

Aus dem Institut für Pathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito

# Funktionelle Relevanz der Extrazellulären Matrixmoleküle Periostin und Tenascin C in Leberschädigung und -regeneration

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Tra My Nguyen

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Univ. -Prof. Dr. Irene Esposito

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

## Zusammenfassung

Die besondere Regenerationsfähigkeit der Leber gewinnt wegen steigender Inzidenzen der chronischen Lebererkrankungen an Bedeutung. Die Rolle der extrazellulären Matrixproteine Periostin (POSTN) und Tenascin C (TNC) bei der Leberregeneration auftretenden duktilären Reaktion ist noch unzureichend untersucht. Das Ziel dieser Arbeit war die Prüfung möglicher Zusammenhänge der Expression von POSTN und TNC mit pathophysiologischen Parametern, sowie die Untersuchung eines Einflusses auf die Aktivierung und Expansion von hepatischen Progenitorzellen.

Dazu wurden 151 humane Gewebeproben mit chronischer Leberschädigung untersucht und entsprechend ihres Fibrosegrades und ihrer histologischen Diagnose klassifiziert. Immunhistochemische Färbungen waren die Basis für die Untersuchung der Expression von POSTN, TNC und der hepatischen Progenitorzellen (EpCAM, SOX9, AFP, NCAM, CK7/CK19) und Stellatumzellen (NCAM,  $\alpha$ SMA, Synaptophysin, Desmin).

Die Studienergebnisse zeigen, dass TNC und POSTN in der gesunden Leber nur äußerst schwach bis gar nicht, jedoch bei den Prozessen der Leberschädigung und -regeneration vermehrt exprimiert werden. Abhängig von der Ätiologie der Leberschädigung werden TNC und POSTN unterschiedlich stark exprimiert. Bei Fortschreiten des Krankheitsstadiums (Desmet 3 und 4) nimmt die (peri-) portale und (peri-) septale Expression von TNC und POSTN signifikant zu ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,05$ ). Die (peri-) portale und (peri-) septale Expression von TNC und POSTN korreliert zudem signifikant mit der Proliferation hepatischer Progenitorzellen bei der Leberregeneration (duktiläre Reaktion) (jeweils  $p < 0,001$ ) sowie mit der Aktivierung von hepatischen Stellatumzellen ( $p < 0,001$  für TNC,  $p = 0,002$  für POSTN).

Die heterogene Expression von TNC und POSTN im geschädigten Lebergewebe, sowie die Korrelation der Markerexpression mit der Aktivierung von hepatischen Stellatumzellen und der Proliferation von hepatischen Progenitorzellen, weist auf eine aktive Rolle der beiden extrazellulären Matrixproteine in der Leberschädigung und -regeneration hin.

## Summary

The special regenerative capacity of the liver is becoming increasingly important due to the rising incidences of chronic liver diseases. The role of the extracellular matrix proteins periostin (POSTN) and tenascin C (TNC) in the ductal response occurring during liver regeneration is still poorly understood. The aim of this work was therefore to test possible correlations of POSTN and TNC expression with pathophysiological parameters, as well as to examine an influence of the two proteins on the activation and expansion of hepatic progenitor cells.

For this purpose, 151 human tissue samples with chronic liver injury were examined and classified according to their degree of fibrosis and histological diagnosis. Immunohistochemical staining provided the basis for studying the expression of POSTN, TNC, and hepatic progenitor cells (EpCAM, SOX9, AFP, NCAM, CK7/CK19) and stellate cells (NCAM,  $\alpha$ SMA, Synaptophysin, Desmin).

The study results show that TNC and POSTN are expressed very weakly to not at all in the healthy liver but are expressed more abundantly in the processes surrounding liver injury and regeneration. POSTN and TNC are expressed differently depending on the aetiology of liver injury. As disease stage progresses (Desmet 3 and 4), (peri-) portal and (peri-) septal expression of TNC and POSTN increases significantly ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively). The (peri-) portal and (peri-) septal expression of TNC and POSTN also correlated significantly with the proliferation of hepatic progenitor cells in liver regeneration (ductal response) ( $p < 0.001$  each) and with the activation of hepatic stellate cells ( $p < 0.001$  for TNC,  $p = 0.002$  for POSTN).

From these results, we conclude that the heterogeneous expression of TNC and POSTN in damaged liver tissue and the correlation of marker expression with hepatic stellate cell activation and hepatic progenitor cell proliferation indicate an active role of the two extracellular matrix proteins in liver injury and regeneration.

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle-actin</i>
AIH	Autoimmunhepatitis
DPBS	Dulbecco`s phosphate buffered saline
ECM	extrazellulären Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCL	Chlorwasserstoff
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HPC	hepatische Progenitorzelle
HSC	hepatische Stellatumzelle
KO	<i>knockout</i>
MEK	Methylethylketon
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
PBC	primär biliäre Cholangitis
PBS	Phosphate buffered saline
POSTN	Periostin
PSC	primär sklerosierende Cholangitis

TGF- $\beta$  *tumor growth factor- $\beta$*   
TNC Tenascin C  
USA Vereinigten Staaten von Amerika  
WT Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>1.1</b>	<b>Chronische Leberschädigung, Leberfibrose und Leberzirrhose</b> .....	1
1.1.1	Toxische Leberschädigung.....	3
1.1.2	Infektiöse Leberschädigung.....	4
1.1.3	Immunvermittelte Leberschädigung .....	5
1.1.4	Hereditär-metabolische Leberschädigung .....	6
<b>1.2</b>	<b>Mechanismen der Leberregeneration</b> .....	7
1.2.1	Rolle der hepatischen Progenitorzellen.....	8
1.2.2	Rolle der hepatischen Stellatumzellen.....	10
1.2.3	Rolle von Periostin und Tenascin C .....	12
1.2.4	Leberregeneration und Ätiologie der Schädigung .....	15
<b>1.3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	16
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	18
2.1.1	Geräte .....	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.3	Chemikalien .....	19
2.1.4	Puffer.....	20
2.1.5	Antikörper und Kits.....	21
2.1.6	Software.....	23
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	23
2.2.1	Ethikvotum.....	23
2.2.2	Probengewinnung .....	23
2.2.3	Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppeneinteilung und Interpretation der konventionellen Histologie .....	24
2.2.4	Immunhistochemie.....	25
2.2.5	Interpretation der immunhistochemischen Färbungen.....	30
2.2.6	Ermittlung des TNC-Gradienten .....	31
2.2.7	Statistische Auswertung.....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	32
<b>3.1</b>	<b>Patientenkohorte</b> .....	32
<b>3.2</b>	<b>Expressionsmuster der ECM-Proteine Tenascin C und Periostin</b> .....	33
3.2.1	Tenascin C .....	33
3.2.2	Tenascin C-Gradient.....	37

3.2.3	Periostin.....	42
<b>3.3</b>	<b>Lokalisation und Aktivität von HSC .....</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Lokalisation und Aktivität von hepatischen Progenitorzellen.....</b>	<b>45</b>
3.4.1	Duktuläre Reaktion in Bezug auf die Ätiologie der Leberschädigung.....	47
3.4.2	Duktuläre Reaktion in Bezug auf das Stadium der Leberschädigung .....	48
3.4.3	Zusammenhang duktuläre Reaktion und Tenascin C-Expression.....	49
3.4.4	Zusammenhang duktuläre Reaktion und Periostin-Expression .....	50
<b>3.5</b>	<b>Proliferation von Hepatozyten und biliären Ductuli .....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Rolle von Tenascin C und Periostin in der Leberschädigung und - regeneration .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>Rolle von hepatischen Stellate Cells in der Leberschädigung und - regeneration .....</b>	<b>58</b>
<b>4.3</b>	<b>Dynamik der duktulären Reaktion und Hepatozytenproliferation in der Leberschädigung und -regeneration .....</b>	<b>59</b>
<b>4.4</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>62</b>
<b>4.5</b>	<b>Stärken, Limitationen und Ausblick.....</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>77</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>78</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische Leberschädigung, Leberfibrose und Leberzirrhose

Mit einem Gewicht von circa 1,5 Kilogramm stellt die Leber die größte Drüse und das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers dar. Ihre Hauptaufgaben sind in der Verwertung von Nahrungsbestandteilen, der Produktion essentieller Proteine sowie im Abbau und in der Ausscheidung von Stoffen zu sehen. Eine Einschränkung der Synthese- und Stoffwechselfunktion der Leber geht mit schwerwiegenden Folgen einher. Diese können von einer erhöhten Blutungsneigung wegen fehlender Gerinnungsfaktoren, über eine portale Hypertension mit Aszites, Ausbildung portokavaler Umgehungskreisläufe und Splenomegalie bis hin zu einer hepatischen Enzephalopathie aufgrund eines Anstiegs toxischer Stoffwechselprodukte reichen (Manns und Cieplik 2016).

Schätzungen zufolge leiden in Deutschland vier bis fünf Millionen Menschen an chronischen Lebererkrankungen (Warpakowski 2018). Per definitionem bezeichnet der Begriff sämtliche pathologischen Prozesse der Leber, die mindestens sechs Monate lang andauern. Chronische Leberschädigungen werden durch eine Vielzahl von Grunderkrankungen unterschiedlicher Ätiologie verursacht (siehe Kapitel 1.1.1 bis 1.1.4), deren gemeinsame Endstrecke über eine zunehmende Fibrosierung in der Leberzirrhose mündet. Die Ursache für die Leberfibrose ist die anhaltende Gewebeschädigung mit nachfolgender Apoptose bzw. Nekrose von Hepatozyten. Durch die Freisetzung von lysosomalen Enzymen kommt es zur Umwandlung von Lipozyten und sogenannten hepatischen *stellate cells* (hepatische Stellatumzellen oder Ito-Zellen) in Kollagen-synthetisierende Zellen, wodurch immer mehr Lebergewebe durch Bindegewebe ersetzt wird. Die Leberfibrose selbst ist als dynamischer Prozess zu verstehen und trotz zunehmender Fibrosierung und Architekturstörung des Gewebes in frühen Stadien noch weitestgehend reversibel (Manns und Cieplik 2016). Die Therapie der Leberfibrose sieht eine konsequente Behandlung der Grunderkrankung vor, sowie die Ausschaltung sämtlicher möglicher Progressionsfaktoren.

Die objektive Beschreibung des Fibrosegrades geschieht entsprechend ihrer Histologie nach Leberbiopsie. Ein häufig angewandtes Bewertungsschema ist die Einteilung nach Desmet (Tabelle 1), wobei ein höherer Score mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Desmet et al. 1994).

**Tabelle 1: Fibrosegrade nach Desmet et al. (1994)**

<b>Score</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Histologie</b>
F0	keine Fibrose	keine Faservermehrung
F1	geringgradige Fibrose	portale Faservermehrung, keine Septen
F2	mittelgradige Fibrose	inkomplette oder komplette portoportale Fasersepten
F3	hochgradige Fibrose	septenbildende Faservermehrung mit Architekturstörung
F4	Zirrhose	wahrscheinlicher oder definitiver zirrhotischer Leberumbau

Die Leberzirrhose stellt das Endstadium eines jahreslangen strukturellen Umbaus der Leber dar, der wegen der Gewebnekrosen, des hohen Fibrosierungsgrades und knotigen Regenerationsarealen mit einem teilweisen oder vollständigen Verlust der Organfunktion verbunden ist. Klinisch wird die Leberzirrhose nach der Child-Pugh-Score in drei Stadien A, B und C eingeteilt, wobei Stadium C mit einer 1-Jahres-Überlebensrate von circa 45% eine hohe Mortalität aufweist (Mishra 2016). Während früher die Leberzirrhose als komplett irreversibel galt, ist die regenerative Fähigkeit des Organs nach Vernarbung heute umstritten (Marcellin et al. 2013; Lee et al. 2015).

Die Therapie der Leberzirrhose setzt sich aus allgemeinen Maßnahmen wie Alkoholabstinenz, Vermeidung leberschädlicher Medikamente und einer möglichst ausgewogenen Ernährung mit ausreichender Proteinzufuhr, die Behandlung der Grunderkrankung und die Therapie möglicher Komplikationen zusammen. Bei besonders schweren Leberschäden kann eine Lebertransplantation als Ultima Ratio erforderlich sein (Wiegand und Berg 2013).

Nachdem ungefähr 80% aller hepatozellulären Karzinome (HCC) auf dem Boden einer Leberzirrhose entstehen, sind entsprechende Untersuchungen in regelmäßigen Abständen indiziert (Harris et al. 2019).

In den folgenden Abschnitten werden die wesentlichen Mechanismen der chronischen Leberschädigung und die jeweils wichtigsten Erkrankungen beschrieben.

### 1.1.1 Toxische Leberschädigung

Die häufigste Ursache für chronische Lebererkrankungen in Deutschland ist ein chronisch überschwelliger Alkoholkonsum. Pathophysiologisch führt der übermäßige Alkoholkonsum nach dem enzymatischen Abbau zu Acetaldehyd zu einem Überangebot an Acetyl-CoA, welches für die Fettsäurebildung in der Leber genutzt wird. Gleichzeitig kommt es zu einer Veränderung des Alkoholstoffwechsels, in dem zunehmend das mikrosomale Äthanol-oxidierende System beim Abbau aktiv wird und lebertoxische Substanzen wie Acetaldehyd freisetzt. In den Anfangsstadien der äthyltoxischen Leberschädigung zeigt sich das Bild einer reversiblen alkoholischen Steatosis hepatis, aus der sich bei anhaltendem Alkoholabusus eine alkoholische Steatohepatitis entwickeln kann. Ohne Alkoholabstinenz kommt es bei ca. 25-30% der Betroffenen innerhalb von fünf Jahren zur Ausbildung einer mikronodulären Leberzirrhose mit entsprechend ungünstiger Prognose. Für die Aufnahme in die Warteliste zur Lebertransplantation ist der Nachweis einer sechsmonatigen Phase der Alkoholabstinenz gefordert, sodass für viele Alkoholiker mit Leberzirrhose lediglich supportive Maßnahmen möglich sind (Kasten 2016).

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) wird inzwischen als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms angesehen und bezeichnet eine Steatose der Leber, die mehr als 5% der Hepatozyten ausmacht. In der europäischen Bevölkerung liegt die Prävalenz der NAFLD zwischen 20 bis 30%, mit steigender Tendenz. Die Pathogenese der NAFLD ist noch nicht abschließend geklärt, allerdings führt das Missverhältnis von Lipidaufnahme und Lipogenese zu einer Akkumulation von Triglyzeriden in den Hepatozyten. Langfristig entwickelt sich bei etwa 5 bis 20% der Betroffenen eine

nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH). Diese geht wiederum in 10 bis 20% der Fälle in eine höhergradige Fibrose über und schreitet in ungefähr 5% zu einer Leberzirrhose voran (Weiß et al. 2014).

Seltenere Ursachen für chronisch-toxische Leberschäden sind Medikamente sowie Giftstoffe in der Umwelt oder am Arbeitsplatz. Die Schädigungsmechanismen sind sehr variabel und abhängig von einer Vielzahl von Faktoren wie eingenommene Substanz, Dosis, Patientenalter und Körpergewicht des Betroffenen (Manns und Cieplik 2016).

### 1.1.2 Infektiöse Leberschädigung

Die chronischen Hepatitiden B und C sind den spezifischen Virusinfektionen der Leber zuzurechnen. Die Begriffe Hepatitis B und C beziehen sich in diesem Abschnitt rein auf die chronischen Verläufe.

Mit einer globalen Prävalenz von ca. 350 Millionen Menschen zählt die Hepatitis-B-Infektion zu den häufigsten chronifizierten Infektionskrankheiten (Sharma et al. 2005). Das Virus wird über Sexualkontakte, parenteral oder perinatal übertragen und weist einen hochvariablen klinischen Verlauf auf. Bei immunkompetenten Erwachsenen treten chronische Verläufe in ungefähr 5 bis 10% der Fälle auf. Bei Menschen mit schwachem Immunsystem hingegen, liegt die Zahl der chronischen Verläufe deutlich höher (Zeuzem 2019). Bei Mutter-Kind-Übertragungen liegen die Chronifizierungsraten bei ca. 90%, während bei Kindern unter sechs Jahren chronische Verläufe in 25 bis 50% der Fälle beobachtet wurden (Trépo et al. 2014). Unbehandelt führt die Hepatitis-B-Infektion bei etwa 20% der Betroffenen innerhalb von zehn Jahren zu einer Leberzirrhose und stellt damit den wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung eines HCC dar. Dabei ist nicht die zytopathische Wirkung der Hepatitis-B-Viren für die Leberzellschädigung verantwortlich, sondern die Immunantwort des Infizierten (Manns und Cieplik 2016).

Schätzungen zufolge sind etwa 1% der Weltbevölkerung chronisch mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) infiziert, wobei die Prävalenzen regional große Unterschiede aufweisen (World Health Organization 2017). Die Übertragung geschieht in erster Linie parenteral über direkten Kontakt mit Blut, beispielsweise

durch kontaminierte Injektionsnadeln bei Drogenabusus oder beim Tätowieren, sowie – seltener – im Rahmen von Organtransplantationen oder Bluttransfusionen. Bei etwa 50 bis 85% aller HCV-Infizierten verläuft die Erkrankung chronisch und äußert sich mit unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit und Müdigkeit. Die HCV-Infektion äußert sich zunächst durch eine entzündliche Leberschädigung mit zunehmender Fibrosierung und nachfolgendem narbig-knotigem Umbau. Ein Fünftel der chronisch Erkrankten weist eine rasche Krankheitsprogression auf, bei der innerhalb von 20 Jahren eine Leberzirrhose auftritt (Webster et al. 2015). Als Risikofaktoren für eine schnelle Progression zur Leberzirrhose konnten bislang unter anderem ein höheres Alter bei Erstdiagnose, männliches Geschlecht, chronischer Alkoholkonsum, Ko-Infektionen mit HBV oder dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), Steatose, erhöhte Transaminasen und die chronische Niereninsuffizienz identifiziert werden (Thein et al. 2008). Das HCV gilt ebenfalls als Risikofaktor für die Entstehung eines HCC mit einer jährlichen Erkrankungsrate von etwa 4%. Weltweit sind ungefähr ein Viertel aller Leberzirrhosen und HCC-Erkrankungen auf eine HCV-Infektion zurückzuführen (Hoshida et al. 2014).

### 1.1.3 Immunvermittelte Leberschädigung

Immunvermittelte Lebererkrankungen wie die Autoimmunhepatitis (AIH), die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und die primär biliäre Cholangitis (PBC) beruhen allesamt auf einer Fehlregulation des körpereigenen Immunsystems. Mit einer Prävalenz von 10-30/100.000 Einwohner ist die AIH eine seltene Lebererkrankung mit meist chronischem Verlauf. Pathophysiologisch führt die fehlerhafte Aktivierung von organspezifischen oder -unspezifischen Immunzellen gegen hepatische Antigene zu einer Zerstörung der Hepatozyten. Unbehandelt finden ein fibrotischer und später auch zirrhotischer Umbau der Leber statt. Frühe Verlaufsformen (ca. 10% der Fälle) treten bereits im Alter von 10 bis 30 Jahre auf, wobei die schleichende und unspezifische Krankheitssymptomatik in einer späten Diagnosestellung resultiert. Bei dieser schweren Form haben bereits etwa 70% der Betroffenen bei Diagnosestellung eine Leberzirrhose (Köppen 2010).

Die PSC beschreibt einen chronisch progredienten Entzündungsprozess der intra- und extrahepatischen Gallenwege, der über eine zunehmende Sklerosierung zur Cholestase führt. Dabei kommt es zu einer direkten Schädigung der Membranen des Gallengangepithels und der Hepatozyten, mit nachfolgender Fibrose- und Zirrhoseentwicklung. Die Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung sind noch nicht abschließend geklärt, allerdings wird wegen der familiären Häufung und der nachgewiesenen Assoziation mit Immunglobulinen von einer immunologischen Genese ausgegangen. Chronische bakterielle oder virale Infektionen, Dysregulation des Mikrobioms, ischämische Gallengangsschädigungen sowie einer entsprechenden genetischen Prädisposition sind bereits im Zusammenhang mit der Entstehung der PSC diskutiert worden. Die Prävalenz in Deutschland liegt bei 4-16/100.000 Einwohner, wobei eine besondere Häufung in Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn festgestellt wurde. Im frühen Stadium verläuft die PSC weitestgehend asymptomatisch, sodass von den ersten Symptomen bis zur Diagnosestellung im Mittel etwa zwei Jahre vergehen. Ohne Lebertransplantation beträgt die mittlere Überlebenszeit bei PSC-

en ab Erstdiagnose 12 bis 18 Jahre (Lutz et al. 2013).

Die PBC ist eine durch Autoantikörper ausgelöste, nicht-eitrige Entzündung der kleinen, intrahepatischen Gallenwege mit chronischem Verlauf, die mit der Entwicklung einer Leberfibrose einhergeht. Die Prävalenz wird mit 2-40/100.000 Einwohner angegeben, wobei Frauen mittleren Alters am häufigsten betroffen sind. Wie bei der PSC, ist auch hier die Ätiologie der Erkrankung noch unbekannt. Im Endstadium kann die Erkrankung in eine Leberzirrhose übergehen, weshalb die Erkrankung früher als primär biliäre Zirrhose bezeichnet wurde (Manns und Cieplik 2016).

#### 1.1.4 Hereditär-metabolische Leberschädigung

Die primäre hereditäre Hämochromatose ist eine autosomal-rezessiv vererbliche Eisenspeicherkrankheit, die mit Eisenablagerungen in unterschiedlichen Organen wie Leber, Pankreas, Herz und Milz einhergeht. Mit

einer Prävalenz von ca. 1/1000 stellt sie die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung der weißen Bevölkerung dar. Eine Punktmutation im HFE-Gen führt zu einer zwei- bis vierfach gesteigerten Eisenresorption im oberen Dünndarm, wobei jährlich ein Gramm Eisen zu viel vom Körper aufgenommen wird. Der schleichende und oftmals weitestgehend asymptotische Krankheitsverlauf hat zur Folge, dass die Krankheit oft erst im fortgeschrittenen Stadium, zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr, diagnostiziert wird. Bei ca. 60 bis 80% der Betroffenen verursachen die Eisenablagerungen eine Leberzirrhose, die in 50% der Fälle mit einem tödlichen HCC assoziiert ist (Köppen 2010).

Der Morbus Wilson ist ebenfalls eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, die mit einer Prävalenz von ca. 1/30.000 recht selten auftritt. Pathophysiologisch führt eine Mutation im Wilson-Gen (*ATP7B*) zum Funktionsverlust eines Membrantransportproteins für Kupfer-Ionen. Nachdem die Ausscheidung über die Galle gestört ist, reichert sich Kupfer unter anderem in der Leber an und löst dort lokale Entzündungsreaktionen aus, die bis zur Leberzirrhose fortschreiten können (Hermann et al. 2012).

## **1.2 Mechanismen der Leberregeneration**

Die Leber besitzt eine außerordentlich hohe Fähigkeit zur Regeneration, eine Tatsache, die insbesondere nach einer Leberteilektomie oder anderen akuten Schädigungen zu beobachten ist. Anhaltende Leberschädigungen führen jedoch, weitestgehend unabhängig von der auslösenden Noxe, zu einer chronischen Entzündungsreaktion und Fibrogenese. Die Mechanismen der Leberregeneration bei chronischer Leberschädigung sind derzeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Während in älteren Studien die Einwanderung, Proliferation und Transdifferenzierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark zu Hepatozyten als mögliche Quelle der Leberregeneration angesehen wurde (Theise et al. 2000; Craig et al. 2004), wird dieser Regenerationsart aufgrund ihrer Seltenheit heute eine nur geringe Bedeutung zugeordnet (Duncan et al. 2009). Eine weitaus größere Bedeutung für die Regeneration bei chronischer Leberschädigung wird dem Phänomen der duktilären Reaktion zugeschrieben (Sato et al. 2019). Dabei handelt es sich um einen reversiblen Prozess, der durch die Aktivierung von hepatischen

Progenitorzellen (HPC) und deren Differenzierung zu reifen Hepatozyten gekennzeichnet ist (Roskams et al. 2004). Diese in einer speziellen Mikroumgebung (Nische) aus extrazellulären Matrixmolekülen und rekrutierten Immunzellen ablaufende duktiläre Reaktion bewirkt letztendlich einen Ersatz des nekrotischen Gewebes, wodurch es zur Regeneration des Leberparenchyms kommen kann.

In den nachfolgenden Abschnitten wird genauer auf die Rolle der HPC, hepatischen stellate cells (HSC) und extrazellulären Matrixproteine Tenascin C und Periostin bei der Leberregeneration nach chronischer Leberschädigung eingegangen.

### 1.2.1 Rolle der hepatischen Progenitorzellen

Bei chronischen Leberschädigungen werden fakultative Leberzellkompartimente aktiviert, die im Normalzustand ruhen und Eigenschaften von Stammzellen besitzen (Lowes et al. 1999; Roskams et al. 2003). Der Begriff fakultativ bezeichnet dabei die Tatsache, dass diese besonderen Leberzellkompartimente in der gesunden Leber nicht als solche identifizierbar sind. In Folge der Aktivierung kommt es zur Proliferation bipotenter Leberzellkompartimente, die sich über verschiedene Zwischenstufen zu Hepatozyten oder Cholangiozyten differenzieren. Aus welchem Zellkompartiment die bipotenten Leberzellkompartimente stammen, ist noch nicht abschließend geklärt, allerdings ist die Existenz von mindestens vier unterschiedlichen Stammzellnischen bekannt (Kuwahara et al. 2008). Die bekannteste Hypothese geht von einem Ursprung in den Hering-Kanälchen aus, jedoch werden auch andere Bereiche der Leber als mögliche Stammzellnischen diskutiert (siehe Kapitel 1.2.2). Unter anderem wurde in zahlreichen *in vitro* und tierexperimentellen Studien beobachtet, dass reife Hepatozyten unter dem Einfluss chronischer Verletzungen zu Leberzellkompartimenten dedifferenzieren können (Chen et al. 2012b; Yanger et al. 2013; Sekiya und Suzuki 2014; Tanimizu et al. 2014). Dabei bleiben den dedifferenzierten Hepatozyten Merkmale des originären Zustandes erhalten, sodass nach Abklingen der Schädigung wieder eine Umwandlung zu reifen Hepatozyten erfolgt (Tarlow et al. 2014).

Die bipotenten Lebervorläuferzellen wurden ursprünglich in Rattenexperimenten entdeckt und aufgrund ihrer charakteristischen morphologischen Erscheinung als Ovalzellen bezeichnet (Farber 1956). Für das humane Äquivalent finden sich in der Literatur eine Vielfalt von Begriffen, unter anderem duktiläre Hepatozyten, *ductular reactive cells*, hepatische Vorläuferzelle, hepatische Stammzelle, transit-amplifizierende Zellen und hepatische Progenitorzellen (*hepatic progenitor cells*, HPC). In dieser Arbeit wird der Begriff HPC synonym für sämtliche in der Literatur gebräuchlichen Bezeichnungen für humanen Leberprogenitorzellen verwendet.

In histopathologischen Untersuchungen von humanen Gewebeproben aus Leberbiopsien konnte mithilfe histologischer und immunhistochemischer Methoden eine starke Korrelation zwischen dem Ausmaß der chronischen Organschädigung und der Zahl der HPC nachgewiesen werden. Dabei nahm die Zellzahl mit steigendem Fibrosegrad zu (Lowe et al. 1999; Roskams et al. 2003). In einer weiteren Studie korrelierte der Fibrosegrad zudem mit der Fläche der duktilären Reaktion (Clouston et al. 2005).

Der Nachweis von HPC ist bereits in vielen chronischen Lebererkrankungen wie alkoholische Steatohepatitis (Sancho-Bru et al. 2012; Dubuquoy et al. 2015), NAFLD (Gadd et al. 2014), chronischer Hepatitis B und C (Sun et al. 2006; Prakoso et al. 2014) sowie PBC und PSC (Crosby et al. 1998) gelungen. Allerdings ist der Immunphänotyp von HPC bislang schlecht charakterisiert und es mangelt an spezifischen Markern (Sato et al. 2019). Gängige etablierte Marker sind A6, OV6, EpCAM, NCAM, Lgr5, TROP2, CD24, CD133, NGA2, CXCR4, AFP, CK7, CK19 und Sox9. Die Genauigkeit der HPC-Bestimmung kann jedoch mittels Kombination mehrerer Expressionsmarker erhöht werden (Adnindya et al. 2017).

Insgesamt erscheint das derzeitige Wissen um die Rolle der HPC im Rahmen der Leberregeneration noch lückenhaft, was auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren zurückzuführen ist. So liegen HPC physiologisch in gesunder Leber nur in sehr geringer Zahl vor und auch die Methoden zur Isolierung und Kultivierung der Zellen variieren stark unter den Forschungsgruppen. Derzeit müssen zur Charakterisierung der funktionellen

Rolle von HPC in der Leberregeneration Tiermodelle verwendet werden. Neben der grundsätzlichen Problematik, dass Tiermodelle nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind, müssen je nach Spezies (beispielsweise Ratte, Maus, Zebrafisch, etc.) und in Abhängigkeit von der darzustellenden chronischen Lebererkrankung unterschiedliche Modelle angewandt werden. Außerdem fehlen längere Beobachtungszeiträume von mehreren Monaten, wie sie für die Analogie zur chronischen Leberschädigung beim Menschen erforderlich wären (Sadri et al. 2016; Sato et al. 2019).

### 1.2.2 Rolle der hepatischen Stellatumzellen

Hepatische stellate cells (HSC) gehören zu den nicht-parenchymatösen Zellen der Leber und wurden bis zur Einigung auf einen einheitlichen Namen im Jahre 1996 auch als Ito-Zellen, Sternzellen (nicht zu verwechseln mit den Kupffer'schen Sternzellen der Leber), Perisinusoidalzellen oder perisinusoidale Lipozyten bezeichnet. Die HSC sind in der ruhenden (quieszenten) Leber im Disse'schen Raum lokalisiert und speichern in ihrem Zytoplasma Lipidtröpfchen mit Retinoiden (Vitamin A). Ihr Anteil an den hepatischen Zellen beträgt lediglich ein Prozent, jedoch speichern sie im Ruhezustand ungefähr 80% des im menschlichen Körper vorhandenen Vitamin A (Blaner et al. 2009).

Im Rahmen von Leberschädigungen wird – unabhängig von der Art der auslösenden Noxe – der Aktivierungsprozess der HSC in Gang gesetzt, der mit einer Vielzahl von morphologischen und funktionellen Änderungen einhergeht. Die HSC transdifferenzieren unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies und *damage-associated molecular patterns* (DAMP) zu kontraktile Myofibroblasten, was sich anhand der verstärkten Expression von *α-smooth muscle-actin* ( $\alpha$ SMA) nachweisen lässt. Aktivierte HSC zeichnen sich weiterhin durch erhöhte Proliferationsraten, eine durch *platelet-derived growth factor* (PDGF)-vermittelte Fähigkeit zur Migration, der Verlust der Vitamin-A-Vesikel und die durch *tumor growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) -induzierte Sekretion von Typ-I-Kollagen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, proinflammatorischen Mediatoren und Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) aus (Friedman 2008).

Mit der ECM-Sekretion wird eine Reduktion der Expressionsraten von Matrix-Metalloproteasen eingeleitet, die eine Hemmung des ECM-Abbaus bewirkt. Nachdem aktivierte HSC kontraktile Filamente beinhalten und Rezeptoren für vasoaktive Substanzen wie Endothelin aufweisen, sind sie dazu in der Lage, die Perfusion der Sinusoide zu regulieren. Damit spielen sie eine wichtige Rolle bei der Erhöhung des portalen Drucks im Rahmen der Leberzirrhose (Reynaert et al. 2002). Ein Wegfall der auslösenden Noxe mit nachfolgender Inaktivierung von aktivierten HSC kann zu einer Regression der Fibrose führen. Dies geschieht, indem die aktivierten HSC wieder in den quieszenten Zustand übergehen oder vermehrt der Apoptose unterliegen (Ghiassi-Nejad und Friedman 2008; Lee et al. 2015). Lange Zeit wurden die aktivierten HSC daher als primäre Auslöser und Unterhalter der Leberfibrosegenese angesehen.

Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass HSC die mesenchymalen Stammzellen der Leber darstellen und somit auch einen Beitrag zur Leberregeneration leisten können (Kordes et al. 2013). HSC weisen molekulare Marker von Stammzellen auf und exprimieren unter anderem CD133, CD44, CD73, CD105, CD271 und Nestin (Kordes et al. 2007; Castilho-Fernandes et al. 2011). Zudem weisen HSC eine gewisse Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli wie toxischen Gallensäuren (Sommerfeld et al. 2009) oder Liganden des CD95-Rezeptors auf (Reinehr et al. 2008). Im Gegensatz zu anderen Leberparenchymzellen führten die genannten apoptotischen Stimuli zu einer Proliferation in quieszenten HSC.

Der Disse'sche Raum stellt die Stammzellnische für die HSC dar. Stammzellnischen zeichnen sich als Mikroumgebungen aus, in denen Stammzellen geschützt in ihrem undifferenzierten und selbstreplizierenden Zustand erhalten werden (Fuchs et al. 2004). Die Basallamina der Stammzellnische setzt sich vorwiegend aus Laminin und Typ-IV-Kollagen zusammen (Sawitza et al. 2009) und die Nische selbst wird durch das sympathische Nervensystem innerviert (Kordes und Häussinger 2013). Der von den HSC exprimierte CXCL12-Chemokin-Typ4-Rezeptor vermittelt im hämatopoetischen System die Lokalisation von blutzellbildenden Stammzellen

und stellt ein weiteres Indiz für den Stammzellcharakter der HSC dar (Sawitza et al. 2009).

Das Regenerationspotential von HSC ist in Tierexperimenten und *in vitro* Studien bereits gut untersucht. Im Mausmodell führte ein entsprechender Proliferationsstimulus, über eine mesenchymale Zwischenphase, zu der Umwandlung von HSC in Albumin-produzierende Hepatozyten (Yang et al. 2008). In einer anderen *in vitro* Untersuchung ließen sich HSC unter anderem zu Hepatozyten-ähnliche Zellen differenzieren (Kordes et al. 2007). Transplantationsexperimente mit isolierten HSC der Leber beziehungsweise PSC (pankreatische *stellate cells*) des Pankreas konnte im Rattenmodell nach der Behandlung mit den Wachstumsfaktoren *hepatocyte growth factor* (HGF) und *fibroblast growth factor* (FGF) eine erfolgreiche Repopularisierung der geschädigten Leber bewirken (Kordes et al. 2012; Kordes et al. 2014). In einer *loss of function*-Studie verhinderte die Inhibition aktivierter HSC mittels Gliotoxin die Regeneration der Leber. Dabei wurde eine 66%-ige Reduktion der proliferierenden Hepatozyten beobachtet, bei gleichzeitiger Verdreifachung der Apoptose von Hepatozyten (Shen et al. 2011). Eine L-Cystein-Diät führte im Rattenmodell zu einer elffach verminderten Aktivierung von HSC, mit einer um fast 80% reduzierten Ovalzellantwort (Pintilie et al. 2010). Möglicherweise verändern die HSC ihr Zytokin-Expressionsprofil im Verlauf des Regenerationsprozesses und sind sowohl für die Steuerung der Initiation als auch der Termination der Leberregeneration verantwortlich (Chen et al. 2012a). Obwohl HSC eines der Hauptproduzenten von TGF- $\beta$  darstellen und TGF- $\beta$  eine antiproliferative Wirkung auf Hepatozyten hat, waren im Rattenmodell in der initialen Regenerationsphase die Konzentration an *hepatocyte growth factor* und die Ovalzellproliferation deutlich erhöht. In der terminalen Phase hingegen war die TGF- $\beta$ -Konzentration hoch und die Proliferation der Ovalzellen eingeschränkt (Chen et al. 2012a).

### 1.2.3 Rolle von Periostin und Tenascin C

Periostin und Tenascin C sind zwei nichtstrukturelle ECM-Proteine, die im Rahmen der Geweberegeneration vermehrt sezerniert werden. Das 90 kDa Protein Periostin (POSTN) gehört zur Fasciclin-Familie und ist nach seiner

Expression im Periost der langen Röhrenknochen benannt. Derzeit sind vier verschiedene Isoformen bekannt, die sich in der Länge der C-terminalen Domäne unterscheiden. Die Funktionen von POSTN sind vielfältig: POSTN kann mit verschiedenen Integrinen interagieren, als Adhäsionsmolekül dienen und vermittelt Signale zur Differenzierung, zum Wachstum und beim Remodelling von Gewebe (Kudo 2017). Beim Erwachsenen sind die Expressionsraten typischerweise niedrig und auf die Gewebe, die einer ständigen mechanischen Belastung ausgesetzt sind, beschränkt. So finden sich die höchsten Konzentrationen physiologisch in Aorta, Magen, Uterus und im Bereich der Parodontalligamente. Daneben ist POSTN Mediator bei epidermalen Wundheilungsprozessen und moduliert den Gewebeumbau nach einem Myokardinfarkt (Kühn et al. 2007). Eine Beteiligung an der Progression von Tumorerkrankungen und allergischen Entzündungen scheint ebenfalls möglich (Morra und Moch 2011).

Das oligomere Glykoprotein Tenascin C (TNC) setzt sich aus sechs Monomeren mit einem Molekulargewicht von 180 bis 250 kDa zusammen und weist zahlreiche Isoformen auf. Aufgrund seiner multidomänen Struktur kann TNC mit mehr als 25 anderen Zelltypen und Matrixmolekülen, unter anderem auch Fibronectin, interagieren und dabei sehr unterschiedliche Wirkungen auslösen. Weiterhin ist eine adhäsionsmodulierende Wirkung bekannt (Pas et al. 2006).

Das Protein wird primär während der Embryonalentwicklung im mesenchymalen Gewebe exprimiert. Beim gesunden Erwachsenen ist TNC nach Abschluss der Organogenese nur in wenigen Geweben nachweisbar. Dazu zählen das Perichondrium, Periost, Endost sowie die Basalmembranen von Dickdarmschleimhaut und Gefäßwänden. Eine vermehrte TNC-Expression tritt ansonsten nur unter pathologischen Bedingungen auf, beispielsweise bei Neoplasien oder Entzündungs- und Wundheilungsprozessen (Ma et al. 2016).

In einigen Studien waren größere TNC-Isoformen mit einer gesteigerten Progression, Invasivität und erhöhten Mortalitätsraten bei malignen Tumoren von Brust (Oskarsson et al. 2011), Lunge (Gocheva et al. 2017), Pankreas (Paron et al. 2011) und Kolon (Yang et al. 2018) assoziiert. Jedoch wurden in anderen

Untersuchungen teilweise keine derartigen Zusammenhänge gefunden und daher anti-metastatische Effekte für TNC vermutet (Giblin und Midwood 2015).

Die TNC-Expression wird von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , *fibroblast growth factor* und *platelet derived growth factor* sowie proinflammatorischen Zytokinen induziert. Nachdem die TNC-Expression nur vorübergehend auftritt, liegt die Vermutung nahe, dass das Glykoprotein unter normalen Bedingungen einer strengen Regulation durch seine Mikroumgebung unterliegt (Midwood et al. 2016).

Die Rolle von TNC und POSTN in der chronisch kranken Leber wurde bislang nur selten untersucht. Aus immunhistochemischen Studien geht hervor, dass TNC und POSTN von HSC exprimiert werden (Yamada et al. 1992; Huang et al. 2015) und dass die Expression beim Wandel vom quieszenten zum aktivierten HSC stark hochreguliert wird (Jiang et al. 2006).

Tierexperimentelle Studien mit unterschiedlichen Mausmodellen haben POSTN als wesentlichen Faktor bei der Progression von NASH ausgemacht (Lu et al. 2014; Li et al. 2015). In klinischen Studien wiesen Patienten und Patientinnen mit NAFLD höhere POSTN-Konzentrationen im Serum und in der Leber auf (Lu et al. 2014; Yang et al. 2016). Die erhöhte POSTN-Serumkonzentration korrelierte dabei mit der Menge an Transaminasen und dem Hüftumfang der Patienten und Patientinnen und war mit einem *Odds Ratio* von 1,75 [95% Konfidenzintervall (1,04-3,37);  $p < 0,001$ ] für NAFLD und Insulinresistenz assoziiert. In leberkranken Wildtyp-Mäusen führte die Anwesenheit von POSTN zu einer signifikant höheren Entzündungs- und Fibrosereaktion als in den POSTN-KO-Mäusen. Die POSTN-Expression wurde dabei durch TGF- $\beta$  induziert und es bestand ein Zusammenhang zwischen den POSTN-Konzentrationen und der TGF- $\beta$ -Expression in Patienten und Patientinnen mit chronischer HBV (Huang et al. 2015).

In einer älteren Untersuchung wurde im Mausmodell mit Concanavalin-A-induzierter fibrotischer Leberschädigung eine signifikante Erhöhung von Fibrosegeneseparametern in Wildtyp (WT)-Mäusen gegenüber TNC-*knockout* (KO)-Mäusen beobachtet (El-Karef et al. 2007a). Die WT-Mäuse wiesen außerdem mehr aktivierte HSC auf. Eine weitere Studie derselben Arbeitsgruppe

zeigte einen Zusammenhang zwischen der Expression von TNC und der Aktivierung von HSC bei chronischer HCV (El-Karef et al. 2007b).

Eine Untersuchung an Patienten und Patientinnen mit chronischer HCV-Infektion zeigte signifikant erhöhte TNC-Serumkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Die TNC-Serumkonzentration korrelierte jedoch nicht mit dem Fibrosegrad gemessen an den Desmet-Stadien, sondern mit dem Ausmaß der sogenannten Mottenfraß-Nekrose (Piecemeal-Nekrose) (Tanaka et al. 2006). Die Wertigkeit von TNC als Fibrose-Marker im Verlauf der Interferon-Therapie von pädiatrischen Patienten und Patientinnen mit chronischer HBV-Infektion war Gegenstand einer prospektiven klinischen Studie. Während der Behandlung war die TNC-Serumkonzentration sowohl bei den Therapie-Respondern als auch bei den Non-Respondern erniedrigt und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den TNC-Konzentrationen und Fibrosegraden festgestellt werden (Lebensztejn et al. 2006). Im Gegensatz dazu korrelierte TNC signifikant mit dem Fibrose-Score in Patienten und Patientinnen mit äthyltoxischer Leberschädigung (Lieber et al. 2008). Nachdem in den aufgeführten Studien unterschiedliche TNC-Unterformen und Fibrose-Bewertungsschemata angewandt wurden, könnten die abweichenden Ergebnisse darauf zurückzuführen sein.

#### 1.2.4 Leberregeneration und Ätiologie der Schädigung

Zu speziellen Erkenntnissen, die sich auf die Regeneration bestimmter chronischer Leberschädigungsarten beziehen, gibt es bislang nur wenige Untersuchungen. Van Haele et al. (2019) bemerkten in einem Review, dass derzeit zu wenige Nachweismöglichkeiten für Untersuchungen am Menschen zur Verfügung stehen. Die aktuellen immunhistochemischen und morphologischen Analysen reichen aktuell noch nicht aus, um den Ursprung beziehungsweise die Herkunft der intermediären Hepatozyten (Hepatozyten, die bezüglich ihres Ausreifungsgrades zwischen Progenitorzellen und reifen Hepatozyten liegen) zweifelsfrei nachzuweisen. Die Autoren kamen insgesamt zu dem Schluss, dass sich zwar die Regenerationsvorgänge bei den unterschiedlichen chronischen Leberschädigungsätiologien teilweise ähneln oder sogar identisch sind, es

jedoch durchaus individuelle Differenzen in Bezug auf die Art der Schädigung gibt.

So konnten Zusammenhänge zwischen dem Auftreten einer duktilären Reaktion und unterschiedlichen chronischen Leberschädigungsarten aufgezeigt werden. In zwei Untersuchungen mit Leberbiopsien von NASH-Patienten und -Patientinnen korrelierte die Prävalenz der zentrolobulären duktilären Reaktion mit dem Fibrosierungsgrad (Richardson et al. 2007; Zhao et al. 2018). Eine Studie enthielt einen longitudinalen Anteil, wobei das Auftreten der duktilären Reaktion signifikant mit der Fibrose-Progression assoziiert war (Zhao et al. 2018). In beiden Studien wurde die duktiläre Reaktion als Prädiktor für die Krankheitsprogression gewertet. Für HCV und NAFLD korrelierte die duktiläre Reaktion mit der Menge an vorhandenen intermediären Hepatozyten (Prakoso et al. 2014; Lanthier et al. 2015).

HSC interagierten via Neurotransmitter mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen über komplexe Signalwege wie Wnt oder Hedgehog. Die differentielle Genexpression der duktilären Reaktion bei HCV- und PSC-Patienten und Patientinnen war der Fokus einer Untersuchung von Govaere et al. (2019). Dabei wurden, in Abhängigkeit von der Ätiologie der Leberschädigung, Unterschiede hinsichtlich der Genexpression für ECM-Proteine und bestimmte Makrophagen-Rezeptoren festgestellt. Beispielsweise wiesen HCV-Patienten und -Patientinnen weniger ECM-assoziierte Gene auf im Vergleich zu den PSC-Patienten und -Patientinnen.

Zusammenfassend lässt sich also postulieren, dass deutliche Hinweise darauf bestehen, dass Mechanismen der Leberregeneration sich durchaus je nach Ätiologie der Leberschädigung in gewissen Punkten unterscheiden.

### **1.3 Ziele der Arbeit**

Die besondere Regenerationsfähigkeit der Leber gewinnt insbesondere vor dem Hintergrund der steigenden Inzidenzen der chronischen Lebererkrankungen zunehmend an Bedeutung. Ein verbessertes Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Leberregeneration könnte zu einer Revolutionierung der heutigen Therapiemöglichkeiten führen, indem bereits die

Entwicklung einer Fibrose gehemmt oder aber Regenerationsprozesse gezielt unterstützt werden könnten. Tierexperimentelle Befunde legen nahe, dass im Rahmen der Leberregeneration neben der fibrotischen Reaktion auch eine reversible duktiläre Reaktion mit Proliferation von hepatischen Progenitorzellen in einer Nische aus extrazellulärer Matrix und Immunzellen ausgelöst wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, welche Funktionen die extrazellulären Matrixproteine Tenascin C und Periostin in der Leberregeneration einnehmen. Von besonderem Interesse war dabei, inwieweit die beiden Proteine die Aktivierung und Expansion von hepatischen Progenitorzellen beeinflussen und/oder deren Differenzierung zu Hepatozyten regulieren. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Expression von Tenascin C und Periostin mit pathophysiologischen Parametern korreliert.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Kochplatte (Einzelkochplatte THS 2022/E Gastro)	ROMMELSBACHER ElektroHausgeräte GmbH (Dinkelsbühl, Deutschland)
Magnetrührer (IKAMAG® RCT)	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Mikroskop (Zeiss Axioskop 2 plus)	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
PAP pen	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg, Deutschland)
pH-Meter (HI-2020 edge®)	Hanna Instruments GmbH (Vöhringen, Deutschland)
Pipetten (Eppendorf Research® plus)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Schlittenmikrotom (HM 430)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Schnellkochtopf (vitaquick® pressure cooker)	Fissler GmbH (Idar-Oberstein, Deutschland)
Universalschrank (universal oven UF75)	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Vortex Mixer (Vortex Genie® 2)	Bender & Hobein GmbH (Ismaning, Deutschland)
Wasserbad	LABORTECHNIK GmbH & Co. KG (Lonsee-Ettlenschließ, Deutschland)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Adhäsive Objektträger (StarFrost Advanced Adhesive)	Engelbrecht GmbH (Edermünde, Deutschland)
Deckgläser 24 x 50 mm	Engelbrecht GmbH (Edermünde, Deutschland)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Pipettenspitzen (TipOne® 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	STARLAB International GmbH (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,2 – 2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Stripetten	Costar (Tewksbury, USA)

### 2.1.3 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
DAB Substrate Kit	Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Dulbecco`s phosphate buffered saline (DPBS)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol ≥ 99,5 %, vergä llt mit 1 % Methylethylketon (MEK)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol 70 %	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Eukitt® Quick-hardening mounting medium	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Normal goat serum	Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Paraffin	Engelbrecht GmbH (Edermünde, Deutschland)
Pronase	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tris	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tween 20	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Xylene	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

#### 2.1.4 Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Chemikalien / Herstellung</b>
Blocking Solution	Bovine serum albumin 1 % in PBS Goat serum 10 % Triton X-100 0,1 %
Natrium Citratpuffer, pH 6,0	10 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit Aqua dest. auffüllen
TBS (10x), pH 7,6	250 mM Tris HCl 1400 mM NaCl mit Aqua dest. auffüllen

### 2.1.5 Antikörper und Kits

<b>Spezifizität</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer</b>
Anti-POSTN	1:200	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	HPA012306
Anti- $\alpha$ SMA	1:200	Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab5694
Anti-SOX9	1:1000	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	AB5535
Anti-TNC Monoclonal Antibody	IHC 1:300	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	MA1-26779
Anti-CK7	1:100	Zytomed Systems (Berlin, Deutschland)	MSK032
Anti-Desmin	1:200	Dako Agilent (Santa Clara, USA)	M 0760 01
Anti-CD56	1:100	Dako Agilent (Santa Clara, USA)	M 7304 01
Anti- Synaptophysin	1:100	Leica Biosystems (Buffalo Grove, USA)	NCL-L-SYNAP-299
Anti-AFP	1:1200	Dako Agilent (Santa Clara, USA)	A 0008 29
Anti-EpCAM	1:400	Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab269810
Anti-Ki67	1:200	BD Biosciences (San José, USA)	561283

<b>Kit</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Peroxidase	Maus	Vector laboratories Inc. (Burlingame, USA)
VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Peroxidase	Kaninchen	Vector laboratories Inc. (Burlingame, USA)
ZytoChem Plus (HRP) One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit/Rat	Maus Kaninchen Ratte	Zytomed Systems (Berlin, Deutschland)

## 2.1.6 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Microsoft Office 365	Microsoft (Redmond, USA)
IBM SPSS Statistics 27	International Business Machines Corporation (New York, USA)
ZEISS ZEN	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena (Deutschland))

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Ethikvotum

Das Studienprotokoll wurde im Vorfeld der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Prüfung vorgelegt. Der Antrag mit der Nummer 5387 wurde nach der Prüfung positiv beschieden. Die Analysen an humanem Paraffingewebe von Patienten und Patientinnen mit chronischer Leberschädigung wurden im Rahmen des Projekts „Funktionelle Relevanz der extrazellulären Matrixmoleküle Periostin und Tenascin C bei Leberschädigung und Regeneration“ unter der Projektkennung 190586431 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

### 2.2.2 Probengewinnung

Die untersuchten Präparate stammen allesamt von Patientinnen und Patienten mit chronischer Leberschädigung, welche sich zwischen 2002 und 2018 an der Universitätsmedizin vorgestellt hatten und bei denen zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken Gewebeproben der Leber entnommen wurden. Es handelte sich bei den zur Verfügung stehenden (humanen) Gewebeproben demnach teilweise um Biopsate und teilweise um Resektate, welche den histopathologischen Untersuchungen der Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zugeführt wurden. Die Suche nach Proben mit diagnostizierter chronischer Leberschädigung erfolgte mit Hilfe des Programms Pathologie-Management-Systems dc-Pathos (dc-systeme Informatik GmbH, Heiligenhaus, Deutschland).

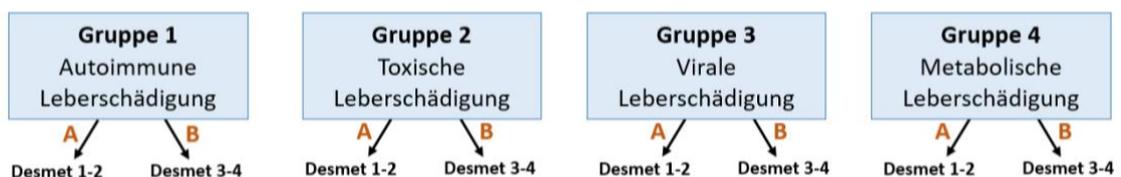
### 2.2.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppeneinteilung und Interpretation der konventionellen Histologie

Alle Leberproben wurden erstmals in der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung im Hinblick auf die vorliegenden Desmet-Stadien untersucht. Bei dieser Routine-Färbung wurden das Zytoplasma und interzelluläre Substanzen rosa gefärbt, wohingegen die Zellkerne eine blau-violette Färbung annahmen. Vor der Färbung wurden die Schnitte in typischer Weise zunächst entparaffiniert und rehydriert. Es folgten das Färben in Mayers Hämalaunlösung für 3 Minuten und das Differenzieren in fließendem Leitungswasser für 3 – 5 Minuten. Danach wurde für 3 Minuten in Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig gefärbt und anschließend circa 30 Sekunden lang mit Leitungswasser gespült. Die Dehydrierung wurde mit einer ansteigenden Alkoholreihe vorgenommen, bevor das gefärbte Präparat eingedeckt wurde.

Für die Auswertung wurden die Proben entsprechend ihrer histologischen Diagnose in den folgenden vier übergeordneten Gruppen eingeteilt:

- Gruppe 1: Immunvermittelte Leberschädigung
- Gruppe 2: Toxische Leberschädigung
- Gruppe 3: Virale Leberschädigung
- Gruppe 4: Metabolische Leberschädigung

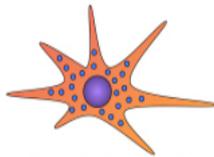
Innerhalb der vier Gruppen wurden die Proben entsprechend ihres Fibrosegrades und Desmet-Scores jeweils noch in zwei Subgruppen A und B unterteilt. Dabei enthielt die Subgruppe A alle Proben mit gering- oder mittelgradiger Fibrose (Desmet-Score 1 oder 2) und die Subgruppe B sämtliche Gewebeproben mit hochgradiger Fibrose oder Zirrhose (Desmet-Score 3 oder 4) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Übersicht Gruppeneinteilung und Subgruppierungen**

## 2.2.4 Immunhistochemie

Die Gewebeproben wurden mithilfe von immunhistochemischen Färbungen gegen POSTN, TNC C, HPC-Markern und Stellatumzell-Markern auf die Expression und Lokalisation der Proteine untersucht. Dazu wurden die folgenden Marker eingesetzt (Abbildung 2):

 <b>Marker für Hepatische Stammzellen</b>	 <b>Marker für Stellatumzellen</b>
EpCAM	TNC
SOX9	POSTN
AFP	NCAM
NCAM	$\alpha$ SMA
CK7 / (CK19)	Synaptophysin
	Desmin

**Abbildung 2: Verwendete Marker**

Ferner kam das Ki-67 Protein als Marker zur Bestimmung der Proliferationsraten zum Einsatz. Dazu wurden jeweils die Wachstumsfraktionen (=prozentualen Anteile) der gefärbten biliären Epithelien und gefärbten Hepatozyten in den Proben bestimmt.

Beispielhaft ist das vollständige immunhistochemische Färbeprotokoll für  $\alpha$ SMA in Tabelle 2 aufgeführt. Im ersten Schritt wurden die Leberproben in Xylol für 3 x 10 Minuten deparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für je 5 Minuten rehydriert. Die Proben wurden danach für zwei Minuten in destilliertes Wasser gegeben, damit die Zellen wieder aufquellen. Die Antigendemaskierung erfolgte entweder mit einem Citratpuffer oder Pronase, wobei der jeweils verwendete Puffer, die Konzentration und auch die individuelle Dauer der Zeit im Dampfkochtopf in Tabelle 3 aufgeführt sind.

**Tabelle 2: Immunhistochemisches Färbeprotokoll für  $\alpha$ SMA**

1.	Deparaffinierung	Xylol	3 x 10 Minuten
2.	Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe	Ethanol 3 x 100 %, 90 %, 70 %	je 5 Minuten
3.	Aufquellen der Zellen	Aqua dest.	2 Minuten
4.	Antigendemaskierung	Citratpuffer pH 6,0	10 Minuten Dampfdrucktopf, 30 Minuten Abkühlen
5.	Waschen	PBS-T (0,05 % Tween)	3 x 5 Minuten
6.	Blockierung endogener Peroxidasen	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Leitungswasser	30 Minuten bei Raumtemperatur
7.	Waschen	PBS-T (0,05 % Tween)	3 x 5 Minuten
8.	Absättigen unspezifischer Bindungen	Blocking Solution	60 Minuten bei Raumtemperatur
9.	Inkubation 1. Antikörper	1:200 in Blocking Solution	60 Minuten bei Raumtemperatur
10.	Waschen	PBS-T (0,05 % Tween)	3 x 5 Minuten
11.	Inkubation 1. Antikörper	Polylink	30 Minuten
12.	Waschen	PBS-T (0,05 % Tween)	3 x 5 Minuten
13.	Inkubation ABC-Reagenz	ABC-HRP-Reagenz	30 Minuten
14.	Waschen	PBS-T (0,05 % Tween)	3 x 5 Minuten
15.	Anfärben mit DAB	DAB-Lösung (1:50)	1 Minute
16.	Abstoppen der DAB-Reaktion	fließendes Leitungswasser	kurz eintauchen
17.	Gegenfärbung	Mayers Hämalaunlösung	1 Minute
18.	Waschen	fließendes Leitungswasser	2-mal gründlich auswaschen
19.	Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe	Ethanol 60 %, 70 %, 90 % 2x 100 %	je 5 Minuten
20.	Xylol-Inkubation		3 x 5 Minuten
21.	Eindecken		

Die Antigendemaskierung diente der Wiederherstellung der Immunreaktivität von paraffineingebettetem Gewebe. Danach kühlten die

Schnitte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur ab, bevor sie einem Waschpuffer zugeführt wurden. Das Waschprotokoll und der verwendete Waschpuffer sind ebenfalls der Tabelle 3 zu entnehmen. Die nachfolgenden fünf Waschschriffe wurden allesamt auf diese Weise durchgeführt.

Die Reduktion der Peroxidaseaktivität wurde mittels dreißigminütiger Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid/PBS oder Wasserstoffperoxid/Leitungswasser erreicht. Es schloss sich ein weiterer Waschschriff in einem Waschpuffer an, bevor die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert wurden. Dazu wurde die Blocking Solution verwendet (siehe Kapitel 2.1.4), welche im Wesentlichen eine Sättigung unspezifischer Bindungsstellen zur Reduzierung unspezifischer Hintergrundfärbung bewirkt.

Nach einem weiteren Waschgang wurden die primären Antikörper in der Blockierungslösung verdünnt (Tabelle 3) und die Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Gewebeschnitte gegeben. Es folgte der dritte Waschschriff und anschließend die Inkubation mit einem sekundären Antikörper für 30 Minuten. Danach wurden die Schnitte erneut gewaschen und für den Reduktionsschriff für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Meerrettichperoxidase (ABC-HRP-Reagenz) behandelt. Im Anschluss wurde ein letztes Mal nach dem oben beschriebenen Protokoll gewaschen und danach mit DAB-Lösung gefärbt. Die Verdünnung der DAB-Lösung sowie die einzelnen Einwirkzeiten sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Nach einem kurzen Spülgang unter fließendem Leitungswasser, um die weitere Färbung zu stoppen, erfolgte die Gegenfärbung für die Dauer von einer Minute in Mayers Häkalaunlösung. Abschließend wurden die Präparate zweimal unter fließendem Wasser ausgewaschen. Zur Dehydrierung durchliefen die Proben für je 5 Minuten eine aufsteigende Alkoholreihe, bevor sie für jeweils 3 x 5 Minuten in Xylol platziert wurden. Abweichende Angaben zur Dehydrierung und Xylol-Platzierung finden sich in Tabelle 3. Die fertigen Proben wurden mit einem Tropfen des Eindeckelmediums Eukitt® Quick-hardening mounting medium auf den Objektträgern platziert und mit Deckgläsern abgedeckt.

**Tabelle 3: Übersicht immunhistochemische Färbeprotokolle**

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Verdünnung Gewebe</b>	<b>Antigendemaskierung</b>	<b>Waschpuffer</b>	<b>Waschprotokoll</b>	<b>Einwirkzeit DAB-Lösung</b>	<b>Dehydrierung</b>	<b>Xylol-Inkubation</b>
Anti-EpCAM	1:200	Citratpuffer pH 6,0; 20 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	TBS-T	2 x 3 Minuten	40 Sekunden	je 1 Minute	3 x 2 Minuten
Anti-SOX9	1:300	Citratpuffer pH 6,0; 20 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	PBS-T	2 x 3 Minuten	30 Sekunden	je 1 Minute	3 x 2 Minuten
Anti-CD133	1:400	Citratpuffer pH 6,0; 20 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	PBS-T	2 x 3 Minuten	30 Sekunden	je 1 Minute	3 x 2 Minuten
Anti-AFP	1:400	Citratpuffer pH 6,0; 20 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	PBS-T	2 x 3 Minuten	30 Sekunden	je 1 Minute	3 x 2 Minuten
Anti-CK7 / (Anti-CK19)	1:300	Citratpuffer pH 6,0; 20 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	PBS-T	2 x 3 Minuten	30 Sekunden	je 1 Minute	3 x 2 Minuten

Anti-TNC	1:200	Pronase; 6 Minuten bei 37 °C in der Mikrowelle	TBS-T	3 x 5 Minuten	40 Sekunden	je 5 Minuten	2 x 5 Minuten
Anti-POSTN	1:300	Citratpuffer pH 6,0; 20 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	TBS-T	2 x 3 Minuten	3 Minuten	je 1 Minute	3 x 2 Minuten
Anti-NCAM	1:300	Citratpuffer pH 6,0; 20 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	PBS-T	2 x 3 Minuten	30 Sekunden	je 1 Minute	3 x 2 Minuten
Anti- $\alpha$ SMA	1:200	Citratpuffer pH 6,0; 10 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	PBS-T	3 x 5 Minuten	1 Minute	je 5 Minuten	3 x 5 Minuten
Anti-Synaptophysin	1:300	Citratpuffer pH 6,0; 20 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	PBS-T	2 x 3 Minuten	30 Sekunden	je 1 Minute	3 x 2 Minuten
Anti-Desmin	1:400	Citratpuffer pH 6,0; 20 Minuten im Dampfdrucktopf + 30 Minuten abkühlen	PBS-T	2 x 3 Minuten	30 Sekunden	je 1 Minute	3 x 2 Minuten

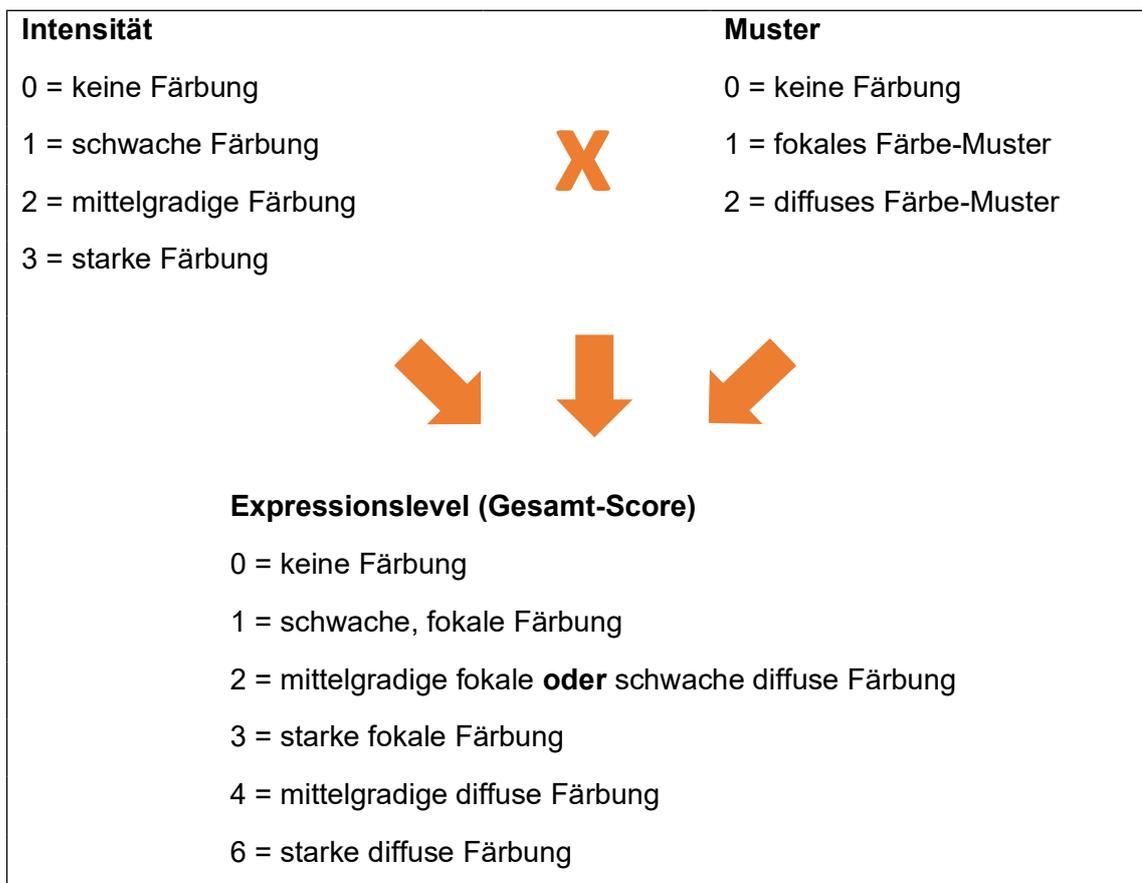
## 2.2.5 Interpretation der immunhistochemischen Färbungen

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde zum einen die Lokalisation der Färbung betrachtet und zum anderen das Expressionslevel in Bezug auf die Lokalisation quantifiziert. Hinsichtlich der Lokalisation der immunhistochemischen Färbung ergab sich demnach folgende Einteilung:

Lokalisation 1: portal, periportal, septal und periseptal

Lokalisation 2: perisinusoidal und perizentral

Beim Expressionslevel wurden die Aspekte Intensität und Muster jeweils einer semi-quantitativen Analyse unterzogen und mit einem Score versehen. Diese beiden Scores (0 bis 3 für die Intensität) und (0 bis 2 für das Muster) wurden anschließend miteinander multipliziert, um den Gesamtscore für das Expressionslevel zu erhalten (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Ermittlung des Expressionslevels**

### 2.2.6 Ermittlung des TNC-Gradienten

In den Proben wurde das Vorhandensein eines TNC-Gradienten dokumentiert, um eine Quantifizierung vornehmen zu können. Dabei bezeichnet der Gradient den Unterschied in der Anfärbbbarkeit beziehungsweise Färbeintensität eines Markers zwischen zwei histologischen Leberzellkompartimenten. Die Auswertung des Gradienten erfolgte anschließend zum einen in Abhängigkeit von der Ätiologie der Leberschädigung und zum anderen in Abhängigkeit von der Progression der Schädigung nach Desmet-Stadium.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Software IBM SPSS Statistics in der Version 26 (International Business Machines Corporation, New York, USA) durchgeführt. Uni- und multivariate Varianzanalysen dienten der Überprüfung möglicher Zusammenhänge zwischen den abhängigen Variablen. Für die Berechnung von nicht linearen Zusammenhängen zwischen den Datenreihen wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient  $r$  berechnet. Das Signifikanzniveau wurde für alle Berechnungen in dieser Arbeit bei  $p < 0,05$  festgelegt.

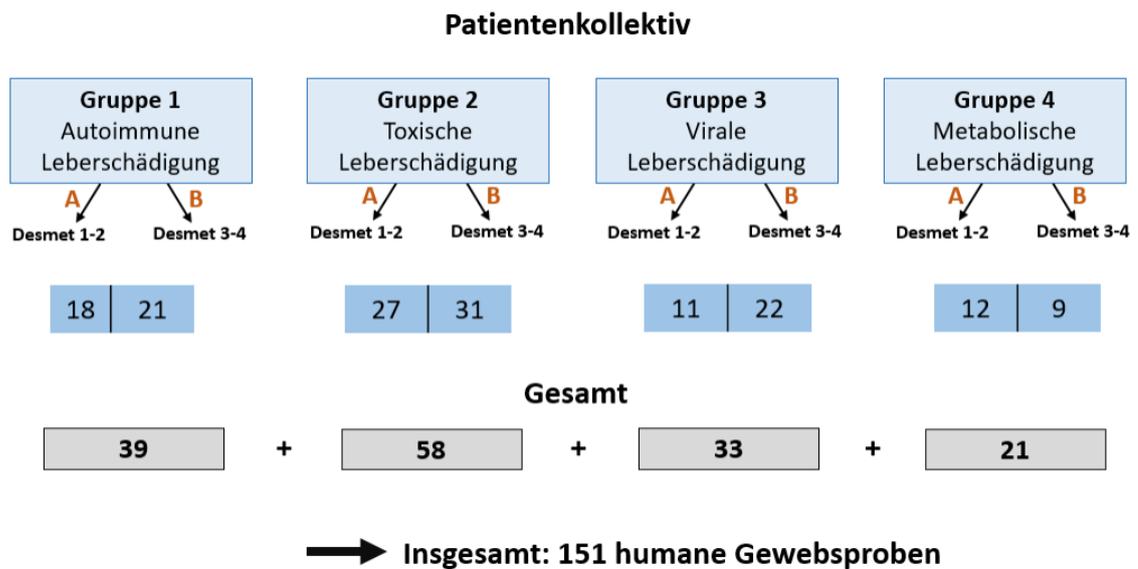
## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Patientenkohorte**

Insgesamt konnten die Gewebeproben von 151 Patienten und Patientinnen in die Experimente miteinbezogen werden. Es handelt sich dabei um 120 Stanzbiopsate und 31 Resektate von 77 männlichen und 74 weiblichen Patienten und Patientinnen mit einem Altersdurchschnitt von 53,61 Jahren (Spanne 4 bis 87 Jahre).

39 Gewebeproben stammten von Patienten und Patientinnen mit AIH, PBS, PSC oder IgG4-assoziiertes sklerosierendes Cholangitis (Gruppe 1, immunvermittelte Leberschädigung). Weitere 58 Proben waren von Patienten und Patientinnen mit NAFLD, NASH, alkoholischer Steatohepatitis und medikamenten-induzierter toxischer Leberschädigung entnommen worden (Gruppe 2, toxische Leberschädigung). Auf die Gruppe der Patienten und Patientinnen mit viraler Leberschädigung entfielen 33 Proben von Patienten und Patientinnen mit Hepatitis B oder C (Gruppe 3, virale Leberschädigung). Die kleinste Untergruppe, mit nur 21 Gewebeproben von leberkranken Patienten und Patientinnen, machten die hereditär-metabolischen Leberschädigungen aus (Gruppe 4, metabolische Leberschädigung).

Eine Übersicht über das untersuchte Patientenkollektiv enthält die nachfolgende Abbildung 4.



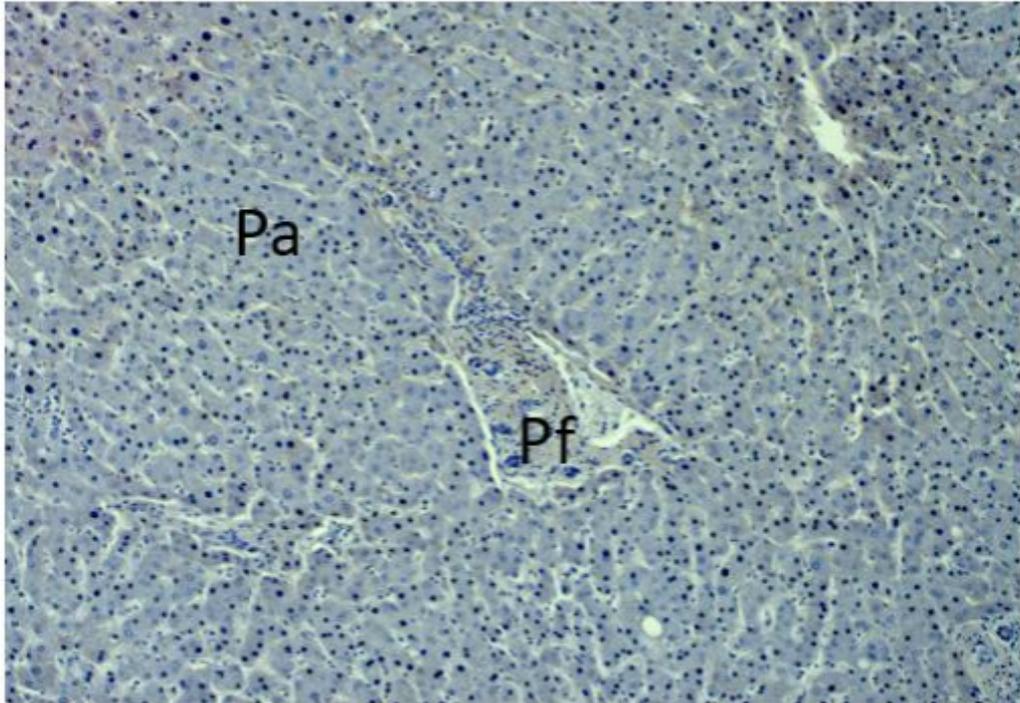
**Abbildung 4: Patientenkollektiv**

### 3.2 Expressionsmuster der ECM-Proteine Tenascin C und Periostin

Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen der Patientenproben gegen TNC und POSTN wurden die Expression und Lokalisation der beiden ECM-Proteine in Bezug auf die duktiläre Reaktion und das Vorkommen von Progenitorzellen bestimmt.

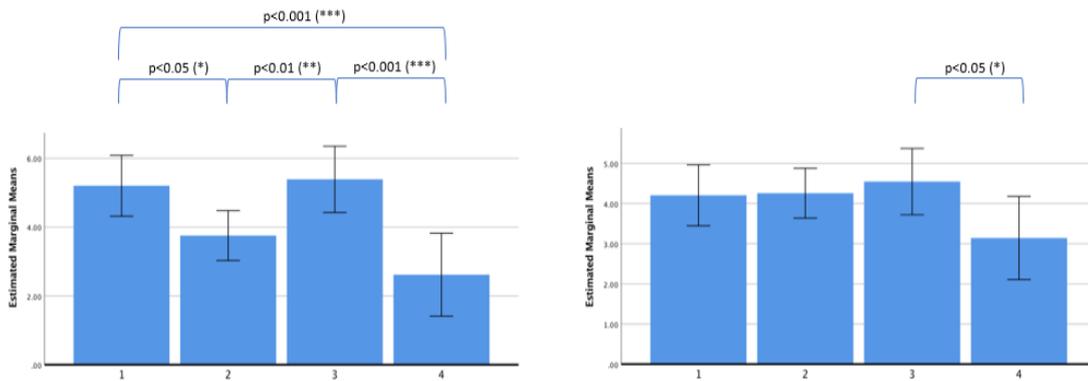
#### 3.2.1 Tenascin C

In der gesunden Leber wird TNC nur äußerst schwach periportal und sinusoidal exprimiert (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Expression von TNC in der gesunden Leber**  
(Pa – Parenchym, Pf – Periportalfeld; 10-fache Vergrößerung)

Es konnte gezeigt werden, dass das ECM-Protein TNC auch in humanen Gewebeproben eine Rolle bei den Prozessen rund um die Leberschädigung und –regeneration spielt. Die Betrachtung der TNC-Expression in Abhängigkeit von den unterschiedlichen ätiologischen Gruppen ergab deutliche Unterschiede, die sowohl unter dem Mikroskop deutlich wurden als auch im Rahmen der semi-quantitativen Analysen. Zwischen den ätiologischen Gruppen gab es signifikante bis hochsignifikante Unterschiede zwischen dem TNC-Vorkommen in Lokalisation 1. In Lokalisation 2 hingegen war lediglich der Vergleich der TNC-Expression zwischen Gruppe 3 (virale Leberschädigung) und Gruppe 4 (metabolische Leberschädigung) mit  $p < 0,05$  signifikant. Der Zusammenhang zwischen den TNC-Expressionsraten und der Lokalisation in den ätiologischen Gruppen ist der Abbildung 6 zu entnehmen.

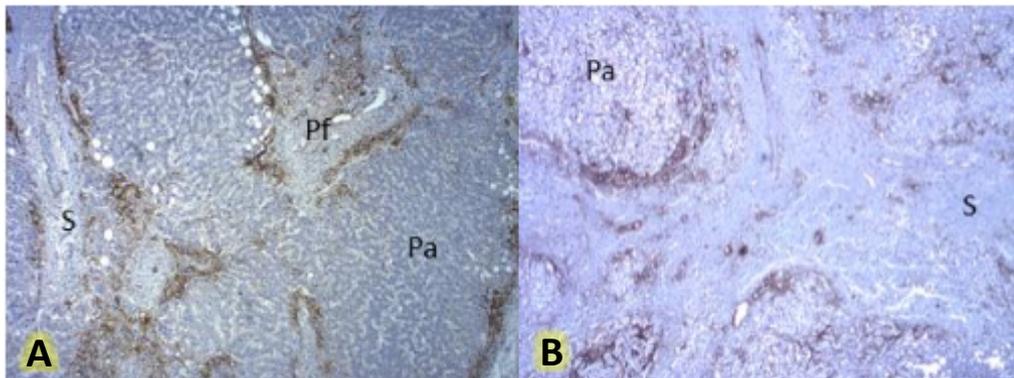


**Abbildung 6: Vergleich der TNC-Expression in den ätiologischen Gruppen nach Lokalisation mit Säulendiagramm für Lokalisation 1 links und Säulendiagramm für Lokalisation 2 rechts**

(Leberschädigung Gruppe: 1 – immunvermittelt, 2 – toxisch, 3 – viral, 4 – metabolisch)

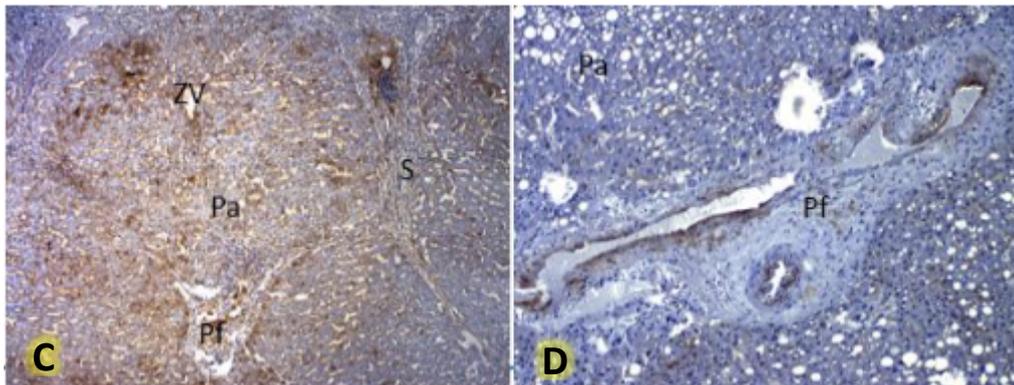
Die Unterschiede in der TNC-Expression zwischen den ätiologischen Gruppen waren gut unter dem Mikroskop zu erkennen (Abbildung 7).

Gruppe 1B Immunvermittelte Leberschädigung Gruppe 2B Toxische Leberschädigung



Gruppe 3B Virale Leberschädigung

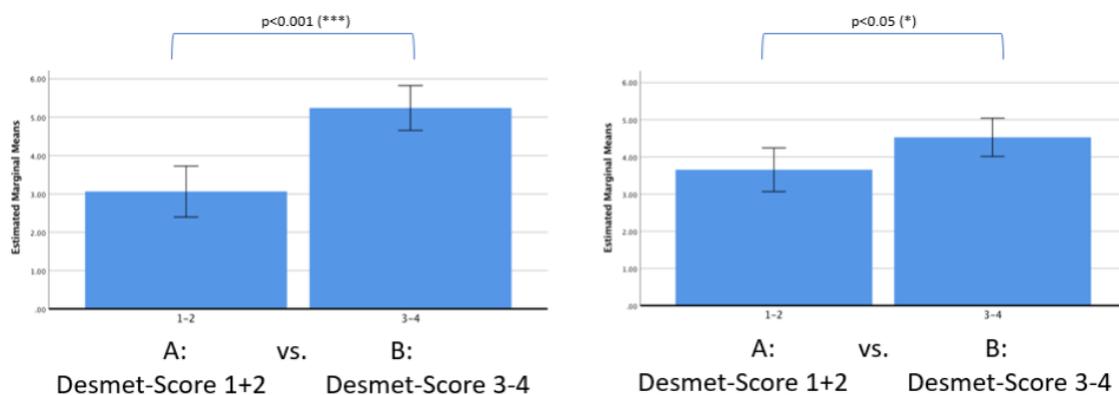
Gruppe 4B Metabolische Leberschädigung



**Abbildung 7: TNC-Expression in Abhängigkeit von der Ätiologie**

(Pa – Parenchym, Pf – Periportalfeld, S - Septum, ZV – Zentralvene; 5-fache Vergrößerung) Die positive TNC-Färbung der humanen Gewebeproben zeigt sich vor allem im Bereich der epithelialen-mesenchymalen Übergangszonen zwischen Septum und Parenchym, im Bereich des fibrösen Septums und der Sinusoide. Die Intensität der TNC-Färbung nimmt mit zunehmendem Abstand zu diesen Bereichen ab.

Um die Frage zu beantworten, inwiefern TNC ein Marker für die Progression der Leberschädigung darstellt, wurde die TNC-Färbung in den Lokalisationen 1 und 2 jeweils zusätzlich für die Desmet-Stadien untersucht. Die Analyse erfolgte dabei nach den Subgruppen A (Desmet-Score 1 oder 2) und B (Desmet-Score 3 oder 4). In Lokalisation 1 war die TNC-Expression hochsignifikant mit dem Desmet-Score assoziiert ( $p < 0,001$ ), wobei die TNC-Expression mit höherem Desmet-Stadium zunahm. Für die Lokalisation 2 war der Vergleich zwischen den Gewebeproben mit niedrigen Desmet-Scores (1 und 2) und denen mit hohen Desmet-Scores (3 oder 4) ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Vergleich der TNC-Expression in Bezug auf die Desmet-Stadien mit Säulendiagramm für Lokalisation 1 links und Säulendiagramm für Lokalisation 2 rechts**

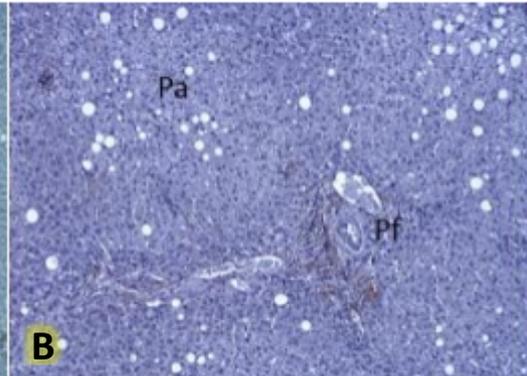
(Leberschädigung Gruppe: 1 – immunvermittelt, 2 – toxisch, 3 – viral, 4 – metabolisch)

Mikroskopisch waren die Unterschiede hinsichtlich der TNC-Expression in Abhängigkeit des Desmet-Scores gut erkennbar. Bei Gewebeproben mit einer geringgradigen Fibrose und portalen Faservermehrung (Desmet-Score 1) war kaum TNC nachweisbar. Bei Desmet-Score 2 herrschte eine mittelgradige Fibrose mit inkompletten portoportal Fasensepten vor und die TNC-Expression war im Periportalfeld bereits leicht zu erkennen. Je höher der Desmet-Score, desto mehr TNC-Expression war zu erkennen und desto mehr TNC-Ablagerungen fanden sich auch im Parenchym. In der nachfolgenden Bilderserie in Abbildung 9 ist die sukzessive Zunahme der TNC-Expression mit steigendem Desmet-Score dargestellt.

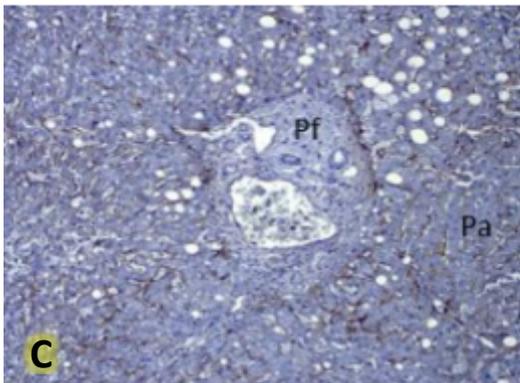
Gruppe 1A Desmet-Score 1; 10x Vergr.



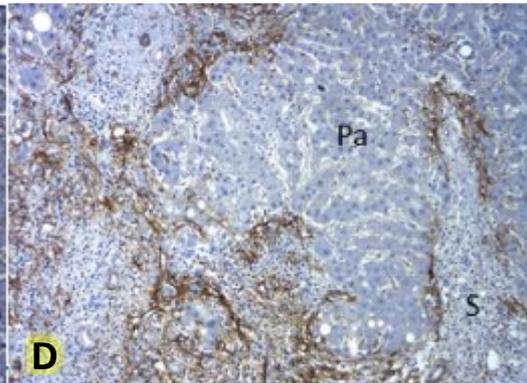
Gruppe 3A Desmet-Score 2; 10x Vergr.



Gruppe 1B Desmet-Score 3; 10x Vergr.



Gruppe 1B Desmet-Score 4; 5x Vergr.



### Abbildung 9: TNC-Expression in Abhängigkeit vom Desmet-Stadium

(Pa – Parenchym, Pf – Periportalfeld, S - Septum; Vergr. -Vergrößerung) Während die TNC-Expression bei Desmet-Score 1 kaum erkennbar ist, wird sie mit steigendem Desmet-Stadium in der 10-fachen Vergrößerung zunehmend stärker sichtbar. Beim Präparat mit dem Score 4 sind die TNC-Ablagerungen bereits in der 5-fachen Vergrößerung in den Periportalfeldern und im Parenchym deutlich zu erkennen.

#### 3.2.2 Tenascin C-Gradient

Die Prüfung des Vorhandenseins eines Gradienten der TNC-Expression (graduelle Abnahme/Zunahme der TNC-Expression im räumlichen Verlauf, zum Beispiel im Verlauf von Bindegewebssepten zum angrenzenden Leberparenchym) in Bezug auf die Ätiologie der Leberschädigung und die Desmet-Stadien war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Die Ausrichtung des Gradienten wurde über den Namen (zum Beispiel zentroportal, septoparenchymal, etc.) charakterisiert. Dabei wurde zuerst immer die Lokalisation mit der stärkeren Färbintensität genannt.

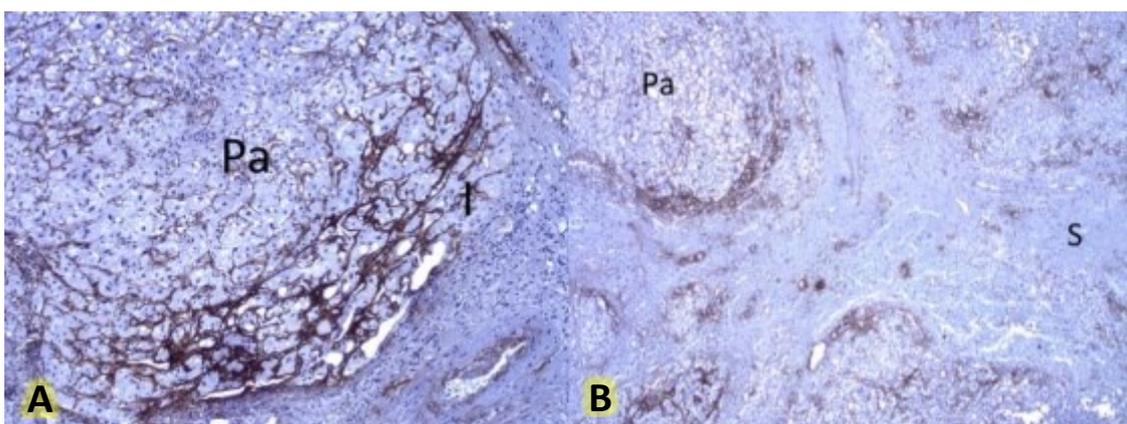
Am häufigsten wurde ein Gradient für TNC bei der immunvermittelten Leberschädigung festgestellt (16 von 39 Proben, 41,0 %). In Bezug auf die Lokalisation zeigten sich deutliche Unterschiede, wobei der TNC-Gradient

deutlich öfter portozentral zu beobachten war (10 von 16 positiven Proben, 62,5 %) und zentro- sowie septoparenchymal wesentlich seltener auftrat (jeweils 3 von 16 Proben, 18,8 %).

Bei der viralen Leberschädigung war ein Gradient bei etwas mehr als einem Drittel der Proben vorhanden (13 von 33 Proben, 39,4 %). Die Verteilung des Gradienten war überwiegend septoparenchymal gelagert (12 von 13 Proben, 92,3 %). Lediglich eine einzige der insgesamt 13 Proben von Leberschädigungen viraler Genese mit einem TNC-Gradienten fiel zentroportal positiv aus (7,7 %).

Im Falle der hereditär metabolischen Leberschädigung konnte ein TNC-Gradient bei ungefähr einem Viertel der Proben identifiziert werden (5 von 21 Proben, 23,8 %). Wie bei der eben beschriebenen viralen Leberschädigung trat der Gradient verstärkt septoparenchymal auf (3 von 5 Proben, 60,0 %). Außerdem wurde ein TNC-Gradient in zwei der fünf Proben zentroportal beobachtet (40,0 %).

Am seltensten trat ein TNC-Gradient bei der toxischen Leberschädigung auf, nämlich in nur fünf der insgesamt 58 Gewebeproben dieser Gruppe (8,6 %). Hier zeigte sich ein kleiner Überhang für die zentroportalen Kompartimente (3 von 5 Proben, 60,0 %), während die septoparenchymalen Kompartimente seltener einen TNC-Gradienten aufwiesen (2 von 5 Proben, 40,0 %) (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Vorhandensein eines TNC-Gradienten in Proben mit toxischer Leberschädigung**

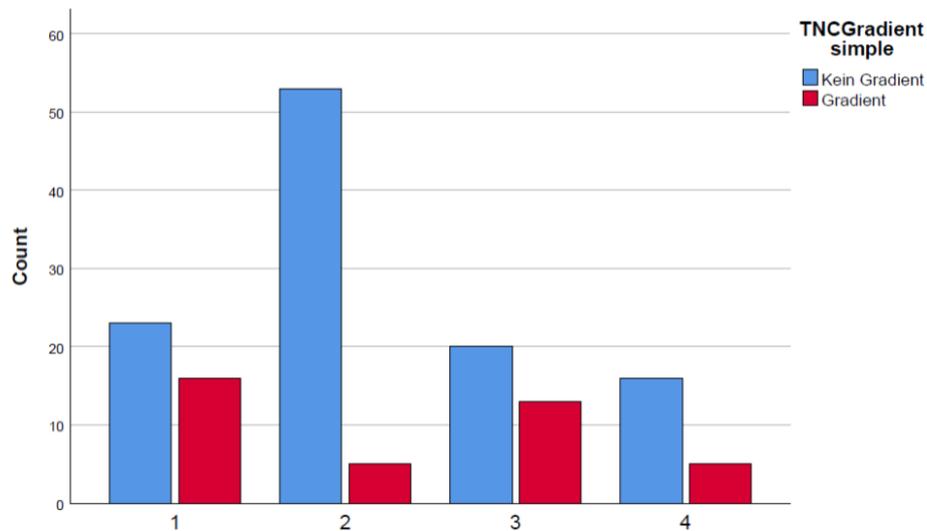
(Pa – Parenchym, S- Septum) Die Unterschiede in der Färbintensität der Leberzellkompartimente sind deutlich in der 5- und 10-fachen Vergrößerung zu erkennen.

Der Übersicht halber sind die beschriebenen Zusammenhänge in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Übersicht TNC-Gradient nach Ätiologie der Leberschädigung**

<b>Gruppe</b>	<b>Gradient für TNC</b>	<b>kein Gradient für TNC</b>
1 immunvermittelt	Gesamt: 16/39 (41,0 %) Portozentral: 10/16 (62,5 %) Zentroparenchymal: 3/16 (18,8 %) Septoparenchymal 3/16 (18,8 %)	23/39 (59,0 %)
2 toxisch	Gesamt: 5/58 (8,6 %) Zentroportal: 3/5 (60,0 %) Septoparenchymal: 2/5 (40,0 %)	53/58 (91,4 %)
3 viral	Gesamt: 13/33 (39,4 %) Portozentral: 1/13 (7,7 %) Septoparenchymal: 12/13 (92,3 %)	20/33 (60,6 %)
4 metabolisch	Gesamt: 5/21 (23,8 %) Zentroportal: 2/5 (40,0 %) Septoparenchymal: 3/5 (60,0 %)	16/21 (76,2 %)

Die Anzahl der Proben mit versus ohne TNC-Gradienten in den ätiologischen Gruppen ist in Abbildung 11 graphisch anhand eines Säulendiagramms dargestellt. Der Gruppenvergleich zeigte mit dem Chi-Quadrat-Test einen signifikanten Unterschied an ( $p = 0,001$ ).



**Abbildung 11: Vorhandensein eines TNC-Gradienten in den ätiologischen Gruppen**

(Leberschädigung Gruppe: 1 – immunvermittelt, 2 – toxisch, 3 – viral, 4 – metabolisch)

Die weiteren Analysen befassten sich mit dem TNC-Gradienten in Abhängigkeit vom Desmet-Stadium. Von den insgesamt 68 Gewebeproben mit Desmet-Stadium 1 oder 2 wurde ein TNC-Gradient bei 13 Proben festgestellt (19,1 %), wohingegen bei 55 Proben (80,9 %) kein Gradient vorkam. Am häufigsten war der Gradient portozentral lokalisiert (6 von 13 Proben, 46,1 %), gefolgt von zentroportal (4 von 13 Proben, 30,8 %) und zentroparenchymal (3 von 13 Proben, 23,1 %).

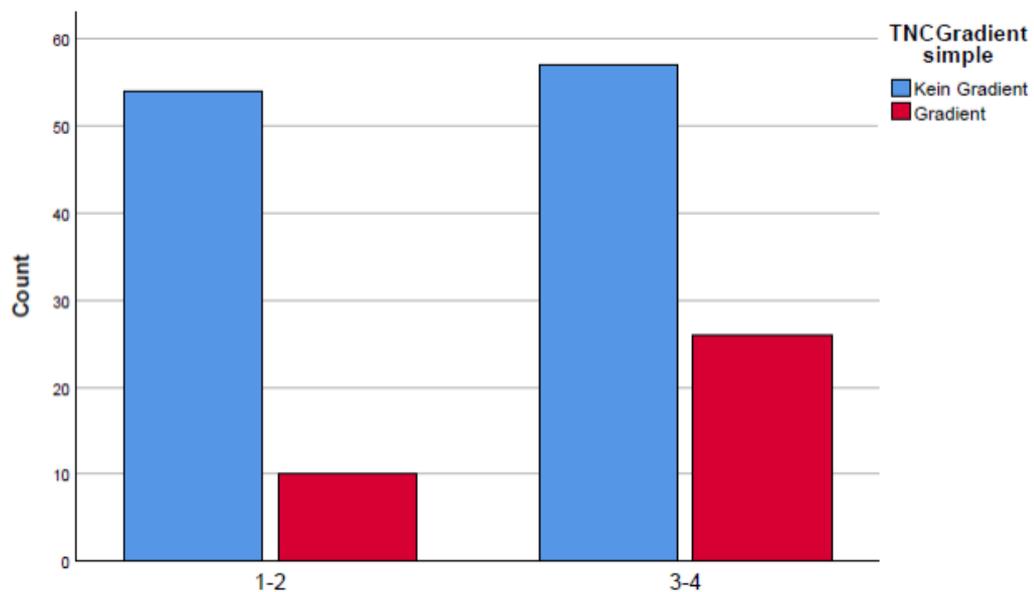
In den Gewebeproben mit Desmet-Stadium 3 oder 4 kam ein TNC-Gradient häufiger vor, nämlich in 26 der insgesamt 83 Proben (31,3 %). Am häufigsten war der TNC-Gradient septoparenchymal zu finden (20 von 26 Proben, 77,0 %), gefolgt von portozentral (5 von 26 Proben, 19,2 %) und zentroportal (1 von 26 Proben, 3,8 %). Die Übersicht ist der nachfolgenden .

**Tabelle 5** zu entnehmen.

**Tabelle 5: Übersicht TNC-Gradient nach Desmet-Stadium**

Desmet-Stadium	Gradient für TNC	kein Gradient für TNC
1 - 2	Gesamt 13/68 (19,1 %)	55/68 (80,9 %)
	Portozentral: 6/13 (46,1 %)	
	Zentroparenchymal: 3/13 (23,1 %)	
	Zentroportal: 4/13 (30,8 %)	
3 - 4	Gesamt: 26/83 (31,3 %)	57/83 (68,7 %)
	Portozentral: 5/26 (19,2 %)	
	Zentroportal: 1/26 (3,8 %)	
	Septoparenchymal: 20/26 (77,0 %)	

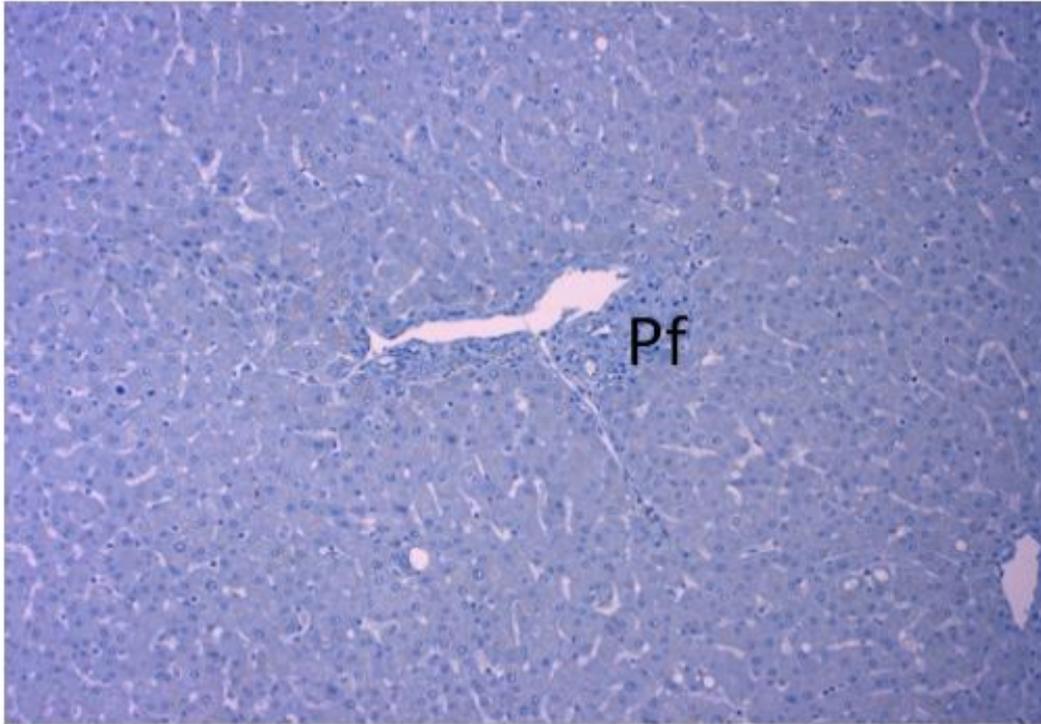
Die Anzahl der Proben mit versus ohne TNC-Gradienten in den ätiologischen Gruppen ist in Abbildung 12 mit einem Säulendiagramm graphisch dargestellt. Der Vergleich des Vorkommens eines TNC-Gradienten zwischen den Gewebeproben mit niedrigem (Desmet-Score 1 oder 2) und hohem Desmet-Score 3 oder 4) Desmet-Stadium war mit dem Chi-Quadrat-Test signifikant ( $p=0,022$ ).



**Abbildung 12: Vorkommen eines TNC-Gradienten in den Desmet-Stadien**

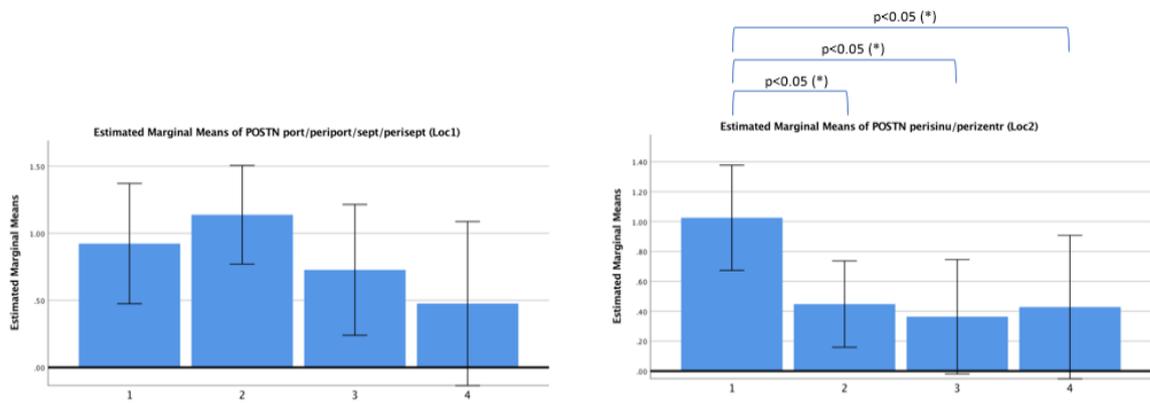
### 3.2.3 Periostin

Im Gegensatz zu TNC wird das ECM-Protein POSTN in gesundem Lebergewebe kaum bis gar nicht exprimiert (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Expression von POSTN in der gesunden Leber**  
(Pa – Parenchym, Pf – Periportalfeld; 10-fache Vergrößerung)

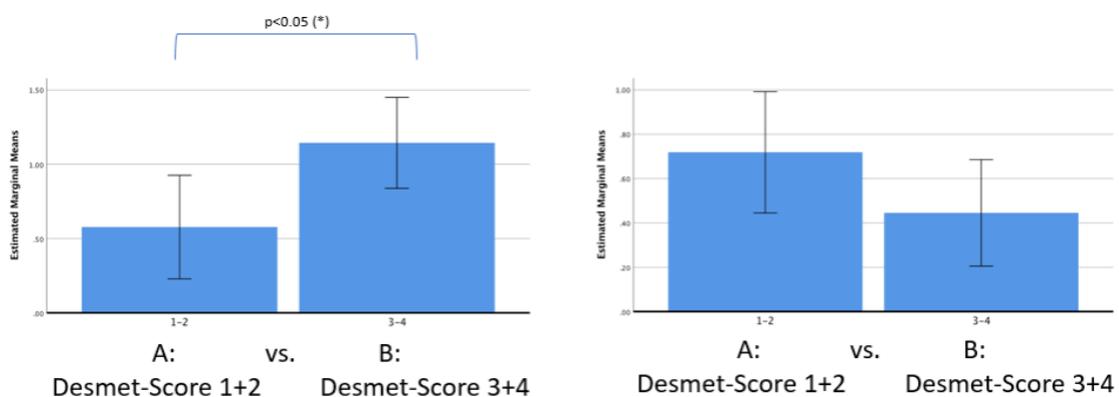
Das ECM-Protein POSTN ist auch bei Menschen an den Prozessen der Leberschädigung und –regeneration beteiligt. Die Untersuchung der POSTN-Färbung in den unterschiedlichen ätiologischen Gruppen ergab signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen, allerdings nur für die POSTN-Expression in Lokalisation 2. Die Analyse der POSTN-Vorkommen in Lokalisation 1 hingegen, waren im Vergleich der ätiologischen Gruppen allesamt nicht signifikant (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Vergleich der POSTN-Expression in den ätiologischen Gruppen nach Lokalisation mit Säulendiagramm für Lokalisation 1 links und Säulendiagramm für Lokalisation 2 rechts**  
 (Leberschädigung Gruppe: 1 – immunvermittelt, 2 – toxisch, 3 – viral, 4 – metabolisch)

Die Auswertung der POSTN-Färbung in Bezug auf das Stadium der Leberschädigung ergab unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit von der betrachteten Lokalisation. So waren in Lokalisation 1 die Expressionsraten des POSTN-Proteins mit höherem Desmet-Score (3 oder 4) erhöht gegenüber niedrigeren Desmet-Scores von 1 bis 2. Dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,05$ ). In Lokalisation 2 war dieser Zusammenhang genau umgekehrt, mit verstärkter POSTN-Färbung bei den Desmet-Scores 1 und 2. Im späteren Krankheitsverlauf der Leberschädigung (Desmet-Score 3 oder 4) nahm das Vorkommen von POSTN in Lokalisation 2 wieder ab. Der Gruppenvergleich für das Vorkommen von POSTN in Lokalisation 2 war jedoch nicht signifikant (

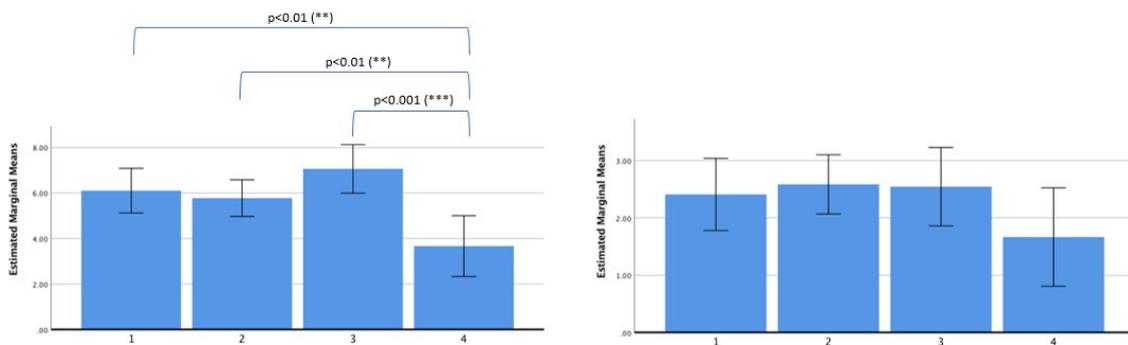
Abbildung 15).



**Abbildung 15: POSTN-Vorkommen in den unterschiedlichen Desmet-Gruppen mit Säulendiagramm für Lokalisation 1 links und Säulendiagramm für Lokalisation 2 rechts**

### 3.3 Lokalisation und Aktivität von HSC

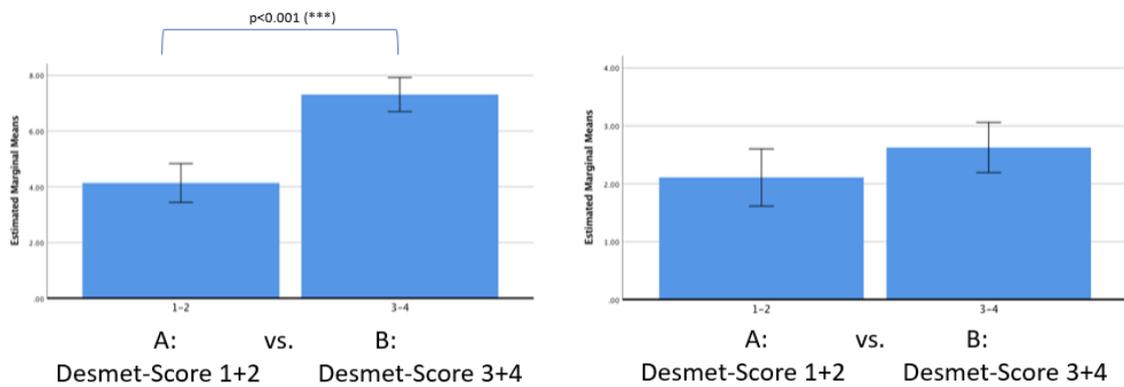
Die Analyse konnten zeigen, dass aktivierte HSC auch beim Menschen an den Prozessen Leberschädigung und –regeneration beteiligt sind. Die Aktivierung der HSC war dabei abhängig von der Lokalisation und Ätiologie der Leberschädigung. In Lokalisation 1 war der Unterschied zwischen den ätiologischen Gruppen signifikant, in Lokalisation 2 hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden (Abbildung 16). Insgesamt zeigt sich hier, dass in hereditär-metabolischen Leberschädigungen deutlich weniger  $\alpha$ SMA-positive HSC vorkommen als in den Leberschädigungen anderer Ätiologie, in denen die Anzahl dieser Zellen jeweils ähnlich hoch ist.



**Abbildung 16: Aktivierung von  $\alpha$ SMA in den unterschiedlichen ätiologischen Gruppen mit Säulendiagramm für Lokalisation 1 links und Säulendiagramm für Lokalisation 2 rechts**

(Leberschädigung Gruppe: 1 – immunvermittelt, 2 – toxisch, 3 – viral, 4 – metabolisch)

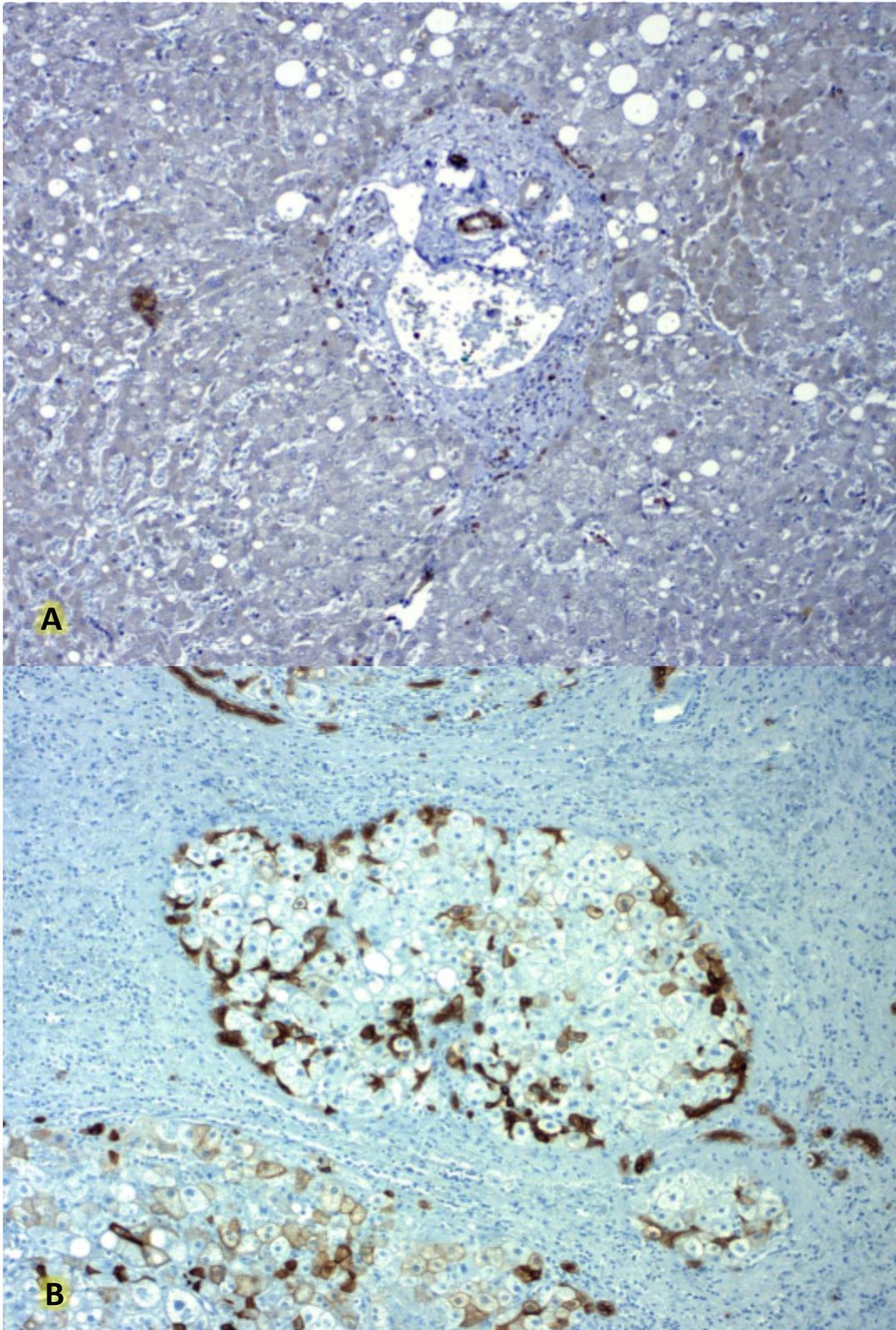
Die Expressionsraten von HSC waren zudem vom Krankheitsstadium abhängig. Dabei nahm die  $\alpha$ SMA-Färbung im Krankheitsverlauf der Leberschädigung (= Desmet-Stadium) immer weiter zu. In Lokalisation 1 war der Unterschied bezüglich der  $\alpha$ SMA-Färbung zwischen den Subgruppen A (Desmet-Score 1 oder 2) und B (Desmet-Score 3 oder 4) mit  $p < 0,001$  sogar hochsignifikant. In Lokalisation 2 konnte ebenfalls eine Zunahme der  $\alpha$ SMA-Färbung bei Proben mit Desmet-Score 3 oder 4 beobachtet werden, allerdings war der Gruppenunterschied zu den beiden ersten Desmet-Stadien nicht signifikant (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Vergleich des Vorkommens von HSC in Bezug auf die Desmet-Stadien (Nachweis über  $\alpha$ SMA) mit Säulendiagramm für Lokalisation 1 links und Säulendiagramm für Lokalisation 2 rechts**

### 3.4 Lokalisation und Aktivität von hepatischen Progenitorzellen

In der Studie konnte an humanen Gewebeproben nachgewiesen werden, dass im Rahmen der Leberregeneration eine duktiläre Reaktion mit Proliferation von Zellen mit dem Markerprofil der hepatischen Progenitorzellen in einer Nische aus extrazellulärer Matrix und Immunzellen ausgelöst wird (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Duktuläre Reaktion mit Sox9 und CK7**

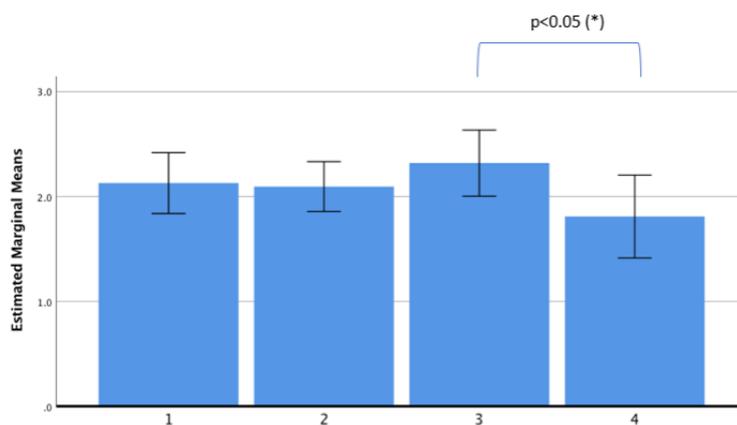
A: Desmet Stadium 3, Gruppe 1B, immunvermittelt, starke duktuläre Reaktion mit Anfärbung des Kerns von hepatischen Progenitorzellen periportal

B: Desmet Stadium 4, Gruppe 2B, toxisch, starke duktuläre Reaktion mit Anfärbung der Membran von hepatischen Progenitorzellen periseptal

Diese duktiläre Reaktion wurde in Bezug zu unterschiedlichen Parametern gesetzt und statistisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Auswertung werden in den nachfolgenden Unterabschnitten präsentiert.

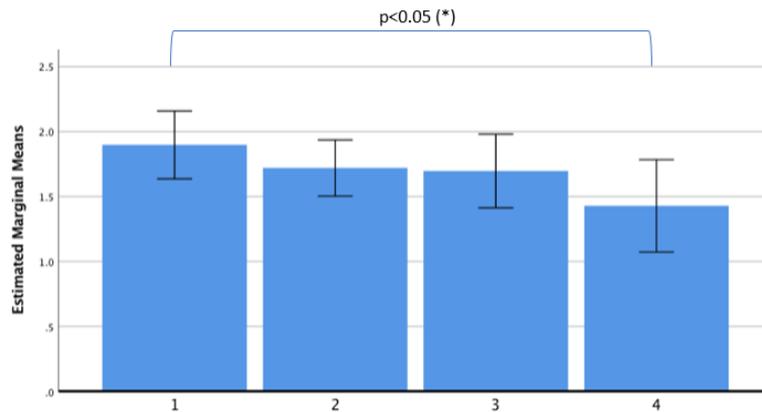
### 3.4.1 Duktiläre Reaktion in Bezug auf die Ätiologie der Leberschädigung

Das Auftreten einer duktilären Reaktion zeigte Unterschiede bezüglich der ätiologischen Gruppen und war außerdem abhängig von dem verwendeten Antikörper. Mit dem Antikörper CK7 war die duktiläre Reaktion in Gruppe 3 (virale Leberschädigung) leicht erhöht. Im Vergleich der ätiologischen Gruppen war lediglich der Unterschied zwischen Gruppe 3 (virale Leberschädigung) und Gruppe 4 (metabolischer Leberschädigung) statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 19). Auch hier zeigt sich im Vergleich eine geringere duktiläre Reaktion in der Gruppe der hereditär-metabolischen Leberschädigung.



**Abbildung 19: Duktiläre Reaktion mit CK7 in Bezug auf die Ätiologie**  
(Leberschädigung Gruppe: 1 – immunvermittelt, 2 – toxisch, 3 – viral, 4 – metabolisch)

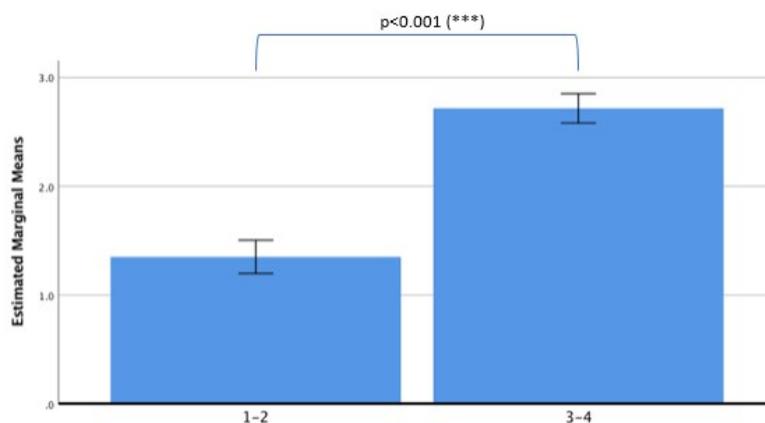
Unter Verwendung des Antikörpers Sox9 zum Nachweis war das Vorkommen der duktilären Reaktion in Gruppe 1 (immunvermittelte Leberschädigung) gegenüber den übrigen Gruppen leicht erhöht. Der Vergleich zwischen den Gruppen konnte einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe 1 (immunvermittelte Leberschädigung) und Gruppe 4 (metabolische Leberschädigung) aufzeigen ( $p < 0,05$ ), wobei auch hier in der Gruppe der hereditär-metabolischen Leberschädigungen insgesamt die geringste Ausprägung der duktilären Reaktion zu beobachten war (Abbildung 20).



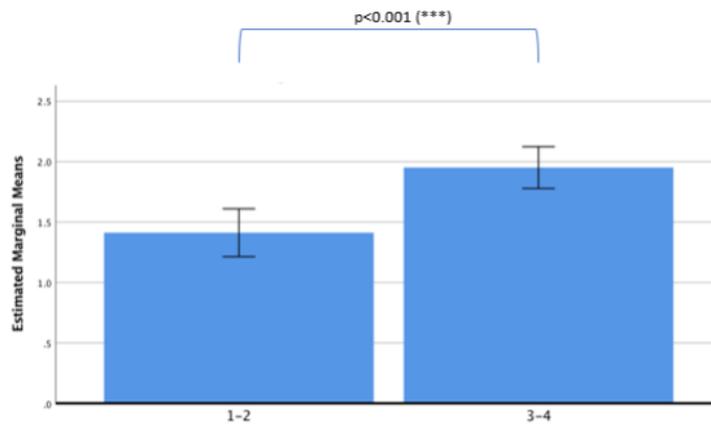
**Abbildung 20: Duktuläre Reaktion mit Sox9 in Bezug auf die Ätiologie**  
 (Leberschädigung Gruppe: 1 – immunvermittelt, 2 – toxisch, 3 – viral, 4 – metabolisch)

### 3.4.2 Duktuläre Reaktion in Bezug auf das Stadium der Leberschädigung

Hinsichtlich der Desmet-Stadien zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Verwendung der Antikörper CK7 und Sox9 zur Detektierung der duktulären Reaktion. In beiden Fällen war die duktuläre Reaktion in den späteren Krankheitsstadien gegenüber den Anfangsstadien der Leberschädigung deutlich ausgeprägter. Sowohl für den Antikörper CK7 (Abbildung 21) als auch für Sox9 (Abbildung 22) war der Unterschied im Vorkommen der duktulären Reaktion zwischen den Desmet-Gruppen mit  $p < 0,001$  hochsignifikant.



**Abbildung 21: Duktuläre Reaktion mit CK7 in Bezug auf die Desmet-Gruppen**



**Abbildung 22: Duktuläre Reaktion mit Sox9 in Bezug auf die Desmet-Gruppen**

### 3.4.3 Zusammenhang duktuläre Reaktion und Tenascin C-Expression

Eine weitere Fragestellung der Arbeit war die Feststellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten der duktulären Reaktion und der TNC-Expression. Dazu wurden die Expression der Marker für die duktuläre Reaktion, nämlich CK7, Sox9 und EpCAM, in Relation zur TNC-Expression gesetzt für die Lokalisationen 1 und 2. Dabei zeigte sich, dass die TNC-Expression signifikant positiv mit dem Auftreten einer duktulären Reaktion (gemessen mit den Antikörpern CK7, Sox9 und EpCAM) korrelierte, und zwar in beiden Lokalisationen. Die Stärke der Zusammenhänge (Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient) für die einzelnen Antikörper und die dazugehörigen p-Werte sind der nachfolgenden Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6: Zusammenhang Vorkommen der duktulären Reaktion in Bezug auf die TNC-Expression**

Antikörper	Lokalisation 1		Lokalisation 2	
	Spearman's <i>r</i>	p-Wert	Spearman's <i>r</i>	p-Wert
CK7	0,312	< 0,001	0,181	0,026
Sox9	0,285	< 0,001	0,263	0,001
EpCAM	0,412	< 0,001	0,244	0,003

### 3.4.4 Zusammenhang duktuläre Reaktion und Periostin-Expression

Das im vorherigen Abschnitt 3.4.3 beschriebene Vorgehen wurden ebenfalls für POSTN genutzt, um mögliche Assoziationen zwischen dem Auftreten der duktulären Reaktion und der POSTN-Expression aufzudecken. Die POSTN-Expression korrelierte dabei in Lokalisation 1 signifikant positiv mit einer duktulären Reaktion mittels Nachweises über die Antikörper CK7, Sox9 und EpCAM. In Lokalisation 2 war die Expression des ECM-Proteins POSTN lediglich für Sox9 signifikant positiv mit der duktulären Reaktion assoziiert. Die positiv gerichteten Zusammenhänge für CK7 und EpCAM erreichten in Lokalisation 2 beide nicht das festgelegte Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Die Stärke der Zusammenhänge (Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient) für die einzelnen Antikörper und die dazugehörigen p-Werte sind in

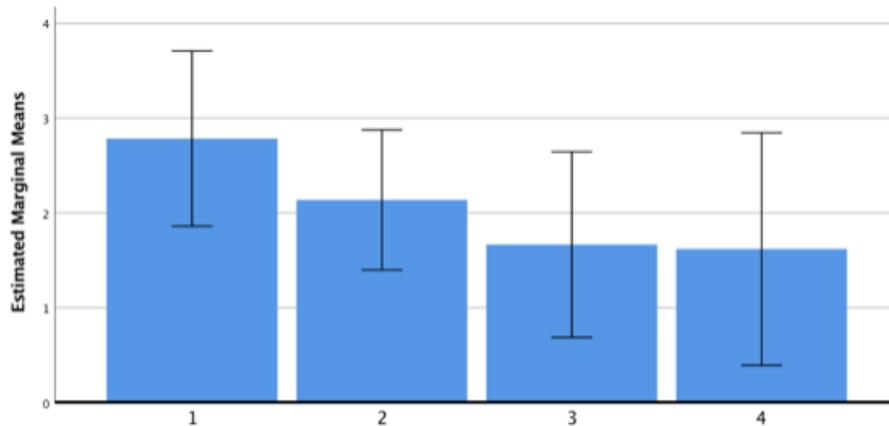
Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Zusammenhang Vorkommen der duktulären Reaktion in Bezug auf die POSTN-Expression**

Antikörper	Lokalisation 1		Lokalisation 2	
	Spearman's $r$	p-Wert	Spearman's $r$	p-Wert
CK7	0,226	0,005	0,068	0,410
Sox9	0,336	< 0,001	0,259	0,001
EpCAM	0,308	< 0,001	0,128	0,116

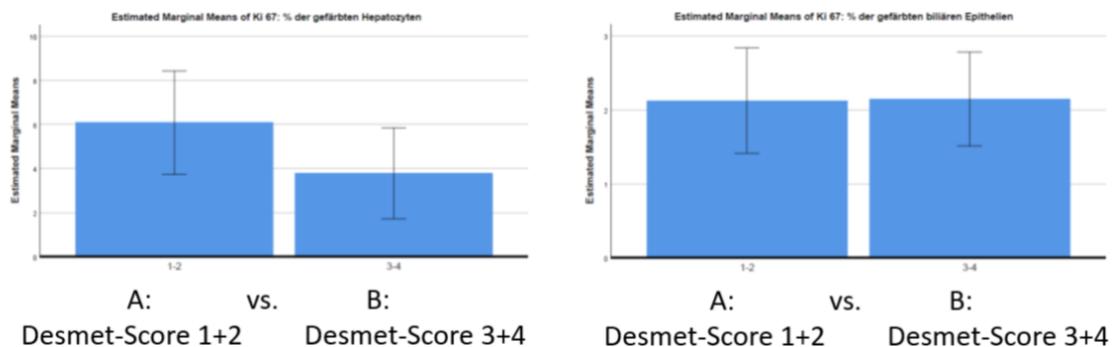
### 3.5 Proliferation von Hepatozyten und biliären Ductuli

Um die Frage nach möglichen Unterschieden in der Proliferation von Zellen in Bezug auf die verschiedenen Ätiologien zu beantworten, wurden die Wachstumsfraktionen des Markerproteins Ki-67 ausgewertet. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens von Ki-67 zwischen den unterschiedlichen ätiologischen Gruppen ausfindig gemacht werden (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Vorkommen des Proliferationsmarkers Ki-67 in den biliären Ductuli in den unterschiedlichen ätiologischen Gruppen**  
 (Leberschädigung Gruppe: 1 – immunvermittelt, 2 – toxisch, 3 – viral, 4 – metabolisch)

Ebenfalls nicht signifikant fielen die Vergleiche der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in den beiden Desmet-Gruppen A und B aus. Dies war sowohl für die Wachstumsfraktion in den gefärbten Hepatozyten der Fall als auch bei den biliären Epithelien zu beobachten. Das Vorkommen von Ki-67 schien dabei von der Lokalisation abhängig zu sein. So nahm das Vorkommen des Proliferationsmarkers in den gefärbten Hepatozyten bei höheren Desmet-Scores (3 oder 4) ab, wohingegen die gefärbten biliären Epithelien eine allenfalls minimal erhöhte Proliferation in späteren Krankheitsstadien aufwiesen (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Proliferation nach Lokalisation und Desmet-Stadium mit Vorkommen von Ki-67 in den gefärbten Hepatozyten**

## 4 Diskussion

Schätzungen zufolge leiden in Deutschland vier bis fünf Millionen Menschen an chronischen Lebererkrankungen, das heißt länger als sechs Monate andauernden pathologischen Prozessen (Warpakowski 2018). Zu den Hauptursachen zählen immunvermittelte Leberschädigungen, toxische Schäden, virale Schäden und hereditär-metabolische Leberschädigungen. Chronische Leberschädigungen münden über eine zunehmende Fibrosierung in die Leberzirrhose. Die Leberzirrhose stellt somit das gemeinsame Endstadium eines jahrelangen strukturellen Umbaus der Leber aus verschiedenen Ätiologien dar, der wegen des hohen Fibrosierungsgrades, der Gewebsnekrosen und knotigen Regenerationsarealen mit einem teilweisen oder vollständigen Verlust der Organfunktion verbunden ist. Im schwersten Stadium der Leberzirrhose liegt die Ein-Jahres-Überlebensrate bei gerade einmal 45 % (Mishra, 2016). Außerdem sind circa 80 % aller hepatozellulären Karzinome auf eine Leberzirrhose zurückzuführen (Harris et al. 2019).

Die Therapie der Leberzirrhose setzt sich aus allgemeinen Maßnahmen wie Alkoholabstinenz, Vermeidung leberschädlicher Medikamente und einer möglichst ausgewogenen Ernährung mit ausreichender Proteinzufuhr, die Behandlung der Grunderkrankung und die Therapie möglicher Komplikationen zusammen. Ultima ratio ist die Lebertransplantation, für die nur ein eingeschränkter Teil der Patientinnen und Patienten überhaupt in Frage kommt und die ihrerseits mit einem erheblichen organisatorischen und finanziellen Aufwand sowie mit weiteren Risiken und möglichen Komplikationen verbunden ist. Eine andere kurative therapeutische Option existiert bislang nicht. Dies verdeutlicht die dringliche Notwendigkeit von antifibrotischen Therapien und Medikamenten.

Nach derzeitigem Forschungsstand ist die Regeneration von chronischen Leberschädigungen in erster Linie auf das Phänomen der duktilären Reaktion zurückzuführen (Sato et al. 2019). Dieser reversible Prozess ist gekennzeichnet durch die Aktivierung von HPC und deren Differenzierung zu reifen Hepatozyten, eine Reaktion, die in einer speziellen Mikroumgebung aus ECM-Molekülen und rekrutierten Immunzellen stattfindet (Roskams et al. 2004). Die beiden nicht-

strukturellen ECM-Proteinen POSTN und TNC werden im Rahmen der Geweberegeneration in unterschiedlichen Organen vermehrt exprimiert und erste Untersuchungen zu TNC und POSTN deuten auf eine Rolle der ECM-Proteine in der chronisch kranken Leber hin. Bisherige immunhistochemische Studien konnten einerseits zeigen, dass TNC und POSTN von HSC exprimiert werden (Yamada et al. 1992; Huang et al. 2015), und dass andererseits die Expression beim Wandel vom quieszenten zum aktivierten HSC stark hochreguliert wird (Jiang et al. 2006).

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Funktionen der ECM-Proteine TNC und POSTN bei der Leberregeneration zu untersuchen. Insbesondere sollte dabei auf eine mögliche Aktivierung von HPC und deren Differenzierung zu Hepatozyten eingegangen werden. Zuletzt sollte ein Zusammenhang zwischen den ECM-Molekülen TNC und POSTN und pathophysiologischen Parametern geprüft werden.

#### **4.1 Rolle von Tenascin C und Periostin in der Leberschädigung und -regeneration**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TNC und POSTN in der gesunden Leber zunächst nur äußerst schwach beziehungsweise nicht exprimiert werden, jedoch stark steigende Expressionslevel bei Vorliegen einer chronischen Leberschädigung aufweisen. Nachdem sowohl die TNC-Expression als auch die POSTN-Expression bei fortschreitendem Desmet-Stadium signifikant zunehmen, spricht dies für eine aktive, dynamische Rolle der beiden ECM-Proteine im Rahmen von Leberschädigung und -regeneration. Das gesteigerte Vorkommen von TNC in Lokalisation 1 (portal, periportal, septal und periseptal) und Lokalisation 2 (perisinusoidal und perizentral) weist außerdem auf eine möglicherweise ausgeprägtere oder allgemeinere Rolle bei den Schädigungs- und -regenerationsprozessen hin. Im Gegensatz dazu könnte die signifikante Zunahme der POSTN-Expression lediglich in Lokalisation 1 eine eher spezifischere, lokalisationsgebundene Rolle des ECM-Moleküls signalisieren.

In Bezug auf die Expression der beiden ECM-Proteine in den ätiologischen Gruppen war die Expression von TNC und POSTN besonders in den Gruppen

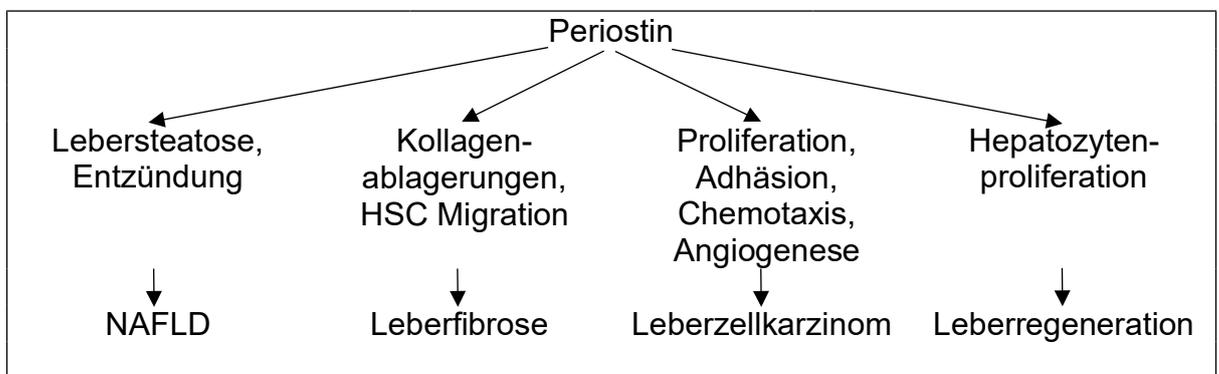
1 – 3 (immunvermittelte, toxische und virale Leberschädigung) erhöht. Im Gegensatz dazu wies die Gruppe der Proben mit hereditär-metabolischer Schädigung für beide ECM-Proteine geringere Expressionslevel auf. Aus diesem Grund kann man für Gruppe 4 ein anderer - TNC-/POSTN-unabhängiger - Mechanismus der Leberschädigung und –regeneration vermuten. Bislang gibt es dazu wenig Evidenz, allerdings führte eine Unterbrechung der Nitisinon-Therapie im Mausmodell bei Tieren mit Tyrosinämie Typ I zu einer Aktivierung gleich mehrerer molekularer Signalwege. So wurde eine Hochregulation der Gene beobachtet, die mit dem Stoffwechsel reaktiver Sauerstoffspezies und des Glutathionstoffwechsels in Verbindung stehen. Diese Stressreaktion wiederum war mit der transkriptionellen Aktivierung mehrerer Marker von Leberzellvorläuferzellen verbunden, darunter Atf3, Cyr61, Ddr1, Epcam, Elovl7 und Glis3, was auf eine sehr frühe Aktivierung der Leberregeneration nach Nitisinon-Entzug schließen ließ (Colemonts-Vroninks et al. 2020). Hier sind in Zukunft noch viele Untersuchungen notwendig, um die genauen Mechanismen der Leberregeneration bei hereditär-metabolischer Leberschädigung zu beschreiben.

Die Analyse des Vorhandenseins eines TNC-Gradienten konnte eine Abhängigkeit sowohl von der Ätiologie der Leberschädigung als auch von der Progression der Schädigung über den Desmet-Score aufzeigen. Dabei war die Prävalenz des TNC-Gradienten in Gruppe 2 (toxische Leberschädigung) und Gruppe 4 (hereditär metabolische Leberschädigung) deutlich niedriger als in den beiden anderen Gruppen. Die unterschiedliche Verteilung des Gradienten in den histologischen Leberzellkompartimenten kann als Zeichen ätiologisch individuell unterschiedlich ablaufender Signalwege gedeutet werden. Die Anzahl an Gewebeprobe ohne Gradienten sank zudem mit zunehmendem Desmet-Stadium.

In zahlreichen älteren Studien wurde bereits eine erhöhte TNC-Expression bei Vorliegen einer chronischen Leberschädigung nachgewiesen (Yamada et al. 1992; Ramadori et al. 1991). Zudem konnte auch der umgekehrte Fall nachgewiesen werden, nämlich eine Abschwächung der Fibrose im Falle eines TNC-Mangels (El-Karef et al. 2007a). Die TNC-Serumkonzentrationen waren bei

Patienten und Patientinnen mit chronischer HCV (Tanaka et al. 2006), äthyltoxischer Leberschädigung (Lieber et al. 2008), Leberzirrhose (Yamauchi et al. 1994) und HCC signifikant erhöht (Benbow et al. 2016). Aufgrund dessen wurde die Verwendung von TNC als Plasma-Biomarker für die Leberzirrhose und HCC vorgeschlagen (Benbow et al. 2016; Benbow et al. 2018).

Aktuelle Erkenntnisse deuten darauf hin, dass auch POSTN eine aktive Rolle bei pathologischen Prozessen der chronisch kranken Leber, einschließlich der Lebersteatose, Entzündung, Fibrosierung und Tumorgenese einnimmt. Jia et al. (2019) fassen die aktuell bekannten Funktionen von POSTN bei chronischer Leberschädigung graphisch folgendermaßen zusammen (Abbildung 25)



**Abbildung 25: Wirkmechanismen und Aufgaben von POSTN bei chronischer Leberschädigung und Regeneration (modifiziert nach Jia et al. 2019, o. S.)**

Bereits in tierexperimentellen Studien mit unterschiedlichen Mausmodellen ist POSTN als wesentlicher Faktor bei der Progression der NASH ausgemacht worden (Lu et al. 2014; Li et al. 2015). Dabei wurde das Vorliegen einer chronischen Entzündungsreaktion als Hauptfaktor für die Progression von NAFLD zu NASH identifiziert. Li et al. (2015) konnten zeigen, dass die POSTN-Expression nach NASH-Induktion in Mäusen signifikant erhöht, war im Gegensatz zu den gesunden Mäusen. In der Subgruppenanalyse von POSTN-Knockout-Mäusen wiesen diese deutlich weniger Entzündungsmarker, einen geringeren Fibrosierungsgrad sowie einen niedrigeren Steatosegrad auf. In leberkranken Wildtyp-Mäusen führte die Anwesenheit von POSTN zu einer signifikant höheren Entzündungs- und Fibrosereaktion als in den POSTN-KO-Mäusen (Huang et al. 2015).

In klinischen Studien wiesen Patienten und Patientinnen mit NAFLD höhere POSTN-Konzentrationen im Serum und in der Leber auf (Lu et al. 2014; Yang et al. 2016). Die erhöhte POSTN-Serumkonzentration korrelierte dabei mit den Transaminasewerten und dem Hüftumfang der Patienten und Patientinnen und war mit einem Odds Ratio von 1,75 [95% Konfidenzintervall (1,04-3,37);  $p < 0,001$ ] für NAFLD und Insulinresistenz assoziiert. In einer weiteren Untersuchung korrelierte die POSTN-Konzentration im Serum mit der TGF- $\beta$ -Expression in Patienten und Patientinnen mit chronischer Hepatitis (Huang et al. 2015). Mantovani et al. (2019) weisen darauf hin, dass auch POSTN aus anderen Quellen außerhalb der Leber (beispielsweise im Knochen) möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung und/oder Progression von NAFLD in bestimmten Patientenkohorten spielen kann. Hintergrund sind die Ergebnisse ihrer Studie an 777 postmenopausalen Frauen mit einem Diabetes Mellitus Typ 2 und erhöhten Biomarkern für den Knochenumsatz. Umgekehrt korrelierte der Fibrosegrad bei postmenopausalen Frauen mit Diabetes mellitus Typ 2 und NAFLD (Diagnosesicherung histologisch über Leberbiopsie) negativ mit der Knochendichte (Zhu et al. 2020).

Insbesondere diese letzten beiden Studien zeigen, dass die zahlreichen Wirkmechanismen von POSTN noch weiter untersucht werden müssen – und zwar für unterschiedliche Gewebearten und Lokalisationen innerhalb eines Organs. Antifibrotische Therapien, die ihre Wirkung allein über die POSTN-Inhibition entfalten, könnten ansonsten in anderen Gewebearten für unerwünschte Nebenwirkungen sorgen.

Zum Einfluss von POSTN auf die Fibrosierung der Leber liegen bislang lediglich Erkenntnisse aus *In-vitro*- und tierexperimentellen Studien vor. Der profibrogene Effekt von POSTN wird eventuell über den TGF- $\beta$ 1/SMAD-Signalweg vermittelt (Hong et al. 2015; Huang et al. 2015). Aber auch andere Signalwege wie die POSTN- $\alpha$ v-Integrin-Achse und die Aktivierung von durch Interleukin-7 vermittelte Signalkaskaden wurden bereits diskutiert (Jia et al. 2019).

Ein wesentliches Merkmal der Tumorgenese und –progression ist die ausgezeichnete Kommunikation und Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung.

Viele ECM-Proteine, unter anderem POSTN, werden sowohl von den Krebszellen selbst als auch von den sie umgebenden Stromazellen sezerniert, und tragen damit aktiv zur Schaffung einer proliferativen Mikroumgebung mit entsprechendem Tumorwachstum und -metastasierung bei. Die POSTN-Expression ist inzwischen eng mit der Invasivität und Progression von zahlreichen Tumorarten assoziiert, unter anderen beim kleinzelligen Lungenkarzinom, Pankreaskarzinom und Mammakarzinom (Jia et al. 2019; Liu et al. 2019).

Lv et al. (2013) konnten erstmals nachweisen, dass der POSTN-Serumspiegel in HCC-Gewebe höher war als in den angrenzenden Geweben. Außerdem standen die hohen POSTN-Serumkonzentrationen in engem Zusammenhang mit der Tumormetastasierung und Angiogenese. Ähnliches wurde im Rahmen einer immunhistochemischen Untersuchung von 149 Patienten und Patientinnen bestätigt, die sich zwischen 2006 und 2010 einer chirurgischen Resektion wegen HCC unterzogen hatten (Jang et al. 2016). Die immunhistochemischen Färbungen zeigten, dass die Kombination aus Überexpression von POSTN und mikrovaskulärer Invasion beim HCC mit einer schlechten Prognose assoziiert waren. Die Autoren schlagen daher, entsprechender Validierung vorausgesetzt, daher die Verwendung von POSTN-Serumkonzentrationen als Marker für die HCC-Progression vor.

Es liegen bereits erste positive Ergebnisse für den Einsatz von POSTN-Antagonisten im Mausmodell bei Brust- und Magenkrebsmetastasen vor (Lee et al. 2013; Liu et al. 2015). Gleichwohl müssen bei derartigen Therapieansätzen Folgen wie die Einschränkung der POSTN-vermittelten Angiogenese bei der Leberregeneration oder auch die Einschränkung der Leberregeneration nach Leberteilresektion bedacht werden. So ist bekannt, dass ein POSTN-Mangel in den späteren Phasen der Leberregeneration Beeinträchtigungen der Angiogenese zur Folge hat. Außerdem führte die POSTN-Überexpression im Mausmodell zu einer schnelleren und effizienteren Leberregeneration nach Leberteilresektion (Wu et al. 2018).

Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur und erweitern den derzeitigen Stand der

Wissenschaft um wichtige Einblicke in die Situation am Menschen. Neu ist dabei die Erkenntnis, dass TNC vermutlich eine allgemeinere Rolle bei den Schädigungs- und Regenerationsprozessen einnimmt, wobei der Mechanismus zumindest für die hereditär-metabolische Schädigung TNC-unabhängig zu sein scheint. Die heterogene Gradienten-Verteilung für TNC deutet außerdem auf individuelle Signalwege in Abhängigkeit der Ätiologie hin. POSTN scheint im Vergleich zu TNC eine spezifischere Rolle bei den Prozessen um Leberschädigung und –regeneration zu spielen, die von der Ätiologie der Schädigung abhängig ist. Nach unserer Kenntnis ist dies die erste Studie, in der eine systematische Untersuchung an humanen Gewebeproben von Patienten und Patientinnen mit Leberschädigung durchgeführt wurde. Der Entdeckung von gleich drei möglichen Einflussfaktoren auf die Schädigungs- und Regenerationsprozesse, nämlich Ätiologie der Leberschädigung, Krankheitsstadium und Lokalisation, wird eine große Bedeutung zugeschrieben, die es zukünftig im Zuge weiterer Untersuchungen näher zu erörtern gilt.

#### **4.2 Rolle von hepatischen *stellate cells* in der Leberschädigung und –regeneration**

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass HSC auch beim Menschen an den Prozessen Leberschädigung und –regeneration beteiligt sind. Die Aktivierung der HSC war dabei abhängig von der Lokalisation und Ätiologie der Leberschädigung. So wurden in Lokalisation 1 (portal, periportal, septal und periseptal) signifikante Unterschiede zwischen den ätiologischen Gruppen identifiziert, wobei das Vorkommen von  $\alpha$ SMA-positiven HSC in Proben mit viraler Leberschädigung am höchsten und im Falle von hereditär-metabolischer Leberschädigung am niedrigsten war. In Lokalisation 2 (perisinusoidal und perizentral) waren die Gruppenunterschiede nicht signifikant, da die Anzahl aktivierter HSC in den Gruppen 1 bis 3 (immunvermittelt, toxisch und viral) ähnlich hoch ausfiel. Am niedrigsten war die Konzentration aktivierter HSC bei hereditär-metabolischer Leberschädigung.

Die Expressionsraten von HSC waren zudem vom Krankheitsstadium abhängig und nahmen mit fortschreitendem Desmet-Stadium zu. Auch hier konnte ein Unterschied zwischen den Lokalisationen festgestellt werden. In Lokalisation 1 (portal, periportal, septal und periseptal) war der Gruppenunterschied für die beiden Subgruppen A (Desmet-Score 1 oder 2) und B (Desmet-Score 3 oder 4) hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). In Lokalisation 2 (perisinusoidal und perizentral) wurde ebenfalls eine Zunahme der  $\alpha$ SMA-Färbung bei Proben mit Desmet-Score 3 oder 4 beobachtet, aber der Vergleich mit den beiden ersten Desmet-Stadien war nicht signifikant.

Nachdem das Vorhandensein von aktivierten HSC analog zur Expression von TNC und POSTN anstieg, scheint dies die bisherige Literatur zu bestätigen, die den aktivierten HSC eine Sekretion von ECM-Proteinen zuschreibt (Friedman 2008; Thompson et al. 2015). Im Speziellen ist bereits nachgewiesen worden, dass aktivierte HSC Tenascin C und Periostin synthetisieren (El-Karef et al. 2007b; Zhang et al. 2017).

Insgesamt zeigt der Blick in die Literatur einen großen Mangel an Studien zu HSC mit humanen Gewebeproben auf. Hingegen finden sich zuhauf Berichte über tierexperimentelle und *in-vitro*-Untersuchungen, die sich mehrheitlich mit den potenziellen Signalkaskaden in der Aktivierung von HSCs befassen. Weiterhin sind auch viele Reviews publiziert, deren Aufgabe in der strukturierten Wiedergabe des jeweils aktuellen Wissensstandes zu sehen ist. Zur Einordnung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ist die Durchführung weiterer Studien notwendig, vorzugsweise mit humanen Gewebeproben anstelle von Tiermodellen.

### **4.3 Dynamik der duktilären Reaktion und Hepatozytenproliferation in der Leberschädigung und –regeneration**

In dieser Studie konnte an humanen Gewebeproben nachgewiesen werden, dass im Rahmen der Leberregeneration eine duktiläre Reaktion mit Proliferation von Zellen mit dem Markerprofil der hepatischen Progenitorzellen in einer Nische aus extrazellulärer Matrix und Immunzellen ausgelöst wird. Das Auftreten einer duktilären Reaktion zeigte Unterschiede bezüglich der

ätiologischen Gruppen und war außerdem zu einem gewissen Grad abhängig von dem als Surrogatmarker verwendeten Antikörper. Unabhängig vom verwendeten Antikörper gab es eine weniger ausgeprägte duktiläre Reaktion bei hereditär-metabolischer Leberschädigung. Mit CK7 war die duktiläre Reaktion in Gruppe 3 (virale Leberschädigung) leicht erhöht und für Sox9 traf dies auf Gruppe 1 (immunvermittelte Leberschädigung zu).

Aus den Differenzen zum Vorkommen der duktilären Reaktion zwischen den verwendeten Antikörpern kann gefolgert werden, dass bei derartigen Untersuchungen die Verwendung von Panels aus mehreren Markern einer Untersuchung durch nur einen einzigen Marker überlegen ist. Möglicherweise würde der Einsatz von nur einem Antikörper dazu führen, dass der Nachweis der duktilären Reaktion in einzelnen ätiologischen Gruppen unter Umständen nur schwach oder gar nicht sichtbar wird. In zukünftigen Studien wird der Stellenwert der einzelnen Antikörper für den Nachweis der duktilären Reaktion in den ätiologischen Gruppen noch zu klären sein. Bis dahin jedoch wird der Einsatz eines Panels für sinnvoll erachtet. Mit der Verwendung eines Panels würden gleich mehrere Antikörper abgedeckt und die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises einer duktilären Reaktion unabhängig von der Ätiologie der Leberschädigung wäre erhöht.

Mit fortschreitendem Stadium der Leberschädigung, also in späteren Krankheitsstadien gegenüber den Anfangsstadien, fiel die duktiläre Reaktion in dieser Studie signifikant ausgeprägter aus. Die statistischen Vergleiche zum Vorkommen der duktilären Reaktion in den Desmet-Stadien für die Antikörper CK7 und Sox9 waren beide hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Auch ältere histopathologische Untersuchungen von humanen Gewebeproben aus Leberbiopsien konnten bereits Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der chronischen Leberschädigung und der Zahl der vorhandenen Zellen mit dem Markerprofil der hepatischen Progenitorzellen ausmachen. Dabei nahm die Zellzahl mit steigendem Fibrosegrad zu (Lowes et al. 1999; Roskams et al. 2003). In einer weiteren Studie korrelierte der Fibrosegrad zudem mit der Fläche der duktilären Reaktion (Clouston et al. 2005). In einer aktuelleren

Untersuchung mit 90 Gewebeproben von Patienten und Patientinnen mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis erfolgte eine longitudinale Analyse von sukzessiven, zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Leberbiopsien. Dabei korrelierte die Prävalenz der duktulären Reaktion signifikant mit der Progression der Leberschädigung (Zhao et al. 2018).

Indes ist trotz des erfolgreichen Nachweises von HPC bei vielen chronischen Lebererkrankungen wie der alkoholischen Steatohepatitis (Sancho-Bru et al. 2012; Dubuquoy et al. 2015), NAFLD (Gadd et al. 2014), der chronischen Hepatitis B und C (Sun et al. 2006; Prakoso et al. 2014) sowie der PBC und PSC (Crosby et al. 1998) der Immunphänotyp von HPC noch unzureichend charakterisiert (Sato et al. 2019). Dies macht sich vor allem in einem Mangel an spezifischen Markern bemerkbar, wodurch die Genauigkeit der HPC-Bestimmung Einschränkungen erfährt. Die Genauigkeit der HPC-Bestimmung kann jedoch mittels Kombination mehrerer Expressionsmarker erhöht werden (Adnindya et al. 2017).

Die (peri-) portale und (peri-) septale Expression von TNC und POSTN korrelierte zudem signifikant mit der Proliferation hepatischer Progenitorzellen bei der Leberregeneration (duktuläre Reaktion) (jeweils  $p < 0,001$ ) sowie mit der Aktivierung von hepatischen Stellatumzellen ( $p < 0,001$  für TNC,  $p = 0,002$  für POSTN). Diese Zusammenhänge liefern wichtige Hinweise darauf, dass die aktivierten HSC und das von ihnen produzierte TNC und POSTN eine zentrale Rolle bei der Schaffung der Nische spielen, in der die duktuläre Reaktion überhaupt stattfinden kann.

Bezüglich der ätiologischen Gruppen fiel genau wie bei der Expression von TNC und POSTN auch die duktuläre Reaktion in Gruppe 4 (hereditär-metabolische Leberschädigung) am niedrigsten aus. Dies deutet möglicherweise auf eine besondere Form der Leberschädigung- und regeneration für diese Ätiologie hin. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind weitere Untersuchungen notwendig, wobei diese sich aufgrund der kleinen zugrundeliegenden Patientenkollektive durchaus schwierig und zeitaufwendig gestalten dürften.

Die Auswertung der Proliferationsaktivität von Hepatozyten zeigte, dass im Anfangsstadium der Leberschädigung (Desmet-Stadium 1 und 2) sowohl hepatozytäre als auch biliäre Zellen eine aktive Rolle spielen. In späteren Stadien (Desmet-Stadien 3 und 4) hingegen, nahm die Aktivität der Hepatozyten ab, während die biliären Epithelien weiterhin minimal erhöhte Proliferationsraten aufwiesen.

Die Bedeutung und Tragweite dieser letzten beiden Erkenntnisse sind noch unklar. Eine Studie am Rattenmodell untersuchte die Rolle der Hepatozyten bei der Leberschädigung und –regeneration der alkoholischen Steatohepatitis im zeitlichen Verlauf über eine Dauer von fünf Wochen. Über die Messung der Aktivität der Plasma-Transaminasen konnte ein progressiver Anstieg der Leberschädigung nachgewiesen werden, der am Ende der dritten Woche sein Maximum erreichte. In den nachfolgenden Wochen 4 und 5 konnte eine leichte aber signifikant geringere Abnahme der Leberschädigung beobachtet werden. Die Studienautoren kamen zu dem Schluss, dass der vorübergehende Rückgang der Leberschädigung während der alkoholischen Steatose auf eine verstärkte NF- $\kappa$  B-abhängige Hepatozytenproliferation zurückzuführen war (Apte et al. 2004). Insgesamt offenbart sich hier die Notwendigkeit weiterer Studien zur Bestätigung, Einordnung und Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung.

#### **4.4 Schlussfolgerungen**

Die heterogene Expression von Tenascin C und Periostin im geschädigten Lebergewebe sowie die Korrelation der Markerexpression mit der Aktivierung von HSC und der Proliferation von hepatischen Progenitorzellen sprechen für eine aktive Rolle der beiden extrazellulären Matrixproteine in Rahmen der chronischen Leberschädigung und –regeneration. Ferner scheinen die Expressionslevel der beiden ECM-Molekülen TNC und POSTN, das Ausmaß der duktulären Reaktion sowie die Zahl der aktivierten HSC von der Ätiologie der Leberschädigung und auch vom Krankheitsstadium (Desmet-Stadium) abhängig zu sein. Tendenziell beobachten wir eine Zunahme an duktulärer Reaktion und aktivierten HSC bei steigendem Desmet-Stadium, insbesondere bei immunvermittelten Leberschädigungen.

Die Aktivierung der HSC war in Lokalisation 1 (portal, periportal, septal und periseptal) bei der viralen Leberschädigung am höchsten, während in Lokalisation 2 (perisinusoidal und perizentral) die HSC-Aktivierung für die ätiologischen Gruppen 1, 2 und 3 (immunvermittelt, toxisch und viral) ähnlich hoch ausfiel. In beiden Lokalisationen kamen bei der Gruppe der hereditär-metabolischen Leberschädigungen deutlich weniger  $\alpha$ SMA-positive HSC vor als in den anderen Ätiologien. Die duktiläre Reaktion, als Korrelat für die Regeneration, fiel in den ätiologischen Gruppen und je nach verwendetem Antikörper unterschiedlich aus. Mit dem Antikörper CK7 war die duktiläre Reaktion in Gruppe 3 (virale Leberschädigung) prominenter und mit Sox9 das Vorkommen der duktilären Reaktion in Gruppe 1 (immunvermittelte Leberschädigung) erhöht. Unabhängig vom Antikörper war in der Gruppe der hereditär-metabolischen Leberschädigungen die geringste Ausprägung der duktilären Reaktion zu beobachten, so dass in dieser Krankheitsgruppe die Regeneration möglicherweise auf andere Mechanismen zurückzuführen ist

#### **4.5 Stärken, Limitationen und Ausblick**

Im folgenden Abschnitt wird abschließend auf die Stärken und Limitationen der Studie eingegangen. Die größte Stärke der Studie ist die Schaffung neuer Erkenntnisse an humanen Gewebeproben von Patienten und Patientinnen mit chronischer Leberschädigung. Damit wird ein wesentlicher Beitrag zur Erweiterung des aktuellen Wissenschaftsstandes geleistet; insbesondere vor dem Hintergrund der geringen Anzahl an Studien mit humanen Gewebeproben, bei gleichzeitig steigender Relevanz der chronischen Lebererkrankungen für die Gesellschaft. Obwohl *In-vitro*-Experimente und tierexperimentelle Studien an Mäusen für das Studium der Leber unverzichtbar sind, so sind die jeweiligen Erkenntnisse letztlich nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar. Aufgrund der Komplexität der Funktionen der menschlichen Leber müssen, je nach Spezies und in Abhängigkeit von der darzustellenden chronischen Lebererkrankung, unterschiedliche Modelle angewandt werden. Hinzukommt der fehlende Beobachtungszeitraum von mehreren Monaten, wie sie für die Analogie zur chronischen Leberschädigung beim Menschen erforderlich wäre (Sadri et al. 2016; Sato et al. 2019).

Nachdem im Zuge der Recherchen für diese Arbeit keine einzige derartige Untersuchung identifiziert werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass diese Studie tatsächlich die erste ihrer Art darstellt. Damit stehen den Forschern nun erstmalig anhand humaner Gewebeproben belegte Erkenntnisse über die Rolle der ECM-Proteine POSTN und TNC, sowie HPC und HSC für gleich alle vier Haupt-Ätiologien der chronischen Leberschädigung bereit. Außerdem gibt es damit gesicherte Daten zum Vorkommen dieser Moleküle und Zellen in unterschiedlichen Stadien der chronischen Leberschädigung, sowie zu deren Verteilung (Lokalisation) innerhalb des Organs.

Die vorliegende Studie wird limitiert durch die Tatsache, dass es sich um eine rein morphologische immunhistochemische Analyse handelt, welche die Entwicklung der Prozesse der Leberschädigung und -regeneration nur eingeschränkt darstellen kann. Eine weitere Limitation stellt die geringe Anzahl an Gewebeproben in einigen ätiologischen Gruppen dar. Insbesondere standen nur wenige Gewebeproben von Patienten und Patientinnen mit viraler und hereditär-metabolischer Leberschädigung für die Untersuchungen zur Verfügung. Die geringe Anzahl der Proben in diesen Gruppen führte bei der Aufteilung entsprechend des Desmet-Stadiums zu einer weiteren Verkleinerung der Stichproben für die Subgruppenanalyse. Hier sind in Zukunft weitere Studien mit größeren Stichprobengrößen beziehungsweise Patientenkollektiven notwendig. Einerseits um die Ergebnisse dieser Untersuchung zu bestätigen und andererseits, um weiterführende Analysen (wie beispielsweise eine weitere Unterteilung entsprechend der vier einzelnen Desmet-Stadien oder auch der jeweiligen Grunderkrankung anstelle von Hauptkategorien für die ätiologischen Auswertungen) zu ermöglichen.

## 5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht Gruppeneinteilung und Subgruppierungen .....	24
Abbildung 2: Verwendete Marker .....	25
Abbildung 3: Ermittlung des Expressionslevels .....	30
Abbildung 4: Patientenkollektiv.....	33
Abbildung 5: Expression von TNC in der gesunden Leber.....	34
Abbildung 6: Vergleich der TNC-Expression in den ätiologischen Gruppen.....	35
Abbildung 7: TNC-Expression in Abhängigkeit von der Ätiologie.....	35
Abbildung 8: Vergleich der TNC-Expression Desmet-Stadien .....	36
Abbildung 9: TNC-Expression in Abhängigkeit vom Desmet-Stadium.....	37
Abbildung 10: Vorhandensein eines TNC-Gradienten.....	38
Abbildung 11: TNC-Gradient in den ätiologischen Gruppen .....	40
Abbildung 12: Vorkommen eines TNC-Gradienten in den Desmet-Stadien .....	41
Abbildung 13: Expression von POSTN in der gesunden Leber .....	42
Abbildung 14: Vergleich der POSTN-Expression in den ätiologischen Gruppe.	43
Abbildung 15: POSTN-Vorkommen in den unterschiedlichen Desmet-Gruppe.	43
Abbildung 16: Aktivierung von $\alpha$ SMA.....	44
Abbildung 17: Vergleich des Vorkommens von HSC .....	45
Abbildung 18: Duktuläre Reaktion mit Sox9 und CK7 .....	46
Abbildung 19: Duktuläre Reaktion mit CK7 in Bezug auf die Ätiologie .....	47
Abbildung 20: Duktuläre Reaktion mit Sox9 in Bezug auf die Ätiologie .....	48
Abbildung 21: Duktuläre Reaktion mit CK7 Desmet-Gruppen .....	48
Abbildung 22: Duktuläre Reaktion mit Sox9 Desmet-Gruppen .....	49
Abbildung 23: Vorkommen des Proliferationsmarkers Ki-67 .....	51
Abbildung 24: Proliferation mit Vorkommen von Ki-67 .....	51
Abbildung 25: Wirkmechanismen und Aufgaben von POSTN .....	55

## 6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fibrosegrade nach Desmet et al. (1994).....	2
Tabelle 2: Immunhistochemisches Färbeprotokoll für $\alpha$ SMA.....	26
Tabelle 3: Übersicht immunhistochemische Färbeprotokolle.....	28
Tabelle 4: Übersicht TNC-Gradient nach Ätiologie der Leberschädigung .....	39
Tabelle 5: Übersicht TNC-Gradient nach Desmet-Stadium.....	40
Tabelle 6: Zusammenhang Vorkommen der duktilären Reaktion in Bezug auf die TNC-Expression.....	49
Tabelle 7: Zusammenhang Vorkommen der duktilären Reaktion in Bezug auf die POSTN-Expression.....	50

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

Adnindya, Rulan; Indriyani; Azmi, Ahmad; Liem, Isabella (2017): Specific Markers for Hepatic Progenitor Cells. In: *OnLine Journal of Biological Sciences* 17, S. 187–192. DOI: 10.3844/ojbsci.2017.187.192.

Apte, Udayan M.; Mcrec, Rachel; Ramaiah, Shashi K. (2004): Hepatocyte proliferation is the possible mechanism for the transient decrease in liver injury during steatosis stage of alcoholic liver disease. In: *Toxicol Pathol* 32 (5), S. 567–576. DOI: 10.1080/01926230490508812.

Benbow, Jennifer H.; Elam, April D.; Bossi, Krista L.; Massengill, Danae L.; Brandon-Warner, Elizabeth; Anderson, William E. et al. (2018): Analysis of Plasma Tenascin-C in Post-HCV Cirrhosis: A Prospective Study. In: *Dig Dis Sci* 63 (3), S. 653–664. DOI: 10.1007/s10620-017-4860-z.

Benbow, Jennifer H.; Thompson, Kyle J.; Cope, Heidi L.; Brandon-Warner, Elizabeth; Culberson, Catherine R.; Bossi, Krista L. et al. (2016): Diet-Induced Obesity Enhances Progression of Hepatocellular Carcinoma through Tenascin-C/Toll-Like Receptor 4 Signaling. In: *The American Journal of Pathology* 186 (1), S. 145–158. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.09.015.

Blaner, William S.; O'Byrne, Sheila M.; Wongsiriroj, Nuttaporn; Kluwe, Johannes; D'Ambrosio, Diana M.; Jiang, Hongfeng et al. (2009): Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. In: *Biochimica et biophysica acta* 1791 (6), S. 467–473. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2008.11.001.

Castilho-Fernandes, Andrielle; Almeida, Danilo Candido de; Fontes, Aparecida Maria; Melo, Fernanda Ursoli Ferreira; Picanço-Castro, Virgínia; Freitas, Marcela Cristina et al. (2011): Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Experimental and molecular pathology* 91 (3), S. 664–672. DOI: 10.1016/j.yexmp.2011.09.002.

Chen, Lin; Zhang, Wei; Zhou, Qiao-dan; Yang, Hong-qiang; Liang, Hui-fang; Zhang, Bi-xiang et al. (2012a): HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration. In: *Cell biochemistry and function* 30 (7), S. 588–596. DOI: 10.1002/cbf.2838.

Chen, Yixin; Wong, Philip P.; Sjeklocha, Lucas; Steer, Clifford J.; Sahin, M. Behnan (2012b): Mature hepatocytes exhibit unexpected plasticity by direct dedifferentiation into liver progenitor cells in culture. In: *Hepatology* 55 (2), S. 563–574. DOI: 10.1002/hep.24712.

Clouston, A. D.; Powell, E. E.; Walsh, M. J.; Richardson, M. M.; Demetris, A. J.; Jonsson, J. R. (2005): Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. In: *Hepatology* 41 (4), S. 809–818.

Colemonts-Vroninks, Haaike; Neuckermans, Jessie; Marcelis, Lionel; Claes, Paul; Branson, Steven; Casimir, Georges et al. (2020): Oxidative Stress, Glutathione Metabolism, and Liver Regeneration Pathways Are Activated in Hereditary Tyrosinemia

Type 1 Mice upon Short-Term Nitisinone Discontinuation. In: *Genes* 12 (1). DOI: 10.3390/genes12010003.

Craig, Clare Elizabeth Honor; Quaglia, Alberto; Selden, Clare; Lowdell, Mark; Hodgson, Humprey; Dhillon, Amar Paul (2004): The histopathology of regeneration in massive hepatic necrosis. In: *Seminars in liver disease* 24 (1), S. 49–64. DOI: 10.1055/s-2004-823101.

Crosby, Heather A.; Hubscher, S.; Fabris, L.; Joplin, R.; Sell, S.; Kelly, D.; Strain, A. J. (1998): Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. In: *American Journal of Pathology* 152 (3), S. 771–779.

Desmet, Valeer J.; Gerber, Michael; Hoofnagle, Jay H.; Manns, Michael; Scheuer, Peter J. (1994): Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. In: *Hepatology* 19 (6), S. 1513–1520. DOI: 10.1002/hep.1840190629.

Dubuquoy, Laurent; Louvet, Alexandre; Lassailly, Guillaume; Truant, Stéphanie; Boleslawski, Emmanuel; Artru, Florent et al. (2015): Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis. In: *Gut* 64 (12), S. 1949–1960. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308410.

Duncan, Andrew W.; Dorrell, Craig; Grompe, Markus (2009): Stem cells and liver regeneration. In: *Gastroenterology* 137 (2), S. 466–481. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.05.044.

EI-Karef, A.; Yoshida, T.; Gabazza, E. C.; Nishioka, T.; Inada, H.; Sakakura, T.; Imanaka-Yoshida, K. (2007a): Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immune-mediated chronic hepatitis in mice. In: *The Journal of pathology* 211 (1), S. 86–94. DOI: 10.1002/path.2099.

EI-Karef, Amro; Kaito, Masahiko; Tanaka, Hideaki; Ikeda, Kazuo; Nishioka, Tomohiro; Fujita, Naoki et al. (2007b): Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate cells/myofibroblasts in chronic hepatitis C. In: *Journal of hepatology* 46 (4), S. 664–673. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.10.011.

Farber, E. F. (1956): Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylamino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. In: *Cancer research* 16 (2), S. 142–148.

Friedman, Scott L. (2008): Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. In: *Physiological reviews* 88 (1), S. 125–172. DOI: 10.1152/physrev.00013.2007.

Fuchs, Elaine; Tumber, Tudorita; Guasch, Geraldine (2004): Socializing with the Neighbors. In: *Cell* 116 (6), S. 769–778. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00255-7.

Gadd, V. L.; Skoien, R.; Powell, E. E.; Fagan, K. J.; Winterford, C.; Horsfall, L. et al. (2014): The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology* 59 (4), S. 1393–1405.

- Ghiassi-Nejad, Zahra; Friedman, Scott L. (2008): Advances in antifibrotic therapy. In: *Expert review of gastroenterology & hepatology* 2 (6), S. 803–816. DOI: 10.1586/17474124.2.6.803.
- Giblin, Sean P.; Midwood, Kim S. (2015): Tenascin-C: Form versus function. In: *Cell adhesion & migration* 9 (1-2), S. 48–82. DOI: 10.4161/19336918.2014.987587.
- Gocheva, Vasilena; Naba, Alexandra; Bhutkar, Arjun; Guardia, Talia; Miller, Kathryn M.; Li, Carman Man-Chung et al. (2017): Quantitative proteomics identify Tenascin-C as a promoter of lung cancer progression and contributor to a signature prognostic of patient survival. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (28), E5625-E5634. DOI: 10.1073/pnas.1707054114.
- Govaere, Olivier; Cockell, Simon; van Haele, Matthias; Wouters, Jasper; van Delm, Wouter; van den Eynde, Kathleen et al. (2019): High-throughput sequencing identifies aetiology-dependent differences in ductular reaction in human chronic liver disease. In: *The Journal of pathology* 248 (1), S. 66–76. DOI: 10.1002/path.5228.
- Harris, Patrick S.; Hansen, Ross M.; Gray, Meagan E.; Massoud, Omar I.; McGuire, Brendan M.; Shoreibah, Mohamed G. (2019): Hepatocellular carcinoma surveillance: An evidence-based approach. In: *World journal of gastroenterology* 25 (13), S. 1550–1559. DOI: 10.3748/wjg.v25.i13.1550.
- Hermann, W.; Huster, D.; Ransmayr, G.; Boltshauser, E. (2012): S1 Leitlinie Morbus Wilson. AWMF-Registernummer 030/91 (Stand 30.09.2012, in Überarbeitung), gültig bis 29.09.2017.
- Hong, Li; Shejiao, Dai; Fenrong, Chen; Gang, Zhao; Lei, Dong (2015): Periostin down-regulation attenuates the pro-fibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF- $\beta$ 1. In: *J. Cell. Mol. Med.* 19 (10), S. 2462–2468. DOI: 10.1111/jcmm.12636.
- Hoshida, Yujin; Fuchs, Bryan C.; Bardeesy, Nabeel; Baumert, Thomas F.; Chung, Raymond T. (2014): Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. In: *Journal of hepatology* 61 (1 Suppl), S79-90. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.010.
- Huang, Yangmei; Liu, Weiping; Xiao, Hongjun; Maitikabili, Alaiyi; Lin, Qinghua; Wu, Tiantian et al. (2015): Matricellular protein periostin contributes to hepatic inflammation and fibrosis. In: *The American Journal of Pathology* 185 (3), S. 786–797.
- Jang, Se Young; Park, Soo Young; Lee, Hye Won; Choi, Yeon-Kyung; Park, Keun-Gyu; Yoon, Ghil Suk et al. (2016): The Combination of Periostin Overexpression and Microvascular Invasion Is Related to a Poor Prognosis for Hepatocellular Carcinoma. In: *Gut and Liver* 10 (6), S. 948–954. DOI: 10.5009/gnl15481.
- Jia, Yan; Zhong, Fenmiao; Jiang, Shuoyi; Guo, Qin; Jin, Huanhuan; Wang, Feixia et al. (2019): Periostin in chronic liver diseases: Current research and future perspectives. In: *Life Sciences* 226, S. 91–97. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.04.021.
- Jiang, Feng; Parsons, Christopher J.; Stefanovic, Branko (2006): Gene expression profile of quiescent and activated rat hepatic stellate cells implicates Wnt signaling

pathway in activation. In: *Journal of hepatology* 45 (3), S. 401–409. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.03.016.

Kasten, Philipp (2016): Alkoholinduzierte Leberschäden. In: Michael P. Manns und Sabine Schneidewind (Hg.): *Praxis der Papatologie*. Berlin: Springer, S. 111–118.

Köppen, Hartmut (Hg.) (2010): *Gastroenterologie für die Praxis*. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Kordes, Claus; Häussinger, Dieter (2013): Hepatic stem cell niches. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (5), S. 1874–1880. DOI: 10.1172/JCI66027.

Kordes, Claus; Sawitza, Iris; Götze, Silke; Häussinger, Dieter (2012): Stellate cells from rat pancreas are stem cells and can contribute to liver regeneration. In: *PloS one* 7 (12), e51878. DOI: 10.1371/journal.pone.0051878.

Kordes, Claus; Sawitza, Iris; Götze, Silke; Häussinger, Dieter (2013): Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 31 (2-3), S. 290–304. DOI: 10.1159/000343368.

Kordes, Claus; Sawitza, Iris; Götze, Silke; Herebian, Diran; Häussinger, Dieter (2014): Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (12), S. 5503–5515. DOI: 10.1172/JCI74119.

Kordes, Claus; Sawitza, Iris; Müller-Marbach, Alexis; Ale-Agha, Niloofar; Keitel, Verena; Klonowski-Stumpe, Hanne; Häussinger, Dieter (2007): CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 352 (2), S. 410–417. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.11.029.

Kudo, Akira (2017): Introductory review: periostin-gene and protein structure. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74 (23), S. 4259–4268.

Kühn, Bernhard; del Monte, Federica; Hajjar, Roger J.; Chang, Yuh-Shin; Lebeche, Djamel; Arab, Shima; Keating, Mark T. (2007): Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. In: *Nature medicine* 13 (8), S. 962–969.

Kuwahara, Reiichiro; Kofman, Alexander V.; Landis, Charles S.; Swenson, E. Scott; Barendswaard, Els; Theise, Neil D. (2008): The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. In: *Hepatology* 47 (6), S. 1994–2002. DOI: 10.1002/hep.22218.

Lanthier, Nicolas; Rubbia-Brandt, Laura; Lin-Marq, Nathalie; Clément, Sophie; Frossard, Jean-Louis; Goossens, Nicolas et al. (2015): Hepatic cell proliferation plays a pivotal role in the prognosis of alcoholic hepatitis. In: *Journal of hepatology* 63 (3), S. 609–621. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.04.003.

Lebensztejn, Dariusz-Marek; Sobaniec-Lotowska, Maria-Elzbieta; Kaczmarek, Maciej; Voelker, Michael; Schuppan, Detlef (2006): Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. In: *World journal of gastroenterology* 12 (21), S. 3338–3343. DOI: 10.3748/wjg.v12.i21.3338.

- Lee, Youngmin A.; Wallace, Michael C.; Friedman, Scott L. (2015): Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. In: *Gut* 64 (5), S. 830–841. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-306842.
- Lee, Yu Jin; Kim, Il Shin; Park, Soo-Ah; Kim, Youndong; Lee, Jeung Eun; Noh, Dong-Young et al. (2013): Periostin-binding DNA aptamer inhibits breast cancer growth and metastasis. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (5), S. 1004–1013. DOI: 10.1038/mt.2013.30.
- Li, Yuan; Wu, Shasha; Xiong, Shanshan; Ouyang, Gaoliang (2015): Deficiency of periostin protects mice against methionine-choline-deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. In: *Journal of hepatology* 62 (2), S. 495–497.
- Lieber, Charles S.; Weiss, David G.; Paronetto, Fiorenzo (2008): Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease. In: *Alcoholism, clinical and experimental research* 32 (6), S. 1031–1039. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2008.00664.x.
- Liu, Guo-Xiao; Xi, Hong-Qing; Sun, Xiao-Yan; Wei, Bo (2015): Role of periostin and its antagonist PNDA-3 in gastric cancer metastasis. In: *World journal of gastroenterology* 21 (9), S. 2605–2613. DOI: 10.3748/wjg.v21.i9.2605.
- Liu, Yingfu; Huang, Zhengjie; Cui, Dan; Ouyang, Gaoliang (2019): The Multiaspect Functions of Periostin in Tumor Progression. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1132, S. 125–136. DOI: 10.1007/978-981-13-6657-4\_13.
- Lowes, Kym N.; Brennan, Barbara A.; Yeoh, George C.; Olynyk, John K. (1999): Oval Cell Numbers in Human Chronic Liver Diseases Are Directly Related to Disease Severity. In: *The American Journal of Pathology* 154 (2), S. 537–541. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65299-6.
- Lu, Yan; Liu, Xing; Jiao, Yang; Xiong, Xuelian; Wang, E.; Wang, Xiaolin et al. (2014): Periostin promotes liver steatosis and hypertriglyceridemia through downregulation of PPAR $\alpha$ . In: *The Journal of clinical investigation* 124 (8), S. 3501–3513. DOI: 10.1172/JCI74438.
- Lutz, Holger; Trautwein, Christian; Tischendorf, Jens W. (2013): Primary sclerosing cholangitis: diagnosis and treatment. In: *Deutsches Arzteblatt international* 110 (51-52), S. 867–874. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0867.
- Lv, Y.; Wang, W.; Jia, W. D.; Sun, Q. K.; Huang, M.; Zhou, H. C. et al. (2013): High preoperative levels of serum periostin are associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. In: *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 39 (10), S. 1129–1135. DOI: 10.1016/j.ejso.2013.06.023.
- Ma, Jian-Cang; Huang, Xin; Shen, Ya-Wei; Zheng, Chen; Su, Qing-Hua; Xu, Jin-Kai; Zhao, Jun (2016): Tenascin-C promotes migration of hepatic stellate cells and production of type I collagen. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 80 (8), S. 1470–1477.

Manns, Michael P.; Cieplik, Natascha (2016): Pathophysiologie der Entzündung und Fibrose. In: Michael P. Manns und Sabine Schneidewind (Hg.): Praxis der Papatologie. Berlin: Springer, S. 15–21.

Mantovani, A.; Sani, E.; Fassio, A.; Colecchia, A.; Viapiana, O.; Gatti, D. et al. (2019): Association between non-alcoholic fatty liver disease and bone turnover biomarkers in post-menopausal women with type 2 diabetes. In: *Diabetes & Metabolism* 45 (4), S. 347–355. DOI: 10.1016/j.diabet.2018.10.001.

Marcellin, Patrick; Gane, Edward; Buti, Maria; Afdhal, Nezam; Sievert, William; Jacobson, Ira M. et al. (2013): Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. In: *The Lancet* 381 (9865), S. 468–475. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61425-1.

Midwood, Kim S.; Chiquet, Matthias; Tucker, Richard P.; Orend, Gertraud (2016): Tenascin-C at a glance. In: *Journal of cell science* 129 (23), S. 4321–4327.

Mishra, P. K. (2016): Textbook of surgical gastroenterology. New Delhi: Jaypee.

Morra, Laura; Moch, Holger (2011): Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 459 (5), S. 465–475.

Oskarsson, Thordur; Acharyya, Swarnali; Zhang, Xiang H-F; Vanharanta, Sakari; Tavazoie, Sohail F.; Morris, Patrick G. et al. (2011): Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. In: *Nature medicine* 17 (7), S. 867–874. DOI: 10.1038/nm.2379.

Paron, Igor; Berchtold, Sonja; Vörös, Julia; Shamarla, Madhavi; Erkan, Mert; Höfler, Heinz; Esposito, Irene (2011): Tenascin-C enhances pancreatic cancer cell growth and motility and affects cell adhesion through activation of the integrin pathway. In: *PloS one* 6 (6), e21684. DOI: 10.1371/journal.pone.0021684.

Pas, Jakub; Wyszko, Eliza; Rolle, Katarzyna; Rychlewski, Leszek; Nowak, Stanisław; Zukiel, Ryszard; Barciszewski, Jan (2006): Analysis of structure and function of tenascin-C. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 38 (9), S. 1594–1602. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.03.017.

Pintilie, Dana G.; Shupe, Thomas D.; Oh, Seh-hoon; Salganik, Susan V.; Darwiche, Houda; Petersen, Bryon E. (2010): Hepatic stellate cells' involvement in progenitor-mediated liver regeneration. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90 (8), S. 1199–1208. DOI: 10.1038/labinvest.2010.88.

Prakoso, Emilia; Tirnitz-Parker, Janina E. E.; Clouston, Andrew D.; Kayali, Zeid; Lee, Aimei; Gan, Eng K. et al. (2014): Analysis of the intrahepatic ductular reaction and progenitor cell responses in hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. In: *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 20 (12), S. 1508–1519. DOI: 10.1002/lt.24007.

Ramadori, G.; Schwögler, S.; Veit, T.; Rieder, H.; Chiquet-Ehrismann, R.; Mackie, E. J.; zum Meyer Büschenfelde, K. H. (1991): Tenascin gene expression in rat liver and in rat

liver cells. In vivo and in vitro studies. In: *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology* 60 (3), S. 145–153. DOI: 10.1007/BF02899540.

Reinehr, Roland; Sommerfeld, Annika; Häussinger, Dieter (2008): CD95 ligand is a proliferative and antiapoptotic signal in quiescent hepatic stellate cells. In: *Gastroenterology* 134 (5), S. 1494–1506. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.021.

Reynaert, H.; Thompson, M. G.; Thomas, T.; Geerts, A. (2002): Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. In: *Gut* 50 (4), S. 571–581. DOI: 10.1136/gut.50.4.571.

Richardson, Michelle M.; Jonsson, Julie R.; Powell, Elizabeth E.; Brunt, Elizabeth M.; Neuschwander-Tetri, Brent A.; Bhathal, Prithi S. et al. (2007): Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. In: *Gastroenterology* 133 (1), S. 80–90. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.05.012.

Roskams, Tania; Yang, Shi Qi; Koteish, Aymen; Durnez, Anne; DeVos, Rita; Huang, Xiawen et al. (2003): Oxidative Stress and Oval Cell Accumulation in Mice and Humans with Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *The American Journal of Pathology* 163 (4), S. 1301–1311. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63489-X.

Roskams, Tania A.; Theise, Neil D.; Balabaud, Charles; Bhagat, Govind; Bhathal, Prithi S.; Bioulac-Sage, Paulette et al. (2004): Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. In: *Hepatology* 39 (6), S. 1739–1745. DOI: 10.1002/hep.20130.

Sadri, Ali-Reza; Jeschke, Marc G.; Amini-Nik, Saeid (2016): Advances in Liver Regeneration: Revisiting Hepatic Stem/Progenitor Cells and Their Origin. In: *Stem cells international* 2016, S. 7920897. DOI: 10.1155/2016/7920897.

Sancho-Bru, Pau; Altamirano, José; Rodrigo-Torres, Daniel; Coll, Mar; Millán, Cristina; José Lozano, Juan et al. (2012): Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. In: *Hepatology* 55 (6), S. 1931–1941. DOI: 10.1002/hep.25614.

Sato, Keisaku; Marzioni, Marco; Meng, Fanyin; Francis, Heather; Glaser, Shannon; Alpini, Gianfranco (2019): Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. In: *Hepatology* 69 (1), S. 420–430. DOI: 10.1002/hep.30150.

Sawitza, Iris; Kordes, Claus; Reister, Sven; Häussinger, Dieter (2009): The niche of stellate cells within rat liver. In: *Hepatology* 50 (5), S. 1617–1624. DOI: 10.1002/hep.23184.

Sekiya, Sayaka; Suzuki, Atsushi (2014): Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver. In: *The American Journal of Pathology* 184 (5), S. 1468–1478. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.01.005.

Sharma, Sanjeev Kumar; Saini, Nitin; Chwla, Yogesh (2005): Hepatitis B virus: inactive carriers. In: *Virology journal* 2, S. 82. DOI: 10.1186/1743-422X-2-82.

- Shen, Kuntang; Chang, Wenju; Gao, Xiaodong; Wang, Hongshan; Niu, Weixin; Song, Lujun; Qin, Xinyu (2011): Depletion of activated hepatic stellate cell correlates with severe liver damage and abnormal liver regeneration in acetaminophen-induced liver injury. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 43 (4), S. 307–315. DOI: 10.1093/abbs/gmr005.
- Sommerfeld, Annika; Reinehr, Roland; Häussinger, Dieter (2009): Bile acid-induced epidermal growth factor receptor activation in quiescent rat hepatic stellate cells can trigger both proliferation and apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (33), S. 22173–22183. DOI: 10.1074/jbc.M109.005355.
- Sun, C.; Jin, X-L; Xiao, J-C (2006): Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: histological and ultrastructural study. In: *Histopathology* 48 (5), S. 546–555. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02372.x.
- Tanaka, Hideaki; El-Karef, Amro; Kaito, Masahiko; Kinoshita, Noriaki; Fujita, Naoki; Horiike, Shinichiro et al. (2006): Circulating level of large splice variants of tenascin-C is a marker of piecemeal necrosis activity in patients with chronic hepatitis C. In: *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver* 26 (3), S. 311–318. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2005.01229.x.
- Tanimizu, Naoki; Nishikawa, Yuji; Ichinohe, Norihisa; Akiyama, Haruhiko; Mitaka, Toshihiro (2014): Sry HMG box protein 9-positive (Sox9+) epithelial cell adhesion molecule-negative (EpCAM-) biphenotypic cells derived from hepatocytes are involved in mouse liver regeneration. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (11), S. 7589–7598. DOI: 10.1074/jbc.M113.517243.
- Tarlow, Branden D.; Pelz, Carl; Naugler, Willscott E.; Wakefield, Leslie; Wilson, Elizabeth M.; Finegold, Milton J.; Grompe, Markus (2014): Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. In: *Cell stem cell* 15 (5), S. 605–618. DOI: 10.1016/j.stem.2014.09.008.
- Thein, Hla-Hla; Yi, Qilong; Dore, Gregory J.; Krahn, Murray D. (2008): Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. In: *Hepatology* 48 (2), S. 418–431. DOI: 10.1002/hep.22375.
- Theise, N. D.; Nimmakayalu, M.; Gardner, R.; Illei, P. B.; Morgan, G.; Teperman, L. et al. (2000): Liver from bone marrow in humans. In: *Hepatology* 32 (1), S. 11–16. DOI: 10.1053/jhep.2000.9124.
- Thompson, Alexandra I.; Conroy, Kylie P.; Henderson, Neil C. (2015): Hepatic stellate cells: central modulators of hepatic carcinogenesis. In: *BMC Gastroenterol* 15 (1), S. 63. DOI: 10.1186/s12876-015-0291-5.
- Trépo, Christian; Chan, Henry L. Y.; Lok, Anna (2014): Hepatitis B virus infection. In: *The Lancet* 384 (9959), S. 2053–2063. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60220-8.
- van Haele, Matthias; Snoeck, Janne; Roskams, Tania (2019): Human Liver Regeneration: An Etiology Dependent Process. In: *IJMS* 20 (9), S. 2332. DOI: 10.3390/ijms20092332.

- Warpakowski, Andrea (2018): Hepatologie: Erkrankungsinzidenz nimmt zu. In: *Dtsch Ärztebl* 115 (22), A-1058/B-888/C-884.
- Webster, Daniel P.; Klenerman, Paul; Dusheiko, Geoffrey M. (2015): Hepatitis C. In: *The Lancet* 385 (9973), S. 1124–1135. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)62401-6.
- Weiß, Johannes; Rau, Monika; Geier, Andreas (2014): Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. In: *Deutsches Arzteblatt international* 111 (26), S. 447–452. DOI: 10.3238/arztebl.2014.0447.
- Wiegand, Johannes; Berg, Thomas (2013): The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. In: *Deutsches Arzteblatt international* 110 (6), S. 85–91. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0085.
- World Health Organization (2017): Global Hepatitis Report, 2017. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wu, Tiantian; Huang, Jingwen; Wu, Shasha; Huang, Zhengjie; Chen, Xiaoyan; Liu, Yingfu et al. (2018): Deficiency of periostin impairs liver regeneration in mice after partial hepatectomy. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 66, S. 81–92. DOI: 10.1016/j.matbio.2017.09.004.
- Yamada, S.; Ichida, T.; Matsuda, Y.; Miyazaki, Y.; Hatano, T.; Hata, K. et al. (1992): Tenascin expression in human chronic liver disease and in hepatocellular carcinoma. In: *Liver* 12 (1), S. 10–16. DOI: 10.1111/j.1600-0676.1992.tb00548.x.
- Yamauchi, M.; Mizuhara, Y.; Maezawa, Y.; Toda, G. (1994): Serum tenascin levels in chronic liver disease. In: *Liver* 14 (3), S. 148–153. DOI: 10.1111/j.1600-0676.1994.tb00064.x.
- Yang, Liu; Jung, Youngmi; Omenetti, Alessia; Witek, Rafal P.; Choi, Steve; Vandongen, Hendrika M. et al. (2008): Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (8), S. 2104–2113. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0115.
- Yang, Zhaoting; Zhang, Chengye; Qi, Wenbo; Cui, Chunai; Cui, Yan; Xuan, Yanhua (2018): Tenascin-C as a prognostic determinant of colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition and proliferation. In: *Experimental and molecular pathology* 105 (2), S. 216–222. DOI: 10.1016/j.yexmp.2018.08.009
- Yang, Zhen; Zhang, Hongmei; Niu, Yixin; Zhang, Weiwei; Zhu, Lingfei; Li, Xiaoyong et al. (2016): Circulating periostin in relation to insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease among overweight and obese subjects. In: *Scientific reports* 6, S. 37886.
- Yanger, Kilangsunla; Zong, Yiwei; Maggs, Lara R.; Shapira, Suzanne N.; Maddipati, Ravi; Aiello, Nicole M. et al. (2013): Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. In: *Genes & development* 27 (7), S. 719–724. DOI: 10.1101/gad.207803.112.
- Zeuzem, Stefan (2019): Virushepatitis. Medizinische Übersicht. In: Frank Lammert und Petra Lynen Jansen (Hg.): *Weissbuch Gastroenterologie 2020/2021. Erkrankungen des*

Magen-Darm-Traktes, der Leber und der Bauspeicheldrüse – Gegenwart und Zukunft.  
1. Auflage. Berlin: De Gruyter, S. 87–89.

Zhang, Rui; Yao, Rong-Rong; Li, Jing-Huan; Dong, Gang; Ma, Min; Zheng, Qiong-Dan et al. (2017): Activated hepatic stellate cells secrete periostin to induce stem cell-like phenotype of residual hepatocellular carcinoma cells after heat treatment. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 2164. DOI: 10.1038/s41598-017-01177-6.

Zhao, Lei; Westerhoff, Maria; Pai, Rish K.; Choi, Won-Tak; Gao, Zu-Hua; Hart, John (2018): Centrilobular ductular reaction correlates with fibrosis stage and fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. In: *Mod Pathol* 31 (1), S. 150–159. DOI: 10.1038/modpathol.2017.115.

Zhu, Xiaopeng; Yan, Hongmei; Chang, Xinxia; Xia, Mingfeng; Zhang, Linshan; Wang, Liu et al. (2020): Association between non-alcoholic fatty liver disease-associated hepatic fibrosis and bone mineral density in postmenopausal women with type 2 diabetes or impaired glucose regulation. In: *BMJ Open Diab Res Care* 8 (1), e000999. DOI: 10.1136/bmjdr-2019-000999.

## Anhang

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte Ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Irene Esposito für die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Den wohl wichtigsten Beitrag leistete meine Erstbetreuerin Frau Dr. Häberle, die mir während der gesamten Phase der Arbeit nicht nur fachlich als hervorragende Betreuerin, sondern auch als Freundin emotional zur Seite stand. Sie zeigte stets großes Verständnis für all meine Fragestellungen und führte mich immer wieder mit der richtigen Hilfestellung auf den richtigen Weg.

Meinen Eltern, Geschwistern und meinem Ehemann danke ich für Ihre Geduld und Ermutigungen während meines ganzen Studiums und während der ganzen Arbeit an dieser Dissertation. Sie haben mir immer wieder Zuversicht gegeben, auch in schwierigen Phasen nicht aufzugeben und mein Ziel konsequent weiterzuverfolgen.