

**AUS DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE**  
**DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF**  
**DIREKTORIN: UNIV. PROF. DR. MED. IRENE ESPOSITO**

**EINFLUSS DER EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINE**  
**TENASCIN C UND PERIOSTIN AUF DIE MURINE**  
**HEPATOZYTENDIFFERENZIERUNG**

Dissertation

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

vorgelegt von

Johanna Winnie Schifferings

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr.med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Irene Esposito

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

## Zusammenfassung

Die De-differenzierung von Hepatozyten trägt zum bemerkenswerten Regenerationspotential der Leber bei. Dieser Prozess ist u.a. durch eine verminderte Expression von Albumin (ALB), als Marker adulter Hepatozyten, und eine Re-Expression von Progenitorgenen (darunter *Afp*, *Ck19*, *Epcam*, *Ncam*, *Sox9*) gekennzeichnet. Darüber hinaus kommt es zur Bildung einer Stammzell-Nische mit vermehrter Sekretion der extrazellulären Matrixproteine Tenascin C (TNC) und Periostin (POSTN), die in Regenerationsprozessen beteiligt sind und über Integrin-Rezeptoren und die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) intrazelluläre Signalwege initiieren. In diesem Projekt wurde der Einfluss von FAK, TNC und POSTN auf den De-differenzierungsprozess von Hepatozyten untersucht. Mittels Kollagenaseperfusion wurden Wildtyp- (WT-), TNC- und POSTN-KO-Hepatozyten isoliert und auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Die TNC- und POSTN-KO-Hepatozyten wurden zudem mit ihrem jeweils rekombinanten Protein, WT-Hepatozyten mit einem FAK-Inhibitor (FAKi) behandelt und für 24, 48 und 72 Std. kultiviert. Mittels RT-qPCR wurde die mRNA-Expression von *Afp*, *Alb*, *Ck19*, *Epcam* und *Sox9*, sowie mittels Westernblot die Expression von ALB und SOX9 zusätzlich analysiert. Zur Untersuchung der Histonmodifikation Histon 2A Lysin 119 Ubiquitinylierung (H2Ak119Ub) wurde nach 48 Std. ein Chromatinimmunopräzipitations- (ChIP-) Assay durchgeführt.

WT-Hepatozyten zeigen nach Kultivierung einen de-differenzierten Phänotyp. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die De-differenzierung in WT-Hepatozyten potenziell FAK-abhängig reguliert ist und dass eine FAK-Inhibition die De-differenzierung möglicherweise beeinträchtigt. POSTN-KO-Hepatozyten zeigen eine verzögerte De-differenzierung, die Behandlung mit rcPOSTN zeigt insgesamt keinen eindeutigen *rescue*-Effekt in Bezug auf eine verbesserte De-differenzierung. Einzig die *Afp*- und *Sox9*-Expression ist durch die Behandlung gesteigert. Die De-differenzierung in TNC-KO-Hepatozyten scheint verzögert im Vergleich zum WT. Durch die Zugabe von rcTNC kann insgesamt keine eindeutig verbesserte De-differenzierung beobachtet werden. Eine eindeutige Regulation der Progenitorgenloci in Abhängigkeit der H2Ak119Ub und der Zugabe der rekombinanten Proteine konnte in den KO-Hepatozyten nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend ist eine eingeschränkte De-differenzierung in KO-Hepatozyten detektierbar. Eine eindeutige Wirkung der Zugabe der rekombinanten Proteine kann nicht festgestellt werden. FAK scheint ein möglicher Einflussfaktor im Prozess der hepatischen De-differenzierung zu sein. Eine eindeutige Aussage bezüglich der Rolle von H2Ak119Ub im Prozess der hepatischen De-differenzierung lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht ableiten.

## Summary

Hepatocyte dedifferentiation contributes to the regenerative potential of the liver. This process is characterized by a decreased expression of albumin (ALB), as a marker of adult hepatocytes, and a re-expression of progenitor genes (including *Afp*, *Ck19*, *Epcam*, *Ncam*, *Sox9*). Furthermore, it comes to the formation of a stem cell niche with increased secretion of the extracellular matrix proteins tenascin C (TNC) and periostin (POSTN), which engage in regeneration processes and initiate intracellular signaling pathways via integrin receptors and focal adhesion kinase (FAK). In this project, the influence of POSTN and TNC on the dedifferentiation process of hepatocytes was investigated.

Wild type (WT), TNC- and POSTN-KO hepatocytes were isolated by collagenase perfusion and cultured on a collagen monolayer. TNC- and POSTN-KO hepatocytes were treated with their respective recombinant protein, WT hepatocytes with a FAK inhibitor (FAKi) and were cultured for 24, 48 and 72 hours. The mRNA expression of *Afp*, *Alb*, *Ck19*, *Epcam* and *Sox9* were analyzed by qPCR and additionally the expression of ALB and SOX9 by Western Blot. To investigate the histone modification “histone 2A lysine 119 ubiquitylation” (H2Ak119Ub), a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed after 48 hours.

WT hepatocytes show a dedifferentiated phenotype after cultivation. The results indicate that dedifferentiation in WT hepatocytes is potentially regulated by FAK and that FAK inhibition may impair dedifferentiation. POSTN-KO hepatocytes show delayed dedifferentiation, treatment with rcPOSTN shows no clear overall rescue effect in terms of improved dedifferentiation. Only *Afp* and *Sox9* expressions are increased by the treatment. Dedifferentiation in TNC-KO hepatocytes appears to be delayed compared to WT. Overall, the addition of rcTNC does not improve dedifferentiation. A pronounced effect of the externally added recombinant proteins cannot be determined. A clear regulation of the progenitor gene loci depending on H2Ak119Ub and adjustment of rcTNC and rcPOSTN treatment could not be shown in the KO hepatocytes.

In conclusion, TNC- and POSTN-KO hepatocytes appear to have limited dedifferentiation abilities. A distinct effect of the externally supplied recombinant proteins cannot be determined. FAK seems to be a possible influencing factor in the process of hepatic dedifferentiation.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Volltext
Abb.	Abbildung
a.e.	am ehesten
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
ALB	Albumin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL4	Tetrachlormethan
cDNS	Komplementäre DNS
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
CK19	Cytokeratin 19
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Engl.	Englisch
EPCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinases</i>
Et al.	Und weitere
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAKi	Fokale Adhäsionskinase Inhibitor
Ggf.	gegebenenfalls
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HPC	Hepatische Progenitorzellen
HSC	Hepatische Sternzellen
H2Ak119Ub	Histon 2 A Lysin 119 Ubiquitinylierung
ILK	<i>Integrin linked kinase</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
Min.	Minuten
mRNA	Boten-RNA
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
PDAC	Pankreatisches Duktales Adenokarzinom
POSTN	Periostin
PRC	<i>Polycomb Repressor Complex</i>
PSC	Pluripotente Stammzellen
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rc	rekombinant
RGD-Domäne	Arginin-Glycin-Asparagin-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunden
SOX9	<i>Sex Determing Region of the Y Chromosome Related HMG box 9</i>
Std.	Stunden
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor-beta
TNC	Tenascin C
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
u.a.	unter anderem
Vgl.	Vergleich(e)
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

# INHALT

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.1</b>	<b>Anatomie und Funktion der humanen Leber</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.2</b>	<b>Anatomie der murinen Leber</b>	<b>- 3 -</b>
<b>1.3</b>	<b>Leberregeneration</b>	<b>- 4 -</b>
1.3.1	Trans- und De-differenzierung	- 4 -
1.3.2	Regeneration nach partieller Hepatektomie	- 5 -
1.3.3	Regeneration nach Noxenexposition	- 6 -
<b>1.4</b>	<b>Die extrazelluläre Matrix</b>	<b>- 6 -</b>
1.4.1	Tenascin C (TNC)	- 7 -
1.4.2	Periostin (POSTN)	- 8 -
1.4.3	Der Integrinsignalweg	- 9 -
1.4.4	Fokale Adhäsionskinase (FAK)	- 10 -
<b>1.5</b>	<b>Progenitormarker</b>	<b>- 11 -</b>
1.5.1	AFP ( $\alpha$ -Fetoprotein)	- 11 -
1.5.2	ALB (Albumin)	- 12 -
1.5.3	CK19 (Cytokeratin 19)	- 12 -
1.5.4	EPCAM ( <i>Epithelial cell adhesion molecule</i> )	- 12 -
1.5.5	NCAM ( <i>Neural cell adhesion molecule</i> )	- 13 -
1.5.6	SOX9 ( <i>SRY related HMG box 9</i> )	- 13 -
<b>1.6</b>	<b>Histonmodifikationen</b>	<b>- 13 -</b>
1.6.1	Ubiquitinylierungen	- 14 -
<b>1.7</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	<b>- 15 -</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>- 16 -</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>- 16 -</b>
2.1.1	Laborgeräte	- 16 -
2.1.2	Software	- 17 -
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	- 17 -

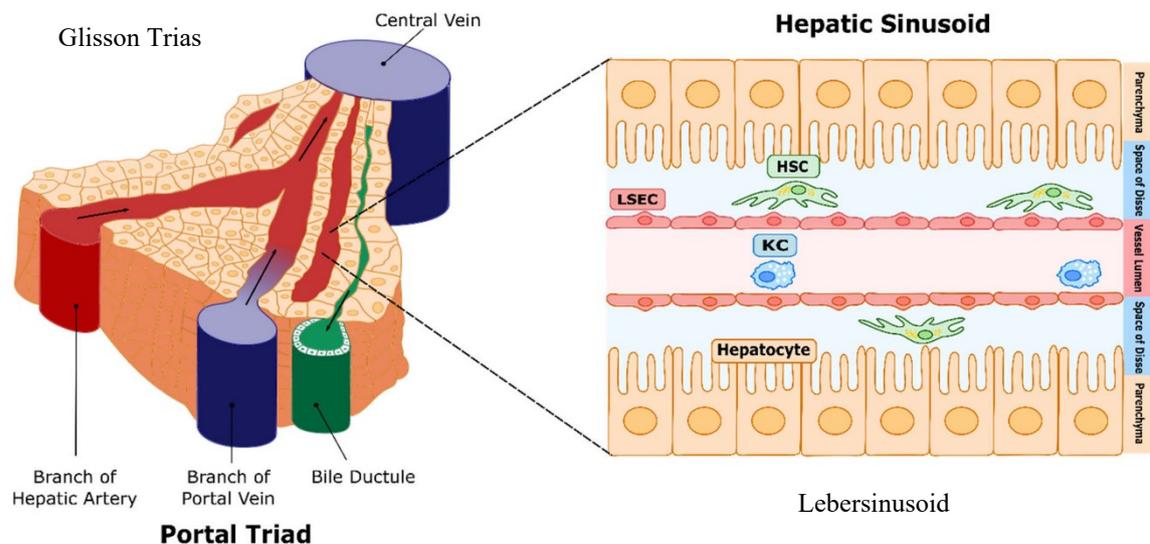
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	- 18 -
2.1.5	Kits	- 19 -
2.1.6	Primer für qPCR und ChIP-Assay	- 19 -
2.1.7	Antikörper	- 20 -
2.1.8	SDS-Gele	- 21 -
2.1.9	Puffer und Lösungen	- 21 -
2.1.10	Medien	- 23 -
2.1.11	Rekombinante Proteine und FAK-Inhibitor	- 23 -
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>- 23 -</b>
2.2.1	Tierhaltung	- 23 -
2.2.2	Genetik der Versuchstiere	- 24 -
2.2.3	Hepatozytenisolation	- 24 -
2.2.4	Zellkultur und Behandlung der Hepatozyten	- 25 -
2.2.5	RNA-Isolation	- 26 -
2.2.6	Analyse der mRNA-Expression	- 26 -
2.2.7	Proteinisolation	- 27 -
2.2.8	Analyse der Proteinexpression	- 28 -
2.2.9	ChIP-Assay und DNS-Analyse	- 29 -
<b>2.3</b>	<b>Graphische Darstellung und Statistische Auswertung</b>	<b>- 30 -</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>- 32 -</b>
<b>3.1</b>	<b>De-differenzierungsverhalten von WT-Hepatozyten</b>	<b>- 32 -</b>
<b>3.2</b>	<b>Einfluss des FAKi auf die Hepatozytendifferenzierung</b>	<b>- 34 -</b>
<b>3.3</b>	<b>De-differenzierungsverhalten von POSTN-KO-Hepatozyten</b>	<b>- 37 -</b>
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von rcPOSTN auf den Differenzierungsstatus von POSTN-KO-Hepatozyten</b>	<b>- 41 -</b>
<b>3.5</b>	<b>De-differenzierungsverhalten von TNC-KO-Hepatozyten</b>	<b>- 44 -</b>
<b>3.6</b>	<b>Einfluss von rcTNC auf den Differenzierungsstatus von TNC-KO-Hepatozyten</b>	<b>- 47 -</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>- 51 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Expressionsverhalten von WT-Hepatozyten auf einem Kollagenmonolayer</b>	<b>- 51 -</b>
4.1.1	Hepatozyten de-differenzieren möglicherweise FAK-abhängig	- 52 -
<b>4.2</b>	<b>Die De-differenzierung in KO-Hepatozyten scheint verzögert</b>	<b>- 53 -</b>

4.2.1	Einfluss der Substitution von rcPOSTN und rcTNC auf den Differenzierungsstatus	- 54 -
<b>4.3</b>	<b>Die Rolle der epigenetischen H2Ak119Ub</b>	<b>- 56 -</b>
<b>4.4</b>	<b>Limitationen der Arbeit</b>	<b>- 57 -</b>
<b>4.5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>- 58 -</b>
<b>5</b>	<b>ANHANG</b>	<b>- 59 -</b>
<b>5.1</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>- 59 -</b>
<b>5.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>- 65 -</b>
<b>5.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>- 66 -</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 ANATOMIE UND FUNKTION DER HUMANEN LEBER

Die Leber ist das größte Stoffwechselorgan des Körpers. Sie liegt hauptsächlich im rechten Oberbauch und grenzt mit der konvexen *Facies diaphragmatica* an das Zwerchfell. Beim Menschen besteht die Leber aus einem rechten und linken Leberlappen, sowie dem *Lobus caudatus* und dem *Lobus quadratus*. Rechter und linker Leberlappen sind durch das *Ligamentum falciforme* voneinander getrennt (Mulligan, 2006). Die arterielle Blutversorgung erfolgt durch die *Arteria hepatica propria* aus dem *Truncus coeliacus* der *Aorta*. Über die *Vena portae* gelangt nährstoffreiches Blut aus dem Darm in die Leber, eine essentielle Anpassung für die Aufgabe als Stoffwechselorgan (Lautt und Greenway, 1987). Die *Vena portae* definiert die acht funktionellen Lebersegmente (Couinaud, 1957). Die venöse Drainage der Leberzellen erfolgt über die *Venae hepaticae* in die *Vena cava inferior*. Im *Ligamentum teres hepatis* verläuft die obliterierte fötale Nabelvene, die bei portalvenöser Hypertension rekanalisieren kann und zum klinischen Bild des *Caput medusae* führt.



**Abbildung 1 Glisson Trias und Lebersinusoid**

Gezeigt ist der exemplarische Aufbau eines Lebersinusoids (rechts) und der *Glisson Trias* (links). Letztere besteht aus einem Ast der *Arteria hepatica propria*, einem Gallenkanälchen und einem Pfortaderast. Über diese Blutgefäße wird die Leber mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, über die Gallenkanälchen wird die in den Hepatozyten gebildete Galle in die großen Gallenwege abgeleitet. Die Lebersinusoiden werden von Hepatozyten begrenzt. Zwischen der Kapillarwand und den Hepatozyten befindet sich der Dissé-Raum, in dem sich u.a. hepatische Sternzellen (HSCs) befinden (entnommen aus (Gibert-Ramos, 2021), mit Genehmigung des *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*).

Mikroanatomisch erfolgt die Einteilung der Leber klassischerweise in die Zentralvenenläppchen (Kiernan und Green, 1833). Die Zentralvenen liegen dabei in der Mitte dieser postulierten Läppchen. Hexagonal in den Ecken befinden sich die Periportalfelder mit der Glisson Trias, bestehend aus einem Ast der *Arteria hepatica propria*, einem Gallenkanal und einem Ast der *Vena portae*. Das Blut aus der *Arteria hepatica propria* und der *Vena portae* konfluiert in den *Sinūs* (Abbildung 1). Die Lebersinusoide sind von einem diskontinuierlichen Endothel zu den Hepatozyten hin begrenzt. Zwischen Endothel und Hepatozyten liegt der sogenannte Dissé-Raum der Leber. Hierin befinden sich Hepatische Sternzellen (HSCs) und Kupffer-Zellen (Sanz-García, 2021). Der Dissé-Raum verlangsamt den Blutfluss und ermöglicht so eine längere Kontaktzeit zwischen Nähr- bzw. Giftstoffen im Blut und den Hepatozyten, sodass diese besser aufgenommen bzw. aus dem Blut herausgefiltert werden können. Die Leber ist zudem zonal gegliedert, wobei Hepatozyten in der Nähe der Periportalfelder andere Enzymexpressionsmuster aufweisen, als solche in der Nähe der Zentralvene (Rappaport, 1973; Ruijter, 2004). Dies ist eine Anpassung daran, dass periportale Hepatozyten unmittelbar toxischen Substanzen aus dem Blut exponiert sind. So wird einer vorzeitigen Apoptose der Hepatozyten bei Noxenexposition vorgebeugt. In Bezug auf die Zentralvene distal gelegene Hepatozyten sind somit primär an die Entgiftung adaptiert, während proximal gelegene Hepatozyten insbesondere an anabole Stoffwechselläufe angepasst sind.

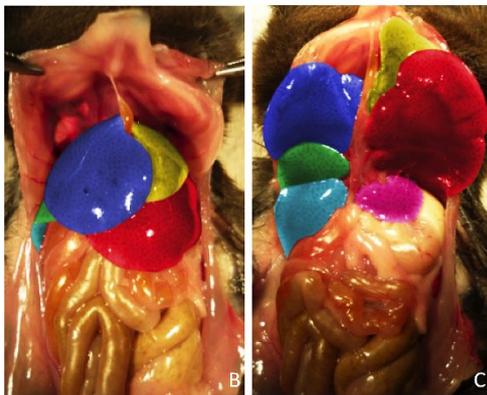
Die Leber spielt eine wichtige Rolle in vielen biochemischen Prozessen des Körpers. Die Hauptaufgaben der Leber erfüllen dabei die Hepatozyten, die bis zu 80 % der Lebermasse ausmachen. Hepatozyten sind große, polygonale Zellen mit einem prominenten, zentral gelegenen *Nucleus*. Als Epithelzellen haben sie sowohl einen basolateralen Teil, der an die Sinusoide bzw. den Dissé-Raum grenzt, als auch einen apikalen Anteil, der an die Gallengänge grenzt. Auf der apikalen Seite erfolgt der Transport der in den Hepatozyten produzierten Gallenflüssigkeit in die Gallengänge. Neben der Galleproduktion sind die Hepatozyten auch für die Produktion von Proteinen (u.a. Albumin, Transferrin, Gerinnungsfaktoren), die Regulation der Glukosehomöostase, den Fettsäurestoffwechsel, die Vitamin- und Spurenelementspeicherung, sowie für den Abbau toxischer Substanzen zuständig (Jungermann und Katz, 1989). Neben exogenen Noxen wie Alkohol oder Medikamenten zählt dazu auch die Entgiftung des endogenen Ammoniaks im Harnstoffzyklus.

Den kleineren Anteil der Lebermasse, ca. 6 %, machen HSCs, Kupffer-Zellen, die sinusoidalen Endothelzellen und Cholangiozyten aus (Leeuw, 1990). HSCs befinden sich im Dissé-Raum der Leber. In der gesunden Leber speichern sie v.a. das lipophile Vitamin A (Blaner, 2016). Zudem werden Intermediärfilamente des Zytoskeletts, z.B. Desmin und Vimentin, von HSCs gebildet. Bei einer Leberschädigung kommt es zur Transformation der HSCs in Myofibroblasten (aktivierte HSCs), deren Beteiligung bei der Leberregeneration bereits umfangreich untersucht wurde (Cordes, 2007; Kamm, 2022; Kumar, 2018; Sawitza, 2009). Die Kupffer-Zellen sind die Makrophagen der Leber und dienen als solche der Abwehr von viralen oder bakteriellen Leberpathogenen (Wardle,

1987). Als leberständige Makrophagen sind sie am Rand der Lebersinusoiden lokalisiert. Die sternförmigen Fortsätze ragen in den Dissé-Raum der Leber, sodass Pathogene im Blutstrom detektiert werden können. Sinusoidale Endothelzellen, als Grenze zwischen den blutgefüllten Sinusoiden und dem Dissé-Raum, erfüllen eine wichtige Filtrationsfunktion, die maßgeblich durch die Fenestrierung des Endothels gewährleistet wird. So können lediglich Partikel einer bestimmten Größe diese Barriere überschreiten. Die Porosität der Fenestrierung nimmt von periportal nach zentrilobulär zu und ermöglicht so einen intensiveren Stoffaustausch im Zentrum der Leberläppchen (Wisse, 1985). Die Cholangiozyten befinden sich zwischen den Hepatozyten. Sie sind das Epithel der intrahepatischen Gallengänge und ebenfalls für die Produktion von Gallensäuren sowie den Transport der Gallenflüssigkeit in die extrahepatischen Gallenwege verantwortlich.

## 1.2 ANATOMIE DER MURINEN LEBER

Die Mausleber besteht aus vier Leberlappen. Der mediane Lappen füllt fast die gesamte ventrale Ansicht aus. Er grenzt unmittelbar an die Gallenblase, die in der Bifurkation zwischen rechtem und linkem Anteil des medianen Leberlappens liegt. Einen *Lobus quadratus* gibt es, anders als beim Menschen, nicht (Martins, 2008).



**Abbildung 2 Anatomie der Mausleber**

Gezeigt ist die murine Leber in situ nach medianer Laparotomie von ventral (B) und kaudal nach Anheben der ventralen Leberanteile (C). Blau markiert ist der *Lobus hepatis dexter medialis*, rot markiert der *Lobus hepatis sinister lateralis*. Der *Lobus hepatis sinister medialis* wurde hier gelb eingefärbt, der *Lobus hepatis dexter lateralis* grün. In Abb. C ist der *Processus caudatus* türkis eingefärbt, der *Processus papillaris* pink. (modifiziert entnommen aus (Fiebig und Boll, 2012), mit Genehmigung von *Plos One*).

Die histologische Anatomie sowie die Gallenblasenanlage entsprechen weitestgehend der menschlichen Anatomie (Kruepunga, 2019). Ebenso ist die enzymatische Ausstattung von Hepatozyten in unterschiedlichen Regionen der Leberläppchen weitestgehend spezieübergreifend (Wagenaar, 1994). Kupffer-Zellen und HSCs kommen auch in der Mausleber vor. Aufgrund dieser

Homologien zwischen murinen und humanen Lebern ist eine Übertragbarkeit des Mausmodells auf den menschlichen Organismus überhaupt möglich. Limitiert ist die Übertragbarkeit des Mausmodells auf den Menschen unter anderem aufgrund der unterschiedlichen Immunsysteme, sowie bisher nicht untersuchter Artspezifika (Liu, 2012).

### 1.3 LEBERREGENERATION

Die Regeneration, das heißt die vollständige Wiederherstellung eines Gewebes ohne die Bildung einer Narbe, ist in den meisten menschlichen Organen, spätestens nach der Embryonalphase, stark eingeschränkt. Die meisten der Körperzellen befinden sich in ihrem differenzierten Zustand, im sogenannten Zellzyklusarrest (G<sub>0</sub>-Phase). In der adulten Leber proliferieren im gesunden Zustand lediglich 0,1 % der Hepatozyten (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Die Leber besitzt als einziges der viszeralen Organe eines erwachsenen Menschen ein bemerkenswertes Regenerationspotential, sowohl nach toxischer Schädigung, als auch nach Teilorganentnahme (Higgins und Anderson, 1931; Michalopoulos und DeFrances, 1997; Taub, 2004). Kommt es zu einer Schädigung von Hepatozyten mit anschließendem Zelltod, zum Beispiel durch Virushepatitiden oder eine äthyltoxische Schädigung, so wird eine Entzündungsreaktion mit Zytokinfreisetzung initiiert. Letztere stimuliert HSCs unter anderem zur Sekretion extrazellulärer Matrixproteine (Huang, 2015). Durch diese Volumenzunahme der extrazellulären Matrix (EZM), die zunächst als transiente Fibrose zu bezeichnen ist, kommt es zu einer Strömungswiderstandserhöhung im Leberparenchym. Als Folge von dysregulierten Regenerations- und Fibroseprozessen kann im Langzeitverlauf eine Zirrhose bis hin zum hepatozellulären Karzinom (HCC) entstehen (Manns und Cieplik, 2016). Laut Statista wurden im Jahr 2022 in Deutschland 85.201 Menschen aufgrund von Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese stationär behandelt, die Prävalenz steigt seit 2005 an (statista Deutschland, 2024). Aufgrund der steigenden Anzahl an Menschen mit Adipositas, nimmt die Prävalenz nicht-alkoholischer Fettlebererkrankungen stetig zu und beträgt in Europa zwischen 20 und 30 % (Blachier, 2013). In der 2022 aktualisierten Leitlinie zur nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung wird die Prävalenz in Deutschland mit 23 % angegeben (Roeb, 2022). Da Fettlebererkrankungen mit einer Fibrose einhergehen und in eine Zirrhose münden können, ist das Verständnis der genauen Prozesse der hepatischen Regenerationsmechanismen somit von immer größerer epidemiologischer Relevanz.

#### 1.3.1 TRANS- UND DE-DIFFERENZIERUNG

Die Differenzierung von Zellen beschreibt die zunehmende Spezialisierung einer initial pluripotenten Stammzelle bis hin zu einer differenzierten, adulten Zelle. Der Prozess der De-differenzierung beschreibt dementsprechend die kontinuierliche Umwandlung einer spezialisierten,

adulten Zelle in einen Vorläuferphänotyp der gleichen Zelllinie. Der de-differenzierte Zustand kann sich durch eine veränderte Genexpression, Morphologie sowie eine veränderte Stoffwechselaktivität äußern. Die Genexpression in de-differenzierten Zellen ist dabei gekennzeichnet durch die Zunahme der Expression von Progenitorgenen bei gleichzeitigem Verlust der Expression adulter Marker (Jopling, 2011). Die de-differenzierten Zellen haben das Potential wiederum in adulte Zellen anderer, verwandter Zelllinien zu re-differenzieren (Jopling, 2011). Dieser Mechanismus wird als Transdifferenzierung bezeichnet und ist unter anderem zwischen Pankreas- und Leberzellen möglich (Shen, 2003). Die De-differenzierung wird insbesondere mit Regenerationsprozessen assoziiert, da in diesen Situationen der regenerative Ersatz von apoptotischen und nekrotischen Zellen den Fortbestand der Organfunktion sichert (Jopling, 2011). Außerdem spielen De-differenzierungsmechanismen eine Rolle in der Karzinogenese des HCC (Chao, 2020). Chen *et al.* konnten zeigen, dass nicht zwangsläufig externe Stammzellen für die Leberregeneration notwendig sind, wie bis dato angenommen, sondern dass Hepatozyten selbst Progenitorzellen durch De-differenzierung generieren können (Chen, 2012).

### 1.3.2 REGENERATION NACH PARTIELLER HEPATEKTOMIE

Die Leber ist in der Lage, selbst nach der Entfernung von bis zu 2/3 ihrer Masse, vollständig zu regenerieren (Higgins und Anderson, 1931). In dieser nicht-toxischen Ätiopathogenese kommt es aber scheinbar nicht zu einer Aktivierung von Stammzellen oder zur Ausprägung eines Vorläuferphänotyps im Sinne einer De-differenzierung. Die Leber regeneriert hier vielmehr über die Hyperplasie von vorhandenen adulten Hepatozyten (Miyaoaka und Miyajima, 2013; Taub, 2004), sowie die Mitose von Cholangiozyten (Michalopoulos, 2017). Die Genexpression in Hepatozyten ändert sich bereits innerhalb von Stunden nach der Entfernung von Leberteilen (Mohn, 1991); darunter die Expression von Genen, die die Veränderung der EZM beeinflussen (Michalopoulos, 2017). Die Veränderung der EZM ist essenzieller Bestandteil der Bildung der molekularen Nische. Diese beschreibt die molekulare Umgebung aus Transmittern und Zellen, die für die Zell-Zell-Kommunikation und somit die Regenerationsprozesse immanent wichtig sind. In den ersten Tagen nach dem Beginn der Hepatozytenproliferation kommt es während der nicht-toxischen Regeneration zur Replikation von HSCs. Das legt einen Einfluss der proliferierenden Hepatozyten auf die Aktivierung der HSCs nahe (Michalopoulos, 2017). So wird in diesen Modellen der Teilorganentnahme die Organfunktion und Anatomie durch die Proliferation von ortsständigen Zellen gesichert.

### 1.3.3 REGENERATION NACH NOXENEXPOSITION

Im Falle einer toxischen Schädigung der Leber können bis zu 75 % der Hepatozyten aus dem Zellzyklusarrest (G0) wieder in den Zellzyklus eintreten (Adam, 2007; Leevy, 1959). Durch die Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten ist eine *restitutio ad integrum* nach einer akuten Intoxikation mit reaktiver Fibrose möglich. Die Fibrose ist zunächst lediglich Teil der akuten Anpassungsreaktion und ein wichtiger Schritt auf dem Weg der Leberregeneration. Erst eine dysregulierte fibrotische Reaktion kann zur Zirrhose führen. Die reaktive Fibrose ist also potentiell vollständig reversibel (Manns und Cieplik, 2016). Als Reaktion auf eine akute Schädigung wird die Transformation von HSCs in Myofibroblasten induziert. Die Reversibilität der daraus resultierenden Fibrose ist dabei von der Art und Dauer der Noxenexposition abhängig (Cordero-Espinoza und Huch, 2018). Die HSCs befinden sich als residente Zellen im Dissé-Raum der Leber. Kommt es zu einer Leberschädigung, kann eine morphologische und funktionelle Veränderung der HSCs beobachtet werden. Sie sezernieren Proteine der EZM, darunter Tenascin C (TNC) und Periostin (POSTN), sowie Kollagen (El-Karef, 2007; Huang, 2015). Diese schädigungsinduzierte Umgebungsveränderung wird als „Nische“ bezeichnet (Sawitza, 2009). Sie stellt die molekularen Voraussetzungen für eine Regeneration der Leber bereit, indem sie unter anderem die Differenzierung der hepatischen Progenitorzellen (HPC) in Hepatozyten und somit die Wiederherstellung eines funktionellen Leberparenchyms beeinflusst (Adam, 2017). Aus den HPCs können im Verlauf sowohl Cholangiozyten als auch Hepatozyten regeneriert werden (Libbrecht und Roskams, 2002; Sell, 1998). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die HSCs selbst zu Progenitor-ähnlichen Zellen de-differenzieren und daraus ebenfalls funktionelles Leberparenchym regeneriert werden kann (Sawitza, 2009; Yang, 2008). Die toxische Leberregeneration ist also im Vergleich zur nicht-toxischen Regeneration auch von De-differenzierungsprozessen abhängig.

### 1.4 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX

Die EZM umgibt alle residenten Zellen der Leber. Sie umfasst ein Strukturnetzwerk aus Stroma-, Endothel- und Epithelzellen sowie verschiedenen Makromolekülen (Amenta und Harrison, 1997). Hierzu zählen Elastin, verschiedene Arten von Kollagenen, Proteoglykane und Glykoproteine, zu denen auch TNC und POSTN gehören. Extrazelluläre Matrizen kommen nicht nur in der Leber vor. Vielmehr bieten sie Stabilität und gleichzeitig Flexibilität für alle Gewebe. Die genaue Zusammensetzung variiert je nach Organ und Entwicklungsstadium, das heißt die EZM ist nicht starr, die Zusammensetzung wird flexibel angepasst, je nachdem welchen äußeren Einflüssen die Zellen ausgesetzt sind (Bedossa und Paradis, 2003). Dieser Anpassungsprozess geschieht durch die intermittierende Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen, sowie die selektive Bindung derer in der EZM. Die Komponenten der EZM interagieren wiederum mit Zelloberflächen, vor allem über Integrinsignalwege (Gkretsi, 2007; Godoy, 2009). Die Integrinsignalwege vermitteln

die Wachstums- und Differenzierungsreize nach intrazellulär und intranukleär. Die EZM dient also der Vermittlung und Amplifikation von Zell-Zell-Kommunikation und ist so ein immanenter Bestandteil in Regenerations-, Wachstums- und Homöostaseprozessen (Amenta und Harrison, 1997). Die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in verschiedene Zelltypen ist von der EZM-Zusammensetzung abhängig (Goh, 2010). Die EZM ist die Basis, auf der die Signaltransduktion funktionieren kann und epigenetische Modifizierungen initialisiert werden können (Jones und Jones, 2000). Die hepatische EZM ermöglicht die Expression des typischen Hepatozytenphänotyps *in vitro* und *in vivo*. Bei der Kultur von Hepatozyten auf einer zweidimensionalen Plastikoberfläche ist dies nicht mehr gewährleistet, da es hier keine EZM gibt. Hepatozyten verlieren bei diesem Kultivierungsverfahren ihren adulten Phänotyp und de-differenzieren in einen Vorläuferphänotyp (Bissell und Guzelian, 1980; Godoy, 2009).

Nach einer Schädigung kommt es zunächst zur Bildung einer provisorischen EZM, die hauptsächlich aus extrazellulären Matrixproteinen, z.B. TNC und POSTN, und Plasmaproteinen wie Fibronectin besteht. Diese Umgebungsveränderung begünstigt die Vermehrung und Teilung von Fibroblasten. Im weiteren Verlauf kann es zur Aktivierung von Myofibroblasten kommen im Wechselspiel mit der Bildung einer fibrotischen EZM, die hauptsächlich aus Kollagenen besteht. Weiterhin kommt es bei fehlender Regenerationsfähigkeit zur Apoptose von Zellen mit Verlust der normalen Gewebefunktion oder zur De-differenzierung und somit doch noch zur Regeneration (Wight und Potter-Perigo, 2011). Welche der beiden Szenarien dominiert und warum dies interindividuell bei Patient:innen unterschiedlich verläuft, ist noch nicht ausreichend untersucht.

#### 1.4.1 TENASCIN C (TNC)

TNC ist ein extrazelluläres Matrixprotein der Tenascin-Familie, das fakultativ im Regenerationsprozess der Leber exprimiert wird (El-Karef, 2007). Es handelt sich um ein hexameres Glykoprotein, dessen sechs armähnliche Strukturen symmetrisch auf einen zentralen Punkt zuwachsen und sich dort verbinden. An den distalen Enden (N-terminal) der Arme befinden sich *EGF like repeats*, während die proximalen Anteile (C-terminal) aus *fibronectin type III repeats* (FN-III) bestehen (Amenta und Harrison, 1997). Letztere ermöglichen die Verbindung der EZM zu zellulären Anteilen. An der *TNC assembly domain* (TA) erfolgt die Verbindung zwischen zwei TNC-Trimeren zu einem Hexagon. Diese Struktur wird durch Disulfidbrücken zwischen Cystinaminosäuren stabilisiert (Jones und Jones, 2000). Die Aktivierung der Expression von TNC ist u.a. abhängig von *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukinen. Zudem kann TNC mechanisch induziert werden, was der Grund dafür sein könnte, dass es in den namensgebenden Sehnen exprimiert wird (Chiquet-Ehrismann, R., 2004). TNC induziert lediglich eine schwache Zell-Zell-Adhäsion und wirkt eher als Adhäsionsmodulator (Orend

und Chiquet-Ehresmann, 2000). Es wird von einem hochkonservierten Gen kodiert und spielt als solches eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung (Midwood, 2016).

Nach aktuellem Kenntnisstand ist TNC insbesondere in neuronalen Regenerationsprozessen ein wichtiger Modulator der neuronalen Differenzierung. TNC ermöglicht die Transdifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen in neuronale Zelllinien (Tsai, 2014). Auch in anderen Geweben wie der Lunge (Kho, 2013) oder Knorpelgewebe (Cheng, 2012) wurde die Assoziation einer erhöhten TNC-Expression und dem Regenerationsprozesses der jeweiligen Zellen bestätigt. TNC wird während des hepatischen Regenerationsprozesses, sowie in dysregulierten Regenerationsprozessen, wie sie bei einer Zirrhose und dem Progress eines HCC beobachtet werden, verstärkt exprimiert (Benbow und Elam, 2018; El-Karef, 2007).

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass TNC ein wichtiges Molekül im Prozess der Leberregeneration sein könnte. Es ist in de-differenzierten Zellen anderer Organe vermehrt exprimiert im Vergleich zu adulten Zellen und dort an Regenerationsprozessen beteiligt. In der Leber ist der Zusammenhang zwischen TNC und der (De-) Differenzierung der Hepatozyten bisher nur unzureichend untersucht.

#### 1.4.2 PERIOSTIN (POSTN)

POSTN ist ein 90 kDA großes Glykoprotein der EZM (Kudo, 2011), das 1993 von Takeshita *et al.* erstmals aus dem Periost und dem Zahnhalteapparat von Mäusen isoliert und analysiert wurde (Takeshita, 1993). Die POSTN-Expression ist unter anderem TGF- $\beta$  induziert (Huang, 2015). Über Fascilin-Domänen (Fas-Domänen) kann es zur Interaktion zwischen TNC und POSTN, sowie anderen Bestandteilen der EZM (z.B. Fibronectin) kommen (Sirica, 2014). Huang *et al.* konnten bei Periostin-Knockout- (POSTN-KO) Mäusen eine verminderte Fibrosebildung im Prozess der Leberregeneration nachweisen (Huang, 2015). Die Leberfibrose ist hierbei primär als reversibler Regenerationsprozess zu verstehen und nicht als klinische Vorstufe einer Zirrhose. Somit ist in diesem Kontext eine starke Fibrosebildung mit der normalen Regeneration der Leber assoziiert. Kumar *et al.* konnten im gleichen Mausmodell zeigen, dass eine akute toxische Schädigung durch Tetrachlormethan (CCl<sub>4</sub>) bei den POSTN-KO-Mäusen eine signifikant geringere Fibrosebildung im Verlauf der Leberregeneration verursachte. Der POSTN-KO scheint also die Regenerationsmechanismen einzuschränken. Kumar *et al.* identifizierten aktivierte HSCs als Hauptproduzenten des POSTN, welches wiederum die Kollagenbildung, respektive die Fibrosierung induziert (Kumar, 2018). Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass eine verminderte POSTN-Expression mit einer schlechteren Regeneration assoziiert ist. Im Versuchsaufbau von Wu *et al.* zeigten POSTN-KO-Mäuse nach 2/3 Hepatektomie eine deutlich schlechtere Organregeneration (Wu, 2018). Der Einfluss von POSTN auf eine normale Leberregeneration ist somit naheliegend, der

Einfluss auf die (De-) Differenzierung speziell von Hepatozyten ist bisher allerdings nur unzureichend untersucht. Für andere Gewebetypen ergibt sich eine umfassendere Datenlage. In einem Versuchsmodell mit Kortison induzierter Osteonekrose konnte der POSTN-KO mit einer schlechteren Ausdifferenzierung von Knochenvorläuferzellen in adulte Knochenzellen assoziiert werden. Die POSTN-Expression war hier essentiell für die Genexpression, die adulte Knochenzellen typisiert (Han und Gong, 2020). Ebenso ist eine verstärkte POSTN-Expression mit der Differenzierung von neuronalen Stammzellen in adulte Neuronen nach hypoxischer Hirnschädigung assoziiert (Ma, 2015). Kii *et al.* konnten zeigen, dass eine enge molekulare Wechselwirkung zwischen POSTN und TNC besteht. KO-Mäuse, die jeweils eins der beiden Moleküle nicht exprimieren können, exprimieren einen ähnlichen Phänotyp in Bezug auf Inflammationsprozesse im Schienbeinknochen. In beiden KO-Zelllinien war die Regeneration eingeschränkt (Kii, 2010). Über die FAS-Domänen kann POSTN TNC in die Architektur der EZM rekrutieren (Kii, 2010). Die Autoren nehmen die hexabrachiale Struktur des TNC als maßgebend für die zunehmende dreidimensionale Organisation der EZM an, was wiederum maßgeblichen Einfluss auf die Signalwege in der EZM hat.

#### 1.4.3 DER INTEGRINSIGNALWEG

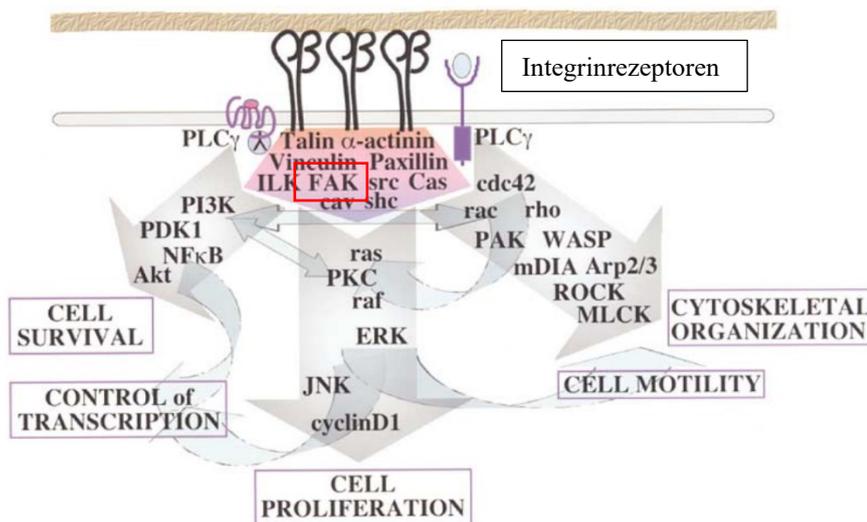
Integrine sind Transmembranproteine in nahezu allen menschlichen und auch murinen Zellen. Die extrazelluläre Domäne der Integrine bindet sowohl an Proteine der EZM als auch an Oberflächenstrukturen anderer Zellen. So vermitteln Integrine Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte. Über die intrazelluläre Domäne können diese Signale im Rahmen der Signaltransduktion bis auf Zellkernebene vermittelt werden.

Integrine sind Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen und zu bis zu 24 unterschiedlichen Subtypen kombiniert werden können (Humphries, 2000; Hynes, 2002). Im inaktiven Zustand sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten in sich gefaltet. Durch die Aktivierung kommt es zu einer Aufrichtung dieser Untereinheiten. Integrine sind intrazellulär mit dem Aktinskelett verbunden (Bachmann, 2020). Die Bindung an die EZM erfolgt über die Arginin-Glycin-Asparagin- (kurz: RGD) Domäne. Diese Domänen erkennen verschiedene Moleküle, darunter Fibronectin, Kollagen und Laminin (Hynes, 2002). Über die Bindung an RGD-Domänen kann auch TNC die Zell-Zell-Adhäsion ermöglichen (Bourdon und Ruoslahti, 1989). Sugiyama *et al.* identifizierten  $\alpha\beta 5$  und  $\alpha\beta 3$  als relevante Integrine für die POSTN-Bindung (Sugiyama, 2016). Die hohe strukturelle Variabilität der Integrine bedingt unterschiedliche Mechanismen, durch die Integrine an der Regeneration der Leber beteiligt sind. Der KO von  $\alpha\beta 8$  führte bei Greenhalgh *et al.* zu einer schnelleren Leberregeneration (Greenhalgh, 2019). Auch der KO der Integrin assoziierten Kinase (*Integrin linked Kinase*, kurz: ILK) verbessert die Regenerationsfähigkeit nach toxischer Leberschädigung (Bhushan, 2016). Das  $\beta 1$ -Integrin hingegen ist wichtig für die Regeneration der

kanalikulären Architektur der Leber nach einer Schädigung (Masuzaki, 2021). Die verschiedenen Integrinsubtypen besitzen somit unterschiedliche Funktionen in Regenerationsmechanismen, wobei einige die Regeneration begünstigen und andere die Regeneration beeinträchtigen.

#### 1.4.4 FOKALE ADHÄSIONSKINASE (FAK)

Die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) ist eine 125 kDA große Tyrosinkinase, die in vielen Signalwegen von Wachstum, Zell-Zell-Kommunikation, Kanzerogenese und Metastasierung beteiligt ist (Gnani, 2017). FAK ist ein Signalmolekül in Integrin-Signalwegen (Gnani, 2017; Guan, 1991; Li, 2011; Shishido, 2014), wobei die N-terminale Domäne der FAK an  $\beta$ -Untereinheiten der Integrine binden kann (Parsons, 2003).



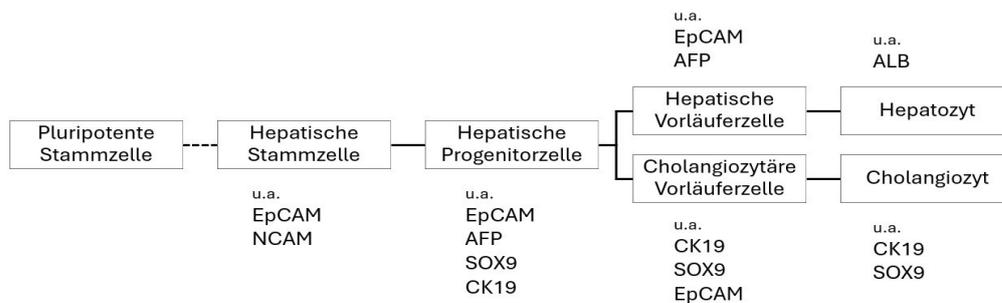
**Abbildung 3 FAK im Integrinsignalweg**

Dargestellt ist ein intrazellulärer Signalweg, vermittelt durch Integrine, die in der Zellmembran verankert sind und die Signaltransduktion von extrazellulären Reizen vermitteln. U.a. vermitteln sie antiapoptotische und proliferative Signale über FAK (rote Umrandung) nach intrazellulär (modifiziert entnommen aus (Hynes, 2002), mit Genehmigung von Elsevier).

Mit der C-terminalen Domäne kann FAK an andere Proteinkomplexe binden und so Zell-Zell-Kontakte induzieren. Über diese Domäne erfolgt ebenso die Bindung an das zytoplasmatische Protein Paxillin, welches wiederum direkt an den intrazellulären Anteil des Integrin-Rezeptors binden kann (Mitra, 2005). Das N-terminale Ende trägt die Region FERM, die posttranslational sumoyliert werden kann. Sumoylierungen stehen im Zusammenhang mit dem nukleozytoplasmatischen Transport von Proteinen nach intranukleär. Eine direkte Signalübertragung über sumoyliertes FAK in den Zellkern wäre somit denkbar (Mitra, 2005).

## 1.5 PROGENITORMARKER

Welche Proteine eine Zelle vorrangig exprimiert, hängt von ihrem Differenzierungsstadium ab. Ein adulter Hepatozyt ist vor allem durch seine Albuminexpression gekennzeichnet. Vorläuferzellen exprimieren Marker verschiedener Zellreihen. Hepatische Stammzellen sind aufgrund der multipotenten Eigenschaften von Stammzellen in der Lage, sowohl in Hepatozyten, Cholangiozyten als auch weitere Zellen der adulten Leber zu differenzieren. Entsprechend tragen sie sowohl hepatische Stammzellmarker als auch cholangiozytäre Marker wie Cytokeratin 19 (CK19) und das *SRY related HMG box 9* (SOX9). Hepatische Stammzellen exprimieren kein  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP), dafür aber das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) (Hindley, 2016). Hepatische Progenitorzellen (HPC) sind bipotente Zellen, die Hepatozyten und Cholangiozyten hervorbringen können. Sie exprimieren AFP, CK19, EPCAM und SOX9, jedoch kein NCAM (Abb. 4) (Chaudhari, 2016; Hindley, 2016). Zwischenstufen der einzelnen Entwicklungsabschnitte dieser Zellen kommen vor und sind gekennzeichnet durch die Expression verschiedener Marker (Zhang, 2008).



**Abbildung 4 Progenitormarker**

Gezeigt ist die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen (PSC, links) in hepatische Progenitorzellen (Mitte), die wiederum in Cholangiozyten und Hepatozyten (rechts unten bzw. rechts oben) differenzieren. Aufgelistet sind jeweils Vertreter von spezifischen Markern der einzelnen Entwicklungsstufen der Zellen (modifiziert entnommen aus (Chaudhari, 2016)).

### 1.5.1 AFP (A-FETOPROTEIN)

AFP besteht aus einer U-förmigen Polypeptidkette mit einem Gewicht von 68 kDa und ist strukturell dem ALB ähnlich (Dudich, 1999). Als solches ist auch AFP ein Transportmolekül, das unter anderem Bilirubin und Fettsäuren binden kann (Mizejewski, 2001). Dennoch ist AFP vor allem mit fötalen hepatischen Stammzellen assoziiert und wird als solches in der gesunden, adulten Leber kaum exprimiert. Bei einer Leberschädigung und Leberkarzinomen wird es als Zeichen des dedifferenzierten, unreifen zellulären Phänotyps re-exprimiert (Chaudhari, 2016). Beim Menschen dient es deshalb als laborchemischer Tumormarker für HCCs. AFP kann die Apoptose von Immunzellen induzieren und so die Immunantwort auf einen Regenerationsstimulus beeinflussen.

Dies scheint vor allem in der Karzinogenese des HCC von Bedeutung zu sein (González-Carmona, 2006).

### 1.5.2 ALB (ALBUMIN)

ALB wird von gesunden, adulten Hepatozyten synthetisiert. ALB ist ein 66,5 kDa großes Transportprotein, das ins Blut sezerniert wird und dort unter anderem lipophilen Hormonen, sowie Fett- und Aminosäuren die Zirkulation über den Blutweg ermöglicht (Moman, 2021). Der kolloidosmotische Druck wird wesentlich durch ALB bestimmt (Moman, 2021). Kommt es zu einem Albuminmangel durch eine Leberinsuffizienz oder Malnutrition, sinkt der kolloidosmotische Druck in den Gefäßen und es folgt die Ödembildung. Im klinischen Kontext ermöglicht die Messung des ALB im Serum einen Rückschluss auf die Syntheseleistung der Leber. Auch im molekularen Kontext kann die Expression von ALB als Funktionsparameter für stoffwechselaktive, ausdifferenzierte Hepatozyten angesehen werden, da ALB als leberspezifischer Marker gilt (Moman, 2021).

### 1.5.3 CK19 (CYTOKERATIN 19)

CK19 ist ein Marker der gemeinsamen Vorläuferzellen von Leber- und Gallenepithel, der in adulten Cholangiozyten weiterhin exprimiert wird, während er bei adulten Hepatozyten nicht mehr nachzuweisen ist (Haruna, 1996). In bipotenten HPCs wird CK19 ebenfalls exprimiert (Hindley, 2016; Van Eyken, 1988). Durch Schädigung der Leber wird CK19 als Ausdruck der De-differenzierung von Hepatozyten re-exprimiert (Chen, 2012).

### 1.5.4 EPCAM (*EPITHELIAL CELL ADHESION MOLECULE*)

Das epitheliale Glykoprotein 40 (EPCAM) wurde von Litvinov *et al.* erstmals als Zelladhäsionsmolekül beschrieben (Litvinov, 1994). Es wird in differenzierten Hepatozyten einer gesunden Leber in den seltensten Fällen exprimiert (Yoon, 2011). Yoon *et al.* konnten zeigen, dass die EPCAM-Expression vor allem in zirrhotischen Lebern stark zunimmt, wenn die Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten überschritten worden ist. Dann wird zur Aufrechterhaltung des Leberparenchyms zunehmend die Ausdifferenzierung von Leberprogenitorzellen notwendig, die EPCAM-positiv sind (Chaudhari, 2016; Yoon, 2011). EPCAM-positive Zellen sind also bipotente Progenitorzellen. Korreliert mit dem Proliferationsmarker Ki76 konnten Boer *et al.* zeigen, dass EPCAM vor allem von proliferierenden Zellen exprimiert wird und es folglich wichtig ist für den Zellzyklus und Regenerationsprozesse (Boer, 1999; Chaudhari, 2016).

### 1.5.5 NCAM (*NEURAL CELL ADHESION MOLECULE*)

NCAM ist ein neuronales Adhäsionsmolekül, das in Hepatozyten und anderen nicht-parenchymatösen Zellen der Leber normalerweise nicht exprimiert wird (Knittel, 1996). HSCs nehmen bei Kultivierung einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp an. Diese Zellen zeigen sich NCAM-positiv (Knittel, 1996). NCAM wird in hepatischen Stammzellen exprimiert, während es in HPCs nicht mehr exprimiert wird (Chaudhari, 2016). Es wird während der Embryogenese in den Gallengängen und regenerationsassoziiert in der duktilären Reaktion exprimiert (Fabris, 2000; Libbrecht, 2001; Tsuchiya, 2014).

### 1.5.6 SOX9 (*SRY RELATED HMG BOX 9*)

SOX9 ist ein Zell-Oberflächenmarker, der sowohl bei Cholangiozyten als auch bei bipotenten Vorläufern hepatischer und cholangiozytärer Linien vorkommt. Daher kann SOX9 als Progenitormarker betrachtet werden (Chaudhari, 2016). In der gesunden adulten Leber ist SOX9 in Zellen der Gallengänge exprimiert, nicht aber in ALB-positiven Hepatozyten (Furuyama, 2011). Dahingegen fanden Gilgenkrantz *et al.* einen Unterschied in der SOX9-Expression je nach mikroanatomischer Lage der Hepatozyten. Periportale Hepatozyten exprimieren SOX9, während zentral gelegene Hepatozyten dies nicht tun (Gilgenkrantz und Collin de l'Hortet, 2018). Bei chronischer Leberschädigung kommt es zu einer massiven Expansion und Proliferation von SOX9-positiven Hepatozyten (Font-Burgada, 2015).

## 1.6 HISTONMODIFIKATIONEN

Histone sind Proteine im Zellkern, die die Kondensation der DNS zu Heterochromatin ermöglichen. Im Gegensatz zu Euchromatin, das gelockert im Zellkern vorliegt, um im Rahmen des Zellzyklus und der Zellteilung abgelesen zu werden, ist das Heterochromatin die kondensierte Form der DNS. Jeweils zwei Moleküle der Klassen Histon 2A (H2A), Histon 2B (H2B), Histon 3 (H3) und Histon 4 (H4) verbinden sich zu einem Oktamer. Histone, die reich an positiv geladenen Aminosäuren sind, binden die negativ geladene DNS. Der Komplex aus DNS und Histonen wird als Nukleosom bezeichnet. Durch posttranslationale Histonmodifikationen wird die Genexpression, ergänzend zur direkten DNS-Modifikation, epigenetisch reguliert (Peterson, 2004). Dies hat einen Einfluss auf das Proteom und somit den Phänotyp und die Funktionsweise der jeweiligen Zellen. Epigenetische Veränderungen ermöglichen eine schnelle Anpassung der Zellen bzw. des Genoms an wechselnde Umweltbedingungen. Sie spielen zudem eine wesentliche Rolle in der Embryogenese (Kundaje, 2015). Zu den Histonmodifikationen zählen vor allem Methylierungen, die in einfacher bis dreifacher Ausführung vorkommen, sowie Acetylierungen, Phosphorylierungen, Sumoylierungen und Ubiquitylierungen. Innerhalb eines Zelltyps scheint das Epigenom relativ konstant zu sein (Wang,

2019). Das bedeutet, dass diese Zellen in der Folge ein ähnliches Genexpressionsmuster zeigen, da dieses für die Funktionalität von Zellen außerordentlich relevant ist. Histonmodifikationen scheinen einen höheren Stellenwert in der Regulation der Genomexpression zu haben als die einfache, direkte DNS-Methylierung, bei einem deutlich dynamischeren Verlauf (Wang, 2019). Ähnlich wie bei Tumorsuppressor- und Onkogenen ist auch bei der epigenetischen Regulation das Wechselspiel von Repression und Aktivierung von entscheidender Bedeutung (Kang, 2016; Sun, 2016). So können zum Beispiel Methylierungen sowohl genaktivierend als auch suppressiv wirken, je nach Anzahl der Methylgruppen (Mono-, Di- oder Trimethylierung) und je nachdem wo sich die Methylierung befindet (Martens, 2005; Pekowska, 2011). Durch die Isolation und Kultivierung von Hepatozyten wurden bereits Unterschiede der Histonmodifikationen, insbesondere in Bezug auf Acetylierungen, zwischen nativen und kultivierten Hepatozyten beschrieben (Gruppuso, 2018).

#### 1.6.1 UBIQUITINYLIERUNGEN

Bei Ubiquitinylierungen handelt es sich um sehr große epigenetische Modifizierungen, die durch enzymatische Reaktionen und Umlagerungen durch die Ubiquitin-Protein-Ligasen E1-3 an die Histone angefügt werden (Pickart und Eddins, 2004). Kouzarides *et al.* identifizierten Lysin als einzige mögliche Bindungsstelle für Ubiquitinylierungen (Kouzarides, 2007). Ubiquitinylierungen stehen im Zusammenhang mit Transkriptionsmodifikationen und Reparaturmechanismen (Kouzarides, 2007). Ubiquitinylierungen am H2A wurden in der Literatur vor allem mit der Inaktivierung von Genen assoziiert (Kouzarides, 2007; Shilatifard, 2006; Wang, 2006). Dies erfolgt, indem die DNS stärker an die Histone gebunden wird. Hierdurch wird das Ablesen der DNS durch die DNS-abhängigen Polymerasen unterbunden. Allerdings wurde in neueren Arbeiten auch eine potentiell genaktivierende Eigenschaft beschrieben (Cohen, 2020; Frangini, 2013). Benitz *et al.* konnten zeigen, dass in der azinär-duktalem Metaplasie, die im Pankreasgewebe bei Entzündung oder Karzinomen vorkommt, der Verlust des differenzierten azinären Phänotyps mit einer vermehrten Ubiquitinylierung des H2Ak119 assoziiert ist (Benitz, 2016). Aufgrund der strukturellen und biologischen Ähnlichkeit von Pankreas und Leber ist ein ähnlicher Einfluss der Ubiquitinylierung in Hepatozyten bei der De-differenzierung möglich. In nicht publizierten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ergaben sich Hinweise darauf, dass vor allem die H2Ak119Ub, mehr noch als die bereits umfangreich untersuchten (Tri-) Methylierungen, einen Einfluss in der De-differenzierung von murinen Hepatozyten haben kann (Toscano, 2018).

## 1.7 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Das genaue Verständnis der Mechanismen der Leberregeneration sowie den daran beteiligten Molekülen ist unabdingbar um insbesondere dysregulierte, pathologische Regenerationsprozesse und letztendlich die Fibrosierung und Karzinogenese der Leber zu verstehen. Zwei der beteiligten Moleküle sind POSTN und TNC, beides Proteine der EZM, die an Regenerationsprozessen beteiligt sind (Huang, 2015; Kumar, 2018; Tsai, 2014). Insbesondere die Bedeutung von POSTN im Prozess der Regeneration des Pankreas, eines embryonal der Leber sehr ähnlichen Organs, konnte bereits gezeigt werden (Hausmann, 2016). EZM-Moleküle vermitteln Signale unter anderem über Integrin-Signalwege (Bourdon und Ruoslahti, 1989; Sugiyama, 2016). Ein Zusammenhang zwischen Integrinen, FAK, PRCs und epigenetischen Modifizierungen scheint gegeben, der genaue Einfluss dieser Signaltransduktion auf die Leberregeneration ist derzeit aber noch nicht untersucht (Parsons, 2003; Shishido, 2014). Erhöhte H2Ak119Ub-Level sind in Pankreaskarzinomen mit dem Verlust des differenzierten Phänotyps der Azinuszellen assoziiert (Benitz, 2016). Der Einfluss der H2Ak119Ub auf die Regenerationsmechanismen der Leber hingegen ist noch nicht hinlänglich untersucht. Nicht publizierte Vorarbeiten deuten einen Einfluss der H2Ak119Ub auf die Hepatozytendifferenzierung an (Toscano, 2018).

Die Bedeutung von POSTN und TNC in der Leberregeneration ist insgesamt noch nicht ausreichend untersucht, insbesondere die Auswirkung auf die Hepatozytendifferenzierung bedarf weiterer Forschung. Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist deshalb, die Differenzierungsmechanismen in primären Hepatozyten, insbesondere in Abhängigkeit der EZM-Moleküle TNC und POSTN, genauer zu analysieren. Außerdem ist von Interesse, inwiefern die epigenetische H2Ak119Ub in diesem Kontext an der Regulation der Progenitor-Genexpression beteiligt ist.

Konkret soll verifiziert werden, dass Wildtyp- (WT-) Hepatozyten bei der Kultivierung auf einem Kollagenmonolayer de-differenzieren. Weiterführend wird untersucht, ob diese De-differenzierung durch die Behandlung mit einem FAKi gehemmt werden kann, basierend auf der Annahme, dass FAK die De-differenzierung begünstigt, indem es über eine Regulation des PRC1 eine verminderte Ubiquitinierung von Progenitor-Genen induziert. Es wird zudem postuliert, dass POSTN-KO bzw. TNC-KO-Hepatozyten *a priori* schlechter de-differenzieren als WT-Hepatozyten. Von Interesse ist weiterhin, ob durch die Kultivierung von KO-Hepatozyten mit dem jeweiligen Protein, das in den KO-Zellen nicht exprimiert werden kann, die De-differenzierungsfähigkeit wiederhergestellt werden kann.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Im Folgenden erfolgt die Darstellung des Versuchsaufbaus und der dafür verwendeten Materialien.

### 2.1 MATERIAL

Im Folgenden erfolgt die Auflistung der zu dieser Arbeit verwendeten Materialien.

#### 2.1.1 LABORGERÄTE

**Tabelle 1 Laborgeräte**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Analysewaage	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Systec (Linden)
Cell Counter TC20	BioRad (USA)
Clario Star	BMG Labtech (Ortenberg)
Feinwaage	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (Hercules, USA)
Inkubationsschüttler	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Inkubator	Thermo Scientific (USA)
Magnetisches Separations Rack	Invitrogen (USA)
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA-Werke (Staufen)
Mikroskop DMIL LED	Leica Microsystems (Wetzlar)
Odyssey Infrared Imaging System Scanner	LI-COR (USA)
PCR-Cycler Flex	Analytik Jena (Jena)
Peristaltikpumpe	Gibson (USA)
pH-Meter	HANNA Instruments (USA)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe Pipetboy Acu	Integra Bioscience (Biebertal)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Photometer Küvette $\mu$ Cuvette G1.0	Eppendorf (Hamburg)
Power-PAC Basic	BioRad (München)
qPCR-Cycler StepOne Plus	Applied Biosystems (USA)
Rollenmischer	Invitrogen (USA)
Aesculap Skalpelle	B.Braun (Melsungen)
Sonopuls HD70	Bandelin (Berlin)
Sterilbank	J. H. Schrader (Göttingen)
Tischzentrifuge	Sysmatec (Schweiz)
Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad (USA)

TC20 Automated Cell Counter	BioRad (München)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
Wasserbad	Fischer & Rintelen (Essen)
Zentrifugen 5810 R, 5417 R	Eppendorf (Hamburg)

## 2.1.2 SOFTWARE

**Tabelle 2 Software**

Software	Verwendungszweck
Clario Star 3.02 R2	RNA-Konzentrationsbestimmung
Graph Pad Prism 9.5.1	Graphische und statistische Auswertung
Licor Imaging 5.2	Westernblotanalysen
Stepstone Plus 2.3	qPCR

## 2.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

**Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien**

Material	Firma
Cell Strainer	Greiner Bio-One (Österreich)
Zählkammer	BioRad (München)
Falcon Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)	Greiner (Österreich)
Kanülen Vasofix 22G	B.Braun (Melsungen)
Nitrozellulosemembran	Whatman (Vereinigtes Königreich)
PCR- Platten	Thermo Fisher Scientific (USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Hamburg)
Reaktionsgefäße (0,2- 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Spritzen (5 ml, 25 ml, 50 ml)	B.Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)
Stripetten	Costar (USA)
Whatman Paper	Whatman (Vereinigtes Königreich)
Williams Medium E mit Glutamax	Thermo Fisher Scientific (USA)
Zellkulturplatten (6-Well)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen (TC-100, TC-150)	Sarstedt (Nümbrecht)

Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)
-------------	----------------------

#### 2.1.4 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

**Tabelle 4 Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Chlorwasserstoffsäure	Merck (Darmstadt)
Coomassie-Brillant-Blau	Merck (Darmstadt)
Dexamethason	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat-Diphosphat	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol 70 %	VWR Chemicals (USA)
Ethanol 99 %	VWR Chemicals (USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (USA)
Formaldehyd 37 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Glucose	Merck (Darmstadt)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) - ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth (Karlsruhe)
Octylphenoxypolyethoxyethanol (IGEPAL)	Sigma-Aldrich (USA)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Ketavet	Zoetis (USA)
Kollagenase CLSII	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories (USA)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (USA)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Page Ruler™ Prestained Plus Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (USA)

cPBS Dulbecco	Merck (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich (USA)
Phosphatase-Inhibitor-Tabletten	Roche (Schweiz)
Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche (Schweiz)
Rompun	Bayer (Leverkusen)
Rotiphorese Gel 3D (Acrylamid Mix)	Carl Roth (Karlsruhe)
SDS <i>ultrapure</i> > 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad (München)
Triton x-100	Merck (Darmstadt)
Trizma base 99 %	Sigma-Aldrich (USA)
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich (USA)
Tween-20	Merck (Darmstadt)

### 2.1.5 KITS

**Tabelle 5 Kits**

Kits	Firma	Produktnummer
PowerUp SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific (USA)	A25742
RevertAid First Strand cDNS Synthesis	Thermo Fisher Scientific (USA)	K1621
RNeasy Mini	Qiagen (Niederlande)	74104
SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP	Cell Signaling (USA)	9003S
GeneJET DNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific (USA)	K0702

### 2.1.6 PRIMER FÜR QPCR UND CHIP-ASSAY

**Tabelle 6 Transkriptionsstarts für Primer**

Zielgen	Sequenz 3'-5'	Sequenz 5'-3'
<i>Afp</i>	TGAGGGAATGGCCGACATTT T	ACCAGAGTTCACAGGGCTTG
<i>Alb</i>	AACAAACGGCTCTTGCTGAG	CGAGAAGCAGGTGTCCTTGT
<i>Ck19</i>	CCCGGACCCTCCCGA	CTCAAACCTGGTTCTGAAGT CATCT
<i>Epcam</i>	GCCAGTGTACTTCAGTTGGT GC	CCCTTCAGGTTTTGCTCTTCT CC

<i>Gapdh</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGA CTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTT CAG
<i>Sox9</i>	CACAAGAAAGACCACCCC GA	CTCCGCTTGTCCGTTCTT CA
<i>Afp</i> (TSS)	CAAGTGACCCCTGCTCTGTT	CAGTGCTGGAAGTGGGATGT
<i>Alb</i> (TSS)	GGAACCAATGAATGCGAGG T	TTTTGCCAGAGGCTAGTGGG
<i>Ck19</i> (TSS)	GCCTGTGTAGTAAGGGGCTG	GGCGATTCTGCTCCTACCTC
<i>Epcam</i> (TSS)	AAACTGGGGGCTGAACAGT G	GAAGTGCTGCTTCTCCTCCA
<i>Ncam</i> (TSS)	GGTGGAAGGACACAGTGAG G	GCTGAGCGGAGAATGAGTG A
<i>Sox9</i> (TSS)	CCCTTCCAAAATCCGGTCCA	TCGCTCCCACAGAAGTTTCC
Negativkontrolle im ChIP- Assay	CCCACACAAAGCCCCTCAAT C	CAGCGAAAGCGACAGGCTA AA

### 2.1.7 ANTIKÖRPER

**Tabelle 7 Antikörper**

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
ALB	Ziege	1:2000 (WB)	Novus Biologicals (USA)	AF3329-SP
GAPDH	Ziege	1:2000 (WB)	Sigma-Aldrich (USA)	G8795-200UL
H2Ak119Ub	Kaninchen	1:100 (ChIP)	Cell Signaling (USA)	26498S
SOX9	Kaninchen	1:2000 (WB)	Merck (Darmstadt)	AB5535
<b>Sekundär- antikörper</b>				
IRDye 680	Ziege	1:10 000 (WB)	LI-COR (USA)	926-68070
IRDye 800	Kaninchen	1:10 000 (WB)	LI-COR (USA)	926-32214
IRDye 800	Ziege	1:10 000 (WB)	LI-COR (USA)	926-32211

## 2.1.8 SDS-GELE

**Tabelle 8 SDS-Gele**

Komponente	Sammelgel [ $\mu$ l]	12 % Trenngel [ $\mu$ l]
Aqua dest.	1500	1700
Sammel-/bzw. Trenngel-Puffer	650	1300
30 % Acrylamid	375	2000
10 % SDS	25	50
10 % APS	12,5	25
TEMED	5,0	7,5

## 2.1.9 PUFFER UND LÖSUNGEN

**Tabelle 9 Puffer und Lösungen**

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Blocking-Puffer	5 % (w/v) Milchpulver  in TBS-T
Hanks-Puffer	0,14 M NaCl  0,005 M KCl  0,02 M HEPES  0.0003 M NaHPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O  0.0004 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  Mit NaOH auf pH 7,4 einstellen.  Auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen und autoklavieren.
Hanks I	200 ml Hanks-Puffer  800 $\mu$ l 2 mM/l EGTA  0,1 % Glukose
Hanks II	100 ml Hanks-Puffer  0,1 % Glucose

	<p>5 mMol/l CaCl<sub>2</sub></p> <p>0,6 mg/ml Kollagenase (in 10 ml Hanks-Puffer gelöst und steril filtriert)</p>
PBS-T	<p>1 l PBS</p> <p>1 ml Tween-20</p>
RIPA Lysepuffer	<p>150 mM NaCl</p> <p>1 % IGEPAL</p> <p>0,5 % Natriumdeoxycholat</p> <p>0,1 % SDS</p> <p>50 mM Tris pH 8,0</p> <p>Protease-Inhibitor</p> <p>Phosphatase-Inhibitor</p>
Sammelgel-Puffer	<p>0,05 M Tris</p> <p>Mit HCl auf pH 6,8 einstellen.</p> <p>Auf 100 ml Aqua dest. auffüllen.</p>
TBS 10-fach	<p>0,2 M Tris</p> <p>1,37 M NaCl</p> <p>Mit HCl auf pH 7,6 einstellen.</p> <p>Auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen.</p>
TBS-T	<p>100 ml TBS 10-fach</p> <p>900 ml Aqua dest.</p> <p>1 ml Tween 20</p>
Transferpuffer 10-fach	<p>0,25 M Tris</p> <p>1,9 M Glycin</p> <p>Mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen</p>
Transferpuffer 1-fach	<p>100 ml Transferpuffer 10-fach</p> <p>200 ml 100 % Methanol</p> <p>700 ml Aqua dest.</p>
Trenngel-Puffer	<p>0,15 M Tris</p> <p>Mit HCl auf pH 8,8 einstellen.</p> <p>Auf 50 ml Aqua dest. auffüllen.</p>

## 2.1.10 MEDIEN

**Tabelle 10 Medien für die Hepatozytenkultur**

Medium	Zusammensetzung
Attachment	Williams Medium E mit Glutamax 10 % FCS 100 nM Dexamethason 1 % Penicillin/Streptomycin
Pre-starvation	Williams Medium E mit Glutamax 100 nM Dexamethason 1 % Penicillin/Streptomycin

## 2.1.11 REKOMBINANTE PROTEINE UND FAK-INHIBITOR

**Tabelle 11 Rekombinante Proteine und FAK-Inhibitor**

Protein	Firma	Produktnummer
Rat-tail Kollagen	Corning (USA)	354236
rcTNC	R&D Systems (USA)	3358-TC
rcPOSTN	R&D Systems (USA)	3548-F2
FAK-Inhibitor	R&D Systems (USA)	PF 573228

## 2.2 METHODEN

Für die vorliegenden Versuche wurden WT- und KO-Hepatozyten aus genetisch entsprechend modifizierten Mäusen entnommen. Die Kultur erfolgte auf einem Kollagenmonolayer. Die Analyse der behandelten und nicht behandelten Gruppen erfolgte nach 24, 48 und 72 Std. Ein CHIP-Assay wurde nach 48 Std. durchgeführt. Im Folgenden werden die angewendeten Protokolle näher erläutert.

### 2.2.1 TIERHALTUNG

Als Versuchstiere dienen Mäuse der Linie B6; 129-POSTN<sup>tm1mol/J</sup>, die im Folgenden als POSTN-KO bezeichnet werden und die TNC-KO-Linie B6.Cg-TNC<sup>tm1Sl<sup>a</sup></sup>. Die POSTN-KO-Tiere stammen aus dem Jackson Laboratorium (Bar Harbor, ME, USA), die TNC-KO Mäuse aus RIKEN (Japan). Die Aufzucht fand in der hiesigen „Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben“ (ZETT) der Universität Düsseldorf unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen statt.

Ein positives Votum des Landesamtes für Natur-, Umwelt-, und Verbraucherschutz (LANUV) zum Tierversuchsantrag liegt unter der Projektnummer A212/17, Aktenzeichen 84-02.04.2017.A212 vor. Die Tierversuche wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt.

### 2.2.2 GENETIK DER VERSUCHSTIERE

Um die Rolle des KO von POSTN und TNC auf die Differenzierung der Hepatozyten *in vitro* zu untersuchen, wurden Mäuse mit globalem KO für TNC und POSTN verwendet, sowie Wurfgeschwister aus der heterozygoten Verpaarung als WT-Kontrollen.

Bei der TNC-KO-Linie wurde Exon 2 des TNC-Gens durch eine lacZ/Neomycin Resistenzkassette ersetzt, dabei zeigen TNC-KO-Tiere keinen spezifischen Phänotyp (Saga, 1992).

Bei der POSTN-KO-Linie wurden die Exone 4 bis 10 des *Postn*-Gens durch eine, entgegen der Transkriptionsrichtung eingesetzte, Neomycin-Resistenzkassette ersetzt. Der Vektor wurde in embryonale Stammzellen inseriert, die von der Linie 129 abstammen. Es ergibt sich somit ein gemischter C57BL/6J und 129 Hintergrund (Oka, 2007). Die von uns verwendeten Mäuse wurden auf den BL6 Hintergrund zurückgekreuzt. Der Phänotyp der KO-Tiere ist unter physiologischen Bedingungen unauffällig.

### 2.2.3 HEPATOZYTENISOLATION

Die Isolation von murinen Hepatozyten durch die Perfusion der Leber mit einer Kollagenaselösung, die vorher über die *Vena portae* appliziert wird, wurde von Klaunig *et al.* erstmals als die effektivste Strategie zur Isolation von vitalen murinen Hepatozyten beschrieben. Diese Methode führte zu der höchsten Lebendzellzahl nach der Isolation (Klaunig, 1981).

Die primären Hepatozyten wurden hierfür aus acht bis 12 Wochen alten, männlichen und weiblichen Mäusen der oben beschriebenen Linien mittels Perfusion isoliert. Die Versuchsgruppen (n=3) wurden nicht nach Geschlechtern getrennt analysiert.

Die Tiere wurden zunächst durch die intraperitoneale Gabe von 0,01 ml Rompun + 0,04 ml Ketavet + 0,05 ml NaCl narkotisiert, um im Anschluss eine mediane Laparotomie durchführen zu können. Eine Sterican-Kanüle wurde nach Präparation der *Vena portae* in diese eingeführt. Die Kanüle war über ein Schlauchsystem mit einer Peristaltikpumpe verbunden. Die Leber wurde mit 37° C warmen HANKS 1 Puffer mit 8 ml/min bis zur visuellen Blutleere perfundiert. Hanks Puffer ähnelt der ionischen Zusammensetzung im Verdauungstrakt (Liu, 2011) und ermöglicht so eine isotone Isolation von Hepatozyten. Die Flüssigkeit konnte durch einen Entlastungsschnitt an der murinen Bauchorta wieder aus dem Gefäßsystem austreten. Anschließend erfolgte die 15-minütige Perfusion

mit HANKS 2 Puffer (ebenfalls 37° C), um den Zellverband der Hepatozyten durch die enthaltende Kollagenase 2 aufzulösen. Die verdaute Leber wurde vorsichtig *in toto* entnommen. Die Gallenblase wurde unter besonderer Vorsicht entfernt, um eine Kontamination mit Cholangiozyten zu vermeiden. In einer Zellkulturschale mit *attachment medium* wurde die Leberkapsel unter der Sterilbank eröffnet und die Hepatozyten ausgeschwemmt. Um unverdautes Lebergewebe zu entfernen, wurde die Suspension von Hepatozyten und *attachment medium* durch einen *cell strainer* (100 µm) filtriert. In einem 50 ml Falcon wurden die Hepatozyten dreimal mit *attachment medium* gewaschen und jeweils bei 500 rpm für drei Min. bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Hepatozyten in frischem *attachment medium* resuspendiert. Die Zellen mehrerer Tiere des gleichen Genotyps wurden vereinigt, um eine ausreichend hohe Zellzahl für die Folgeversuche zu gewährleisten. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Hilfe von einer 1:1 Verdünnung in Trypanblau in einem automatischen Zellzähler. Bis zur Kultivierung wurden die Zellen auf Eis gelagert. Eine zeitnahe Verwendung war notwendig, da die Lebendzellzahl stündlich sank. Für den Zeitpunkt 0 (t0) der mRNA- und Proteinanalysen wurden  $1 \times 10^6$  (RNA) bzw.  $2 \times 10^6$  (Protein) Hepatozyten bei 500 rpm und RT für drei Min. zentrifugiert. Das jeweilige Zellpellet wurde anschließend in RLT+ 1 % β-Mercaptoethanol für die RNA-Isolation bzw. in RIPA-Puffer für die Proteinisolation aufgenommen und bei -80° C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Zum Messzeitpunkt t72 des Genotyps POSTN-KO lagen nur zwei biologische Replikate vor, da bei diesem Durchlauf nicht genug lebende Zellen isoliert werden konnten.

#### 2.2.4 ZELLKULTUR UND BEHANDLUNG DER HEPATOZYTEN

Die Hepatozyten wurden in Zellkulturplatten mit 15 cm Durchmesser für den ChIP-Assay und in 6-Well-Platten für die spätere RNA- und Proteinisolation kultiviert. Alle verwendeten Platten wurden drei Std. vorher mit 10 mg/ml *Rat Tail* Kollagen (1:100 verdünnt in sterilem Aqua dest.) beschichtet. Nach 30 Min. Inkubationszeit bei RT wurde das restliche Kollagen wieder abgenommen. Die Platten mussten vollständig getrocknet sein, bevor die Aussaat der Hepatozyten beginnen konnte. Pro Well der 6-Well-Platten wurden 300.000 Hepatozyten in 1 ml *attachment medium* ausplattiert. In den 15 cm Zellkulturschalen wurden je  $4 \times 10^6$  Hepatozyten in 10 ml *attachment medium* kultiviert. Nach zwei Std. bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubator waren die Zellen adhärirt. Die Adhärenz wurde lichtmikroskopisch überprüft. Die Platten wurden dann einmalig mit PBS gewaschen, um tote und nicht adhärente Zellen zu entfernen. Anschließend wurde 1 ml pro Well bzw. 10 ml pro Zellkulturplatte des *pre starvation medium* hinzugegeben. Das *pre starvation medium* enthielt in den behandelten Gruppen bei WT-Hepatozyten 500 ng/ml FAKi, bei POSTN-KO-Hepatozyten 500 ng/ml rcPOSTN und bei TNC-KO-Hepatozyten 500 ng/ml rcTNC. Hierin wurden die Hepatozyten im Inkubator bei 37° C bis zum jeweiligen Versuchszeitpunkt kultiviert. Für die RNA- und Proteinversuche wurden nach 24, 48 und 72 Std. nach der Zugabe des *pre starvation*

*medium* Proben asserviert. Der ChIP-Assay konnte aufgrund geringer Zellzahlen bei der Isolation nur nach 48 Std. durchgeführt werden.

#### 2.2.5 RNA-ISOLATION

Die Hepatozyten wurden jeweils nach 24, 48 und 72 Std. in RLT Lysepuffer mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol mit einem Zellschaber aus den Wells gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Wells wurden zuvor mit PBS gewaschen, um eine Kontamination der Probe mit Mediumrückständen zu vermeiden. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem RNeasy Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Um die RNA-Ausbeute zu maximieren, wurden die Säulen am Ende fünf Min. mit RNase-freiem Wasser inkubiert und erst danach zentrifugiert. Die isolierte und nicht verwendete RNA wurde bei  $-80^{\circ}$  C gelagert. Noch vor der Kultivierung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen bei RT und 500 rpm für drei Min. zentrifugiert, in RLT mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und bei  $-80^{\circ}$  C bis zur weiteren Verwendung als t0 Referenzzeitpunkt für die Expressionsanalysen eingefroren.

#### 2.2.6 ANALYSE DER MRNA-EXPRESSION

Die mRNA-Expression wurde mit der quantitativen Polymerase Kettenreaktion in Echtzeit (*realtime quantitative polymerase chain reaction*, kurz RT-qPCR) bestimmt. Hiermit kann die Expression bestimmter Gene quantifiziert werden. Die Amplifikation und die Detektion der komplementären DNS (cDNS) sind bei diesem Verfahren in einem kombiniert, die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet. Die Bindung von SYBR-Green an die DNS bewirkt eine Zunahme der Fluoreszenz bei 521 nm. Am Ende eines jeden PCR-Zyklus wird die Intensität der Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzintensität verhält sich hierbei proportional zur DNS-Menge. Somit kann aus der gemessenen Fluoreszenzintensität auf die Quantität der amplifizierten DNS geschlossen werden. Zunächst wurde für die qPCR die RNA-Konzentration in den Proben mittels dem *Clario Star Microplate Reader* gemessen. 250 ng RNA wurden mit dem Thermo Fisher *RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit* in cDNS umgeschrieben. Dies erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers. Von der cDNS wurden pro Reaktion 10 ng für die qPCR eingesetzt. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen (Tabelle 12):

**Tabelle 12 Reaktionsgemisch für die qPCR**

Reaktionsgemisch je Ansatz
SYBR Green 10 $\mu$ l

5'-3' Primer 0,2 µl (10 mM)
3'-5' Primer 0,2 µl (10 mM)
Aqua dest. 4,6 µl

**Tabelle 13 Ablauf der qPCR**

Phase	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95° C	3 Min.
Denaturierung	95° C	20 Sek.
<i>Annealing</i>	55° C	20 Sek.
Extension	68° C	30 Sek.
Finale Verlängerung	55° C	30 Sek.
Abkühlung	4° C	

Für jede Probe und jedes Gen wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels des StepOne und der integrierten Software StepOne Software 2.3. Der Schwellenwert (engl. *threshold*) gibt den Zeitpunkt in der Messung an, an dem die Amplifikation beginnend exponentiell verläuft und sich das Fluoreszenzsignal signifikant vom Hintergrundrauschen differenzieren lässt. Der *threshold* wurde manuell an dieser Stelle im Graph eingestellt, der Ct (engl. *cycle threshold*) - Wert gibt dann an, nach wie vielen Zyklen dieser Schwellenwert überschritten wurde. Niedrige Ct-Werte zeigen somit eine hohe initiale Zielgenexpression an, hohe Ct-Werte hingegen eine geringe initiale Expression. Der Schwellenwert (engl. *threshold*) wurde im mittleren Bereich dort festgelegt, wo die Amplifikationskurve bei einer logarithmischen y-Achse linear verläuft, da dies die exponentielle Phase der Amplifikation anzeigt. Die gemessenen Ct-Werte, die für jedes Gen bei gleichbleibendem *threshold* bestimmt wurden, wurden auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* ( $\Delta Ct$ ), sowie auf nicht kultivierte Zellen ( $t_0$ ) normiert ( $\Delta\Delta Ct$ ). So ließ sich auf die relative mRNA-Expression zum Isolationszeitpunkt schließen. Dafür wurde die Formel:  $\text{relative mRNA-Expression} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  verwendet. Das heißt:  $\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{Referenzgen GAPDH})$ ;  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Versuchszeitpunkt}) - \Delta Ct(t_0)$ .

### 2.2.7 PROTEINISOLATION

Die Hepatozyten für die späteren Proteinanalysen wurden nach 24, 48 und 72 Std. dem Inkubator entnommen und auf Eis mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 80 µl RIPA pro 300.000 Zellen aufgenommen und bei -80° C bis zur Weiterverwendung eingefroren. Vor der Kultivierung, unmittelbar nach der Hepatozytenisolation, wurden  $2 \times 10^6$  native Hepatozyten für den

Zeitpunkt t<sub>0</sub> bei RT für drei Min. mit 500 rpm zentrifugiert und in RIPA resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung ebenfalls bei -80° C.

Die Proben wurden vor der Proteinisolation auf Eis langsam aufgetaut und dort 30 Min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 Min. bei 14000 rpm und 4° C. Der Überstand mit den isolierten Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt.

#### 2.2.8 ANALYSE DER PROTEINEXPRESSION

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde im Vorfeld eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) und Coomassie-Brillant-Blau-Lösung erstellt. Die Coomassie-Brillant-Blau-Lösung ist im ungebundenen Zustand rot mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm. Durch die Zugabe von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm. Der Proteingehalt einer Probe kann somit über die Extinktionsanalyse bestimmt werden, wenn diese in Referenz mit einer Standardreihe gesetzt wird. Zur Erstellung der Standardreihe wurde eine Stammlösung mit 0,1 mg/ml BSA-Gehalt angesetzt. Diese wurde mit Aqua dest. schrittweise verdünnt bis zu einer Konzentration von 0,01 mg/ml. Die photometrische Extinktion dieser Standardkonzentrationen wurde festgehalten. Die Extinktion der zu untersuchenden Proteinproben wurden dann ebenfalls vermessen. Mittels der Standardreihe wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

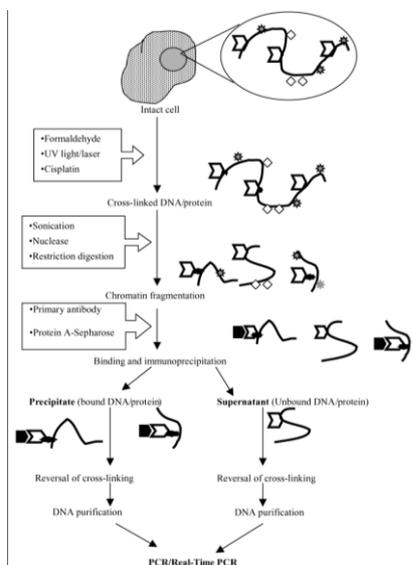
Zur anschließenden Durchführung der Westernblots, wurden je 30 µg Protein der Proben jeweils mit Sammelgelpuffer angesetzt. Beides zusammen wurde für fünf Min. bei 95° C aufgekocht. Die Proben, sowie der Größenstandard „*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*“ wurden auf ein 12-prozentiges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Dieses wurde zuvor in eine Gelkammer eingespannt, die Kämme wurden entfernt und mit Laufpuffer gespült, um eventuelle Gelreste zu entfernen. Die Apparatur wurde anschließend mit Laufpuffer aufgefüllt. Nach zwei Std. Laufzeit bei 100 V wurden die Proteine für 30 Min. auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurden die Membran und *Whatman Paper* in der Größe der Membran in Transferpuffer angefeuchtet. Es wurde ein *semi-dry* Sandwich-Blot durchgeführt: Von unten nach oben wurden drei *Whatman Paper*, die Nitrocellulosemembran, das Trenngel (das Sammelgel wurde zuvor abgetrennt) und noch einmal drei *Whatman Paper* aufeinandergelegt. Nach der Übertragung erfolgte das Absättigen der Membran für 30 Min. mit 5 % Milchpulverlösung in TBS-T bei RT auf einem Reaktionsgefäßroller.

Anschließend erfolgte der Proteinnachweis. Die Antikörper zum Nachweis von ALB und SOX9 wurden in 5 % Milchpulverlösung in TBS-T verdünnt und über Nacht bei 4° C bzw. für das *housekeeping* Gen GAPDH für eine Std. bei RT auf einem Reaktionsgefäßroller inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für fünf Min. mit TBS gewaschen. Die Membran wurde mit dem jeweils affinen Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper für eine halbe Std. bei RT in einem abgedunkelten Falcon rollend inkubiert. Im Anschluss wurde drei Mal für fünf Min. mit TBS

gewaschen, um überschüssige Antikörperreste zu entfernen. Anschließend konnten die Fluoreszenzsignale mit dem *Odyssey Infrared Imaging System* Scanner und der *Image-Studio 3.1*-Software detektiert werden. Dabei wurden sowohl der 700 nm als auch der 800 nm Kanal mit 3.0 Intensität vermessen. Die Normierung der Fluoreszenzsignale erfolgte in Relation zu dem *housekeeping* Gen GAPDH, sowie zum Zeitpunkt t0.

## 2.2.9 CHIP-ASSAY UND DNS-ANALYSE

Zur Analyse der Histonmodifikation wurde ein Chromatin-Immunopräzipitationsassay (ChIP) verwendet. Der ChIP-Assay dient dazu Histon-DNS-Interaktionen zu untersuchen, um zum Beispiel zu analysieren, welche Histonmodifikationen mit welchen Genregionen assoziiert sind. Zu diesem Zweck erfolgt die Vernetzung (*crosslinking*) mit Formaldehyd der zum Versuchszeitpunkt vorliegenden Histon-DNS-Bindung noch in der Zellkulturschale. Nach der *in vitro*-Zelllyse, wird das Lysat auf *beads* geladen. Dieser Schritt ermöglicht die selektive Ausfällung der zu untersuchenden Histonmodifikation mittels spezifischer Antikörper. Gibt es bereits eine Hypothese über die Bindungsstelle der untersuchten Modifikation im Genom, kann im Anschluss eine qPCR mit den entsprechenden, spezifischen Primern durchgeführt werden.



**Abbildung 5 ChIP-Assay**

Gezeigt ist der schematische Ablauf eines ChIP-Assays. Die Zellen mit ihren DNS/Histonkomplexen werden mittels Formaldehyds fixiert (*cross linking*). Mittels Ultraschalls wird die DNS/Histonmischung in kleinere Abschnitte gebrochen (Fragmentierung). Je nach Versuchsaufbau werden Antikörper komplementär zu den zu untersuchenden Zielstrukturen hinzugegeben (Immunopräzipitation). Die DNS wird daraufhin aufgereinigt und kann mittels qPCR analysiert werden (entnommen aus (Das, 2004), mit Genehmigung der *Future Science Ltd.*).

Je untersuchte epigenetische Modifikation wurden  $4 \times 10^6$  ausplattierte und vitale Zellen genutzt. Hinzu kamen je  $4 \times 10^6$  Zellen für die Positivkontrolle (H3) und die Negativkontrolle (IgG). Die Zellen wurden 48 Std. lang, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, kultiviert. Die Fixation der Histon/DNS Komplexe erfolgte mit  $27 \mu\text{l}$  37 %igem Paraformaldehyd pro ml Medium. Zu einer 15 cm Zellkulturschale mit 10 ml Medium wurden somit  $270 \mu\text{l}$  Paraformaldehyd hinzugegeben. Die Proben wurden nach dem Protokoll des Herstellers weiterverarbeitet („*SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP*“ von Thermo Fisher). Die Beschallung zur Fragmentierung der Histon/DNS-Komplexe erfolgte mit einem Ultraschallgerät. Dieses wurde auf Zyklus 30 und Stärke 75 % eingestellt. Jede Probe wurde mit 10 Impulsen beschallt. Die Proben wurden entsprechend des Herstellerprotokolls verdünnt und über Nacht bei  $4^\circ \text{C}$  mit dem H2Ak119Ub bzw. einem IgG-Antikörper (Negativkontrolle) und dem H3-Antikörper (Positivkontrolle) drehend inkubiert.  $10 \mu\text{l}$  pro Behandlungsgruppe wurden ohne Antikörper sofort eingefroren. Hierbei handelt es sich um die Input-DNS, die die Gesamt-DNS in der Probe repräsentiert. Nach der Inkubationszeit mit dem Antikörper, wurden die Proben gewaschen und anschließend mittels ChIP-Auswaschpuffer die Komplexe aus DNS und Chromatin bei  $65^\circ \text{C}$  getrennt.

Nach der DNS-Isolation am Ende des Assays mit dem Thermo Fischer DNS Kit, erfolgte die quantitative PCR-Analyse mit vorher eigens dafür angefertigten, in der Arbeitsgruppe bereits vorliegenden, effizienten Oligonukleotiden (Tabelle 6). Pro qPCR-Reaktion wurden  $2 \mu\text{l}$  der DNS-Probe hinzugegeben.

Zeigten die Ergebnisse nach 40 qPCR-Zyklen keine Amplifikation der DNS, wurden die betroffenen Proben bei  $30^\circ \text{C}$  in einer Vakuum-Zentrifuge für ca. 30 Min. eingedampft und in einem kleineren Volumen mit Nuklease-freiem Wasser, zur effizienteren Anreicherung, wiederaufgenommen. Diese konzentrierte DNS wurde anschließend erneut mit der qPCR analysiert. Dieses Vorgehen fand lediglich bei einer Probe Anwendung.

Die Ct-Werte der qPCR wurden nach der im Herstellerprotokoll angegebenen Formel ausgewertet. Dabei wurden die Ct-Werte der an H2Ak119Ub gebundenen DNS (IP sample) mit den Ct-Werten der *Input* DNS, die nicht mit einem Antikörper inkubiert wurde, in Beziehung gesetzt. Das Ergebnis zeigt dann den prozentualen Anteil von mit H2Ak119Ub epigenetisch modifizierter DNS an der Gesamt-DNS in der Probe. Prozentualer Input =  $2 \% \times 2^{(C[t] \text{ 2\% Input Sample} - C[t] \text{ IP-Sample})}$ .

### 2.3 GRAPHISCHE DARSTELLUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die graphische Darstellung und die anschließende statistische Auswertung der mRNA-, Westernblot- und ChIP-Assays erfolgte mit GraphPad Prism. Die qualitativen Westernblotabbildungen wurden mittels ImageJ erstellt. Zur statistischen Auswertung der

Versuchsgruppen wurde eine Rangvarianzanalyse durchgeführt, da mehr als zwei Versuchsgruppen vorlagen. Da die vorliegenden Daten (n=3) keine Normalverteilung zeigen, wurde als nicht-parametrischer Test ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die *Post-hoc* Testung erfolgte mittels Dunn-Test. Zum Messzeitpunkt t72 des Genotyps POSTN-KO lagen nur zwei biologische Replikate vor. Hier wurde der Mittelwert aus den zwei Replikaten gebildet, um anschließend ebenfalls einen Kruskal-Wallis-Test durchführen zu können. Für den Paarvergleich der CHIP-Assays wurde ein nicht-parametrischer zweiseitiger t-Test (Mann-Whitney-U-Test) angewandt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0.05$  festgelegt.

### 3 ERGEBNISSE

Hepatozyten aus WT-, TNC- und POSTN-KO-Mäusen wurden mittels Kollagenaseperfusion isoliert und auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Zusätzlich wurden TNC- und POSTN-KO-Hepatozyten mit dem jeweils rekombinanten Protein und WT-Hepatozyten mit einem FAK-Inhibitor (FAKi) behandelt. Alle Versuchsgruppen wurden für 24, 48 und 72 Std. kultiviert. Mittels RT-qPCR wurde die mRNA-Expression von *Afp*, *Alb*, *Ck19*, *Epcam* und *Sox9*, sowie mittels Westernblot die Proteinexpression von ALB und SOX9 zusätzlich analysiert. Zudem wurde jeweils nach 48 Std. ein ChIP-Assay durchgeführt, um den Einfluss der epigenetischen Modifikation H2Ak119Ub auf die Regulation der Progenitorgene sowie *Alb* mit und ohne die jeweilige Behandlung zu analysieren.

#### 3.1 DE-DIFFERENZIERUNGSVERHALTEN VON WT-HEPATOZYTEN

Zur Untersuchung des Differenzierungsstatus von WT-Hepatozyten auf einem Kollagenmonolayer wurde an spezifischen Zeitpunkten (24, 48 und 72 Std.) nach dem Aussäen der Hepatozyten das Expressionsniveau von Progenitor- und Differenzierungsmarkern auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Im Detail wurden auf mRNA-Ebene die Progenitormarker *Afp*, *Ck19*, *Epcam* und *Sox9*, sowie der Differenzierungsmarker *Alb* untersucht. Zusätzlich wurde die Expression eines Vertreters der Progenitormarker (SOX9) sowie des Differenzierungsmarkers (ALB) auf Proteinebene analysiert.

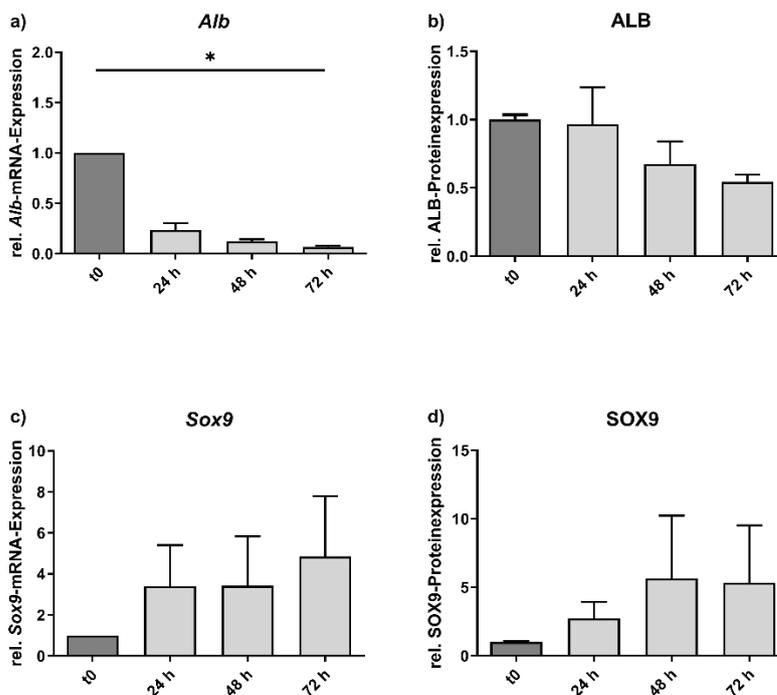
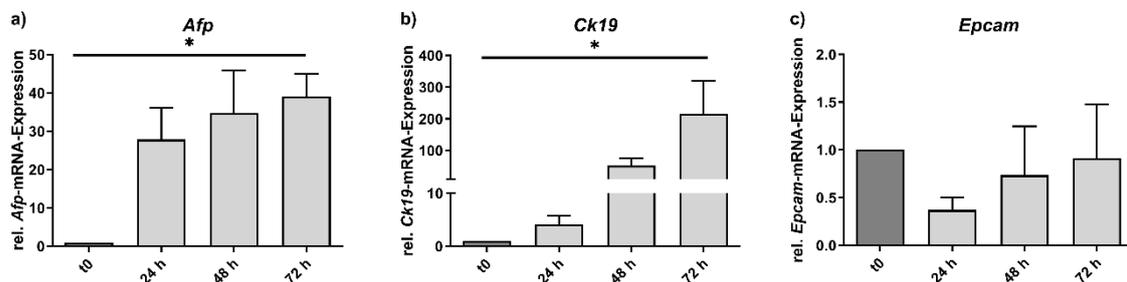


Abbildung 6 mRNA- und Proteinexpression von ALB und SOX9 in WT-Hepatozyten

Die aus WT-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Nach mRNA- und Proteinisolation wurde die Expression von Albumin (a und b), sowie SOX9 (c und d) bestimmt. Es zeigt sich eine reduzierte ALB-Expression bei gleichzeitig gesteigerter SOX9-Expression. Die Reduktion der *Alb*-Expression nach 72 Std. im Vergleich zu t0 ist signifikant. Die jeweilige Expression wurde auf die Kontrolle t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. \* =  $p < 0.05$ .  $p$ -Werte wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung. n=3.

Albumin als Marker differenzierter Hepatozyten, wird, während der 72-stündigen Kultivierung auf einem Kollagenmonolayer, sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene herunterreguliert (Abb. 6a und b). Bereits nach 24 Std. zeigt sich auf *Alb*-mRNA-Ebene eine Reduktion der Expression auf das 0,3-fache des Ausgangswertes. Nach 72 Std. zeigt sich eine signifikante Reduktion im Vgl. zu t0 ( $p = 0,02$ ). Auf Proteinebene kann ebenfalls eine Abnahme der ALB-Expression detektiert werden. Die Reduktion der Expression auf das 0,7-fache des Ausgangswertes kann allerdings nicht als signifikant nachgewiesen werden. Auf mRNA-Ebene weisen die kultivierten WT-Hepatozyten im Vergleich zum Referenzzeitpunkt t0 nach 24 und 48 Std. eine Zunahme des *Sox9*-Expressionsniveaus auf das 4-fache des Ausgangswertes auf. Das Maximum der Expression im untersuchten Zeitraum wird nach 72 Std. erreicht. Ebenso konnte eine tendenzielle Zunahme des SOX9-Proteinniveaus gezeigt werden. Ein signifikanter Expressionsunterschied kommt bezüglich des Progenitorgens *Sox9* weder auf mRNA- noch auf Proteinebene zur Darstellung.



**Abbildung 7 Expression der Progenitorgene *Afp*, *Ck19* und *Epcam* in WT-Hepatozyten**

Die aus WT-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 sowie 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Nach mRNA-Isolation wurde die Expression von *Afp* (a), *Ck19* (b) sowie *Epcam* (c) bestimmt. Die Expression von *Afp* und *Ck19* nimmt im Vgl. zu t0 signifikant zu. *Epcam* weist eine Reduktion der Expression im Vgl. zu t0 auf. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. \* =  $p < 0,05$ .  $p$ -Werte wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung. n=3.

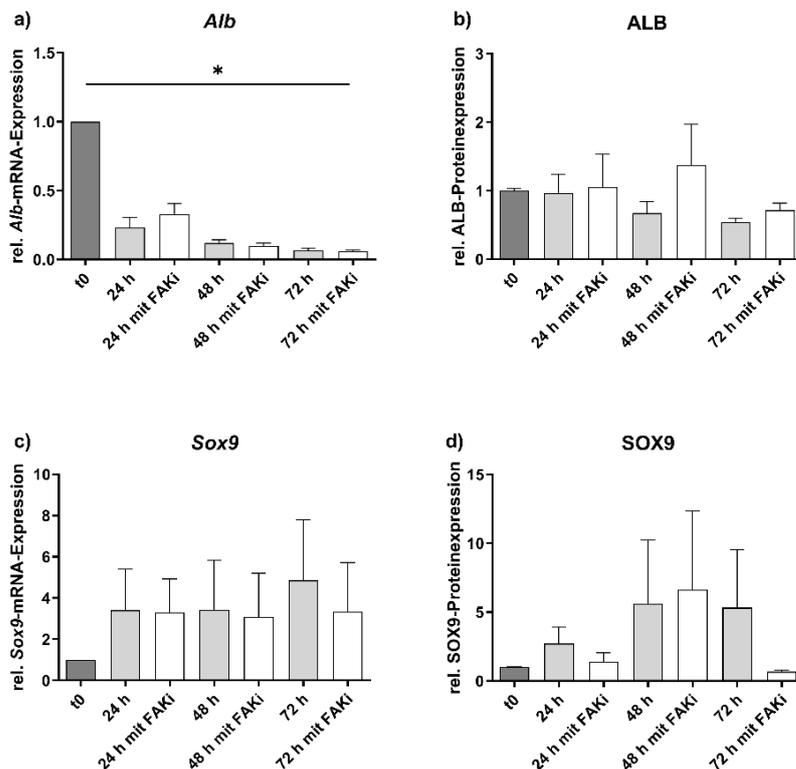
Die Analyse der *Afp*-mRNA-Expression mittels RT-qPCR zeigt eine kontinuierliche Zunahme des Expressionsniveaus bis auf das 40-fache von t0 nach 72 Std. Dieser Unterschied kann als signifikant nachgewiesen werden ( $p = 0,049$ ). *Ck19* weist nach 24 Std. eine zum Referenzzeitpunkt t0 geringfügig gesteigerte Expression auf. Nach 48 Std. zeigt sich eine auf das 50-fache gesteigerte Expression. Das Maximum wird nach 72 Std. mit der signifikant erhöhten Expression auf das 250-

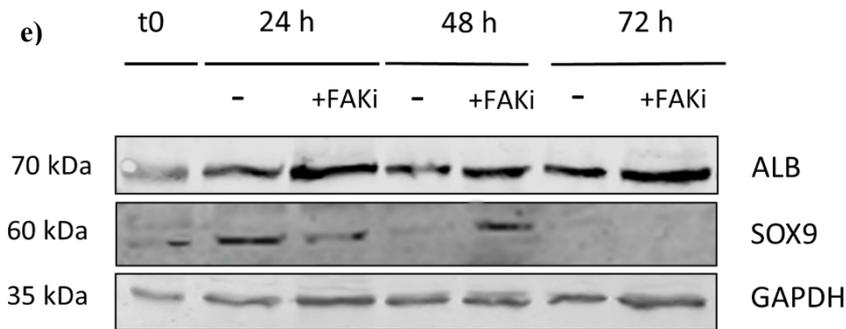
fache von t0 erreicht ( $p = 0,049$ ) (Abb. 7b). Die *Epcam*-mRNA-Expression ist nach 24 Std. auf die Hälfte reduziert im Vgl. zu t0. Nach 48 und 72 Std. zeigt sich im Vgl. zu t24 eine Zunahme der Expression, das Expressionsniveau von t0 wird nach 72 Std. erreicht (Abb. 7c). Somit ist die *Epcam*-Expression in kultivierten WT-Hepatozyten reduziert im Vgl. zu nicht kultivierten WT-Hepatozyten. Eine Zunahme der Expression über den Beobachtungszeitraum in den kultivierten Hepatozyten ist aber dennoch festzustellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass WT-Hepatozyten eine reduzierte mRNA- und Proteinexpression von Albumin bei gleichzeitig gesteigerter Proteinexpression von SOX9, bzw. mRNA-Expression von *Afp*- und *Ck19* und *Sox9* aufweisen. Dies kann mit einem de-differenzierten Phänotyp assoziiert werden.

### 3.2 EINFLUSS DES FAKi AUF DIE HEPATOZYTENDIFFERENZIERUNG

Die WT-Hepatozyten wurden zum Kultivierungsbeginn in zwei Gruppen eingeteilt, von denen die eine Gruppe mit einem FAK-Inhibitor (FAKi), -einmalig zu Kulturbeginn, - behandelt wurde. FAK ist eine Kinase, die regulatorische Signale nach der Bindung von TNC und POSTN an Integrinrezeptoren intrazellulär vermittelt. Die zweite Gruppe wurde ohne Behandlung kultiviert. Hier wurde untersucht, ob durch die Zugabe des FAKi die De-differenzierungsfähigkeit der WT-Hepatozyten beeinträchtigt wird.



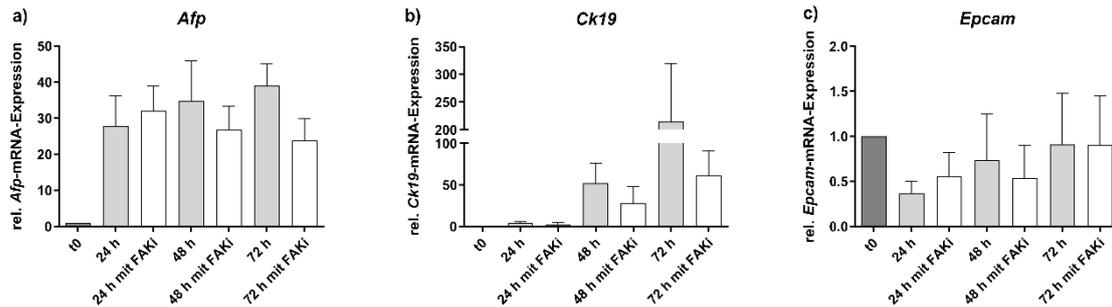


**Abbildung 8 mRNA- und Proteinexpression von ALB und SOX9 in Abhängigkeit der Behandlung mit einem FAKi**

Die aus WT-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Dabei wurde eine Versuchsgruppe mit einem FAKi behandelt (weiß), die zweite Versuchsgruppe wurde ohne Behandlung kultiviert (grau). Nach mRNA- und Proteinisolation wurde die Expression von ALB (a und b) sowie SOX9 (c und d) bestimmt. Abb. e) zeigt exemplarisch eine Westernblotanalyse von ALB (70kDa) und SOX9 (60kDa), sowie GAPDH (35kDa). *Alb* zeigt keinen Expressionsunterschied zwischen den Versuchsgruppen. Die Reduktion der *Alb*-Expression in der FAKi-Versuchsgruppe nach 72 Std. ist signifikant im Vgl. zu t0. Die FAKi-behandelten Hepatozyten zeigen eine geringfügig verstärkte ALB-Expression. Nach 72 Std. ist das *Sox9*-mRNA-Niveau in der behandelten Gruppe reduziert. Das SOX9-Proteinniveau ist durch die Behandlung nach 24 und 72 Std. reduziert im Vergleich zu den nicht behandelten Hepatozyten. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. \* =  $p < 0,05$ .  $p$ -Werte wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.  $n=3$ .

Bezüglich der *Alb*-Expression ist kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen zu detektieren. Ein statistisch signifikanter Expressionsunterschied zeigt sich lediglich in der behandelten Gruppe nach 72 Std. im Vgl. zu t0 ( $p = 0,02$ ). Während die ALB-Proteinexpression nach 24 und 72 Std. in der FAKi behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zu den unbehandelten Hepatozyten nur geringfügig verstärkt ist, zeigt sich nach 48 Std. eine Verdopplung der Expression in der FAKi behandelten Versuchsgruppe. Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen konnte weder auf mRNA- noch auf Proteinebene ein signifikanter Nachweis erbracht werden.

Nach 72 Std. beträgt die *Sox9*-mRNA-Expression in der behandelten Gruppe das 0,6-fache der Expression in nicht behandelten WT-Hepatozyten zum gleichen Versuchszeitpunkt, nachdem nach 24 und 48 Std. kein Unterschied festgestellt werden konnte (Abb. 8c). Die SOX9-Proteinexpression ist in der FAKi behandelten Gruppe nach 24 und 72 Std. reduziert. Nach 48 Std. wird SOX9 in der behandelten Gruppe marginal verstärkt exprimiert (1,2-fach), allerdings ist das Ergebnis in beiden Versuchsgruppen mit einer sehr hohen Varianz behaftet (Abb. 8d). Diesen Verlauf stellt der exemplarisch abgebildete Westernblot dar (Abb. 8e). Nach 72 Std. befinden sich die Proteinbanden in der vorliegenden Abb. an der Nachweisgrenze, wodurch eine semiquantitative Auswertung erschwert ist. Dies hat die hohe Standardabweichung zum Zeitpunkt t72 in der nicht behandelten Gruppe zur Folge.



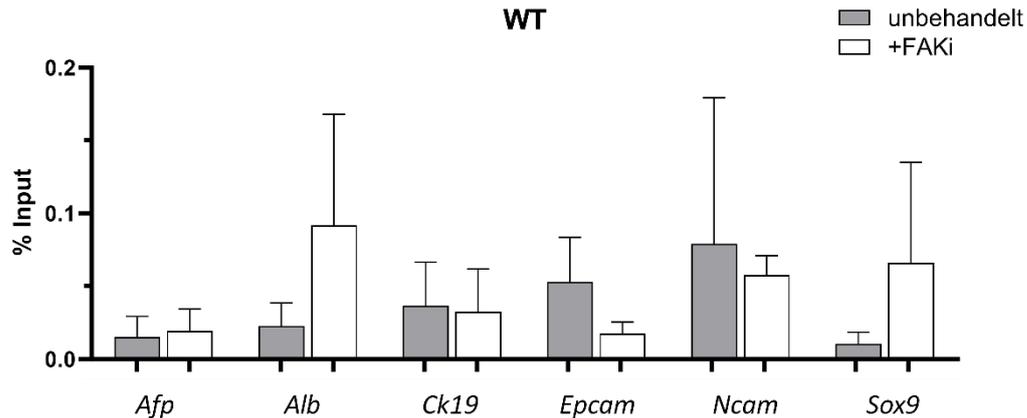
**Abbildung 9 mRNA-Expression von *Afp*, *Ck19* und *Epcam* in WT-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit einem FAKi**

Die aus WT-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Dabei wurde eine Versuchsgruppe mit FAKi behandelt (weiß), die andere wurde ohne Behandlung kultiviert (grau). Nach mRNA-Isolation wurde die Expression von *Afp* (a), *Ck19* (b), sowie *Epcam* (c) bestimmt. Die Expression von *Afp* und *Ck19* ist durch die Behandlung nach 48 und 72 Std. reduziert. Bezüglich *Epcam* zeigt sich kein eindeutiger Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. Ein statistisch signifikanter Nachweis zeigt sich nicht (n=3). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.

Der Progenitormarker *Afp* wird unabhängig von der Behandlung ab Kultivierungsbeginn gesteigert exprimiert im Vergleich zu den nicht kultivierten WT-Hepatozyten (t0). Nach 48 und 72 Std. ist in der FAKi-behandelten Gruppe ein Expressionsverlust im Vgl. zu den nicht behandelten WT-Hepatozyten zu detektieren (Abb. 9a). Ebenso ist die *Ck19*-Expression in der behandelten Gruppe an den Zeitpunkten t48 und t72 reduziert (Abb. 9b). Durch die Behandlung mit dem FAKi wird die *Epcam*-Expression kaum beeinflusst, nach 24 Std. ist durch die Behandlung eine minimal gesteigerte Expression zu detektieren, nach 48 Std. zeigt sich die Expression geringfügig reduziert (Abb. 9c). Ein signifikanter Unterschied kann für kein genanntes Gen erbracht werden.

Im Hinblick auf die ALB-Proteinexpression, die *Afp* und *Ck19*, sowie die *Sox9*-mRNA- und SOX9-Proteinexpression nach 72 Std., könnten die vorliegenden Daten darauf hindeuten, dass die mit dem FAKi behandelten Hepatozyten möglicherweise eingeschränkt de-differenzieren im Vergleich zu den unbehandelten WT-Zellen. Die Ergebnisse legen keinen statistisch signifikanten Einfluss offen.

Um den Einfluss der epigenetischen Histonmodifikation H2Ak119Ub auf den De-differenzierungsprozess in WT-Hepatozyten genauer zu untersuchen, wurde ein ChIP-Assay durchgeführt. Der ChIP-Assay ermöglicht die Analyse von DNS-Abschnitten, die unter einer bestimmten epigenetischen Modifizierung reguliert sind. Es erfolgt die Quantifizierung der Genloci von *Alb* sowie der Progenitormarker *Afp*, *Ck19*, *Epcam*, *Ncam* und *Sox9*, die durch die H2Ak119Ub, in Abhängigkeit der Behandlung mit FAKi, gebunden werden.



**Abbildung 10 Quantifizierung der H2Ak119Ub gebundenen *Alb*- und Progenitorgen-DNS in Abhängigkeit der Behandlung mit einem FAKi**

Hepatozyten wurden aus WT-Mäusen isoliert und auf einem Kollagenmonolayer für 48 Std. kultiviert. Der FAKi wurde zu Kulturbeginn zu einer Versuchsgruppe hinzugegeben. Nach 48 Std. wurden die Zellen fixiert, um die zu dem Zeitpunkt vorhandene Histon-DNS-Bindung zu konservieren. Vor der Inkubation mit dem Antikörper gegen H2Ak119Ub wurde ein Teil der Gesamt-DNS entnommen (Input). Der prozentuale Input gibt die Menge der H2Ak119Ub gebundenen DNS an der Gesamt-DNS an. Die Menge der qPCR-Produkte der durch die H2Ak119Ub gebundenen Genloci von *Epcam* und *Ncam* ist durch die Behandlung mit FAKi vermindert, von *Alb* und *Sox9* hingegen vermehrt. *Afp* und *Ck19* zeigen keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Ergebnisse verfehlen einen statistisch signifikanten Nachweis (n=3). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.

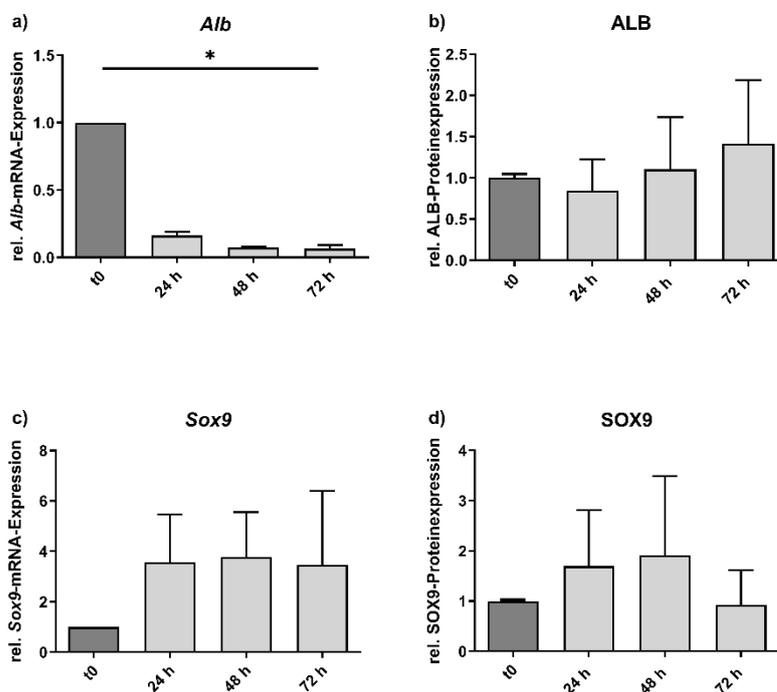
Nach 48 Std. Kultivierung mit FAKi wurde in der behandelten Gruppe eine geringere Menge an qPCR-Produkten der spezifischen Genloci von *Ncam* und *Epcam*, die durch die H2Ak119Ub gebunden sind, quantifiziert (Abb. 10). Durch die FAKi-Behandlung konnten bezüglich *Alb* und *Sox9* geringfügig mehr qPCR-Produkte der durch die H2Ak119Ub gebundenen jeweiligen Genloci quantifiziert werden. Die Analysen von *Afp* und *Ck19* zeigen ein vergleichbares Niveau in beiden Versuchsgruppen. Insgesamt deuten *Alb*, *Epcam*, *Ncam* und *Sox9* darauf hin, dass die Bindung dieser Genloci durch die H2Ak119Ub, möglicherweise FAK-abhängig reguliert werden könnte. Diese Tendenzen verfehlen einen signifikanten Nachweis. Zu berücksichtigen ist außerdem die hohe Varianz der Ergebnisse in der behandelten Gruppe von *Alb* und *Sox9*, sowie in der nicht behandelten Gruppe von *Ncam*.

### 3.3 DE-DIFFERENZIERUNGSVERHALTEN VON POSTN-KO-HEPATOZYTEN

POSTN ist ein Protein der EZM, das in verschiedenen Versuchsanordnungen bereits eine starke Assoziation zu einer normalen Regeneration der Leber aufgewiesen hat. Die Periostindefizienz ist mit einer pathologischen, eingeschränkten Regeneration der Leber assoziiert. In diesem

Versuchsaufbau wurde deshalb die De-differenzierungsfähigkeit der Hepatozyten bei fehlender Periostin-Expression (POSTN-KO) untersucht.

POSTN-KO-Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Anschließend wurde die Expression von Albumin und der Progenitorgene analysiert, um zu überprüfen, ob der Verlust von POSTN die De-differenzierungsfähigkeit der Hepatozyten beeinträchtigt. Im Detail werden auf mRNA-Ebene die Progenitormarker *Afp*, *Ck19*, *Epcam* und *Sox9*, sowie der Differenzierungsmarker *Alb* untersucht. Zusätzlich wird die Expression eines Vertreters der Progenitormarker (SOX9) sowie des Differenzierungsmarkers ALB auf Proteinebene analysiert.

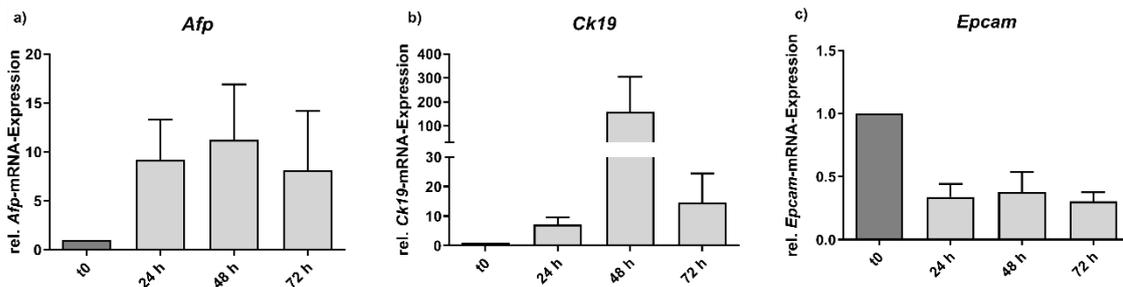


**Abbildung 11 ALB- und SOX9-mRNA- und Proteinexpression in POSTN-KO-Hepatozyten**

Die aus POSTN-KO-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 sowie 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Nach mRNA- und Proteinisolierung wurde die Expression von Albumin (a und b), sowie SOX9 (c und d) bestimmt. Während *Alb* im beobachteten Zeitraum eine signifikant reduzierte Expression aufweist, nimmt die ALB-Expression zu. SOX9 wird sowohl auf mRNA-als auch Proteinebene verstärkt exprimiert. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. \* =  $p < 0,05$ .  $p$ -Werte wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.  $n=3$ .

*Alb*-mRNA wird in kultivierten POSTN-KO-Hepatozyten im beobachteten Zeitraum bereits nach 24 Std. deutlich reduziert exprimiert im Vgl. zu t0. Auf diesem basalen Niveau stagniert die Expression auch nach 48 und 72 Std. Die Reduktion der Expression ist nach 72 Std. signifikant im Vgl. zu t0 ( $p = 0,03$ ). Hingegen zeigt sich auf ALB-Proteinebene eine Steigerung der Expression auf das 1,5-fache

des Ausgangsniveaus (Abb. 11 a und b). Die *Sox9*- Expression ist nach 24 Std. auf das 4-fache von t0 gesteigert. Eine Veränderung der Expression im Vgl. zu t24 ist an den weiteren Versuchszeitpunkten nicht messbar. Die SOX9-Proteinanalysen zeigen nach 24 Std. eine auf das 1,9-fache gesteigerte Expression im Vergleich zu t0. Nach 48 Std. nimmt das SOX9-Proteinniveau geringfügig zu im Vergleich zu t24. Nach 72 Std. nimmt die SOX9-Expression ab und erreicht nahezu das Expressionsniveau der nicht kultivierten Kontrollgruppe (Abb. 11d).

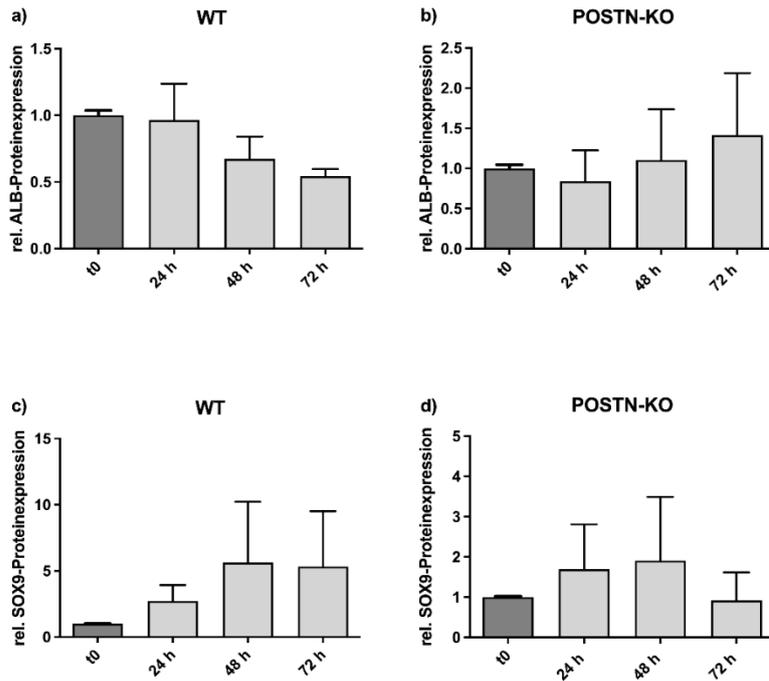


**Abbildung 12 Expression der Progenitorgene *Afp*, *Ck19* und *Epcam* in POSTN-KO-Hepatozyten**

Die aus POSTN-KO-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 sowie 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Nach mRNA-Isolation wurde die Expression der Progenitorgene *Afp* (a), *Ck19* (b) und *Epcam* (c) bestimmt. *Afp* und *Ck19* weisen eine gesteigerte Expression im Vgl. zu t0 auf. Der Progenitormarker *Epcam* wird über den Versuchszeitraum von 72 Std. auf einem gleichbleibenden Niveau reduziert exprimiert. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. Die Ergebnisse verfehlen einen statistisch signifikanten Nachweis (n=3). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.

Bezüglich *Afp* zeigt sich bereits nach 24 Std. eine deutlich höheres Expressionsniveau im Vgl. zu t0. Die Expression ist auf das 10-fache von t0 gesteigert. An den weiteren Versuchszeitpunkten kann von einem gleichbleibendem Expressionsniveau bezüglich *Afp* ausgegangen werden. *Ck19* weist eine gesteigerte Expression im Vgl. zu t0 auf. Nach 48 Std. zeigt sich eine deutlich gesteigerte Expression, die mit einer hohen Varianz aufgrund eines Ausreißers in den Messwerten behaftet ist. Bezüglich des Progenitorgens *Epcam* zeigt sich bereits nach 24 Std. eine auf das 0,4-fach reduzierte Expression (Abb. 12c). Die Expression bleibt über den beobachteten Versuchszeitraum konstant.

Um einen möglichen Unterschied im De-differenzierungsverhalten von WT- und POSTN-KO-Hepatozyten zu detektieren, wird die Expression von ALB als Differenzierungsmarker und SOX9 als Vertreter der Progenitormarker auf Proteinebene gegenübergestellt (Abb. 13).



**Abbildung 13 Vergleich der ALB- und SOX9-Proteinexpression in WT- und POSTN-KO-Hepatozyten**

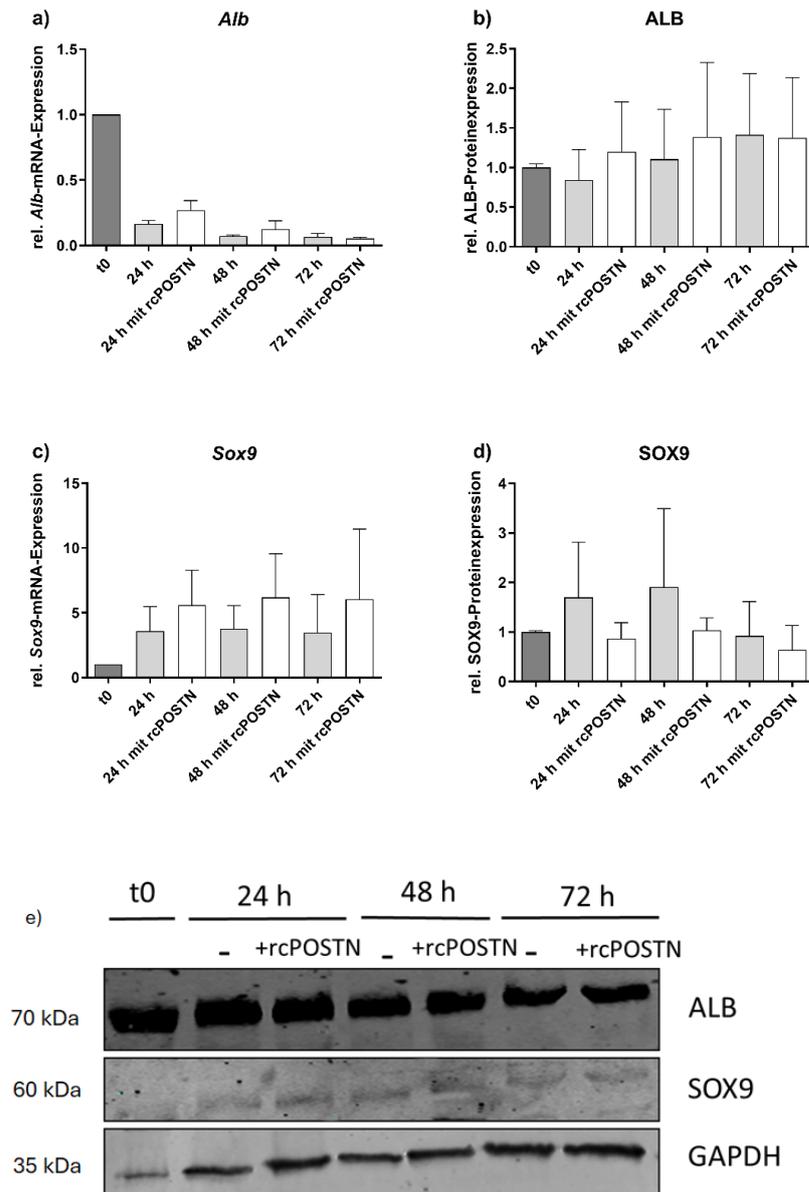
Die aus WT- (a und c) und POSTN-KO-Mäusen (b und d) isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Nach Proteinisolierung wurde das Expressionsniveau von ALB (a und b), sowie SOX9 (c und d) bestimmt. Das Proteinniveau von ALB in WT-Hepatozyten nimmt über den Versuchszeitraum ab, während die ALB-Expression in POSTN-KO-Hepatozyten zunimmt. Die SOX9-Expressionslevel steigen in beiden Versuchsgruppen bis zum Zeitpunkt t48 an. Während die Expression in WT-Hepatozyten nach 72 Std. stagniert, sinkt sie in POSTN-KO-Hepatozyten auf das Niveau von t0 ab. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. Die Ergebnisse verfehlen einen signifikanten Nachweis (n=3). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.

Während die ALB-Proteinexpression in WT-Hepatozyten kontinuierlich über den Kultivierungszeitraum abnimmt, nimmt die Proteinexpression von ALB in POSTN-KO-Hepatozyten zu (Abb. 13a und b). Somit kann für die Proteinexpression von ALB im Vergleich der WT- und POSTN-KO-Hepatozyten ein konträres ALB-Expressionsverhalten beobachtet werden. In POSTN-KO-Hepatozyten zeigt sich eine geringere relative Zunahme der SOX9-Expression nach 24 und 48 Std. im Vergleich zum WT. Nach 72 Std. zeigt sich eine reduzierte Expression in POSTN-KO-Hepatozyten im Vergleich zum WT. Statistische Signifikanzen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist auch in POSTN-KO-Hepatozyten eine verstärkte Expression von Progenitormarkern bei gleichzeitig reduzierter *Alb*-Expression nachweisbar. Dies entspricht einem de-differenzierten Phänotyp. Allerdings verläuft dies bezüglich ALB und SOX9 verzögert im Vgl. zum WT. *Epcam* zeigt mit einem reduzierten Expressionsniveau eine gegenläufige Tendenz im Vgl. zu den weiteren Progenitorgenen und unterstreicht die These einer eingeschränkten De-differenzierung durch den POSTN-KO.

### 3.4 EINFLUSS VON rcPOSTN AUF DEN DIFFERENZIERUNGSSTATUS VON POSTN-KO-HEPATOZYTEN

POSTN-KO-Hepatozyten wurden zu Kulturbeginn mit rekombinantem POSTN (rcPOSTN) behandelt und ebenso wie die unbehandelten POSTN-KO-Hepatozyten für 24, 48 und 72 Std. kultiviert. Bei diesem vergleichenden Experiment soll untersucht werden, ob die Zugabe von rcPOSTN eine verbesserte De-differenzierung zur Folge hat.

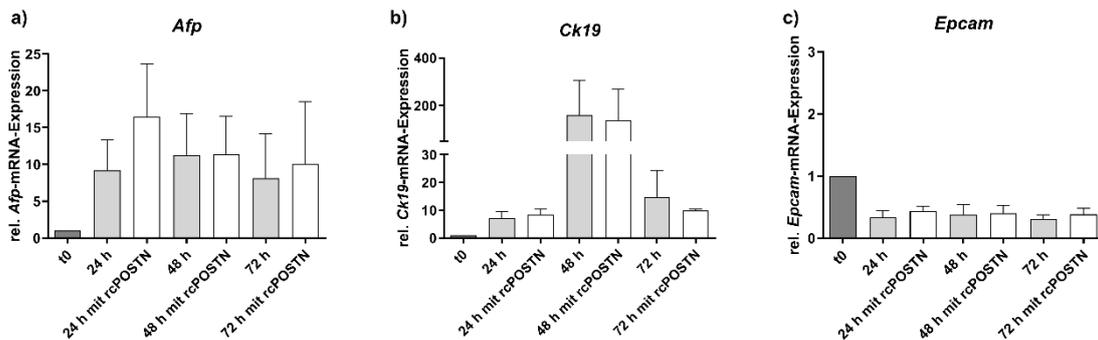


**Abbildung 14 ALB- und SOX9-mRNA- und Proteinexpression in POSTN-KO-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit rcPOSTN**

Die aus POSTN-KO-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Dabei wurde eine Versuchsgruppe mit rcPOSTN behandelt (weiß), die andere wurde ohne Behandlung kultiviert (grau). Nach mRNA- und Proteinisolation wurde die Expression von Albumin (a und b) sowie SOX9 (c und d) bestimmt. Abb. e) zeigt beispielhaft eine Westernblotanalyse von ALB (70kDa) und SOX9 (60kDa), sowie GAPDH (35kDa). Durch die Behandlung ist kein Unterschied

bezüglich der *Alb*-mRNA-Expression zwischen den Versuchsgruppen nachweisbar. Das Expressionsniveau der *Sox9*-mRNA ist in der behandelten Gruppe gesteigert im Vgl. zur unbehandelten Gruppe. ALB-Protein wird durch die Behandlung mit rcPOSTN nach 24 und 48 Std. geringfügig verstärkt exprimiert, die SOX9-Proteinexpression ist reduziert. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. Die Ergebnisse verfehlen einen statistisch signifikanten Nachweis (n=3). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.

Mittels RT-qPCR konnte kein Unterschied bezüglich der *Alb*-mRNA-Expression zwischen den beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden (Abb. 14a). Auf Proteinebene konnte durch die Behandlung der POSTN-KO-Hepatozyten mit rcPOSTN eine verstärkte ALB-Expression nach 24 und 48 Std. festgestellt werden. Nach 72 Std. gleicht sich die Expression in beiden Gruppen aneinander an (Abb. 14b). In dem hier exemplarisch abgebildeten Westernblot (Abb. 14e) lassen sich die Unterschiede visuell kaum nachvollziehen. Die Unterschiede in der ALB-Expression sind gering (Vgl. Abb. 14 b und e); es konnte kein signifikanter Nachweis erbracht werden. Auf mRNA-Ebene ist in der behandelten Gruppe eine Zunahme der *Sox9*-Expression auf das 1,7-fache im Vgl. zur unbehandelten Gruppe an allen untersuchten Zeitpunkten detektierbar. Das SOX9-Proteinexpressionsniveau der rcPOSTN behandelten POSTN-KO-Hepatozyten ist an allen Zeitpunkten im Vergleich zur unbehandelten Gruppe um die Hälfte reduziert. In dem exemplarisch ausgewählten Westernblot wurde nur ein schwaches Signal für SOX9 gemessen, allerdings kommt eine intensivere Bande bei SOX9 nach 24 Std. in der behandelten Gruppe zur Darstellung, was mit der großen Varianz in der unbehandelten Gruppe korreliert (Vgl. Abb. 14 d und e).



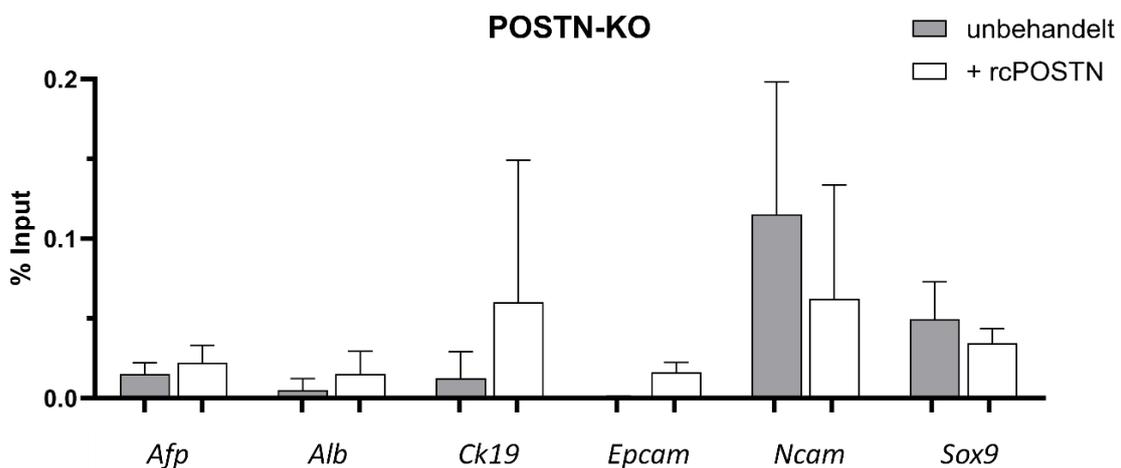
**Abbildung 15 mRNA-Analyse von Progenitorgenen in POSTN-KO-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit rcPOSTN**

Die aus POSTN-KO-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Dabei wurde eine Versuchsgruppe mit rcPOSTN behandelt (weiß), die andere wurde ohne Behandlung kultiviert (grau). Nach mRNA-Isolation wurde die Expression von *Afp* (a), *Ck19* (b), sowie *Epcam* (c) bestimmt. *Afp* wird nach 24 und 72 Std. in der behandelten Gruppe verstärkt exprimiert. Das *Ck19*- und *Epcam*-Expressionsniveau zeigt keinen Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. Die Ergebnisse verfehlen einen statistisch signifikanten Nachweis (n=3). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.

Mittels RT-qPCR konnte nach 24 Std. ein Anstieg der *Afp*-Expression auf das 1,9-fache in der rcPOSTN-behandelten Versuchsgruppe im Vgl. zur unbehandelten Gruppe gezeigt werden. Nach 48 Std. liegt kein Unterschied vor. Nach 72 Std. zeigt sich eine geringfügig verstärkte Expression durch die Behandlung. Die Expressionsanalysen von *Ck19* und *Epcam* weisen keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen auf.

Zusammenfassend wurde eine verstärkte Expression von *Afp* und *Sox9* nach der Zugabe von rcPOSTN gezeigt. Hingegen zeigen die Analysen von ALB und SOX9 eine geringfügig verstärkte (ALB) bzw. reduzierte (SOX9) Expression in der behandelten Gruppe. Die Ergebnisse verfehlen einen signifikanten Nachweis.

Um den Einfluss der epigenetischen H2Ak119Ub in POSTN-KO-Hepatozyten zu untersuchen, wurde ein ChIP-Assay nach 48 Std. sowohl in der mit rcPOSTN behandelten als auch in der unbehandelten Gruppe durchgeführt.



**Abbildung 16 Quantifizierung der H2Ak119Ub gebundenen *Alb*- und Progenitormarker-DNS in Abhängigkeit der Behandlung mit rcPOSTN in POSTN-KO-Hepatozyten**

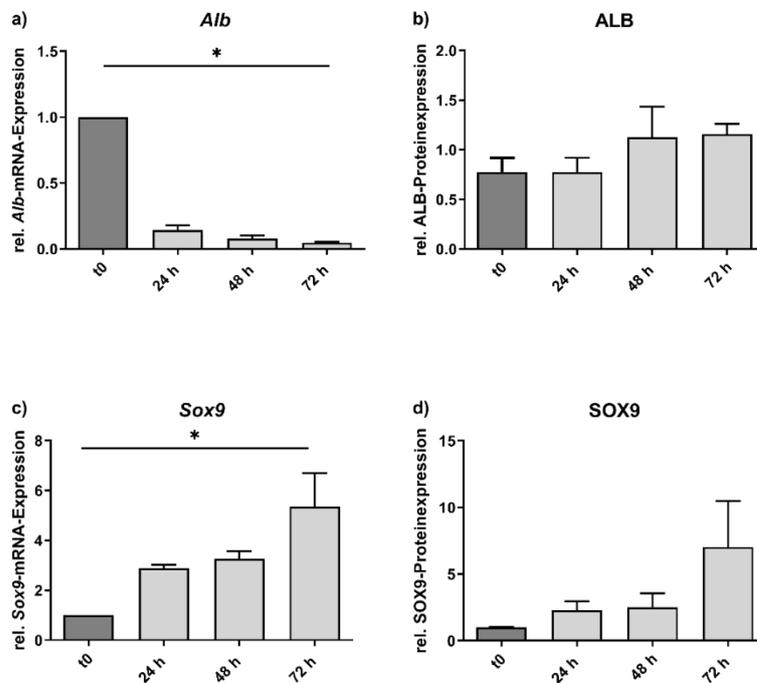
Hepatozyten wurden aus POSTN-KO-Mäusen isoliert und auf einem Kollagenmonolayer für 48 Std. kultiviert. rcPOSTN wurde zu Kulturbeginn zu einer Versuchsgruppe hinzugegeben. Nach 48 Std. wurden die Zellen fixiert, um die zu dem Zeitpunkt vorhandene Histon-DNS-Bindung zu konservieren. Vor der Inkubation mit dem Antikörper gegen H2Ak119Ub wurde ein Teil der Gesamt-DNS entnommen (Input). Der prozentuale Input gibt an, wieviel die H2Ak119Ub regulierte DNS an der Gesamt-DNS ausmacht. Die Menge der qPCR-Produkte nimmt durch die Behandlung mit rcPOSTN bezüglich der Genloci von *Ck19* und *Epcam* zu, während sie bei *Ncam* und *Sox9* abnimmt. Die Quantifizierung der DNS, der an die H2Ak119Ub gebundenen Genloci von *Afp* und *Alb*, zeigt vergleichbare qPCR-Produktmengen der beiden Gruppen. Ein statistisch signifikanter Nachweis kann nicht erbracht werden (n=3). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.

Bezüglich der durch die H2Ak119Ub gebundenen Genloci von *Ck19* und in geringerem Maße von *Epcam* wurde eine geringfügig größere Menge von qPCR-Produkten in den mit rcPOSTN behandelten Hepatozyten gemessen im Vergleich zu den unbehandelten POSTN-KO-Hepatozyten

(Abb. 16). Für die Progenitormarker *Ncam* und *Sox9* zeigen sich gegenteilige Tendenzen, durch die Behandlung nimmt die Menge der qPCR-Produkte, der durch die H2Ak119Ub gebundenen Genloci, ab. Die Quantifizierung der Genloci von *Afp* und *Alb* zeigt ein vergleichbares Niveau in beiden Versuchsgruppen, somit scheint kein Einfluss der Zugabe von rcPOSTN auf die KO-Hepatozyten in Bezug auf die Regulation dieser Genloci durch die H2Ak119Ub zu bestehen. Die gemessenen Unterschiede verfehlen einen statistisch signifikanten Nachweis.

### 3.5 DE-DIFFERENZIERUNGSVERHALTEN VON TNC-KO-HEPATOZYTEN

TNC-KO-Hepatozyten wurden über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Std. kultiviert, um das De-differenzierungsverhalten zu beobachten. Dies dient der Beantwortung der Fragestellung, ob TNC-KO-Hepatozyten eingeschränkt auf einem Kollagenmonolayer de-differenzieren im Vergleich zu WT-Hepatozyten. In einem zweiten Schritt erfolgt deshalb der direkte Vergleich zu WT-Hepatozyten, um eine potenziell eingeschränkte De-differenzierung durch den TNC-KO im Vergleich zu WT-Hepatozyten näher zu untersuchen. Im Detail wurden auf mRNA-Ebene die Progenitormarker *Afp*, *Ck19*, *Epcam* und *Sox9*, sowie der Differenzierungsmarker *Alb* untersucht. Zusätzlich wurde die Expression eines Vertreters der Progenitormarker (SOX9) sowie der Differenzierungsmarker ALB auf Proteinebene analysiert.

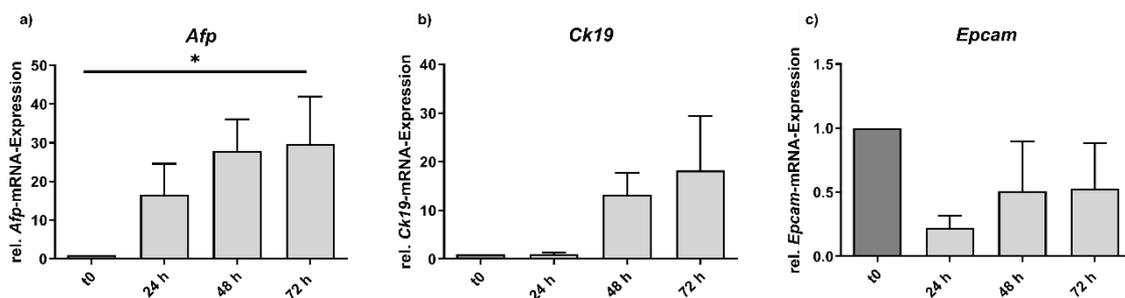


**Abbildung 17** ALB- und SOX9-mRNA- und Proteinexpression in TNC-KO-Hepatozyten

Die aus TNC-KO-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Nach mRNA- und Proteinisolierung wurde die Expression von Albumin (a und b), sowie SOX9 (c und d) bestimmt. Während *Alb*-mRNA signifikant reduziert exprimiert wird, nimmt die *Sox9*-mRNA- und

SOX9-Proteinexpression zu. Die Zunahme der *Sox9*-Expression ist signifikant. ALB zeigt ein gleichbleibendes Expressionsniveau. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. \* =  $p < 0.05$ .  $p$ -Werte wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.  $n=3$ .

Das mRNA-Expressionsniveau des Differenzierungsgens *Alb* nimmt über den Beobachtungszeitraum signifikant ab ( $p = 0,026$ ). Die Expression ist auf das 0,2-fache von t0 reduziert. ALB wird auf Proteinebene nach 24 Std. in gleichem Maße wie in der Kontrollgruppe, die nicht kultiviert wurde (t0), exprimiert. Das Expressionslevel steigt nach 48 Std. auf das Maximum (die 1,1-fache Expression im Vergleich zu t0) an und stagniert zum Zeitpunkt t72 (Abb. 17b). Aufgrund der maximal 1,1-fachen Erhöhung, kann insgesamt von einem gleichbleibenden Expressionsprofil ausgegangen werden. *Sox9*-mRNA wird kontinuierlich verstärkt exprimiert, bis nach 72 Std. ein Maximum mit der 6-fachen Expression von t0 erreicht wird (Abb. 17c). Dieser Unterschied ist signifikant ( $p = 0,03$ ). Auf Proteinebene zeigt sich eine zunehmend gesteigerte SOX9-Expression, bis nach 72 Std. das Maximum mit der 7-fach verstärkten Expression im Vergleich zu t0 erreicht wird (Abb. 17d).

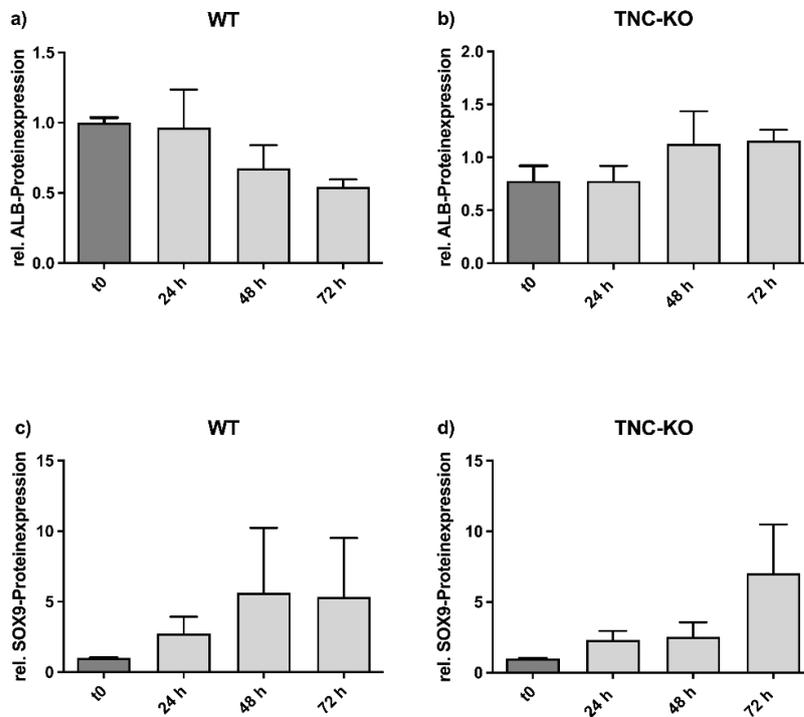


**Abbildung 18 Expression der Progenitorgene *Afp*, *Ck19* und *Epcam* in TNC-KO-Hepatozyten**

Die aus TNC-KO-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Nach RNA-Isolation wurde die mRNA-Expression von *Afp* (a), *Ck19* (b), sowie *Epcam* (c) bestimmt. Die *Afp*- und *Ck19*-Expression nimmt über den Versuchszeitraum zu. Die *Epcam*-Expression nimmt nach 24Std. ab und nähert sich nach 48 und 72 Std. dem Expressionsniveau von t0 an. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. \* =  $p < 0,05$ .  $p$ -Werte wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.  $n=3$ .

Die Expression des Progenitorgens *Afp* nimmt im Beobachtungszeitraum signifikant bis auf das 30-fache der Expression von t0 nach 72 Std. zu ( $p = 0,049$ ) (Abb. 18a). Die *Ck19*-Expression ist nach 48 Std. auf das 15-fache der Expression von t0 gesteigert und nimmt nach 72 Std. nur noch geringfügig zu. *Epcam*-mRNA wird nach 24 Std. reduziert exprimiert im Vgl. zu t0. Nach 48 und 72 Std. nimmt die Expression zu, bleibt allerdings reduziert im Vgl. zu t0. Eine statistische Signifikanz wird nicht beobachtet.

Im nächsten Schritt erfolgt der direkte Vergleich der ALB- und SOX9-Proteinexpression in WT- und TNC-KO-Hepatozyten, um Unterschiede im De-differenzierungsverhalten näher zu beschreiben (Abb. 19).



**Abbildung 19 Vergleich der ALB- und SOX9-Proteinexpression in WT- und TNC-KO-Hepatozyten**

Die aus WT- (a und c) und TNC-KO-Mäusen (b und d) isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Nach Proteinisolierung wurde die Expression von ALB (a und b), sowie SOX9 (c und d) bestimmt. In TNC-KO-Hepatozyten verbleibt die ALB-Expression auf einem vergleichbaren Niveau in Bezug auf t0, wohingegen eine Reduktion in WT-Hepatozyten zu detektieren ist. Die SOX9-Expression steigt in TNC-KO-Hepatozyten verzögert an im Vgl. zum WT. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. Statistische Signifikanzen ergeben sich nicht (n=3). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.

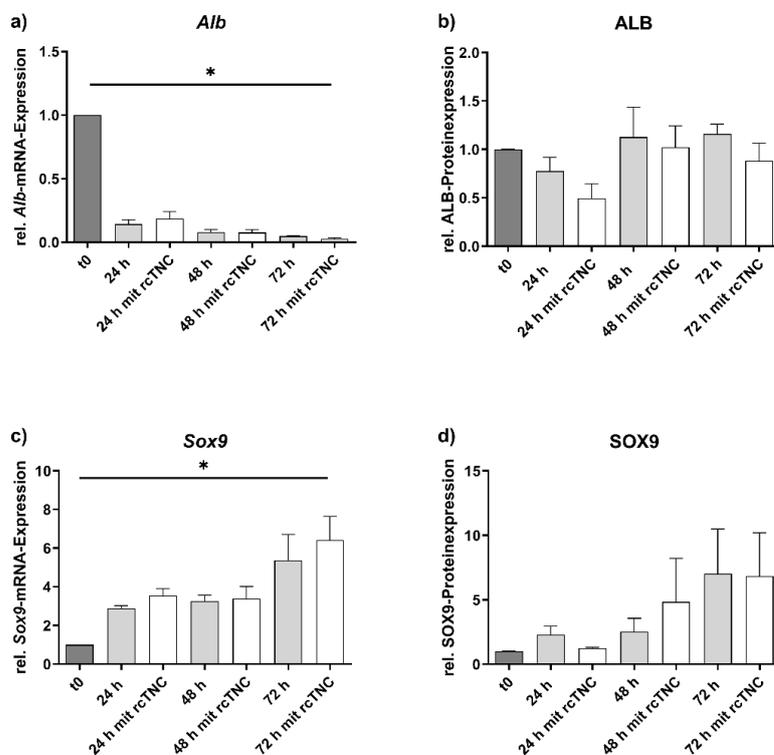
WT-Hepatozyten prägen einen Progenitor-ähnlichen Phänotyp bei der Kultivierung auf einem Kollagenmonolayer aus. Dies ist unter anderem charakterisiert durch die erhöhte Expression von Progenitorgen, in diesem Fall SOX9, sowie die verminderte Expression des Differenzierungsmarkers ALB. Diese Entwicklung konnte auf Proteinebene in WT-Hepatozyten festgestellt werden (Abb. 19a und c). Es konnte kein statisch signifikanter Nachweis erbracht werden. Eine gesteigerte SOX9-Expression kann in TNC-KO-Hepatozyten ebenfalls beobachtet werden, allerdings mit einer Latenz von ungefähr 24 Std. (Abb. 19c und d). Dies bedeutet, dass nach 72 Std. Kultivierungszeit die TNC-KO-Hepatozyten das höchste SOX9-Expressionsniveau aufweisen, was bei WT-Hepatozyten bereits nach 48 Std. erreicht wird. Ein ähnlicher Effekt konnte für ALB nicht gezeigt werden. Bezüglich der ALB-Expression in TNC-KO-Hepatozyten ist ein gleichbleibendes

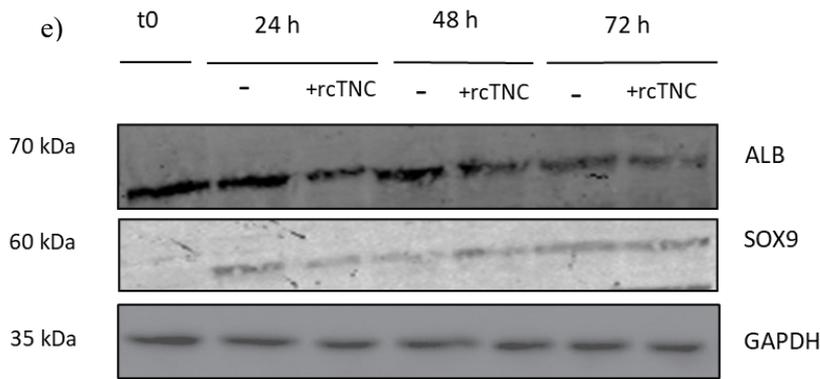
Expressionsprofil im Vgl. zu t0 zu detektieren. Im Vergleich zu den WT-Hepatozyten, in denen sich ein über den Versuchszeitraum ein um die Hälfte reduziertes ALB-Expressionslevel zeigt, ist dies ein hierzu tendenziell widersprüchliches Expressionsmuster (Abb. 19a und b).

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass auch TNC-KO-Hepatozyten einen de-differenzierten Phänotyp auf einem Kollagenmonolayer ausprägen, allerdings verläuft dies verzögert im Vgl. zum WT. *Epcam*-mRNA zeigt ein reduziertes Expressionsniveau im Vgl. zu t0 und ALB-Protein zeigt keine Reduktion der Expression. Dieses Differenzierungsmuster kann mit einer eingeschränkten De-differenzierung in TNC-KO-Hepatozyten assoziiert werden.

### 3.6 EINFLUSS VON rcTNC AUF DEN DIFFERENZIERUNGSSTATUS VON TNC-KO-HEPATOZYTEN

Nach der Isolation der TNC-KO-Hepatozyten erfolgte eine Unterteilung in zwei Versuchsgruppen. Eine Gruppe wurde zu Kulturbeginn mit rcTNC behandelt, die andere Gruppe wurde ohne eine Behandlung kultiviert. Der Vergleich beider Gruppen dient der Untersuchung, ob die Zugabe von rcTNC eine verbesserte De-differenzierungsfähigkeit bewirkt.

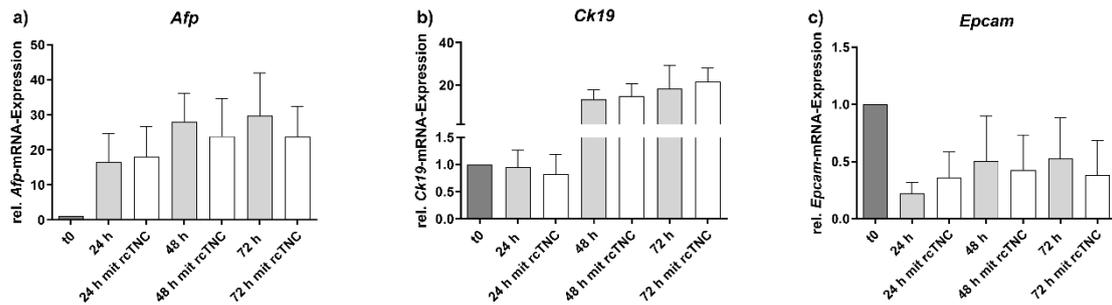




**Abbildung 20 ALB- und SOX9-mRNA- und Proteinexpressionsanalysen in TNC-KO-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit rcTNC**

Die aus TNC-KO-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Dabei wurde eine Versuchsgruppe mit rcTNC behandelt (weiß), die andere wurde ohne Behandlung kultiviert (grau). Nach mRNA- und Proteinisolation wurde die Expression von Albumin (a und b) sowie SOX9 (c und d) bestimmt. Abb. e) zeigt beispielhaft eine Westernblotanalyse von ALB (70kDa) und SOX9 (60kDa), sowie GAPDH (35kDa). Ein Unterschied im Expressionsniveau der beiden Gruppen in Bezug auf die *Alb*-mRNA-Expression konnte nicht festgestellt werden. In der behandelten Gruppe wurde ALB-Protein reduziert exprimiert. *Sox9*-mRNA wird nach 72 Std. in der behandelten Gruppe verstärkt exprimiert. SOX9-Protein wird in der behandelten Gruppe zunächst reduziert und nach 48 Std. verstärkt exprimiert. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich nur in Bezug auf die *Alb*- und *Sox9*-Expression nach 72 Std in der behandelten Gruppe im Vgl. zu t0. \* =  $p < 0,05$ . *p*-Werte wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.  $n=3$ .

Das Expressionsniveau der *Alb*-mRNA ist in beiden Versuchsgruppen basal niedrig im Vgl. zu t0. Ein Unterschied zwischen den Gruppen ist nicht festzustellen. Einzig die Reduktion der *Alb*-Expression nach 72 Std. in der behandelten Gruppe im Vgl. zu t0 ist signifikant ( $p = 0,016$ ). Die ALB-Proteinexpression ist in der mit rcTNC behandelten Gruppe an allen untersuchten Zeitpunkten reduziert im Vergleich zu nicht behandelten TNC-KO-Hepatozyten. Die Expressionsniveaus von *Sox9*-mRNA zeigen nach 24 und 48 Std. keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Nach 72 Std. kann eine geringfügig gesteigerte Expression im Vgl. zur nicht behandelten Gruppe detektiert werden. Die *Sox9*-Expression in der behandelten Gruppe ist nach 72 Std. signifikant gesteigert im Vgl. zu t0 ( $p = 0,02$ ). Die SOX9-Expression in der behandelten Gruppe entspricht nach 24 Std. der Hälfte der Expression in nicht behandelten KO-Hepatozyten. Nach 48 Std. ist die Expression in der behandelten Gruppe verdoppelt, um sich nach 72 Std. der nicht behandelten Gruppe anzugleichen, hier besteht kein Expressionsunterschied zwischen den Gruppen (Abb. 20d). Diese Dynamik kann in dem exemplarisch abgebildeten Westernblot (Abb. 20e) eingeschränkt nachvollzogen werden. Insgesamt zeigen sich nur schwache Signale bei 60kDa (SOX9). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen konnte für keinen der genannten Marker gezeigt werden.



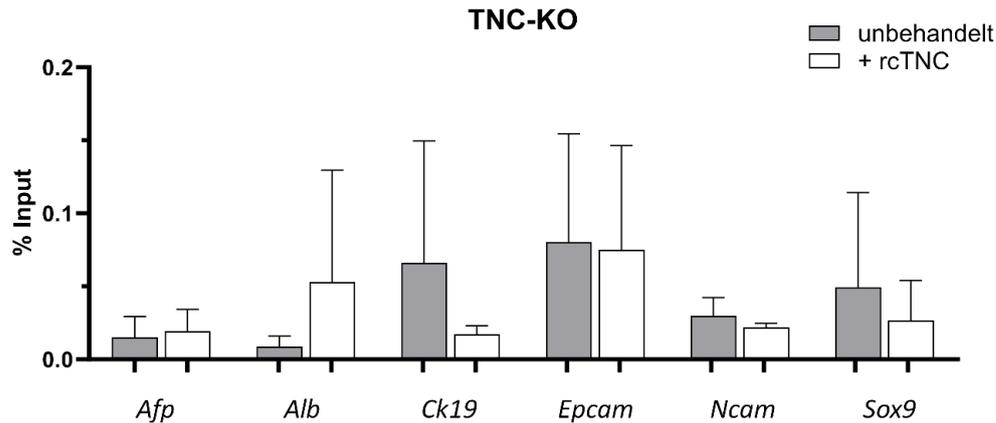
**Abbildung 21 mRNA-Expression der Progenitorgene *Afp*, *Ck19* und *Epcam* in TNC-KO-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit rcTNC**

Die aus TNC-KO-Mäusen isolierten Hepatozyten wurden für 24, 48 und 72 Std. auf einem Kollagenmonolayer kultiviert. Dabei wurde eine Versuchsgruppe mit rcTNC behandelt (weiß), die andere wurde ohne Behandlung kultiviert (grau). Nach mRNA-Isolation wurde die Expression von *Afp* (a), *Ck19* (b), sowie *Epcam* (c) bestimmt. *Afp* wird nach 48 und 72 Std. in der behandelten Gruppe reduziert exprimiert. *Ck19* und *Epcam* zeigen keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Als Kontrolle dienen Hepatozyten, die vor der Kultivierung entnommen wurden (t0). Die jeweilige Expression wurde auf t0 sowie auf das housekeeping Gen *Gapdh* normiert. Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung. n=3.

*Afp* wird in beiden Behandlungsgruppen im Vergleich zum Expressionsniveau von t0 verstärkt exprimiert. Nach 24 Std. ist kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen nachweisbar. Nach 48 und 72 Std. ist die *Afp*-Expression in mit rcTNC behandelten TNC-KO-Hepatozyten auf das 0,6-fache reduziert im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe. Die *Ck19*- und *Epcam*-Expression zeigt keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Zusammenfassend deutet die verminderte ALB-Proteinexpression bei gesteigerter Expression von *Sox9* nach 72 Std. bzw. SOX9-Protein nach 48 Std. eine möglicherweise geringfügig verbesserte Dedifferenzierungsfähigkeit der mit rcTNC behandelten Hepatozyten an. Auf mRNA-Ebene ist dies für *Alb* nicht nachzuvollziehen. Die reduzierte *Afp*-Expression widerspricht dieser Tendenz. Die Expression von *Ck19* und *Epcam* wird durch die Zugabe von rcTNC nicht beeinflusst. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen kommen nicht zur Darstellung.

Um den Einfluss der epigenetischen Modifikation H2Ak119Ub in TNC-KO-Hepatozyten und den Einfluss der Behandlung mit rcTNC auf die epigenetischen Prozesse zu untersuchen, wurde ein ChIP-Assay nach 48 Std. durchgeführt. Es erfolgt die Quantifizierung der Genloci von *Alb* und der Progenitormarker *Afp*, *Ck19*, *Epcam*, *Ncam* und *Sox9*, die durch die H2Ak119Ub in Abhängigkeit der Behandlung mit rcTNC gebunden werden.



**Abbildung 22 Quantifizierung der H2Ak119Ub gebundenen *Alb*- und Progenitormarker-DNS in Abhängigkeit der Behandlung mit rcTNC in TNC-KO-Hepatozyten**

Hepatozyten wurden aus TNC-KO-Mäusen isoliert und auf einem Kollagenmonolayer für 48 Std. kultiviert. rcTNC wurde zu Kulturbeginn zu einer Versuchsgruppe hinzugegeben. Nach 48 Std. wurden die Zellen fixiert, um die zu dem Zeitpunkt vorhandene Histon-DNS-Bindung zu konservieren. Vor der Inkubation mit dem Antikörper gegen H2Ak119Ub wurde ein Teil der Gesamt-DNS entnommen (Input). Der prozentuale Input gibt an, wieviel die H2Ak119Ub regulierte DNS an der Gesamt-DNS ausmacht. Die Menge der qPCR-Produkte der H2Ak119Ub gebundenen Genloci von *Ck19* und *Sox9* nimmt nach der Behandlung ab, die von *Alb* hingegen zu. Bezüglich *Afp*, *Epcam* und *Ncam* zeigen sich vergleichbare Ergebnisse in den beiden Versuchsgruppen. Die Ergebnisse verfehlen einen statistisch signifikanten Nachweis (n=3). Die Fehlerbalken visualisieren die Standardabweichung.

Nach 48 Std. wurde eine geringere Menge von qPCR-Produkten der durch die H2Ak119Ub gebundenen Genloci von *Ck19* und *Sox9*, gemessen (Abb. 22). Bezüglich des durch die H2Ak119Ub gebundenen Genlocus von *Alb* konnte durch die Behandlung mit rcTNC eine größere Menge von qPCR-Produkten gemessen werden. Die Menge der qPCR-Produkte der durch die H2Ak119Ub gebundenen Genloci von *Afp*, *Epcam* und *Ncam* ist in beiden Gruppen annähernd gleich. Statistisch signifikante Unterschiede werden für keinen der untersuchten Genloci nachgewiesen. Es zeigt sich eine hohe Varianz für die Analysen der Genloci von *Ck19* und *Sox9* jeweils in der unbehandelten Gruppe, sowie für *Alb* in der behandelten Gruppe.

## 4 DISKUSSION

Die Leber besitzt ein hohes Regenerationspotential, das maßgeblich durch die Fähigkeit der Hepatozyten zur De-differenzierung mitbedingt ist (Chen, 2012). Dieser Prozess ist u.a. durch eine verminderte Expression von ALB, als Marker adulter Hepatozyten, und eine (Re-) Expression von Progenitorgenen wie z.B. *Afp*, *Ck19*, *Epcam*, *Ncam* und *Sox9* gekennzeichnet (Chaudhari, 2016; Dunn, 1992). Darüber hinaus kommt es zur Bildung einer „Stammzell-Nische“ mit verstärkter Expression von EZM-Proteinen, darunter TNC und POSTN (El-Karef, 2007; Huang, 2015), die in unterschiedlichen Regenerationsprozessen beteiligt sind und intrazelluläre Signale über Integrin-Rezeptoren und u.a. FAK vermitteln (Bourdon und Ruoslahti, 1989; Gnani, 2017). Die dynamischen Veränderungen der EZM sind eine wichtige Voraussetzung für die Regenerationsfähigkeit der Leber *in vivo* (Bedossa und Paradis, 2003). Eine pathologische Zunahme der EZM durch einen dysregulierten Regenerationsprozess führt zum klinischen Bild der Fibrose. Da auf dem Boden der chronischen Fibrose eine Leberzirrhose bis hin zum HCC entstehen kann, ist das Verständnis der Regenerationsmechanismen von großer klinischer Bedeutung. In den Fokus der vorliegenden Untersuchung werden deshalb die Einflüsse der EZM-Proteine TNC und POSTN, sowie der im Signalweg folgenden Kinase FAK auf den molekularen Phänotyp und die H2Ak119Ub gestellt. Unter der Prämisse, dass der TNC- bzw. POSTN-KO zu einer eingeschränkten De-differenzierung der Hepatozyten führt und dass die Zugabe von diesen Proteinen die De-differenzierungsfähigkeit, respektive die eutrophe Leberregeneration wiederherstellt, ergeben sich hieraus zukünftig potenziell interessante Therapieansätze für Menschen mit manifester Leberfibrose.

Bislang liegen wenige Daten bezüglich des KO von TNC und POSTN, sowie des Einflusses von FAKi im Kontext der Leberregeneration und des Differenzierungsstatus von Hepatozyten vor. Im Folgenden sollen die im Rahmen dieses Promotionsprojektes erhobenen Daten und Ergebnisse in den wissenschaftlichen Stand der Forschung eingeordnet werden.

### 4.1 EXPRESSIONSVERHALTEN VON WT-HEPATOZYTEN AUF EINEM KOLLAGENMONOLAYER

Dass kultivierte Hepatozyten im Vergleich zu nicht kultivierten Hepatozyten eine veränderte Genexpression im Sinne einer erhöhten Progenitorgenexpression und einer verminderten Albuminexpression aufweisen, ist in der Vergangenheit bereits umfangreich untersucht worden. Mehrere unabhängige Studien konnten aufzeigen, dass durch die Kultivierung auf einem Monolayer aus Kollagen I in kultivierten Hepatozyten eine De-differenzierung zu Progenitor-ähnlichen Zellen induziert werden kann (Bissell und Guzelian, 1980; Godoy, 2009; Reid und Jefferson, 1984). In den vorliegenden Daten zeigt sich hierzu passend eine reduzierte mRNA- und Proteinexpression von Albumin mit einem Minimum nach der maximalen Versuchsdauer von 72 Std., bei gleichzeitig

gesteigerter Expression der Progenitormarker *Afp*, *Ck19* und *Sox9*. Chaudhari *et al.* haben bislang die umfangreichste Beschreibung von verschiedenen Vorläuferzellen vorgenommen. Hepatische Stammzellen exprimieren in ihrem Versuchsaufbau EpCAM und NCAM, aber kein AFP, wohingegen Progenitorzellen u.a. AFP, CK19 und auch SOX9 exprimieren, bei persistierender EpCAM-Expression. Hepatische Vorläuferzellen exprimieren EpCAM und AFP, aber kein CK19 und SOX9 (Chaudhari, 2016). Auf Basis dieser Publikation, handelt es sich bei den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Zellen a.e. um Hepatozyten mit einem Progenitormarkerprofil, da sowohl eine erhöhte *Afp*-, als auch *Sox9*- und *Ck19*-Expression detektiert wurde. Allerdings zeigt sich in den vorliegenden Daten eine im Vgl. zu nicht kultivierten Hepatozyten reduzierte *Epcam*-Expression. Bis zu t72 ist dann eine gesteigerte *Epcam*-Expression zu beobachten, diese erreicht aber nur das Niveau von t0. Diese Ergebnisse könnten implizieren, dass *Epcam* ein später Marker der De-differenzierung ist. Im Sinne von Chaudhari *et al.* würden allerdings bereits hepatische Vorläuferzellen *Epcam* exprimieren. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete, nicht signifikante, *Epcam*-Expression ist somit nicht konkordant zu den bisherigen Forschungsergebnissen. Zur validen Beurteilung der Hypothese, dass *Epcam* ein eher später Marker der De-differenzierung sein könnte, wären größere Versuchsgruppen und ein längerer Versuchszeitraum notwendig.

#### 4.1.1 HEPATOZYTEN DE-DIFFERENZIEREN MÖGLICHERWEISE FAK-ABHÄNGIG

Es ist bekannt, dass FAK durch Integrine aktiviert werden kann (Francalanci, 2020). Integrinrezeptoren wiederum können TNC und POSTN binden (Bourdon und Ruoslahti, 1989; Sugiyama, 2016). Somit ist eine FAK-Induktion durch die EZM-Proteine möglich. Aufgrund dieses Zusammenhangs zwischen den EZM-Proteinen TNC sowie POSTN und dem FAK-abhängigen Signalweg, wurde der Einfluss eines FAKi in WT-Hepatozyten untersucht. Eine Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den POSTN- und TNC-KO-Hepatozyten mit dem FAKi war nicht Bestandteil dieser Arbeit und wäre in weiterführenden Versuchen von Interesse.

Mittels FAKi wurde die FAK in dem vorliegenden Versuchsaufbau blockiert, um zu untersuchen, ob die Inhibition zu einer eingeschränkten De-differenzierung in WT-Hepatozyten führt. FAK wird bei der Kultivierung von Hepatozyten auf einem Kollagenmonolayer aktiviert und verstärkt exprimiert, während dies in einer Kollagensandwich-(3D-) Kultur, in der Hepatozyten keinen de-differenzierten Phänotyp annehmen, nicht passiert. Die Aktivierung von De-differenzierungsmechanismen kann inhibiert werden, wenn der FAK/Scr Signalweg gehemmt wird (Godoy, 2009). Somit gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivierung von FAK für die hepatozelluläre De-differenzierung notwendig ist. In der vorliegenden Arbeit zeigen sich ebenfalls vereinzelt Hinweise auf eine Beteiligung von FAK im De-differenzierungsprozess. Durch die FAKi-Zugabe kommt es zu einer eingeschränkten Expression von *Afp*, *Ck19*, sowie *Sox9* nach 72 Std. Die ALB-Expression ist in der behandelten Gruppe tendenziell gesteigert im Vgl. zu nativ kultivierten WT-Hepatozyten. Ein

signifikanter Unterschied konnte allerdings nicht gezeigt werden. Von Chaudhari *et al.* wurde dieses Expressionsmuster mit reifen Hepatozyten assoziiert (Chaudhari, 2016). Dies unterstreicht die These der eingeschränkten De-differenzierung durch die FAKi-Behandlung. Das Ergebnis wird durch eine insgesamt nur geringfügig erhöhte Proteinexpression von ALB relativiert. *Alb*-mRNA zeigt sogar keinen Expressionsunterschied zwischen den Versuchsgruppen. Eine mögliche Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse bzgl. mRNA- und Proteinexpression von Albumin ist eine posttranskriptionale Regulation, z.B. eine gesteigerte ALB-Proteinexpression im Vgl. zur mRNA-Expression durch eine verstärkte Translation der vorhandenen *Alb*-mRNA (*translation on demand*) (Liu, 2016). Bei Shang *et al.* wurde, konträr zu der beschriebenen Annahme, nach einer 2/3-Hepatektomie eine verbesserte Leberregeneration in FAK-deletierten Mäusen beobachtet (Shang, 2016). Dies könnte darin begründet sein, dass nach Hemihepatektomie andere Signalwege induziert werden als bei toxischer oder entzündlicher Leberschädigung, bei denen eher De-differenzierungsprozesse im Vordergrund stehen (Higgins und Anderson, 1931; Michalopoulos, 2017; Miyaoka und Miyajima, 2013). Ein direkter Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen ist aufgrund des *in vivo* Versuchsaufbaus bei Shang *et al.* und den *in vitro* Analysen der vorliegenden Arbeit nicht zulässig.

#### 4.2 DIE DE-DIFFERENZIERUNG IN KO-HEPATOZYTEN SCHEINT VERZÖGERT

Es ist bekannt, dass die Organfunktion in stark geschädigtem Leber- und Pankreasgewebe unter anderem durch die De-differenzierung von differenzierten Zellen zu Vorläuferzellen und deren Proliferation wiederhergestellt werden kann (Jensen, 2005; Jopling, 2011; Sawitza, 2009). Der Einfluss eines KO der Proteine TNC und POSTN auf die De-differenzierung in Hepatozyten ist bisher nicht ausreichend untersucht. Makroskopisch konnte im Pankreas von POSTN-KO-Mäusen nach chemisch-toxischer Induktion einer Pankreatitis eine deutlich schlechtere Regeneration des Pankreas im Vergleich zum WT beobachtet werden (Hausmann, 2016). Aufgrund der embryonalen und strukturellen Ähnlichkeit von Pankreas und Leber ist eine Übertragbarkeit auf Hepatozyten denkbar (Ghurburrun, 2018; Zaret, 2008). Diese potenzielle Analogie zwischen beiden Organen konnte von Huang *et al.* bestätigt werden. Der POSTN-KO führte in der genannten Studie zu einer signifikant geringeren transienten Fibrose als Zeichen der eingeschränkten Regeneration in Mauslebern (Huang, 2015). Die eingeschränkte Regeneration betraf sowohl makroskopische Beobachtungen, als auch die Expression von Markern adulter Hepatozyten, in diesem Fall Aminotransferasen (Huang, 2015). Eine Untersuchung speziell der Expression von Differenzierungsmarkern in POSTN-KO-Hepatozyten stand zu diesem Zeitpunkt noch aus. Die hier erhobenen Daten geben vereinzelt Hinweise darauf, dass eine schlechtere Regeneration in POSTN-KO-Hepatozyten, wie sie bei Huang *et al.* zu beobachten war, mit der schlechteren De-differenzierung der Hepatozyten durch den POSTN-KO assoziiert sein könnte. Die De-

differenzierung verläuft in den vorliegenden Ergebnissen in POSTN-KO-Hepatozyten bzgl. der ALB- und SOX9-Expression verzögert im Vgl. zum WT. Allerdings prägen auch POSTN-KO-Hepatozyten einen Vorläuferphänotyp bei der Kultivierung auf einem Kollagenmonolayer aus. Lediglich *Epcam* zeigt über den gesamten Versuchszeitraum eine reduzierte Expression im Vgl. zu t0 und unterstreicht damit möglicherweise die These einer eingeschränkten De-differenzierung in POSTN-KO-Hepatozyten. Um die De-differenzierungsfähigkeit der KO-Hepatozyten abschließend beurteilen zu können, sind größere Versuchsgruppen notwendig, um einen statistisch signifikanten Einfluss darzustellen.

Analog zum POSTN-KO zeigen in den Experimenten von El Karef *et al.* auch TNC-KO-Mäuse eine signifikant schlechtere morphologische Leberregeneration nach chemisch-toxisch induzierter Hepatitis (El-Karef, 2007). Verlieren Hepatozyten die Fähigkeit zur TNC-Expression durch einen entsprechenden KO, kommt es bei El-Karef *et al.* zu einer verminderten transienten Fibrose, respektive einer eingeschränkten Regeneration (El-Karef, 2007). Ein wichtiger Einfluss von TNC im Kontext der Zelldifferenzierung wurde bereits für Neuronen und Chondrozyten gezeigt (Okada und Suzuki, 2021; Roll und Faissner, 2019). Über den Einfluss von TNC auf zelluläre (De-) Differenzierungsmechanismen in der Leber ist bisher wenig bekannt. Die hier vorliegenden Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die von El-Karef beobachtete morphologische Einschränkung der Regeneration durch eine verzögerte De-differenzierung in TNC-KO-Hepatozyten mitbeeinflusst sein könnte. In den hier erhobenen Daten verläuft die De-differenzierung auf einem Kollagenmonolayer in TNC-KO-Hepatozyten bzgl. ALB und SOX9 verzögert im Vergleich zu WT-Hepatozyten. Allerdings prägen TNC-KO-Hepatozyten, wie auch POSTN-KO-Hepatozyten, in den vorliegenden Versuchen bzgl. der weiteren untersuchten Gene einen de-differenzierten Phänotyp aus. Lediglich *Epcam* zeigt eine reduzierte Expression im Vgl. zu nicht kultivierten TNC-KO-Hepatozyten und unterstreicht damit die These einer eingeschränkten De-differenzierung in TNC-KO-Hepatozyten. Somit sind auch bzgl. TNC weitere Untersuchungen in größeren Versuchsansätzen notwendig, um den Einfluss von TNC auf die De-differenzierung näher zu analysieren.

#### 4.2.1 EINFLUSS DER SUBSTITUTION VON rcPOSTN UND rcTNC AUF DEN DIFFERENZIERUNGSSTATUS

Der Einfluss von rcPOSTN auf den Differenzierungsprozess in Hepatozyten, insbesondere in KO-Hepatozyten ist bisher nicht untersucht worden. Bei Smid *et al.* führte die Injektion von POSTN direkt in das Pankreas von POSTN-KO-Mäusen zu einer vermehrten Expression von Progenitormarkern (Smid, 2015). Somit konnte bereits gezeigt werden, dass extern zugeführtes POSTN die Bildung von Vorläuferzellen im embryonal verwandten Pankreas stimulieren kann. Die Zugabe von rcPOSTN scheint in dem hier vorliegenden hepatozellulären Versuchsaufbau keinen eindeutigen Effekt auf die De-differenzierungsfähigkeit von POSTN-KO-Hepatozyten zu haben.

Lediglich bezüglich *Afp* und *Sox9* ist eine tendenziell gesteigerte Expression nach der Zugabe von rcPOSTN detektierbar. Dieser Unterschied verfehlt einen signifikanten Nachweis. Es wurde humanes rcPOSTN verwendet und zu murinen Hepatozyten appliziert. Das humane rcPOSTN wurde entsprechend bereits etablierten Versuchsprotokollen in der AG verwendet. Die fehlende bzw. eingeschränkte biologische Wirksamkeit des humanen Proteins in Kombination mit einer anderen Zielspezies, in diesem Fall Mäusen, ist denkbar. Humanes und murines POSTN stimmen lediglich zu 90% in ihrer Aminosäuresequenz überein (Mosher, 2015). Der Versuchsaufbau könnte entsprechend mit murinem rcPOSTN in murinen Hepatozyten wiederholt werden, um eine möglichst hohe biologische Kompatibilität zu erreichen. Bezüglich SOX9 zeigt sich auf Proteinebene kein entsprechender Effekt wie auf mRNA-Ebene. Möglicherweise zeigt sich der *rescue* Effekt durch die Zugabe von rcPOSTN hier zunächst nur frühzeitig auf mRNA-Ebene. Somit wäre ein längerer Beobachtungszeitraum von Interesse, um eventuelle Einflüsse auf die Proteinebene auch zu erfassen.

Die externe Applikation von TNC wurde bisher im Kontext der Leberregeneration und der Hepatozytendifferenzierung nicht untersucht. Tsai *et al.* konnten in ihren Versuchen mit mesenchymalen Stammzellen und Neuronen bereits zeigen, dass extern zugeführtes TNC eine Transdifferenzierung begünstigen kann (Tsai, 2014). Die Behandlung mit rcTNC scheint in den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten die De-differenzierungsfähigkeit für TNC-KO-Hepatozyten nicht zu verbessern. Einzig die ALB-Expression ist durch die rcTNC-Zugabe über den gesamten Versuchszeitraum verringert, ein statistisch signifikanter Unterschied wurde aber nicht gemessen. Die gesteigerte Expression von *Sox9* nach 72 Std. bzw. von SOX9 nach 48 Std. findet keine Entsprechung an den weiteren Versuchszeitpunkten und kann ebenfalls nicht als signifikant nachgewiesen werden, sodass hier insgesamt nicht von einem echten Effekt ausgegangen werden kann. Auch hier wurde, analog zum Versuchsaufbau in POSTN-KO-Hepatozyten, humanes rcTNC zu murinen TNC-KO-Hepatozyten appliziert. Wie bereits beschrieben, könnte dies aufgrund von Artspezifika eine eingeschränkte Wirksamkeit in den murinen Hepatozyten aufweisen. Das humane rcTNC ist *in vitro* sehr stabil und zeigte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe auch nach 120 Std. noch einen Effekt auf murine pankreatische Azinuszellen. Durch eine tägliche Behandlung mit dem rekombinanten Protein wurde keine Veränderung der Messwerte beobachtet (Kulenkampff, 2020). In Azinuszellen scheint somit kein ausbleibender Effekt aufgrund von Artspezifika zu bestehen. Auch eine verminderte Wirksamkeit aufgrund einer Metabolisierung des rcTNC lag nicht vor. Zu überprüfen bleibt, ob dies in murinen Hepatozyten zu replizieren ist, oder ob eine repetitive Gabe ein verändertes Differenzierungsverhalten bedingt.

### 4.3 DIE ROLLE DER EPIGENETISCHEN H2AK119UB

In unabhängigen Studien wurde gezeigt, dass sich das Epigenom von ruhenden, adulten Hepatozyten und Hepatozyten in der regenerierenden Leber eindrücklich unterscheidet. Diese beiden Zellpopulationen (ruhend und proliferierend) können epigenetisch u.a. durch differente Chromatin-Zustände unterschieden werden (Wang, 2019). Histonmodifikationen können die Genexpression durch Veränderung der Chromatinstruktur, respektive die Zugänglichkeit der DNS regulieren oder durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, indem sie die Bindung dieser begünstigen oder verhindern (Bannister und Kouzarides, 2011). Eine dieser epigenetischen Modifizierungen ist die H2Ak119Ub, die im Kontext der Leberregeneration eine bisher ungeklärte Funktion hat. Die H2Ak119Ub wurde in der vorliegenden Arbeit explorativ auf Basis von vielversprechenden Ergebnissen aus nicht publizierten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe untersucht, in der die H3k27me3, H3k27Ac, H3k4me3 als auch die H2Ak119Ub in WT-Hepatozyten nach 24 und 72 Std. Kultivierungszeitraum auf einem Kollagenmonolayer untersucht worden sind. Unter diesen Modifikationen zeigte die H2Ak119Ub den deutlichsten Regulationseffekt bzgl. der Genloci von *Afp*, *Alb* und *Sox9* (Toscano, 2018). Ob und inwiefern die externe Zugabe von FAKi (in WT-Hepatozyten) bzw. rcPOSTN und rcTNC (in KO-Hepatozyten) zu Unterschieden in der Ubiquitylierung des Histons 2A und der damit assoziierten Genregulation führt, war Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Geringfügige Unterschiede bzgl. der Genloci von *Alb*, *Epcam*, *Ncam* und *Sox9* in den hier erhobenen Daten zeigen, dass diese FAK-abhängig durch die H2Ak119Ub reguliert sein könnten. Nach der Behandlung mit rcPOSTN nimmt die Menge der qPCR-Produkte, der durch die H2Ak119Ub gebundenen Genlocus von *Ncam* ab, während diese von *Ck19* zunimmt. Nach der Zugabe von rcTNC zeigte sich bzgl. dem Genlocus von *Ck19* eine geringere Menge von qPCR-Produkten, bezüglich des *Alb*-Genlocus nimmt sie zu. Eine Korrelation der beobachteten Ergebnisse zu den mRNA- und Proteinexpressionsanalysen bringen keine verwertbaren Ergebnisse, weil sich entsprechend dieses Zeitpunktes kein Unterschied zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen ergibt. Die beobachteten Unterschiede verfehlen zudem einen signifikanten Nachweis, die Analysen zeigen mit 0,1-0,2 % des Inputs insgesamt sehr geringe Unterschiede. Der Einfluss weiterer epigenetischer Modifizierungen in einem hoch komplexen und schnell regulierten System ist sehr wahrscheinlich, die Genexpression ist in der Regel Folge kumulativer Einflüsse an einem Gen (Mann, 2014). Eine direkte Kausalität zwischen der epigenetischen Modifikation und der Expressionsanalyse ist auf Basis dessen nicht gegeben (Fischle, 2003). Es handelt sich also lediglich um beobachtete Tendenzen. Die Regulation könnte ebenso durch andere Histonmodifikationen oder durch weitere epigenetische Modifizierungen erfolgen. Hierzu zählen unter anderem die Methylierungen, Phosphorylierungen und Acetylierungen von Histonen sowie die direkte Methylierung im regulatorischen Bereich der DNS. Der Einfluss der H3k27me3 ist in der Leber wesentlich besser untersucht (Bae, 2015; Cao, 2004; Tian, 2015). So ist der Verlust der repressiven H3k27me3 mit einer schlechteren Leberregeneration assoziiert (Bae,

2015). Zwischen den verschiedenen Histonmodifikationen sind zudem Wechselwirkungen möglich. So begünstigt z.B. die Methylierung des H3k27 die H2Ak119Ub (Bannister und Kouzarides, 2011; Kimura, 2013). Dieser *cross talk* zwischen den Modifikationen kann sowohl kompetitive als auch synergistische Effekte bewirken (Fischle, 2003; Schwämmle, 2016; Zee, 2010). Wie von Cohen *et al.* beschrieben ist das Verständnis der komplexen Polycomb-Regulationen zum jetzigen Stand der Forschung zu wenig umfassend um eine eindeutige Aussage bezüglich der Auswirkungen der Histonmodifikationen auf die Expression treffen zu können (Cohen, 2020). Yue *et al.* zeigen, dass die Genexpressionsmuster in murinen und humanen Zellen deutlich unterschiedlich sind (Yue, 2014). Eine Übertragbarkeit der vorliegenden *in vitro* Ergebnisse mit murinen Hepatozyten auf den Organismus Mensch ist somit fraglich und bedarf weiterer Analysen. Epigenetische Modifizierungen, die sehr schnell reguliert und wenig konserviert sind, legen eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Spezies nahe.

#### 4.4 LIMITATIONEN DER ARBEIT

Eine deutliche Limitation dieser Arbeit ist die geringe Versuchsanzahl (n=3), was sicherlich die fehlende statistische Signifikanz der meisten Ergebnisse mitbedingt. Aufgrund des hohen Lebendzellbedarfs für die vollständige Versuchsreihe bestehend aus mRNA-, Protein- und ChIP-Analysen, konnte nur eine Histonmodifikation im ChIP-Assay untersucht werden. Epigenetische Regulationsprozesse sind aber sehr komplex und werden durch eine singuläre Modifikation nicht hinlänglich abgebildet. Auch hier sind die gemessenen Unterschiede nicht signifikant und bewegen sich mit 0,1-0,2 % des Inputs auf einem sehr basalen Niveau.

In Vorarbeiten wurde im Rahmen eines Pankreasprojektes humanes rcTNC zu murinen Azinuszellen gegeben, um den Einfluss auf den Differenzierungsstatus zu analysieren (Kulenkampff, 2020). Hier zeigte sich keine fehlende Wirksamkeit aufgrund von Artspezifika, dennoch ist eine Limitation durch die fehlende biologische Wirksamkeit eines humanen Proteins mit murinen Zellen denkbar.

In den vorliegenden Versuchen wurde lediglich das De-differenzierungsverhalten in einer zweidimensionalen Zellkultur untersucht. Die Leberregeneration ist jedoch ein komplexer Mechanismus in einem dreidimensionalen Organsystem, der von weiteren Faktoren bestimmt wird als der De-differenzierung der Hepatozyten. Dazu zählen zum Beispiel der Differenzierungsstatus von hepatischen Sternzellen, sowie immunologische Signalwege (Yin, 2013).

Zuletzt stellt der Zeitaspekt eine Limitation dar; die Versuche wurden über maximal 3 Tage durchgeführt. Untersuchungen im Zeitraum bis zu einer Woche wären künftig von Interesse. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass erst nach 3-7 Tagen eine signifikante Veränderung hin zu einem de-differenzierten Zustand detektierbar ist (Dunn, 1992).

## 4.5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die in der Literatur vorbeschriebene De-differenzierung von WT-Hepatozyten auf einem Kollagenmonolayer kann in dieser Arbeit in WT-Hepatozyten weitestgehend reproduziert werden. Die De-differenzierung scheint dabei partiell FAK-abhängig zu sein. Die FAKi-Behandlung verstärkt tendenziell die Assoziation zwischen den Genloci von *Alb* und *Sox9* und der H2Ak119Ub und verringert diese von *Epcam* und *Ncam*. Somit ist ein Einfluss des FAK/Src-Signalweges auf die Differenzierungsmechanismen in Hepatozyten möglich.

POSTN-KO-Hepatozyten de-differenzieren tendenziell verzögert auf einem Kollagenmonolayer im Vergleich zum WT. Durch die Behandlung mit rcPOSTN kann keine eindeutig verbesserte De-differenzierung gezeigt werden. Einzig *Afp* und *Sox9* geben Hinweise auf eine möglicherweise verbesserte De-differenzierung nach rcPOSTN-Behandlung. In den ChIP-Analysen ist kein eindeutiger Effekt zu beobachten.

TNC-KO-Hepatozyten de-differenzieren tendenziell verzögert im Vergleich zu WT-Hepatozyten. Ein nennenswerter Einfluss der Zugabe von rcTNC auf die Expressionsanalysen kann nicht nachgewiesen werden. Auch im ChIP-Assay kann kein eindeutiger Effekt gezeigt werden.

Die H2Ak119Ub, reguliert durch den PRC1, ist nur eine von vielen möglichen epigenetischen Modifizierungen, die gegenseitig miteinander wechselwirken. Deshalb wäre eine Untersuchung weiterer Modifizierungen in dem hier verwendeten Versuchsaufbau von Interesse. Epigenetische Modifizierungen können sehr schnell reguliert werden, deswegen wäre die Analyse weiterer Zeitpunkte sinnvoll.

In Zukunft müssen die oben beschriebenen Mechanismen in größeren Versuchsansätzen überprüft werden, um die statistische Signifikanz valider beurteilen zu können. Interessant wäre das Differenzierungsverhalten von KO-Hepatozyten in dreidimensionalen Kulturen zu untersuchen, um die EZM besser abbilden zu können. Es ist denkbar, dass die rekombinanten Proteine in einer solchen, dem *in vivo* Aufbau ähnlicheren, Konstellation eine andere Wirkung bedingen als auf einem Kollagenmonolayer. Effekte durch den Metabolismus der rekombinanten Proteine und des FAKi können in einem Versuchsaufbau mit repetitiver Zugabe ausgeschlossen werden.

## 5 ANHANG

### 5.1 LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, B., 2017. Hepatic Progenitor Cell Activation in Liver Repair. *Liver research* 1.2, 81-87.
- Adam, B., 2007. *Gastroenterologie: das Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Georg Thieme Verlag.
- Amenta und Harrison, 1997. Expression and potential role of the extracellular matrix in hepatic ontogenesis: A review. *Microscopy Research and Technique* 39, 372–386.
- Bachmann, M., 2020. Induction of ligand promiscuity of  $\alpha V\beta 3$  integrin by mechanical force. *Journal of Cell Science* 133 (9).
- Bae, W.K., 2015. The methyltransferases enhancer of zeste homolog (EZH) 1 and EZH2 control hepatocyte homeostasis and regeneration. *FASEB J* 29, 1653–1662.
- Bannister und Kouzarides, 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381–395.
- Bedossa und Paradis, 2003. Liver extracellular matrix in health and disease. *The Journal of Pathology* 200, 504–515.
- Benbow und Elam, 2018. Analysis of Plasma Tenascin-C in Post-HCV Cirrhosis: A Prospective Study. *Dig Dis Sci* 63, 653–664.
- Benitz, S., 2016. Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 monoubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 7, 11424–11433.
- Bhushan, B., 2016. Liver-Specific Deletion of Integrin-Linked Kinase in Mice Attenuates Hepatotoxicity and Improves Liver Regeneration After Acetaminophen Overdose. *Gene Expr* 17, 35–45.
- Bissell und Guzelian, 1980. Phenotypic Stability of Adult Rat Hepatocytes in Primary Monolayer Culture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 349, 85–98.
- Blachier, M., 2013. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology* 58, 593–608.
- Blaner, W.S., 2016. Vitamin A Absorption, Storage and Mobilization. *Subcell Biochem* 81, 95–125.
- Boer, C.J. de, 1999. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *The Journal of Pathology* 188, 201–206.
- Bourdon und Ruoslahti, 1989. Tenascin mediates cell attachment through an RGD-dependent receptor. *Journal of Cell Biology* 108, 1149–1155.
- Cao, Z., 2004. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, 155–164.
- Chao, J., 2020. Dedifferentiation of hepatocellular carcinoma: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Am J Transl Res* 12, 2099–2109.
- Chaudhari, P., 2016. Expression kinetics of hepatic progenitor markers in cellular models of human liver development recapitulating hepatocyte and biliary cell fate commitment. *Experimental Biology and Medicine* 241, 1653–1662.
- Chen, Y., 2012. Mature hepatocytes exhibit unexpected plasticity by direct dedifferentiation into liver progenitor cells in culture. *Hepatology* 55, 563–574.
- Cheng, T., 2012. Comparison of gene expression patterns in articular cartilage and dedifferentiated articular chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research* 30, 234–245.
- Chiquet-Ehrismann, R., 2004. Tenascins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 986–990.
- Cohen, I., 2020. Activity of PRC1 and histone H2AK119 monoubiquitination: Revising popular misconceptions. *Bioessays* 42, e1900192.
- Cordero-Espinoza und Huch, 2018. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *J Clin Invest* 128, 85–96.
- Cordes, C., 2007. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410–417.
- Couinaud, 1957. *Le foie: études anatomiques et chirurgicales*. Masson et Cie.
- Das, P.M., 2004. Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* 37, 961–969.

- Dudich, I., 1999. Isolation and structural and functional characterization of two stable peptic fragments of human alpha-fetoprotein. *Biochemistry* 38, 10406–10414.
- Dunn, J.C., 1992. Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. *The Journal of Cell Biology* 116, 1043–1053.
- El-Karef, A., 2007. Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immune-mediated chronic hepatitis in mice. *The Journal of Pathology* 211, 86–94.
- Fabris, L., 2000. Characterization and isolation of ductular cells coexpressing neural cell adhesion molecule and Bcl-2 from primary cholangiopathies and ductal plate malformations. *Am J Pathol* 156, 1599–1612.
- Fiebig und Boll, Hanne, 2012. Three-Dimensional In Vivo Imaging of the Murine Liver: A Micro-Computed Tomography-Based Anatomical Study. *PLOS ONE* 7, e31179.
- Fischle, W., 2003. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 17, 1870–1881.
- Font-Burgada, J., 2015. Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer. *Cell* 766–779.
- Francalanci, P., 2020. Focal Adhesion Kinase (FAK) Over-Expression and Prognostic Implication in Pediatric Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 21 (16): 5759.
- Frangini, A., 2013. The Aurora B Kinase and the Polycomb Protein Ring1B Combine to Regulate Active Promoters in Quiescent Lymphocytes. *Molecular Cell* 51, 647–661.
- Furuyama, K., 2011. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature Genetics* 43, 34–41.
- Ghurburrun, E., 2018. Liver and Pancreas: Do Similar Embryonic Development and Tissue Organization Lead to Similar Mechanisms of Tumorigenesis? *Gene Expr* 18, 149–155.
- Gibert-Ramos, A., 2021. The Hepatic Sinusoid in Chronic Liver Disease: The Optimal Milieu for Cancer. *Cancers* 13, 5719.
- Gilgenkrantz und Collin de l'Hortet, 2018. Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. *The American Journal of Pathology* 188, 1316–1327.
- Gkretsi, V., 2007. Integrin-linked kinase is involved in matrix-induced hepatocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 638–643.
- Gnani, D., 2017. Focal adhesion kinase depletion reduces human hepatocellular carcinoma growth by repressing enhancer of zeste homolog 2. *Cell Death & Differentiation* 24, 889–902.
- Godoy, P., 2009. Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor  $\beta$ -induced apoptosis. *Hepatology* 49, 2031–2043.
- Goh, F., 2010. Transcriptional Regulation of the Endogenous Danger Signal Tenascin-C: A Novel Autocrine Loop in Inflammation. *J Immunol* 184 (5), 2655–2662.
- González-Carmona, M.A., 2006. Patient-derived dendritic cells transduced with an  $\alpha$ -fetoprotein-encoding adenovirus and co-cultured with autologous cytokine-induced lymphocytes induce a specific and strong immune response against hepatocellular carcinoma cells. *Liver International* 26, 369–379.
- Greenhalgh, S.N., 2019. Loss of Integrin  $\alpha\beta 8$  in Murine Hepatocytes Accelerates Liver Regeneration. *Am J Pathol* 189, 258–271.
- Gruppuso, P., 2018. Stability of histone post-translational modifications in samples derived from liver tissue and primary hepatic cells. *PLoS One* 13, e0203351.
- Guan, J.L., 1991. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul* 2, 951–964.
- Han und Gong, 2020. Knockdown of POSTN Inhibits Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Patients With Steroid-Induced Osteonecrosis. *Front Cell Dev Biol* 8, 606289.
- Haruna, Y., 1996. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development *Hepatology*, 476–481.
- Hausmann, S., 2016. Loss of Periostin Results in Impaired Regeneration and Pancreatic Atrophy after Cerulein-Induced Pancreatitis. *The American Journal of Pathology* 186, 24–31.
- Higgins und Anderson, 1931. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 186–202.

- Hindley, C.J., 2016. Organoids from adult liver and pancreas: Stem cell biology and biomedical utility. *Developmental Biology* 251–261.
- Huang, Y., 2015. Matricellular Protein Periostin Contributes to Hepatic Inflammation and Fibrosis. *The American Journal of Pathology* 185, 786–797.
- Humphries, M.J., 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28, 311–339.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110, 673–687.
- Jensen, J.N., 2005. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128, 728–741.
- Jones and Jones, 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Developmental Dynamics* 218, 235–259.
- Jopling, C., 2011. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 79–89.
- Jungermann und Katz, 1989. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiological Reviews* 69, 708–764.
- Kamm, D.R., 2022. Hepatic Stellate Cells in Physiology and Pathology. *The Journal of physiology* 600, 1825.
- Kang, J., 2016. Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements. *Nature* 532, 201–206.
- Kho, L., 2013. Identification of dedifferentiation and redevelopment phases during postpneumonectomy lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305, L542–554.
- Kiernan und Green, 1833. The anatomy and physiology of the liver. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 123, 711–770.
- Kii, I., 2010. Incorporation of tenascin-C into the extracellular matrix by periostin underlies an extracellular meshwork architecture. *J. Biol. Chem.* 285, 2028–2039.
- Kimura, H., 2013. Histone modifications for human epigenome analysis. *J Hum Genet* 58, 439–445.
- Klaunig, J., 1981. Mouse Liver Cell Culture. *In Vitro* 17 (10), 926–934.
- Knittel, T., 1996. Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *The American Journal of Pathology* 149, 449–462.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 693–705.
- Kruepunga, N., 2019. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865, 869–878.
- Kudo, A., 2011. Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cell. Mol. Life Sci* 3201–3207.
- Kulenkampff, J., 2020. Funktionelle Rolle des extrazellulären Matrixmoleküls Tenascin C während der Regeneration des Pankreas. *Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.
- Kumar, P., 2018. Periostin promotes liver fibrogenesis by activating lysyl oxidase in hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 293(33), 12781–12792.
- Kundaje, A., 2015. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518, 317–330.
- Lautt und Greenway, Clive V., 1987. Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology* 7, 952–963.
- Leeuw, A.M.D., 1990. Sinusoidal endothelial cells of the liver: Fine structure and function in relation to age. *Journal of Electron Microscopy Technique* 14, 218–236.
- Leevy, C.M., 1959. Liver Regeneration in Experimental Carbon Tetrachloride Intoxication. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 102, 672–675.
- Li, J., 2011. Eight paths of ERK1/2 signalling pathway regulating hepatocyte proliferation in rat liver regeneration. *J Genet* 90, 435–442.
- Libbrecht, L., 2001. Expression of neural cell adhesion molecule in human liver development and in congenital and acquired liver diseases. *Histochem Cell Biol* 116, 233–239.
- Libbrecht und Roskams, Tania, 2002. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13, 389–396.
- Litvinov, S.V., 1994. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *The Journal of Cell Biology* 125, 437–446.
- Liu, F., 2011. Evolution of a physiological pH6.8 bicarbonate buffer system: Application to the dissolution testing of enteric coated products. *Elsevier Enhanced Reader* 78, 151–156.

- Liu, Y., 2016. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165, 535–550.
- Liu, Y., 2012. Animal models of chronic liver diseases. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 304, G449–G468.
- Ma, S.-M., 2015. Periostin Promotes Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation following Hypoxic-Ischemic Injury. *PLoS One* 10, e0123585.
- Mann, D.A., 2014. Epigenetics in liver disease. *Hepatology* 60, 1418–1425.
- Manns und Cieplik (Ed.), 2016. *Praxis der Hepatologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Martens, J.H.A., 2005. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J* 24, 800–812.
- Martins, P.N.A., 2008. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver International* 28, 3–11.
- Masuzaki, R., 2021. Integrin  $\beta$ 1 Establishes Liver Microstructure and Modulates Transforming Growth Factor  $\beta$  during Liver Development and Regeneration. *Am J Pathol* 191, 309–319.
- Michalopoulos, G.K., 2017. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 65, 1384–1392.
- Michalopoulos und DeFrances, 1997. Liver Regeneration. *Science* 276, 60–66.
- Midwood, K., 2016. Tenascin-C at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 4321–4327.
- Mitra, S.K., 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 56–68.
- Miyaoka und Miyajima, 2013. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Div* 8, 8.
- Mizejewski, G.J., 2001. Alpha-fetoprotein Structure and Function: Relevance to Isoforms, Epitopes, and Conformational Variants. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 377–408.
- Mohn, K.L., 1991. The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes. *Mol Cell Biol* 11, 381–390.
- Moman, R.N., 2021. Physiology, Albumin, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Mosher, D.F., 2015. Periostin and TGF- $\beta$ -induced protein: Two peas in a pod? *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 50, 427–439.
- Mulligan, M., 2006. International anatomical terminology. *Skeletal Radiol* 35, 717–718.
- Oka, T., 2007. Genetic Manipulation of Periostin Expression Reveals a Role in Cardiac Hypertrophy and Ventricular Remodeling. *Circulation Research* 101, 313–21.
- Okada und Suzuki, 2021. The Role of Tenascin-C in Tissue Injury and Repair After Stroke. *Frontiers in Immunology* 11.
- Orend und Chiquet-Ehresmann, 2000. Adhesion Modulation by Antiadhesive Molecules of the Extracellular Matrix. *Experimental Cell Research* 261, 104–110.
- Parsons, J.T., 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of Cell Science* 116, 1409–1416.
- Pekowska, A., 2011. H3K4 tri-methylation provides an epigenetic signature of active enhancers. *EMBO J* 30, 4198–4210.
- Peterson, P., 2004. Histones and histone modifications. *Current Biology* 14, R546–R551.
- Pickart und Eddins, 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, The Ubiquitin-Proteasome System* 1695, 55–72.
- Rappaport, A.M., 1973. The microcirculatory hepatic unit. *Microvascular Research* 6, 212–228.
- Reid und Jefferson, 1984. Culturing hepatocytes and other differentiated cells. *Hepatology* 4, 548–559.
- Roeb, E., 2022. Aktualisierte S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – April 2022 – AWMF-Registernummer: 021–025. *Z Gastroenterol* 60, 1346–1421.
- Roll und Faissner, 2019. Tenascins in CNS lesions. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Mammalian innate immunity to fungal infection* 89, 118–124.
- Ruijter, J.M., 2004. Stereological measurement of porto-central gradients in gene expression in mouse liver. *Hepatology* 39, 343–352.
- Saga, Y., 1992. Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev.* 6, 1821–1831.
- Sanz-García, C., 2021. The Space of Disse: The Liver Hub in Health and Disease. *Livers* 1, 3–26.

- Sawitzka, I., 2009. The niche of stellate cells within rat liver. *Hepatology* 50, 1617–1624.
- Schwämmle, V., 2016. Systems Level Analysis of Histone H3 Post-translational Modifications (PTMs) Reveals Features of PTM Crosstalk in Chromatin Regulation. *Molecular & Cellular Proteomics* 15, 2715–2729.
- Sell, S., 1998. Comparison of liver progenitor cells in human atypical ductular reactions with those seen in experimental models of liver injury. *Hepatology* 27, 317–331.
- Shang, N., 2016. FAK deletion accelerates liver regeneration after two-thirds partial hepatectomy. *Sci Rep* 6, 34316.
- Shen, C.N., 2003. Transdifferentiation of pancreas to liver. *Mech Dev* 120, 107–116.
- Shilatifard, A., 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75, 243–269.
- Shishido, S., 2014. Role of Integrin Alpha4 in Drug Resistance of Leukemia. *Front Oncol* 4, 99.
- Sirica, A., 2014. Periostin in Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Pathobiological Insights and Clinical Implications. *Exp Mol Pathol.* 97(3), 515–524.
- Smid, J.K., 2015. Periostin Induces Pancreatic Regeneration. *Endocrinology* 156, 824–836.
- statista Deutschland, 2024. Leberkrankheiten - Fallzahl in Deutschland bis 2022 [WWW Document]. Statista. URL <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/150960/umfrage/leberkrankheiten-in-deutschland-seit-2000/> (accessed 10.18.24).
- Sugiyama, A., 2016. Periostin promotes hepatic fibrosis in mice by modulating hepatic stellate cell activation via  $\alpha$ v integrin interaction. *J Gastroenterol* 51, 1161–1174.
- Sun, X., 2016. Suppression of the SWI/SNF Component Arid1a Promotes Mammalian Regeneration. *Cell Stem Cell* 18, 456–466.
- Takeshita, S., 1993. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J.* 294(Pt 1), 271–278.
- Taub, R., 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 836–847.
- Tian, W., 2015. Decoding liver injury: A regulatory role for histone modifications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 67, 188–193.
- Toscano, S., 2018. Einfluss der extrazellulären Matrixproteine Tenascin C und Periostin auf die Dedifferenzierung von primären Hepatozyten in vitro (Masterarbeit). Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Tsai, H.-L., 2014. Different Forms of Tenascin-C with Tenascin-R Regulate Neural Differentiation in Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A* 20, 1908–1921.
- Tsuchiya, A., 2014. Polysialic acid/neural cell adhesion molecule modulates the formation of ductular reactions in liver injury. *Hepatology* 60, 1727–1740.
- Van Eyken, P., 1988. The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. *Hepatology* 8, 1586–1595.
- Wagenaar, G.T.M., 1994. Vascular branching pattern and zonation of gene expression in the mammalian liver. A comparative study in rat, mouse, cynomolgus monkey, and pig. *The Anatomical Record* 239, 441–452.
- Wang, H., 2006. Histone H3 and H4 Ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 Ubiquitin Ligase Facilitates Cellular Response to DNA Damage. *Molecular Cell* 22, 383–394.
- Wang, S., 2019. Epigenetic Compensation Promotes Liver Regeneration. *Developmental Cell* 50, 43-56.e6.
- Wardle, E.N., 1987. Kupffer cells and their function. *Liver* 7, 63–75.
- Wight und Potter-Perigo, 2011. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G950–G955.
- Wisse, E., 1985. The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of disse. *Hepatology* 5, 683–692.
- Wu, T., 2018. Deficiency of periostin impairs liver regeneration in mice after partial hepatectomy. *Matrix Biology* 66, 81–92.
- Yang, L., 2008. Fate-Mapping Evidence That Hepatic Stellate Cells Are Epithelial Progenitors in Adult Mouse Livers. *Stem Cells.* 26(8), 2104–2113.

- Yin, C., 2013. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *Journal of clinical investigation* 123, 1902–1910.
- Yoon, S., 2011. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *53(3):964-73*.
- Yue, F., 2014. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* 515, 355–364.
- Zaret, K.S., 2008. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* 9, 329–340.
- Zee, B.M., 2010. In Vivo Residue-specific Histone Methylation Dynamics. *Journal of Biological Chemistry* 285, 3341–3350.
- Zhang, L., 2008. The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology* 48, 1598–1607.

## 5.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Glisson Trias und Lebersinusoid.....	- 1 -
Abbildung 2 Anatomie der Mausleber.....	- 3 -
Abbildung 3 FAK im Integrinsignalweg.....	- 10 -
Abbildung 4 Progenitormarker.....	- 11 -
Abbildung 5 ChIP-Assay .....	- 29 -
Abbildung 6 mRNA- und Proteinexpression von ALB und SOX9 in WT-Hepatozyten.....	- 32 -
Abbildung 7 Expression der Progenitorgene <i>Afp</i> , <i>Ck19</i> und <i>Epcam</i> in WT-Hepatozyten.....	- 33 -
Abbildung 8 mRNA- und Proteinexpression von ALB und SOX9 in Abhängigkeit der Behandlung mit einem FAKi.....	- 35 -
Abbildung 9 mRNA-Expression von <i>Afp</i> , <i>Ck19</i> und <i>Epcam</i> in WT-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit einem FAKi .....	- 36 -
Abbildung 10 Quantifizierung der H2Ak119Ub gebundenen <i>Alb</i> - und Progenitorgen-DNS in Abhängigkeit der Behandlung mit einem FAKi.....	- 37 -
Abbildung 11 ALB- und SOX9-mRNA- und Proteinexpression in POSTN-KO-Hepatozyten ..	- 38 -
Abbildung 12 Expression der Progenitorgene <i>Afp</i> , <i>Ck19</i> und <i>Epcam</i> in POSTN-KO-Hepatozyten ..	- 39 -
Abbildung 13 Vergleich der ALB- und SOX9-Proteinexpression in WT- und POSTN-KO-Hepatozyten.....	- 40 -
Abbildung 14 ALB- und SOX9-mRNA- und Proteinexpression in POSTN-KO-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit rcPOSTN.....	- 41 -
Abbildung 15 mRNA-Analyse von Progenitorgenen in POSTN-KO-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit rcPOSTN .....	- 42 -
Abbildung 16 Quantifizierung der H2Ak119Ub gebundenen <i>Alb</i> - und Progenitormarker-DNS in Abhängigkeit der Behandlung mit rcPOSTN in POSTN-KO-Hepatozyten .....	- 43 -
Abbildung 17 ALB- und SOX9-mRNA- und Proteinexpression in TNC-KO-Hepatozyten .....	- 44 -
Abbildung 18 Expression der Progenitorgene <i>Afp</i> , <i>Ck19</i> und <i>Epcam</i> in TNC-KO-Hepatozyten ..	- 45 -
Abbildung 19 Vergleich der ALB- und SOX9-Proteinexpression in WT- und TNC-KO-Hepatozyten .....	- 46 -
Abbildung 20 ALB- und SOX9-mRNA- und Proteinexpressionsanalysen in TNC-KO-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit rcTNC .....	- 48 -
Abbildung 21 mRNA-Expression der Progenitorgene <i>Afp</i> , <i>Ck19</i> und <i>Epcam</i> in TNC-KO-Hepatozyten in Abhängigkeit der Behandlung mit rcTNC .....	- 49 -
Abbildung 22 Quantifizierung der H2Ak119Ub gebundenen <i>Alb</i> - und Progenitormarker-DNS in Abhängigkeit der Behandlung mit rcTNC in TNC-KO-Hepatozyten.....	- 50 -

### 5.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Laborgeräte.....	- 16 -
Tabelle 2 Software .....	- 17 -
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien .....	- 17 -
Tabelle 4 Chemikalien .....	- 18 -
Tabelle 5 Kits .....	- 19 -
Tabelle 6 Transkriptionsstarts für Primer.....	- 19 -
Tabelle 7 Antikörper .....	- 20 -
Tabelle 8 SDS-Gele.....	- 21 -
Tabelle 9 Puffer und Lösungen .....	- 21 -
Tabelle 10 Medien für die Hepatozytenkultur .....	- 23 -
Tabelle 11 Rekombinante Proteine und FAK-Inhibitor.....	- 23 -
Tabelle 12 Reaktionsgemisch für die qPCR.....	- 26 -
Tabelle 13 Ablauf der qPCR .....	- 27 -

# Danksagung

Den Schluss dieser Arbeit möchte ich nutzen, um den wichtigsten Wegbegleiterinnen und Wegbegleitern zu danken:

Zunächst Frau Univ. Prof. Dr. med. Irene Esposito, deren Vorlesungen mein Interesse an der Pathologie geweckt haben und die das Thema, die materiellen Umstände und natürlich ihre Fachkompetenz für dieses Projekt zur Verfügung gestellt hat.

Frau Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino, für die fachliche Expertise und die Co-Betreuung meiner Promotion.

Herrn Dr. rer. nat. Matthias Wirth, der meine ersten kleinen Laborschritte begleitet hat und insbesondere Dr. rer. nat. Friederike Opitz, die seine Position als Laborleitung übernommen und sich so engagiert in meine Doktorarbeit eingedacht und eingebracht hat.

Herrn Dr. rer. nat. Martin Schlenso für seine Einarbeitung und seine ausführliche, und konstruktive Kritik, die mich im Schreibprozess vorangebracht hat.

„Meinen Labormädels“ Kati, Caro und Marie, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Dem Team des Patholabors für die praktische Einarbeitung im Labor. Insbesondere Olga für die tatkräftige Unterstützung bei der Hepatozytenisolation.

Vanessa Herbertz und der AG Cordes, die für die Etablierung der Versuche zu Beginn ihr Inventar und ihre Räumlichkeiten, sowie ihr praktisches Wissen zur Verfügung gestellt haben.

Letztlich allen voran danke ich meiner liebevollen Familie und meinem wunderbaren Freundeskreis für die Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke für Eure Liebe und Wärme.