

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

**Der Einfluss des Mineralokortikoidrezeptors
auf die Aktivierung hepatischer Sternzellen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Katharina Friedrichs
geboren in Offenburg

2019

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. T. Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. M. Dollinger
2. Berichterstatter:	PD Dr. T. Gräter
Tag der Promotion:	12.12.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1. Leberzirrhose.....	1
1.1.1. Definition und Ätiologie.....	1
1.1.2. Die Rolle der hepatischen Sternzellen in der Pathogenese der Leberfibrose.....	1
1.2. Der Mineralokortikoidrezeptor	4
1.2.1. Genomische Wirkungen.....	4
1.2.2. Nicht-genomische Wirkungen.....	5
1.3. Aldosteron und Fibrose.....	7
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	10
2.1. Material.....	10
2.2. Methoden	13
2.2.1. Zelllinien und Zellkultur	13
2.2.2. Proteinanalyse mittels Western Blot.....	15
2.2.3. Versuchsablauf.....	18
2.2.4. Statistik	21
3. Ergebnisse.....	22
3.1. MR-Expression in verschiedenen Zelltypen.....	22
3.2. Aktivierung des nicht-genomischen Signalwegs durch Aldosteron	23
3.3. Aktivierung der hepatischen Sternzellen	26
3.3.1. Einfluss auf Proliferation: Wachstumskurve.....	26
3.3.2. Expression profibrotischer Proteine	27
4. Diskussion.....	28
4.1. MR-Expression in verschiedenen Zelltypen.....	28
4.2. Aktivierung des nicht-genomischen Signalwegs durch Aldosteron	29
4.3. Aktivierung der hepatischen Sternzellen	30

4.4.	Klinische Bedeutung.....	33
5.	Zusammenfassung.....	34
6.	Literaturverzeichnis	36
7.	Danksagung.....	42
8.	Lebenslauf.....	43

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-I-Converting-Enzyme
Aldo	Aldosteron
APS	Ammoniumpersulfat
aSMA	Alpha smooth muscle actin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ENaC	Epithelial Natrium channel
EPHESUS	Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetal calf serum
HBs-Ag	Hepatitis B virus surface antigen
HEK	Human embryonic kidney
HSZ	Hepatische Sternzellen
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
IKZ	Inkubationszeit
IL	Interleukin
MMP	Matrixmetalloproteinase
MR	Mineralokortikoidrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
OH	Ethanol
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RALES	Randomized Aldactone Evaluation Study
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SL	Stammlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF- β	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WTK	Wachstumskurve

1. Einleitung

1.1. Leberzirrhose

1.1.1. Definition und Ätiologie

Die Leberzirrhose ist das Endstadium verschiedenster Lebererkrankungen [38]. Aufgrund einer anhaltenden Schädigung wird das ursprüngliche Lebergewebe durch fibrotisches Narbengewebe ersetzt. Die normale Leberarchitektur wird dadurch zerstört, es kommt zur Ausbildung von bindegewebigen Septen und Regeneratknoten [2, 63].

Die weltweit häufigsten Ursachen der Leberzirrhose sind noch chronischer Alkoholabusus und Virushepatitiden wie Hepatitis B und C [17, 52].

Insbesondere in der westlichen Welt gewann aber in den letzten Jahren die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease) immer mehr an Bedeutung [64]. Die Prävalenz liegt heutzutage in Industrieländern zwischen 20-30 %. Dies ist zu erklären durch die zunehmende Anzahl an Patienten mit Adipositas, Diabetes mellitus und metabolischem Syndrom – den Hauptrisikofaktoren für NAFLD [1, 61].

Andere Gründe für eine chronische Leberschädigung sind Autoimmunerkrankungen (z.B. Autoimmune Hepatitis, primär biliäre Zirrhose oder primär sklerosierende Cholangitis), Stoffwechselerkrankungen (z.B. Hämochromatose, Morbus Wilson), andere Infektionen (z.B. Schistosomiasis), vaskuläre Erkrankungen (z.B. Budd-Chiari-Syndrom) oder Medikamente [17, 65].

1.1.2. Die Rolle der hepatischen Sternzellen in der Pathogenese der Leberfibrose

Ein Schlüsselereignis in der Entstehung der hepatischen Fibrose ist die Aktivierung hepatischer Sternzellen (HSZ) [19]. Diese Zellen finden sich im Disse-Raum der Lebersinusoide. Ihre Hauptaufgabe in der gesunden Leber ist die Speicherung von Vitamin A, zudem sind sie am Umsatz der Extrazellulärmatrix (EZM) beteiligt [36, 44]. Ihre Aktivierung wird insbesondere über andere Leberparenchymzellen gesteuert: So kommt es infolge einer chronischen Leberschädigung zum Untergang von Hepatozyten. Ihre Apoptose sowie die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies stellen einen starken Stimulus für die Sternzellen dar [13, 14, 49]. Des Weiteren führt

die Leberschädigung zur Aktivierung von Kupffer-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen. Beide stimulieren die HSZ parakrin über die Freisetzung verschiedener Zytokine wie beispielsweise Transformin growth factor β (TGF- β) und Platelet derived growth factor (PDGF) [7, 19]. Diese erste Phase der Sternzellaktivierung, unter anderem durch die Stimulation der Nachbarzellen, nennt man Initiationsstadium oder auch präinflammatorisches Stadium [20, 37, 43].

Darauf folgt die Aufrechterhaltung der Aktivierung. Diese Phase ist gekennzeichnet durch die diversen Veränderungen im Phänotyp der Sternzellen. Sie verlieren ihre Vitamin A-Speicher, entwickeln die Fähigkeit zur Chemotaxis sowie zur Kontraktion [19, 20, 37]. Angeregt durch PDGF kommt es zur gesteigerten Proliferation [43, 51].

Über TGF- β wird die verstärkte Synthese von Kollagenen stimuliert, wodurch es zur Fibrogenese kommt. Hierbei wird TGF- β nicht nur von den Nachbarzellen, sondern auch von den Sternzellen selbst vermehrt gebildet, wirkt also para- als auch autokrin [40, 43].

Des Weiteren setzen die HSZ nun zunehmend die sie umgebende Extrazellulärmatrix um. Sogenannte Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche Bestandteile der EZM abbauen, sind maßgeblich daran beteiligt, ebenso wie deren Gegenspieler die Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Diese Enzyme werden von den HSZ in aktiviertem Zustand vermehrt gebildet [3, 5, 41]. Die erhöhte Konzentration von MMPs führt insbesondere im Anfangsstadium der Fibrose zu einem verstärkten Abbau gesunder EZM, was deren Ersatz durch Narbengewebe begünstigt. Die TIMPs verhindern wiederum in späteren Stadien den Abbau der überschießenden Fibrose [17, 20, 37].

Die Aktivierung der Sternzellen führt also zu ihrer Umwandlung in einen profibrotischen Phänotyp, was mit verschiedenen Veränderungen in ihrem Verhalten einhergeht und im Gesamten einen der wichtigsten Bausteine in der Entwicklung der Leberfibrose darstellt [19, 43].

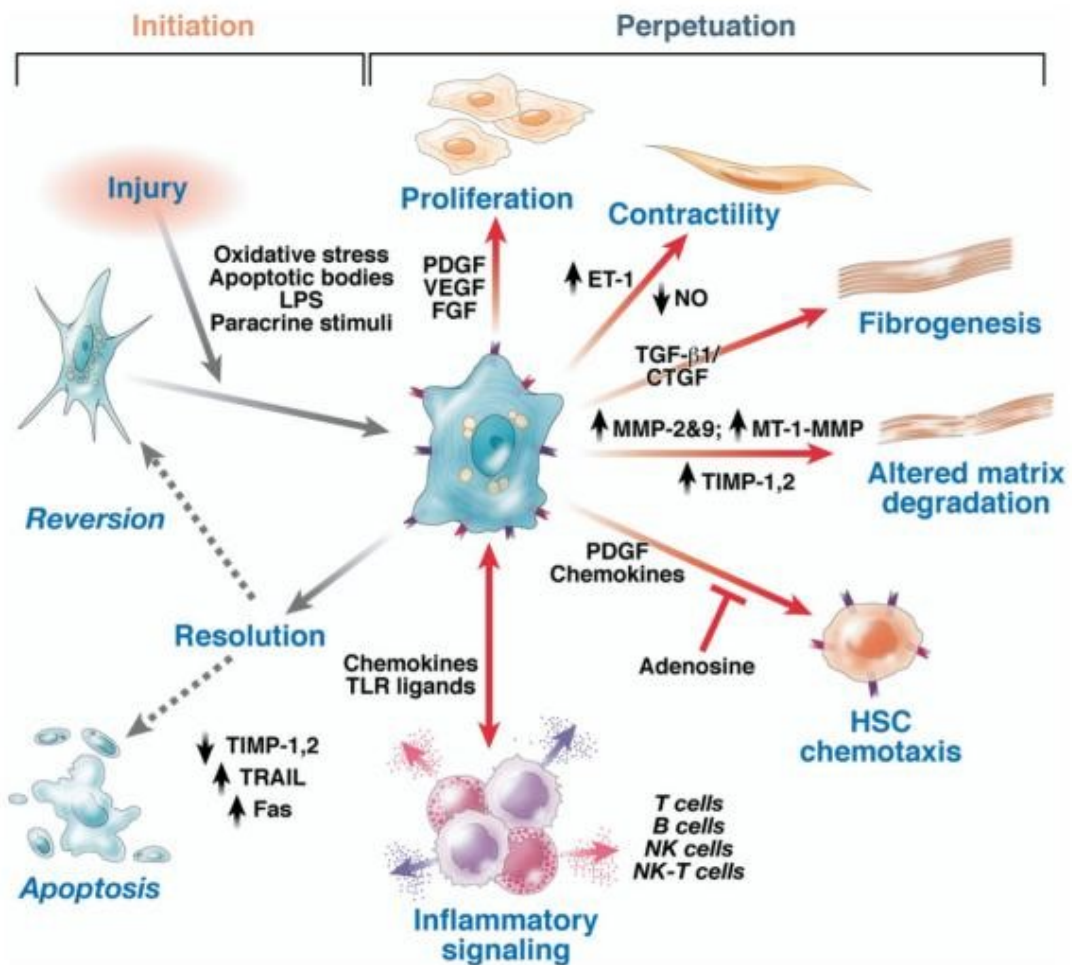


Abb. 1 Die Aktivierung hepatischer Sternzellen In der Phase der Initiation kommt es zur Aktivierung der hepatischen Sternzellen (HSC) durch äußere Einflüsse wie z.B. oxidativen Stress oder durch parakrine Stimulation von benachbarten Zellen. In der Phase der Aufrechterhaltung der Aktivierung (Perpetuation) kommt es zu verschiedenen Veränderungen im Phänotyp der Zellen: gesteigerte Proliferation, Kontraktilität, Fibrogenese, gesteigerter Umbau der Extrazellulärmatrix und Chemotaxis.

Aus Gastroenterology Vol. 134, Scott L. Friedmann, Mechanisms of hepatic fibrogenesis, Seite 25, Copyright 2018, mit Erlaubnis von Elsevier.

1.2. Der Mineralokortikoidrezeptor

Gemeinsam mit dem Glukokortikoidrezeptor, dem Östrogen- sowie dem Progesteronrezeptor gehört der Mineralokortikoidrezeptor (MR) zu den Steroidrezeptoren [22]. Er kommt hauptsächlich in epithelialen Zellen von Darm und Niere vor [50].

Sein wichtigster Ligand ist das Steroidhormon Aldosteron. Es wird gebildet in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde, seine Hauptaufgabe ist die Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushaltes und damit einhergehend die Regulation des Blutdrucks [24].

Die Synthese von Aldosteron wird über das so genannte Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) gesteuert. Kommt es zu einem Volumenmangel führt dies in den Glomerula der Niere zur Freisetzung von Renin, welches in der Leber synthetisiertes Angiotensinogen spaltet, wodurch Angiotensin I entsteht. Dieses wird nun wiederum durch das Angiotensin-I-Converting-Enzym (ACE) zu Angiotensin II umgewandelt, das schließlich die Synthese von Aldosteron stimuliert [4].

1.2.1. Genomische Wirkungen

In ruhendem Zustand findet sich der MR gebunden an Hitzeschockproteine im Zytosol der Zelle. Durch Bindung seines Liganden löst er sich aus diesem Komplex und lagert sich zu Dimeren zusammen. In dieser dimerisierten Form wird er dann in den Zellkern transportiert, wo er durch Andocken an Promotorregionen die Transkription bestimmter Gene aktiviert. Der MR fungiert also als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor [4, 28, 32], in den distalen Tubuli und Sammelrohren der Niere stimuliert er so Synthese und Einbau von epithelialen Natriumkanälen (ENaCs = epithelial Natrium channel) und -transportern. Die dadurch gesteigerte Rückresorption von Natrium bewirkt eine Zunahme des Extrazellulärvolumens – der Blutdruck steigt [30]. Da im Austausch für die Natriumaufnahme Kalium ausgeschieden wird, spielt der MR gleichzeitig eine wichtige Rolle in der Regulation des Elektrolythaushaltes [4].

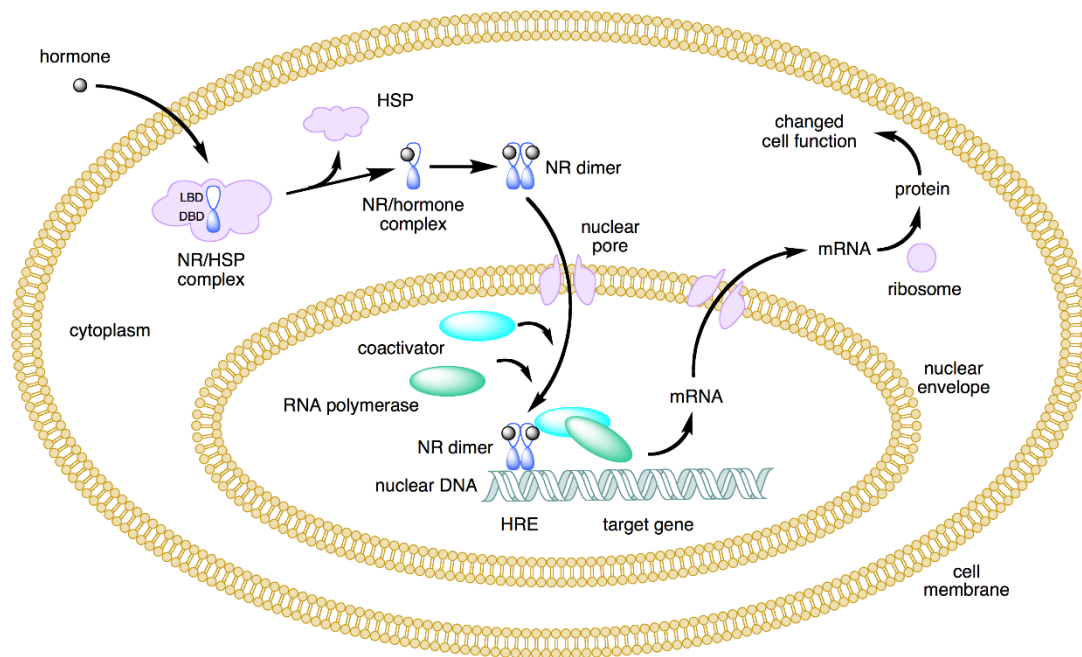


Abb. 2 Der genomische Signalweg des Mineralokortikoidrezeptors Durch Bindung seines Liganden löst sich der Mineralokortikoidrezeptor (NR) vom zuvor gebundenen Hitzeschockprotein (HSP), dimerisiert und dockt im Zellkern an Promotorregionen (hormone response element HRE) der Zielgene (target gene) an.

Von Boghog2 (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nuclear_receptor_action.png), „Nuclear receptor action“, als gemeinfrei gekennzeichnet, Details auf Wikimedia Commons: <https://commons.wikimedia.org/wiki/Template:PD-user>

1.2.2. Nicht-genomische Wirkungen

Bereits vor über 50 Jahren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des MR durch Aldosteron zu Veränderungen führte, die zu schnell abliefen um über den genomischen Signalweg vermittelt worden zu sein. Die Translokation des dimerisierten MR in den Nukleus, die Aktivierung von Genen und Synthese von Proteinen dauert Stunden. Ganong und Mulrow beschrieben aber schon 1958 eine Veränderung in der Elektrolytausscheidung von Hunden nach Injektion von Aldosteron, die bereits nach wenigen Minuten zu beobachten war [25].

1984 untersuchten Moura und Worcel die Auswirkung von Aldosteron auf den Natriumtransport in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten. Sie konnten zwei verschiedene Wirkungsweisen des Aldosterons zeigen. Zum einen kam es zu einem späten Effekt, der genomisch vermittelt war, zum anderen konnte bereits nach wenigen Minuten ein Anstieg des Natriumausstroms verzeichnet werden. Dieser frühe Effekt konnte nicht durch Actinomycin D gehemmt werden und musste folglich über einen nicht-genomischen Signalweg ablaufen [47].

Dieser Weg war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung und nach und nach konnten mehr Details ans Licht gebracht werden:

Wie auch bei anderen Steroidhormonen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des nicht-genomischen Signalwegs durch Aldosteron mit der Phosphorylierung und damit Aktivierung der Mitogen-aktivierten Kinase ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) einhergeht [15, 16, 26]. Ebenso kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosinkinase Src [10, 31]. Immer noch nicht abschließend geklärt ist, wie genau der MR diese Signalkaskade anstößt. In einigen Versuchen konnte durch Blockieren des MR mit Aldosteron-Antagonisten die Aktivierung des nicht-genomischen Signalwegs nicht verhindert werden. Ebenso gab es auch Untersuchungen in denen eine Aktivierung des schnellen Signalwegs ganz in Abwesenheit des MR beschrieben wurde, sodass die Existenz eines anderen, eventuell membranständigen, Rezeptors postuliert wurde [29, 35]. In anderen Studien wiederum gelang eine Aktivierung von ERK und Src ausschließlich nach Transfektion der Zellen mit dem MR. Dieser Effekt konnte durch Spironolacton inhibiert werden, was die Abhängigkeit vom Rezeptor verdeutlicht [31].

Inzwischen wurde zudem gezeigt, dass es durch Stimulation mit Aldosteron, durch den MR, zu einer Transaktivierung des Epidermal growth factor Rezeptors (EGFR) kommt, wahrscheinlich vermittelt über Src [31, 32, 34, 60].

Neueste Studien beschreiben außerdem, dass der nicht-genomische Signalweg gleichzeitig auch mit dem klassischen genomischen Weg interagiert [33]. Wie dieses komplexe Zusammenspiel genau funktioniert bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen.

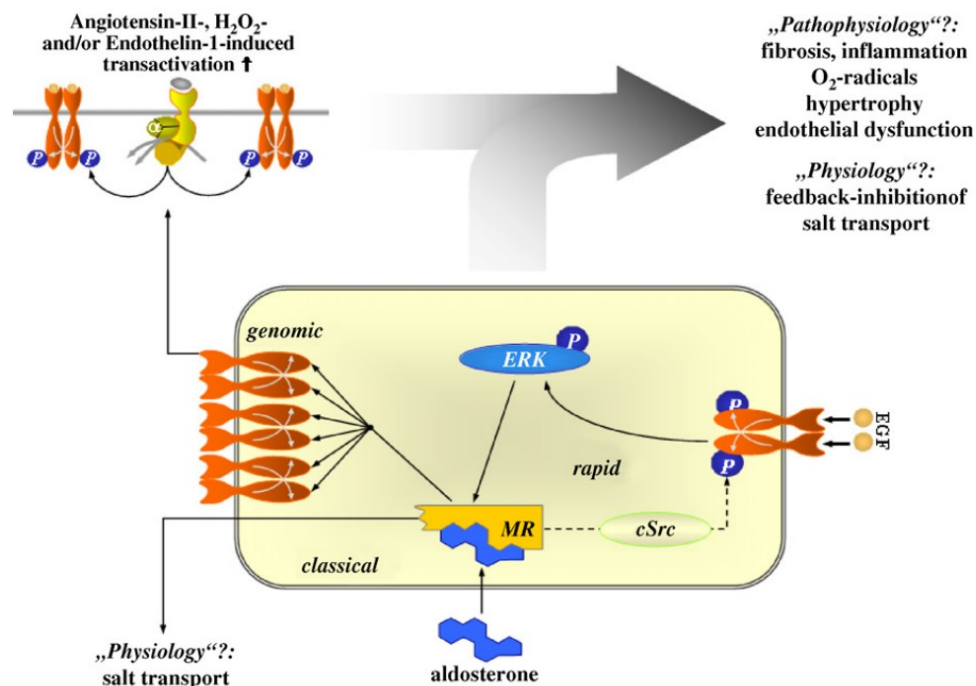


Abb. 3 Der nicht genomische Signalweg des Mineralokortikoidrezeptors Durch Bindung von Aldosteron kommt es abgesehen vom klassischen genomischen Signalweg auch zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der Mitogen-aktivierten Kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase). Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch eine Co-Aktivierung des Epidermal growth factor Rezeptors (EGFR) über die Tyrosinkinase Src vermittelt. Aus *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 277, Claudia Grossmann und Michael Gekle, *Non-classical actions of the mineralocorticoid receptor: Misuse of EGF receptors?*, Seite 10, Copyright 2018 mit Genehmigung von Elsevier

1.3. Aldosteron und Fibrose

Neben der klassischen Wirkung von Aldosteron auf Wasser- und Elektrolythaushalt existieren auch noch andere „nicht-klassische“ Wirkungen des Hormons, welche in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt sind.

Großen Anteil daran tragen zwei berühmte klinische Studien aus den Jahren 1999 und 2003: Die Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) und die Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS). Pitt et al. zeigten, dass durch den Einsatz von Spironolacton bzw. Eplerenon, beides Aldosteron-Antagonisten, das Überleben von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz bzw. nach akutem Myokardinfarkt signifikant verlängert werden konnte. Die erhebliche Reduktion von Morbidität und Mortalität war unabhängig von der blutdrucksenkenden Wirkung der beiden Medikamente. Vielmehr waren die Ergebnisse dadurch zu erklären, dass die Aldosteron-Antagonisten das kardiale Remodelling, also kardiale Fibrose, verhindern konnten

[53, 54, 62]. Auch verschiedene experimentelle Studien konnten zeigen, dass Aldosteron im Herz zu Fibrose führt und dass dieser Effekt durch Aldosteron-Antagonisten inhibiert werden konnte [11, 12, 27].

Ähnlich wie am Herz konnte auch in der Niere die profibrotische Wirkung von Aldosteron nachgewiesen werden, ebenso wie deren Hemmung durch Aldosteron-Antagonisten [8, 57, 58]. Untersuchungen an Ratten ergaben eine verstärkte Kollagensynthese in renalen Fibroblasten ausgelöst durch Aldosteron. Gleichzeitig wurde beschrieben, dass diese Stimulation durch die Aktivierung von ERK1/2, also den nicht-genomischen Signalweg des MR, vermittelt wird [48].

Dass Aldosteron ebenso in der Leber an der Entstehung von Fibrose beteiligt ist, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. So konnten beispielsweise Rombouts et al. zeigen, dass Aldosteron in primären hepatischen Sternzellen Prokollagen erhöht [59]. Ebenso konnten Queisser et al. durch Aldosteron-Infusionen in Ratten Leberfibrose induzieren, der Effekt war unabhängig vom Blutdruck der Tiere [56].

Die Aldosteron-Antagonisten Spironolacton und Eplerenon konnten in der Leber von Ratten die Aktivierung von Sternzellen reduzieren und so, ebenso wie am Herz, Fibrose verhindern [21, 45, 46]. Aldosteron könnte also ein wichtiger Faktor in der Entwicklung der Leberzirrhose zu sein.

Gleichzeitig bedingt die Leberzirrhose ihrerseits wiederum erhöhte Aldosteronspiegel. Dies hat mehrere Gründe:

Zum einen wird Aldosteron hauptsächlich in der Leber abgebaut. Je weiter die Leberzirrhose fortschreitet, desto mehr Hepatozyten werden zerstört und desto weniger kann die Leber ihrer normalen Stoffwechselfunktion nachkommen. Dies betrifft dann natürlich auch den Aldosteronstoffwechsel. Das Hormon wird weniger abgebaut, folglich steigt die Konzentration im Blut [6, 18]. Die Aldosteron-Clearance ist zudem direkt abhängig vom Blutfluss in der Leber, welcher aufgrund des steigenden Widerstands in den Gefäßen jedoch vermindert ist [9].

Zum anderen hat man in Patienten mit Leberzirrhose auch eine erhöhte Aldosteronsekretion beobachtet. Dies ist dadurch zu erklären, dass es, u.a. aufgrund der zirrrosebedingten portalen Hypertension, zu einer Umverteilung des Blutvolumens, insbesondere in die erweiterten Gefäße des Splanchnikusgebietes, kommt. Das verminderte effektive Blutvolumen führt zu einem verringerten Fluss in den Nierenarterien, wodurch wiederum, im Sinne einer neurohumoralen

Gegenregulation, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert und schlussendlich die Aldosteronproduktion stimuliert wird [9, 42].

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Spätestens seit den klinischen Studien RALES und EPHESUS sind die nicht-genomischen Effekte des MR von großem wissenschaftlichem Interesse. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Aldosteron nicht nur am Herz, sondern auch in der Niere zu fibrotischen Veränderungen führt. Einzelne Untersuchungen zeigen ebenso einen Einfluss von Aldosteron auf die Entwicklung hepatischer Fibrose. Dies ist insbesondere auch deshalb interessant, weil es im Rahmen einer Leberzirrhose zu erhöhten Aldosteronspiegeln kommt.

Die Rolle des MR in der Entwicklung einer Leberzirrhose ist dennoch weitgehend unerforscht. Da die Leberzirrhose weltweit eine hohe Prävalenz hat und ihre Therapiemöglichkeiten doch begrenzt sind, ist ein besseres Verständnis der beeinflussenden Faktoren unbedingt nötig.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss des MR auf verschiedene Leberzellen genauer zu beschreiben.

Dabei sollte in einem ersten Schritt gezeigt werden, welche Zellen überhaupt den MR exprimieren und weiterhin ob durch Aldosteron in diesen Zellen der nicht-genomische Signalweg des MR aktiviert werden kann.

Da hepatische Sternzellen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Leberfibrose spielen, sollte der Einfluss von Aldosteron insbesondere auf diesen Zelltyp analysiert werden. Hierbei sollte untersucht werden, ob sich die Zellen durch Stimulation mit dem Steroidhormon in einen profibrotischen Phänotyp verwandeln.

Würde sich bestätigen, dass Aldosteron auch in der Leber Fibrogenese fördert und würden die Mechanismen dahinter besser verstanden werden, ergäben sich Möglichkeiten für neue Therapieansätze. Insbesondere der Einsatz von Aldosteron-Antagonisten könnte, ebenso wie in der Behandlung herzkranker Patienten, einen völlig neuen Stellenwert erhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Chemikalien und Lösungen

Acrylamid 30% Stammlösung	Rotiphorese Gel 30, Roth
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma
Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)	Bio-Rad
ECL Western Blotting detection reagents and analysis system	Amersham, GE Healthcare
Ethanol	VWR chemicals
Milchpulver, blotting grade, fettarm	Roth
Phosphataseinhibitor PhosSTOP	Roche
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad
Proteaseinhibitor complete, Mini, EDTA-free	Roche
SDS-Sample-Buffer (6x)	Boston BioProducts
SDS, ultra pure	Roth
Stripping Buffer, Restore Western Blot	Thermo Scientific
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma
Tris Molecular biology grade	AppliChem
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma-Aldrich

Puffer

Blocklösung	Milchpulver
	PBS 10x
	Tween

Laufpuffer	PBS 1x
------------	--------

Lysepuffer (NP40-Puffer)	Aqua bidest.
	150mM NaCl
	1% NP40 (IGEPAL)
	50mM Tris (pH 8,0)
	Protease-/Phosphatase-Inhibitoren

Waschpuffer	1x PBS
	0,05% Tween 20

Hormone

Aldosteron	A9477, Sigma-Aldrich
EGF (human, rekombinant)	E9644, Sigma-Aldrich

Sets und Kits

iBlot Western Detection Kit	novex by Life Technologies
Gel Transfer Stacks Nitrocellulose regular	

Zellkultur

DMEM (1x) Dulbecco's Modified Eagle Medium	gibco by Life Technologies
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	gibco by life technologies
FCS	gibco by Life Technologies
Penicillin/Streptomycin	gibco by Life Technologies
RPMI-Medium 1640 (1x)	gibco by Life Technologies
Trypsin	gibco by Life Technologies
Kulturplatten (Cell Culture Dishes, 100x20mm)	Cellstar, Greiner Bio-One
Multiwellplatte, 12 Wells	Greiner Bio-One
Kulturflaschen (Cell Culture Flasks, 250ml)	Cellstar, Greiner Bio-One

Primär-Antikörper

β-Aktin	(1:5000)	A1978, Sigma-Aldrich
aSMA	(1:1000)	ab5694, abcam
Collagen	(1:1000)	ab34710, abcam
ERK 1/2	(1:5000)	4695, Cell Signaling Technology
pERK 1/2	(1:1000)	4377, Cell Signaling Technology
IL-6	(1:1000)	12153, Cell Signaling Technology
MMP-2	(1:1000)	4022, Cell Signaling Technology
NR3C2	(1:1000)	AV45599, Sigma-Aldrich
src	(1:1000)	2102, Cell Signaling Technology
p-src	(1:1000)	6943, Cell Signaling Technology

TGF- β	(1:1000)	3711, Cell Signaling Technology
TIMP1	(1:1000)	8946, Cell Signaling Technology
<u>Sekundär-Antikörper</u>		
Anti-Mouse IgG	(1:5000)	NA931V, Amersham, GE Healthcare
Anti-Rabbit IgG	(1:5000)	NA934V, Amersham, GE Healthcare

Geräte und sonstige Labormaterialien

Brutschrank	Thermo Scientific, HERA cell 240
iBlot Gel Transfer Device	invitrogen, ThermoFisher Scientific
Chemilumineszenz-Film	Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare
Elektrophorese Power Supply	Bio-Rad
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik, Blockthermostat BT 100
Einmal-Küvetten	1,5 ml halbmikro, PMMA
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Photometer	Eppendorf, BioPhotometer
Pipetten	verschiedene Größen, Eppendorf
Pipettenspitzen	verschiedene Größen, Eppendorf
Reagenzgefäß	verschiedene Größen, Falcon, CorningIncorporated
Roll-Mixer	Stuart, roller mixer SRT6D
Schüttel-Mixer	Rocking Platform, VWR
Stripetten	verschiedene Größen, costar, CorningIncorporated
Vortex	Scientific Industries, Vortex Genie 2
Zählkammer	Neubauer improved brigh-line, Marienfeld
Zentrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5417R

2.2. Methoden

2.2.1. Zelllinien und Zellkultur

Für die Experimente standen fünf verschiedene Zelllinien zur Verfügung:

hTERT-HSZ

Die Zellen dieser Linie stammen aus einem zertifizierten Labor der Universitätsklinik Regensburg (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hellerbrand), welches die Zelllinie selbst generiert. Zur Immortalisierung wurden primäre Sternzellen aus humanem Lebergewebe mit einem Retrovirus, der eine humane Telomerase-Reverse-Transkriptase (hTERT) exprimiert, infiziert. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer und relativ langsam, als Verdoppelungszeit werden 4 Tage angegeben.

Hep3B

Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus einer Lebertumorbiopsie eines achtjährigen Jungen mit hepatozellulärem Karzinom etabliert. Auch diese Zellen sind eine Leihgabe des Labors in Regensburg, welches die Zellen bei ATCC einkauft (ATCC HB-8064). Die Zellen enthalten Fragmente des Hepatitis-B-Virus-Genoms und exprimieren das HBs-Ag (hepatitis B virus surface antigen), allerdings werden keine aktiven Viruspartikel produziert. Die Zellen werden daher von der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) der Risikogruppe 1 zugeordnet. Morphologisch handelt es sich um epitheliale Zellen, die adhärent als Monolayer wachsen. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 40-50 Stunden.

HepG2

Eine Leberkarzinomzelllinie, die aus Lebergewebe eines fünfzehnjährigen Jungen mit gut differenziertem hepatozellulärem Karzinom generiert wurde. Die Zellen stammten aus einem Labor der Gastroenterologie der Universitätsklinik Ulm (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oswald) und wurden dort ebenfalls bei ATCC bestellt (ATCC HB-8065). Auch sie stellen sich morphologisch epithelial dar, wachsen adhärent als Monolayer und in kleinen Zusammenschlüssen, die Verdopplungszeit beträgt etwa 50-60 Stunden. Das HBs-Ag wird nicht exprimiert.

HEK 293

HEK steht für „Human Embryonic Kidney“, es handelt sich um eine humane Nierentubuluszelllinie. Sie wurde etabliert durch die Transfektion der Zellen mit DNA des Typ 5 Adenovirus. Es werden aber keine aktiven Viruspartikel produziert. Die epithelialen Zellen wachsen adhärent als Monolayer. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 24-30 Stunden. Auch diese Zellen erhielten wir aus einem Labor der Gastroenterologie an der Universitätsklinik Ulm (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Oswald).

Laut Literaturangaben exprimieren diese Zellen den Mineralokortikoidrezeptor nicht, weswegen sie hier als Negativkontrolle verwendet wurden.

HK-2

Wir erhielten die Zellen aus einem Labor der Nephrologie an der Universitätsklinik Ulm (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Keller). Es handelt sich um Zellen des proximalen Tubulus einer humanen adulten Niere. Die Linie wurde etabliert durch die Transduktion mit Genen des Humanen Papillomavirus (HPV 16). Auch sie wachsen adhärent als Monolayer, die Verdoppelungszeit beträgt 72-96 Stunden. Da diese Zellen den Mineralokortikoidrezeptor exprimieren, wurden sie als Positivkontrolle verwendet.

Alle Zellen wurden auf 10 cm Petrischalen in je 10ml Medium in einem Hera Cell 240 Brutschrank von Thermo Scientific bei 37°C gehalten.

Bis auf Hep G2, die RPMI Medium benötigten, wurden alle Zellen in DMEM kultiviert. Zugesezt wurde außerdem 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) um Infektionen vorzubeugen.

Etwa zweimal wöchentlich wurden die Platten zum Kulturerhalt gesplittet. Hierbei erfolgte nach einmaligem Waschen mit DPBS das enzymatische Ablösen der Zellen durch Inkubation mit Trypsin. Nach wenigen Minuten wurde dieses durch die Zugabe von serumhaltigem Medium inaktiviert und die Zellen konnten wie gewünscht verdünnt und ausplattiert werden.

2.2.2. Proteinanalyse mittels Western Blot

2.2.2.1. Prinzip

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Hierbei werden diese auf eine Trägermembran übertragen, um anschließend, z.B. durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern, detektiert zu werden.

Vor dem eigentlichen Western Blot ist es jedoch nötig das Proteingemisch aufzutrennen, z.B. mittels SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Dazu werden die zuvor denaturierten Proteine mit SDS beladen und anschließend in einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld ihrer Molekülmasse nach getrennt.

2.2.2.2. Vorbereitung der Zellen

Für die Western Blot Analyse wurden die Zellen in der Schale auf Eis gestellt und zunächst mit DPBS gewaschen. Nur bei den Hep G2 und HEK 293 erfolgte kein Waschen, da diese Zellen sich dabei zu leicht von der Platte lösen und verloren gingen.

Mit einem Cell Scraper wurden die Zellen vom Boden der Platten gelöst und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt.

2.2.2.3. Herstellung der Zellysate

Nach 12-minütigem Zentrifugieren bei 2500rpm wurden die flüssigen Bestandteile abgesaugt und die Zellen in Lysepuffer, versetzt mit Protease- und Phosphataseinhibitor, resuspendiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis waren die Zellen lysiert. Um Zelltrümmer zu entfernen wurde erneut bei 13000rpm zentrifugiert und die als Überstand gewonnene Proteinlösung konnte für die Bradford-Analyse herangezogen werden.

2.2.2.4. Proteingehaltsbestimmung

Zur Proteingehaltsbestimmung diente der Bradford-Assay. Hierbei wurde je 1 µl der jeweiligen Proteinlösung in 1 ml des zuvor 1:5 in Wasser verdünnten Bradford-Reagenz gegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnte die Proteinkonzentration am Photometer gemessen werden.

Anhand dieser Werte wurden anschließend die Konzentrationen der Proteinlösungen einander angeglichen.

2.2.2.5. SDS-PAGE

Verwendet wurde die diskontinuierliche Methode nach Laemmli. Das verwendete Polyacrylamidgel besteht hierbei aus zwei Abschnitten: einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Diese unterscheiden sich hinsichtlich pH und Porengröße, was dazu führt, dass das Proteingemisch zunächst im Sammelgel konzentriert und dann erst weiter unten im feinporigeren Trenngel aufgetrennt wird.

Sammelgel	Acrylamid 30%
	APS 10%
	Aqua dest.
	SDS 10%
	TEMED
	Sammelgelpuffer (0,5M Tris/HCl pH 6,8)
Trenngel	Acrylamid 30%
	APS 10%
	Aqua dest.
	SDS 10%
	TEMED
	Trenngelpuffer (1,5M Tris/HCl pH 8,8)

Zuvor wurden die Proteine mit SDS-Sample-Buffer versetzt und bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in Laufpuffer bei 80V. Als Größenstandard diente Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad).

2.2.2.6. Proteintransfer

Der Transfer erfolgte innerhalb von 7 Minuten mithilfe des iBlot. Hierbei wurde das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen zwischen Bottom Stack, welches die Nitrozellulosemembran enthält und Wattman Papier platziert. Die oberste Schicht bildeten das Top Stack und ein Schwamm. Dann wurde alles fest im iBlot eingespannt und das Gerät gestartet. Durch das nun vertikal zum Gel verlaufende elektrische Feld wurden die Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Zum Schluss wurde die Membran eine Stunde in Blocklösung inkubiert, um sie auf die Antikörperreaktion vorzubereiten.

2.2.2.7. Antikörperreaktion und Detektion

Der Primärantikörper wurde nach Herstellerangaben in Blocklösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Anschließend wurden überschüssige Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt und die Membran mit ebenfalls in Blocklösung verdünntem Zweitantikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Waschen konnten die Proteinbanden mithilfe von ECL in der Dunkelkammer auf einem Film sichtbar gemacht werden.

Um auf derselben Membran noch weitere Proteine detektieren zu können, wurden die verwendeten Antikörper anschließend mit Stripping Buffer entfernt und es konnte, wie oben beschrieben, ein anderer Primärantikörper eingesetzt werden.

2.2.3. Versuchsablauf

2.2.3.1. Darstellung der MR-Expression in den verschiedenen Zelllinien

Für diesen Versuch sollten Zelllysate von allen Zelllinien gewonnen werden.

Da die verschiedenen Zelllinien allerdings nicht nur aus unterschiedlich großen Zellen bestanden, sondern auch unterschiedlich dicht wuchsen, wurden für den Versuch 3 Platten HSZ, je 2 Platten Hep3B und HK-2 und je 1 Platte Hep G2 und HEK 293 ausplattiert.

Auf denen im Western Blot entstandenen Membranen wurde dann zunächst der MR und anschließend, als Ladungskontrolle, Aktin detektiert.

2.2.3.2. Stimulation mit Aldosteron

Das Hormon lag als Pulver vor. Um für jedes Experiment Aldosteron frisch lösen zu können, wurden zunächst kleine Aliquots von einigen Mikrogramm abgewogen.

Eine solche kleine Portion wurde dann vor jedem Versuch gemäß der Formel

$$m \text{ [mg]} = M \text{ [mol/l]} * V \text{ [l]} * C \text{ [g/mol]}$$

in einer entsprechenden Menge Ethanol (OH) gelöst, wobei $M = 360,44 \text{ mol/l}$ ist und $C = 1 \text{ mM}$ sein sollte.

Die so erhaltene 1 mM Aldosteronlösung wurde in serumfreien DMEM weiter auf eine $10 \text{ }\mu\text{M}$ und eine 100 nM Stammlösung (SL) verdünnt.

Genauso wurde OH als Kontrolle 1:100 in DMEM verdünnt.

24 Stunden vor der Stimulation mit Aldosteron wurden die Zellen serumfrei gesetzt. Das bedeutet, das vorhandene Medium mit FCS und P/S wurde abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit DPBS gewaschen und neues Medium ohne Zusätze wurde hinzugefügt.

2.2.3.2.1. Stimulation des nicht-genomischen Signalwegs

Es wurden hierzu zwei Experimente durchgeführt. Im ersten wurden unterschiedliche Konzentrationen von Aldosteron verwendet. Es gab es für jede Zelllinie 7 Bedingungen, d.h. es wurden 7 Platten à 10ml Medium verwendet:

- | | | |
|--------------------------------|---------|-------------------------------------|
| 1) Keine Stimulation | | |
| 2) OH als Negativkontrolle | $\cong$ | 10 μ l von 10 μ M OH-Lösung |
| 3) Stimulation mit 0,1 nM Aldo | $\cong$ | 10 μ l von 100 nM Aldo-SL |
| 4) Stimulation mit 1 nM Aldo | $\cong$ | 1 μ l von 10 μ M Aldo-SL |
| 5) Stimulation mit 10 nM Aldo | $\cong$ | 10 μ l von 10 μ M Aldo-SL |
| 6) Stimulation mit 100 nM Aldo | $\cong$ | 100 μ l von 10 μ M Aldo-SL |
| 7) EGF als Positivkontrolle | $\cong$ | 2,5 μ l von 50 nM EGF-Lösung |

Die jeweiligen Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen in das serumfreie Medium hinzugegeben und dann vorsichtig mit einer 10 ml Pipette durchmischt.

Anschließend wurden die Platten zur Inkubation 10 Minuten in den Brutschrank gestellt.

Nach dem Western Blot sollten verschiedene aktivierte, d.h. phosphorylierte Proteine des nicht-genomischen Signalwegs nachgewiesen werden. Zum einen handelte es sich dabei um pERK mit ERK als Kontrolle und p-Src mit Src als Kontrolle. Als allgemeine Ladungskontrolle diente Aktin.

Im zweiten Experiment wurde statt der Aldosteronkonzentration die Inkubationszeit variiert. Es galten die folgenden 9 Bedingungen, wobei je 1 Platte HSZ pro Bedingung verwendet wurde.

- | | |
|---|---|
| 1) Keine Stimulation als Negativkontrolle | |
| 2) 1 min IKZ | } je 1 nM Aldo $\cong$ 1 μ l von 10 μ M Aldo-SL |
| 3) 2,5 min IKZ | |
| 4) 5 min IKZ | |
| 5) 10 min IKZ | |
| 6) 20 min IKZ | |
| 7) 30 min IKZ | |
| 8) 60 min IKZ | |
| 9) EGF als Positivkontrolle, 10 min IKZ | $\rightarrow$ 3 μ l von 50 nM EGF-Lösung |

Die durch den Western Blot entstandene Membran wurde zunächst mit dem Anti-pERK-Antikörper inkubiert, danach wurden zur Kontrolle auch ERK und Aktin detektiert.

2.2.3.2.2. Erstellen der Wachstumskurve

Hierzu wurden Sternzellen in drei 12-well-Platten ausgesät, wobei jedes Well 1,5 ml DMEM +FCS +P/S enthielt und in einer Platte nur 3 Wells belegt waren. 24 Stunden vor Beginn des Experiments wurden die Zellen serumfrei gesetzt.

Die Zellen der einen Platte wurden dann mit Aldosteron stimuliert. Das zuvor gelöste und verdünnte Aldosteron wurde hierbei einem Mastermix mit DMEM für alle 12 Wells zugegeben, wobei das Medium mit 1 % FCS versetzt war, um den Zellen die für das Wachstum nötigen Nährstoffe zu gewähren.

Mastermix: 390 µl von 100 nM Aldo-SL in 39 ml DMEM + 1 % FCS

Diese Lösung wurde dann vorsichtig mit einer 10 ml Pipette durchmischt und jedem Well wurden, nach Absaugen des alten Mediums, 1,5 ml davon hinzugegeben.

Ebenso wurde mit der anderen Platte verfahren, nur dass hier statt Aldosteron OH zur Kontrolle verwendet wurde.

Die Zellen in den 3 Wells der dritten Platte dienten als Ausgangspunkt t₀. Sie wurden direkt am Tag der Stimulation gezählt.

Der Zeitpunkt t₁ wurde auf 24h nach Stimulation angesetzt, t₂ nach 48h, t₃ nach 72h und t₄ nach 96h, wobei die verbliebenen Wells für t₃ und t₄ am zweiten Tag nach derselben Methode noch einmal stimuliert wurden. Dazwischen wurden die Platten im Brutschrank aufbewahrt.

Es wurden zu jedem Zeitpunkt je 3 Wells der Aldo-stimulierten und 3 Wells der OH-versetzten Zellen gezählt. Dazu wurde das Medium im Well abgesaugt und einmalig mit 2 ml DPBS gewaschen. Anschließend wurden pro Well 500 µl Trypsin zur Ablösung der Zellen hinzugegeben. Nach wenigen Minuten der Inkubation wurde diese Reaktion mit 1000 µl DMEM +FCS +P/S abgestoppt und die entstandenen 1,5 ml Zellsuspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt.

Die anschließende Zählung fand mithilfe einer Neubauer improved bright-line (Marienfeld) Zählkammer statt.

2.2.3.2.3. Nachweis profibrotischer Proteine

Hierzu wurden die Sternzellen unter 6 verschiedene Bedingungen auf 6 Platten ausgesät, wobei jede Platte 10 ml Medium enthielt und Zellen 24 h vor Versuchsbeginn serumfrei gesetzt wurden:

1)	6h IKZ	1 nM Aldo	$\triangleq$	1 μ l von 10 μ M	Aldo-SL
2)	6h IKZ	OH-Kontrolle	$\triangleq$	1 μ l von 10 μ M	OH-Lösung
3)	12h IKZ	1 nM Aldo	$\triangleq$	1 μ l von 10 μ M	Aldo-SL
4)	12h IKZ	OH-Kontrolle	$\triangleq$	1 μ l von 10 μ M	OH-Lösung
5)	24h IKZ	1 nM Aldo	$\triangleq$	1 μ l von 10 μ M	Aldo-SL
6)	24h IKZ	OH-Kontrolle	$\triangleq$	1 μ l von 10 μ M	OH-Lösung

Nach Zugabe der Lösungen wurde das Medium vorsichtig mit einer 10 ml Pipette durchmischt und die Platten wieder zurück in den Brutschrank gestellt.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden Zelllysate erstellt und mittels Western Blot und Antikörperreaktion die folgenden Proteine detektiert:

MMP-2

TIMP1

IL-6

TGF- β

α SMA

Collagen

Als Ladungskontrolle diente Aktin.

2.2.4. Statistik

Die quantitative Auswertung der Western Blots erfolgte mit ImageJ. Dabei konnte die Bandenintensität als Summe der Pixel pro Abschnitt gemessen werden.

Zur weiteren statistischen Analyse wurden Microsoft Office Excel und IBM SPSS Statistics 22 verwendet. Zur Prüfung der Signifikanz wurde der t-Test nach Student angewandt.

Die Diagramme wurden ebenfalls mit Microsoft Office Excel erstellt, wobei alle Werte als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben sind.

3. Ergebnisse

3.1. MR-Expression in verschiedenen Zelltypen

Der erste Schritt war es herauszufinden, welche der fünf Zelllinien überhaupt den Mineralokortikoidrezeptor exprimiert. Hierzu wurden Zelllysate aller Zelllinien erstellt und anschließend im Western Blot der MR detektiert (Abb. 4a). Die HEK293-Zellen dienten als Negativkontrolle. Hier konnte, wie auch in den Hep G2, der MR nicht detektiert werden. Bei den HK-2 als Positivkontrolle, wie auch bei den Hep3B und HSZ konnte der MR nachgewiesen werden, wobei bei den HSZ das Signal deutlich am stärksten war (Abb. 4b).

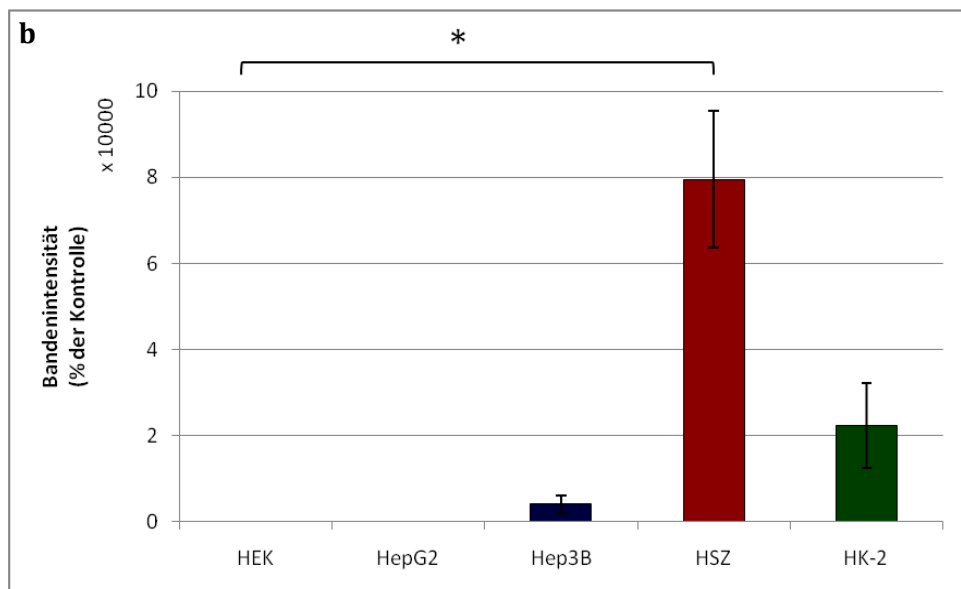
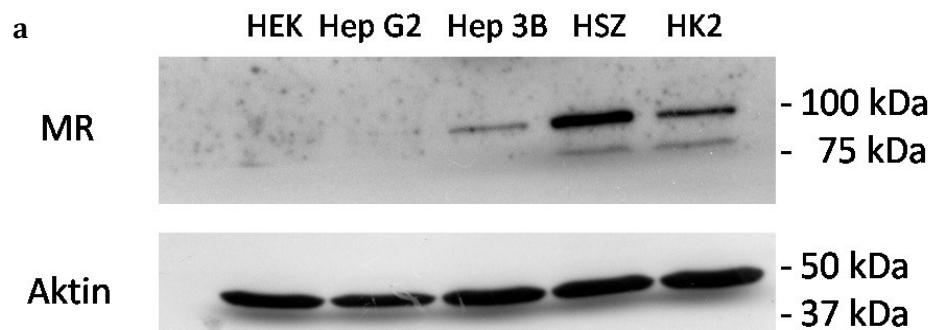


Abb. 4: MR-Expression der verschiedenen Zelltypen. **a** Western Blot Ergebnis. MR Mineralokortikoidrezeptor, Aktin als Ladungskontrolle. HSZ Hepatische Sternzellen, kDa Kilodalton **b** Quantitative Auswertung (n=3), Mittelwert $\pm$ SEM, * $p < 0,05$ vs. HEK als Negativkontrolle

3.2. Aktivierung des nicht-genomischen Signalwegs durch Aldosteron

Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich in den verschiedenen Zelllinien der oben beschriebene, nicht-genomische Signalweg durch Aldosteron aktivieren lässt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit verschiedenen Konzentrationen von Aldosteron stimuliert, um dann mittels Western Blot pERK bzw. p-Src nachzuweisen. In HEK 293 und Hep G2 konnte, analog zur fehlenden Expression des MR, keine Aktivierung gezeigt werden (Abb. 5 a und b). HK-2 und Hep3B zeigten jeweils eine leichte ERK-Aktivierung, jedoch war der Unterschied zur Kontrolle nicht ausgeprägt (Abb. 5 c und d). Nur in den HSZ zeigte sich eine deutliche ERK- sowie Src-Aktivierung, die jeweils bei einer Konzentration von 1nm Aldo am stärksten war (Abb. 5 e und f, Abb. 6).

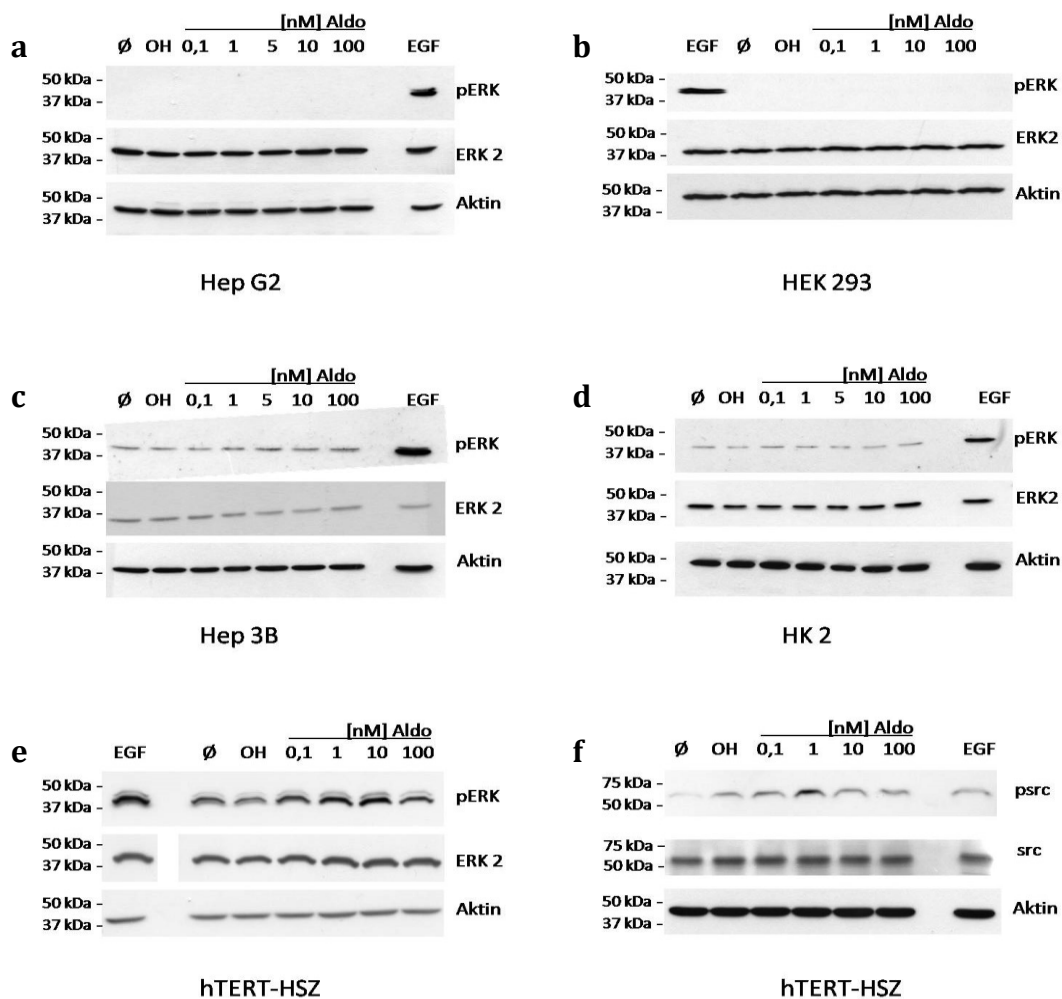


Abb. 5: Stimulation des nicht-genomischen Signalwegs durch Aldosteron. Western Blot Ergebnis. **a** pERK-Aktivierung in Hep G2 **b** pERK-Aktivierung in HEK 293 **c** pERK-Aktivierung in Hep3B **d** pERK-Aktivierung in HK-2 **e** pERK Aktivierung in HSZ **f** p-Src-Aktivierung in HSZ. OH (Ethanol) als Negativkontrolle. EGF als Positivkontrolle. ERK-2, src und Aktin als Ladungskontrolle. Aldo Aldosteron, HSZ Hepatische Sternzellen, kDa Kilodalton.

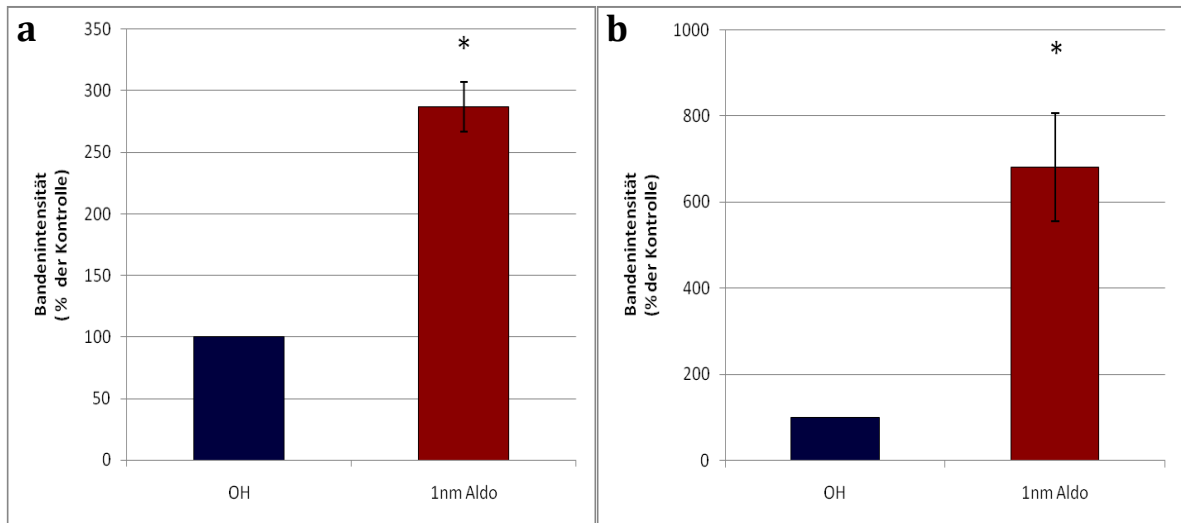


Abb. 6: Stimulation des nicht-genomischen Signalwegs in hepatischen Sternzellen durch Aldosteron.
a pERK-Aktivierung **b** p-src-Aktivierung. In beiden Fällen n=3. Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. OH-Kontrolle. OH Ethanol, Aldo Aldosteron.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle folgenden Versuche nur noch mit HSZ durchgeführt.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie viel Zeit die ERK-Aktivierung benötigt. HSZ wurden dafür unterschiedlich lange mit Aldosteron inkubiert. Als Aldosteron-Konzentration wurde 1 nM gewählt, da hier im vorherigen Versuch die Aktivierung am ausgeprägtesten war.

Es konnte gezeigt werden, dass bereits nach wenigen Minuten eine Aktivierung von ERK stattfindet. Sie erreicht ihren Höhepunkt nach 10 Minuten und flacht danach wieder ab (Abb. 7 a und b).

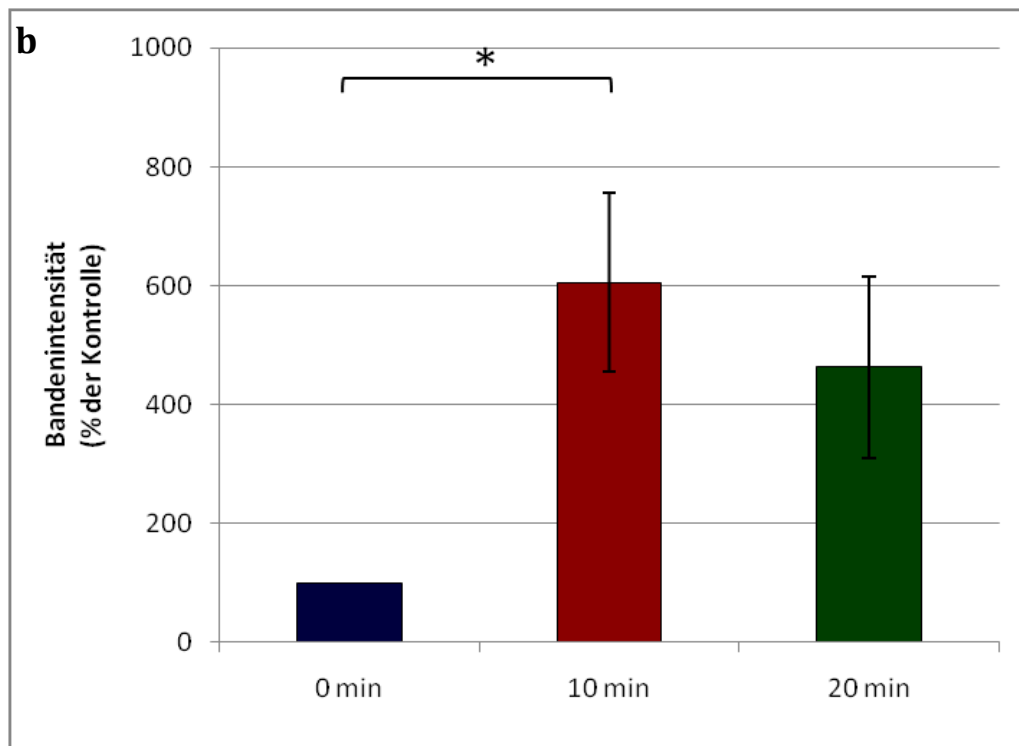
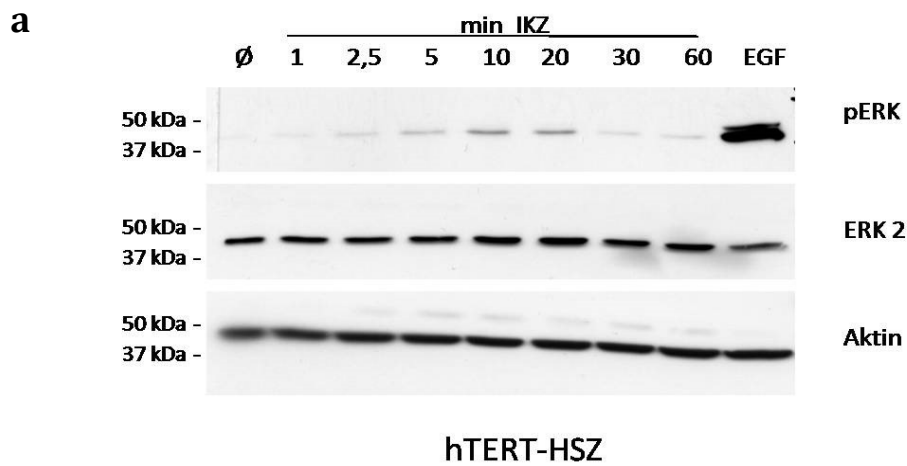


Abb. 7: Stimulation des nicht-genomischen Signalwegs in hepatischen Sternzellen (HSZ) durch Aldosteron. **a** Western Blot Ergebnis der pERK-Aktivierung in HSZ zu bestimmten Zeitpunkten nach Stimulation mit Aldosteron. OH (Ethanol) als Negativkontrolle. EGF als Positivkontrolle. ERK-2 und Aktin als Ladungskontrolle. IKZ Inkubationszeit **b** Quantitative Auswertung der pERK-Aktivierung nach 10 min und 20 min, wobei n=4, Mittelwert $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.3. Aktivierung der hepatischen Sternzellen

3.3.1. Einfluss auf Proliferation: Wachstumskurve

Um zu zeigen, dass Aldosteron in den Hepatischen Sternzellen nicht nur den nicht-genomischen Signalweg stimuliert, sondern die Zelle aktiviert, sollte der Einfluss von Aldosteron auf die Proliferation der Zellen untersucht werden.

HSZ wurden mit Aldosteron und zur Kontrolle mit OH stimuliert und an vier aufeinander folgenden Tagen ausgezählt.

Die mit Aldosteron stimulierten Zellen wuchsen deutlich schneller als die Kontrollzellen. Bereits an Tag 3 hatten sie sich fast verdoppelt, an Tag 4 waren es schließlich etwa zweieinhalb Mal so viele wie zu Beginn und damit deutlich mehr als in der Kontrollgruppe (Abb. 8).

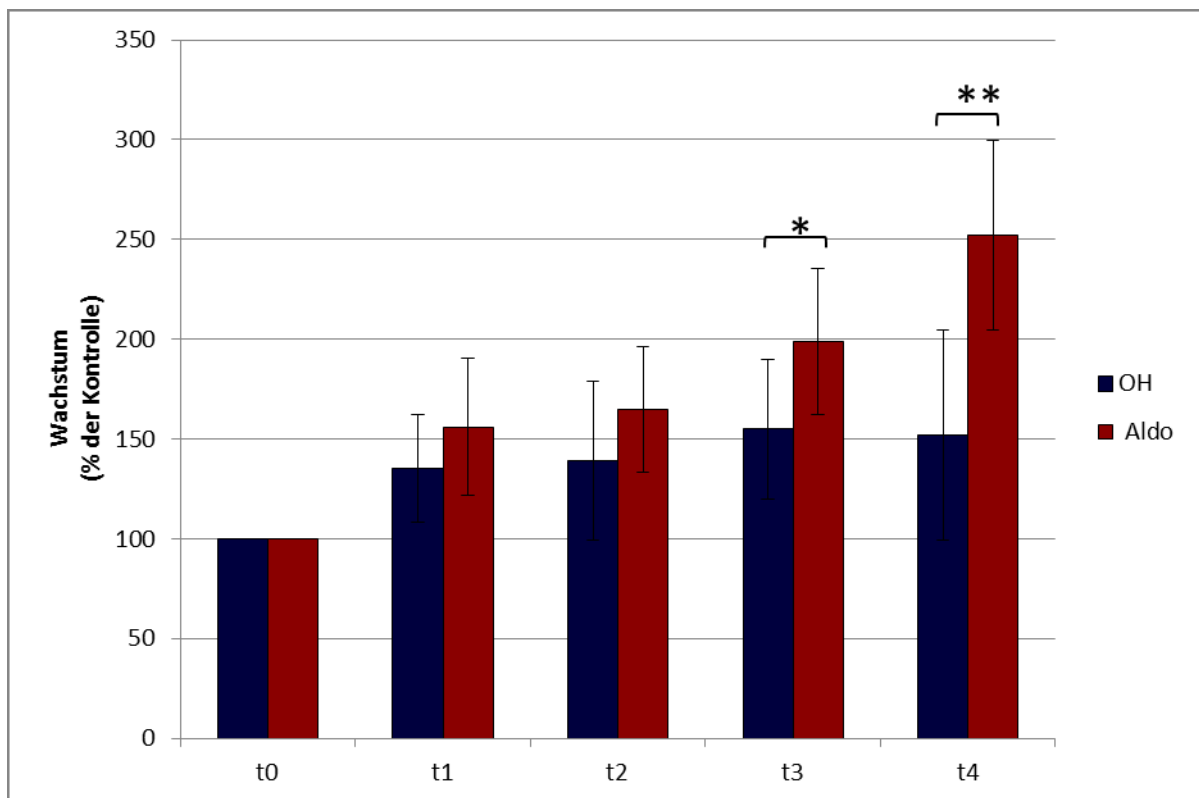


Abb. 8: Wachstum der hepatischen Sternzellen nach Stimulation mit Aldosteron. n=3, Mittelwert $\pm$ SEM. *p<0,05 vs. OH-Kontrolle. ** p<0,01 vs. OH-Kontrolle. OH Ethanol, Aldo Aldosteron. t1 nach 24h, t2 nach 48h, t3 nach 72h, t4 nach 96h.

3.3.2. Expression profibrotischer Proteine

Ein weiterer Hinweis darauf, dass Aldosteron hepatischen Sternzellen aktiviert, wäre wenn diese einen profibrotischen Phänotyp entwickelten. D.h. wenn man die Produktion verschiedener profibrotischer Proteine nachweisen könnte.

Hierfür wurden HSZ über einige Stunden mit einer 1 nM Aldosteron-Lösung inkubiert und schließlich die folgenden Proteine im Western Blot detektiert: MMP-2, IL-6, Kollagen, TGF- β und TIMP (Abb. 9).

Bereits nach 6h zeigt sich eine schwache Tendenz, deutlicher wird es jedoch nach 12h. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine vermehrte Expression von MMP-2, IL-6, Collagen, sowie TGF- β durch Stimulation mit Aldosteron gezeigt werden. Nur bei TIMP, dem Gegenspieler der Matrixmetalloproteinasen, war dies nicht der Fall: im Vergleich zur OH-Kontrolle stieg die Expression durch Aldosteron nicht an.

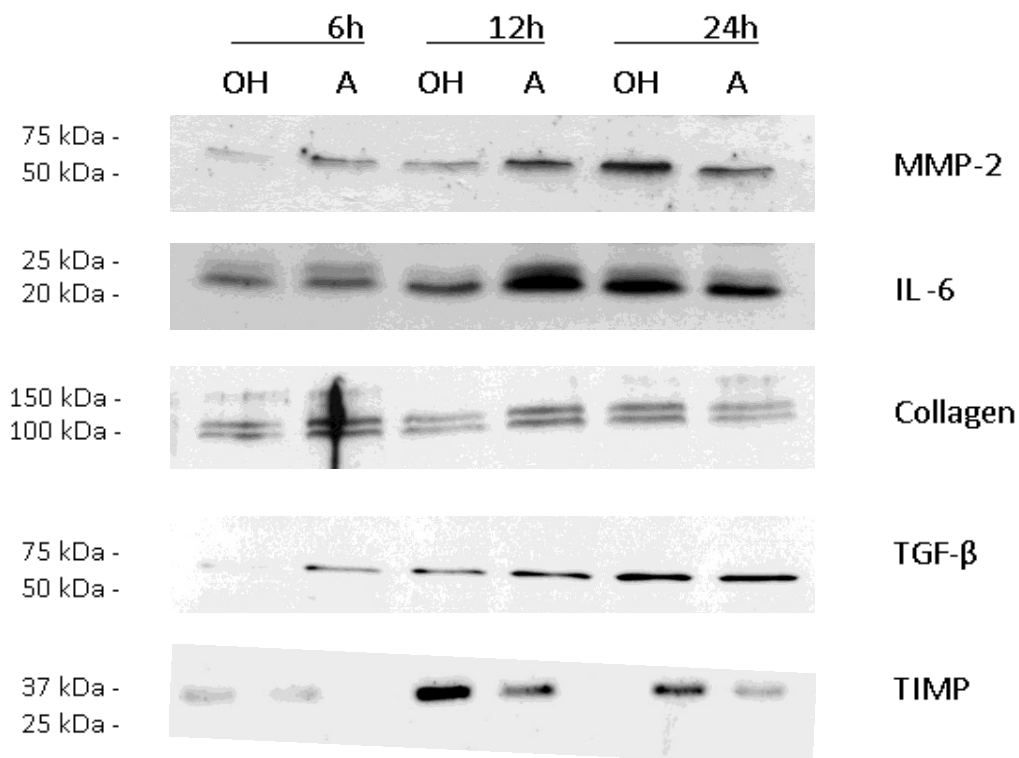


Abb. 9: Expression profibrotischer Proteine durch Stimulation mit Aldosteron Western Blot Ergebnis. In HSZ nach 6, 12 und 24 Stunden. OH (Ethanol) als Kontrolle. A Aldosteron. kDa Kilodalton.

4. Diskussion

4.1. MR-Expression in verschiedenen Zelltypen

Um die Rolle des MR in der Pathogenese der Leberzirrhose zu untersuchen, musste zunächst geklärt werden, welche Zelltypen beteiligt sein könnten. Da die hepatischen Sternzellen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung hepatischer Fibrose spielen [19] lag es nahe, diesen Zelltyp in die Untersuchungen miteinzuschließen.

Tatsächlich konnte bei den HSZ im Western Blot deutlich die stärkste MR-Expression detektiert werden (vgl. Abb. 4). Dieses Ergebnis widerspricht einer Untersuchung von Rombouts et al., welche weder in primären noch in subkultivierten HSZ den MR nachwies [59]. In verschiedenen anderen Studien konnte jedoch durch Aldosteron-Antagonisten eine verminderte Sternzellaktivierung bewirkt werden [21, 46]. Wenn durch eine Blockade des MR eine bestimmte Wirkung in HSZ also verhindert werden kann, so impliziert dies, dass die Zellen den Rezeptor exprimieren, ebenso wie in dieser Untersuchung.

Auch Pizarro et al. konnten eine MR-Expression in HSZ zeigen. Interessanterweise wurde in deren Studie auch eine Abhängigkeit der Expression vom Grad der Inflammation und Fibrose, also vom Grad der Aktivierung, gefunden [55].

Unabhängig davon wurde bereits beschrieben, dass immortalisierte Sternzelllinien allein durch das Ausplattieren in Kulturschalen Charakteristika einer Aktivierung annehmen [36, 39]. Diese beiden Theorien zusammengenommen, könnte in der Tat das Ausmaß der MR-Expression im vorliegenden Versuch zum Teil durch die Kultivierung erklärt werden.

Allerdings zeigten nicht nur HSZ eine MR-Expression, auch in den Hep3B-Zellen konnte der MR detektiert werden (vgl. Abb. 4). Pizarro et al. fanden zudem auch eine MR-Expression in Kupffer-Zellen [55]. In der vorliegenden Arbeit wurden diese, ebenso wie sinusoidale Endothelzellen, nicht berücksichtigt. Es weist jedoch darauf hin, dass auch andere Leberparenchymzellen eine Rolle spielen könnten und dass die vom MR vermittelten Wirkungen zwar wohl hauptsächlich, aber eben nicht ausschließlich über HSZ vermittelt werden.

4.2. Aktivierung des nicht-genomischen Signalwegs durch Aldosteron

Nach Stimulation mit Aldosteron konnte in Hep 3B, HK-2 und vor allem in HSZ eine Phosphorylierung von ERK bzw. Src nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5). Die Aktivierung dieser Proteine wurde bereits in verschiedenen anderen Untersuchungen an unterschiedlichen Zellen beschrieben [23, 26, 31]. Sie gelten als Bestandteile der Signalkaskade des nicht-genomischen Signalwegs. Aufgrund der Ergebnisse dieses Experiments lässt sich also schlussfolgern, dass sich durch Aldosteron insbesondere in HSZ, aber auch in Hep 3B, der nicht-genomischen Signalweg aktivieren lässt.

Wie auch in anderen Studien kam es zur größten Aktivierung der Proteine nach Stimulation mit einer Aldosteronkonzentration im nanomolaren Bereich. Allerdings beschreiben Gekle et al. und Grossmann et al. in ihren Experimenten eine zunehmende ERK-Aktivierung mit zunehmender Aldo-Konzentration [26, 31]. Eine solche Dosisabhängigkeit konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Ebenso wie bei Braun et al. kam es zur größten ERK-Aktivierung bei einer Konzentration von 1 nM Aldosteron (vgl. Abb. 5 und 6), durch höhere Dosen konnte kein zusätzlicher Effekt erzielt werden [10].

Die normale Plasmakonzentration von Aldosteron beträgt 20-150 ng/l [38, 42]. 1 nM Aldo entspricht etwa 360 ng/l, diese Konzentration liegt also über dem Normwert und kommt damit Werten gleich, wie sie beispielsweise im Rahmen einer Leberzirrhose gefunden werden können. Die Aktivierung des nicht-genomischen Signalwegs fände also eher nicht zu Beginn der Erkrankung statt, sondern vielmehr erst, wenn die Zirrhose schon so weit fortgeschritten ist, dass es aufgrund der veränderten Hämodynamik zum sekundären Hyperaldosteronismus kommt.

Dass nur in den Zellen eine Phosphorylierung von ERK detektiert werden konnte, welche im ersten Versuch auch eine Expression des MR zeigten (vgl. Abb. 4), legt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich um einen MR-abhängigen Prozess handelt. Um diese Theorie noch besser belegen zu können, wären allerdings weitere Versuche nötig, die die Inhibierung des Effekts durch Blockieren des MR mit einem Aldosteron-Antagonisten beweisen, ebenso wie beispielsweise Grossmann et al. und Braun et al. in ihren Untersuchungen [10, 31].

Im zweiten Versuchsteil konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK bereits nach 10 min ihren Höhepunkt erreicht (vgl. Abb. 7). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Braun et al. überein, auch in ihren Untersuchungen kam es nach 10 Minuten zur größten ERK-Aktivierung, längere Inkubationszeiten konnten keinen weiteren Anstieg bewirken [10]. In anderen Fällen wurde die größte ERK-Aktivierung schon nach 5 Minuten beschrieben [26, 31]. Diese Veränderungen treten zeitlich zu früh auf, um über den klassischen genomischen Signalweg hervorgerufen worden zu sein. Dass es sich um einen so frühen Effekt handelt, bestärkt die Hypothese, dass es durch Aldosteron zur Aktivierung des nicht-genomischen Signalwegs in HSZ kommt. Trotzdem gilt auch hier, dass für einen eindeutigen Beweis noch eine Gegenprobe nötig wäre. Käme es trotz Blockieren der Transkription der DNA, z.B. mit Actinomycin D wie in den Experimenten von Moura et al. [47], zur Phosphorylierung von ERK und Src so wäre eindeutig bewiesen, dass die Effekte nicht genomisch vermittelt sind.

4.3. Aktivierung der hepatischen Sternzellen

Kommt es in Folge einer Leberschädigung zur Aktivierung hepatischer Sternzellen, so nehmen diese einen profibrotischen Phänotyp an. Dies geht mit verschiedenen Veränderung in ihrem Verhalten einher [19, 43]. Ziel im letzten Versuch war es, solche Veränderungen durch Stimulation mit Aldosteron zu provozieren und nachzuweisen.

Um den Einfluss von Aldosteron auf die Proliferation der Zellen zu untersuchen wurde eine Wachstumskurve erstellt. Tatsächlich kam es eindeutig zu einer gesteigerten Proliferation der HSZ nach Stimulation mit Aldosteron (vgl. Abb. 8).

Weiterhin konnte die Expression von proinflammatorischen und profibrotischen Proteinen nach Inkubation mit Aldosteron gezeigt werden. Der Effekt war nach 12h am deutlichsten, es kam zu einer verstärkten Bildung von MMP-2, IL-6, Collagen und TGF- β . Nach längerer Inkubationszeit nahm die Expression der Proteine wieder ab. (vgl. Abb 9). Die erhöhte Expression von Collagen und TGF- β sind Zeichen für Fibrogenese, denn Collagen ist einer der Hauptbestandteile des fibrotischen Narbengewebes und TGF- β der wichtigste Stimulus für dessen Produktion [65]. Die Bildung von IL-6 zeigt die Beteiligung an inflammatorischen Vorgängen.

Der Umsatz von Extrazellulärmatrix wird durch MMPs gesteuert, auch deren Expression war nach Inkubation mit Aldosteron erhöht. Dass im Vergleich zur OH-Kontrolle keine verstärkte Synthese von TIMP nachgewiesen wurde, könnte eventuell damit zusammenhängen, dass die Gegenspieler der MMPs erst im Verlauf gebildet werden [3, 20].

Zusammen genommen konnten durch Stimulation mit Aldosteron Veränderung im Verhalten der HSZ gezeigt werden, die für den Übergang in einen profibrotischen Phänotyp sprechen.

Insgesamt waren die Ergebnisse allerdings schwer reproduzierbar, was durch folgende Überlegungen zu erklären sein könnte:

Zum einen ist zu bedenken, dass es im Rahmen einer Leberzirrhose nicht nur zu kurzzeitig erhöhten Aldosteronspiegeln kommt. Die Konzentration des Hormons liegt in fortgeschritten Stadien dauerhaft über der Norm und die Zellen sind somit einem andauernden Stimulus ausgesetzt. Ein solch kontinuierlicher Zufluss an Aldosteron war im Experiment schwer zu realisieren. Jedoch hätte man die Zellen auch hier, ähnlich wie bei der Wachstumskurve, statt einmalig zumindest mehrmals hintereinander stimulieren können, um den Hyperaldosteronismus besser zu simulieren. Möglicherweise hätte sich dadurch ein Zusammenhang zwischen Zeit und Proteinexpression provozieren lassen.

Zum anderen muss auch hier berücksichtigt werden, dass HSZ allein durch die Kultivierung in Plastikschaalen aktiviert werden, ein Vorgang, der in verschiedenen Untersuchungen beschrieben wurde [36]. Die für die Versuche verwendeten Zellen waren zuvor nicht jedes Mal exakt gleich lang ausplattiert. Sie könnten folglich durch die Kulturschaalen unterschiedlich stark „voraktiviert“ gewesen sein. Tatsächlich könnte man die Eignung von auf diese Art kultivierten hepatischen Sternzelllinien für den Versuchsaufbau durchaus in Frage stellen. In der Literatur wurde beschrieben, dass die hTERT-HSZ lediglich in Kultur auf einer basalmembranartigen Matrix in einen ruhenden Zustand übergehen und nur so der Übergang in die aktivierte Form studiert werden kann [39]. Um den Einfluss der Kultivierung auf die Veränderungen im Phänotyp zu reduzieren wäre dies also eine Lösung. Eine andere Möglichkeit würde ein Experiment an primären HSZ darstellen, wobei auch hier die Ergebnisse stark davon abhängig wären, in welchem Zeitraum nach Isolierung der Zellen die Untersuchungen durchgeführt würden.

Weiterhin konnte durch diesen Versuch nicht auf den Einfluss von anderen Zelltypen auf die Aktivierung der HSZ eingegangen werden. Die Umwandlung in einen profibrotischen Phänotyp ist ein komplexes Zusammenspiel von verschiedensten Einflüssen auf die HSZ, u.a. spielt auch die parakrine Stimulation durch andere Zelltypen eine wichtige Rolle [19, 20]. Diese Bedingungen konnten in dem Versuch nicht abgebildet werden, hierfür wären Untersuchungen an Zellverbänden oder am Tiermodell nötig.

Trotzdem zeigen die Ergebnisse nicht nur, dass durch Stimulation mit Aldosteron in HSZ über den MR der nicht-genomische Signalweg aktiviert wird, sie weisen auch darauf hin, dass es durch Aldosteron zur Umwandlung der HSZ in einen profibrotischen Phänotyp kommt.

4.4. Klinische Bedeutung

Über die Rolle des MR in der Pathogenese der Leberzirrhose ist bisher nur wenig bekannt. Klar ist jedoch, dass der MR in anderen Organen an der Entstehung von Fibrose beteiligt ist. Seine Bedeutung im Rahmen der Leberzirrhose ist insbesondere deshalb interessant, da es im Laufe der Erkrankung zu erhöhten Aldosteronspiegeln kommt. Wenn Aldosteron im menschlichen Organismus, ebenso wie in diesen Versuchen, über den nicht-genomischen Signalweg die Aktivierung hepatischer Sternzellen und damit die Fibrogenese fördert, so käme es im Verlauf der Krankheit zu einem Circulus vitiosus: Die zunehmende Fibrosierung führt zu erhöhten Aldosteronspiegeln und Aldosteron stimuliert wiederum die Fibrogenese.

Während zu Beginn der Erkrankung vermutlich andere Faktoren eine wichtigere Rolle spielen, so könnte Aldosteron doch ein entscheidender Faktor in der Aufrechterhaltung der Leberzirrhose sein und unter anderem einen Grund für die schwierige Behandlung darstellen. Das könnte in der Zukunft die Rolle von Aldosteron-Antagonisten in ein völlig neues Licht rücken.

Durch die Entdeckung, dass MR-Antagonisten kardiales Remodelling reduzieren wurde die Therapie der Herzinsuffizienz bereits revolutioniert. Im Rahmen der Leberzirrhose wäre eventuell eine ähnliche Entwicklung denkbar. Derzeit werden die MR-Antagonisten bei dieser Erkrankung aufgrund ihrer Wirkung auf den Wasser- und Elektrolythaushalt vor allem zur Behandlung von Aszites eingesetzt. Vielleicht wird künftig aber auch hier ihre antifibrotische Wirkung mehr in den Fokus rücken.

5. Zusammenfassung

Die Leberzirrhose ist die Spätfolge verschiedener Lebererkrankungen. Dabei kommt es durch entzündliche Fibrose zur Zerstörung der Läppchen- und Gefäßstruktur der Leber und zur Ausbildung von bindegewebigen Septen und Regeneratknoten.

Als Ursachen dieser chronischen Erkrankung standen in westlichen Ländern bisher vor allem Alkoholabusus oder Virushepatitiden an erster Stelle. Inzwischen sind aber die nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen auf dem Vormarsch. Um die 30% der Bevölkerung in Industrienationen leiden an der sogenannten NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease), aufgrund von Adipositas, Diabetes mellitus oder Hyperlipoproteinämie.

Im individuellen Verlauf der Lebererkrankungen sind große Unterschiede zu beobachten. Um die Gründe dafür besser zu verstehen und mögliche neue therapeutische Ansätze zu finden, bedarf es der Identifikation beeinflussender Faktoren.

Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Leberzirrhose spielen die hepatischen Sternzellen (HSZ). Durch verschiedenste Stimuli gehen sie in einen profibrotischen Phänotyp über, was mit bestimmten Veränderungen in ihrem Verhalten einhergeht: Der Verlust von Retinoiden, die Synthese von Collagen, der Umsatz von Extrazellulärmatrix (EZM), eine gesteigerte Proliferation, die Fähigkeit zur Kontraktion und Chemotaxis.

Der Mineralokortikoidrezeptor (MR) ist ein im Zytosol lokalisierter Transkriptionsfaktor, der durch Bindung des passenden Liganden (Aldosteron) aktiviert wird. Diese Aktivierung führt in Epithelzellen der Nierentubuli zur verstärkten Synthese bestimmter Ionenkanäle und -transporter. Die Folge ist eine vermehrte Rückresorption von Natrium und damit die Retention von Wasser.

Neben der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes ist der MR aber auch an der Vermittlung profibrotischer Vorgänge beteiligt.

So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung des MR im Herz-Kreislauf-System und in der Niere zu verstärkter Kollagensynthese und damit zu Fibrose führt. Außerdem wurde beobachtet, dass MR-Antagonisten, wie Spironolacton oder Eplerenon, das Auftreten bzw. das Ausmaß des kardialen Remodellings, sowie einer Leberfibrose reduzieren. Diese Vorgänge werden nicht über den klassischen genomischen Signalweg induziert, vielmehr kommt es zur Aktivierung eines

schnellen, nicht-genomischen Signalwegs, vermutlich durch Co-Aktivierung des EGF-Rezeptors.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des MR in der Pathogenese der Leberzirrhose genauer untersucht werden. Hierfür wurde zunächst bestimmt, welche Leberzelltypen an den Vorgängen beteiligt sein könnten, d.h. welche Zellen den MR exprimieren. Wie sich zeigte, tragen vor allem HSZ den MR, weniger stark ausgeprägt konnte auch in Hep3B Zellen eine Expression gezeigt werden. Danach wurden die Zellen mit Aldosteron stimuliert und mittels Western Blot aktivierte Proteine des nicht genomischen Signalwegs detektiert. Eine Phosphorylierung von ERK bzw. Src konnte erneut vor allem in HSZ detektiert werden. Die Aktivierung dieser Proteine trat bereits nach wenigen Minuten ein, was noch einmal unterstreicht, dass es sich hierbei nicht um einen genomischen Vorgang handeln kann. Im letzten Versuchsteil sollte durch Stimulation mit Aldosteron der Übergang hepatischer Sternzellen in einen profibrotischen Phänotyp gezeigt werden. Tatsächlich hatte die Stimulation mit Aldosteron einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen und auch eine vermehrte Expression von profibrotischen Proteinen konnte gefunden werden.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass der MR, ebenso wie in Herz und Niere, auch in der Leber eine Rolle in der Fibrogenese spielt. Seine Wirkungen scheinen am ehesten über HSZ vermittelt zu sein. In ihnen wird durch Aldosteron der nicht-genomische Signalweg aktiviert und die Zellen gehen in einen profibrotischen Phänotyp über.

Würde sich diese Hypothese durch weitergehende Untersuchungen bestätigen, so könnte dies durch den erweiterten Einsatz von Aldosteron-Antagonisten einen neuen Therapieansatz in der Behandlung der Leberzirrhose schaffen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Andronescu, C. I., Purcarea, M. R., and Babes, P. A. 2018. Nonalcoholic fatty liver disease - epidemiology, pathogenesis and therapeutic implications. *Journal of Medicine and Life*, 11, 20–23.
- [2] Anthony, P. P., Ishak, K. G., Nayak, N. C., Poulsen, H. E., Scheuer, P. J., and Sobin, L. H. 1977. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature and classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 55, 521–540.
- [3] Arthur, M. J. P. 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279, G245-249.
- [4] Behrends, J. C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., and Wischmeyer, E. 2010. *Physiologie*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart.
- [5] Benyon, R. C., Hovell, C. J., Da Gça, M., Jones, E. H., Iredale, J. P., and Arthur, M. J. 1999. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 30, 977–986.
- [6] Bernadi, M., Trevisani, F., Gasbarrini, A., and Gasbarrini, G. 1994. Hepatorenal Disorders - Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Seminars in liver disease*, 14, 23–34.
- [7] Bilzer, M., Roggel, F., and Gerbes, A. L. 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver International*, 26, 1175–1186.
- [8] Blasi, E. R., Rocha, R., Rudolph, A. E., Blomme, E. A.G., Polly, M. L., and McMahon, E. G. 2003. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney International*, 63, 1791–1800.
- [9] Bosch, J., Arroyo, V., Betriu, A., Mas, A., Carrilho, F., Rivera, F., Navarro-Lopez, F., and Rodes, J. 1980. Hepatic Hemodynamics and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Cirrhosis. *Gastroenterology*, 78, 92–99.
- [10] Braun, S., Lösel, R., Wehling, M., and Boldyreff, B. 2004. Aldosterone rapidly activates Src kinase in M-1 cells involving the mineralocorticoid receptor and HSP84. *FEBS Letters*, 570, 69–72.
- [11] Brilla, C. G., Matsubara, L., and Weber, K. T. 1993. Anti-Aldosterone Treatment and the Prevention of Myocardial Fibrosis in Primary and Secondary Hyperaldosteronism. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 25, 563–575.

- [12] Brilla, C. G., Zhou, G., Matsubara, L., and Weber, K. T. 1994. Collagen Metabolism in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts: Response to Angiotensin II and Aldosterone. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 26, 809–820.
- [13] Canbay, A., Higuchi, H., Bronk, S. F., Taniai, M., Sebo, T. J., and Gores, G. J. 2002. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: A link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology*, 123, 1323–1330.
- [14] Canbay, A., Taimr, P., Torok, N., Higuchi, H., Friedman, S., and Gores, G. J. 2003. Apoptotic Body Engulfment by a Human Stellate Cell Line Is Profibrogenic. *Laboratory Investigation*, 83, 655–663.
- [15] Cato, A. C. B., Nestl, A., and Mink, S. 2002. Rapid Actions of Steroid Receptors in Cellular signaling pathway. *Science's STKE*, 1–12.
- [16] Cheskis, B. J. 2004. Regulation of cell signalling cascades by steroid hormones. *J. Cell. Biochem.*, 93, 20–27.
- [17] Cohen-Naftaly, M. and Friedman, S. L. 2011. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 4, 391–417.
- [18] Coppage, W. S., Cooner, A. E., Island, D. P., and Liddle, G. W. 1962. The metabolism of aldosterone in normal subjects and in patients with hepatic cirrhosis. *The Journal of clinical investigation*, 41, 1672–1680.
- [19] Elpek, G. Ö. 2014. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World journal of gastroenterology*, 20, 7260–7276.
- [20] Friedman, S. L. 2008. Hepatic fibrosis - overview. *Toxicology*, 254, 120–129.
- [21] Fujisawa, G., Muto, S., Okada, K., Kusano, E., and Ishibashi, S. 2006. Mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents pig serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 148, 149–156.
- [22] Funder, J. W. 1997. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Annual Review of Medicine*, 48, 231–240.
- [23] Funder, J. W. 2005. The nongenomic actions of aldosterone. *Endocrine reviews*, 26, 313–321.
- [24] Funder, J. W. 2017. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors-Physiology and Pathophysiology. *International journal of molecular sciences*, 18 (5).

- [25] Ganong, W. F. and Mulrow, P. J. 1958. Rate of Change in Sodium and Potassium Excretion After Injection of Aldosterone Into the Aorta and Renal Artery of the Dog. *American journal of physiology*, 195, 337–342.
- [26] Gekle, M., Freudinger, R., Mildenerger, S., Schenk, K., Marschitz, I., and Schramek, H. 2001. Rapid activation of Na⁺/H⁺-exchange in MDCK cells by aldosterone involves MAP-kinases ERK 1/2. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 441, 781–786.
- [27] Gekle, M. and Grossmann, C. 2009. Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 458, 231–246.
- [28] Gomez-Sanchez, E. and Gomez-Sanchez, C. E. 2014. The Multifaceted Mineralocorticoid Receptor. *Comprehensive Physiology*, 4, 965–994.
- [29] Good, D. W., George, T., and Watts, B. A. 2002. Aldosterone inhibits HCO₃⁻ absorption via a nongenomic pathway in medullary thick ascending limb. *American journal of physiology. Renal physiology*, F699-706.
- [30] Goodfriend, T. L. 2006. Aldosterone - A Hormone of Cardiovascular Adaptation and Maladaptation. *J Clin Hypertension*, 8, 133–139.
- [31] Grossmann, C., Benesic, A., Krug, A. W., Freudinger, R., Mildenerger, S., Gassner, B., and Gekle, M. 2005. Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 19, 7, 1697–1710.
- [32] Grossmann, C. and Gekle, M. 2007. Non-classical actions of the mineralocorticoid receptor: misuse of EGF receptors? *Molecular and cellular endocrinology*, 277, 6–12.
- [33] Grossmann, C. and Gekle, M. 2009. New aspects of rapid aldosterone signaling. *Molecular and cellular endocrinology*, 308, 53–62.
- [34] Grossmann, C. and Gekle, M. 2012. Interaction between mineralocorticoid receptor and epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular and cellular endocrinology*, 350, 235–241.
- [35] Haseroth, K., Gerdes, D., Berger, S., Feuring, M., Günther, A., Herbst, C., Christ, M., and Wehling, M. 1999. Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochemical and biophysical research communications* 266, 1, 257–261.

- [36] Hellerbrand, C. 2013. Hepatic stellate cells - the pericytes in the liver. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 456, 775–778.
- [37] Hernandez-Gea, V. and Friedman, S. L. 2011. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology*, 6, 425–456.
- [38] Herold, G. 2013. *Innere Medizin 2013. Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Selbstverl., Köln.
- [39] Herrmann, J., Gressner, A. M., and Weiskirchen, R. 2007. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *Journal of cellular and molecular medicine*, 11, 704–722.
- [40] Inagaki, Y. and Okazaki, I. 2007. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*, 56, 284–292.
- [41] Iredale, J. P., Thompson, A., and Henderson, N. C. 2013. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. *Biochimica et biophysica acta*, 1832, 876–883.
- [42] Kuiper, J. J., Boomsma, F., van Buren, H., Man, R. de, Danser, A. H. J., and van den Meiracker, A. H. 2008. Components of the renin-angiotensin-aldosterone system in plasma and ascites in hepatic cirrhosis. *European journal of clinical investigation*, 38, 939–944.
- [43] Li, D. and Friedman, S. L. 1999. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14, 618–633.
- [44] Lüllmann-Rauch, R. and Asan, E. 2015. *Taschenbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- [45] Luo, W., Meng, Y., Ji, H.-L., Pan, C.-Q., Huang, S., Yu, C.-H., Xiao, L.-M., Cui, K., Ni, S.-Y., Zhang, Z.-S., and Li, X. 2012. Spironolactone lowers portal hypertension by inhibiting liver fibrosis, ROCK-2 activity and activating NO/PKG pathway in the bile-duct-ligated rat. *PloS one*, 7, e34230.
- [46] Matono, T., Koda, M., Shiho, T., Takaaki, S., Masaru, U., and Yoshikazu, M. 2010. The effects of the selective mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation in rat. *Int J Mol Med*, 25, 875–882.
- [47] Moura, A.-M. and Worcel, M. Direct action of aldosterone on transmembrane ^{22}Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension* 1984, 6, 425–430.

- [48] Nagai, Y., Miyata, K., Sun, G.-P., Rahman, M., Kimura, S., Miyatake, A., Kiyomoto, H., Kohno, M., Abe, Y., Yoshizumi, M., and Nishiyama, A. 2005. Aldosterone Stimulates Collagen Gene Expression and Synthesis Via Activation of ERK1/2 in Rat Renal Fibroblasts. *Hypertension*, 46, 1039–1045.
- [49] Novo, E., Marra, F., Zamara, E., Di Valfrè Bonzo, L., Caligiuri, A., Cannito, S., Antonaci, C., Colombatto, S., Pinzani, M., and Parola, M. 2006. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut*, 55, 90–97.
- [50] Pascual-Le Tallec, L. and Lombès, M. 2005. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19, 2211–2221.
- [51] Pinzani, M. 2002. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Frontiers in Bioscience*, 7, d1720-1726.
- [52] Pinzani, M., Rosselli, M., and Zuckermann, M. 2011. Liver cirrhosis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 25, 281–290.
- [53] Pitt Bertram, Remme Willem, Zannad Faiez, Neaton James, Martinez Felipe, Roniker Barbara, Bittman Richard, Hurley Steve, Kleiman Jay, and Gatlin Marjorie. 2003. Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine*, 348, 1309–1321.
- [54] Pitt Bertram, Zannad Faiez, Remme Willem J., Cody Robert, Castaigne Alain, Perez Alfonso, Palensky Jolie, and Wittes Janet. 1999. The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. *The New England Journal of Medicine*, 341, 709–717.
- [55] Pizarro, M., Solís, N., Quintero, P., Barrera, F., Cabrera, D., Rojas-de Santiago, P., Arab, J. P., Padilla, O., Roa, J. C., Moshage, H., Wree, A., Inzaugarat, E., Feldstein, A. E., Fardella, C. E., Baudrand, R., Riquelme, A., and Arrese, M. 2015. Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blockade in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 35, 2129–2138.
- [56] Queisser, N., Happ, K., Link, S., Jahn, D., Zimnol, A., Geier, A., and Schupp, N. 2014. Aldosterone induces fibrosis, oxidative stress and DNA damage in livers of male rats independent of blood pressure changes. *Toxicology and applied pharmacology*, 280, 399–407.

- [57] Rafiq, K., Hitomi, H., Nakano, D., and Nishiyama, A. 2011. Pathophysiological Roles of Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor in the Kidney. *J Pharmacol Sci*, 115, 1–7.
- [58] Remuzzi, G., Cattaneo, D., and Perico, N. 2008. The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19, 1459–1462.
- [59] Rombouts, K., Niki, T., Wielant, A., Hellemans, K., Schuppan, D., Kormoss, N., and Geerts, A. 2001. Effect of aldosterone on collagen steady state levels in primary and subcultured rat hepatic stellate cells. *Journal of hepatology*, 34, 230–238.
- [60] Ruhs, S., Nolze, A., Hübschmann, R., and Grossmann, C. 2017. 30 Years of the mineralocorticoid receptor: Nongenomic effects via the mineralocorticoid receptor. *The Journal of endocrinology*, 234, T107-T124.
- [61] Stål, P. 2015. Liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease - diagnostic challenge with prognostic significance. *World journal of gastroenterology*, 21, 11077–11087.
- [62] Struthers, A. D. and Unger, T. 2011. Physiology of aldosterone and pharmacology of aldosterone blockers. *European Heart Journal Supplements*, 13 Supplement B, B27-B30.
- [63] Tsochatzis, E. A., Bosch, J., and Burroughs, A. K. 2014. Liver cirrhosis. *The Lancet*, 383, 1749–1761.
- [64] Younossi, Z. M., Stepanova, M., Afendy, M., Fang, Y., Younossi, Y., Mir, H., and Srishord, M. 2011. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 9, 524-530.
- [65] Zhou, W.-C., Zhang, Q.-B., and Qiao, L. 2014. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology*, 20, 7312–7324.

7. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Dollinger danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung während der Arbeit an meiner Promotion.

Bei Christin Münzberg und Elke Preiß bedanke ich mich für die Betreuung und die hilfreiche Unterstützung während meiner Arbeit im Labor.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen der AG Prof. Oswald für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich für das Stipendium während meiner Forschungsarbeit im Labor durch die Aufnahme ins Promotionsprogramm für experimentelle Medizin der Universität Ulm.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, aber insbesondere meinen Eltern, für ihre Unterstützung, Ermutigung und den Rückhalt, nicht nur während der Promotion, sondern während des gesamten Studiums.

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.