlichen Zellen je nach Bedarf eingefroren oder verworfen. Für das Einfrieren der Zellen wurden spezielle Kryoröhrchen sowie ein „Freezing Medium“, bestehend aus 70% zellspezifischem Medium, 20% FCS und 10% DMSO verwendet. Nachdem die Zellen für 24 h bei -70°C tiefgefroren worden waren, erfolgte die letztendliche Lagerung bei -180°C in flüssigem Stickstoff.

### 2.4.3 Übersicht der verschiedenen Zellkulturen

Zelltyp	Auftau-Medium	Wachstums-Medium	TNS (Trypsin neutralisierende Lösung)	Zentrifugalkraft und Kulturflasche
Upcyte® LSEC	Human endothelial SFM + 10% FCS	Human endothelial SFM + 10% FCS + 10 ng/ml VEGF + 10 ng/ml HGF	Human endothelial SFM + 10%FCS	720g Kollagen beschichtet
Upcyte® Hepatocytes	Basal Medium+ 10% FCS	Hepatocyte Wachstums Medium: Basal Medium  Hepatocytes Versuche: High Performance Medium	Basal Medium + 10% FCS	90g Kollagen beschichtet
Human HSC	DMEM + 10% FCS	DMEM + 10% FCS	DMEM + 10% FCS	260g unbeschichtet
Darmorganoide	Advanced DMEM + 10% FCS	WENRAS	Advanced DMEM + 10% FCS	800g unbeschichtet
Leberorganoide		50% HPM + 45% SFM + 5% FCS +		

		10ng/ml VEGF + 10ng/ml HGF		
Perfusionssystem		45% Advanced DMEM + 25% HPM + 22,5% SFM + 7,5% FCS + 10ng/ml VEGF + 10ng/ml HGF		

**Tab.5** Übersicht der verschiedenen Zellkulturen

Zusammensetzung <b>WENRA:</b>	Finale Konzentration
B27 (Gibco)	1:50
N-Acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma-Aldrich)	1.25 mM
Wnt3a (konditioniertes Medium)	50%
R-Spondin (konditioniertes Medium)	20%
Noggin (konditioniertes Medium)	10%
Human-EGF (Sigma-Aldrich)	50 ng/ml
Y-27632 (Cayman Chemical, USA)	10 µM
A83-01 (Sigma-Aldrich)	500 nM
Prostaglandin E2 (Cayman Chemical)	10 nM
Human gastrin (Sigma-Aldrich)	10 nM
Nicotinamid (NA) (Sigma-Aldrich)	10 mM
Primocin (InvivoGen, USA)	100 mg/ml

**Tab.6** Übersicht der Inhaltsstoffe des Mediums WENRA von Cai et al. 2022

Bemerkung zu Tab.6: Zur Bildung und Kultur von Darmorganoiden wurde WENRA, ein zusammengesetztes Medium, benutzt. Konditioniertes Medium wurde wie bei Cai et al. beschrieben, hergestellt<sup>102</sup>.

#### 2.4.4 Darmorganoide

Die Kultur von Darmorganoiden unterscheidet sich von der einfachen Monolayer-Kultur. Für Organoide nutzten wir im Gegenteil zu den Monolayer-Kulturen keine Kulturflaschen, sondern 6-Well Platten. Anders als die Monolayer kultivierten wir die Darmorganoide nicht als planaren Zellrasen, sondern innerhalb von kleinen Tropfen aus Matrigel (s. unten). Die Stammzellen für die Darmorganoide wurden, wie zuvor von Cai et al.<sup>102</sup> beschrieben, aus Darm-Krypten von gesundem Darmgewebe von Patienten mit Kolonkarzinom isoliert.

Nach Isolation wurden pro Well einer 6-well-Platte ca. 200 Krypten aus Darmzellen mit 100 µl Matrigel vermischt und auf dem Well in kleinen Tropfen platziert. Beim Matrigel wurde stets auf eine konsequente Lagerung auf Eis geachtet, da Matrigel bei 4 °C einen flüssigen Aggregatzustand einnimmt und bei 37°C fest wird. Beim sorgfältigen Durchmischen muss eine Blasenbildung vermieden werden, da diese die natürliche Anordnung der Zellverbände stört.

Anschließend wurden die Wells mit den Matrigel-Zell-Tropfen auf den Kopf gedreht und zur Überführung in den festen Aggregatzustand im Inkubator bei 37°C für 45 min inkubiert. Danach wurden die Platten wieder zurückgedreht und 2 ml des WENRA Mediums (Zusammensetzung s. Tab. 6) hinzugefügt. Das Medium wurde alle 48 h gewechselt. Um ein Loslösen der Matrigeltropfen beim Mediumwechsel zu verhindern, muss der Wechsel besonders vorsichtig durchgeführt werden. Aus demselben Grund wird dabei auf ein Waschen mit PBS verzichtet.

Ungefähr alle 7 Tage sollten die Darmorganoide passagiert werden. Dafür wurden die Tropfen aus Matrigel und Darmzellen mittels Schaber von den Platten abgelöst und mitsamt dem Medium in einem 15 ml Falcon gesammelt. Anschließend erfolgte eine zellspezifische Zentrifugation bei 4°C und 800 g für 3 Minuten.

Nach dem Abziehen des Überstandes wurde je nach Größe des Zellhaufens Trypsin (meist ca. 1 ml pro Well) hinzugefügt und mittels Pipette gut vermischt.

Nachfolgend wurde das Zellgemisch für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Währenddessen bewirkt Trypsin (Temperaturoptimum der Enzymaktivität bei 37°C) ein Auflösen des Matrigels. Anschließend wurde das Medium „Advanced DMEM“ + 10% FCS hinzugefügt, um das Trypsin mittels FCS zu neutralisieren. Danach wurde das Zellgemisch abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und

der alleinige Zellrückstand mit Matrigel suspendiert. Das weitere Procedere entspricht dem des Auftauens.

Beim Einfrieren wurden die Organoide einmal zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Das „*Freezing Medium*“ bestand aus 90% FCS und 10% DMSO.

Beim Auftauen erfolgte nach Suspension in Advanced DMEM + 10% FCS eine Zentrifugation sowie ein Abziehen des Mediums mit nachfolgender Einbettung in Matrigel und Kultur in WENRA Medium.

#### 2.4.5 Leberorganoide

Zur Herstellung von Leberorganoiden werden Hepatozyten, LSEC und HSC benötigt. Um die physiologische Zusammensetzung der Leber zu imitieren, wurden 70% upcyte HC, 20% upcyteLSEC und 10% humane HSC aus der Zellkultur verwendet. Um Organoide eines Wells einer 6-well-Platte oder einer Kammer unseres Perfusionssystems herzustellen, nutzten wir demnach 140.000 HC, 50.000 LSEC und 10.000 HSC, in toto 200.000 Zellen.

Wie oben bereits erwähnt, wurden alle drei Zellarten vor der Passage zuerst gewaschen, trypsinisiert und gezählt. Anschließend wurde die jeweils erforderliche Zellanzahl in ein 15 ml Falcon pipettiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend erfolgte die Suspension der ersten Zellart in Matrigel. Nach gründlichem Durchmischen wurde das Gemisch aus Matrigel und Zellen mit der nächsten Zellart vermengt. Der Schritt wurde erneut wiederholt, so dass sich am Ende alle drei Zelltypen im Matrigel befanden. Beim Durchmischen ist auf die Vermeidung von Blasenbildung zu achten, da diese die Architektur der Zellverbände stört. Wie oben bereits erwähnt, muss das Matrigel für einen flüssigen Aggregatzustand stets auf Eis gelagert werden. Anschließend wurde das Matrigel-Zellgemisch mit allen drei Zelltypen in kleinen Tropfen auf Wells einer 6-well-Platte oder in eine Kammer eines Perfusionssystems pipettiert. Wie bei den Darmorganoiden, wurden die Tropfen aus Matrigel für 45 min auf den Kopf gedreht und im Inkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Kultur in einem Medium aus 50% HCM, 45% SFM, 5% FCS, 10 ng/ml VEGF und 10 ng/ml HGF. Nach Kultur für 48 h wurden die Organoide mittels PBS vorsichtig gewaschen und je nach Versuchsaufbau mit unterschiedlichen Medien resuspendiert und mit unterschiedlichen Reagenzien stimuliert.

## 2.5 Stimulantien

### 2.5.1 Fettsäuren

Für die Stimulation der Zellen mit Fettsäuren wurden drei verschiedene Fettsäuren verwendet: die gesättigte Palmitinsäure mit 16 Kohlenstoffatomen (C16), die einfach ungesättigte Ölsäure (C18:1) und die mehrfach ungesättigte Linolsäure (C18:2). Die Fettsäuren wurden in reiner Form (99,9% Reinheitsgrad) von der Firma Sigma Aldrich gekauft und eigenständig gelöst und verdünnt. Die Palmitinsäure wurde in Methanol, die beiden anderen in Ethanol gelöst. Aus den Lösungen aus Fettsäure und Alkohol entstanden so Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 mM.

Alle Lösungen wurden bei 4°C und unter Lichtausschluss aufbewahrt. Die gewünschte finale Konzentration variierte je nach Versuch. In den meisten Versuchen betrug sie 200 µM.

$$\text{Stoffmengenkonzentration (Molar)} : = \frac{\text{Stoffmenge}}{\text{Volumen}}$$

**Formel 3**

Für die gewünschte Ziellösung von 200 µM, lag die Verdünnung bspw. bei:

$$\text{Verdünnung} = \frac{100 \text{ mM Stammlösung}}{200 \text{ µM Ziellösung}} = 500$$

**Formel 4**

Um die finale Konzentration von 200 µM Fettsäure zu erreichen, wurden 2 µl 100 mM Stammlösung 1 ml Medium zugegeben, was einer Verdünnung von 500 entspricht. Um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch das zur Lösung der Fettsäuren verwendete Ethanol und Methanol auszuschließen, wurden für die Kondition „Kontrolle“ ebenfalls 2 µl 100 mM Stammlösung von Ethanol (OA und LA) bzw. Methanol (PA) pro 1 ml Medium verwendet.

## 2.5.2 BMP-9

Das für die Stimulation verwendete BMP-9 wurde von der Firma Peprotech bezogen. Pro 1 ml Medium wurden 2 µl einer Stammlösung mit einer Konzentration von 2,5 ng/µl hinzugefügt, wodurch sich die finale BMP-9 Konzentration auf 5 ng/ml ergab.

## 2.6 Versuchsaufbau

### 2.6.1 Monolayer

Viele der Versuche wurden anhand reiner Monolayer-Zellkulturen durchgeführt. Dafür wurden unabhängig von der Zellart pro well einer 6-well-Platte etwa 200.000 Zellen in einem Well ausplattiert. Nach erneuter Kultur für 24 h, erfolgte meist ein „Aushungern“ der Zellen bei 0,5% FCS für 4 h vor Versuchsbeginn. Auch für den eigentlichen Versuch wurde das FCS-reduzierte Medium verwendet. Da für die upcyte Hepatozyten vom Hersteller vorgefertigte Medien verwendet wurden, wechselten wir das Medium von *Hepatocyte Cell Culture Medium (HCM)* für die Kultur zum *High Performance Medium (HPM)* für den Versuch. Letzteres enthält weniger proliferations-stimulierende Faktoren und ist daher für die Nutzung bei Versuchen konzipiert. Das *Aushungern*, also der reduzierte Anteil an Wachstumsfaktoren des Serums im Medium, wird häufig praktiziert, da sonst die Wachstumsfaktoren die Stoffwechselforgänge und womöglich auch die Genexpression beeinträchtigen und so das wissenschaftliche Ergebnis verfälschen könnten.

### 2.6.2 Stimulation der Monolayer und der Darmorganoide

Die Zellen oder die Organoide wurden für jeweils 48 h behandelt. Wie oben beschrieben wurden 4 µl der 100 mM Stammlösung der Fettsäuren in 2 ml Medium pipettiert. Während die hHSC und die Upcyte® LSEC nur mit Fettsäuren stimuliert

wurden, wurde bei den Upcyte® Hepatozyten und den Darmorganoiden bei bestimmten Konditionen zusätzlich BMP-9 (5 ng/ml) hinzugefügt.

Konditionen der Versuche mit hHSC und Upcyte® LSEC (2 ml Medium pro Well):

1) Kontrolle	4 µl Ethanol + 4 µl Methanol
2) Palmitinsäure (PA)	4 µl PA
3) Ölsäure (OA)	4 µl OA
4) Palmitinsäure + Ölsäure (PA+OA)	4 µl PA + 4 µl OA
5) Linolsäure (LA)	4 µl LA

**Tab.7** Konditionen der Versuche mit hHSC und Upcyte® LSEC

Konditionen der Versuche mit Hepatozyten und Darmorganoiden (2 ml Medium pro Well):

1) Kontrolle	4 µl Ethanol + 4 µl Methanol
2) Palmitinsäure (PA)	4 µl PA
3) Ölsäure (OA)	4 µl OA
4) Palmitinsäure + Ölsäure (PA+OA)	4 µl PA + 4 µl OA
5) Linolsäure (LA)	4 µl LA
6) BMP-9	4 µl Ethanol + 4 µl Methanol + 2 µl BMP-9
7) Palmitinsäure (PA) + BMP-9	4 µl PA + 2 µl BMP-9
8) Ölsäure (OA) + BMP-9	4 µl OA + 2 µl BMP-9
9) Palmitinsäure + Ölsäure (PA+OA) + BMP-9	4 µl PA + 4 µl OA + 2 µl BMP-9
10) Linolsäure (LA) + BMP-9	4 µl LA + 2 µl BMP-9

**Tab.8** Konditionen der Versuche mit Upcyte® Hepatozyten und Darmorganoiden

## 2.6.3 Perfusionssystem

### 2.6.3.1 Aufbau des Perfusionssystems

Um eine mögliche Leber-Darm-Achse bezüglich BMP-9 und seinen Mediatoren zu untersuchen, nutzten wir in unseren Versuchen zusätzlich ein Perfusionssystem.

Dieses bestand aus einer Pumpe, einem Mediumreservoir sowie zwei Kammern, welche mittels elastischer Schläuche verbunden waren (s. *Abb. 19 Schematische Darstellung des Perfusionssystems*). Bei der Reihenfolge der Schaltung der einzelnen Elemente orientierten wir uns an den physiologischen Gegebenheiten.

Im menschlichen Körper werden Nahrungsstoffe vom Darm aufgenommen, verarbeitet und die aufgespaltenen Nahrungsstoffe zusammen mit Signalstoffen über die Pfortader an die Leber weitergegeben. So können vom Darm ausgeschüttete Mediatoren auf die Leberzellen einwirken. Um die menschliche Physiologie möglichst genau zu imitieren, wurde daher die Kammer mit den Darmorganoiden direkt nach der Pumpe und vor die Kammer mit den Leberorganoiden geschaltet. Durch die Verbindungsschläuche konnte das Medium, angereichert mit den von den Zellen ausgeschütteten Signalstoffen, durch die einzelnen Kompartimente fließen. Nach den Leberorganoiden wurde das Medium in einem Reservoir gesammelt, aus dem es wiederum von der Pumpe angesaugt und zurück ins System gegeben wurde.

### 2.6.3.2 Versuchsablauf

Aufgrund des sehr aufwendigen Versuchsaufbaus und der Menge und Vielfalt der benötigten Zellen, konnten wir bei den Versuchen mit dem Perfusionssystem nur zwei Konditionen berücksichtigen. Eine Kondition stellte die obligatorische Kontrolle dar, die andere enthielt eine Stimulation mit Fettsäuren. Aus demselben Grund der Praktikabilität verzichteten wir auf den separaten Einsatz mehrerer unterschiedlicher einzelner Fettsäuren und erstellten stattdessen von den zuvor genutzten Fettsäuren eine Mischung.

Die Fettsäuren PA, OA und LA wurden zu gleichen Teilen gemischt, um eine finale kumulative Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  im Versuch zu erreichen. Die Konzentrationen der verwendeten Stammlösungen von Ethanol, Methanol, PA, OA und LA betragen allesamt 100 mM.

Konditionen der Versuche mit den Darm- und Leberorganoiden im Perfusionssystem:

1) Kontrolle	+ 2 $\mu\text{l}$ Ethanol + 2 $\mu\text{l}$ Methanol	pro 2 ml Medium
2) Fettsäuremischung: -1/3 PA -1/3 OA -1/3 LA	+ 1,33 $\mu\text{l}$ PA + 1,33 $\mu\text{l}$ OA + 1,33 $\mu\text{l}$ LA	pro 2 ml Medium

**Tab.9** Konditionen der Versuche mit Darm- und Leberorganoiden im Perfusionssystem

Zu Beginn des Versuchs wurden die jeweiligen benötigten Zellen mit Matrigel gemischt. Für die Leberorganoiden wurden dafür pro Kammer insgesamt 200.000 Zellen verwendet, 140.000 upcHC, 50.000 upcLSEC und 10.000 primäre hHSC. Für das genaue Herstellungsverfahren siehe *Kap. 2.4.5*. Während die Organoiden bei den anderen Versuchen in kleinen Tropfen in 6-well-Platten platziert wurden, wurde hier das gesamte Matrigel-Zellgemisch in die dafür vorgesehene H-förmige Mulde der Kammer ausplattiert. Bei den Darmorganoiden wurde die Zellmenge eines Wells einer 6-well-Platte (nach einer Kultur über 6-7 Tage) auf zwei Kammern passagiert. Danach erfolgte eine Kultur mit dem jeweiligen Organoid-spezifischen Medium für 24 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO (Organoid-spezifisches Medium s. Tab 5).

Anschließend wurden die Organoiden in den Kammern zweimal mit PBS gewaschen und mit einem gemeinsamen Perfusionsmedium (s. Tabelle 5) resuspendiert. Unter Sterilität wurde das Perfusionssystem gemäß der bereits oben beschriebenen Reihenfolge verbunden und die Kompartimente mit Medium aufgefüllt. Die kumulative Menge Medium pro Perfusionssystem betrug 20 ml. Bei der Kondition mit Fettsäuren war das Medium zuvor mit der oben beschriebenen Menge Fettsäuren angereichert worden, um eine gute Durchmischung mit homogener Dichte zu gewährleisten. Die

Pumpe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 300 µl/min angeschaltet um für einen ausreichenden Stoffaustausch zu gewährleisten und den Blutfluss zu imitieren. Nach Inbetriebnahme wurde das gesamte Perfusionssystem für die Versuchsdauer in den Inkubator bei 37°C und 5% CO gestellt.

Nach der Dauer von 48 h wurde die Stimulation beendet, das Medium entfernt und die Organoide zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte das „Ernten“ der Organoide mittels 800 µl RNA Lysis Puffer pro Kammer sowie das Aufreinigen der RNA.

## 2.7. Methoden zur Untersuchung auf RNA-Ebene

### 2.7.1 RNA-Isolierung

Um die Ergebnisse eines Versuchs auszuwerten, isolierten wir zuallererst die RNA. Dafür wurde zunächst der Überstand der Wells beziehungsweise der Kammern entnommen und verworfen. Nach mehrmaligem vorsichtigem Waschen des Zellrasens oder der Organoide mit PBS wurde den Zellen RNA-Lysis-Puffer T hinzugefügt. Für die Versuche im Monolayer wurden 400 µl/well, für die Darmorganoide 600 µl/well benutzt. Die Zellen der Organoide in den Kammern des Perfusionssystems wurden mit 800 µl lysiert. Nachfolgend wurden die Zellen mithilfe eines Schabers gelöst. Beim Lysieren muss auf eine gleichmäßige Verteilung des Puffers auf der gesamten Oberfläche geachtet werden. Das Lysat wurde dann in ein Eppendorfer Tube überführt und entweder gleich aufgereinigt oder für den späteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

### 2.7.2 RNA-Aufreinigung

Die RNA-Aufreinigung erfolgte mittels peqGOLD Total RNA purification kit (Peqlab) anhand des Protokolls des Herstellers. Die Lysate wurden auf DNA Removing Columns und Collection Tubes geladen und anschließend für 60 Sekunden bei 12.000 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Säulendurchfluss wurde in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und mit einem identischen Volumen aus 70% Ethanol versehen sowie durch Vortexen sorgfältig gemischt. Nachfolgend wurden die Proben auf Perfect RNA Columns pipettiert und für 60 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert.

Der Säulendurchfluss wurde verworfen und das Säulchen in ein neues 2.0 ml Collection Tube transferiert. Danach wurden 500 µl RNA Wash Buffer I auf die PerfectBind RNA Columns pipettiert und für 15 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert. Wiederum wurde der Säulendurchfluss verworfen, das Collection Tube wurde jedoch im nächsten Schritt weiter verwendet.

Um die vollständige Freiheit der Probe von DNA zu gewährleisten, wurde ein DNase I Reaktionsmix vorbereitet. Hiervon wurden jeweils 80 µl bestehend aus 10 µl RNase-freier DNase I und 70 µl DNase I Digestion Buffer (RDD) direkt auf die Membran der PerfectBind RNA Column pipettiert. Um der DNA-Degradation genügend Zeit zu geben, wurden die Columns dann bei Raumtemperatur (25-30°C) für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die PerfectBind RNA Columns in ein neues 2.0 ml Collection Tube transferiert und 400 µl des RNA Wash Buffer I zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Columns bei 10.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen.

Als weiteren Waschschrift wurden 600 µl des RNA Wash Buffers II (Pufferkonzentrat plus 4 Volumen 100% Ethanol) auf die PerfectBind RNA Columns pipettiert und für 15 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert. Dieser Waschgang wurde nochmals wiederholt und der Säulendurchfluss wie zuvor verworfen.

### 2.7.3 RNA-Elution

Schliesslich wurden die Columns in die geleerten 2.0 ml Collection Tubes transferiert und durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 10.000 g vollständig getrocknet. Als letzten Schritt wurden die PerfectBind RNA Columns in ein sauberes 1.5 ml Zentrifugenröhrchen gesteckt und die RNA mit sterilem RNase-freiem dH<sub>2</sub>O eluiert. Je nach der erwarteten Menge RNA, eluierten wir mit unterschiedlichen Volumina. Meist waren 25 µl eine adäquate Menge, um eine geeignete Konzentration zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten erfolgte die letzte Zentrifugation bei 10.000 g für 2 Minuten.

## 2.7.4 RNA Konzentrationsmessung

Um aus RNA cDNA herzustellen, musste zuerst die korrekte Konzentration der einzelnen Proben ermittelt werden. Die Messung der Konzentration führten wir mit einem Microplate Reader durch. Initial erfolgte ein Blanking der Maschine mit Wasser. Anschließend wurden 2 µl der zu analysierenden Probe auf eine Nanoquant™ Platte appliziert und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

## 2.8 cDNA Synthese

Um die Genexpression mittels PCR zu bestimmen, war ein Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkription notwendig. Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng RNA verwendet, wobei das benötigte Volumen mit folgender Formel berechnet wurde:

$$\text{Volumen RNA } (\mu\text{l}) = \frac{500 \text{ ng}}{\text{Konzentration } \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}$$

**Formel 5**

Um die Genexpression der verschiedenen Proben zu vergleichen, mussten alle mittels RNase freien Wassers auf dieselbe Konzentration verdünnt werden. Die benötigte Menge RNase freien Wassers wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Volumen H}_2\text{O } (\mu\text{l}) = 15 \mu\text{l} - \text{Volumen RNA } (\mu\text{l})$$

**Formel 6**

Zu den 15 µl der Probe, wurde dann jeweils 5 µl Mastermix hinzugegeben, welcher aus 4,3 µl TransAmp Buffer (5x) und 0,7 µl reverser Transkriptase bestand. Das

Gemisch wurde kurz zentrifugiert und in einen Thermal Cycler mit nachfolgendem Programm gegeben:

25°C für 10 Minuten (Primer Anlage)

42°C für 15 Minuten (Reverse Transkription)

48°C für 15 Minuten (Optionaler Schritt für hochstrukturierte RNA)

85°C für 5 Minuten (Inaktivierung)

Letztendlich wurde das Endprodukt mit 60 µl RNase-freiem Wasser verdünnt, und das Gesamtvolumen von 80 µl bis zur jeweiligen Messung bei -20°C gelagert.

## 2.9 Realtime PCR

Die Untersuchungen zur Genexpression führten wir mittels realtime PCR durch. Dafür wurden zunächst die Primer (*forward* und *reverse*) mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Ein Mastermix, bestehend aus 606 µl SYBR-Green und 354 µl RNase-freiem Wasser wurde angefertigt. Dieser sollte zum Schutz des SYBR Green zu jeder Zeit auf Eis gelagert sein. Die Menge des benötigten Mastermix pro verdünntem Primer kann mit folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Volumen Mastermix } (\mu\text{l}) = 10,75 \times \text{Anzahl der Wells} - \text{Volumen Primer } (\mu\text{l})$$

**Formel 7**

Von jedem verdünnten Primer wurden jeweils 0,5 µl des Forward- und 0,5 µl des Reverse-Primers pro Well berechnet. Aus dem daraus entstehenden Gemisch bestehend aus Primer und Mastermix wurden 10 µl pro Well einer 96-Well Platte pipettiert. Im Anschluss wurden als letztes 1,5 µl der zu messenden cDNA hinzugefügt. Nach dem Pipettieren aller benötigten Wells, wurde die 96-Well Platte sorgfältig mit einem dafür vorgesehen Cover beklebt und für 2 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in einen qTower<sup>3</sup> der Firma Analytikjena gegeben, in welchem die Polymerase Kettenreaktion sowie die fiberoptische Messung in 40 Zyklen stattfand.

## 2.9.1 Verwendete Primer

<b><i>Murine Primer</i></b>	<b><i>Basensequenz 5' – 3'</i></b>	<b><i>Firma</i></b>
mβ-klotho_For	TGGGGTCCCATTGGATAGAG	Eurofins
mβ-klotho_Rev	ACTCAGGGTAGTCGCCGTC	Eurofins
mFASN_For	CCCCTCTGTTAATTGGCTCC	Eurofins
mFASN_Rev	TTGTGAAGTGCAGGTTAGG	Eurofins
mFGF15_For	ATGGCGAGAAAGTGGAAACGG	Eurofins
mFGF15_Rev	CTGACACAGACTGGGATTGCT	Eurofins
mFGFR4_For	GCTCGGAGGTAGAGGTCTTGT	Eurofins
mFGFR4_Rev	CCACGCTGACTGGTAGGAA	Eurofins
mGlut2_For	GGCTAATTTCAGGACTGGTT	Eurofins
mGlut2_Rev	TTTCTTTGCCCTGACTTC	Eurofins
mPEPCK_For	CAGCCAGTGCCCCATTATTG	Eurofins
mPEPCK_Rev	AGGTATTTGCCGAAGTTGTAGCC	Eurofins
mUCP_For	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	Eurofins
mUCP_Rev	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT	Eurofins
		Eurofins
<b><i>Humane Primer</i></b>		Eurofins
haSMA_For	GTGTTGCCCTGAAGAGCAT	Eurofins
haSMA_Rev	GCTGGGACATTGAAAGTCTCA	Eurofins
hActin_For	GGAAATCGTGCGTGACATTAAG	Eurofins
hActin_Rev	GGCTATCTCTTGCGAAGT	Eurofins
hAlb_For	TCTCTGTAGTGTTTCGCAGTATGT	Eurofins
hAlb_Rev	CGTTCTTGGTTGCGCCTTTT	Eurofins
hALK1_For	CATCGCCTCAGACATGACCTC	Eurofins
hALK1_Rev	GTTTGCCCTGTGTACCGAAGA	Eurofins
hALK2_For	TCTCTGTAGTGTTTCGCAGTATGT	Eurofins
hALK2_Rev	CGTTCTTGGTTGCGCCTTTT	Eurofins
hB2M_For	GACTTGTCTTTTCAGCAAGGA	Eurofins
hB2M_Rev	ACAAAGTCACATGGTTCACA	Eurofins
hBMP9_For	CGTCCAACATTGTGCGGAG	Eurofins

hBMP9_Rev	GACAGGAGACATAGAGTCGGAGG	Eurofins
hβ-klotho_For	TCTGTCATCCTGTCAGCACTT	Eurofins
hβ-klotho_Rev	CCAGTCCCAATACCCCAGAAAAA	Eurofins
hCol1a1_For	GTGCGATGACGTGATCTGTGA	Eurofins
hCol1a1_Rev	CGGTGGTTTCTTGGTCGGT	Eurofins
hCXCL14_For	CGCTACAGCGACGTGAAGAA	Eurofins
hCXCL14_Rev	GTTCCAGGCGTTGTACCAC	Eurofins
hCCL2_For	CAGCCAGATGCAATCAATGCC	Eurofins
hCCL2_Rev	TGGAATCCTGAACCACTTCT	Eurofins
hEndoglin_For	CGCCAACCACAACATGCAG	Eurofins
hEndoglin_Rev	GCTCCACGAAGGATGCCA	Eurofins
hFGF19_For	GCACAGTTTGCTGGA	Eurofins
hFGF19_Rev	ATCTCCTCCTCGAAA	Eurofins
hFGF21_For	ACCAGAGCCCCGAAAGTCT	Eurofins
hFGF21_Rev	CTTGACTCCCAAGATTTGAATAACTC	Eurofins
hFGFR4_For	GCACTGGAGTCTCGTGATGG	Eurofins
hFGFR4_Rev	CCACAGCGTTCTCTACCAGG	Eurofins
hFN_For	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG	Eurofins
hFN_Rev	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA	Eurofins
hGlut2_For	AGTTAGATGAGGAAGTCAAAGCAA	Eurofins
hGlut2_Rev	TAGGCTGTCCGGTAGCTGG	Eurofins
hMif_For	AGCAGCTGGCGCAGGCCA	Eurofins
hMif_Rev	CTCGCTGGAGCCGCCGAA	Eurofins
hLGR5_For	GAGTTACGTCTTGCGGGAAAC	Eurofins
hLGR5_Rev	TGGGTACGTGTCTTAGCTGATTA	Eurofins
hLYVE_For	AGGCTCTTTGCGTGCAGAA	Eurofins
hLYVE_Rev	GGTTCGCCTTTTTGCTCACAA	Eurofins
hPEPCK_For	TGCATGAAAGGTCGCACCA	Eurofins
hPEPCK_Rev	CACAGAATGGAGGCATTTGACA	Eurofins
hrS18_For	CCATTCGAACGTCTGCCCTAT	Eurofins
hrS18_Rev	TCACCCGTGGTCACCATG	Eurofins
hStab_For	TGCCTTCCCAAATTACCGAGG	Eurofins
hStab_Rev	CTGTGCCGATTTGGTCCCA	Eurofins

hRPL19_For	GCAAGCGCCGTGAAGAGCG	Eurofins
hRPL19_Rev	ATGTACAGACAAAGTGGGAGG	Eurofins

**Tab. 10** Primer: *αSMA*, alpha smooth muscle actin; *Actin*; *Alb*, albumin; *ALK1*, activin receptor-like kinase 1; *ALK2*, activin receptor-like kinase 2; *B2M*,  $\beta$ 2-Mikroglobulin; *BMP-9*, bone morphogenetic protein-9; *Col1 $\alpha$ 1*, collagen Typ I, alpha 1; *CXCL14*, C-X-C motif chemokine 14; *CCL2*, C-chemokine ligand 2; *Endoglin*; *FAS*, Fettsäure-Synthase; *FGF15*, fibroblast growth factor 15; *FGF19*, fibroblast growth factor 19; *FGF21*, fibroblast growth factor 21; *FGF21*, fibroblast growth factor 21; *FGFR4*, fibroblast growth factor receptor 4; *FN*, fibronectin; *Glut2*, Glucose transporter 2; *LGR5*, Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5; *LYVE*, lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor; *Mif*, macrophage migration inhibitory factor; *PEPCK*, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; *RPL19*, ribosomale 60S-Protein L19; *rS18*, Ribosomal Protein S18; *Stab*, stabilin; *UCP*, uncoupling protein.

## 3 Ergebnisse

Teile der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden bereits publiziert:

*Intestinal BMP-9 locally upregulates FGF19 and is down-regulated in obese patients with diabetes.*

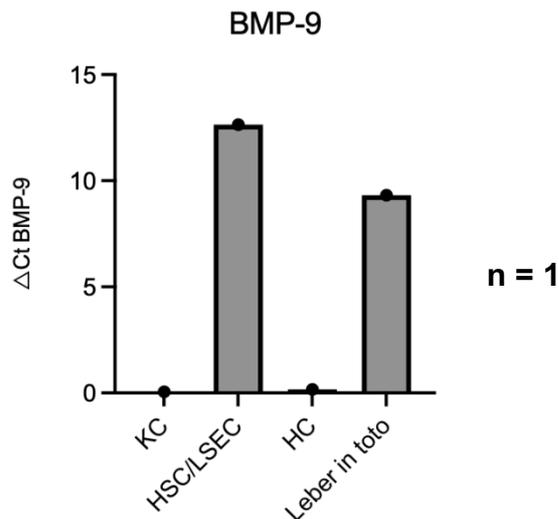
**Drexler S**, Cai C, Hartmann AL, Moch D, Gaitantzi H, Ney T, Kraemer M, Chu Y, Zheng Y, Rahbari M, Treffs A, Reiser A, Lenoir B, Valous NA, Jäger D, Birgin E, Sawant TA, Li Q, Xu K, Dong L, Otto M, Itzel T, Teufel A, Gretz N, Hawinkels LJAC, Sánchez A, Herrera B, Schubert R, Moshage H, Reissfelder C, Ebert MPA, Rahbari NN, Breitkopf-Heinlein K.

Mol Cell Endocrinol. 2023;570:111934. doi: 10.1016/j.mce.2023.111934.

PMID: 37085108

### 3.1 Ursprung von BMP-9

Während Bidart et al.<sup>41</sup> postulierten, dass Hepatozyten die Ursprungszellen von BMP-9 seien, konnte die Forschungsgruppe von Breitkopf-Heinlein et al. zeigen, dass BMP-9 hauptsächlich in hepatischen Sternzellen gebildet wird<sup>39</sup>. Um dies nochmals zu überprüfen und uns einen Überblick über mögliche andere Quellen von BMP-9 zu verschaffen, analysierten wir die BMP-9 Expression verschiedener Leberzellen. Nach Isolation der verschiedenen Zellarten aus gesundem humanen Lebergewebe, verglichen wir die BMP-9-Level der primären Zellen mittels realtime-PCR. Wie erwartet, zeigte sich in dem Zelllysate aus HSC und LSEC die höchste BMP-9-Expression, während in den Hepatozyten praktisch keine Expression nachweisbar war (s. Abb. 8). Ebenso war in den Kupferzellen nur eine minimale Synthese zu messen.



**Abb. 8.: Vergleich der BMP-9 Expression verschiedener Zellarten der humanen Leber.** Lebergewebe eines Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen wurde zur Analyse entnommen. Dabei wurde nur gesundes, vom Tumor weit entferntes Gewebe verwendet. Nach Aufreinigung des Gewebes sowie Isolation der Zellarten wurde die BMP-9 Expression mittels realtime-PCR analysiert. KZ, Kupfferzellen; LSEC, liver sinusiodal endothelial cell; HSC, Hepatische Sternzellen; BMP-9, bone morphogenetic protein- 9.

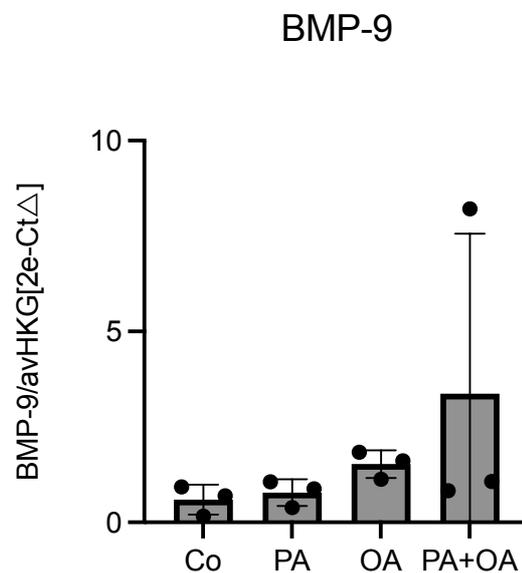
## 3.2 Untersuchungen an humanen hepatischen Sternzellen

### 3.2.1 BMP-9 Expression in hHSC unter Stimulation mit Fettsäuren

Ursprüngliche Zielsetzung der Arbeit war es, die Rolle von BMP-9 unter dem Einfluss von Fettsäuren genauer zu untersuchen. Einer der naheliegenden ersten Schritte war demnach, sich die direkte Beeinflussung der BMP-9 Expression durch Fettsäuren anzuschauen. Wie oben bereits erwähnt, scheinen HSC die hauptsächliche Synthese von BMP-9 zu betreiben, weswegen wir humane HSC verschiedenen Fettsäuren aussetzten. Die HSC wurden primär aus der gesunden Leber von Patienten mit kolorektalem Karzinom isoliert und dann kultiviert. Obwohl wir mehrere verschiedene Primersequenzen von BMP-9 ausprobierten, konnten wir keine validen Messungen der Genexpression in der real-time PCR erzielen. Anders als bei Ergebnissen mit primären Zellen, ergaben sich sehr hohe Ct-Werte (ca. 31-34; Abb. 9), welche auf eine

nur geringe Bildung von BMP-9 schließen lassen. Wir vermuten daher am ehesten ein Artefakt der Monolayerkultur von HSC, welches dadurch verursacht wird, dass kultivierte HSC mit steigender Passageanzahl ihren primären Phänotyp verlieren und daher zunehmend weniger BMP-9 exprimieren.

In der Folge verschoben wir unseren Fokus auf die Auswirkungen von Fettsäuren und BMP-9 auf mögliche Zielzellen von BMP-9 und konzentrierten uns auf mögliche Downstream – Signalwege.



**Abb. 9: BMP-9 Expression in hHSC nach Stimulation mit Fettsäuren.** hHSC wurden in DMEM + 10% FCS kultiviert. 4h vor Versuchsbeginn erfolgte ein Aushungern der Zellen bei 0,5% FCS. Die Zellen wurden für 48h mit PA (200  $\mu$ M), OA (200  $\mu$ M) und PA+OA (kumulative Konzentration von 400  $\mu$ M) stimuliert. Nach Beenden des Versuchs erfolgte die Analyse der RNA-Expression mittels realtime-PCR. Die Ct-Werte wurden auf b2M (house-keeping Gen) normalisiert. Die statistische Auswertung von n=3 unabhängigen Experimenten erfolgte via t-test. Es konnten keine signifikanten Ergebnisse gefunden werden. Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure, HSC, Hepatische Sternzellen, B2M,  $\beta$ -Mikroglobulin; BMP-9, bone morphogenetic protein- 9.

### 3.2.2 Aktivierungszustand von HSC

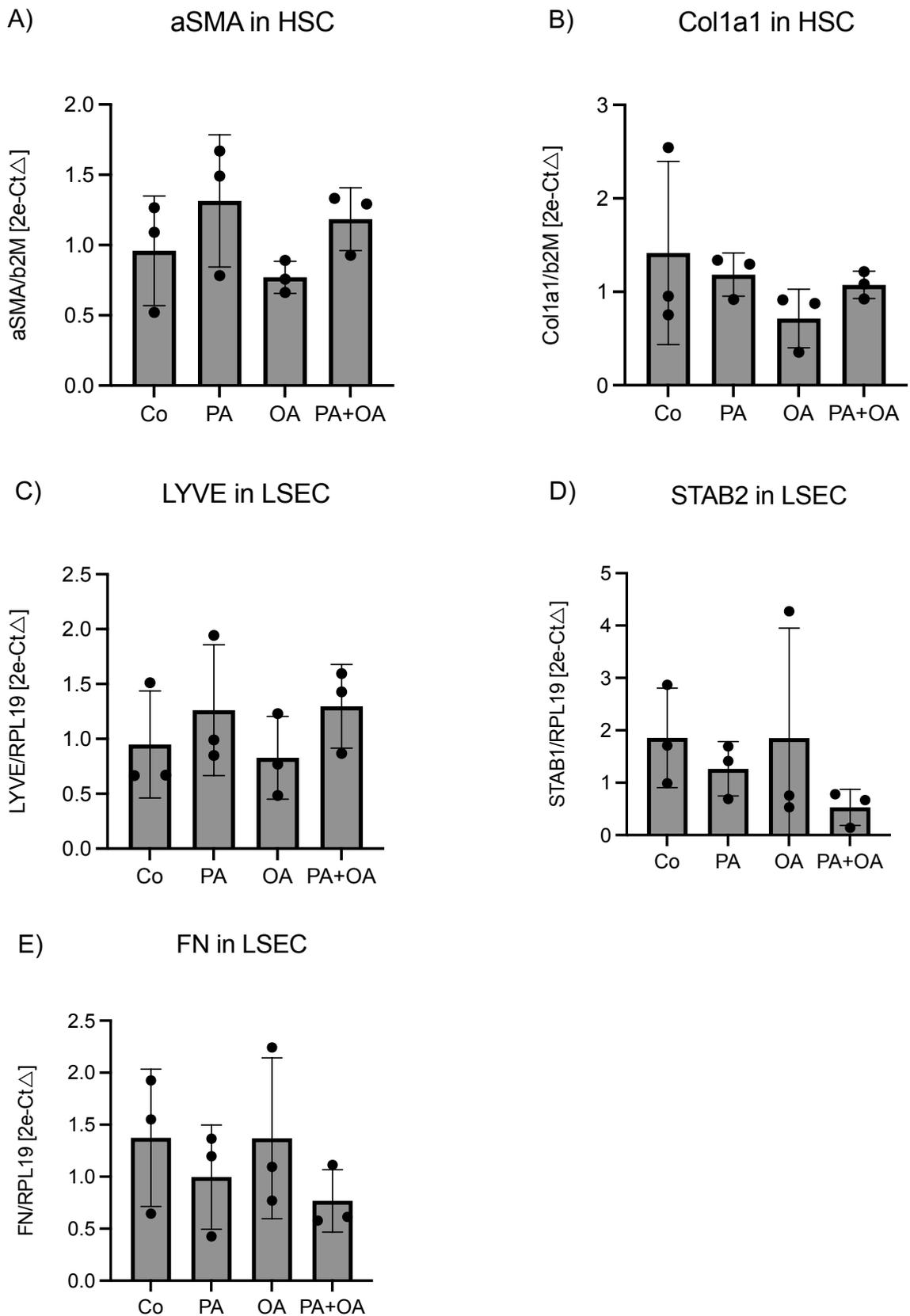
Bei beginnender Fibrose kommt es zur Dedifferenzierung von HSC zu Myofibroblasten, welche extrazelluläre Matrix Proteine synthetisieren<sup>104</sup>. Diese entstehen vorwiegend aus aktivierten HSC, können zum Teil aber auch aus LSEC<sup>11, 12</sup> entstehen. aSMA sowie auch Col1a1 sind geeignete Marker für die HSC-Aktivierung<sup>7, 10, 104</sup>. Um zu überprüfen, inwiefern die Exposition mit Fettsäuren eine Aktivierung der Zellen bewirkt, und sie zu Myofibroblasten differenzieren lässt, analysierten wir die aSMA und Col1a1 Expression nach Stimulation mit verschiedenen Fettsäuren. Wie in Abb. 10A und 10B zu sehen, konnte durch Exposition mit Fettsäuren in HSC keine Erhöhung der Myofibroblasten-Marker beobachtet werden.

### 3.2.3 Aktivierungsgrad von LSEC

Auch LSEC können dem aktuellen Forschungsstand nach zu Myofibroblasten differenzieren bzw. aktiviert werden und so ihre stabilisierende Wirkung auf hepatische Sternzellen verlieren<sup>12, 105</sup>. Lyve1 und Stab2 stellen Marker für gesunde, ruhende LSEC<sup>106</sup> dar, während Fibronectin einen Marker für aktivierte, dedifferenzierte LSEC darstellt<sup>107</sup>.

Bei Aktivierung fällt demnach die Expression von Lyve1 und Stab2 ab, während Fibronectin ansteigt.

Um eine mögliche Aktivierung der LSEC durch fettreiche Stoffwechsellage zu untersuchen, analysierten wir diese Marker nach Stimulation mit verschiedenen Fettsäuren für 48h. Dabei konnten keine signifikanten Änderungen der Genexpression festgestellt werden (s. Abb. 10 C-E).

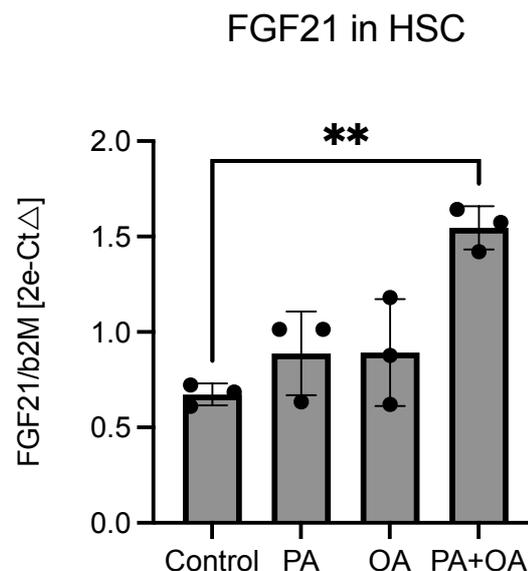


**Abb. 10 Keine Zellaktivierung von hHSC und LSEC nach Stimulation mit Fettsäuren.** Für den Versuchsaufbau s. Abb.9. Die statistische Auswertung von n = 3 unabhängigen Experimenten erfolgte mittels t-Test. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. A) zeigt die Expression von aSMA in hHSC, B) die Expression von Col1a1 in hHSC, C) die Expression von LYVE-1 in LSEC, D) die Expression von Stab-2 in LSEC und E) die expression

von Fibronectin in LSEC. Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure, B2m,  $\beta$ 2-Mikroglobulin; aSMA, anti-smooth muscle antibody; Col1a1, Collagen 1a1, LYVE-1, lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1; Stab-2, Stabilin-2; FN, Fibronectin.

### 3.2.3 Die Kombination aus Öl- und Palmitinsäure stimuliert die FGF21- Synthese in hepatischen Sternzellen

Der Forschungsgruppe von Kim et al.<sup>91</sup> zufolge erhöht BMP-9 die Synthese von FGF21 in der Leber. Wir untersuchten daher die Expression von FGF21 in HSC. Während die alleinige Stimulation mit Palmitin- oder Ölsäure keine signifikanten Veränderungen zeigte, führte die Kombination von Palmitin- und Ölsäure zu einer signifikant gesteigerten FGF21- Expression (s. Abb.11).

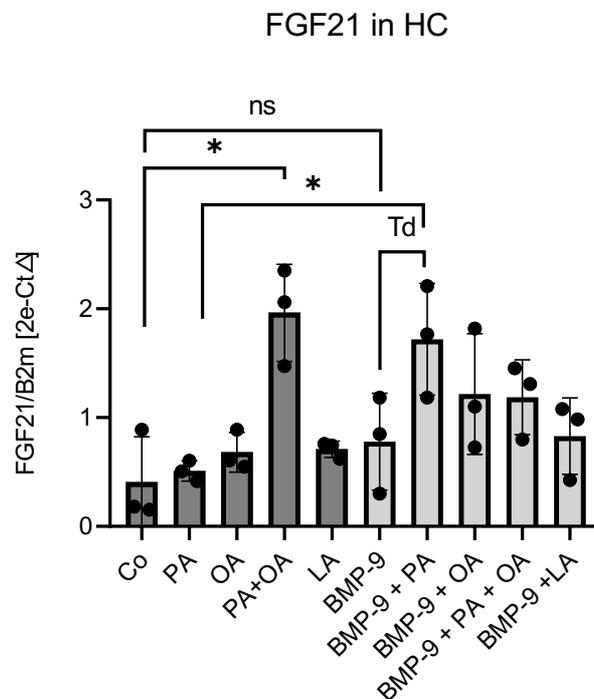


**Abb. 11: FGF21-Expression in hHSC nach Stimulation mit Fettsäuren.** Für den Versuchsaufbau s. Abb. 9. Die Analyse der RNA-Level erfolgte mittels realtime-PCR. Die Ct-Werte wurden auf b2M (house-keeping Gen) normalisiert. Die statistischen Unterschiede von n = 3 unabhängigen Experimenten wurden mittels t-Test bestimmt und wie folgt klassifiziert;  $p \leq 0.01$ : \*\*. Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure; B2m,  $\beta$ 2-Mikroglobulin; FGF21; fibroblast growth factor 21.

### 3.3 Einfluss von BMP-9 und Fettsäuren auf Hepatozyten

#### 3.3.1 FGF21-Expression in Hepatozyten

Die Hepatozyten stellen mit Abstand die häufigste Zellart der Leber dar und sind maßgeblich an ihrer Funktion beteiligt. Weiterhin bilden sie Xu et al.<sup>86</sup> zufolge auch FGF21. Die Forschungsgruppe hatte gezeigt, dass Linolsäure die FGF21-Expression in Hepatozyten erhöht. Daneben konnten Kuo et al. zeigen, dass BMP-9 ebenfalls die Expression von FGF21 steigert. Die Ergebnisse dieser zwei Forschungsgruppen versuchten wir in einem Versuchsaufbau zu überprüfen, indem wir Hepatozyten sowohl mit Fettsäuren allein als auch in Kombination mit BMP-9 stimulierten (s. Abb. 12). Die Stimulation mit einzelnen Fettsäuren führte zu keiner signifikanten Steigerung von FGF21. Diese wurde nur durch die Kombination von Öl- und Palmitinsäure erreicht. Bei der Applikation von BMP-9 und Fettsäuren zeigte sich bei der Kondition BMP-9 + Palmitinsäure die FGF21-Expression im Vergleich zur Kondition mit alleiniger Palmitinsäure signifikant gesteigert, während BMP-9 mit PA gegenüber alleinigem BMP-9 zumindest eine Tendenz erreichte.

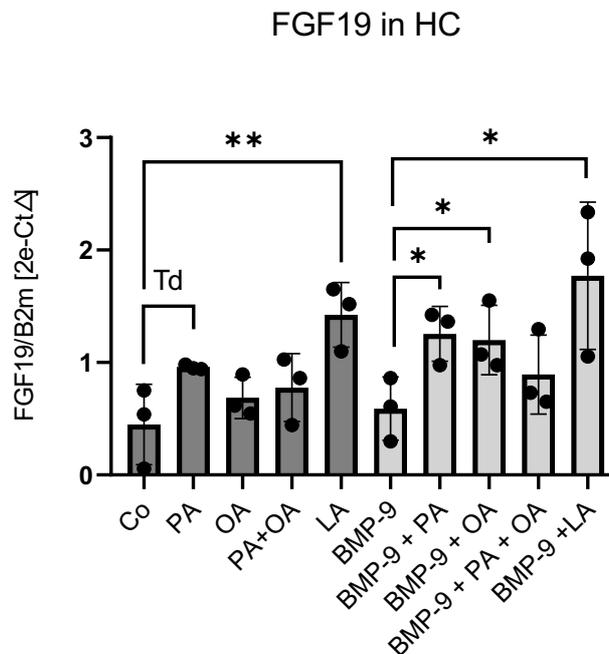


**Abb. 12: Expression von FGF21 in Hepatozyten.** Die upcyte Hepatozyten wurden gemäß den Angaben des Herstellers in Basal Medium kultiviert. Für den Versuch wurde High Performance Medium

genutzt und die Zellen wurden für 48h mit PA (200 mM), OA (200 mM) und PA+OA (kumulative Konz. 400 mM) sowie BMP-9 ( 5ng/ml) .Danach erfolgte die Bestimmung der RNA-Level mittels realtime-PCR sowie die Normalisierung auf b2M (house-keeping Gen). Die Daten wurden anhand von t-Test-Berechnungen ausgewertet und wie folgt klassifiziert:  $p \leq 0.1$ : Tendenz (Td);  $p \leq 0.05$ : \*. Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure, LA, Linolsäure; BMP-9, bone morphogenetic protein- 9; B2m,  $\beta$ 2-Mikroglobulin; FGF21; fibroblast growth factor 21.

### 3.3.2 Expression von FGF19 in Hepatozyten

FGF19 ist ein strukturell und funktionell mit FGF21 verwandtes Signalmolekül <sup>81</sup>. Obwohl in der Literatur vor allem das terminale Ileum als Ursprungsort von FGF19 angeführt wird,<sup>38</sup> überprüften wir zunächst, ob BMP-9 und/oder Fettsäuren nicht ebenfalls einen Effekt auf eine mögliche FGF19-Expression in Hepatozyten haben könnten. Bei alleiniger Stimulation mit Fettsäuren zeigte sich eine tendenzielle Induktion bei der Kondition mit Palmitinsäure sowie eine signifikante Induktion bei der Linolsäure (s. Abb. 13). Sowohl die Ölsäure als auch interessanterweise die Kombination von Öl- und Palmitinsäure zeigten keinen Effekt. Auch in der Kombination mit BMP-9 zeigten die Kondition mit Palmitin-, Öl- und Linolsäure eine signifikant gesteigerte FGF19-Expression im Vergleich zu BMP-9. BMP-9 allein hatte keine Auswirkungen auf die FGF19-Synthese in Hepatozyten.

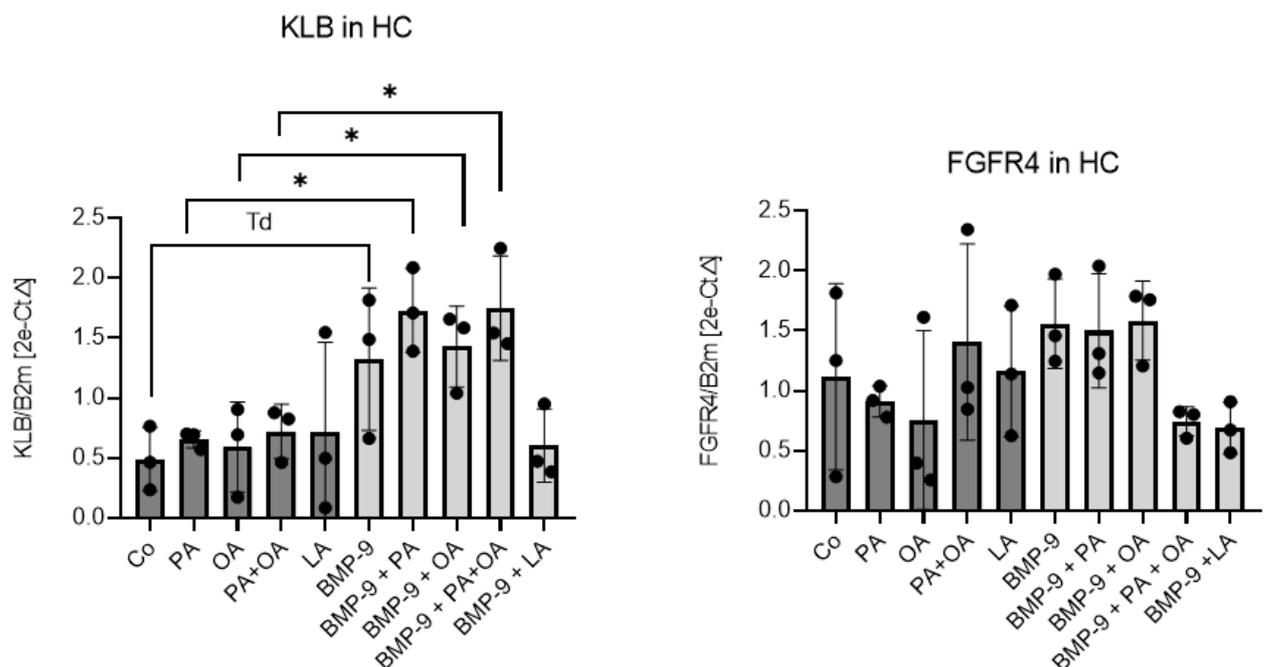


**Abb. 13: FGF19 Expression in Hepatozyten.** Für den Versuchsaufbau s. Abb. 12. Die dunkelgrauen Balken symbolisieren die Konditionen ohne BMP-9, die hellgrauen die mit BMP-9. Die Bestimmung der

RNA-Expression erfolgte via realtime-PCR. Die Ct-Werte wurden auf b2M normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des t-Tests, die Ergebnisse wurden folgendermaßen eingeteilt:  $p \leq 0.1$ : Td;  $p \leq 0.05$ : \*,  $p \leq 0.05$ : \*\*. Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure, LA, Linolsäure; BMP-9, bone morphogenetic protein- 9; B2m,  $\beta$ 2-Mikroglobulin; FGF19; fibroblast growth factor 19.

### 3.3.3 FGF21/FGF19 - Rezeptoren in Hepatozyten

FGFR4 ist einer von vier verschiedenen FGF-Rezeptoren. Zusammen mit dem Ko-Rezeptor  $\beta$ -Klotho, stellt er einen der hauptsächlichen Rezeptoren von FGF21 und FGF19 dar.<sup>38, 108</sup> In Hepatozyten ließ sich keine signifikante Beeinflussung der Expression von FGFR4 durch Stimulation mit Fettsäuren oder BMP-9 erkennen (s. Abb. 14A). Anders verhielt es sich bei dem Ko-Rezeptor  $\beta$ -Klotho. Nachdem FGFR4 in Hepatozyten eher konstitutiv exprimiert zu werden scheint, zeigte sich die Expression vom Ko-Rezeptor  $\beta$ -Klotho durch die Stimulation mit BMP-9 erhöht (s. Abb. 14B). Während die Kondition mit BMP-9 alleine nur eine tendenzielle Erhöhung erreichte, waren die Expressionslevel bei der Kombination von BMP-9 mit Palmitin- oder Ölsäure oder einer Kombination mit beiden Säuren signifikant erhöht. Die Kondition mit BMP-9 + Linolsäure zeigte aus unbekanntem Gründen allerdings keinen erhöhten Wert. Ebenso blieb die Stimulation mit den Fettsäuren alleine ohne Effekt auf  $\beta$ -Klotho.



**Abb. 14: FGFR4/ $\beta$ -klotho Rezeptorstatus in Hepatozyten** Für den Versuchsaufbau siehe Abb. 12.

Nach Stimulation mit den Fettsäuren und BMP-9 für 48h wurden die RNA-Level via realtime-PCR analysiert und auf b2M normalisiert. A) zeigt die Expression des Rezeptors FGFR4, B) des Rezeptors KLB in HC. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Tests. Die Ergebnisse wurden wie folgt klassifiziert:  $p \leq 0.1$ : Td;  $p \leq 0.05$ : \*. Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure, LA, Linolsäure; BMP-9, bone morphogenetic protein- 9; B2m,  $\beta$ 2-Mikroglobulin.

### 3.4 Untersuchungen in Darmorganoiden

BMP-9 bindet mit höchster Affinität an den Alk1-Rezeptor<sup>44</sup>. Wie Chen et al. zeigten, findet sich in Darmzellen vergleichsweise mehr Alk1 als in der Leber. Ebenso zeigt sich Id1, ein Zielgen von BMP-9, im Darm erhöht exprimiert<sup>102</sup>.

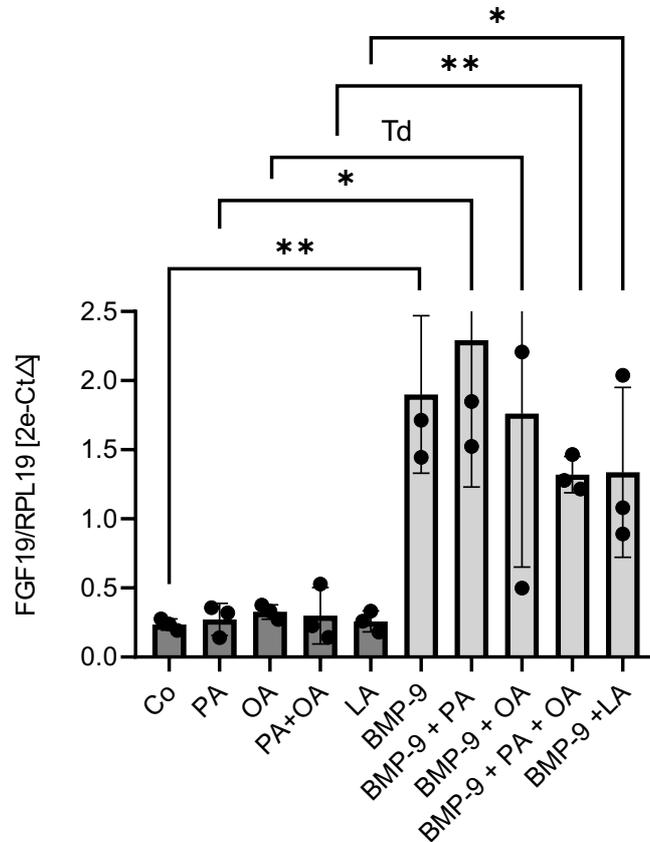
Ein möglicher Einfluss von BMP-9 auf den Darm scheint daher naheliegend. Nachdem wir die Auswirkungen von BMP-9 und Fettsäuren auf die Leber untersucht hatten, analysierten wir nun deren Effekt auf intestinale Epithelzellen. Dabei konzentrierten wir uns auf die gleichen Mediatoren, welche wir bereits in der Leber untersucht hatten. Um Ergebnisse zu erzielen die besser in die Klinik translatierbar sein sollten, nutzten wir in unserem Versuchsaufbau ein Organoidmodell aus Darmzellen.

#### 3.4.1 FGF19 in Darmorganoiden durch BMP-9 hochreguliert

FGF19 ist ein Signalmolekül, welches im terminalen Ileum gebildet wird und über den Rezeptorkomplex FGFR4/ $\beta$ -klotho in der Leber wirkt. Nach der Untersuchung von FGF19 in Hepatozyten, waren wir an der Regulation von FGF19 in Darmorganoiden interessiert. Auch hier nutzten wir den bereits erprobten Versuchsaufbau mit verschiedenen Fettsäuren in Kombination mit BMP-9.

Während die Fettsäuren allein keinerlei Effekt auf FGF19 zeigten, steigerte die Stimulation mit BMP-9 die FGF19-Expression signifikant (s. Abb. 15). Sowohl die Kondition mit alleinigem BMP-9 als auch die Konditionen mit Fettsäuren + BMP-9 im Vergleich zu den Fettsäuren allein zeigten signifikante Ergebnisse. Lediglich die Kondition BMP-9 + Ölsäure erreichte im Bezug zur Kondition mit alleiniger Ölsäure lediglich eine Tendenz.

## FGF19 in Darmorganoiden

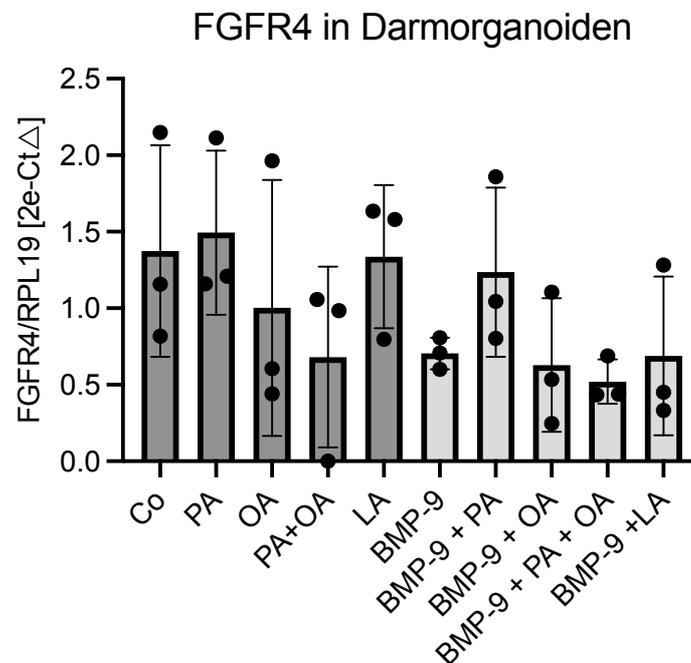


**Abb. 15: FGF19 in Darmorganoiden.** Intestinale Epithelzellen wurden aus Biopsien von Kolonkarzinompatienten isoliert. Dabei wurde nur gesundes, vom Tumor weit entferntes Gewebe verwendet. Die intestinalen Epithelzellen wurden als dreidimensionale Zellverbände in Matrigel und WENRA Medium (genaue Zusammensetzung s. Tab. 6) kultiviert und für den Versuch für 48h mit Fettsäuren und BMP-9 stimuliert. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Konditionen ohne BMP-9, die hellgrauengrauen die mit BMP-9. Die Auswertung der RNA-Expressionen erfolgte via realtime-PCR. Die Ct-Werte wurden auf Rpl19 (house-keeping Gen) normalisiert, mittels t-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert:  $p \leq 0.1$ : Td;  $p \leq 0.05$ : \*;  $p \leq 0.01$ : \*\*. Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure; LA, Linolsäure; BMP-9, bone morphogenetic protein- 9, Rpl19, ribosom protein L19; FGF19; fibroblast growth factor 19.

### 3.4.2 Rezeptoren von FGF19 und FGF21 im Darm

FGFR4 ist einer von vier Rezeptoren der FGF-Superfamilie und bildet gemeinsam mit dem Ko-Rezeptor  $\beta$ -klotho den Rezeptorkomplex von FGF19 und FGF21<sup>38, 108</sup>. In den Darmorganoiden zeigte sich kein Effekt nach Stimulation mit Fettsäuren oder BMP-9

(s. Abb. 16). Eine sehr niedrige Expression von  $\beta$ -Klotho in Darmorganoiden konnte zwar nachgewiesen werden, da die Ct-Werte aber sehr deutlich höher waren als in der Leber, gingen wir von einer eher weniger relevanten Expression im Darm aus und führten keine weiteren Analysen durch.

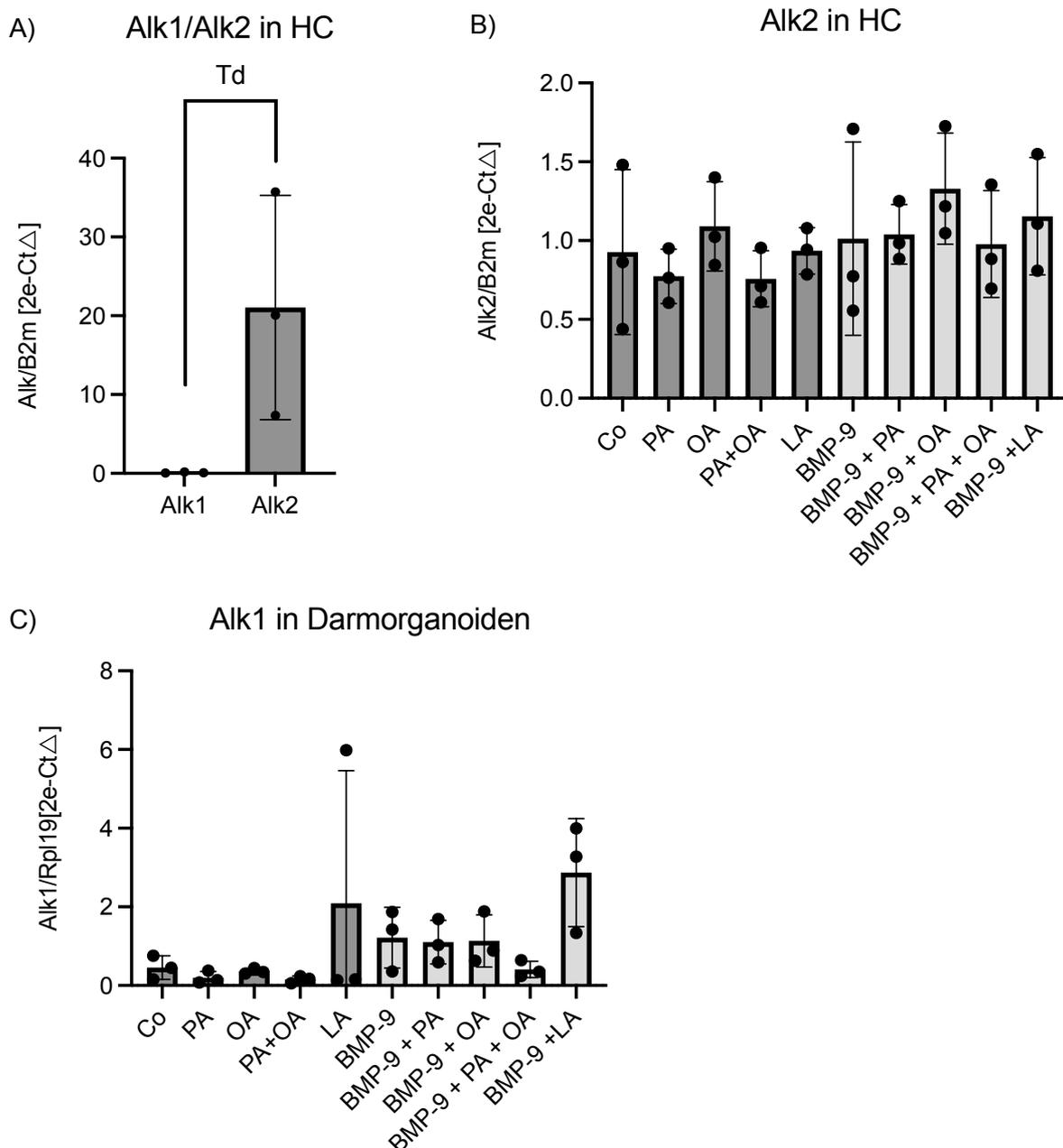


**Abb. 16: FGFR4 in Darmorganoiden.** Für den Versuchsaufbau s. Abb. 15. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Konditionen ohne BMP-9, die hellgrauen die mit BMP-9. Die Auswertung von Versuchen der RNA erfolgte via realtime-PCR. Die Ct-Werte wurden auf Rpl19 (house-keeping Gen) normalisiert, mittels t-Test ausgewertet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure; LA, Linolsäure; BMP-9, bone morphogenetic protein- 9, Rpl19, ribosom protein L19; FGFR4; fibroblast growth factor receptor 4.

### 3.4.3 BMP-9 Rezeptorstatus in Hepatozyten und im Darm

BMP-9 bindet an verschiedene Rezeptoren, von denen es für Alk1 die höchste Affinität besitzt.<sup>44</sup> Alk1 wird im Darm relativ stark exprimiert.<sup>102</sup> Mit niedrigerer Affinität bindet BMP-9 auch an Alk2. Da BMP-9 vermutlich in HSC gebildet wird<sup>39</sup>, untersuchten wir die benachbarten Hepatozyten auf ihren BMP-9 Rezeptorstatus. Dafür verglichen wir die Expression von Alk1 und Alk2. Wie bereits von Breikopf-Heinlein et al.

beschrieben<sup>39</sup> fand sich kaum Alk1 Expression in Hepatozyten, sondern fast ausschließlich Alk2 (s. Abb. 17A). In der Folge waren wir interessiert, inwieweit sich die Exposition der Hepatozyten mit Fettsäuren oder BMP-9 auf die Alk2-Expression auswirkt (s. Abb. 17B). Dabei konnte allerdings keine Einflussnahme festgestellt werden. Bei der Auswertung der Alk1 Expression in Darmorganoiden, könnte man eine Erhöhung von Alk1 durch BMP-9 vermuten (s. Abb. 17C). Die Ergebnisse zeigen jedoch eine recht große Streuung und erreichten daher leider kein Signifikanzniveau.



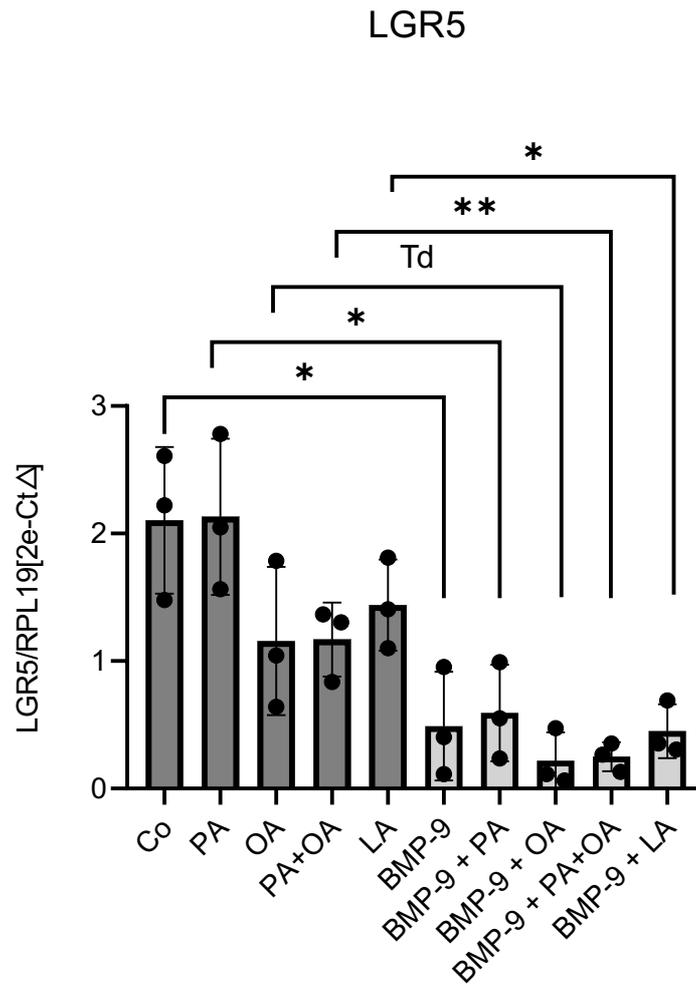
**Abb. 17 Alk- Rezeptorstatus in Hepatozyten und im Darm.** A) zeigt die Expression von Alk1 und Alk2 in upcyte Hepatozyten. B) zeigt die Ergebnisse der Stimulation der Hepatozyten mit Fettsäuren

und BMP-9 in Bezug auf die Alk2-Expression. Für den Versuchsaufbau s. Abb. 12. Die Auswertung der RNA-Expression erfolgte mithilfe der realtime-PCR, die Ergebnisse wurden auf  $\beta$ 2M normalisiert. C) Alk1 in Darmorganoiden, für den Versuchsaufbau s. Abb. 15. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Konditionen ohne BMP-9, die hellgrauen die mit BMP-9. Die Auswertung der RNA erfolgte via realtime-PCR. Die Ct-Werte wurden auf Rpl19 normalisiert. Die statistische Analyse wurde mittels t-Test durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure, LA, Linolsäure; BMP-9, bone morphogenetic protein- 9;  $\beta$ 2m,  $\beta$ 2-Mikroglobulin; alk1, activin like kinase 1; activin like kinase 2; Rpl19, ribosom protein L19

#### 3.4.4 Die LGR5 Expression wird durch BMP-9 in Darmorganoiden reduziert

LGR5 ist ein Marker der Stammzellen des Darms.<sup>109</sup> Die Applikation von BMP-9 bewirkte eine Abnahme der Expression in den Darmorganoiden (s. Abb. 18). Die alleinige Stimulation mit Fettsäuren hatte hingegen keinen signifikanten Effekt. Bei der Kombination von Palmitin- und Ölsäure, welche die doppelte kumulative Konzentration beinhaltete, zeigte sich zumindest eine Tendenz.

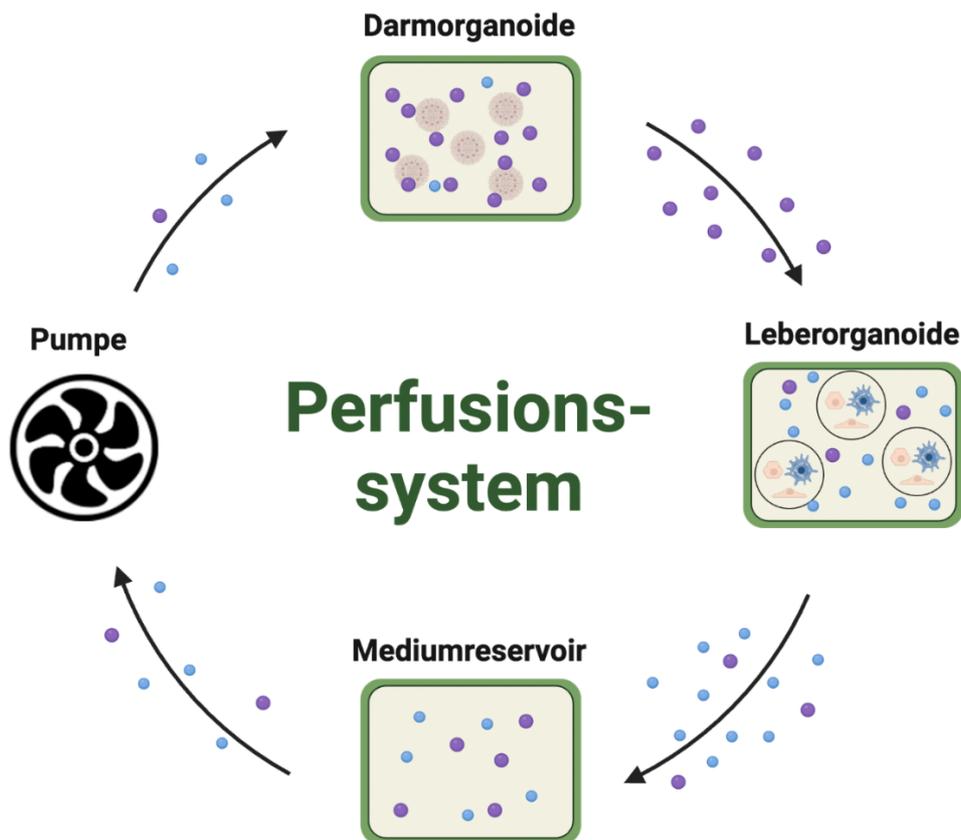


**Abb. 18: LGR5 in Darmorganoiden.** Für den Versuchsaufbau s. Abb. 15. Die dunkelgrauen Balken repräsentieren die Konditionen ohne BMP-9, die hellgrauen die mit BMP-9. Die Auswertung der RNA erfolgte mittels realtime-PCR. Die Ct-Werte wurden auf Rpl19 normalisiert, mittels t-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert:  $p \leq 0.1$ : Td;  $p \leq 0.05$ : \*;  $p \leq 0.01$ : \*\*. Co, Kontrolle; PA, Palmitinsäure; OA, Ölsäure; LA, Linolsäure; BMP-9, bone morphogenetic protein- 9, Rpl19, ribosom protein L19; LGR5, Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5.

### 3.5 Untersuchungen anhand des Perfusionssystems

In vivo wachsen Zellen in dreidimensionalen Verbänden und werden verschiedensten Wachstums- und Differenzierungsreizen ausgesetzt. Um in vitro möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen, gestalteten wir einen Versuchsaufbau mit einem Perfusionssystem. In diesem installierten wir dreidimensionale Zellverbände in Form

von Darm- und Leberorganoiden, um so die potenzielle Beeinflussung der Zellen beider Organe untereinander zu simulieren (s. Abb. 19). Die Kammern mit den jeweiligen Organoiden standen über ein Schlauchsystem miteinander in Verbindung. Mittels einer Pumpe generierten wir eine definierte Flussrate von gemeinsamem Medium um einen Stoffaustausch zwischen den „Organen“ zu gewährleisten.



**Abb. 19 Schematische Darstellung des Perfusionssystems.** Das Perfusionssystem besteht aus 4 Komponenten, welche über Schläuche miteinander verbunden sind. Das System ist mit einem gemeinsamen Medium (Zusammensetzung s. Kapitel 2) aufgefüllt, welches über die Schläuche durch die Kammern zirkulieren kann. Die nötige Flussrate wird durch eine Pumpe sichergestellt. Um die anatomischen Gegebenheiten des Pfortadersystems in vivo zu berücksichtigen und physiologischen Stoffwechsel möglichst genau nachzubilden, wurden die Kammer mit den Darmorganoiden denen der Leberorganoide voran geschaltet. So konnten Mediatoren und Stoffwechselprodukte der Darmorganoide direkt auf die Leberorganoide einwirken, sowie umgekehrt die Mediatoren der Leberorganoide nach Durchlaufen des Reservoirs und der Pumpe auf die Darmorganoide einwirken.

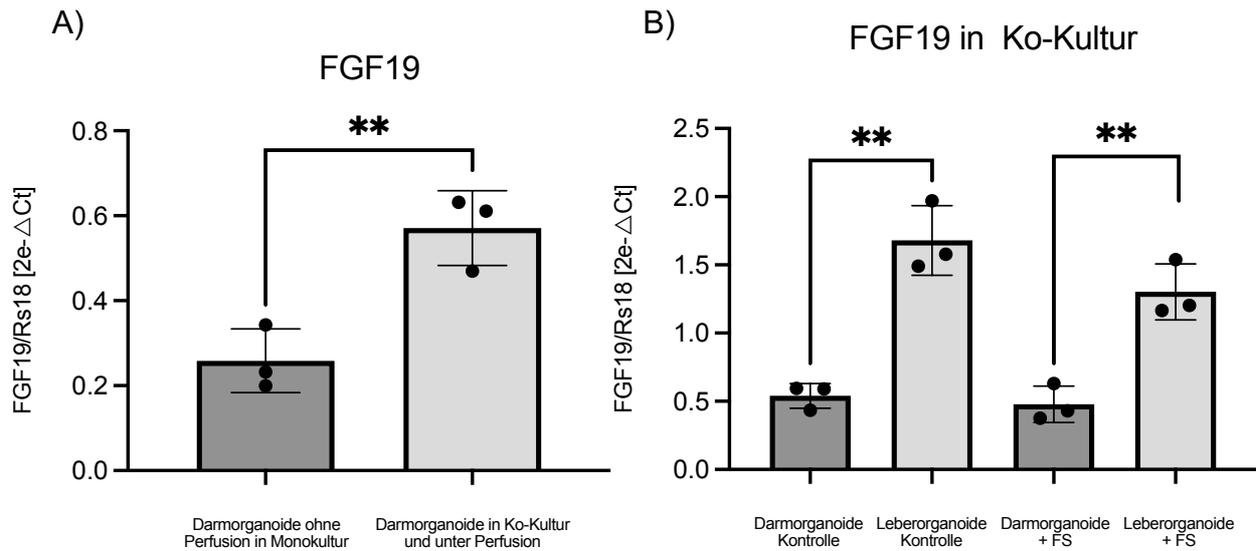
### 3.5.1 Einfluss des Perfusionssystems auf FGF19

Um die Auswirkungen des Versuchsaufbaus des Perfusionssystems zu untersuchen, verglichen wir die Expression von FGF19 in Darmorganoiden in Monokultur mit der von Darmorganoiden in Ko-Kultur mit Leber-Organoiden im Perfusionssystem. Wie in Abb. 20A zu sehen, zeigte sich die Expression von FGF19 in den Darmorganoiden in Ko-Kultur im Vergleich zu Darmorganoiden in Monokultur signifikant erhöht.

### 3.5.2 FGF19 Expression in Darm- und Leberorganoiden

Die bekannteste Funktion von FGF19 ist die Regulation der Gallensäuresynthese. Gallensäuren binden am FXR-Rezeptor im terminalen Ileum, welcher die Synthese von FGF19 in den Darmzellen steigert. FGF19 selbst bindet darauf über den FGFR4 Rezeptor in der Leber, um dort die Gallensäuresynthese zu hemmen.<sup>96</sup>

Wir waren nun interessiert, ob neben dem Darm auch andere Organe wie z.B. die Leber an der Synthese von FGF19 beteiligt sind. Dafür verglichen wir die Expression von FGF19 in Darm- und Leberorganoiden im Perfusionssystem. Wider unserer Erwartung zeigte sich, dass die Expression von FGF19 in den Leberorganoiden signifikant höher war als in den Darmorganoiden (s. Abb. 20 B). Dies zeigte sich unabhängig von einer Stimulation mit Fettsäuren. Die Fettsäuren allein hatten keinen signifikanten Effekt auf die Expression von FGF19 in den jeweiligen Organoiden.

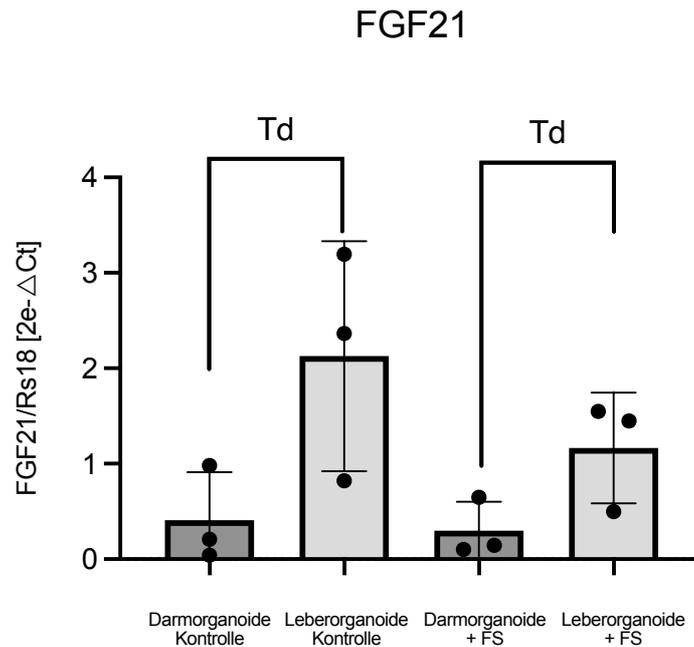


**Abb. 20: FGF19-Expression in Darm- und Leberorganoiden.** A) Vergleich der Expression von FGF19 in Darmorganoiden in Monokultur und Darmorganoiden in Ko-Kultur im Perfusionssystem. B) Vergleich der FGF19 Expression von Darmorganoiden und Leberorganoiden in Ko-Kultur in Perfusionssystem mit und ohne Fettsäurestimulation.

Darmorganoiden aus intestinalen Epithelzellen und Leberorganoiden aus HC, HSC und LSEC wurden in Matrigel eingebettet und jeweils in ihren eigenen Kammern platziert (für die genaue Herstellung siehe Kap. 2). Die Kammern wurden mittels elastischer Schläuche miteinander verbunden und standen über ein gemeinsames Medium (genaue Zusammensetzung s. Tab. 5) sowie mittels Pumpe generierter Flussrate zueinander in Verbindung. In der Kondition mit den Fettsäuren wurde ein Mix aus verschiedenen Fettsäuren zugesetzt. Nach 48h wurde der Versuch beendet und die RNA-Expression von FGF19 via realtime-PCR analysiert. Die Ct-Werte wurden auf rS18 normalisiert und die Ergebnisse von  $n = 3$  unabhängigen Versuchen mittels t-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert:  $p \leq 0.01$ : \*\*. PFS, Perfusionssystem; FS, Fettsäuren; rS18, ribosomal protein S18; FGF19, fibroblast growth factor 19.

### 3.5.3 FGF21 in Leber- und Darmorganoiden

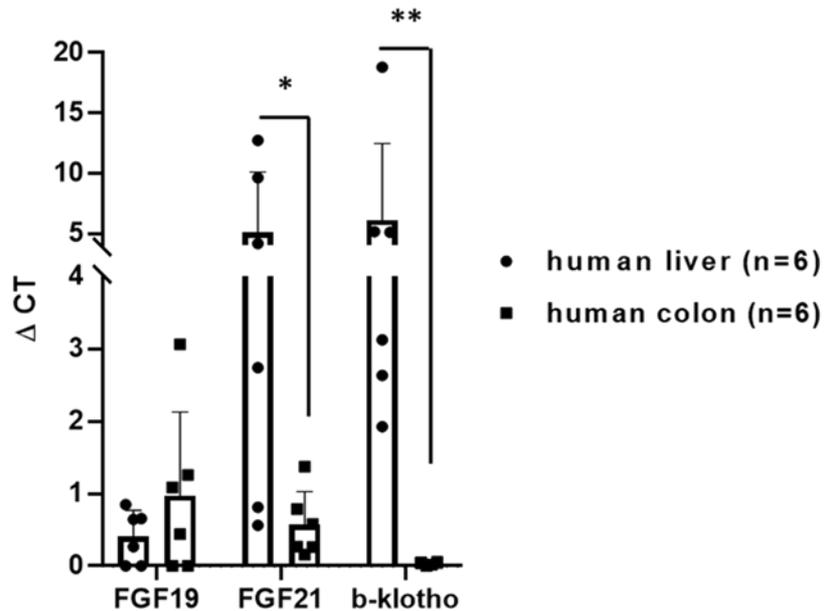
Das zu FGF19 strukturell und funktional verwandte FGF21 war in Leberorganoiden im Vergleich zu den Darmorganoiden ebenfalls erhöht (s. Abb. 21). Bei der Auswertung der Ergebnisse kam es allerdings zu hohen Varianzen, sodass der Unterschied lediglich eine Tendenz und keine Signifikanz erreichte. Die Fettsäuren zeigten keinen Effekt.



**Abb.21: Vergleich der Expression von FGF21 in Leber- und Darmorganoiden.** Für den Versuchsaufbau s. Abb.20. Die RNA-Expression von FGF19 wurde via realtime-PCR analysiert. Die Ct-Werte wurden auf *rS18* (house keeping gen) normalisiert und die Ergebnisse via t-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert:  $p \leq 0.1$ : Td. PFS, Perfusionsystem; FS, Fettsäuren; *rS18*, ribosomal protein S18; FGF21, fibroblast growth factor 21.

### 3.5.4 Vergleich von FGF19, FGF21 und Ko-Rezeptor $\beta$ -klotho in humanem Leber- und Darmgewebe

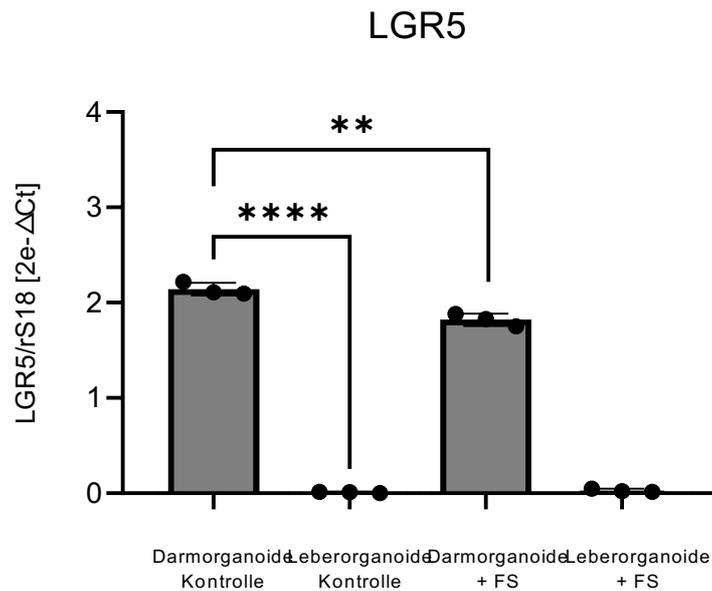
Um die Ergebnisse des Perfusionsystems weiter zu validieren, analysierten wir zusätzlich die Expression von FGF19, FGF21 und  $\beta$ -klotho in Leber- und Darmgewebe von Patienten mit hepatisch metastasierem kolorektalen Karzinom und verglichen sie miteinander (s. Abb. 22). Während FGF19 in humanem Gewebe in beiden Organen relativ gleich hoch exprimiert war, zeigten sich FGF21 und vor allem  $\beta$ -klotho signifikant höher im Lebergewebe.



**Abb. 22 Vergleich der Expression der FGF-Liganden und deren Ko-Rezeptor in humanem Leber- und Darmgewebe.** Es wurden Biopsien aus Leber- und Darmgewebe von Patienten mit Kolonkarzinom entnommen. Dabei wurde nur gesundes, vom Tumor weit genug entferntes Gewebe verwendet. Nach Aufreinigung des Gewebes erfolgte die Analyse der RNA-Expression via realtime-PCR. Die statistische Auswertung wurde mittels t-Test durchgeführt und die Daten wie folgt klassifiziert:  $p \leq 0.05$ ;  $p \leq 0.01$ : \*\*. FGF19, fibroblast growth factor 19; FGF21, fibroblast growth factor 21.

### 3.5.4 Stammzellmarker der intestinalen Epithelzellen

Wie bereits beschrieben, ist LGR5 ein Stammzellmarker intestinaler Zellen<sup>109</sup> der die Wachstumsbedingungen der Zellen widerspiegelt. Entsprechend fanden wir LGR5 hauptsächlich in den Darmorganoiden (s. Abb. 23). Weiter zeigte sich eine Reduktion von LGR5 durch das Zusetzen von Fettsäuren in den Darmorganoiden.



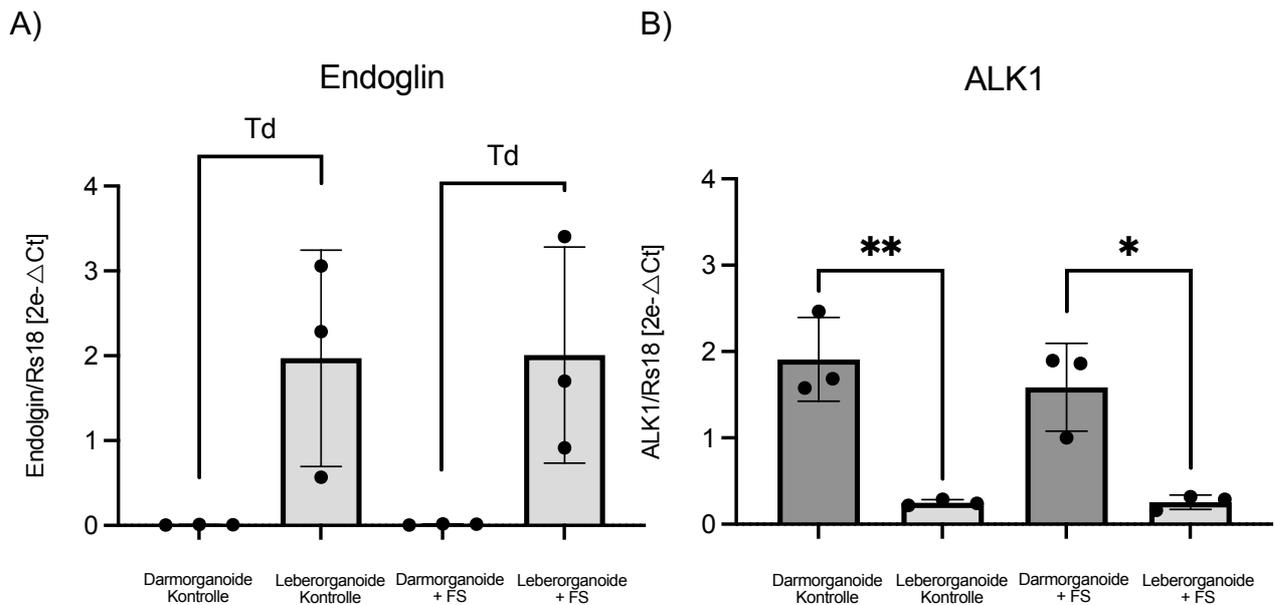
**Abb. 23: LGR5 im Perfusionssystem.** Für den Versuchsaufbau s. Abb.20. Die RNA-Expression von FGF19 wurde via realtime-PCR analysiert. Die Ct-Werte wurden auf *rS18* normalisiert und die Ergebnisse mittels t-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert:  $p \leq 0.01$ : \*\*;  $p \leq 0.00001$ : \*\*\*\*. PFS, Perfusionssystem; FS, Fettsäuren; *rS18*: *ribosomal protein S18*; LGR5, Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5.

### 3.5.5 BMP-9 -Rezeptoren im Perfusionssystem

Wie bereits erwähnt, hatten Cai et al.<sup>102</sup> eine höhere Alk1 Expression im Darm als in der Leber gefunden. Um dieses Ergebnis im eigenen Versuchsaufbau zu validieren, verglichen wir ebenfalls die Expression von Alk1 in Darm- und Leberorganoiden. Wie erwartet, zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von Alk1 in den intestinalen Epithelzellen (s. Abb. 24B). Ein Einfluss der Fettsäuren auf die Synthese von Alk1 konnte dabei nicht festgestellt werden.

Weiter untersuchten wir die Expression von Endoglin, einem nicht obligaten Ko-Rezeptor von BMP-9<sup>44</sup>. In dem Versuch die Signalwege von BMP-9 besser zu erforschen, verglichen wir die Expression von Endoglin in Leberorganoiden mit der von Darmorganoiden. Obwohl die Expression in der Leber deutlich höher scheint als im Darm, erreichten die Unterschiede in beiden Konditionen aufgrund der hohen

Streuung leider nur eine Tendenz (s.Abb. 24A). Ein möglicher Grund für die hohen Varianzen könnten wiederum die sehr niedrigen Expressionslevel sein (die Ct-Werte waren > 30).



**Abb. 24: Vergleich der BMP-9 Rezeptoren Alk1 und Endoglin in Darm- und Leberorganoiden in Ko-Kultur in Perfusionssystem.** A zeigte die Expression von Alk1 in Darm und Leberorganoiden in Ko-Kultur im Perfusionssystem, B die von Endoglin in Ko-Kultur im Perfusionssystem. Für den Versuchsaufbau s. Abb. 20. Die RNA-Expression wurde via realtime-PCR analysiert. Die Ct-Werte wurden auf *rS18* normalisiert und die Ergebnisse mittels t-Test ausgewertet und wie folgt klassifiziert:  $p \leq 0.1$ : Tendenz;  $p \leq 0.05$ : \*;  $p \leq 0.01$ : \*\*. PFS, Perfusionssystem; FS, Fettsäuren; *rS18*, ribosomal protein S18; Alk1, activin like kinase 1.



## 4 Diskussion

Obwohl BMP-9 bereits vor 20 Jahren entdeckt wurde<sup>45</sup>, bleiben verschiedene Rollen dieses Zytokins im Körper immer noch ungeklärt. Lag früher der Knochenstoffwechsel im Fokus, hat sich die Aufmerksamkeit in den letzten Jahren mehr und mehr auf die Funktion von BMP-9 in der Leber sowie im Fett- und Glucosestoffwechsel verschoben. Mehreren Arbeitsgruppen zufolge<sup>64, 67, 91, 110</sup>, hat BMP-9 einen positiven Effekt auf den Energiehaushalt. Vor allem dann, wenn eine entgleiste, fettreiche Stoffwechsellage vorliegt, wie es z.B. bei NAFLD oder Diabetes der Fall ist.

Gleichzeitig, scheint BMP-9 in der Leber bei Entzündung, z.B. im Rahmen einer CCL4-Schädigung im Mausmodell, einen eher schädlichen Effekt auf die Regenerationsfähigkeit der Leber zu besitzen<sup>39</sup>. So besteht in der aktuellen Literatur eine Diskrepanz bezüglich der potentiell schädlichen oder eher nützlichen Funktion von BMP-9 im menschlichen Körper.

Auch um diese Diskrepanz weiter zu beleuchten, war das Ziel dieser Arbeit die Erforschung der Funktionen von BMP-9 bei fettreicher Stoffwechsellage,.

Im Bestreben bestmögliche translationale Forschung zu betreiben, wurden neben Monolayer-Kulturen auch Organoide in Kultur sowie im Modell eines Perfusionssystems studiert. Im Verlauf der Arbeit untersuchten wir nicht nur den Einfluss der Fettsäuren auf BMP-9, sondern konzentrierten uns ebenso auf die Identifikation noch unerforschter Mediatoren von BMP-9 und deren Einordnung in den humanen Metabolismus unter fettreicher Stoffwechsellage.

### 4.1 Ursprung von BMP-9

Trotz jahrelanger Erforschung von BMP-9 besteht immer noch Uneinigkeit über dessen genauen Ursprung. Obwohl bereits bei der Entdeckung von BMP-9 die Leber als hauptsächlicher Syntheseort deklariert wurde<sup>45</sup>, blieb die genaue Zellart, welche

BMP-9 bilden soll, umstritten. Während Bidart et al. die Hauptquelle von BMP-9 in den Hepatozyten sieht<sup>41</sup>, kam die Forschungsgruppe von Breitkopf-Heinlein et al. zu dem Ergebnis, dass die hepatischen Sternzellen den Hauptanteil von BMP-9 bilden<sup>39</sup>. Um diese Diskrepanz grob orientierend zu überprüfen, führten wir eine Analyse der Genexpression der verschiedenen Leberzelltypen in Bezug auf deren BMP-9 Expression durch. Auch wenn dabei die finale Isolation der Zellen aus dem Lebergewebe leider nicht vollständig gelang, zeigte sich die Expression in unserem Zellgemisch aus nicht-parenchymalen Zellen (HSC und LSEC) deutlich höher als in den Hepatozyten (s. Abb. 8). Aus der Zusammenschau der bisherigen Forschungsergebnisse und diesen Daten, erscheinen die HSC als Hauptquelle des BMP-9 deutlich wahrscheinlicher als die Hepatozyten.

#### 4.2 BMP-9 Expression von hHSC

Wie oben erwähnt, bilden vermutlich HSC den größten Anteil von BMP-9. BMP-9 wiederum soll manche seiner Effekte auf den Metabolismus erst in fettreicher Stoffwechsellage entfalten<sup>64</sup>.

Um zu überprüfen, inwiefern sich eine fettreiche Stoffwechsellage direkt auf die BMP-9 Expression auswirkt, setzen wir hHSC in Monolayerkultur einem fettreichen Medium aus und analysierten die RNA-Expression anschließend via realtime-PCR (s. Abb. 9). Aufgrund der Tatsache, dass BMP-9 offenbar in kultivierten HSC insgesamt nur in niedrigen Mengen exprimiert wurde, war es technisch schwierig die BMP-9 Expression mittels PCR zu messen.

Im Kontrast dazu stehen die oben genannten Ergebnisse der Analyse der verschiedenen Leberzellen. Dort erwies sich die realtime-PCR als unproblematisch und der Ct-Wert der Probe mit HSC/LSEC belief sich immerhin auf 25.

Grund für die Diskrepanz könnte die Tatsache darstellen, dass sich die humanen HSC vor den Experimenten bereits seit längerer Zeit in Kultur befanden. Denkbar wäre, dass sich die Expression über die verschiedenen Passagen und den damit einhergehenden Zell-Stress verändert hat. So können HSC durch physische Einflüsse aktiviert werden und zu Myofibroblasten differenzieren.<sup>10</sup> Allerdings soll der Literatur zufolge bei der Differenzierung zu Myofibroblasten die BMP-9 Expression eher zu- statt abnehmen.<sup>39</sup> Inwieweit eine Langzeitkultur der Zellen in vitro aber als valides

Modell für die Aktivierung zu Myofibroblasten betrachtet werden kann, ist nicht bekannt.

In jedem Fall wären weitere Versuche mit jüngeren Zelllinien und primären HSC notwendig, um die Expression von BMP-9 in hHSC im physiologischen Zustand sowie unter fettreicher Stoffwechsellage korrekt zu untersuchen.

### 4.3 Aktivierung von HSC und LSEC

HSC und auch LSEC können durch verschiedene Arten von Stress (wie z.B. die Wirkung von bakteriellen Toxinen wie Lipopolysacchariden) aktiviert werden und zu Myofibroblasten bzw. makrovesikulären Endothelzellen differenzieren bzw. transitionieren.<sup>12, 14</sup> Physiologischerweise wirken gesunde LSEC stabilisierend auf den Normalzustand der HSC.<sup>111</sup> Werden sie allerdings kapillarisiert, verlieren sie diese Fähigkeit, woraufhin die HSC zu Myofibroblasten dedifferenzieren.<sup>105</sup> Durch diese Aktivierung kommt es zur verstärkten Bildung von extrazellulärer Matrix und somit zum Beginn des fibrotischen Umbauprozesses der Leber.<sup>8, 14</sup>

Um zu untersuchen, ob auch die direkte Exposition gegenüber Fettsäuren eine Aktivierung von HSC und LSEC bewirken kann, analysierten wir verschiedene Marker nach Stimulation mit Fettsäuren. Für den Aktivierungszustand der HSC wurden die Marker alpha smooth muscle actin (aSMA) und Kollagen Typ I (Col1a1) verwendet. Bezüglich der Aktivierung der LSEC analysierten wir die Expression von LYVE-1 und Stabilin 2 (STAB2) sowie Fibronectin.

Entgegen unserer Erwartung zeigte sich in unseren Versuchen kein einziger dieser Marker signifikant verändert exprimiert (s. Abb. 10 A-E). Die Annahme, dass die direkte Exposition gegenüber Fettsäuren mit einer Aktivierung der HSC zu Myofibroblasten, bzw. einer Kapillarisation der LSEC einhergeht, konnten wir demnach nicht bestätigen.

Neben der Möglichkeit, dass Fettsäuren nicht als direkter Stimulus fungieren, wäre es ebenfalls denkbar, dass die Zelllinien durch die langandauernde Kultur inkl. mehrerer Passagen bereits basal stark aktiviert waren. Olsen et al. zufolge, können mechanische Einflüsse in Form einer extrazellulären Matrix eine Aktivierung der HSC bewirken.<sup>10</sup> Möglicherweise befanden sich die HSC dadurch bereits in einem solch ausgeprägten Aktivierungszustand, dass die Fettsäuren als Stimulus keine zusätzliche

Aktivierung mehr zur Folge hatten. Eben dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass wir in kultivierten HSC deutlich weniger BMP-9 gefunden haben als in den frisch isolierten HSC (wie in Kap. 4.2 bereits erwähnt).

Auch bei den LSEC konnten keine signifikanten Veränderungen im Sinne einer Dedifferenzierung durch die Stimulation mit Fettsäuren gefunden werden (s. Abb. 10 C-E). Die Erklärungen dafür entsprechen vermutlich mehr oder weniger denen der HSC.

Ein Unterschied der beiden Zellarten besteht darin, dass wir die HSC selbst von humanem Gewebe isoliert und kultiviert haben, während wir für die Versuche mit LSEC upcyteLSEC genutzt haben. Upcyte Zellen sind humane Zellen, welche ehemals isoliert und lentiviral verändert wurden, um die Proliferation transient zu stimulieren und ein widerstandsfähiges und realistisches Modell humaner Zellen zur Verfügung zu haben. Auch wenn sie sich gut zur Untersuchung der humanen zellulären Vorgänge eignen, könnten die Prozesse der Kapillarisation durch die lentivirale Modifikation alteriert worden sein.

#### 4.4 FGF21 und seine Rolle im BMP-9 Stoffwechsel

FGF21 gehört zur Untergruppe von FGF19, kann endokrin wirken und besitzt verschiedene benigne Effekte auf den menschlichen Stoffwechsel.<sup>38, 85, 90, 91</sup> Ein Bildungsort ist die Leber, wobei die Synthese durch verschiedene Einflüsse stimuliert wird, darunter auch durch Fettsäuren.<sup>86</sup> Nach den Ergebnissen von Yu et al. zeigen Hepatozyten einer Hepatom Zelllinie (HepG2) nach Stimulation mit Linolsäure eine erhöhte FGF21 Produktion.<sup>86</sup>

Da sich die Hepatom Zelllinie von einer Tumorzelllinie ableitet, inklusive möglicher stattgefundenener Mutationen, ist die Aussagekraft in Bezug auf die Physiologie von primären (nicht-entarteten) Hepatozyten limitiert. Um die Versuchsergebnisse von Yu et al. zu reproduzieren und zu validieren, untersuchten wir die Stimulation mit Fettsäuren daher anhand von upcyte Hepatozyten. Wie oben erwähnt, sind upcyte Hepatozyten Zellen, welche von einem gesunden Spender bezogen und anschließend quasi immortalisiert wurden. Da es sich bei Ihnen im Unterschied zur Tumorzelllinie um gesunde Zellen handelt, bieten sie eine wertvolle Ergänzung zu den bisherigen

Ergebnissen. In unserem Versuch zeigte sich bei den upcHC im Gegensatz zu den Ergebnissen mit der Hepatom Linie keine Induktion von FGF21 durch Linolsäure (s. Abb. 12). Allerdings konnten wir eine Induktion von FGF21 durch Palmitin- und Ölsäure nachweisen.

Während Yu et al. die Produktion von FGF21 in Hepatozyten untersucht hatten<sup>86</sup>, konnten wir ebenfalls eine Bildung von FGF21 in hHSC feststellen.

In den hHSC zeigte sich FGF21 bemerkenswerterweise durch dieselbe Kombination an Fettsäuren induziert (Palmitin- und Ölsäure) wie bei den Hepatozyten (s. Abb. 11). Den Daten der humanen Proben zufolge, scheint die FGF21 Synthese im Vergleich zum Darm vor allem in der Leber zu erfolgen (s. Abb. 22).

Kuo et al. postulierten, dass die Applikation von BMP-9 ebenfalls zu erhöhter FGF21-Expression führt. Diese Hypothese konnten wir in unserem Versuchsaufbau nicht bestätigen (Abb.12). In unserer Arbeitsgruppe zeigte die virusvermittelte Überexpression von BMP-9 in Mäusen ebenfalls keine erhöhte FGF21-Expression.<sup>112</sup> Allerdings führte die Stimulation mit BMP-9 und Palmitinsäure im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Fettsäuren zu einer gesteigerten Synthese von FGF21 in Hepatozyten (s. Abb. 12).

Dass BMP-9 erst im Beisein von Fettsäuren einen Effekt auf die FGF21-Synthese haben könnte, würden zu den Ergebnissen von Yang et al.<sup>64</sup> passen, welche mehrere Effekte von BMP-9 erst unter einer *high fat diet* beobachtet haben.

Weiter analysierte unsere Arbeitsgruppe BMP-9 KO-Mäuse. Dort zeigte sich die Expression von FGF21 in der Leber vermindert<sup>112</sup>, während KLB im Fettgewebe wiederum stark induziert wurde. Denkbar wäre, dass es im Zuge des Fehlens von BMP-9 zur verminderten Synthese von FGF21 kommt und daraus eine kompensatorische Erhöhung des Rezeptors von FGF21 im Fettgewebe resultiert.

Weiter zeigten die BMP-9 KO-Mäuse vermehrt viszerales Fettgewebe, dessen Expression sich zusätzlich von der Expression gesunder Individuen in Bezug auf verschiedene Adipokine deutlich unterschied. So war Leptin, ein zentrales Hormon in der Regulation der Nahrungsaufnahme<sup>113</sup>, z.B. 113-mal stärker exprimiert als bei den Wildtyp-Kontrollen (noch nicht veröffentlichte Daten). BMP-9 scheint demnach auch auf diesem Weg einen Einfluss auf die Stoffwechsellhomöostase zu haben.

Zusammengenommen sind die Ergebnisse unserer Versuche mit FGF21 komplex und insbesondere in Bezug auf die aktuelle Forschungsliteratur schwierig einzuordnen. Dass BMP-9 eine Rolle in der Regulation des Fettstoffwechsels spielt ist aufgrund der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen sowie der ausgeprägten Veränderung der Adipokine bei BMP-KO Mäusen sehr wahrscheinlich anzunehmen. Eine direkte klare Induktion von FGF21 durch Fettsäuren und BMP-9 konnten wir jedoch nicht sicher feststellen. Gleichwohl zeigte sich FGF21 in bestimmten Konditionen durch Fettsäuren bzw. durch BMP-9 + Fettsäuren erhöht. FGF21 wird wahrscheinlich insgesamt mehr in der Leber als im Darmgewebe gebildet, in der Leber aber nicht nur durch Hepatozyten, sondern auch durch nicht-parenchymale Zellen. In den HSC zeigte sich dabei die FGF21-Synthese durch die Kombination von Palmitin- und Ölsäure signifikant gesteigert.

#### 4.5.1 Synthese von FGF19

FGF19 ist sowohl strukturell als auch funktionell nah mit FGF21 verwandt<sup>38</sup>. Seine prominenteste Rolle nimmt es im Rahmen der Gallensäurenregulation ein. In diesem Zusammenhang wird meist das terminale Ileum als Syntheseort von FGF19 angegeben, von wo FGF19 sezerniert wird, um endokrin über den Blutfluss auf die Leber (einschliesslich die Hepatozyten) zu wirken. Dort hemmt es über FGFR4 die Aktivität von CYP7A1 und damit den entscheidenden Schritt der Gallensäuresynthese.<sup>114</sup>

In unseren Versuchen zeigte sich allerdings nicht nur in Darm- sondern auch in Leberzellen eine Expression von FGF19 (s. Abb. 13). In der Ko-Kultur des Perfusionssystem mit Darm- und Leberorganoiden zeigte sich die Synthese von FGF19 in den Leberorganoiden sogar signifikant höher als in den Darmorganoiden (s. Abb. 20). Um diese Ergebnisse weiter zu validieren, verglichen wir zusätzlich die Genexpression in jeweils 6 humanen Darm- und Leberbiospien. Hier zeigte sich die Expression am ehesten gleich, es konnte keine signifikante Differenz festgestellt werden (s. Abb. 22).

Eine mögliche Erklärung für die divergenten Ergebnisse in Organoiden könnte der Umstand sein, dass der Stress der Kultur und das Passagieren sich auf die Expression von FGF19 in den Organoiden ausgewirkt haben könnte.

Dass FGF19 aber zumindest teilweise auch in Hepatozyten gebildet wird, passt nicht ganz zur prominenten Hypothese der Darm-Leber-Achse mit Regulation der Gallensäuren über FGF19. Diese wurde allerdings bereits von anderen Arbeitsgruppen sukzessive erweitert. So scheint es sich eher nicht nur um eine lineare Regulation von FXR im Darm über FGF19 zur Hemmung der CYP7A1 in der Leber zu handeln, sondern es zeigte sich auch eine Hemmung der CYP7A1 über SHP.<sup>93</sup>

Dass FGF19 unseren Ergebnisse zufolge auch in Hepatozyten, dem eigentlichen Zielort, gebildet wird, lässt zusammen mit den jüngeren Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen auf eine deutliche komplexere Regulierung schließen als ehemals angenommen.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Signalwege und die Bildungsorte von FGF19 besser zu verstehen.

#### 4.5.2 Der Einfluss von Fettsäuren und BMP-9 auf FGF19

In Hepatozyten zeigte sich eine erhöhte Expression von FGF19 durch die Exposition mit Palmitin- und Linolsäure (s. Abb. 13). BMP-9 allein, hatte in Hepatozyten keinen signifikanten Effekt auf FGF19. Die Kombinationen von Palmitin- und Linolsäure mit BMP-9 erreichten wiederum eine signifikante Steigerung im Vergleich zu den Konditionen mit alleinigem BMP-9. Dies passt zu den Ergebnissen von Yang et al., bei denen sich manche Effekte von BMP-9 erst entfalteten, sobald eine fettreiche Stoffwechsellage gegeben war. Andererseits waren es sowohl ohne als auch mit BMP-9 dieselben Fettsäuren (Palmitin- und Ölsäure) welche eine signifikant gesteigerte Expression von FGF19 erreichten. Daher halten wir es für wahrscheinlicher, dass der Einfluss der Fettsäuren auf die FGF19-Expression in Hepatozyten eher unabhängig von BMP-9 ist und BMP-9 keine direkte Auswirkung auf FGF19 in Hepatozyten besitzt.

In Darmepithelzellen zeigen sich die Effekte von BMP-9 auf FGF19 im Vergleich zu den Hepatozyten sehr gegensätzlich. Dort wiederum scheint BMP-9 einen deutlichen und starken Einfluss auf die Expression von FGF19 zu haben (s. Abb. 15). Jede

Kondition mit BMP-9 zeigte eine gesteigerte FGF19 Synthese, auch BMP-9 allein, ohne Fettsäuren. Umgekehrt zur Leber scheint im Darm demnach BMP-9 unabhängig von den Fettsäuren einen starken Einfluss auf FGF19 zu haben, während die direkte Stimulation mit Fettsäuren alleine eher ohne Auswirkung bleibt.

Passend dazu die Ergebnisse der Darmorganoide in Ko-Kultur mit Leberorganoiden, welche signifikant mehr FGF19 Expression als Darmorganoide in Monokultur zeigen (s. Abb.20). In Rückschau mit unseren anderen Ergebnissen postulieren wir daher, dass in der Ko-Kultur von den Leberorganoiden ausgeschüttetes BMP-9 an den Rezeptor Alk1 der Darmorganoide bindet und so die FGF19- Synthese im Vergleich zu Darmorganoiden in Monokultur steigert.

Die Ergebnisse spiegeln auch den Wert und den Zusatznutzen des Modells des Perfusionssystems wider. Durch die unterschiedlichen Komponenten können komplexe Interaktionen von Zellen verschiedener Organe in vitro besser untersucht werden. Dieser Vorteil stellt gleichzeitig auch einen Nachteil der Methodik dar, da es mit steigender Komplexität im Versuchsaufbau durch den erhöhten Anteil an Variablen schwieriger wird, die Ergebnisse korrekt zu deuten. Ebenso erhöht sich die Störanfälligkeit des Versuchsaufbaus im Vergleich zu einfacheren Versuchsmodellen wie z.B. dem Monolayer.

Wenn BMP-9 tatsächlich auch in vivo einen induktiven Effekt auf FGF19 besitzt, könnte es nicht nur in der Stoffwechsellhomöostase eine wichtige Rolle spielen, sondern auch im Gallensäuremetabolismus. Jüngste Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen zunehmend die Bedeutung von FGF19 insbesondere in mit Gallensäuren-assoziierten Erkrankungen wie z.B. der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC). So zeigten Schneider et al.<sup>115</sup> dass eine verminderte FXR-Aktivierung und Signalkaskade durch Depletion des enteralen Mikrobioms (mit konsekutiv vermindertem FGF19) bei Mdr2-Knockout Mäusen zu einer vermehrten Leberschädigung führt.

Passend zu diesen Daten zeigte sich in einem Genexpressionsarray FGF15, das murine Analogon zum humanen FGF19, durch einen Knockout von BMP-9 im Dünndarm deutlich vermindert.<sup>112</sup> CYP7A1, dessen Expression durch FGF19 gehemmt wird, zeigte sich hochreguliert. Unser nächster Schritt wird sein, die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf der Ebene der Proteine zu bestätigen.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass BMP-9 die Bildung von FGF19 verstärkt und auf diese Weise positiv auf den Energie- und Leberstoffwechsel einwirkt. Unseren Ergebnissen zufolge klassifiziert sich BMP-9 somit, neben FGF19 selbst, als vielversprechendes Zielprotein in Erkrankungen der Leber und des Darms, die mit Gallensäuren assoziiert sind.

#### 4.6 Rezeptoren von FGF19 und FGF21

FGF19 und FGF21 binden unter anderem über FGFR4 und dessen Ko-Rezeptor  $\beta$ -klotho an ihre jeweiligen Zielzellen.<sup>108</sup>

FGFR4 fanden wir sowohl in Hepatozyten als auch in Darmorganoiden eher konstitutiv exprimiert (s. Abb. 14 und 16).  $\beta$ -Klotho wiederum scheint im Menschen vor allem in Hepatozyten und nicht in Darmzellen exprimiert zu werden (s. Abb. 23). Die Daten dazu sind allerdings nicht einheitlich.

In Hepatozyten führte die Stimulation mit BMP-9 in fast allen Konditionen zu einer erhöhten Expression von  $\beta$ -klotho (s. Abb. 14B). Lediglich die Kondition mit Linolsäure und BMP-9 zeigte im Vergleich zur alleinigen Linolsäure keine Steigerung. Die alleinige Stimulation mit Fettsäuren hatte keinen Effekt auf  $\beta$ -klotho.

Während BMP-9 eher keinen Effekt auf die FGF19 Synthese in Hepatozyten hat (s. Kap. 4.5.2), scheint es verstärkend auf die Expression dessen Ko-Rezeptors  $\beta$ -Klotho in Hepatozyten zu wirken. Auf diese Weise vermittelt BMP-9 einerseits eine gesteigerte Synthese des Liganden FGF19 in den Darmzellen (s. Abb.15) und erhöht gleichzeitig die Antwortfähigkeit an der Zielzelle über die erhöhte Expression des Ko-Rezeptors  $\beta$ -Klotho in den Hepatozyten. So wirkt BMP-9 unseren Ergebnissen zufolge in doppelter Weiser (Ligand als auch Rezeptor) verstärkend auf denselben Signalweg ein.

Zumindest in teilweisem Kontrast stehen andere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, bei denen  $\beta$ -klotho in BMP-9-KO-Mäusen in der Leber- und vor allem in Fettgewebe verstärkt exprimiert war (Daten noch nicht veröffentlicht). Daneben fand sich FGF21

und vor allem FGF19 in den BMP-9-KO-Mäusen vermindert. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das fehlende BMP-9 über die verminderte Synthese von FGF19 und FGF21 zu einer kompensatorischen Erhöhung deren Ko-Rezeptors geführt haben könnte. Grundlegend muss aber auch immer beachtet werden, dass sich die Regulation bei Mäusen von der humanen Regulation unterscheiden kann. Zusammenfassend erscheint die Regulation komplex und weitere Versuche sind notwendig, um sie genauer zu verstehen.

#### 4.7 Rezeptoren von BMP-9 im Vergleich von Leber und Darm

Die höchste Affinität besitzt BMP-9 für den Rezeptor Alk1, während es Alk2 ebenfalls mit niedrigerer Affinität bindet.<sup>44</sup> Die Expression dieser Rezeptoren ist demnach die Voraussetzung für eine funktionierende Signalkaskade. Daneben fungiert Endoglin als nicht obligater Ko-Rezeptor, welcher die Rezeptorantwort noch modulieren kann.<sup>44</sup> Nach dem aktuellen Forschungsstand wird auf den Darmepithelzellen hauptsächlich Alk1 exprimiert, während auf Hepatozyten vor allem Alk2 exprimiert wird.<sup>102</sup> Ebenso verhielt es sich bei der Untersuchung unserer Hepatozyten, bei denen sich ebenfalls nur Alk2 fand (Abb.17a). Eine parakrine Wirkung des von HSC gebildeten BMP-9 auf Hepatozyten ist daher möglich, aber nur über den Rezeptortyp für den BMP-9 grundsätzlich eher eine niedrige Affinität besitzt.<sup>44</sup> Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum Effekte von BMP-9 auf Hepatozyten möglicherweise schwächer ausfallen als auf Zellen, die Alk1 exprimieren.

Endoglin, der Ko-Rezeptor von BMP-9 fand sich in unseren Versuchen nahezu ausschließlich in den Leberorganoiden (s. Abb. 24A). Bei der Analyse der Genexpression via PCR beliefen sich die CT-Werte aber auf über 30, was insgesamt eine eher geringe Expression vermuten lässt und möglicherweise auch die hohen Fehlerindikatoren erklärt.

Die Stimulation mit verschiedenen Fettsäuren oder BMP-9 hatte auf Alk2 in HC keinerlei Wirkung (s. Abb. 17b). Alk2 scheint auf den Hepatozyten eher konstitutiv exprimiert zu werden.

Auch unsere Ergebnisse im Perfusionssystem (PFS) decken sich mit denen der aktuellen Literatur. So fanden wir Alk1 hauptsächlich auf Darmorganoiden und kaum auf Leberorganoiden (s. Abb. 24 B). Alk2 scheint im PFS wie erwartet vermehrt von den Leberorganoiden gebildet zu werden, aber die statistische Auswertung erreichte keine Signifikanz, weshalb diesbezüglich keine valide Aussage getroffen werden kann (Daten nicht gezeigt).

Weder auf Alk1 noch auf Alk2 zeigte die Stimulation mit Fettsäuren eine Wirkung (s. Abb. 17 und 24B). Weiter studierten wir die Wirkung von BMP-9 auf Alk1 in den Darmorganoiden. Auch wenn die Ergebnisse eine leichte Steigerung von Alk1 vermuten lassen (Abb. 17c), erreichten die Daten aufgrund von hohen Fehlerindikatoren keine Signifikanz.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir nach unserer Auswertung die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen können, dass Hepatozyten vor allem Alk2 bilden, während Enterozyten vorwiegend Alk1 exprimieren. Der Ko-Rezeptor Endoglin spielt eher keine Rolle im Darm.

Bezüglich unserer Vermutung einer organübergreifenden Regulation zwischen BMP-9 und FGF19 ist Alk1, der Rezeptor, für den BMP-9 die höchste Affinität besitzt, auf den Darmzellen vorhanden. Demnach kann in der Leber von HSC gebildetes BMP-9 im Darm über Alk1 wirken. Cai et al. hatten weiterhin gezeigt, dass das prominente Zielgen von BMP-9, ID1, im Darm vermehrt exprimiert wird.<sup>102</sup> Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass BMP-9 im Darm auch wirklich signalisiert.

#### 4.8 Einfluss von BMP-9 auf die Regenerationsfähigkeit

LGR5 stellt einen Marker von Stammzellen des Darms dar.<sup>109</sup> Die Expression spiegelt in gewisser Weise die Zellteilungsbedingungen wider.

Während abgesehen von der Kombination aus Palmitin- und Ölsäure Stimulation von Darmorganoiden mit Fettsäuren keinen Effekt zeigte, bewirkte die Stimulation mit BMP-9 eine signifikante Reduktion von LGR5 in (s. Abb. 18). Allein die Kombination von BMP-9 mit Ölsäure erreichte nur eine Tendenz. Es scheint als würde BMP-9 am ehesten unabhängig von Fettsäuren LGR5 in Darmepithelzellen reduzieren. Da LGR5 vor allem von den Stammzellen in den Krypten exprimiert wird, scheint BMP-9

demnach den differenzierten Phänotyp dieser Zellen zu stabilisieren. Nach Breitkopf-Heinlein et al.<sup>39</sup> hat BMP-9 auf Hepatozyten einen ähnlichen Effekt. Im Perfusionsystems zeigte LGR5 in den Darmorganoiden deutlich höher exprimiert als in der Leber (s. Abb. 23). Die Darmorganoide in Ko-Kultur in fettreichem Medium zeigten eine erniedrigte Expression von LGR5 im Vergleich zur Kontrolle. Da in den Monolayerversuchen mit Darmorganoiden Fettsäuren eher keinen Effekt auf die LGR5-Expression hatten, scheint es unwahrscheinlich, dass die Reduktion von LGR5 im Perfusionsmodell durch einen direkten Einfluss der Fettsäuren verursacht wurde. Denkbar wäre, dass durch die Fettsäuren vermehrt BMP-9 in den Leberorganoiden exprimiert wurde, welches dann wiederum LGR5 in den Darmorganoiden reduzierte (ähnlich vermutet wie bei unseren Ergebnissen mit FGF19 im Perfusionssystem s. Kap. 4.5.2). Wie bereits mehrmals erwähnt hatte Yang et al.<sup>64</sup> einige Effekte von BMP-9 erst in fettreicher Stoffwechsellage beobachtet. Um diese Hypothese zu stützen, müsste allerdings im ersten Schritt bewiesen werden, dass BMP-9 wirklich durch Fettsäuren induziert wird.

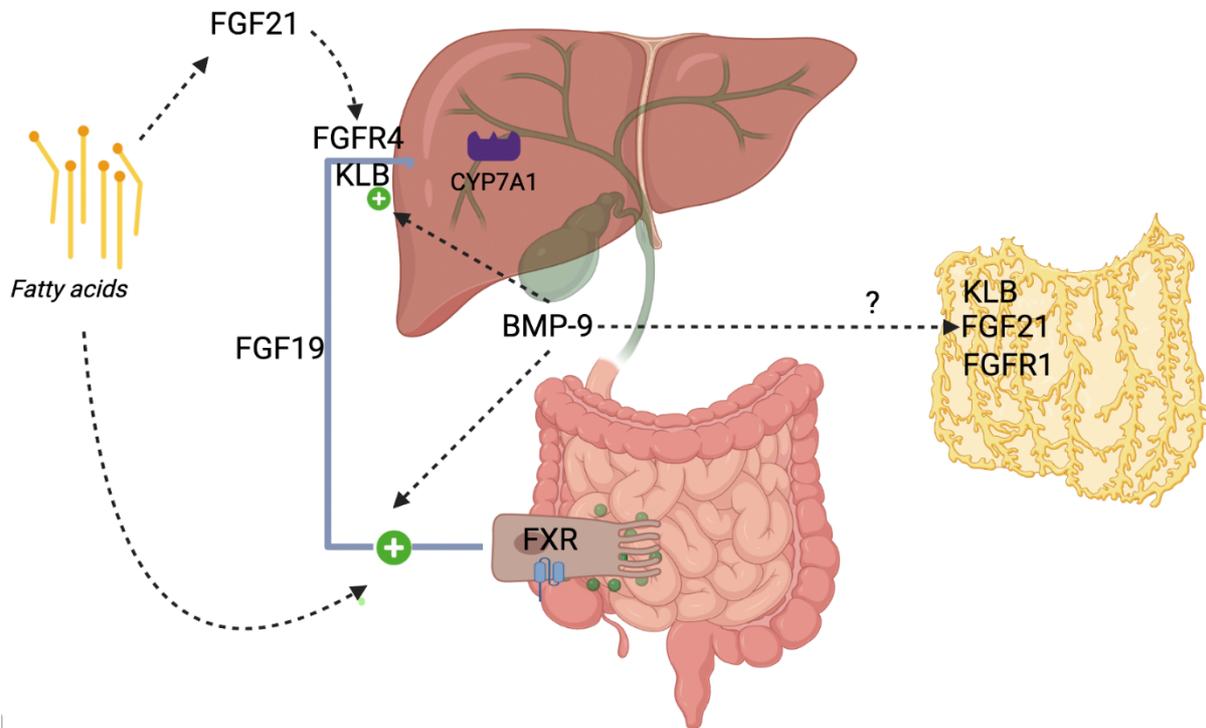
Demnach sind weitere Anstrengungen notwendig, um die Rolle von BMP-9 vollständiger im menschlichen Stoffwechsel einzuordnen.

Während mehreren Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen zufolge BMP-9 eine benigne Rolle im Stoffwechsel zu haben scheint (s. oben), hatte die Arbeitsgruppe von Breitkopf-Heinlein et al.<sup>39</sup> gezeigt, dass BMP-9 die Regenerationsfähigkeit der Leber bei Leberschädigung bzw. im NASH-Modell herabsetzt. In ruhenden, gesunden Hepatozyten wirkte BMP-9 dagegen antiproliferativ und stabilisierte die Zellpolarisation sowie die Expression von CYP450 Enzymen.<sup>39</sup>

Wir vermuten daher, dass sich BMP-9 im funktionierenden, physiologischen Stoffwechsel positiv auf die Leberfunktion auswirkt und dass die Regulation mit steigender Inflammation wie z.B. im Rahmen einer NASH zunehmend entgleist. So könnte die Applikation von BMP-9 bei NAFL und Diabetes Typ 2 den Stoffwechsel positiv beeinflussen, während es bei NASH die Leberfibrose verstärken könnte.

Vor möglichen klinischen Studien mit BMP-9 müssen diese divergenten Ergebnisse von BMP-9 in verschiedenen Störungsmodellen zunächst vollständiger untersucht und verstanden werden.

## 5 Zusammenfassung



**Abb. 25: Schematische Zusammenfassung der Regulation von BMP-9 und seinen Mediatoren sowie zugehöriger Rezeptoren.** BMP-9 wird von der Leber gebildet und wirkt an mehreren Organen. In der Leber bewirkt es eine Steigerung von FGF21 sowie des Ko-Rezeptors von FGF21 und FGF19  $\beta$ -klotho. Fettsäuren scheinen diesen Effekt noch zu verstärken. Weiter bewirkt BMP-9 eine deutlich gesteigerte Expression von FGF19 im Darm und spielt ebenfalls eine (noch ungeklärte) Rolle in der Regulation von FGF21 und KLB im viszeralen Fettgewebe.

Zusammen mit den jüngsten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppe weisen unsere Erkenntnisse auf eine Beteiligung von BMP-9 im Energie- und Leberstoffwechsel hin. Während die Verbindung von FGF21 durch BMP-9 unseren Ergebnissen zufolge nicht eindeutig war, konnten wir eine deutlich gesteigerte Expression von FGF19 in Darmepithelzellen durch BMP-9 nachweisen.

Nach Einordnung unserer Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand sind wir davon überzeugt, dass BMP-9 über den Mediator FGF19 ebenfalls eine wichtige Rolle in einer Leber-Darm-Achse einnimmt. In dieser wird BMP-9 zumindest zum Teil von

der Leber gebildet, um über den Rezeptor Alk1 an den Darmzellen zu wirken und dort die Expression von FGF19 zu steigern. Über FGF19 als Mediator wäre ein Teil der bekannten benignen Effekte von BMP-9 auf den Stoffwechsel zu erklären. Gleichzeitig stellt FGF19 selbst ein aktuell viel diskutiertes Forschungsobjekt mit spannenden Erkenntnissen und womöglich neuen Ansatzpunkten in der Therapie von Leberschäden dar. Insbesondere in Gallensäuren-assoziierten Erkrankungen nimmt FGF19 eine bedeutende Rolle ein.

Weiter konnten wir zeigen, dass BMP-9 nicht nur den Liganden FGF19 induziert, sondern auch den Ko-Rezeptor  $\beta$ -Klotho erhöht und so auf doppelte Weise verstärkend auf denselben Signalweg einwirkt. Zur besseren Übersicht haben wir unsere Ergebnisse in Zusammenhang mit dem aktuellen Forschungsstand als Schema visualisiert (s. Abb. 25).

Es gilt nun, die Erkenntnisse der Analyse der Genexpressionen auf der Ebene der Proteine weiter zu validieren und diese gegebenenfalls mit Untersuchungen in vivo abzugleichen.

Die physiologische Regulation mit den positiven Effekten von BMP-9 auf den Stoffwechsel scheint mit Inflammation z.B. im Rahmen einer NASH zunehmend zu entgleisen und sich negativ auf bereits bestehenden Leberschaden und die Regenerationsfähigkeit auszuwirken. Um geeignete medikamentöse Ansatzpunkte abhängig vom Stadium der Leberschädigung zu identifizieren und sichere klinische Studien durchzuführen, ist ein genaueres Verständnis der sich im Rahmen der zunehmenden Schädigung wechselnden Pathophysiologie unbedingt erforderlich.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Stevens GA, Singh GM, Lu Y, et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul Health Metr.* 2012;10(1):22.
2. Milic S, Lulic D, Stimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9330-9337.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64(1):73-84.
4. Younossi ZM, Stepanova M, Younossi Y, et al. Epidemiology of chronic liver diseases in the USA in the past three decades. *Gut.* 2019.
5. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. - 6., vollständig überarbeitete Auflage 2019.
6. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(5):306-321.
7. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012;180(4):1340-1355.
8. Kent G, Gay S, Inouye T, et al. Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73(10):3719-3722.
9. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007;13(11):1324-1332.
10. Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(1):G110-118.
11. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol.* 2002;36(2):200-209.
12. Ruan B, Duan JL, Xu H, et al. Capillarized Liver Sinusoidal Endothelial Cells Undergo Partial Endothelial-Mesenchymal Transition to Actively Deposit Sinusoidal ECM in Liver Fibrosis. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:671081.
13. Musso O, Rehn M, Saarela J, et al. Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology.* 1998;28(1):98-107.
14. Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, et al. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):948-954.
15. Kudaravalli P, John S. Nonalcoholic Fatty Liver. *StatPearls.* Treasure Island (FL) 2019.
16. Moore JB. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc.* 2010;69(2):211-220.
17. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet.* 2016;387(10019):679-690.
18. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003;37(4):917-923.
19. Papamiliadous ES, Roberts SK, Nicoll AJ, et al. A randomised controlled trial of a Mediterranean Dietary Intervention for Adults with Non Alcoholic Fatty Liver Disease (MEDINA): study protocol. *BMC Gastroenterol.* 2016;16:14.

20. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2017;37 Suppl 1:85-89.
21. Roeb E, Steffen HM, Bantel H, et al. [S2k Guideline non-alcoholic fatty liver disease]. *Z Gastroenterol.* 2015;53(7):668-723.
22. Weiss J, Rau M, Geier A. Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111(26):447-452.
23. Friedman S, Sanyal A, Goodman Z, et al. Efficacy and safety study of cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis in adult subjects with liver fibrosis: CENTAUR Phase 2b study design. *Contemp Clin Trials.* 2016;47:356-365.
24. Schuppan D, Surabattula R, Wang XY. Determinants of fibrosis progression and regression in NASH. *J Hepatol.* 2018;68(2):238-250.
25. Kleiner DE, Makhlof HR. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):293-312.
26. Singh S, Allen AM, Wang Z, et al. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(4):643-654 e641-649; quiz e639-640.
27. White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10(12):1342-1359 e1342.
28. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol.* 2012;56(6):1384-1391.
29. Schirmacher P, Fleig WE, Tannapfel A, et al. [Bioptic diagnosis of chronic hepatitis. Results of an evidence-based consensus conference of the German Society of Pathology, of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases and of Compensated Hepatitis (HepNet)]. *Pathologe.* 2004;25(5):337-348.
30. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells.* 2020;9(4).
31. Shao T, Josephson L, Liang SH. PET/SPECT Molecular Probes for the Diagnosis and Staging of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mol Imaging.* 2019;18:1536012119871455.
32. Eddowes PJ, Sasso M, Allison M, et al. Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2019;156(6):1717-1730.
33. Arab JP, Barrera F, Arrese M. The Evolving Role of Liver Biopsy in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Ann Hepatol.* 2018;17(6):899-902.
34. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40(6):1387-1395.
35. Lee J, Vali Y, Boursier J, et al. Prognostic accuracy of FIB-4, NAFLD fibrosis score and APRI for NAFLD-related events: A systematic review. *Liver Int.* 2021;41(2):261-270.
36. Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol.* 2017;67(4):829-846.
37. Harrison SA, Rinella ME, Abdelmalek MF, et al. NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2018;391(10126):1174-1185.
38. Babaknejad N, Nayeri H, Hemmati R, et al. An Overview of FGF19 and FGF21: The Therapeutic Role in the Treatment of the Metabolic Disorders and Obesity. *Horm Metab Res.* 2018;50(6):441-452.

39. Breitkopf-Heinlein K, Meyer C, König C, et al. BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis. *Gut*. 2017;66(5):939-954.
40. Brown MA, Zhao Q, Baker KA, et al. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem*. 2005;280(26):25111-25118.
41. Bidart M, Ricard N, Levet S, et al. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(2):313-324.
42. Mi LZ, Brown CT, Gao Y, et al. Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(12):3710-3715.
43. David L, Mallet C, Keramidas M, et al. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res*. 2008;102(8):914-922.
44. Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 6):964-972.
45. Miller AF, Harvey SA, Thies RS, et al. Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem*. 2000;275(24):17937-17945.
46. Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther*. 2004;11(17):1312-1320.
47. Sharff KA, Song WX, Luo X, et al. Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *J Biol Chem*. 2009;284(1):649-659.
48. Truksa J, Peng H, Lee P, et al. Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(27):10289-10293.
49. Schnitzler AC, Mellott TJ, Lopez-Coviella I, et al. BMP9 (bone morphogenetic protein 9) induces NGF as an autocrine/paracrine cholinergic trophic factor in developing basal forebrain neurons. *J Neurosci*. 2010;30(24):8221-8228.
50. Levet S, Ciais D, Merdzhanova G, et al. Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood*. 2013;122(4):598-607.
51. Li S, Dai H, He Y, et al. BMP9 inhibits the growth of breast cancer cells by downregulation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep*. 2018;40(3):1743-1751.
52. Wang T, Zhang Z, Wang K, et al. Inhibitory effects of BMP9 on breast cancer cells by regulating their interaction with pre-adipocytes/adipocytes. *Oncotarget*. 2017;8(22):35890-35901.
53. Ren W, Sun X, Wang K, et al. BMP9 inhibits the bone metastasis of breast cancer cells by downregulating CCN2 (connective tissue growth factor, CTGF) expression. *Mol Biol Rep*. 2014;41(3):1373-1383.
54. Gou L, Liu M, Xia J, et al. BMP9 Promotes the Proliferation and Migration of Bladder Cancer Cells through Up-Regulating lncRNA UCA1. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
55. Bi J, Ge S. Potential roles of BMP9 in liver fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):20656-20667.
56. Wood JH, Guo J, Morrell NW, et al. Advances in the molecular regulation of endothelial BMP9 signalling complexes and implications for cardiovascular disease. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(3):779-791.
57. Townson SA, Martinez-Hackert E, Greppi C, et al. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J Biol Chem*. 2012;287(33):27313-27325.

58. Saito T, Bokhove M, Croci R, et al. Structural Basis of the Human Endoglin-BMP9 Interaction: Insights into BMP Signaling and HHT1. *Cell Rep.* 2017;19(9):1917-1928.
59. Wiercinska E, Wickert L, Denecke B, et al. Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2006;43(5):1032-1041.
60. Gonzalez-Nunez M, Munoz-Felix JM, Lopez-Novoa JM. The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(10):1492-1510.
61. Li Q, Gu X, Weng H, et al. Bone morphogenetic protein-9 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2013;104(3):398-408.
62. Levelt E, Pavlides M, Banerjee R, et al. Ectopic and Visceral Fat Deposition in Lean and Obese Patients With Type 2 Diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(1):53-63.
63. Xu X, Li X, Yang G, et al. Circulating bone morphogenetic protein-9 in relation to metabolic syndrome and insulin resistance. *Sci Rep.* 2017;7(1):17529.
64. Yang M, Liang Z, Yang M, et al. Role of bone morphogenetic protein-9 in the regulation of glucose and lipid metabolism. *FASEB J.* 2019;33(9):10077-10088.
65. Ferre P, Fougelle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res.* 2007;68(2):72-82.
66. Ferre P, Fougelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12 Suppl 2:83-92.
67. Kuo MM, Kim S, Tseng CY, et al. BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity. *Biomaterials.* 2014;35(10):3172-3179.
68. Berg F, Gustafson U, Andersson L. The uncoupling protein 1 gene (UCP1) is disrupted in the pig lineage: a genetic explanation for poor thermoregulation in piglets. *PLoS Genet.* 2006;2(8):e129.
69. Li Q, Liu B, Breitkopf-Heinlein K, et al. Adenovirusmediated overexpression of bone morphogenetic protein9 promotes methionine choline deficiencyinduced nonalcoholic steatohepatitis in nonobese mice. *Mol Med Rep.* 2019;20(3):2743-2753.
70. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, et al. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res.* 2008;49(5):1068-1076.
71. Jiang Q, Li Q, Liu B, et al. BMP9 promotes methionine- and choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in non-obese mice by enhancing NF-kappaB dependent macrophage polarization. *Int Immunopharmacol.* 2021;96:107591.
72. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):235-253.
73. Dieci MV, Arnedos M, Andre F, et al. Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer Discov.* 2013;3(3):264-279.
74. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2(3):REVIEWS3005.
75. Beenken A, Mohammadi M. The structural biology of the FGF19 subfamily. *Adv Exp Med Biol.* 2012;728:1-24.
76. Luo J, Ko B, Elliott M, et al. A nontumorigenic variant of FGF19 treats cholestatic liver diseases. *Sci Transl Med.* 2014;6(247):247ra100.
77. Xu J, Stanislaus S, Chinookoswong N, et al. Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models--association with liver and adipose tissue effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(5):E1105-1114.
78. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* 1996;271(25):15292-15297.

79. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, et al. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem*. 2007;282(37):26687-26695.
80. Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*. 2008;57(5):1246-1253.
81. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1492(1):203-206.
82. Xu J, Lloyd DJ, Hale C, et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 2009;58(1):250-259.
83. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*. 2008;149(12):6018-6027.
84. Potthoff MJ, Inagaki T, Satapati S, et al. FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(26):10853-10858.
85. Bookout AL, de Groot MH, Owen BM, et al. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med*. 2013;19(9):1147-1152.
86. Yu H, Xia F, Lam KS, et al. Circadian rhythm of circulating fibroblast growth factor 21 is related to diurnal changes in fatty acids in humans. *Clin Chem*. 2011;57(5):691-700.
87. Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, et al. Fibroblast growth factor-21 regulates PPARGamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell*. 2012;148(3):556-567.
88. Chartoumpekis DV, Habeos IG, Ziros PG, et al. Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med*. 2011;17(7-8):736-740.
89. Crowley VE, Yeo GS, O'Rahilly S. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(4):276-286.
90. Kwon MM, O'Dwyer SM, Baker RK, et al. FGF21-Mediated Improvements in Glucose Clearance Require Uncoupling Protein 1. *Cell Rep*. 2015;13(8):1521-1527.
91. Kim S, Choe S, Lee DK. BMP-9 enhances fibroblast growth factor 21 expression and suppresses obesity. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(7):1237-1246.
92. Nishimura T, Utsunomiya Y, Hoshikawa M, et al. Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1444(1):148-151.
93. Cicione C, Degirolamo C, Moschetta A. Emerging role of fibroblast growth factors 15/19 and 21 as metabolic integrators in the liver. *Hepatology*. 2012;56(6):2404-2411.
94. Potthoff MJ, Boney-Montoya J, Choi M, et al. FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1alpha pathway. *Cell Metab*. 2011;13(6):729-738.
95. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab*. 2005;2(4):217-225.
96. Song KH, Li T, Owsley E, et al. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene expression. *Hepatology*. 2009;49(1):297-305.
97. Yang C, Jin C, Li X, et al. Differential specificity of endocrine FGF19 and FGF21 to FGFR1 and FGFR4 in complex with KLB. *PLoS One*. 2012;7(3):e33870.
98. Degirolamo C, Sabba C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(1):51-69.

99. Potthoff MJ, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev.* 2012;26(4):312-324.
100. Ryan KK, Kohli R, Gutierrez-Aguilar R, et al. Fibroblast growth factor-19 action in the brain reduces food intake and body weight and improves glucose tolerance in male rats. *Endocrinology.* 2013;154(1):9-15.
101. Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech Dev.* 2000;98(1-2):115-119.
102. Cai C, Itzel T, Gaitantzi H, et al. Identification of liver-derived bone morphogenetic protein (BMP)-9 as a potential new candidate for treatment of colorectal cancer. *J Cell Mol Med.* 2022;26(2):343-353.
103. Godoy P, Hengstler JG, Ilkavets I, et al. Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology.* 2009;49(6):2031-2043.
104. Nevzorova YA, Bangen JM, Hu W, et al. Cyclin E1 controls proliferation of hepatic stellate cells and is essential for liver fibrogenesis in mice. *Hepatology.* 2012;56(3):1140-1149.
105. DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology.* 2015;61(5):1740-1746.
106. Nonaka H, Tanaka M, Suzuki K, et al. Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev Dyn.* 2007;236(8):2258-2267.
107. Tarbit E, Singh I, Peart JN, et al. Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Fail Rev.* 2019;24(1):1-15.
108. Xie MH, Holcomb I, Deuel B, et al. FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine.* 1999;11(10):729-735.
109. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature.* 2007;449(7165):1003-1007.
110. Yang Z, Li P, Shang Q, et al. CRISPR-mediated BMP9 ablation promotes liver steatosis via the down-regulation of PPARalpha expression. *Sci Adv.* 2020;6(48).
111. Deleve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology.* 2008;48(3):920-930.
112. Drexler S, Cai C, Hartmann AL, et al. Intestinal BMP-9 locally upregulates FGF19 and is down-regulated in obese patients with diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2023:111934.
113. Lee J, Liu J, Feng X, et al. Withaferin A is a leptin sensitizer with strong antidiabetic properties in mice. *Nat Med.* 2016;22(9):1023-1032.
114. Holt JA, Luo G, Billin AN, et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* 2003;17(13):1581-1591.
115. Schneider KM, Candels LS, Hov JR, et al. Gut microbiota depletion exacerbates cholestatic liver injury via loss of FXR signalling. *Nat Metab.* 2021;3(9):1228-1241.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2 Mikroskopischer Aufbau der Leber.....	10
Abb. 2 Struktur von BMP-9 nach Brown et al.....	15
Abb. 7 Signalweg von BMP-9.....	17
Abb. 8 BMP-9 in T2D Patienten sowie Einfluss von BMP-9 Überexpression und HFD in Mäusen.....	18
Abb. 5 Physiologische Effekte von FGF21 nach Babaknejad et al.....	23
Abb. 6 Erkenntnisse von Kim et al. schematisch zusammengefasst.....	23
Abb. 7 Unterschiedliche Effekte von FGF15/19 in verschiedenen Organen nach Babaknejad et al.....	25
Abb. 8. Vergleich der BMP-9 Expression verschiedener Zellarten der humanen Leber.....	53
Abb. 9: BMP-9 Expression in hHSC nach Stimulation mit Fettsäuren.....	54
Abb. 10 Keine Zellaktivierung von hHSC /LSEC nach Stimulation mit Fettsäuren...	56
Abb. 11 FGF21-Expression in hHSC nach Stimulation mit Fettsäuren.....	57
Abb. 12 Expression von FGF21 in Hepatozyten.....	58
Abb. 13 FGF19 Expression in Hepatozyten.....	59
Abb. 14 FGFR4/ $\beta$ -klotho Rezeptorstatus in Hepatozyten.....	60
Abb. 15 FGF19 in Darmorganoiden.....	62
Abb. 16 FGFR4 in Darmorganoiden.....	63
Abb. 17 Alk- Rezeptorstatus in Hepatozyten und im Darm.....	64
Abb. 18: LGR5 in Darmorganoiden.....	66
Abb. 19 Schematische Darstellung des Perfusionssystems.....	67
Abb. 20 FGF19-Expression in Darm- und Leberorganoiden.....	69
Abb. 21 Vergleich der Expression von FGF21 in Leber- und Darmorganoiden.....	70
Abb. 22 Vergleich der Expression der FGF-Liganden und deren Ko-Rezeptor in humanem Leber- und Darmgewebe.....	71
Abb. 23 LGR5 im Perfusionssystem.....	72
Abb. 25: Schematische Zusammenfassung der Regulation von BMP-9 und seinen Mediatoren sowie zugehöriger Rezeptoren.....	86

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Einteilung der Schweregrade der nicht-alkoholischen Fettleber.....	12
Tab. 2 Verbrauchsmaterial.....	29
Tab. 3 Gerätschaften.....	30
Tab. 4 Reagenzien.....	32
Tab.5 Übersicht der verschiedenen Zellkulturen.....	37
Tab.6 Übersicht der Inhaltsstoffe des Mediums WENRA.....	37
Tab.7 Konditionen der Versuche mit hHSC und Upcyte® LSEC.....	42
Tab.8 Konditionen der Versuche mit Upcyte® Hepatozyten und Darmorganoiden...	42
Tab.9 Konditionen der Versuche mit Darm- und Leberorganoiden im PFS.....	44
Tab. 10 Primer.....	49



# 9 Lebenslauf

## Stephan Drexler

24.09.1993

Maria Theresia Alle 71d

5264 Aachen

T +49 163 6262946 E sdrexler@ukaachen.de

### Berufserfahrung

Seit 20.09.2021	<b>Assistenzarzt III. Medizinische Klinik für Gastroenterologie</b> Uniklinikum RWTH Aachen
07.12.2020 – 28.02.2021	<b>PJ Quartal Abteilung für Psychosomatik</b> Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Mannheim
21.09.2020 – 06.12.2020	<b>PJ Quartal Abteilung für Chirurgie</b> Kantonspital Frauenfeld, Schweiz
06.07.2020 – 20.09.2020	<b>PJ Quartal Klinik für Gastroenterologie</b> Universitätsklinikum Mannheim
20.04.2020 – 05.07.2020	<b>PJ Quartal Gastroenterologische Ambulanz</b> Universitätsklinikum Mannheim
15.08.2019 – 01.09.2019	<b>Famulatur Abteilung für Gastroenterologie</b> Uniklinik RWTH Aachen
25.02.2019 – 10.03.2019	<b>Famulatur Abteilung für Gastroenterologie</b> Universitätsklinikum Mannheim
03.09.2018 – 12.10.2018	<b>Famulatur Abteilung für Hämatonkologie</b> Universitätsklinikum Mannheim
04.09.2017 – 03.10.2017	<b>Famulatur Abteilung für Anästhesie und Intensivbehandlung</b> Klinikum Mittelbaden, Balg
13.02.2017 – 04.03.2017	<b>Famulatur Abteilung für Allgemeinmedizin</b> Fischer, Praxis für Allgemein- und Palliativmedizin
07/2014 – 08/2014	<b>Krankenpflegepraktikum</b> Klinikum Mittelbaden Bühl
01/2013 – 03/2013	<b>Krankenpflegepraktikum</b> Klinikum Mittelbaden Balg
12/2012	<b>Freiwilliges Praktikum psychiatrische Klinik Gunzenbachhof</b> Baden-Baden

## Ausbildung

10/2016 – 06/2021	<b>Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg</b> Gesamtnote: Sehr gut
05/2018 – 05/2019	<b>Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg</b> Promotionsstipendium
09/2014 – 08/2016	<b>Semmelweis Universität, Budapest</b> Gesamtnote: Sehr gut
10/2013 – 05/2014	<b>McDaniels College, Budapest</b> Vorbereitungsjahr
09/2003 – 07/2012	<b>Gymnasium Hohenbaden, Baden-Baden</b> Allgemeine Hochschulreife

## Sprachen

Deutsch (Muttersprache), Englisch

## Kompetenzen

Soziale Kompetenzen	Cafe Beeg, Baden-Baden Tätigkeit als Servicekraft
Künstl. Kompetenzen	2002 - 2010: Musikschule Baden-Baden (Klavier)
Sport	Laufen, Mountainbike, Karate, Jeet Kune Tao

# 10 Danksagung

Am Schluss bleibt mir noch den vielen Personen zu danken, die mich während dieser Arbeit und den ersten Schritten meiner wissenschaftlichen Laufbahn unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter PD Dr. rer. Nat. Katja Breitkopf-Heinlein danken, die mir die Arbeit vermittelt hat und der ich die Grundausbildung im wissenschaftlichen Arbeiten und Denken verdanke. Der intellektuelle Austausch, das gemeinsame Aus- und Bewerten der Ergebnisse, sowie die Weiterentwicklung der Hypothesen hat mir große Freude bereitet.

Ebenfalls danken möchte ich Dr. rer. Nat. Haristi Gaitantzi und Dr. Chen Cai für die großartige Unterstützung im Labor und Unterweisung der praktischen Methoden.

Neben vielen anderen möchte ich – last but not least – meinen Eltern danken. Dafür, dass sie immer unterstützend an meiner Seite standen und mich bestärkt haben auch in Phasen von Rückschlägen und Frustration den Kopf hochzuhalten und mit der wissenschaftlichen Arbeit fortzufahren.