

**Hepatische NF- $\kappa$ B-Dysregulation induziert  
systemische Autoimmunität und  
Multiorganversagen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Leonie Sophia Keysberg**  
aus Dortmund

Düsseldorf, Oktober 2025

aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Professor Dr. Tom Lüdde

2. Professor Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2026

## **Zusammenfassung**

Die Leberhomöostase wird durch ein empfindliches Zusammenspiel verschiedener Signalwege reguliert und aufrechterhalten. Einer dieser Signalwege ist der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg, der für seine zentrale Rolle in der Entzündungsregulation, der Kontrolle des Zelltods und der Karzinogenese bekannt und vielfach beschrieben ist. Im Gegensatz dazu sind die Mechanismen und Auswirkungen des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs in der Leber bislang nur unzureichend aufgeschlüsselt. Erste Studien zeigen jedoch, dass bei diversen humanen Lebererkrankungen eine Hyperaktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs vorliegt. Um die spezifischen Effekte beider Signalwege sowie ihre potenziellen Interaktionen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit gentechnisch veränderte Mausmodelle generiert. Diese Modelle ermöglichen eine gezielte Hyperaktivierung des kanonischen-, des nicht-kanonischen und beider Signalwege parallel in Leberparenchymzellen.

Während die singuläre Aktivierung einer der beiden NF- $\kappa$ B-Signalwege, nur geringe Auswirkungen auf den Leberphänotyp zeigen, führt die gleichzeitige Überaktivierung beider Signalwege zu einer starken Beeinträchtigung der Leberhomöostase. Bereits in jungem Alter treten ausgeprägte biliäre Veränderungen auf, die zu einer Dedifferenzierung der Hepatozyten und einen progressiven Verlust essenzieller Leberfunktionen zur Folge haben. Diese pathologischen Veränderungen gehen mit Entzündungs- und Fibroseprozessen einher, die letztlich zu einer Zirrhose und einem Multiorganversagen führen, bei dem eine Beeinträchtigung von Lungen- und Nierenfunktion festzustellen sind. Ebenfalls davon betroffen ist die Thymusfunktion, wodurch sich eine regulierte Autoimmunreaktion ergibt, die auf eine Organ-übergreifende Wirkung von Zytokinen aus der Leber hindeutet und belegt, dass Leber-spezifische Signalwegveränderungen autoimmune Prozesse im gesamten Organismus fördern können.

Die Daten verdeutlichen, dass die kombinierte Überaktivierung von kanonischem und nicht-kanonischem NF- $\kappa$ B-Signalweg die immunologische Selbstregulation durchbrechen und entzündliche Prozesse verstärken, die letztlich zur Leberzirrhose und einem Multiorganversagen führen. Diese Erkenntnisse liefern nicht nur ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen, sondern eröffnen auch neue Perspektiven für die Identifikation zentraler Treiber der Krankheitsprogression.

## Summary

Various processes control the delicate balance of liver homeostasis which defend the liver from disease. The canonical NF- $\kappa$ B pathway as one of it is known and already described to regulate inflammation, cell death and carcinogenesis. In contrast, the impact of the non-canonical NF- $\kappa$ B-pathway remain incompletely understood. However, hyperactivation of the non-canonical NF- $\kappa$ B-pathway has been identified in several human inflammatory liver diseases.

To further investigate the specific effects of both pathways and their interactions, genetically modified mouse models have been developed. These models allow targeted hyperactivation of the canonical, non-canonical and both signaling pathways in parallel in liver parenchymal cells. While singular activation of one the two NF- $\kappa$ B pathways show only minor effects on the liver phenotype, the simultaneous hyperactivation of both pathways leads to a severe impairment of liver homeostasis. Even at a young age, pronounced biliary changes occur, leading to dedifferentiation of hepatocytes and progressive loss of essential liver functions later on. These pathological changes are associated with inflammatory and fibrotic processes that ultimately lead to cirrhosis and multiorgan failure, with impaired lung and kidney function. Thymus function is also affected, resulting in a regulated autoimmune response, indicating a cross-organ effect of liver-derived cytokines and demonstrating that liver-specific pathway alterations can promote autoimmune processes throughout the organism.

The data indicate that the combined overactivation of canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathways disrupts immunological self-regulation and amplifies inflammatory processes, ultimately leading to liver cirrhosis and multi-organ failure. These insights not only provide a deeper understanding of the underlying mechanisms but also open up new perspectives for identifying key drivers of disease progression and developing novel therapeutic targets.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Die Leber</i>	1
1.1.1	Histologie der Leber	1
1.1.2	Gallenwegs-assoziierte Lebererkrankungen	3
1.1.3	Portale Hypertension als Folge dekompenzierter Leberzirrhose	4
1.1.4	Funktionen des Immunsystems und Bedeutung in der Leber	6
1.1.5	Autoimmunerkrankungen der Leber	7
1.2	<i>Zelltodformen und Signalwege in der Leber</i>	8
1.3	<i>Funktion und Bedeutung der NF-<math>\kappa</math>B-Signalwege in der Leber</i>	10
1.3.1	Kanonische und nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalwegaktivierung	11
1.3.2	Bedeutung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in der Pathogenese chronischer Lebererkrankungen	13
1.4	<i>Zielsetzung</i>	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	<i>Arbeitsgeräte</i>	16
2.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	17
2.3	<i>Mauslinien</i>	17
2.3.2	Cre- <i>loxP</i> System	18
2.3.3	Ikk2 <sup>LPC-ca</sup> Maus	19
2.3.4	Traf3 <sup>LPC-KO</sup> Maus	19
2.3.5	Caspase8 <sup>LPC-KO</sup> Maus	20
2.3.6	MLKL <sup>LPC-KO</sup> Maus	20
2.3.7	NF- $\kappa$ B2 <sup>LPC-KO</sup> Maus	21
2.3.8	Benennung und Abkürzungen der Mausmodelle	21
2.4	<i>Software und Internetseiten</i>	22
2.5	<i>Genotypisierung der Mauslinien mittels PCR</i>	23
2.6	<i>Analyse des murinen Serums</i>	25
2.7	<i>Bestimmung der Ammoniak-Konzentration in Vollblut</i>	25
2.8	<i>Blutgasanalyse</i>	26
2.9	<i>Messung der spontanen körperlichen Aktivität</i>	26
2.10	<i>Organeinbettung in Paraffin und Herstellung von Gewebeschnitten</i>	26
2.11	<i>Hämatoxylin/Eosin (H/E) und Sirius Red-Färbung</i>	27
2.12	<i>Immunhistochemische (IHC) Färbung und Auswertung</i>	27
2.13	<i>TUNEL-Färbung (engl.: terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)</i>	29
2.14	<i>Gesamtproteinisolation aus Gewebe und Zellpellets mit Quantifizierung nach Bradford</i>	29
2.15	<i>Western Blot</i>	30
2.16	<i>Kernproteinisolation aus Gewebe und Zellpellets</i>	34
2.17	<i>mRNA-Isolation und cDNA-Synthese aus Gewebe und Zellpellets</i>	35
2.18	<i>Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)</i>	35
2.19	<i>Primäre Hepatozyten-Isolation mit anschließender TNF-Stimulation</i>	36
2.20	<i>Immunfluoreszenz-Färbung von Hepatozyten</i>	38
2.21	<i>Zwei-Photonen-Mikroskopie</i>	39
2.22	<i>ANA-Autoantikörper-Kit</i>	40
2.23	<i>Immunfluoreszenz-Färbung von Autoantikörpern auf Gewebe von Rag1-defizienten Mäusen</i>	41

2.24	<i>Isolation von IBDU der Maus zur Kultivierung von Mauscholanziozyten (NMC)</i>	42
2.25	<i>Passagieren und Einfrieren primärer Mauscholanziozyten (NMC)</i>	44
2.26	<i>Statistik</i>	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	<i>Die kombinierte Aktivierung beider NF-<math>\kappa</math>B-Signalwege in LPC ist mit einer Remodellierung der Leberarchitektur und früher Mortalität assoziiert</i>	47
3.2	<i>Untersuchung des hepatischen Zelltods nach Überaktivierung der NF-<math>\kappa</math>B-Signalwege</i>	52
3.3	<i>Simultane Aktivierung der NF-<math>\kappa</math>B-Signalwege führt zu intensivem Inflammationsgeschehen in der Leber</i>	55
3.4	<i>LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse entwickeln eine hepatische Fibrose mit Hepatozytenverlust bei gleichzeitiger Cholangiozytenexpansion</i>	58
3.5	<i>Beeinträchtigung der Hepatozyten- und Leberfunktion in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen</i>	62
3.6	<i>Beeinträchtigung der Nieren- und Lungenfunktion in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen</i>	68
3.7	<i>Entwicklung einer Autoimmunerkrankung durch Defekt der Antikörper-Ausreifung in den mTECs des Thymus</i>	73
3.8	<i>Zusätzliche Deletion von NF-<math>\kappa</math>B2 beeinträchtigt kaum die Ausprägung des Phänotyps der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse</i>	79
3.9	<i>RelB-Kernlokalisierung erfolgt unabhängig von NF-<math>\kappa</math>B2</i>	82
3.10	<i>Autoimmunes Geschehen und Schädigung weiterer Organe in LPC<sup>C+NC</sup><math>\Delta</math>NF<math>\kappa</math>B2-Tieren</i>	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
4.1	<i>Überaktivierung beider NF-<math>\kappa</math>B-Signalwege in LPC führt zu Multiorganversagen</i>	88
4.2	<i>Genetische Konstellation der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse inhibiert den Zelltod</i>	94
4.3	<i>Wechselseitige Interaktionen von Immunantwort und Leberstruktur</i>	97
4.4	<i>Auswirkungen des Ungleichgewichts im Vorhandensein der NF-<math>\kappa</math>B-Untereinheiten</i>	102
4.5	<i>Fazit und Ausblick</i>	104
<b>5</b>	<b>Referenzen</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>123</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>124</b>

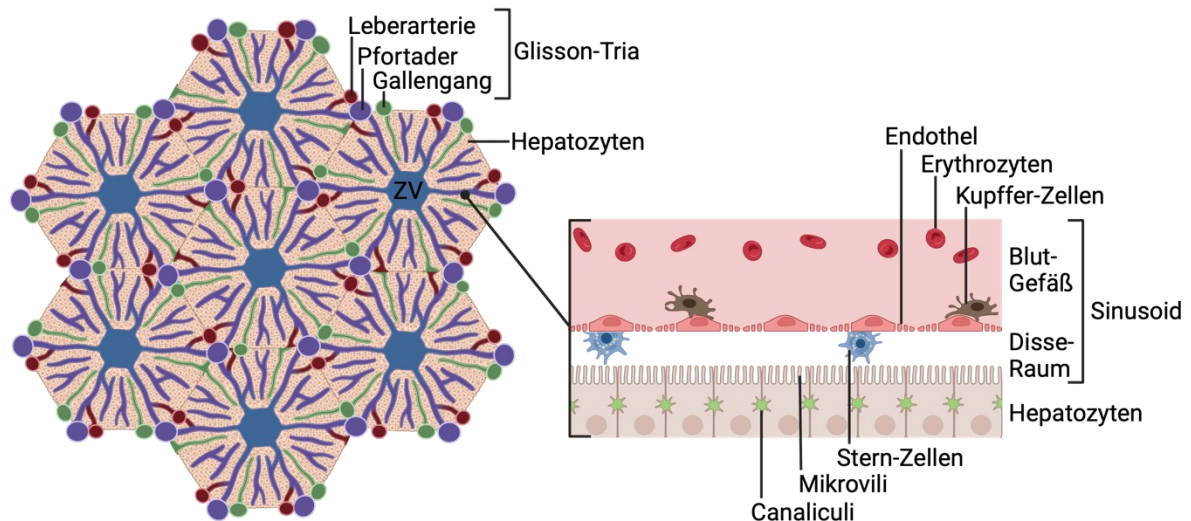
# 1 Einleitung

## 1.1 Die Leber

Die Leber ist das größte parenchymatöse Organ und zeichnet sich im Vergleich zu anderen Organen durch ihre Fähigkeit aus, verlorenes Parenchym zu regenerieren. Sie nimmt durch vielfältige Aufgaben eine essenzielle Rolle im Organismus ein. Unter anderem verrichtet sie eine entscheidende Funktion innerhalb des Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsels. Nährstoffe, die im Darm aufgenommen und in die Blutbahn abgegeben wurden, gelangen über die Pfortader zur Leber und werden hier verwertet, weitersynthetisiert oder in anderer Form gespeichert (Koop 2013). Als Galleproduzent gilt die Leber zudem als exokrine Drüse. Hauptbestandteil der Gallenflüssigkeit sind die Gallensäuren, die im Darm Fette emulgieren und so ihre Resorption ermöglichen. Mit der Galle werden aber auch zahlreiche Stoffe, wie Cholesterin oder Bilirubin als Abbauprodukt abgestorbener roter Blutkörperchen, ausgeschieden. Neben der Galle produziert die Leber außerdem auch zahlreiche Blutbestandteile, wie unter anderem Albumin, Gerinnungsfaktoren und Lipoproteine (Schünke 2024). Durch den direkten Austausch mit dem venösen Blut aus dem Darm gelangen mit den Nährstoffen auch körperfremde Stoffe und Gifte mit in die Leber. Diese werden in der Leber biotransformiert und deren Metaboliten zum Teil über die Galle ausgeschieden. Somit ist die Leber an der Entgiftung als auch an der Ausscheidung körperfremder und körpereigener Abfallprodukte beteiligt (Lüllmann-Rauch 2012). Darüber hinaus ist sie an der Synthese, Biotransformation und Inaktivierung von Hormonen beteiligt und übernimmt so auch eine wichtige endokrine Funktion (Koop 2013).

### 1.1.1 Histologie der Leber

Das Parenchym der Leber ist in hexagonale Leberläppchen unterteilt. In jedem Läppchen sind die Hepatozyten balkenartig angeordnet und verlaufen in Richtung der zentral gelegenen Vene (ZV = Zentralvene). Zwischen den Hepatozyten befinden sich die Lebersinusoiden. An den Stellen, an denen mehrere Läppchen aneinandergrenzen (periportale Felder) befinden sich sogenannte Glisson-Trias, jeweils bestehend aus einem Ast der Pfortader, einer Leberarterie und einem Gallengang (Abbildung 1). Auch Lymphgefäße sind in den periportalen Feldern zu finden (Messmann 2012).



**Abbildung 1: Übersichtsdarstellung des histologischen Aufbaus von Leberparenchym-Gewebe.** Das Leberparenchym ist in hexagonale Läppchen unterteilt, in denen die Hepatozyten balkenartig zur Zentralvene hin angeordnet sind. Dazwischen verlaufen die Lebersinusoiden. An den Rändern der Läppchen befinden sich periportale Felder mit den Glisson-Trias, bestehend aus Pfortader, Leberarterie und Gallengang. In der Vergrößerung wird der Disse-Raum zwischen Hepatozyten und Sinusoiden erkennbar, der den Stoffaustausch über die Mikrovilli ermöglicht. Die Canaliculi, die sich zwischen den Hepatozyten bilden, leiten die Galle in die Gallengänge. Die Sinusoide enthalten außerdem Endothelzellen, Kupffer-Zellen (Makrophagen) und Leber-Sternzellen. Modifiziert nach (Lüllmann-Rauch 2012).

Zwischen den Hepatozyten und dem Endothel der Sinusoide befindet sich der sogenannte Disse-Raum (Vergrößerung in Abbildung 1). Während des Blutdurchflusses durch die Sinusoide erfolgt hier der Stoffaustausch mit den Hepatozyten (Lüllmann-Rauch 2012).

In der Wand der Sinusoide kommen drei Zelltypen vor: Endothelzellen, Kupffer-Zellen und Leber-Sternzellen. Die Endothelzellen bilden das porenhaltige, durchlässige Endothel zwischen Disse-Raum und Sinusoidalraum. An der lumenseitigen Oberfläche des Endothels sitzen die Kupffer-Zellen, die als leberspezifische Makrophagen durch Phagozytose Fremdpartikel, Bakterien und alte Blutzellen entfernen. Im Disse-Raum befinden sich vereinzelt Leber-Sternzellen, die, als Speicherort für resorbiertes Vitamin A, große Lipidtropfen enthalten. Sie sind zudem an der Produktion von Bindegewebsfasern beteiligt und spielen bei der Entstehung einer Leberzirrhose eine pathologische Rolle (Lüllmann-Rauch 2012).

An den Grenzflächen der Hepatozyten bilden diese zwischen sich Gallenkanälchen, durch die die von den Hepatozyten sezernierte Galle entgegen der Blutströmung in Richtung des Periportalfeldes fließt und dort in die Gallengänge mündet. Die Gallenkanälchen besitzen keine eigene Wand, sondern werden durch die Zellmembranen benachbarter Hepatozyten gebildet. Von dort fließt die Galle durch ein Netzwerk von Gallengängen unterschiedlicher Größe (Koop 2013). Die Cholangiozyten, die die Gallengänge auskleiden, spielen eine zentrale Rolle in der

Modifikation der Galle. Sie verändern deren Zusammensetzung, bilden eine Barriere gegen schädliche Moleküle und Mikroorganismen und unterstützen die Immunabwehr. Über ihre basolaterale Membran haben sie Zugang zum Immunsystem und dem Blutkreislauf. Damit tragen Cholangiozyten wesentlich zur Aufrechterhaltung der Leberfunktion bei, obwohl sie nur einen geringen Anteil der Leberzellen ausmachen. Eine Schädigung dieser Zellen kann schwerwiegende Folgen für den Gallenfluss haben und zu einer Beeinträchtigung der Leberfunktion führen (Banales et al. 2019).

### 1.1.2 Gallenwegs-assoziierte Lebererkrankungen

Gallenwegsassozierte Lebererkrankungen, zu denen die primär biliäre Cholangitis (PBC), die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und medikamenteninduzierte Cholestasen gezählt werden, zeichnen sich durch Störungen oder den Stillstand des Gallenflusses aus. Diese beeinträchtigte Gallensekretion führt zur Aktivierung von Cholangiozyten, welche im Folgenden eine zentrale Rolle in der sogenannten duktilären Reaktion spielen. Aktivierte Cholangiozyten proliferieren vermehrt und setzen pro-fibrotische sowie pro-inflammatorische Signale frei. Diese Signale fördern die Interaktion mit Immunzellen, vaskulären Zellen und Mesenchymzellen, was eine chronische Entzündung aufrechterhält. Die anhaltende Cholestase infolge von Obstruktionen oder Entzündung begünstigt die Entwicklung einer Fibrose, die bei chronischem Verlauf in eine Zirrhose übergehen kann. Die übermäßige Proliferation von Cholangiozyten trägt nicht nur zur Progression der Lebererkrankungen bei, sondern erhöht auch das Risiko für die Entwicklung cholangiozelluläre Karzinome (CCC) (Banales et al. 2019).

Ein häufiges klinisches Symptom cholestatischer Lebererkrankungen ist der Ikterus, der auf einer erhöhten Bilirubinkonzentration im Blut beruht. Intrahepatische und posthepatische Ursachen einer Cholestase führen häufig zur Retention von gallepflichtigen Substanzen, wie Bilirubin, und tragen so wesentlich zur Entwicklung eines Ikterus bei. Bei intrahepatischen Störungen, die häufig durch Gallengangspathologien wie bei der PBC oder PSC bedingt sind, können geschädigte Hepatozyten oder verschlossene Gallengänge das Bilirubin nicht effizient in die Gallenwege abgeben (Heinzeller 2001). Posthepatisch hingegen führen mechanische Obstruktionen, etwa durch Gallensteine oder Tumore zu einem Rückstau des konjugierten Bilirubins in die Leber und letztlich ins Blut (Lüllmann-Rauch 2012).

Neben den sichtbaren Symptomen wie Ikterus führt die chronische Cholestase zu schwerwiegenden strukturellen Veränderungen, wie der Entwicklung einer Fibrose. Mit der

Zeit kann eine fortschreitende Fibrose in eine Leberzirrhose übergehen, die das irreversible Endstadium vieler chronischer Lebererkrankungen darstellt (Rosien 2021). Chronische Entzündungsprozesse führen zur Aktivierung von Kupffer-Zellen, die Zytokine freisetzen und dadurch die Leber-Sternzellen stimulieren. Die aktivierten Sternzellen transdifferenzieren in Myofibroblasten, die Kollagenfibrillen bilden und so die Leber verhärten (Lüllmann-Rauch 2012). Durch die Bindegewebsvermehrung geht die typische Läppchenstruktur der Leber zunehmend verloren. Dies beeinträchtigt den Blutfluss und führt zu einem Rückstau in die Pfortader, was die Funktion der verbleibenden Hepatozyten weiter einschränkt. Zu den klinischen Folgen gehören Gerinnungsstörungen, Ikterus und die unzureichende Entgiftung von Ammoniak und anderen Schadstoffen (Heinzeller 2001). Im Gegensatz zur Zirrhose bleibt bei der Leberfibrose die Läppchenstruktur erhalten, obwohl es auch hier zu einer Vermehrung von Bindegewebe kommt (Schaps 2007).

### 1.1.3 Portale Hypertension als Folge dekomensierter Leberzirrhose

Die Leberzirrhose und die Abnahme der Leberfunktion haben vielfältige Auswirkungen auf den Körper und können zahlreiche Folgeerkrankungen hervorrufen. Durch die erhöhte Produktion extrazellulärer Matrix und Fibrose im Disse-Raum, wird der Blutfluss beeinträchtigt und der sinusoidale Druck erhöht. Mit der Erhöhung des intrahepatischen Gefäßtonus und durch strukturelle Veränderungen bedingt ein erhöhter Widerstand in der Leber die Entstehung einer portalen Hypertension. Dies bezeichnet das pathophysiologische Geschehen, wenn der Druckgradient zwischen Pfortader und Lebervenen steigt (Blum 2018). Als Folge der portalen Hypertension kann es zur Bildung eines portosystemischen Kollateralkreislaufs kommen. Dabei fließt das Blut über alternative Gefäßwege wie Ösophagus- und Magenfundusvarizen ab, was zu lebensgefährlichen Varizenblutungen führen kann. Weitere Folgen der portalen Hypertension sind Splenomegalie, Aszites (Flüssigkeitsansammlung im Bauch), hepatische Enzephalopathie und das hepatorenale, sowie das hepatopulmonale Syndrom.

Das hepatorenale Syndrom ist ein funktionelles Nierenversagen, das auf Grundlage einer portalen Hypertension durch Leberfunktionseinschränkung und ohne primäre Nierenerkrankung auftritt. Durch die portale Hypertension kommt es zu einer vermehrten Bildung vasodilatatorischer Substanzen was eine Vasodilatation der gastrointestinalen Gefäßmuskulatur bewirkt. Dies führt zu einer Umverteilung des Blutvolumens und zu einer verminderten Füllung des systemischen arteriellen Kreislaufs, was als arterielles Underfilling

bezeichnet wird. In Reaktion darauf werden vasokonstriktorische Mechanismen wie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), der Sympathikus und Vasopressin aktiviert. Diese Mechanismen führen zu einer Vasokonstriktion in den Nieren, insbesondere in der Nierenrinde, wodurch die glomeruläre Filtrationsrate stark reduziert wird. In frühen Phasen wird die Nierendurchblutung durch Prostaglandine aufrechterhalten, aber im Verlauf überwiegt die Vasokonstriktion. Das hepatorenale Syndrom ist nach einer Lebertransplantation häufig reversibel, was den funktionellen Charakter unterstreicht (Velez, Latt, and Rodby 2024).

Die Abnahme der Leberfunktion kann auch zu einer hepatischen Enzephalopathie (HE) führen. Dabei handelt es sich um eine reversible Funktionsstörung des Zentralnervensystems, die mit neuropsychiatrischen Symptomen verbunden ist. Ein wesentlicher Faktor hierbei ist der Anstieg von Ammoniak, das durch die geschädigte Leber nicht mehr ausreichend entgiftet werden kann. Der im Körper durch den Abbau von Proteinen und Aminosäuren anfallende Ammoniak wird in der gesunden Leber über den Harnstoffzyklus und die Glutaminsynthetase abgebaut und entgiftet. Eine erhöhte Ammoniakkonzentration, bedingt durch einen eingeschränkten Ammoniak-Abbau infolge einer Leberschädigung assoziierten Dysfunktion, kann im Rahmen einer hepatischen Enzephalopathie zur Schädigung des Gehirns führen (Zhou, 2020). In fortgeschrittenen Stadien treten charakteristische Veränderungen der Astrozyten auf, die als Alzheimer-Typ-II-Astrozytose bezeichnet werden.

Die Leberzirrhose kann auch pulmonale Komplikationen hervorrufen, wobei der hepatische Hydrothorax am häufigsten auftritt. Hierbei gelangt in dem Abdomen angesammelte Flüssigkeit durch Defekte im Zwerchfell in den Pleuraraum, was zu einer Kompression der Lunge führt und die Atmung erheblich beeinträchtigt ('Pulmonary Complications of Cirrhosis' 2015). Weniger häufige und weniger gut verstandene Komplikationen sind die pulmonale Hypertension und das hepatopulmonale Syndrom. Während beim hepatopulmonalen Syndrom eine Vasodilatation der Lungenkapillaren und eine gestörte Sauerstoffaufnahme durch verkürzte Blutverweildauer und verschlechterte Gasdifffusion auftreten (Bansal, Gore, and Mittal 2024), ist die portopulmonale Hypertension durch strukturelle Veränderungen der Lungenarterien und Vasokonstriktion infolge portosystemischer Shunts und hormoneller Dysregulation gekennzeichnet (Jasso-Baltazar et al. 2023).

Die im Rahmen der Leberzirrhose entstehende portale Hypertension beeinträchtigt also mehrere weitere Organsysteme, was zu teilweise lebensbedrohlichen Komplikationen wie Blutungen, Nierenversagen, Lungenerkrankungen und Hirnfunktionsstörungen führen kann, deren Fortschreiten durch eine Entzündungsreaktion weiter begünstigt wird (Herrero, Sanchez, and Lorente 2018; Velez, Latt, and Rodby 2024).

#### 1.1.4 Funktionen des Immunsystems und Bedeutung in der Leber

Die Leber nimmt eine zentrale Rolle als Immunbarriere ein, indem sie eine Vielzahl phagozytischer Zellen, unter anderem residente Kupffer-Zellen, beherbergt. Diese Zellen schützen den Organismus, indem sie pathogene und körpereigene Antigene abfangen, die aus dem Darm in das Blut gelangen (Stamataki and Swadling 2020). Das Immunsystem gewährleistet dabei die Immunität, was die Fähigkeit des Organismus zur Erkennung und Eliminierung von Fremdkörpern, wie eingedrungener Mikroorganismen oder verändertem fremden oder eigenen Gewebe, bezeichnet (Hofmann 2006). Die Interaktion zwischen der Leber und dem Immunsystem spielt eine grundlegende Rolle beim Voranschreiten vieler Lebererkrankungen (Dufour 2005).

Grundsätzlich wird die Abwehrreaktion des Menschen in eine angeborene und eine adaptive Immunantwort unterteilt. Das angeborene Immunsystem ist eine schnelle, generelle Reaktion auf Pathogene. Es besteht aus phagozytierenden Zellen und löslichen Effektormolekülen und bleibt lebenslang unverändert. Im Gegensatz dazu reagiert das adaptive Immunsystem mit hoher Spezifität und Gedächtnisfunktion. Sie basiert auf Lymphozyten, die Rezeptoren tragen, um spezifisch zwischen den Erregern unterscheiden zu können. Durch ihre Aktivierung werden unter anderem Antikörper und Zytokine freigesetzt, die als wichtige lösliche Moleküle des adaptiven Immunsystems fungieren. Für die Antikörperbildung müssen B-Lymphozyten, T-Helferzellen und antigenpräsentierende Zellen zusammentreffen, was in peripheren lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten und der Milz erfolgt (Martin 2009).

Die T-Lymphozyten entstehen unter strenger Kontrolle im Thymus. Aus wenigen Vorläuferzellen entwickeln sich hier viele naive T-Zellen, die Antigenrezeptoren erwerben. In der positiven Selektion überleben nur T-Zellen mit funktionsfähigen Antigen-Rezeptoren. Bei der negativen Selektion werden T-Zellen eliminiert, die körpereigene Antigene zu stark binden, um Autoimmunreaktionen zu verhindern, bei denen in erster Linie Antikörper und T-Helferzellen mit körpereigenen Strukturen reagieren (Martin 2009).

Neben der hauptsächlich nicht-immunologischen Stoffwechsel- und Entgiftungsfunktion, ist die Leber auch an komplexen immunologischen Aktivitäten beteiligt. Für normale Stoffwechselfunktionen und den Gewebeumbau ist eine kontrollierte Inflammation erforderlich. Zudem entwickelt die Leber aufgrund der ständigen Exposition gegenüber Nahrungsmitteln und mikrobiellen Produkten eine komplexe Mikroumgebung, in der das Immunsystem harmlose Moleküle toleriert, gleichzeitig aber empfindlich auf Krankheitserreger, bösartige Zellen oder Gewebeschäden reagiert. Eine angemessene

Immunantwort erfordert Mechanismen, die die Entzündung beenden und die Leberhomöostase aufrechterhalten (Dufour 2005).

### 1.1.5 Autoimmunerkrankungen der Leber

Bei den autoimmunologischen Lebererkrankungen kommt es zu einer Fehlregulation des Immunsystems, bei denen körpereigene Strukturen der Leber oder der Gallenwege angegriffen werden. Zu ihnen zählen die Autoimmunhepatitis (AIH) und die primär biliäre Cholangitis (PBC). Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist per Definition zwar keine klassische Autoimmunerkrankung, wird als eine autoimmunassoziierte Erkrankung angesehen und daher häufig in dem Zusammenhang genannt (Terziroli Beretta-Piccoli, Vergani, and Mieli-Vergani 2018; Sarcognato et al. 2021).

Die AIH ist eine seltene, chronische Entzündung der Leber, bei der T-Lymphozyten die Hepatozyten angreifen, was zu erhöhten Leberwerten und Zirrhose führen kann. Ursache ist meist ein Toleranzverlust gegenüber Leberzellen, oft in Kombination mit genetischer Veranlagung und Umweltfaktoren. Betroffene, vor allem Frauen, weisen oft erhöhte IgG-Spiegel und andere Autoimmunerkrankungen auf (Göke 2007; Muratori, Lohse, and Lenzi 2023).

Die PBC ist eine Autoimmunerkrankung, bei der es T-Zell-vermittelt zum fortschreitenden Untergang der kleinen intrahepatischen Gallengänge kommt (Rosien 2021). Im frühen Stadium zeigen sich Immun- und Plasmazellinfiltrate um die Cholangiozyten, gefolgt von einer Proliferation der Gallengänge und der Bildung von Pseudogallengängen. Später entwickelt sich eine ausgeprägte Fibrose, die zur Leberzirrhose führt (Koop 2013). Obwohl die exakte Ätiologie der PBC noch unklar ist, wird angenommen, dass die Zerstörung der Gallengänge durch das Immunsystem vermittelt wird (Messmann 2012). Ein diagnostisches Merkmal, das als PBC spezifisch gilt, ist das Vorhandensein antimitochondrialer Antikörper (He et al.). Der Laborwert, der als erstes ansteigt, ist die Alkalische Phosphatase. Transaminasen und Bilirubin bleiben in den frühen Krankheitsphasen meist im Normbereich und erhöhen sich erst später. Die PBC ist häufig auch mit anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert (Netter 2014).

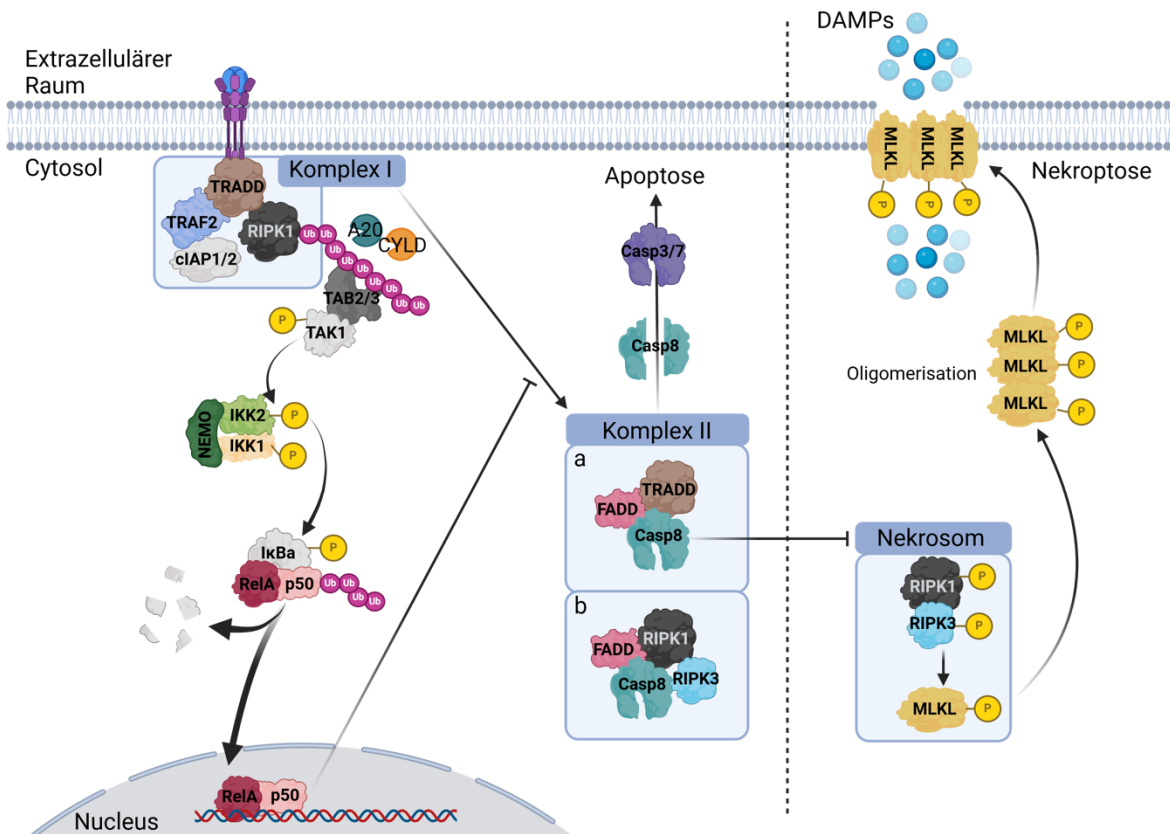
Die PSC zeichnet sich durch fibrosierende Entzündungen der großen Gallengänge aus (Rosien 2021). Anders als bei der PBC, die vor allem die kleinen Gallengänge betrifft, führt die durch die Entzündung vermittelte Verengung der größeren Gallengänge bei der PSC schließlich zu dessen Obstruktion (Dufour 2005). Sie ist oft mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

wie Colitis ulcerosa verbunden und erhöht das Risiko für Cholangiokarzinome (Messmann 2012). Typische Diagnosetests zeigen erhöhte Leberwerte und antineutrophile antizytoplasmatische Antikörper (p-ANCA) (Rosien 2021).

## 1.2 Zelltodformen und Signalwege in der Leber

Der programmierte Zelltod spielt eine zentrale Rolle in der Leberhomöostase und ist physiologisch erforderlich, um die Zellzahl zu begrenzen und beschädigte Zellen zu eliminieren (Newton et al. 2024). Dysregulierter programmierter Zelltod hingegen spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Progression von Lebererkrankungen autoimmuner, viraler, toxischer und auch metabolischer Genese. Die zugrundeliegenden Zelltodformen unterscheiden sich dabei und beeinflussen maßgeblich die Krankheitsentwicklung und -progression (Kayagaki, Webster, and Newton 2024). Der programmierte Zelltod wird aktiv eingeleitet und erfolgt über zwei Hauptmechanismen, dabei erfolgt die intrinsische Aktivierung durch intrazelluläre Stressfaktoren wie Mitochondrienschäden, während die extrinsische Aktivierung durch Liganden vermittelt wird, die an Todesrezeptoren auf der Zellmembran binden. In Hepatozyten sind diese Rezeptoren besonders zahlreich vorhanden und spielen eine zentrale Rolle in der Leberhomöostase, indem sie geschädigte Zellen eliminieren und Zellstress minimieren (Luedde, Kaplowitz, and Schwabe 2014).

Die Aktivierung kann unter anderem über Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) und Interferone aber auch über bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder doppelsträngige RNA induziert werden. In diesem Zusammenhang ist der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1)-vermittelte Zelltod einer der am besten untersuchten Signalwege zur Steuerung von Zellüberleben, -tod und Immunreaktion. Nach der Bindung von TNF- $\alpha$  an Tnfr1 bildet sich Komplex I, der unter anderem Proteine wie Tradd (*engl.: TNFR1-associated death domain*), ubiquitiniertes Ripk1 (*engl.: receptor interacting protein kinase 1*), Traf2 (*engl.: TNF-receptor-associated factor 2*) und Ciap1/2 (*engl.: cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2*) rekrutiert. Dieser Komplex fördert das Zellüberleben und zelluläre Entzündungsreaktionen über die Aktivierung von MAPK (*engl.: Mitogen-activated protein-kinases*) und NF- $\kappa$ B (*engl.: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Feoktistova et al. 2021).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung über die Signalwege zur Einleitung von programmiertem Zelltod durch Aktivierung des TNFR1.** Die Aktivierung von TNFR1 durch TNF-a führt zur Bildung von Komplex I, bei dem Proteine wie Tradd, Ripk1, Traf2 und Ciap1/2 rekrutiert werden und Zellüberleben sowie Entzündungsreaktionen fördert. Abhängig vom Ubiquitinierungsstatus von Ripk1, können sich Komponenten aus Komplex I vom Rezeptor lösen und die zytosolischen Komplexe Iia und Iib bilden. Beide vermitteln die Caspasen-abhängige Apoptose, wobei Komplex Iib in Abwesenheit von Tradd eine Ripk1-abhängige Apoptose einleitet. Ist hingegen Caspase-8 gehemmt, bildet sich das Nekrosom, welches durch Ripk1 und Ripk3 zur Nekroptose führt. Mlkl ist der zentrale Auslöser dieser Zellyse. Modifiziert nach (Pistorio et al. 2022).

Tradd (*engl.: TNFR1-associated death domain protein*) fungiert dabei als wesentlicher Adapter und rekrutiert Ripk1 zum TNFR1, was eine Kaskade nachgeschalteter Signale auslöst. Ciap1/2 und Traf2 spielen eine entscheidende Rolle, indem sie Ripk1 ubiquitinieren und Komplex I stabilisieren. Diese Stabilisierung entscheidet letztlich, ob die Zelle einen Überlebens- oder Zelltodweg einschlägt (Maslov et al. 2022).

Ein Teil von Komplex I kann sich vom Rezeptor lösen und im Zytosol Komplex II bilden. Komplex Iia besteht aus Tradd, Fadd (*engl.: Fas-associated death domain protein*) und Pro-Caspase-8 und bildet sich nachdem Deubiquitinierungsenzyme (wie Cyld und A20) Tradd und Ripk1 vom TNFR1 freigesetzt haben (Chen et al. 2019). Darauf folgt die Rekrutierung von Fadd und Pro-Caspase-8, was zur Spaltung und Aktivierung von Caspase-8 führt und im Folgenden die Kaskade der Caspasen-Aktivierung in Gang setzt. Die Spaltung intrazellulärer Proteine fördert typische apoptotische Merkmale wie DNA-Fragmentierung, Zellschrumpfung

und Membranbläschenbildung (so genannte Apoptotic bodies), wodurch unabhängig von der Ripk1-Kinaseaktivität mit der Apoptose ein kontrollierter Zellabbau ausgelöst wird (Orning and Lien 2021).

Unter bestimmten Bedingungen, bildet sich Komplex IIb, der auch als Ripoptosom bezeichnet wird, die auf einen Mangel an Ciaps und verschiedenen extrazellulären Stimuli, unter anderem die Stimulation mit TNF, zurückzuführen sind (Feoktistova et al. 2021). In Abwesenheit von Tradd bilden Ripk1 zusammen mit Fadd und Caspase-8 den Komplex IIb, wobei hier die Kinaseaktivität von Ripk1 erforderlich ist, um Caspase-8 zu aktivieren und so die Ripk1-abhängige Apoptose zu induzieren (Chen et al. 2019).

Wenn Caspase-8 inaktiviert oder gehemmt ist, entsteht eine alternative Form: das Nekrosom. Die Autophosphorylierung und Interaktion von Ripk1 mit Ripk3 (*engl.: receptor interacting protein kinase 3*) führt zur Phosphorylierung von Mlk1 (*engl.: mixed lineage kinase domain-like*). Dadurch wird dessen Oligomerisierung ausgelöst und es erzeugt Poren in der Zellmembran, was schließlich zur Nekroptose und Zellyse führt. Neben diesem Weg der klassischen Nekroptose-Aktivierung, kann die Nekroptose auch durch eine Vielzahl anderer Reize ausgelöst werden, die wiederum komplexe Signalwege aktivieren und letztlich jedoch zur Aktivierung der Pseudokinase Mlk1 als Effektormolekül der Nekroptose führen (Cao et al. 2024).

### 1.3 Funktion und Bedeutung der NF- $\kappa$ B-Signalwege in der Leber

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B infolge der Komplex-I-Bildung, fördert das Zellüberleben und fungiert als zentraler Regulator von Entzündungsreaktionen. NF- $\kappa$ B wird in nahezu allen Zelltypen exprimiert und kontrolliert die Expression zahlreicher Gene, die neben der Entzündung auch die Immunantwort und Proliferation regulieren. Dabei moduliert NF- $\kappa$ B sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Mediatoren, sodass seine exakte Wirkung stark kontext- und zelltypabhängig ist (Lawrence 2009; Czauderna et al. 2019; Oeckinghaus, Hayden, and Ghosh 2011). In der Leber erfolgt die Signalübertragung durch ein komplexes Zusammenspiel von parenchymatischen und nicht-parenchymatischen Zellen sowie infiltrierenden Immunzellen, was letztlich maßgeblich die hepatische Mikroumgebung beeinflusst.

Unter dem Begriff NF- $\kappa$ B werden fünf Untereinheiten zusammengefasst: RelA (=p65), RelB, c-Rel, p50 (=NF- $\kappa$ B1) und p52 (=NF- $\kappa$ B2). RelA, RelB und c-Rel besitzen am C-Terminus

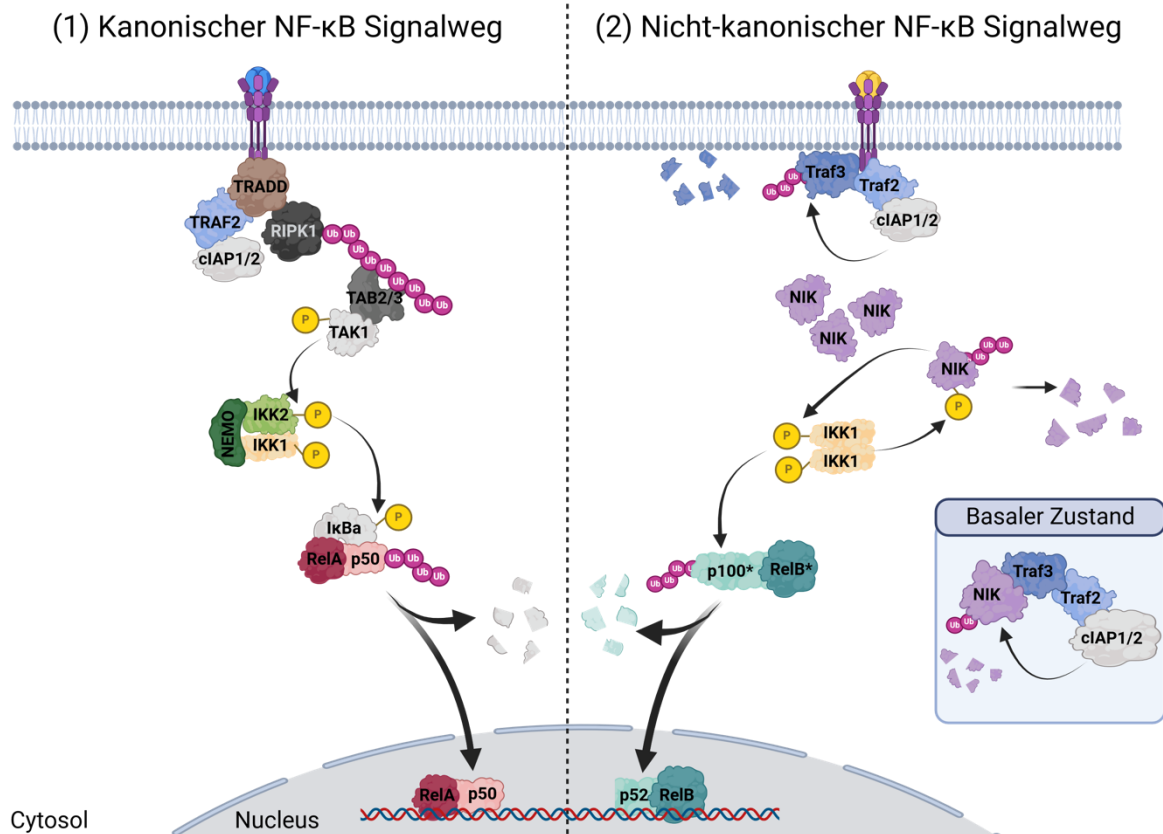
eine Transaktivierungs-Domäne, die für die Transkription von Zielgenen verantwortlich ist. Da RelA zwei Transaktivierungs-Domänen aufweist, vermittelt es die stärkste Gen-Aktivierung. p50 und p52 entstehen durch Degradierung größerer Vorläuferproteine, im Fall von p50 konstitutiv aus p105 und p52 reguliert aus p100. Grundsätzlich haben sie selbst keine Transkriptionsaktivität, wenn sie nicht in einem Dimer mit einem aktiven NF- $\kappa$ B-Protein vorliegen (Dufour 2005).

Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird kontrolliert durch inhibitorische  $\kappa$ Bs (I $\kappa$ Bs), die mit den NF- $\kappa$ B-Proteinen Komplexe bilden und deren Kernlokalisations-Domäne inhibieren. Die Vorläufer-Proteine p105 und p100 haben ähnliche Struktureinheiten und inhibieren dadurch ebenso die NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Zudem sind einige I $\kappa$ Bs, wie I $\kappa$ B $\alpha$  und p100, Zielgene der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, wodurch die Aktivierung über eine negative Rückkopplung reguliert wird (Dufour 2005).

### 1.3.1 Kanonische und nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalwegaktivierung

Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung erfolgt durch verschiedene Stimuli, die ein potenzielles Risiko für den Organismus darstellen. Zu den Auslösern gehören entzündungsfördernde Zytokine, bakterielle Lipopolysaccharide, Virusproteine und freie Radikale. Die Signale führen zu einer Aktivierung von Entzündungsreaktionen, Immunantworten und Wundheilungsprozessen, die darauf abzielen, Gewebeschäden zu reparieren und Pathogene zu beseitigen (Hofmann 2006). Dabei lassen sich zwei Hauptsignalwege der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unterscheiden: der kanonische und der nicht-kanonische Signalweg. Der kanonische Weg aktiviert überwiegend Proteinkomplexe, die RelA und c-Rel enthalten, während der nicht-kanonische Signalweg zur Aktivierung von RelB-p52-Dimeren führt (Lawrence 2009).

Im kanonischen Signalweg erfolgt die Signalübertragung vom Reiz bis zur Kernlokalisation von RelA innerhalb weniger Minuten. Im Gegensatz dazu benötigt der nicht-kanonische NF $\kappa$ B-Signalweg mehrere Stunden, um eine Kerntranslokation von RelB zu erreichen (Bren et al. 2001).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierung des kanonischen- und nicht-kanonischen NF-κB-Signalwegs.** (1) Kanonischer NF-κB-Signalweg: Durch Rezeptoraktivierung wird über Tak1 der Ikk-Komplex aktiviert, woraufhin Ikk2 die proteasomale Degradierung von IκBα herbeiführt. Dadurch wird das RelA-p50-Dimer freigesetzt, kann in den Kern translozieren und die Genregulation hervorrufen. (2) Nicht-kanonischer NF-κB-Signalweg: Traf2 und Traf3 fungieren als Adapterproteine für die cIAP1/3 E3-Ligase. Im basalen Zustand sorgen sie für die proteasomale Degradierung von Nik. Durch Rezeptor-Aktivierung wird der Traf-cIAP1/2-Komplex zum Rezeptor rekrutiert und die Degradierung durch cIAP verschoben von Nik auf Traf3. Dadurch kommt es zu einer Stabilisierung des Nik-Spiegels im Cytosol, was letztlich die Aktivierung des Ikk1-Dimers verursacht, wodurch die Degradierung von p100 zu p52 hervorgerufen wird und das RelB-p52-Dimer in den Kern translozieren kann und die Genregulation hervorruft.

Im kanonischen NF-κB-Signalweg liegt der Transkriptionsfaktor RelA im Zytosol gebunden assoziiert an IκBα vor. Durch Rezeptor-Aktivierung wird ein Rezeptorkomplex gebildet, der schließlich über TAK1 (*engl.: transforming growth factor beta-activated kinase 1*) den Ikk (= IκB-Kinase)-Komplex, bestehend aus Nemo, Ikk1 und Ikk2, aktiviert. Daraufhin kommt es zur Ikk2-vermittelten IκBα-Phosphorylierung, wodurch dieses ubiquitiniert und proteasomal degradiert wird. Dadurch wird das RelA-p50 Dimer freigesetzt, gelangt in den Nucleus und kann die Zielgen-Regulierung hervorrufen (Müller-Esterl 2011).

Im nicht-kanonischen NF-κB-Signalweg fungiert Traf3 (*engl.: TNF-receptor-associated factor 3*) als negativer Regulator (He et al. 2007b). In statischen Zellen vermittelt es gemeinsam mit Traf2 als Gerüstkomponente die Ubiquitinierung der NF-κB-induzierenden Kinase (Nik) und

damit dessen proteasomale Degradierung durch die cIAP1/2-E3-Ligasen. Durch Stimulation des Rezeptors wird der cIAP/Traf2/Traf3-Komplex zu den Rezeptoren rekrutiert und die cIAP-abhängige Ubiquitinierung und Degradierung verschiebt sich von Nik auf Traf3. Mit dem Abbau von Traf3 geht somit eine Stabilisierung der Nik-Expression einher, was die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs zur Folge hat (He et al. 2006). Nik dient als Aktivator von Ikk1 und ist zusätzlich als Gerüstkomponente essenziell, um die Rekrutierung von Ikk1 zu p100 zu vermitteln. Nur in Anwesenheit von Nik kann Ikk1 schließlich die Degradierung von p100 zu p52 hervorrufen, wodurch das RelB-p52-Dimer in den Kern translozieren und durch Bindung an die DNA die Genexpression hervorrufen kann (Xiao, Fong, and Sun 2004).

Zudem wird der nicht-kanonische Signalweg durch Aktivierung des kanonischen Signalwegs reguliert. So sind p100 und RelB, zwei wichtige Bestandteile des nicht-kanonischen Signalwegs, Zielgene von RelA, das hauptsächlich durch den kanonischen Signalweg aktiviert wird (Bren et al. 2001).

Zusätzlich zu der Hauptfunktion als negativer Regulator von NF- $\kappa$ B konnte eine alternative Funktion von Ikk1 gezeigt werden. Durch die Bindung ans Chromatin erfolgt eine Regulation bestimmter entwicklungs- und stammzellbezogenen Gene. Beispielsweise konnte bei einer Ikk1-Defizienz eine Differenzierungsblockade in Darm-Stammzellen festgestellt werden (Álvarez-Villanueva et al. 2023).

### 1.3.2 Bedeutung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in der Pathogenese chronischer Lebererkrankungen

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellüberleben, Zelltod und Entzündungsreaktionen, die entscheidend für die Pathogenese chronischer Lebererkrankungen sind. Die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren fördern die Expression anti-apoptotischer Gene und sichern dadurch das Überleben der Zellen. In vielen Tumoren führt eine konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu Überlebensvorteilen für die malignen Zellen und unterstützt die Tumorprogression, insbesondere in entzündungsbedingten Tumoren (Verzella et al. 2020).

NF- $\kappa$ B ist in ein Netzwerk integriert, in dem es mit zahlreichen anderen Signalwegen interagiert (Hoesel and Schmid 2013), darunter der JNK-MAPK-Signalwegs, der in Entzündungs-, Überlebens- und Zelltodsignalen involviert ist. Auch die Autophagie, die für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase durch Abbau geschädigter Zellbestandteile sorgt,

wird durch NF- $\kappa$ B beeinflusst. Bei pathologischen Prozessen kann diese Regulation zugunsten des Zellüberlebens ausgenutzt werden. Durch die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Signalwege entsteht ein komplexes Netzwerk, in dem NF- $\kappa$ B sowohl die Aktivierung anderer Signalwege fördert als auch von diesen reguliert wird.

Eine gestörte NF- $\kappa$ B-Signalübertragung ist an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt, darunter Autoimmun- und chronisch inflammatorischer Erkrankungen sowie verschiedener Krebsarten (Liu et al. 2017; Verzella et al. 2020). Obwohl die Untersuchungen hauptsächlich auf der Betrachtung der Aktivität des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs basieren, weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg, insbesondere die RelB- und Nik-Aktivierung, ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Progression chronischer Lebererkrankungen wie der biliären Fibrose spielt.

Die Gruppe um Elssner, 2019 konnte aufzeigen, dass in Lebergewebe von Patienten mit PSC, PBC, AIH, chronischer Hepatitis-B- oder -C-Infektion, sowie alkoholischer Lebererkrankung eine erhöhte nukleäre Translokation von RelB nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig wurde ein Anstieg von Lymphotoxin- $\beta$  (LT- $\beta$ ) in den reaktiven Gallengänge-bildenden Cholangiozyten im Vergleich zu Kontrollgewebe beobachtet (Elssner et al. 2019). Humane Cholangiozyten zeigten eine erhöhte Proliferation nach Exposition gegenüber LT- $\beta$ , ein Effekt, der in Zellen mit RelB-Knockdown nicht beobachtet werden konnte. Studien an Mausmodellen bestätigten, dass die RelB-Aktivierung die Gallengangsreaktion und die biliäre Fibrose beeinflusst (Elssner et al. 2019).

Die Gruppe um Zhang, 2022 konnte Nik, das Schlüsselmolekül zur Aktivierung des nicht-kanonischen NF $\kappa$ B-Signalwegs, als zentralen Regulator der Gallengangsreaktion identifizieren. Eine übermäßige Ausbreitung der Cholangiozyten förderte die Progression von Lebererkrankungen (Zhang et al. 2022). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs durch Nik und RelB ein zentraler Mechanismus bei der Progression chronischer Lebererkrankungen ist.

## 1.4 Zielsetzung

Während der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg bereits intensiv hinsichtlich seiner Rolle bei Lebererkrankungen und Tumorentstehung untersucht wurde (Finkin and Pikarsky 2011 2013, Czauderna, 2019), ist weniger klar in welchem Ausmaß dabei der nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg in die Pathogenese involviert ist. Jüngere Studien legen nahe, dass beide Signalwege entweder unabhängig voneinander oder in einem koordinierten Zusammenspiel aktiviert sein könnten (Elssner et al. 2019; Zhang et al. 2022). Dabei könnte ihre kombinierte Aktivierung die Entzündungsreaktionen und den zellulären Crosstalk zwischen Hepatozyten, Cholangiozyten und Immunzellen modulieren.

Da bisher keine umfassenden Vorstudien zur differenziellen Rolle einer kanonischen-, nicht-kanonischen oder kombinierten Hyperaktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in Leberparenchymzellen vorliegen, ist es Ziel dieser Arbeit, die spezifischen Beiträge beider Signalwege zur Krankheitsprogression zu untersuchen. Dabei sollen sowohl die individuellen als auch die kombinierten Effekte dieser Signalwege charakterisiert werden, um ihre Bedeutung für pathologische Ereignisse wie Proliferation, Zelltod und chronische Inflammation zu definieren. Die Hyperaktivierung der Signalwege wird in gentechnisch modifizierten Mausmodellen durch gezielte Modifikation zentraler Regulatoren innerhalb der jeweiligen Signalwege induziert (Abschnitt 2.3), anhand derer eine detaillierte Analyse der Auswirkungen auf die Leberhomöostase und Krankheitsprogression einzeln und in Kombination erfolgt.

Der spontane Phänotyp von Mäusen mit konstitutiver Aktivierung von kanonischem und nicht-kanonischem NF- $\kappa$ B-Signalweg in Leberparenchymzellen soll dafür makroskopisch und molekularbiologisch charakterisiert werden. Insbesondere soll die Bedeutung der daraus resultierenden Proliferations- und Zelltodereignisse auf die Leberhomöostase analysiert werden. Die aus der Inflammation erfolgte Leberschädigung soll aufgeschlüsselt und dessen Einfluss auf den Organismus herausgestellt werden. Um zu untersuchen, wie sich die Aktivierung übergeschalteter Kinasen des nicht-kanonischen Signalwegs im Vergleich zu den Transkriptionsfaktoren auf die Krankheitsprogression auswirkt, soll die Rolle von NF- $\kappa$ B2 als Aktivator von RelB zusätzlich *in vivo* überprüft werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Arbeitsgeräte

Geräte	Hersteller
Absaugpumpe Zellkultur	CellMedia
Bead Ruptor	Omni international
Blottingkammer	Scie-PLAS
CO <sub>2</sub> -Kammer	Medres
Entwässerungsgerät	Leica
Elektrophoresekammer	Biometra, Amershan
Feinwaage	Sartorius
Grobwaage	Mettler
ImageQuant 800	Cytiva
Inkubator	Fisher Scientific
Kamera & Objektiv	Canon
Kassetten-/Objekträger-Drucker	Primera
Kühlplatte	PFM Medical
Kühltischzentrifuge 5424R	Eppendorf
Magnetrührer	Heidolph
Mikroplatten-Reader	Tecan
Mikroskop AxioVert A1	Zeiss
Nanodrop	Implen
Neubauer Zählkammer	Nano Entek
Paraffin-Gießstation	Leica
Perfusionspumpe	Abimed Gilson, CellMedia
pH-Meter	Metler Toledo
Pipetten	Eppendorf
Präparierbesteck	Hammacher-Solingen
Serummessgerät Pentra 4000	Acsonlab Horiba Medical
Slidescanner Aperio AT2	Leica
Sterilbank	Labogene
Thermoblock	Eppendorf

Thermocycler	Applied Biosystems
ViiA7	Applied Biosystems
Vortexer	Ika
Wasserbad	Julabo, Leica
Wippe	Heidolph
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Firma
96-well Platten (Nunc)	Thermo Scientific
Deckgläser	VWR
Drehverschlussröhrchen	Sarstedt
ELISA-Wannen	VWR
Eppendorf Safe-Lock Gefäße (1,5 ml, 2 ml und 5 ml)	Eppendorf
Falcon Gefäße (15 ml und 50 ml)	Greiner
Kanülen	Braun
Keramikkugeln	Omni International
Kryotubes und Farbcodierdeckel	Thermo Scientific, Sarstedt
Objektträger	Klinipath
Pipettenspitzen	Biozym
qRT-PCR-Platten und Klebefolien	4titude
Saugkompressen	Meditrade
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml und 20 ml)	Braun
Vakuumflaschen (250 ml und 500 ml)	TPP
Zellkulturplatten	Greiner, TPP
Zellschaber	Kisker

## 2.3 Mauslinien

Die untersuchten Mäuse wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutz-Aufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf

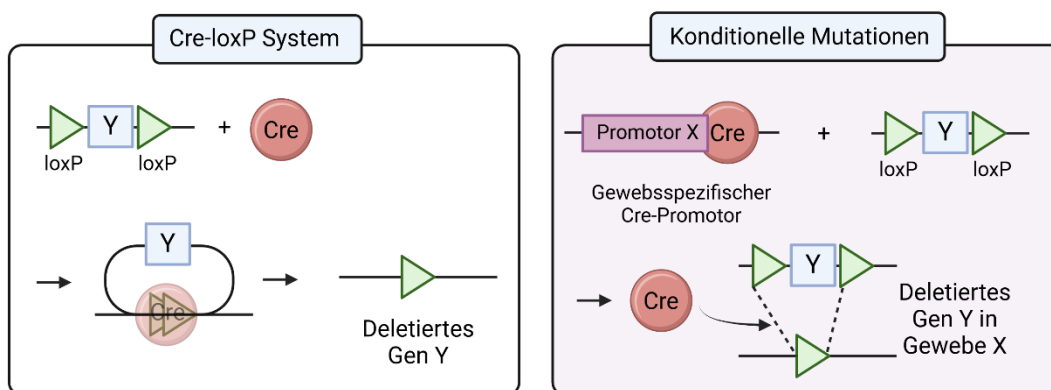
gezüchtet und gehalten. Sie besitzen genetisch einen C57BL/6-Hintergrund und wurden entsprechend der europäischen Haltungsrichtlinien in 20-24°C klimatisierten Räumen in konventionellen offenen Käfigen und während der Zucht in individuell ventilierten Käfigen (IVC) gehalten. Die Zuchten wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2021.A090 genehmigt und entsprechend geführt.

### 2.3.2 Cre-loxP System

Gentechnisch veränderte Mausmodelle werden aufgrund der genetischen und pathophysiologischen Ähnlichkeiten zwischen Mäusen und Menschen häufig zur Untersuchung humaner Erkrankungen eingesetzt. Das Cre-loxP System bietet die Möglichkeit, bestimmte Gene gewebsspezifisch zu deletieren oder überzuaktivieren, um ihre Funktion zu untersuchen (Kim et al. 2018).

Die Cre-Rekombinase ist eine Tyrosin-spezifische Rekombinase, die spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte loxP-Fragmente (locus of x-over, P1), erkennt. Die erwünschte zu modifizierende DNA wird durch loxP-Fragmente flankiert und die Cre-Rekombinase entfernt die DNA, die sich zwischen den loxP-Sequenzen befindet (**Abbildung 4**).

Durch das Einbringen gewebsspezifischer Cre-Promotoren, wird eine Aktivität der Cre-Rekombinase gezielt in bestimmten Geweben erzielt. So wird das gewünschte Gen nur in dem entsprechenden Gewebe modifiziert (Kim et al. 2018).



**Abbildung 4: Übersicht zur Funktion der Cre-spezifischen Deletion von Genabschnitten:** Mit dem Cre-loxP-System können spezifische Genabschnitte entfernen werden. Die Cre-Rekombinase erkennt loxP-Sequenzen und entfernt die dazwischenliegende DNA. Konditionelle Mutationen können durch gewebsspezifische Cre-Promotoren erzeugt werden. Durch den Promotor ist die Cre-Rekombinase nur in dem Gewebe aktiv, das den Promotor exprimiert und so kann die Genmodifikation gezielt in bestimmten Geweben erfolgen. Modifiziert nach (Kim et al. 2018).

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Mäuse mit konditioneller Genmanipulation verwendet. Die für die Zucht verwendeten Mäuse exprimierten die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle der Promotoren für Albumin und Alpha-Fetoprotein. Albumin ist ein Protein, das hauptsächlich in reifen Hepatozyten vorkommt, während Alpha-Fetoprotein (AFP) während der Embryonalentwicklung in Leberzellen und anderen Geweben exprimiert wird. Die Alfp-Cre ermöglicht also die genetische Manipulation von Genen in der Leber während der Entwicklung und in adulten Tieren und wird im weiteren Verlauf als LPC (Leberparenchymzellen) abgekürzt.

Mäuse ohne Cre-Aktivität dienen als wildtypische Kontrollen. Die Alfp-Cre-Rekombinase-Mäuse zur Erzeugung dieser Mauslinien wurde von Prof. Francois Tronche vom Deutschen Krebsforschungszentrum bereitgestellt und erstmals beschrieben von (Kellendonk et al. 2000).

### 2.3.3 Ikk2<sup>LPC-ca</sup> Maus

Diese Mauslinie wurde unter dem Namen B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm4(Ikbbk)Rsky/J</sup> vom Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, erworben und erstmals beschrieben von (Sasaki et al. 2006). Für die konditionelle Aktivierung von Ikk2 in LPCs ist das Stop-Codon von Ikk2 durch loxP-Sequenzen flankiert. Wird dieses durch die Cre-Rekombinase-Aktivität deletiert, führt dies zu einer konstitutiven Überaktivierung von Ikk2. Da Ikk2 ein zentraler Aktivator des kanonischen NF-κB-Signalwegs ist, resultiert dies in einer dauerhaften Aktivierung dieses Signalwegs.

Um die Genmodifikation spezifisch nur in Leberparenchymgewebe zu erzeugen erfolgte eine Verpaarung mit Mäusen, die eine Alfp/Alb-Cre exprimieren. Die heterozygoten Nachkommen wurden verpaart, bis die Alfp/Alb-Cre hemizygot und die Ikk2-loxP-Flankierung homozygot vorlagen. Hierdurch wurde eine konstitutive Aktivierung von Ikk2 in LPC erzielt. Durch einen gemischten genetischen Hintergrund hat sich bei dieser Mauslinie ein agouti-farbenes Fell durchgesetzt.

### 2.3.4 Traf3<sup>LPC-KO</sup> Maus

Zur Deletion von Traf3 in Leberparenchym-Gewebe, wurde der Mausstamm Traf3<sup>Tm1Bshp</sup> verwendet. Sie wurde erstmals 2007 beschrieben (Xie et al. 2007) und in dieser Arbeit für die spezifische Deletion in Leberparenchymzellen mit einer Alfp/Alb-Cre-positiven Maus

(Abschnitt 2.3.2) gekreuzt. Die Nachkommen wurden verpaart, bis die *Alfp/Alb-Cre* hemizygot und das gefloxtete *Traf3*-Allel homozygot vorlag.

Da die *Traf3*-Degradierung der initiale Schritt des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs ist, führt dessen Knockout zu einer Aktivierung dieses Signalwegs in Leberparenchymzellen. Es ist bereits beschrieben, dass eine *Traf3*-Deletion mit einer NIK-Akkumulation und der darauffolgenden Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs einhergeht (He et al. 2006). Weitere Daten zur Deletion von *Traf3* deuten auf eine wesentliche Bedeutung unter anderem bei der B-Zell-Reifung und der Blutgerinnung, sowie der Knochenhomöostase hin (Boyce et al. 2018; Moore et al. 2012; Zhang et al. 2017).

### 2.3.5 Caspase8<sup>LPC-KO</sup> Maus

Zur Deletion von *Caspase8* wurden *Caspase8<sup>tm1Raz</sup>-loxP*-Tiere zur Verfügung gestellt von Prof. Razqallah Hakem der Universität Toronto in Kanada. Sie wurden erstmals 2003 beschrieben (Salmena et al. 2003). Mit der konstitutiven Deletion von *Caspase8* wird die Aktivierung nachgeschalteter Caspasen und damit die Einleitung des apoptotischen Zelltods verhindert. (Abschnitt 1.2, (Salmena et al. 2003)).

Durch Kreuzung der *Traf3<sup>LPC-KO</sup>/Ikk2<sup>LPC-ca</sup>*-Mäuse mit *Caspase8<sup>LPC-KO</sup>*-Mäusen wurde eine Triple-Mutante generiert, mit dessen Hilfe die Rolle der Apoptose *in vivo* herausgestellt werden sollte.

### 2.3.6 MLKL<sup>LPC-KO</sup> Maus

Um MLKL in den LPC zu deletieren wurden *Mlkl<sup>tm1.1Wsa</sup>/J-loxP*-Mäuse verwendet. Die Linie wurde erstmals 2013 beschrieben (Murphy et al. 2013). Die Gruppe konnte zeigen, dass die Deletion von MLKL die TNF-induzierte Nekroptose verhindert.

Durch Kreuzung der *Traf3<sup>LPC-KO</sup>/Ikk2<sup>LPC-ca</sup>*-Mäuse mit *MLKL<sup>LPC-KO</sup>*-Mäusen wurde eine Triple-Mutante generiert, mit dessen Hilfe die Rolle der Nekroptose *in vivo* herausgestellt werden sollte.

### 2.3.7 NF- $\kappa$ B<sup>LPC-KO</sup> Maus

Die B6.Cg-Nfkb2<sup>tm1Ukl</sup>/J-Maus wurde von dem Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine erworben. NF- $\kappa$ B2 (p100/p52) ist zur Kerntranslokation von RelB und damit dessen Aktivierung erforderlich. p100 bindet RelB im Zytosol und wird bei Aktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs zu p52 degradiert, was die Kerntranslokation ermöglicht.

Mit der zusätzlichen Deletion von NF- $\kappa$ B2 in LPC von Traf3<sup>LPC-KO</sup>/Ikk2<sup>LPC-ca</sup>-Mäusen sollte die Rolle des Transkriptionsfaktors des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs *in vivo* unabhängig von zwischengeschalteten Kinasen überprüft werden. Dafür wurden die Traf3<sup>LPC-KO</sup>/Ikk2<sup>LPC-ca</sup>-Mäuse mit Alfp/Alb-Cre-positiven NF- $\kappa$ B2 gekreuzt und Triple-Mutanten erzeugt.

### 2.3.8 Benennung und Abkürzungen der Mausmodelle

Um die Übersichtlichkeit zu wahren, werden in dieser Arbeit anstelle der gesamten Genkonstellationen der Mausmodelle im Folgenden Abkürzungen verwendet. Diese betreffen durch das Cre-loxP-System nur das Leberparenchymgewebe und sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Abkürzung	Genkonstellation	Theoretische Auswirkungen auf die Signalwege
WT	Wildtypische Genkonstellation und Signalweg-Aktivierung	Wurfgeschwister mit natürlich ausgeprägter
LPC <sup>C</sup>	IKK2 <sup>LPC-ca</sup>	Überaktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs
LPC <sup>NC</sup>	Traf3 <sup>LPC-KO</sup>	Überaktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs
LPC <sup>C+NC</sup>	IKK2 <sup>LPC-ca</sup> Traf3 <sup>LPC-KO</sup>	Überaktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs
LPC <sup>C+NC<math>\Delta</math>Casp8</sup>	IKK2 <sup>LPC-ca</sup> Traf3 <sup>LPC-KO</sup> Casp8 <sup>LPC-KO</sup>	Überaktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, zusätzliche Verhinderung der Ausübung von Caspase8-vermittelter Apoptose

LPC <sup>C+NCΔMLKL</sup>	IKK2 <sup>LPC-ca</sup> Traf3 <sup>LPC-KO</sup> MLKL <sup>LPC-KO</sup>	Überaktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF-κB-Signalwegs, zusätzliche Verhinderung der Ausübung von MLKL-vermittelter Nekroptose
LPC <sup>C+NCΔNF-κB2</sup>	IKK2 <sup>LPC-ca</sup> Traf3 <sup>LPC-KO</sup> NF-κB2 <sup>LPC-KO</sup>	Überaktivierung des kanonischen NF-κB-Signalwegs, zusätzlich ist die klassische Aktivierung des nicht-kanonischen NF-κB-Signalwegs nicht mehr möglich

Tabelle 1: Abkürzungen zur Benennung der Mauslinien und Mausmodelle und Übersicht über die Auswirkungen der Genkonstellationen auf die Signalweg-Aktivierung

## 2.4 Software und Internetseiten

Software	Verwendung
ImageScope	Begutachtung von gefärbten Gewebsschnitten und Erstellung von Aufnahmen zur Darstellung und Auswertung
QuPath	Quantitative Auswertung von Färbungen
ImageJ	Quantitative Auswertung von Färbungen
Zeiss ZenBlue	Bedienung des Fluoreszenzmikroskops und Erstellung der Bilder
Zeiss Arivis Cloud	Quantitative Auswertung von Färbungen
PrimerBLAST – NCBI	Überprüfen und Design von Primern
PubMed – NCBI	Literaturrecherche
Biorender	Darstellung von Abbildungen und Illustrationen
MS Office 2016	Auswertung und Speicherung von Daten
GraphPad Prism 9	Grafikdarstellungen und statistische Analyse
Endnote 21	Literaturverwaltung
ChatGPT 4o	Textkorrekturen hinsichtlich Grammatik, Klarheit und Prägnanz. Anschließende Überprüfung, sowie bei Bedarf Überarbeitung, des Inhaltes, sodass die volle Verantwortung für den Inhalt des Textes übernommen wird.

Tabelle 2: Verwendung von Softwares und Internetdiensten

## 2.5 Genotypisierung der Mauslinien mittels PCR

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurden die Ohrlochstanzen verwendet. Zudem wurde, nach Beendigung der Versuche mit den entsprechenden Tieren, die Genotypisierung aus einem kleinen abgetrennten Stück des Schwanzes post mortem noch einmal bestätigt. Aus den Proben wurde DNA isoliert und mithilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die genetische Modifikation untersucht. Zur DNA-Gewinnung wurden die Proben mit 100 µl Lysis-Puffer (Tabelle 3) und 2 µl Proteinase K (Best.-Nr.: EO0491, Thermo Scientific) versetzt und mindestens 1,5 h bei 56 °C in einem Thermoblock (ThermoMixer F1.5, Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurde durch Erhitzen auf 95°C für 15 Minuten im Thermoblock das Enzym inaktiviert. Es folgte eine Zentrifugation bei 20000 g für 5 Minuten, damit sich die nicht lysierten Bestandteile am Boden absetzen. So können aus dem Überstand 2 µl der isolierten DNA mit dem Mastermix in der PCR vervielfältigt werden.

### Genotypisierung-Lysis-Puffer

0,05 M	Kaliumchlorid (KCl)	Best.-Nr.: P9541	Sigma Aldrich
0,01 M	Tris HCl pH 8,3	Best.-Nr.: 9090.3	Carl Roth
0,002 M	Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Best.-Nr.: M8266	Sigma Aldrich
0,0001 %	Gelatine Typ A/B (m/v)	Best.-Nr.: 24360.233	VWR
0,45 %	Nonident P-40 (v/v)	Best.-Nr.: 492016	Merck
0,45 %	Tween 20 (v/v)	Best.-Nr.: 9005-64-5	Serva

Tabelle 3: Reagenzien zur Probenaufreinigung der Maus-Biopsien für die Genotypisierung

Dafür wurde für jede zu untersuchende genetische Modifikation der Mastermix mit den entsprechenden Primern angesetzt. (Tabelle 3 und Tabelle 4) Die Bestimmung von konstitutiv aktivem Ikk2 wurde mit dem Promega-Mastermix durchgeführt, die anderen genetischen Modifikationen wurden mit dem Invitrogen-Mastermix nachgewiesen. Nach Zugabe der 2 µl DNA-Probe, wurde die Probe in den Thermoblock (biometra T3000 Thermocycler) gestellt und das PCR-Programm gestartet.

Mastermix Invitrogen (Best.-Nr.: 4444557)		Mastermix Promega (Best.-Nr.: A6002)	
3 µl	10 X Puffer	5 µl	5 X Puffer
1,8 µl	Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) 25mM	2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
3 µl	dNTP (2 mM)	0,5 µl	dNTPs (10 mM)

1,5 µl	Primer Forward (10 pmol/µl)	1,25 µl	Primer Forward (10 pmol/µl)
1,5 µl	Primer Reverse (10 pmol/µl)	1,25 µl	Primer Reverse (10 pmol/µl)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
17 µl	Nukleasefreies H <sub>2</sub> O	12,8 µl	Nukleasefreies H <sub>2</sub> O

Tabelle 4: Mastermix-Zusammensetzung für die PCR zur Genotypisierung der Versuchsmäuse

Zunächst heizt der Block 5 Minuten auf 94 °C auf, bevor sich 35 Zyklen mit einer sich wiederholenden Temperaturabfolge anschließen. Das Reaktionsgemisch wird 30 Sekunden auf 94 °C erhitzt, wodurch sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen trennen und so die DNA denaturiert. Anschließend folgt eine 30 sekündige Abkühlung auf 58 °C, wodurch die Primer an die Vorlagestränge binden können. Danach wird 1 Minute lang auf 72 °C erhitzt, damit die Polymerase an den gebundenen Primern anlagern und die gewünschte Sequenz amplifizieren kann. Dieser Ablauf wird mit jedem Zyklus wiederholt. Nach dem letzten Zyklus wird die Temperatur noch einmal 5 Minuten bei 72 °C gehalten, bevor die Proben dann zur Auftrennung der Fragmente auf ein Gel aufgetragen werden.

#### PCR-Primer für die Genotypisierung

---

Alb-cre for	GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C
Alb-cre rev	CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC
Caspase 8 for	CCA GGA AAA GAT TTG TGT CTA GC
Caspase 8 rev	CTT CCT GAG TAC TGT CAC CTG T
IKK2ca WT for	CCA GAT GAC TAC CTA TCC TC
IKK2ca WT rev	GAG CTG CAG TGG AGT AG
IKK2ca KO for	AAG ACA GAA GCT TCA CGA C
IKK2ca KO rev	GCA ATA TGG TGG AAA ATA AC
MLKL for	TAT GAC CAT GGC AAC TCA CG
MLKL rev	ACC ATC TCC CCA AAC TGT GA
NFκB2 for	CCC ACC CAC TTT ATG ATG GT
NFκB2 WT rev	GGA TCA CTC TCG GCA TGG
NFκB2 TG rev	CAA CTA TTT GAC TTG AAA GGC ATC C
Traf3 for	GCC AAG AAA GCA TCA TCA AAG ACA
Traf3 rev	GTC CTG GAT CTT GCT ATG AG

Tabelle 5: PCR-Primer zur Maus-Genotypisierung: Sequenzen sind in 5'→3' Richtung angegeben. Einstellung der Primer-Konzentration auf 100 pmol/μl, die Endkonzentration der Primer im Reaktionsgemisch liegt bei 0,5 pmol/μl.

Die Herstellung des Gels erfolgte mit 1,5 %iger Agarose (m/v, Best.-Nr.: 2267.4, Carl Roth) in TAE-Puffer (Best.-Nr.: A1691, AppliChem). Durch Zugabe von HDGreen™ Plus DNA-Dye (Intas Science Imaging) vor dem Ausgießen wird sichergestellt, dass die DNA-Banden unter Anregung von UV-Licht fluoreszieren und so sichtbar gemacht werden.

Die Ladekontrolle (Best.-Nr.: 15628050, Invitrogen) und die zu untersuchenden Proben wurden mit jeweils einer Positiv- und einer Negativ-Kontrolle auf das Gel aufgetragen. Nach Aufsetzen des Deckels der Elektrophoresekammer (Serien-Nr.: 3472, peqlab VWR) wurde der Power Supply (Standard Power Pack P25, Biometra) auf 120-125 V eingestellt. Nachdem die Proben in dem Gel aufgetrennt wurden, erfolgte die Detektion am ChemiDoc MP Imaging System (BioRad).

## 2.6 Analyse des murinen Serums

Das, aus den Tieren entnommene, Vollblut wurde in ein Probengefäß Z-Gel (Best.-Nr.: 41.1500.005, Sarstedt) überführt. Anschließend wurde es 5 Minuten mit 10000 rpm bei RT zentrifugiert. Das Serum, das sich oberhalb der Gel-Schicht sammelt, wurde abgenommen und in ein neues Probengefäß überführt.

Die anschließende Vermessung erfolgte klinisch-biochemisch im Pentra 4000 (Acsonlab Horiba Medical) mit den entsprechenden Kits in einer 1:5 oder 1:10 Verdünnung mit 0,9% NaCl (m/v, Best.-Nr. 7647-14-5, VWR, Verdünnung mit VE-Wasser).

## 2.7 Bestimmung der Ammoniak-Konzentration in Vollblut

Verwendung eines Ammoniak Test Kits (PocketChem BA PA-4140, Arkray) mit den dafür vorgesehenen Teststreifen. Die Durchführung wurde wie in der Packungsbeilage beschrieben gehandhabt. Als Probenmaterial wurde Vollblut verwendet, von dem unmittelbar nach der Entnahme 20 μl auf die Teststreifen aufgebracht wurde.

## 2.8 Blutgasanalyse

Zur Blutgasanalyse wurde das Gerät ABL800 Flex Plus von Radiometer verwendet. Dafür wurden mit *safeCLINITUBES* Kapillarröhrchen 55 µl arterielles Vollblut aufgenommen und unmittelbar in dem Gerät wie vorgesehen mit dem Modus „Kapillare 55 µl pH—BG+OXI“ vermessen.

## 2.9 Messung der spontanen körperlichen Aktivität

Für die Messung der spontanen körperlichen Aktivität der Mäuse wurde auf dem Käfigdeckel ein Infrarot-Sensor (Mouse-E-Motion-Universal-Datenlogger, Infra-E-Motion GmbH) angebracht. Er zählt die Bewegungs-Events jedes Mal, wenn die Maus den Lichtstrahl durchbricht. Um Verfälschungen zu vermeiden wurden die Häuschen in den Käfigen identisch zu den Trink- und Futtermöglichkeiten ausgerichtet. Die Messung erfolgte über vier Tage, sodass die Mäuse zunächst 2 Tage Eingewöhnungszeit haben, bevor die Daten über 48 Stunden mit jeweils zwei Dunkel- und zwei hellen Phasen aufgezeichnet wurden, die zur Analyse dienen.

## 2.10 Organeinbettung in Paraffin und Herstellung von Gewebeschnitten

Die Organe wurden nach der Entnahme in Biopsiekassetten (Best.-Nr.: EAI-06, CellPath) überführt und für mindestens 48 Stunden in Formaldehyd (Histofix 4 %, Best.-Nr.: P087.3, Carl Roth) fixiert. Anschließend erfolgte der Austausch von Formaldehyd durch PBS und die Lagerung im Kühlschrank, bis zur weiteren Prozessierung. Nach der Entwässerung in der Alkoholreihe wurde das Organ paraffinisiert und in einem Paraffinblock eingebettet.

Die Erstellung von Gewebeschnitten aus dem Paraffinblock erfolgte am Mikrotom (HistoCore Multicut, Leica) mit einer Dicke von 3 µm. Zuvor wurden die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte (Cooling Plate 4100, pfm medical GmbH) auf -10 °C abgekühlt. Nachdem der Schnitt erfolgte wurden sie in ein auf 42 °C temperiertes Wasserbad (Leica HI1210) überführt und auf Objektträgern (KP-Silan adhesive slides, Best.-Nr.: PR-S-001, Klinipath) platziert. Vor der weiteren Bearbeitung wurden sie vollständig getrocknet.

## 2.11 Hämatoxylin/Eosin (H/E) und Sirius Red-Färbung

Die H/E-Färbung stellt die Standardfärbung zur Begutachtung der Mikroanatomie von Organen und Geweben dar. Das Hämatoxylin färbt freie Säuregruppen, wodurch die Nukleinsäuren und damit die Zellkerne blau erscheinen, während Eosin fast alle Proteine anfärbt, wodurch das proteinreiche Zytoplasma rosa angefärbt wird. (Heinzeller 2001) Dadurch wird eine Begutachtung der Gewebsstruktur ermöglicht.

Die Sirius-Red-Färbung gilt als Standard zur Unterscheidung des Kollagens in histologischen Schnitten von dem umliegenden Gewebe, sowie dessen quantitativer Schätzung. Dabei wird ausgenutzt, dass die Sulfonsäuregruppen des anionische Farbstoffs Sirius Red mit den basischen Aminosäuren in Kollagenmolekülen reagieren. (Lopez De Padilla et al. 2021)

Die Färbung erfolgte, ebenso wie die Entparaffinisierung und Hydrierung der angefertigten Gewebsschnitte in einer automatisierten Färberei (Leica Autostainer XL) mit angeschlossenen Eindeckelautomat (Leica CV5030) durchgeführt.

## 2.12 Immunhistochemische (IHC) Färbung und Auswertung

Die Immunhistochemischen Färbungen wurden in einem automatisierten Färbeautomat (Leica Bond-RX<sup>m</sup>) durchgeführt. Sie wurden anschließend direkt in die angeschlossene automatisierte Alkoholreihe (Leica Autostainer XL) und schließlich in den Eindeckelautomat (Leica CV5030) überführt. In dem Eindeckelautomat wurde nach einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin eine automatisierte Alkoholreihe zur erneuten Entwässerung durchgeführt.

Die verwendeten Antikörper mit den entsprechenden Konzentrationen, in denen sie eingesetzt wurden, sind ebenso wie das verwendete Antigen-Retrieval in der Tabelle aufgeführt.

### Primär-Antikörper

---

$\alpha$ SMA\*

8-OHdG	1:500	Mouse	5 % NHS	Citrat-Puffer	QED Bioscience
AIRE	1:200	Rabbit	5 % NHS	Citrat-Puffer	Thermo Scientific
B220	1:1000	Rat	15 % NGS	ohne	BD Bioscience
CD3	1:1000	Rabbit	5 % NHS	EDTA-Puffer	Thermo Scientific
CD4	1:200	Rabbit	5 % NHS	EDTA-Puffer	Cell Signaling
CD8	1:500	Rabbit	5 % NHS	EDTA-Puffer	Cell Signaling

CK19*					
Claudin 3	1:200	Rabbit	5 % NHS	EDTA-Puffer	Proteintech
CC3	1:750	Rabbit	5 % NHS	EDTA-Puffer	Cell Signaling
CYP2E1*					
F4/80	1:300	Rat	5 % NGS	HistoZyme®	Abcam
GS	1:50000	Rabbit	5 % NHS	ohne	Sigma-Aldrich
HNF4α*					
Keratin 5	1:250	Rabbit	2,5 % NHS	EDTA-Puffer	Cell Signaling
Ki67	1:1000	Rat	2,5 % NHS	EDTA-Puffer	Dako
p100/p52	1:500	Rabbit	5 % NHS	Citrat-Puffer	Cell Signaling
p105/p50	1:1000	Rabbit	5 % NHS	Citrat-Puffer	Cell Signaling
Pan-CK	1:500	Rabbit	5 % NHS	Citrat-Puffer	Cell Signaling
RelA	1:1000	Rabbit	5 % NHS	Citrat-Puffer	Cell Signaling
RelB	1:1000	Rabbit	5 % NHS	Citrat-Puffer	Cell Signaling
Sox9*					

#### Sekundär-Antikörper (ImmPress)

Horse-anti-rabbit-HRP	Vector Laboratories
Horse-anti-mouse-HRP	Vector Laboratories
Goat-anti-rat-HRP	Vector Laboratories

Tabelle 6: verwendete Antikörper für IHC-Färbungen Alle mit \* markierten Färbungen wurden in Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Arbeitsforschung der TU Dortmund (IfADo) durchgeführt.

Die mit \* markierten Färbungen wurden von den Kooperationspartnern aus dem IfADo an einem Färbeautomaten durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden dort eingescannt und digital versendet, sodass die Auswertung analog den der anderen Färbungen erfolgte.

#### EDTAPuffer (pH 9)

10 mM	Tris-HCl	Best.-Nr.: 9090.3	Carl Roth
1 mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Best.-Nr.: A4892	AppliChem
0,05 %	Tween-20 (v/v)	Best.-Nr.: 9005-64-5	Serva

#### Citrat-Puffer (pH 6)

2 mM	Citronensäure	Best.-Nr.: 77-92-9	Merck
9,4 mM	Natriumcitrat-dihydrat	Best.-Nr.: 6132-04-3	Merck

Tabelle 7: Zusammensetzung der Blockierlösungen für die IHC-Färbungen

Sobald das Lösungsmittel über Nacht unter dem Abzug abgetrocknet war, wurden die eingefärbten Schnitte zur Auswertung und Analyse mit einem Scanner (Aperio® AT2, Leica Biosystems) virtualisiert.

Für die Auswertung wurden von jedem Gewebsschnitt in der gleichen Vergrößerung 10 zufällig gewählte Ausschnitte fotografiert und einzeln ausgewertet. Der Mittelwert aus den 10 Auswertungen wird als ein Wert in den Grafiken zur Quantifizierung angegeben.

### 2.13 TUNEL-Färbung (*engl.: terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

Bei der TUNEL-Färbung werden durch die terminale Transferase an den 3'-Enden von DNA-Strangbrüchen markierte dUTPS (Deoxyuridintriphosphate) ergänzt, die farblich markiert sind. Dadurch werden Zellkerne, die DNA-Strangbrüche aufweisen sichtbar gemacht, was ein charakteristisches Merkmal dafür ist, dass sie sich in einem Zelltodprozess befinden und die Methode ist sensitiver als andere histochemische Färbungen (Kyrylkova et al. 2012). Die Färbung erfolgte von 3 µm dicken Gewebsschnitten von in Paraffin eingebetteter Leber 6 Wochen alter Tiere nach Gebrauchsanweisung des Merck-Kit QIA33.

### 2.14 Gesamtproteinisolation aus Gewebe und Zellpellets mit Quantifizierung nach Bradford

Zur Herstellung eines Proteinlysats aus Gewebe wurde ein Stück dessen in eine Mikro-Schraubröhre (Bestellnr: 72.694.600, Sarstedt) mit ca. 5 Bead ruptor Kügelchen (1,4 mm Ceramic Beads, Best.-Nr.: 19-645, Omni International) und 250 µl NP-40-Lysepuffer (Tabelle 8) überführt. Im Bead Ruptor (12 Bead Mill Homogenizer, Best.-Nr.: 19-050, Omni International) wurde das Gewebe bei mittlerer Stufe für 25 Sekunden homogenisiert. Bei sehr fibrotischem Gewebe, das sich viel schwerer homogenisieren lässt, wurde der Schritt bei Bedarf wiederholt. Dabei wurde die Probe zwischendurch immer wieder kurz auf Eis gestellt, um eine mechanisch bedingte Erwärmung zu vermeiden.

Bei der Proteinisolation aus Zellpellets wurde je nach Größe des Pellets 50-150 µl NP-40-Lysepuffer (Tabelle 8) hinzugegeben und resuspendiert. Das weitere Prozedere war identisch. Es folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 10 Minuten, nach der sich die Proteine im Überstand befinden. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Ein Teil dieses

Protein-Lysats wurde zur Vermessung der Konzentration entsprechend der erwarteten Proteinmenge mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. 6 µl dieser Verdünnung wurde auf eine 96-Well-Platte (Best.-Nr.: 266120, Thermo Fisher) aufgetragen und mit zuvor 1:5-verdünnter Bradford-Lösung (Best.-Nr.: 5000006, Bio-rad) gefärbt. Die optische Dichte (OD) wurde mit Hilfe eines Mikroplatten-Readers (Infinite® 200 Pro, TECAN) bestimmt. Über eine, mit verschiedenen konzentrierten BSA-Lösungen (Best.-Nr.: 9048-46-8, Carl Roth), erstellte Kalibriergerade konnte anhand der OD die Protein-Konzentration ermittelt werden.

NP-40-Lyse-Puffer			
50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)	Best.-Nr.: 9090.3	Carl Roth
150 mM	Natriumchlorid (NaCl)	Best.-Nr.: 7647-14-5	VWR
0,5 %	Nonident P-40 (v/v)	Best.-Nr.: 492016	Merck
1 Tbl	Complete Mini Protease-Inhibitor Cocktail	Best.-Nr.: 11836170001	Roche
1 Tbl	PhosphoSTOP	Best.-Nr.: 4906945001	Roche
1mM	Pefablock	Best.-Nr.: 11429868001	Merck
1mM	Dithiotreitol (DTT)	Best.-Nr.: 6908.3	Roth

Tabelle 8: Puffer-Zusammensetzungen Gesamtprotein-Isolation

Die verschiedenen Lysate wurden mit NP-40-Lysepuffer (Tabelle 8) auf 6 µg/µl Protein eingestellt und mit Lämmli-Puffer (Best.-Nr.: 1610737, Bio-rad) versetzt. In der Regel wurden 10 µl Probe für die Western-Blot-Analysen eingesetzt, sodass eine Menge von 60 µg Protein aufgetragen wurde.

## 2.15 Western Blot

Zunächst wurden die Polyacrylamid-Gele gegossen. Dafür wurden die Porzellan- und Glasscheiben, sowie die Spacer (Hoefer®) in die Polymerisationskammer (Multiple Gel Caster, Amersham) eingesetzt. Anschließend wurden die, in der Tabelle 9 aufgeführten Bestandteile, für das Trenngel zusammengegeben. Je nach Molekulargewicht des untersuchten Proteins wurde der Anteil von Acrylamid im Trenngel von 8-12 % variiert. Dies wurde bis zur vorgegebenen Höhe in die Polymerisationskammer gefüllt und mit Isopropanol (Best.-Nr.: 6752.1, Carl Roth) überschichtet. Sobald das Gel fest war, wurde das Isopropanol abgeschüttet, die Bestandteile für das Sammelgel (Tabelle 9) zusammengegeben und bis zur oberen Kante in

die Polymerisationskammer gefüllt. Die Kämme mit der entsprechenden Anzahl der Wells wurden in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt.

Trenngel			
25 %	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (v/v)	Best.-Nr.: 1185-53-1	Carl Roth
8 %/10 %/ 12 %	Acrylamid (v/v)	Best.-Nr.: 1610158	Bio-Rad
0,1 %	Natriumdodecylsulfat (SDS) (m/v)	Best.-Nr.: 436143	Sigma Aldrich
0,1 %	Ammoniumpersulfat (APS) (m/v)	Best.-Nr.: A3678	Sigma Aldrich
0,15 %	Tetramethylethyldiamin (TEMED) (v/v)	Best.-Nr.: 1.10732	Sigma Aldrich
Sammelgel			
25 %	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (v/v)	Best.-Nr.: 1185-53-1	Carl Roth
12,24 %	Acrylamid (v/v)	Best.-Nr.: 1610158	Bio-Rad
0,1 %	Natriumdodecylsulfat (SDS) (m/v)	Best.-Nr.: 436143	Sigma Aldrich
0,1 %	Ammoniumpersulfat (APS) (m/v)	Best.-Nr.: A3678	Sigma Aldrich
0,15 %	Tetramethylethyldiamin (TEMED) (v/v)	Best.-Nr.: 1.10732	Sigma Aldrich

Tabelle 9: Sammelgel- und Trenngel-Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele für die Western Blots

Sobald das Gel komplett fest geworden war, wurde es in die Laufkammer (SE260, Mighty Small II, Hoefer) eingespannt. Die Kammer wurde wie vorgesehen mit 1X SDS-Laufpuffer (1:10 Verdünnung des ROTIPHORESE® 10X SDS-PAGE, Best.-Nr.: 3060.1, Carl Roth, mit dH<sub>2</sub>O) befüllt. Anschließend wurden vorsichtig die Kämme aus dem Gel entfernt und die, sich ergebenden, Taschen ebenfalls mit 1X SDS-Laufpuffer befüllt. Der Proteinstandard (Novex™, Kat.-Nr.: LC5800, ThermoFisher), sowie die Proben wurden in die Taschen pipettiert. Die Laufkammer wurde an einen Powersupply (Power Pack P25T, Biometra) mit 80 V und 80 mA pro Gel angeschlossen. Sobald die Proben durch das Sammelgel gewandert waren, wurde die Spannung auf 120 V erhöht, so lange bis die Lauffront circa 1 cm über der unteren Kante der Gels gelaufen ist.

Für jedes Gel wurden 2 Whatman®-Papiere (Best.-Nr.: 10426994, VWR) und eine Membran (Immobilon®-PVDF-Membran, Best.-Nr.: IPFL00005, Millipore) mit den Maßen 6,5 cm x 9 cm zugeschnitten. Die Membran wurde für 10 Sekunden in Methanol (MeOH, Best.-Nr.: 67-56-1, VWR) aktiviert. Die Membran wurde in Wasser überführt, so lange, bis kein Wasser mehr

abperlt, gewaschen und dann für mindestens 5 Minuten in den Transfer-Puffer (Tabelle 10) gelegt. Die Whatman®-Papiere wurden sofort in den Transfer-Puffer gegeben. Auf dem unteren Teil der Blottingkammer (V20-Semi-Dry Blotter Unit, Scie-Plas) wurden für jedes Gel ein Whatman®-Papier mit einer Membran darauf aufgelegt. Das Gel wurde vorsichtig aus der Laufkammer genommen und mit dem Spacer von der Glasscheibe auf die Membran überführt. Darauf wurde erneut ein Whatman®-Papier gelegt und etwas Transfer-Puffer darauf gegeben. Durch Rollen mit einer 50 ml-Stripette (Best.-Nr.: 768180, Greiner) wurden die Luftblasen zwischen den Schichten entfernt. Der Deckel der Blottingkammer wurde aufgelegt und eine Spannung von 20 V für 1 Stunde und 10 Minuten angelegt. Dadurch wanderten die Proteine aus dem Gel auf die Membran. Die Banden des Proteinstandards wurden auf der Membran nachgezeichnet und die Membran wurde in TBS-T (Tabelle 10) gewaschen, bevor sie mit 5 %-Milchpulver (Best.-Nr.: T145.2, Carl Roth) in TBS-T auf der Wippe (Polymax 1040, Heidolph) für 1 Stunde blockiert wurde. Nach 3 x 10 min Waschen durch Schwenken mit TBS-T wird die Primär-Antikörper-Lösung dazugegeben.

Dafür werden 5 µl des Antikörpers in 10 ml 5 %- BSA (Best.-Nr.: 9048-46-8, Carl Roth) in TBS-T gegeben und über Nacht bei 4°C auf der Wippe schwenken gelassen. Die Membran wird 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Der Sekundär-Antikörper wurde 1:2000 in 5 %-Milchpulver in TBS-T angesetzt, auf die Membran gegeben und für 1 Stunde geschwenkt. Nach 3 x 10 min Waschen mit TBS-T wurde der Blot detektiert. Je nach Intensität des Signals wurde das intensivere WesternBright Sirius HRP-Substrat (Best.-Nr.: K-12043-D20, Advansta) oder das weniger intensive WesternBright Quantum HRP-Substrat (Best.-Nr.: K-12042-D20, Advansta) verwendet. Die Chemilumineszenz-Detektion erfolgte im Amersham ImageQuant 800 (Cytiva).

TBS-T			
20 mM	Tris-HCl (pH 7,6)	Best.-Nr.: 9090.3	Carl Roth
0,15 M	NaCl	Best.-Nr.: 7647-14-5	VWR
0,1 %	Tween-20 (v/v)	Best.-Nr.: 9005-64-5	Serva
Transfer-Puffer			
25 mM	Tris-HCl	Best.-Nr.: 9090.3	Carl Roth
190 mM	Glycin	Best.-Nr.: 3570	Sigma Aldrich
20 %	Methanol (v/v)	Best.-Nr.: 67-56-1	VWR
Stripping-Puffer			
199 mM	Glycin	Best.-Nr.: 3570	Sigma Aldrich
0,1 %	SDS (m/v)	Best.-Nr.: 436143	Sigma Aldrich
1 %	Tween-20 (v/v)	Best.-Nr.: 9005-64-5	Serva

Natrium-Azid-Lösung

5 % Natrium-Azid

Best.-Nr.: S2002

Sigma Aldrich

Tabelle 10: Zusammensetzung der für die Western Blots verwendeten Puffer

Falls der als nächstes verwendete Primär-Antikörper der gleichen Wirt-Spezies entstammt, wurde ein Stripping-Puffer (Tabelle 10) verwendet, um die bisher gebundenen Primär- und Sekundär-Antikörper von der Membran zu entfernen. Für den Fall, dass der nächste Antikörper, der auf die Membran gegeben werden sollte, von einer anderen Wirts-Spezies stammt, wurde Natrium-Azid-Lösung (Tabelle 10) verwendet, um das HRP des gebundenen Sekundär-Antikörpers zu inaktivieren. In beiden Fällen wurde 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor das Prozedere für die Verwendung von Primär- und Sekundär-Antikörper wie bereits beschrieben wiederholt wurde.

Die in dieser Arbeit für die Western Blots verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper sind in Tabelle 11 aufgeführt:

<u>Primär-Antikörper</u>			
GAPDH	Mouse	Best.-Nr.: MCA 4739	AbD-Serotec
A20	Rabbit	Best.-Nr.: 5630S	Cell Signaling
I $\kappa$ B $\alpha$	Rabbit	Best.-Nr.: 4812	Cell Signaling
Ikk2	Rabbit	Best.-Nr.: 8943	Cell Signaling
Traf3	Rabbit	Best.-Nr.: 4729P	Cell Signaling
p100/p52	Rabbit	Best.-Nr.: 52583	Cell Signaling
P105/p50	Rabbit	Best.-Nr.: 12540	Cell Signaling
RelA/p65	Rabbit	Best.-Nr.: 8242	Cell Signaling
RelB	Rabbit	Best.-Nr.: 10544	Cell Signaling
c-Rel	Rabbit	Best.-Nr.: 12707	Cell Signaling
TBP	Rabbit	Best.-Nr.: 8515	Cell Signaling
HDAC1	Rabbit	Best.-Nr.: sc-7872	Santa Cruz
<u>Sekundär-Antikörper</u>			
Rabbit-HRP	Donkey	Best.-Nr.: GENA934	GE-Healthcare
Mouse-HRP	Sheep	Best.-Nr.: GENA931	GE-Healthcare

Tabelle 11: verwendete Antikörper für Western Blots

## 2.16 Kernproteinisolation aus Gewebe und Zellpellets

Je nach Größe des Gewebestückes oder Zellpellets wurden 50-200 µl Puffer A (Tabelle 12) zugegeben und zerkleinert oder resuspendiert und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Je 50 µl bereits zugegebener Menge Puffer A wurden 3,5 µl 10 % NP-40 (Best.-Nr.: 492016, Merck) hinzugefügt, gut gemischt und 1 Minute bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde bei 10000 rpm und 4°C für 1 Minute zentrifugiert. Die zytoplasmatischen Proteine im Überstand wurden abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Quantifizierung der Proteinmenge, sowie die Einstellung auf 6µg/µl mit Zugabe von Lämmli-Puffer analog der Gesamtproteinlysate durchgeführt.

Das Pellet mit den Kernproteinen wurde in 1 ml Puffer A resuspendiert und 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen ohne das Pellet dabei zu berühren. Etwas mehr als das Volumen des verbleibenden Pellets wurde von Puffer C (Tabelle 12) zugegeben, vorsichtig resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wurde alle 10 Minuten vorsichtig gemischt. Anschließend wurde bei 10000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Kernproteinen wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Quantifizierung und Einstellung der Proteinmenge auf 6 µg/µl erfolgte wie in Abschnitt 2.14 beschrieben.

Puffer A			
10 mM	HEPES (Ethansulfonsäure) pH 7,6	Best.-Nr.: H3375	Sigma Aldrich
10 mM	Kaliumchlorid (KCl)	Best.-Nr.: P9541	Sigma Aldrich
2 mM	Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Best.-Nr.: M8266	Sigma Aldrich
0,1 mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Best.-Nr.: A4892	AppliChem
Puffer C			
50 mM	HEPES (Ethansulfonsäure) pH 7,8	Best.-Nr.: H3375	Sigma Aldrich
50 mM	Kaliumchlorid (KCl)	Best.-Nr.: P9541	Sigma Aldrich
300 mM	Natriumchlorid (NaCl)	Best.-Nr.: 7647-14-5	VWR
0,1 mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Best.-Nr.: A4892	AppliChem
10 %	Glycerin (v/v)	Best.-Nr.: 56-81-5	Merck

Tabelle 12: Pufferzusammensetzung für die Kernprotein-Isolation aus Gewebe und Zellpellets Der pH-Wert wurde mit 1M Natriumhydroxid-Lösung eingestellt.

## 2.17 mRNA-Isolation und cDNA-Synthese aus Gewebe und Zellpellets

Die mRNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Kat.-Nr.: 74106, Qiagen) entsprechend der Angaben im beiliegenden Protokoll des Herstellers.

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde anschließend am NanoPhotometer® (NP80, Implen) vermessen. Die einzelnen Proben wurden entsprechend der Konzentration mit Nuclease-freiem Wasser (Kat.-Nr.: MC1191, Promega) verdünnt, sodass in 12 µl Gesamtvolumen eine Menge von 200 ng mRNA enthalten war.

Es folgte die cDNA-Synthese entsprechend des QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Kat.-Nr.: 205313, Qiagen). Die Proben wurden anschließend auf ein Gesamtvolumen von 200 µl mit Nuclease-freiem Wasser aufgefüllt.

## 2.18 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die aus der mRNA synthetisierte cDNA wurde in der qRT-PCR relativ quantifiziert. Dafür wurde zusätzlich zu dem untersuchten Gen,  $\beta$ -Actin bzw. Ubiquitin als Referenz-Gen mitgemessen, um Variationen in der Ausgangsmenge der Probe relativ ins Verhältnis zu setzen. Zunächst wurde der Master-Mix für alle erwünschten Primer angesetzt und in die Wells der MicroAmp® 96-Well-Platte (Best.-Nr.: 4379983, applied biosystems) vorgelegt. In jedes Well wurde dann 4 µl der, wie in Abschnitt 2.17 beschrieben, vorbereiteten Probe zugegeben. Die Platte wurde anschließend im ViiA7 (applied biosystems) vermessen.

A20 for	CAG AAG AGC AAC TGA GAT CG
A20 rev	GAC ACT CCA TGC AGA GCT CC
AFP for	CTTCCCTCATCCTCCTGCTAC
AFP rev	ACAAACTGGGTAAAGGTGATGG
Albumin for	TCA ACT GTC AGA GCA GAG AAG C
Albumin rev	AGA CTG CCT TGT GTG GAA GAC T
$\alpha$ SMA for	GTC CCA GAC ATC AGG GAG TAA
$\alpha$ SMA rev	TCG GAT ACT TCA GCG TCA GGA
$\beta$ -Actin for	CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC
$\beta$ -Actin rev	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT
CK19 for	GGG GGT TCA GTA CGC ATT GG

CK19 rev	GAG GAC GAG GTC ACG AAG C
HNF4 $\alpha$ for	CTTGGTCATGGTCAGTGTGAAC
HNF4 $\alpha$ rev	AGGCTGTTGGATGAATTGAG GTT
I $\kappa$ B $\alpha$ for	TGA AGG ACG AGG AGT ACG AGC
I $\kappa$ B $\alpha$ rev	TTC GTG GAT GAT TGC CAA GTG
IL-6 for	TACCACTTCACAAGTCGGAGGC
IL-6 rev	CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC
LT $\alpha$ for	TTCTCCGACATGGCTTCTCTT
LT $\alpha$ rev	TGGAAGGGGTATTGGGAGGAA
MCP-1/GM-CSF for	GTG TTG GCT CAG CCA GAT GC
MCP-1/GM-CSF rev	GAC ACC TGC TGC TGG TGA TCC
NF $\kappa$ B2 for	GCCTCTCTTCACCTTAGGCGG
NF $\kappa$ B2 rev	ATCGAAATCTGAAGCCTCGCT
OV-6 for	ATGACATGAAGGTTGTCCTCGG
OV-6 rev	CCCCTTGGTCTTAACATGCTGA
Sox9 for	GGACATCGGTGAACTGAGCA
Sox9 rev	GCGTGACTGTAGTAGGAGCC
TNF for	GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
TNF rev	GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG
Traf3 for	CAGCCTAACCCACCCCTAAAG
Traf3 rev	TCTTCCACCGTCTTCACAAAC
Ubiquitin for	CGT CGA GCC CAG TGT TAC CAC CAA GAA GG
Ubiquitin rev	CCC CCA TCA CAC CCA AGA ACA AGC ACA AG

Tabelle 13: Sequenzen der verwendeten Primer-Paare für die qRT-PCR. Sequenzen sind in 5'  $\rightarrow$  3' angegeben, hergestellt von MWG Biotech, mit Nuclease-freiem Wasser auf 100 pmol/ $\mu$ l eingestellt. In der PCR letztlich eingesetzt mit 0,4 pmol/ $\mu$ l.

## 2.19 Primäre Hepatozyten-Isolation mit anschließender TNF-Stimulation

Nach der Tötung der Maus wurde der Bauchraum geöffnet und der Venenverweilkatheter in die Vena cava inferior gelegt. Der an ein Pumpsystem angeschlossene Schlauch wurde zuvor vollständig mit dem Perfusionspuffer I (Tabelle 14) befüllt. Nachdem sich die Kanüle

vollständig mit Blut gefüllt hatte, wurde der Schlauch an der Kanüle befestigt. Bevor die Pumpe angestellt wurde, wurde die Vena porta durch einen Schnitt eröffnet. Die Leber wurde auf diese Weise mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/min mit dem 37° temperierten Perfusionspuffer I blutleer perfundiert. Währenddessen wurden zu dem Perfusionspuffer II (Tabelle 14) 2 mg Trypsin-Inhibitor (Best.-Nr: 9035-81-8, Sigma-Aldrich) und 10 mg Collagenase Typ II (Best.-Nr.: LS0004176, Pan Biotech, Worthington) gegeben. Nachdem die Leber 5 Minuten perfundiert wurde und komplett blutleer war, wurde die Pumpe kurz gestoppt, der Schlauch von dem Perfusionspuffer I in den Perfusionspuffer II mit zugesetzten Enzymen überführt und erst dann die Pumpe wieder gestartet. So wurde verhindert, dass Luft in das System aufgezogen wird und die Zellen beschädigt. Es wurde so lange über die Perfusion verdaut, bis die Leber weich wurde und sich bei leichtem Druck mit einer Pinzette auf die Oberfläche nicht mehr zusammenzog.

Anschließend wurde die Leber in der Zellkultur mit 10 ml Perfusionspuffer II in ein 10 cm Dish überführt. Mit einer Pinzette wurde die Leber im Bereich der Leberschlagader und des Ductus cysticus fixiert und mit einem Zellschaber die Hepatozyten durch vorsichtiges Streichen aus dem Gewebe gelöst. Die sich daraus ergebene Zellsuspension wurde über einen 70 µm Zellsieb (Best.- Nr.: 542070, Greiner) in ein neues Falcon überführt. 10 ml Williams E-Medium (Best.-Nr.: W4128, Sigma Aldrich) wurden genutzt, um das Dish auszuwaschen und die Suspension aufzufüllen, bevor sie 2 Minuten mit 500 rpm bei 4°C zentrifugierte. Der Überstand wurde aufgenommen und das Pellet in frischem Williams E-Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde 3 mal durchgeführt, bevor das Pellet mit 10 ml Medium (Tabelle 14) aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Nano Entek) bestimmt. Die entsprechende Zellzahl wurde auf die zuvor mit Kollagen beschichteten Zellkultur-Platten (Best.-Nr.: 93100 and 92006, TPP) ausgesäht. Dafür wurden sie mit selbst hergestellter saurer Rattenschwanzkollagen-Lösung beschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Nach Abnehmen der Lösung wurden die Platten unter der Laminar-Air-Flow-Bench (LaboGene ScanLaf Mars) getrocknet und in Parafilm verpackt bei 4°C gelagert.

Sobald die Hepatozyten adhärirt waren, wurden sie je nach Experiment für entsprechende Zeit mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, Best.-Nr.: GFH111-10, HiSS Diagnostics) in Medium ohne FCS (Tabelle 14) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Perfusionspuffer I			
	EBSS ohne Calcium und Magnesium	Best.-Nr.: 12539069	Gibco
0,5 mM	EDTA	Best.-Nr.: A4892	AppliChem
Perfusionspuffer II (pH 7,4)			
	EBSS mit Calcium und Magnesium	Best.-Nr.: 11540616	Gibco
10 mM	HEPES	Best.-Nr.: H3375	Sigma Aldrich
Medium			
	Williams E Medium	Best.-Nr.: W4128	Sigma Aldrich
10 %	FBS Supreme	Best.-Nr.: P30-3031	PAN Biotech
1 %	Penicillin/Streptomycin	Best.-Nr.: 15140-122	Gibco
1 %	L-Glutamin	Best.-Nr.: G7513	Sigma Aldrich
Medium ohne FBS			
	Williams E Medium	Best.-Nr.: W4128	Sigma Aldrich
1 %	Penicillin/Streptomycin	Best.-Nr.: 15140-122	Gibco
1 %	L-Glutamin	Best.-Nr.: G7513	Sigma Aldrich

Tabelle 14: Zusammensetzung von Puffern und Medien für die Isolation primärer Hepatozyten

## 2.20 Immunfluoreszenz-Färbung von Hepatozyten

Die Hepatozyten wurden wie in Abschnitt 2.19 isoliert und analog auf kollagenisierte Ibidi-Wells (Best.-Nr.: 80426, Ibidi®) ausgesäht.

Nachdem sich die Hepatozyten abgesetzt hatten und die toten Zellen abgewaschen wurde erfolgte zunächst die Fixation der Zellen. Dafür wurde das Medium abgesaugt und mit PBS (ohne Ca/Mg, Best.-Nr.: P04-36500, PAN Biotech) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 3 Minuten mit eiskaltem Methanol (MeOH, Best.-Nr.: 67-56-1, VWR) inkubiert. Nach Entfernung des Methanols folgte 3-maliges Waschen mit kaltem DPBS. Anschließend wurden 250 µl Blockierlösung (Tabelle 15) in jedes Well gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Blockierlösung			
	PBS (ohne Ca/Mg)	Best.-Nr.: P04-36500	PAN Biotech
5 %	Bovines Serum Albumin (BSA)	Best.-Nr.: 9048-46-8	Carl Roth
0,1 %	Triton-X 100	Best.-Nr.: 112298	Merck

Primär-Antikörper			
Sox9	Rabbit	Best.-Nr.: D8G8H	Cell Signaling
HNF4a	Mouse	Best.-Nr.: sc-374229	Santa Cruz
CK19	Goat	Best.-Nr.: sc-33111	Santa Cruz
Albumin	Rabbit	Best.-Nr.: sc-50536	Santa Cruz
Sekundär-Antikörper			
Cy3	Goat-anti-rabbit	Best.-Nr.: 111-165-003	Jackson ImmunoResearch
FITC	Goat-anti-mouse	Best.-Nr.: 115-095-166	Jackson ImmunoResearch
Cy3	Donkey-anti-goat	Best.-Nr.: 705-165-147	Jackson ImmunoResearch
FITC	Goat-anti-rabbit	Best.-Nr.: 111-095-144	Jackson ImmunoResearch

Tabelle 15: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Primär-Antikörper-Lösung zugegeben. Dafür wurde der gewünschte Primär-Antikörper 1:200 in 5 %iger BSA-Lösung (Best.-Nr.: 9048-46-8, Carl Roth in PBS, ohne Ca/Mg, Best.-Nr.: P04-36500, PAN Biotech) verdünnt. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde 3-mal mit kaltem DPBS gewaschen, bevor die Sekundär-Antikörper-Lösung zugegeben wurde. Dieser wurde ebenfalls 1:200 in 5 %iger BSA-Lösung verdünnt, wobei zusätzlich Hoechst () in einer Verdünnung von 1:5000 zugegeben wurde. Nach der Inkubationszeit von einer Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde 3-mal mit kaltem PBS gewaschen und zuletzt noch einmal PBS auf die Zellen gegeben, welches nicht wieder abgenommen wird. Anschließend wird die Färbung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss AXIO Observer Z1) mit der Software ZEN begutachtet und fotografiert.

## 2.21 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie werden gleichzeitig zwei Photonen mit niedriger Energie (Infrarotlicht) genutzt, um Fluoreszenzfarbstoffe zu aktivieren. Durch die Verwendung von langwelligem Infrarotlicht bei der Verwendung von zwei Photonen, kann dieses in tiefere Schichten des Gewebes durchdringen ohne signifikante Streuung oder Absorption. Die Technik eignet sich beispielsweise für die Beobachtung dynamischer Prozesse in lebendem Gewebe über lange Zeiträume (Feng et al. 2021). In dieser Arbeit wurde die Leber und die Niere

hinsichtlich des Zelltods ihrer Funktion und diesbezüglich im Besonderen die Aufnahme von Gallensalzanaloga untersucht.

In der Praxis erfolgte dafür zunächst eine Anästhesie der Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion aus Ketamin (100 mg/kg), Xylazin (10 mg/kg), Acepromazin (1,7 mg/kg) und Buprenorphin (0,08 mg/kg). Sobald die Mäuse keine Reflexe mehr auf das Kneifen der Zehen zeigten, wurde der Bauch rasiert und mit Olivenöl eingerieben, damit das Fell die Aufnahmen nicht stört. Unterhalb des Brustbeins wurde die Haut eingeschnitten, um die Leber freizulegen und den linken Leberlappen auf dem Objektträger zu platzieren. Die Maus befand sich dabei in einer auf 36°C temperierten Kammer und wurde während der gesamten Messung mit Isofluran (1-2 %) narkotisiert. Es wurden außerdem kontinuierlich die Atemrate der Maus und der Blutfluss in dem obervierten Bereich der Leber kontrolliert.

Um die Bildgebung zu ermöglichen, wurden über einen Schwanzkatheter intravenös Farbstoffe injiziert. Hoechst 33258 wurde verwendet, um alle Zellkerne anzufärben, wohingegen Sytox green die Zellmembran nur überwinden kann, wenn sie nicht intakt ist und dadurch nur die Zellkerne toter Zellen anfärbt. Tetramethylrhodamin (TMRE) hingegen färbt bei intaktem Membranpotential die Mitochondrienmembran an.

Anhand dieser Färbungen können sowohl der Verlauf der Ausführung von Zelltod-Vorgängen beobachtet, als auch eine allgemeine Begutachtung der Intaktheit der Zellen erfolgen.

Zusätzlich wurde während der Aufnahmen intravenös über den Schwanzkatheter Cholyl-Lysyl-Fluorescein (CLF) injiziert, welches als Gallensalzanalogon fungiert und so durch Beobachtung von dessen Aufnahme in die Zellen einen weiteren Hinweis auf die Funktionsweise des Lebergewebes liefern kann.

Die Experimente wurden von Dr. Ahmed Ghallab im Leibniz-Institut für Arbeitsforschung in Dortmund durchgeführt.

## 2.22 ANA-Autoantikörper-Kit

Die Überprüfung des Serums auf das Vorhandensein von Autoantikörpern wurde mittels ANA-Diagnostik-Kit von Euroimmun (Best.-Nr.: 1512-2005-1, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG) durchgeführt.

Das Kit ist zur Überprüfung von humanen Proben entwickelt, die Überprüfung mit Serum aus etablierten Autoimmun-reaktiven Mausmodellen zeigte jedoch, dass es auch für die Anwendung mit Mausserum geeignet ist.

Auf den Slides sind in jedem Well Hep-2-Zellen und Primatenleber fixiert. Das zu untersuchende Serum wurde in einer Verdünnung von 1:100 in PBS-T (aus dem Kit) darauf gegeben. Es wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS-T für 5 Minuten gespült. Daraufhin wurde ein AF488-gekoppelter anti-IgG-Maus-Antikörper (Best.-Nr.: 115-547-003, Jackson ImmunoResearch) 1:1000 in PBS-T verdünnt, aufgetragen und ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde 5 Minuten mit PBS-T gewaschen und anschließend mit dem, dem Kit beiliegenden Eindeckelmedium und Deckglas eingedeckelt.

Die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung konnte dann am Fluoreszenz-Mikroskop begutachtet werden.

Der Hersteller gibt zudem eine Übersicht heraus, in der je nachdem welcher Bestandteil der Zellen und des Gewebes angefärbt werden, Rückschlüsse getroffen werden können, auf welche Art von Autoimmunerkrankungen ein solches Muster hindeuten könnte.

## 2.23 Immunfluoreszenz-Färbung von Autoantikörpern auf Gewebe von Rag1-defizienten Mäusen

Mäuse, die die Rag1<sup>tm1<sup>Mom</sup></sup> Mutation aufweisen, sind nicht in der Lage reife B- und T-Zellen auszubilden. (Mombaerts et al. 1992) Dies wurde genutzt, um im Serum der Versuchsmäuse Autoantikörper nachzuweisen. Es wurden verschiedene Gewebe, unter anderem Leber, Lunge, Niere, Intestin und Colon, von einer Rag1-defizienten Maus, die freundlicherweise von der AG Lang (Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde, entnommen. Anschließend wurden 10 µm-dicke Kryo-Schnitte am Kryotom (Leica CM3050S) angefertigt. Diese wurden wie in Abschnitt 2.20 beschrieben mit 1:100 verdünntem Serum von wildtypischen und LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen versetzt und mit einem Immunfluoreszenz-gekoppelten anti-IgG-Maus-Antikörper (Best.-Nr.: 115-166-062, Jackson ImmunoResearch), 1:1000 in PBS-T verdünnt, versetzt. Dadurch, dass die Rag1-Maus selbst keine Immunzellen ausbilden kann, werden nur Antikörper angefärbt, die aus dem aufgetragenen Serum stammen und an dem Gewebe gebunden sind.

## 2.24 Isolation von IBDU der Maus zur Kultivierung von Mauscholangiozyten (NMC)

Nach Tötung der Maus wurde der Bauchraum eröffnet. Die Vena porta wurde mit einem Venenverweilkatheter (Vasofix® Safety, Best.-Nr.: 4268113S-01, Braun) kanüliert und eine Ligatur gelegt. Die Vena cava inferior wurde mit einem Schnitt geöffnet und die Leber mit dem Präperfusionspuffer (Tabelle 16) für einige Minuten perfundiert. In der Zeit wurden 3 ml 1 % Agar (m/v, Best.-Nr.: 2267.4, Carl Roth, mit VE-Wasser erhitzt und aliquotiert) in der Mikrowelle erhitzt bis er sich verflüssigte. Der verflüssigte Agar wurde mit 0,1 ml Trypanblau (Best.-Nr.: T8154, Sigma Aldrich) vermischt und in eine 1 ml Spritze (Omnifix®-F, Best.-Nr.: 9161406V, Braun) aufgezogen. Wenn der Agar auf etwa 37-40°C abgekühlt war, wurde der Schlauch aus dem Katheter entfernt und über die Spritze der blaue Agar in die Leber injiziert, bis die Gefäße der Leber durch das Gewebe blau schimmerten.

Die Kanüle wurde entfernt, die Leber herausgelöst, in eine Glaspetrischale mit kaltem Waschpuffer (Tabelle 16) gegeben und auf Eis gestellt. Unter der Sterilupe wurden mit spitzen Pinzetten (FST, Dumont Forceps #55) die blauen Venen freigelegt, indem die Hepatozyten entfernt wurden. Wenn der Waschpuffer zu trüb wurde, wurde die Präparation in einer weiteren Glaspetrischale mit frischem Waschpuffer fortgesetzt. Entlang der blau gefärbten Venen erschienen weißlich die Arterien und Gallengänge. Während die Arterien weiß glänzend schimmern, sind die Gallengänge matt und flexibler. Die abgetrennten 3-5 mm langen Gallengänge wurden in eine 6 cm Cell Dish (Best.-Nr.: 353004, Falcon) mit gekühltem NMC-Vollmedium überführt.

Um die Gallengänge für die Kultivierung in Kollagen einzubetten, wurde frisch Kollagen neutralisiert. Dafür wurden 2,5 ml F-10 (Nutrient Mixture F-10 (HAM), Best.-Nr.: N6635-10, Sigma Aldrich), 0,05 ml Gentamicin (Best.-Nr.: 15710-64, Gibco), 0,25 ml L-Glutamin (Best.-Nr.: G7513, Sigma Aldrich), 0,25 ml 7,5 % (v/v) Natriumhydrogencarbonat (Best.-Nr.: 497-19-8, Merck) und 0,25 ml Soybean Trypsin Inhibitor (STI, Best.-Nr.: 17075-029, Gibco) zusammengegeben. Anschließend wurden 12,5 ml Kollagen zugegeben und mit vorher bestimmter Menge 0,34 N NaOH-Lösung (Best.-Nr.: 106498, Merck verdünnt in VE-Wasser) neutralisiert.

4 ml werden in eine 6 cm Falcon Cell Dish überführt und die Gallengänge darin eingebettet und in den Brutschrank (HeraCell™ 240i) gestellt. Nach ca. 1,5 Stunden härtete das Kollagen aus, dann wurden 4 ml NMC-Vollmedium darüber geschichtet.

### Präperfusionspuffer

140 mM	Natriumchlorid (NaCl)	Best.-Nr.: 7647-14-5	VWR
540 mM	Kaliumchlorid (KCl)	Best.-Nr.: P9541	Sigma Aldrich
640 mM	Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Best.-Nr.: 106559	Merck
2,5 M	HEPES (Ethansulfonsäure)	Best.-Nr.: H3375	Sigma Aldrich
623 mM	EGTA (Ethylenglycolbistetraessigsäure)	Best.-Nr.: 67-42-5	Carl Roth

### Waschpuffer

140 mM	Natriumchlorid (NaCl)	Best.-Nr.: 7647-14-5	VWR
540 mM	Kaliumchlorid (KCl)	Best.-Nr.: P9541	Sigma Aldrich
640 mM	Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Best.-Nr.: 106559	Merck
2,5 M	HEPES	Best.-Nr.: H3375	Sigma Aldrich
0,8 mM	Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Best.-Nr.: 0682.1	Carl Roth
2,5 M	Glucose	Best.-Nr.: 50-99-7	Carl Roth
0,5 mM	Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Best.-Nr.:10043-52-4	Merck

### NMC-Vollmedium

	DMEM/F-12 (HAM's)	Best.-Nr.: FG4815	Sigma Aldrich
10 %	FBS Supreme (v/v)	Best.-Nr.: P30-3031	PAN Biotech
1 %	MEM NEAA (v/v)	Best.-Nr.: 11140-035	Gibco
1 %	Insulin-Transferrin-Selenium Supplements	Best.-Nr.: 51500-056	Gibco
1 %	Chemically Defined Lipid Concentrate (v/v)	Best.-Nr.: 11905-031	Gibco
1,25 %	Soybean Trypsin Inhibitor (m/v)	Best.-Nr.: 17075-029	Gibco
20 mM	L-Glutamin	Best.-Nr.: G7513	Sigma Aldrich
1 %	Penicillin/Streptomycin (v/v)	Best.-Nr.: 15140-122	Gibco
1 %	MEM Vitamin Solution (v/v)	Best.-Nr.: 11120-037	Gibco
0,5 %	Gentamycin (m/v)	Best.-Nr.: 15710-049	Gibco
0,17 %	Triiodothyronin (m/v)	Best.-Nr.: T6397	Sigma Aldrich
0,0025 %	EGF (m/v)	Best.-Nr.: E1257	Sigma Aldrich
0,02 %	Forskolin (m/v)	Best.-Nr.: F3917	Sigma Aldrich
0,0393 %	Dexamethason (m/v)	Best.-Nr.: D4902	Sigma Aldrich

Tabelle 16: Zusammensetzung von Puffern und Medien für die Isolation primärer Mauscholangozyten (NMC)

## 2.25 Passagieren und Einfrieren primärer Mauscholangiozyten (NMC)

Zuvor wurde wie in Abschnitt 2.24 beschrieben Kollagen neutralisiert. Es wurden 4 ml der Lösung in eine Zellkulturflasche (Best.-Nr.: 90026, TPP) gegeben und in den Inkubator gegeben, damit das Kollagen während der Arbeitszeit aushärten kann.

Zunächst wurden die 4 ml Medium, die über die Kollagenschicht geschichtet waren, komplett abgenommen. Anschließend wurden 200 µl Collagenase (HAC)-Lösung (Tabelle 17) zugegeben und die Kollagenschicht vom Boden gelöst. Dies wurde dann circa 45 Minuten im Brutschrank inkubiert, bis die Kollagenschicht komplett aufgelöst war.

Der gesamte Inhalt mit Zellen und aufgelöstem Kollagen wurde mit einer Stripette in ein 15 ml Falcon überführt. Hier sollten sich die Zellen am Boden absetzen. Flotieren die Zellen im Medium, ist das Kollagen noch nicht vollständig gelöst und das Röhrchen sollte bis zur vollständigen Auflösung noch einmal in den Brutschrank gestellt werden. Sollten die Zellen sehr klein sein und sich nicht gut absetzen, kann 1 Minute bei 500g zentrifugiert werden.

<u>Collagenase (HAC)-Lösung</u>			
	DMEM/F-12 (HAM's)	Best.-Nr.: FG4815	Sigma Aldrich
1 %	Highly active Collagenase	Best.-Nr.: C7657	Sigma Aldrich
	Collagenase Typ IX (m/v)		
<u>DMEM/F-12</u>			
	DMEM/F-12 (HAM's)	Best.-Nr.: FG4815	Sigma Aldrich
1 %	Penicillin/Streptomycin (v/v)	Best.-Nr.: 15140-122	Gibco
<u>Trypsin-Lösung</u>			
	DPBS (ohne Mg/Ca)	Best.-Nr.: P04-36500	PAN Biotech
0,01 %	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (m/v)	Best.-Nr.: A4892	AppliChem
0,005 %	Trypsin (m/v)	Best.-Nr.: 25300-054	Gibco
<u>Neutralisierungs-Lösung</u>			
	DMEM/F-12 (HAM's)	Best.-Nr.: FG4815	Sigma Aldrich
5 %	FBS Supreme (v/v)	Best.-Nr.: P30-3031	PAN Biotech
0,0025 %	Soybean-Trypsin-Inhibitor (m/v)	Best.-Nr.: 17075-029	Gibco
<u>Einfriermedium</u>			
40 %	DMEM (v/v)	Best.-Nr.: 11995065	Gibco
40 %	FBS Supreme (v/v)	Best.-Nr.: P30-3031	PAN Biotech
20 %	DMSO (v/v)	Best.-Nr.: A994	Carl Roth

Tabelle 17: Medien und Lösungen zum Passagieren und Einfrieren von Cholangiozyten Alle Medien wurden nach dem Ansetzen und vor der Verwendung mit einem 0,2 µm Filter (Best.-Nr.: 83.1826.001, Sarstedt) steril filtriert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 4 ml DMEM/F-12 (Tabelle 17) gewaschen, dann wieder zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Waschschrift mit 4 ml DMEM/F-12 wird einmal wiederholt, bevor anschließend das Pellet einmal mit PBS (Best.-Nr.: P04-36500, PAN Biotech) gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen wird. Daraufhin werden 500 µl Trypsin-Lösung (Tabelle 17) und die Mischung 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellgruppen durch 3-5-maliges Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 µl Pippette vorsichtig verkleinert. Nun folgte die Zugabe von 2 ml Neutralisierungs-Lösung (Tabelle 17) zum Zell-Trypsin-Gemisch und die anschließende Inkubation von 15-20 Minuten bei Raumtemperatur.

Falls die Zellen sich nicht vollständig am Boden abgesetzt haben wurde die Mischung zentrifugiert, bevor dann der Überstand vorsichtig abgenommen wurde. Es folgten zwei Waschschriffe, in denen jeweils 2 ml DMEM/F-12 (Tabelle 17) zugegeben, zentrifugiert und wieder abgenommen wurden.

Anschließend wurde das Zellpellet in 4 ml NMC-Vollmedium (Tabelle 16) aufgenommen und in die zuvor vorbereitete Kulturflasche mit mittlerweile ausgehärteter Kollagenschicht ausgesät. Sobald sich die Zellgruppen nach einigen Stunden auf der Kollagenschicht abgesetzt haben, erfolgte ein Mediumwechsel.

Bei dem Passagieren der Zellen von Passage 1 zu Passage 2 und von Passage 2 zu Passage 3 erfolgte zudem eine Entfernung von Fibroblasten. Dafür wurden die Zellen nach Aufnahme der Zellpellets in Vollmedium nicht direkt auf eine kollagenisierte Flasche gegeben, sondern zuvor noch auf eine unbehandelte Zellkulturflasche. Diese wurde für 20 Minuten im Inkubator gelagert. Dabei setzen sich in der kurzen Zeit und ohne Kollagenschicht nur die Fibroblasten am Boden der Flasche ab, wohingegen die Cholangiozyten weiter im Medium flotieren. Nach den 20 Minuten werden diese also mit dem Medium wiederaufgenommen und erst dann auf die kollagenisierte Zellkulturflasche ausgesät.

Falls die Zellen eingefroren werden sollten, wurde genauso vorgegangen wie beschrieben, nur dass das Zellpelett nicht in NMC-Vollmedium, sondern in 1,5 ml Einfriermedium (Tabelle 17) aufgenommen wurde und in ein Kryo-Röhrchen überführt wurde. Dieses wurde in einem Mr. Frosty bei -80°C eingefroren.

In dieser Arbeit werden Säulendiagramme verwendet, um die Mittelwerte einer Variablen für verschiedene Gruppen darzustellen. Die Punkte in den Grafiken zeigen die einzelnen Stichprobenwerte einer Variablen. Der Fehlerbalken zeigt jeweils das Intervall zwischen dem Mittelwert minus und dem Mittelwert plus den Standardfehler des Mittelwerts (SEM, engl.: *standard error of the mean*) an. Zum Vergleich der Gruppen wurden die folgenden statistischen Verfahren angewandt: der ungepaarte t-Test und die One-way-ANOVA mit Tukey-Post-hoc-Vergleich.

Beim Vergleich zweier unabhängiger Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, um zu ermitteln, ob zwischen den Mittelwerten der Grundgesamtheiten ein signifikanter Unterschied besteht. Der Test eignet sich, wenn die Daten normalverteilt sind und eine Homogenität der Varianzen vorliegt, was der Einfachheit halber für die untersuchten Datensätze angenommen wird.

Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine One-way-ANOVA (einfachfaktorielle Varianzanalyse) durchgeführt. Damit kann überprüft werden, ob mindestens ein Mittelwert der Grundgesamtheit einer Gruppe signifikant von den anderen abweicht. Die Methode ist geeignet, wenn man eine abhängige Variable in Abhängigkeit einer unabhängigen kategorialen Variable analysieren möchte. Um spezifischere Unterschiede zwischen den Gruppen zu identifizieren, wurde nach der ANOVA ein Tukey-Post-hoc-Vergleich durchgeführt. Dies ermöglicht gezielter herauszufinden, zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede bestehen.

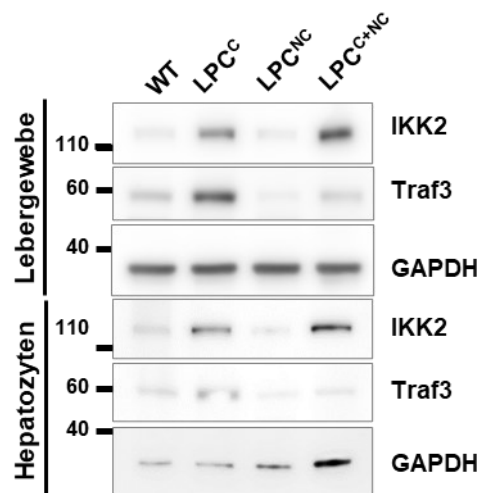
Es wurde angestrebt, dass jede Stichprobengruppe mindestens 6 Werte enthält, um eine ausreichende statistische Aussagekraft zu gewährleisten. An einigen Punkten wurde bewusst auf eine größere Stichprobenanzahl belasteter Tiere verzichtet, da die Ergebnisse bereits mit einer geringeren Stichprobenanzahl eindeutig waren. Dieser Ansatz wurde unter Berücksichtigung tierschutzrechtlicher Aspekte gewählt, um die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten.

Einige Variablen wurden zudem erst im späteren Verlauf der Analysen erfasst und sind daher nicht für alle untersuchten Tiere verfügbar. Für diese Variablen ist der Stichprobenumfang dementsprechend kleiner, um dafür keine zusätzlichen belasteten Tiere zu erzeugen. Entsprechende Einschränkungen sind dokumentiert und wurden bei der Analyse der Daten berücksichtigt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die kombinierte Aktivierung beider NF- $\kappa$ B-Signalwege in LPC ist mit einer Remodellierung der Leberarchitektur und früher Mortalität assoziiert

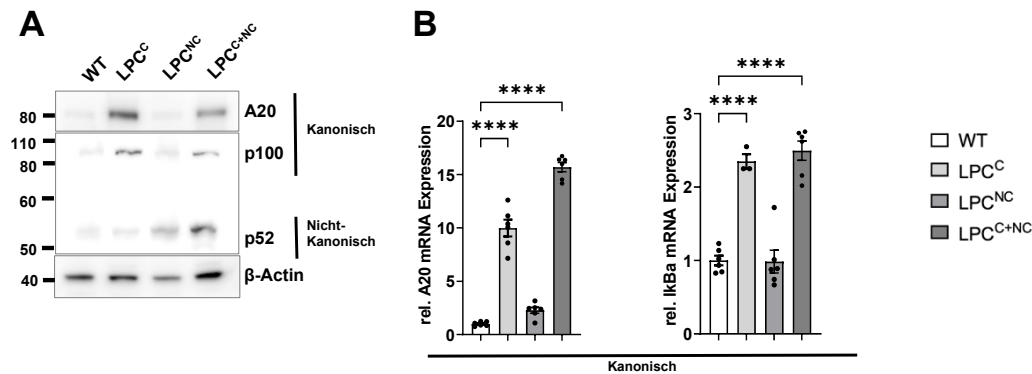
Um den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg in Leberparenchymgewebe zu hyperaktivieren (LPC<sup>C</sup>), wurde eine Punktmutante erzeugt, durch die Ikk2 dauerhaft aktiviert ist. Zur Hyperaktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs in Leberparenchymzellen (LPC<sup>NC</sup>) wurde ein gezielter Knockout von Traf3 vorgenommen. In Mäusen mit kombinierter Überaktivierung (LPC<sup>C+NC</sup>) wurden die Single-Mutanten verpaart, um die synergistischen Effekte beider Signalwege zu analysieren (Übersicht über die Bezeichnungen und Hintergründe der Mauslinien in Tabelle 1 und Abschnitt 2.3.3, 2.3.4). Diese gentechnischen Modifikationen wurden mittels Western Blot zunächst auf Proteinebene validiert. Sowohl gesamtes Lebergewebe, als auch isolierte primäre Hepatozyten zeigten einen Knockout von Traf3 und eine Überaktivierung von Ikk2 in den entsprechenden Mauslinien (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Validierung der spezifischen konstitutiven Aktivierung von Ikk2 bzw. der Gendeletion von Traf3 in Leberlysaten und isolierten primären Hepatozyten mittels Western Blot.**

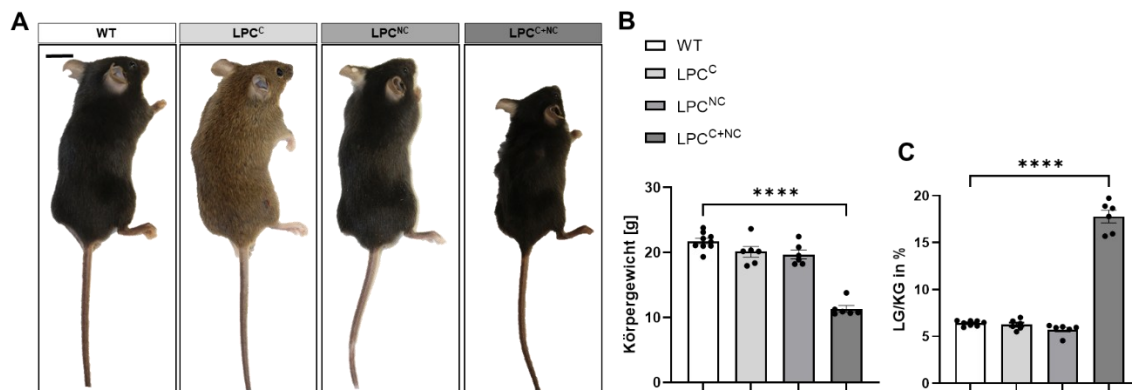
Um nachzuweisen, dass die vorgenommenen Modifikationen, wie beschrieben, tatsächlich zu der Überaktivierung der entsprechenden Signalwege in der Leber führen, wurden Lysate aus primären isolierten Hepatozyten aus den verschiedenen Mauslinien erzeugt und mittels Western Blot und RT-qPCR auf Aktivierung der beiden Signalwege untersucht. Der Western Blot zeigt, dass in allen Mauslinien mit überaktivem kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg die Expression des Zielgens A20 im Vergleich zu Wildtyp-Hepatozyten auf Proteinebene erhöht vorlag (Abbildung 6A). Dies spiegelte sich auch in den RT-qPCR-Daten wider: die

Hepatozytenextrakte mit überaktivem Ikk2 und damit hyperaktivem kanonischem NF- $\kappa$ B-Signalweg zeigten eine erhöhte A20-Expression. Zudem war die Expression von Ikb $\alpha$  und p100 (NF- $\kappa$ B2) in den Hepatozytenextrakten dieser Mäuse erhöht (Abbildung 6B). Die vermehrte Spaltung zu p52, die mit der Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs einhergeht, war nur in Hepatozyten von Tieren mit Traf3-Deletion nachweisbar (Abbildung 6A). Diese Daten bestätigen die Funktionalität der eingesetzten Mausmodelle.



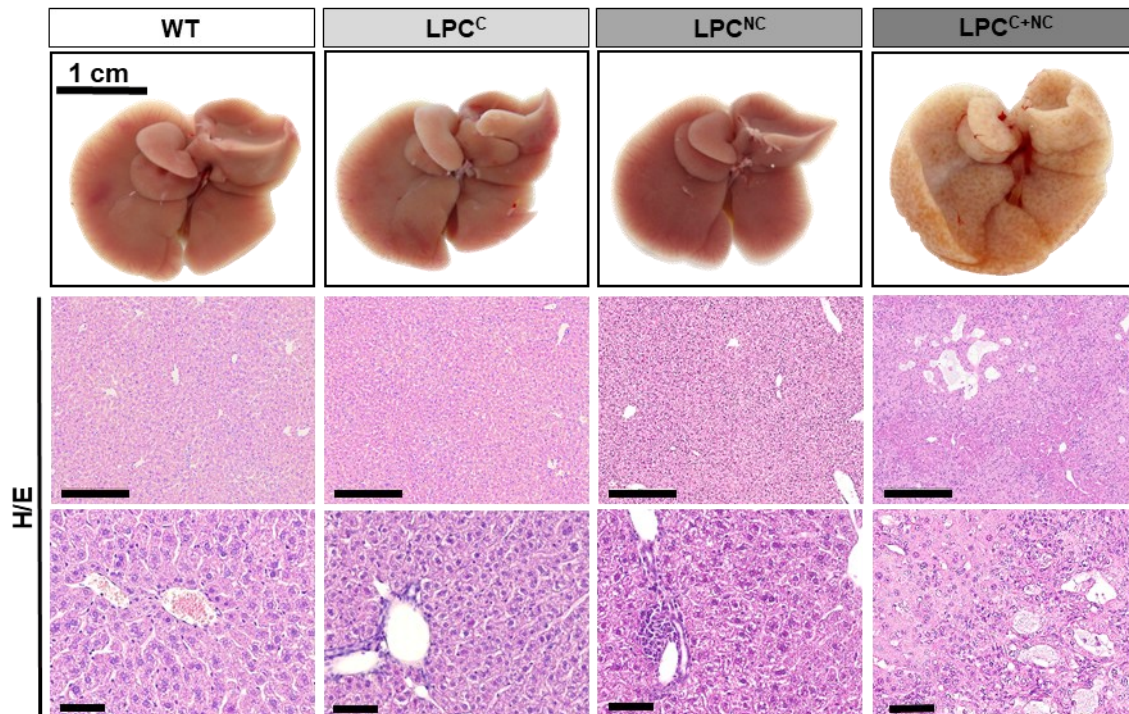
**Abbildung 6: Nachweis der konstitutiven Aktivierung des kanonischen bzw. nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs aufgrund der genetischen Manipulation von Ikk2 und Traf3.** (A) Western Blot Analyse der A20 und p100 Proteinexpression bzw. dessen Spaltung zu p52 als Zielstruktur des kanonischen bzw. nicht-kanonischen Signalwegs. Relative Genexpression von (B) A20 und Ikb $\alpha$  als Zielgene des kanonischen Signalwegs. One-way ANOVA mit Tukey post-hoc Vergleich. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ,  $n = 6$ .

Beim äußeren Erscheinungsbild der Mäuse fiel auf, dass die LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse kleiner sind, als gleichaltrige Wildtyp- oder LPC<sup>C</sup>- und LPC<sup>NC</sup>- Mäuse (Abbildung 7A). Dies spiegelte sich auch in einem um die Hälfte reduzierten Körpergewicht wider (Abbildung 7B). Ein Indikator für das Vorhandensein von Lebererkrankungen, ist das Verhältnis aus Körpergewicht zu Lebergewicht (LG/KG). Dieser ist unter gesunden Umständen innerhalb einer Spezies sehr konstant, sodass eine Abweichung ein Indikator für pathologische Vorgänge sein kann (Cattley and Cullen 2013). Da die Größe der Leber in den deutlich kleineren LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen vergleichbar mit denen, der anderen Mäuse war, ergibt sich ein signifikanter Anstieg des LG/KG-Verhältnisses (Abbildung 7C).



**Abbildung 7: Die simultane Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalwegs in LPC resultiert in einem erhöhten Leber-/Körpergewichts-Verhältnis.** (A) Repräsentative Bilder des äußeren Erscheinungsbilds der jeweiligen Mauslinie. (B) Gegenüberstellung des Körpergewichts und des Verhältnisses von Leber- zu Körpergewicht (LG/KG). Die hellere Fellfarbe der LPC<sup>C</sup>-Maus ist mit dem genetischen Hintergrund assoziiert (siehe Abschnitt 2.3.3). One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich. \*\*\*\* p<0,0001, n=6.

Die Lebern von 6-Wochen alten LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen erschien deutlich heller im Vergleich zu den Lebern der anderen Genotypen. Dies wurde durch eine geringere Durchblutung hervorgerufen (Abbildung 8). Makroskopisch war zudem eine stark verhärtete und veränderte Struktur festzustellen, was durch die H/E-Färbung bestätigt wurde. Während bei den LPC<sup>C</sup>- und LPC<sup>NC</sup>-Lebern die normale Leberarchitektur, wie sie auch in den Wildtyp-Kontrollen erkennbar ist, erhalten war, waren die LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern strukturell verändert. In den periportalen Bereichen breiteten sich Gallengangsepithelien aus und Immunzellen infiltrierten in das umliegende Gewebe (Abbildung 8). Nur noch wenige Bereiche mit den charakteristischen Hepatozyten sind erkennbar. Die übliche Morphologie des Leberparenchyms, in dem die Zentralvene und periportale Glisson-Trias vorhanden sind, ist nicht mehr erkennbar.



**Abbildung 8: Erhebliche morphologische Veränderungen der Leberstruktur durch aktivierende Modifikation beider NF- $\kappa$ B Signalwege.** Repräsentative makroskopische und mikroskopische Aufnahmen der Leber und H/E gefärbter Leberschnitte des jeweiligen Mausmodells im Alter von 6 Wochen. Der Maßstabsbalken der H/E-Aufnahmen entspricht 300  $\mu$ m (oben) bzw. 100  $\mu$ m (unten).

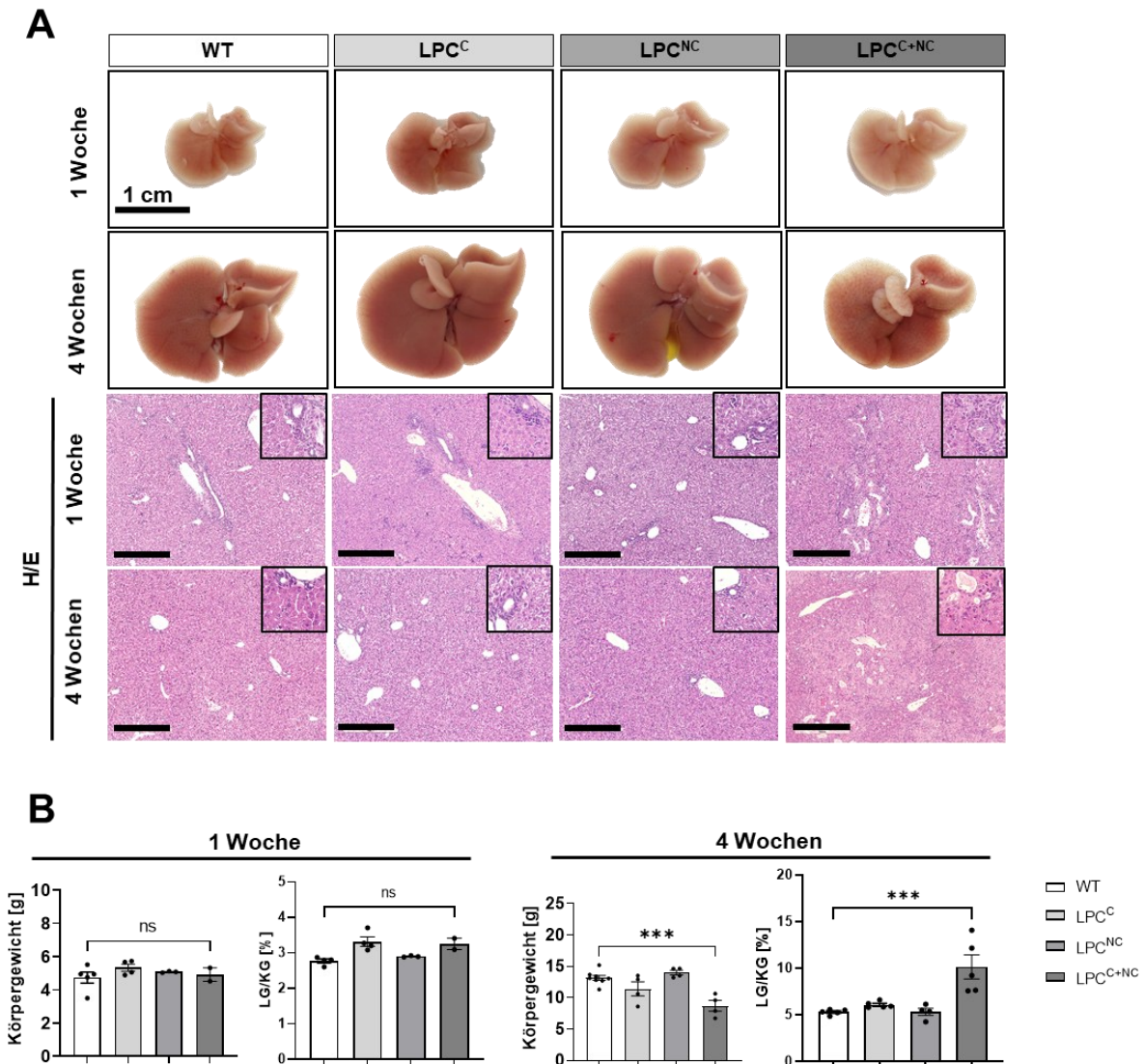
Um zu untersuchen, ob es sich um eine angeborene oder mit zunehmendem Alter entstehende Entwicklungsstörung handelt, wurden 1- und 4-Wochen alte Tiere und deren Lebern begutachtet.

Die Lebern der 1-Wochen alten LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse waren makroskopisch unauffällig und nicht von denen der anderen Genotypen zu unterscheiden (Abbildung 9A). In den H/E-Färbungen ist ebenfalls eine dem Alter entsprechende Leberarchitektur erkennbar. Lediglich in den periportalen Bereiche sind an einigen Stellen Ausbreitungen des Gallengang-Systems und diffuse Veränderungen erkennbar.

Im Alter von 4 Wochen waren bei den LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern bereits makroskopische Veränderungen festzustellen. Sie waren zwar noch nicht ganz so ausgeprägt, wie im Alter von 6 Wochen, jedoch im Vergleich mit den gesunden Lebern erkennbar. Auch sie wiesen eine hellere, weniger durchblutete, fleckige Struktur und bereits eine leichte Verhärtung auf. In den H/E-Färbungen ist ersichtlich, dass die periportalen Veränderungen sich weiter ausbreiteten und manifestierten. Bei den anderen untersuchten Mausmodellen zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede verglichen mit den wildtypischen Mäusen.

Die Beobachtungen spiegeln sich auch in den Gewichten der Mäuse und den LG/KG-Verhältnissen wider (Abbildung 9B) und deuten darauf hin, dass sich der Leberphänotyp der

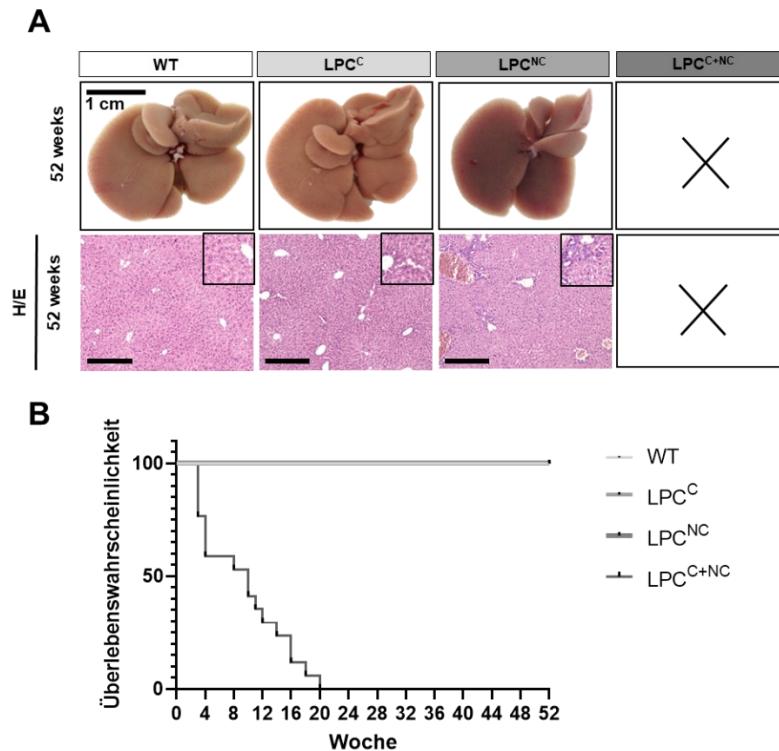
LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse postnatal im Alter von 1-3 Wochen entwickelt und im weiteren Verlauf manifestiert.



**Abbildung 9: Die Phänotypausprägung der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse entwickelt sich in den ersten 4 Lebenswochen.** (A) Repräsentative makroskopische und mikroskopische Aufnahmen der Leber und H/E gefärbter Leberschnitte des jeweiligen Mausmodells im Alter von 1 - und 4 Wochen. Der Maßstabsbalken der H/E-Aufnahmen entspricht 200 µm. (B) Gegenüberstellung des Körpergewichts und des Verhältnisses von Leber- zu Körpergewicht der verschiedenen Genotypen im Alter von 1 Woche und 4 Wochen. One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich. \*\*\* p<0,001, ns = nicht signifikant, 1 Woche: n=2-5, 4 Wochen: n = 4-5.

Um zu überprüfen, ob sich ein ähnlicher Phänotyp auch im Altersverlauf von LPC<sup>C</sup> und LPC<sup>NC</sup> Tieren entwickelt, wurden die Lebern von 52 Wochen alten Tieren untersucht (Abbildung 10A). Im Zuge dieser Alterung wurde eine signifikant frühere Sterblichkeit von LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen festgestellt (Abbildung 10B). Auch im Alter von 52 Wochen zeigten weder LPC<sup>C</sup>-Mäuse noch die LPC<sup>NC</sup>-Mäuse eine derartige Umstrukturierung des Lebergewebes, wie es in LPC<sup>C+NC</sup>-

Mäusen zu beobachten war. Bei den  $LPC^{NC}$ -Lebern ist in der H/E-Färbung eine duktiläre Reaktion erkennbar, das Ausmaß ist jedoch nicht mit dem der  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen vergleichbar. Zusammenfassend ist die parallele Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs in LPC mit einer Remodellierung der Leberarchitektur und einer frühen Mortalität assoziiert.

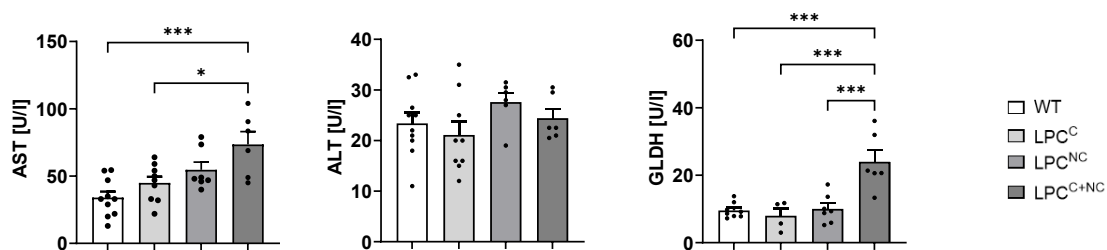


**Abbildung 10:  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen weisen eine erhöhte Mortalität auf.** (A) Repräsentative makroskopische und mikroskopische Aufnahmen der Leber und H/E gefärbter Leberschnitte des jeweiligen Mausmodells im Alter von 52 Wochen. Aufgrund des frühen Versterbens der  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse sind keine Bilder von 52-Wochen alten Lebern vorhanden. (B) Kaplan-Meier-Plot zur Darstellung der durchschnittlichen Überlebensdauer der jeweiligen Mausmodelle, n=15.

### 3.2 Untersuchung des hepatischen Zelltods nach Überaktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege

Wie in den vorangegangenen Ergebnissen gezeigt, konnte eine Umstrukturierung der Leberarchitektur, die mit einer Reduktion der Hepatozytenareale und einer Ausbreitung der biliären Nische assoziiert war, beobachtet werden und impliziert eine Schädigung der Leber. Klinisch korreliert vermehrter hepatozellulärer Zelltod mit der Entwicklung von Fibrose, Zirrhose und letztlich der Entstehung hepatozellulärer Karzinome (Luedde, Kaplowitz, and Schwabe 2014). Der Anstieg von Transaminasen wie Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) sowie der Glutamin-Dehydrogenase (GLDH) gelten als etablierte Biomarker für den Untergang von Leberparenchymzellen und weisen somit auf eine

Leberschädigung hin (Lala, Zubair, and Minter 2024). Serologische Untersuchungen in sechs Wochen alten Mäusen zeigten eine signifikante leichte Erhöhung von zirkulierenden AST in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen, wohingegen der ALT-Wert nicht anstieg (Abbildung 11). Da ein Anstieg des AST-Wertes auch durch andere Faktoren beeinflusst werden kann, wurde zusätzlich der GLDH-Wert herangezogen (Schomaker et al. 2020). Auch dieser war im Serum der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse im Mittel doppelt so hoch wie bei den drei anderen Linien (Abbildung 11). In den LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern lag also eine leichte Schädigung der Leberzellen vor. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Werte bei starken Leberschädigungen mit massivem Hepatozyten-Zelltod deutlich höhere Werte von über 1000 U/l annehmen können (Bettermann et al. 2010).

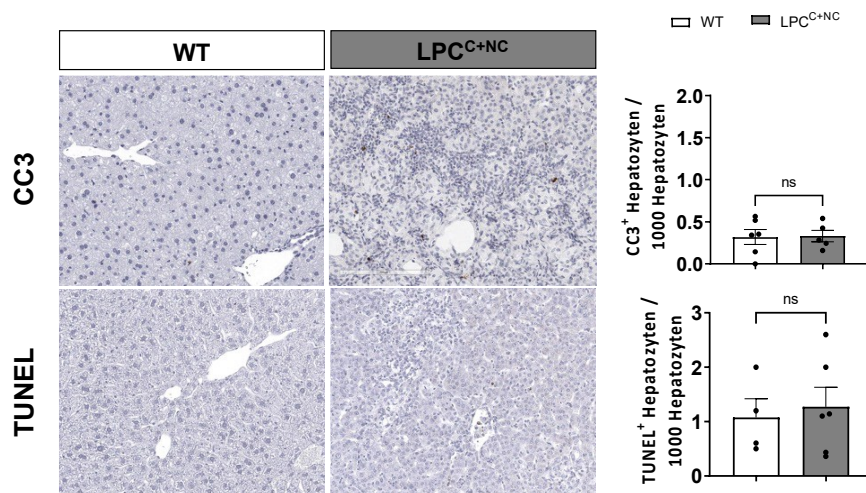


**Abbildung 11: Serologische Untersuchungen zeigen eine leichte Hepatitis bei LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen.** Serumwerte der jeweiligen Mauslinien im Alter von 6 Wochen im direkten Vergleich für AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase und GLDH = Glutamin-Dehydrogenase. One-Way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich \* p<0,05, \*\*\* p<0,001, n=6.

Da die LPC<sup>C</sup>- und LPC<sup>NC</sup>-Proben keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem Wildtyp aufwiesen, wurden sie in diesem Abschnitt nicht weiter aufgeführt (Abbildung 11). Um weiter zu überprüfen inwieweit insbesondere bei den starken Leberveränderungen der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse der Zelltod eine Rolle spielt, wurden immunhistologische Untersuchungen des Lebergewebes mit Zelltodmarkern durchgeführt und mit der wildtypischen Situation verglichen.

Hierfür wurde zum einen gespaltenes Caspase 3 (CC3, engl.: *cleaved Caspase 3*) angefärbt, welches Bestandteil der Exekution von Apoptose ist und somit ein Marker für apoptotische Zellen darstellt (Abbildung 12). Die Quantifizierung der CC3<sup>+</sup> Zellen zeigte keine Erhöhung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass in den Lebern von LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen keine vermehrte Apoptose auftrat. Zusätzlich wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt, um fragmentierte DNA-Stränge zu identifizieren, die als zusätzlicher

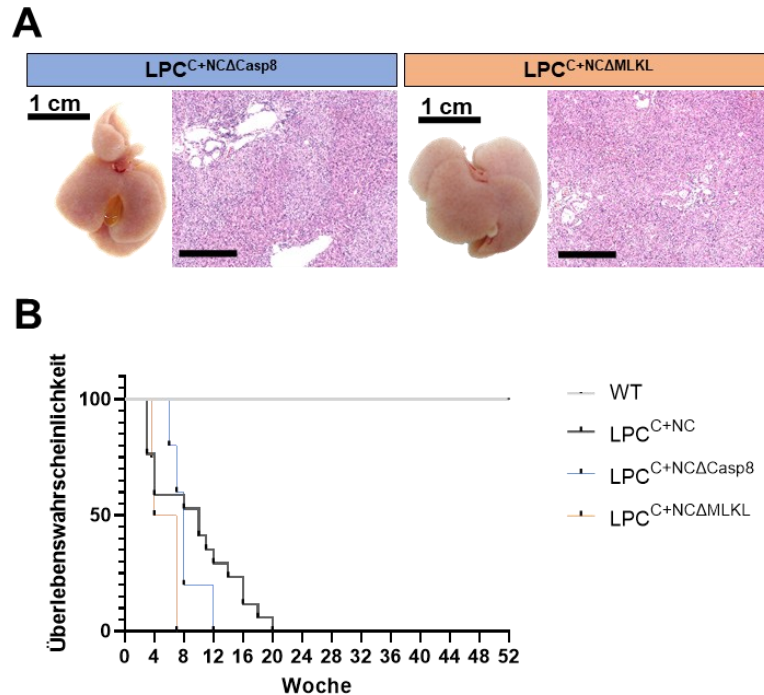
Marker für Zelltod, einschließlich nekrotischer Formen, dienen. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und den  $LPC^{C+NC}$ -Lebern.



**Abbildung 12: Die TUNEL- und CC3-Färbung zeigt keinen erhöhten Zelltod in  $LPC^{C+NC}$ -Lebern.** (A) Immunhistochemische CC3-Färbung und TUNEL-Färbung zur Detektion von DNA-Strangbrüchen in 3  $\mu$ m-dicken Gewebsschnitten von in Paraffin eingebetteter Leber. (B) Quantitative Auswertung der IHC-Färbungen. Ungepaarter t-Test. ns = nicht signifikant, n=5-6.

Zur weiteren Untersuchung der Einflussnahme von kontrolliertem Zelltod, wurde die  $LPC^{C+NC}$ -Maus zum einen mit einer  $Caspase8^{LPC-KO}$ - und zum anderen mit einer  $MLKL^{LPC-KO}$ -Maus gekreuzt. Durch die zusätzliche Deletion von Caspase 8 bzw. MLKL als zentrale Vermittler von Apoptose (Caspase 8) bzw. Nekroptose (MLKL), konnte dessen Einfluss noch einmal *in vivo* ermittelt werden. Beide Konstellationen führten jedoch zu einem vergleichbaren Phänotyp, wie bei den  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen. Sie zeigten sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch ähnlich starke Veränderungen des Leberparenchym-Gewebes (Abbildung 13A) und keine Verlängerung des Überlebens (Abbildung 13B).

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass der programmierte Zelltod in  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen nicht aktiviert vorlag und nicht die Grundlage der strukturellen Veränderungen in  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen darstellt.

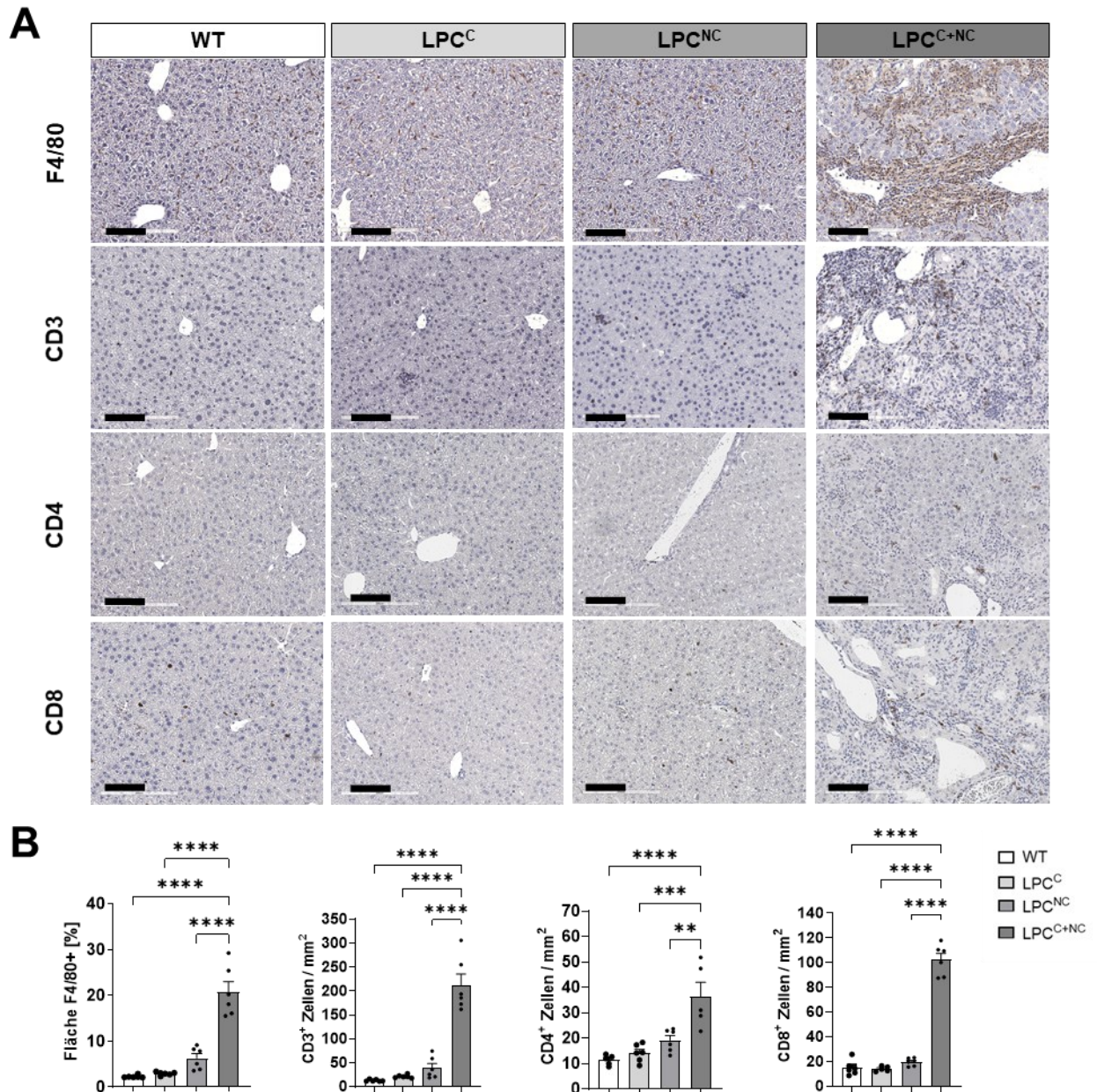


**Abbildung 13: Die zusätzliche Inhibierung der Apoptose bzw. Nekroptose hat keinen protektiven Einfluss auf die Leberstruktur oder die Überlebenswahrscheinlichkeit.** (A) Makroskopische Darstellung der Lebern mit zusätzlicher Caspase8- bzw. MLKL-Deletion, sowie entsprechende H/E-Färbung der 3  $\mu$ m dicken Gewebsschnitte von in Paraffin eingebetteter Leber. Maßstabsbalken in der H/E-Färbung entspricht 200  $\mu$ m. (B) Kaplan-Meier-Plot über die Überlebenswahrscheinlichkeit. n=4-15

### 3.3 Simultane Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege führt zu intensivem Inflammationsgeschehen in der Leber

Da das Fortschreiten von Erkrankungen neben dem programmierten Zelltod auch entscheidend durch die Rekrutierung von Immunzellen im Rahmen der Inflammation beeinflusst werden kann, wurden im Folgenden die Inflammationsprofile für die verschiedenen Modelle differenziert.

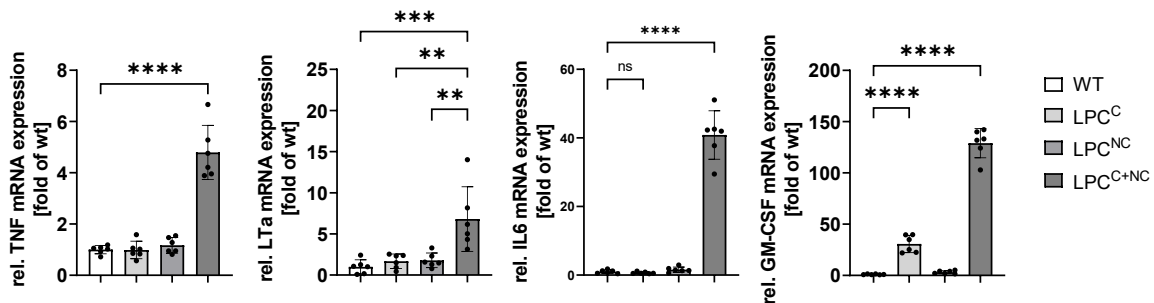
Um zu identifizieren, welche Immunzellen das Lebergewebe infiltrieren, wurden immunhistochemische Färbungen der Lebergewebsschnitte auf das Transmembranprotein CD3 (*engl.: Cluster of Differentiation 3*) von T-Lymphozyten und zudem F4/80 zur Identifizierung von Makrophagen durchgeführt. Sowohl im Vergleich zum WT, als auch im Vergleich zu den Single-Mutanten LPC<sup>C</sup> und LPC<sup>NC</sup>, weisen die Lebern der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse eine ausgeprägte Anreicherung von Makrophagen und T-Zellen auf. Bei ihnen findet sich flächenanteilig die 6-fache Menge Makrophagen in der Leber und bei den T-Zellen steigert sich die Anzahl um knapp das 20-fache verglichen mit den Wildtypen. (Abbildung 14)



**Abbildung 14: Ausgeprägte Immunzellinfiltration in Lebergewebe der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse. (A)** Immunhistochemische Färbung auf F4/80, CD3, CD4 und CD8 von 3 µm-dicken Gewebsschnitten aus in Paraffin eingebetteten und entwässertem Gewebe von 6-Wochen alten Tieren. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. **(B)** Quantitative Auswertung der Färbungen. One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001, n=6.

Um die Funktion und das Immunverhalten der T-Zellen weiter zu spezifizieren, folgte die immunhistochemische Färbung von CD4 (*engl.: Cluster of differentiation 4*)-positiven T-Helferzellen, sowie Monozyten und Makrophagen und CD8 (*engl.: Cluster of differentiation 8*)-positiven zytotoxische T-Zellen. Das Verhältnis der CD4- zu CD8-positiven T-Zellen kann Hinweise auf den Immunstatus geben. Ein hohes Verhältnis CD4/CD8 deutet

auf eine starke Unterstützung der Immunantwort durch die CD4-positiven T-Helferzellen, wohingegen ein niedriges Verhältnis CD4/CD8 in vielen Fällen auf eine aktive zytotoxische Immunantwort hindeutet, zum Beispiel gegen Infektionen oder Tumoren (Wang et al. 2001). In den LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern waren verglichen mit den anderen Genotypen sowohl vermehrt CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, als auch CD8<sup>+</sup>-zytotoxischer-T-Zellen infiltriert. Durch den extremen Anstieg von CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen-T-Zellen auf das 10-fache der Vergleichsgruppen, ergibt sich ein niedriges CD4/CD8-Verhältnis, was für eine zytotoxische Immunantwort spricht. Um das Inflammationsgeschehen weiter zu charakterisieren erfolgte die Messung von Inflammationsmarkern über eine RT-qPCR aus primären Hepatozyten (Abbildung 15).

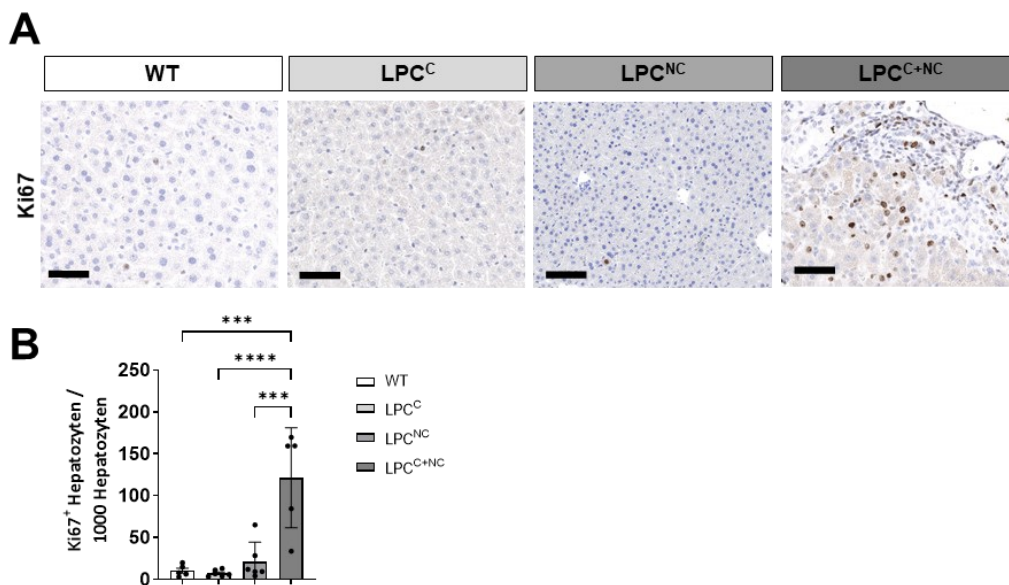


**Abbildung 15: RT-qPCR der unbehandelten isolierten primären Hepatozyten zeigen erhöhte Entzündungsmarker.** TNF (Tumornekrosefaktor), IL-6 (Interleukin-6), LT- $\alpha$  (Lymphotoxin-alpha), GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor), One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ,  $n = 6$ .

Die untersuchten Zytokine spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort. Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-6 (IL-6) sind klassische Marker für Entzündungsreaktionen und werden bei Infektionen und Autoimmunerkrankungen stark exprimiert. Da bei einer Autoimmunantwort das Immunsystem körpereigene Zellen angreift wird eine chronische Entzündung aufrechterhalten, die mit erhöhten Spiegeln dieser Zytokine einhergeht (Bovensiepen et al. 2019). Auch die Ausschüttung des Granulozyten-Makrophagen-stimulierendem Faktor (GM-CSF) in hohen Mengen durch schwere Infektionen führt zu einer systemischen Entzündungsreaktion (Uciechowski and Dempke 2020). Während die Single-Mutanten vergleichbare Werte, wie die Wildtypen zeigten, war bei den LPC<sup>C+NC</sup>-Hepatozyten die Expression aller vier Zytokine erhöht. Die IL-6-Expression weist mit einer Erhöhung um das 40-fache gegenüber den wildtypischen Vergleichstieren die größte Steigerung auf. In Kombination mit erhöhter Expression von TNF kann das auf eine chronische Leberentzündung mit Immunaktivität gegen Leberzellen hindeuten (Chaouali et al. 2020).

### 3.4 LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse entwickeln eine hepatische Fibrose mit Hepatozytenverlust bei gleichzeitiger Cholangiozytenexpansion

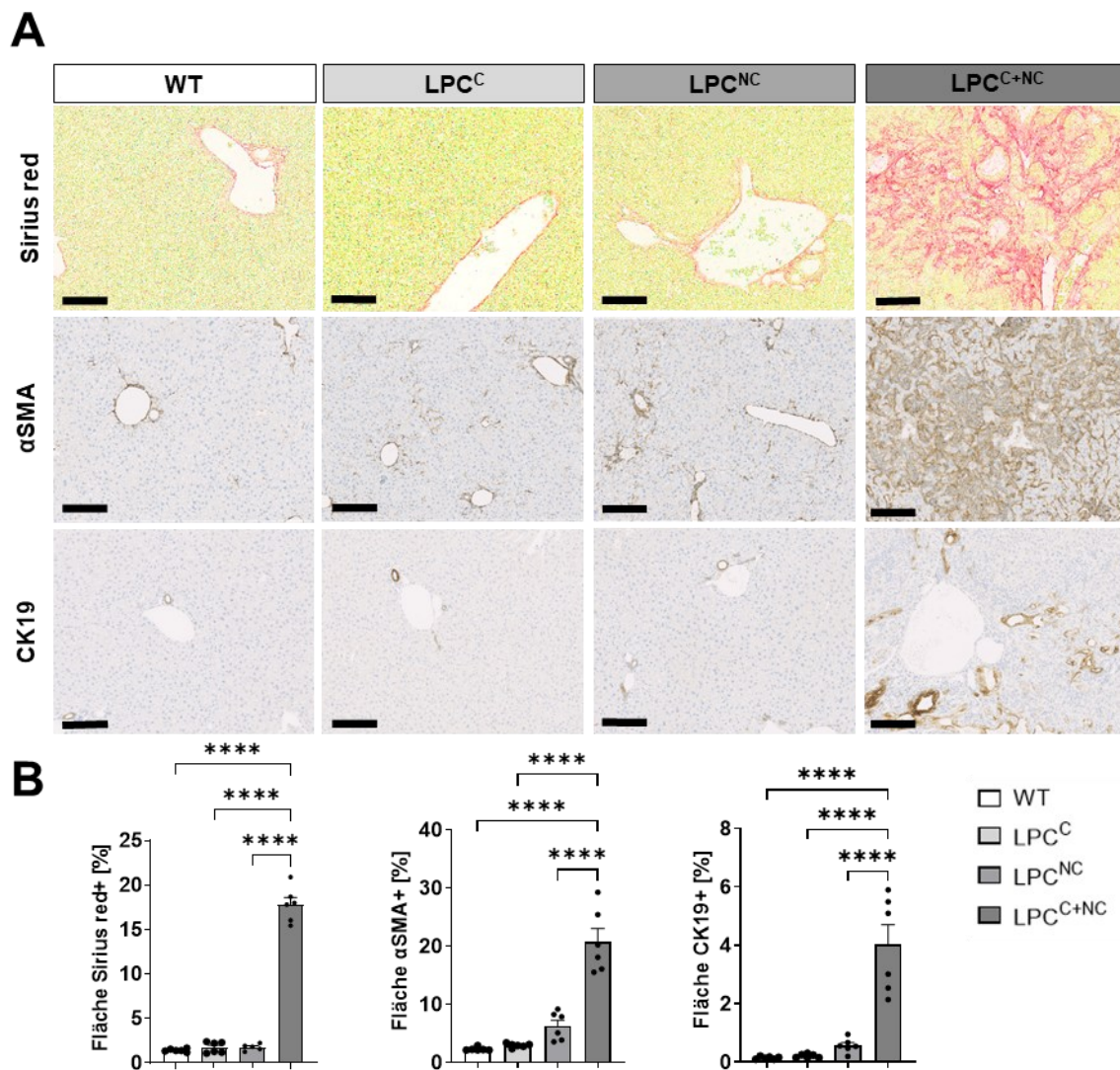
Als potenzielle Folge der Entzündung und möglicher Beitrag zu dem erheblichen strukturellen Umbau der Leber, der mit einem erhöhten LG/KG-Verhältnis einhergeht, wurde die Proliferation der Leberzellen untersucht. Dafür wurde Ki67, welches ausschließlich in der aktiven Phase des Zellzyklus exprimiert wird, immunhistochemisch in Leberschnitten angefärbt. Während die LPC<sup>C</sup>-Lebern kein Unterschied hinsichtlich der Hepatozyten-Proliferation verglichen zu den Wildtyp-Tieren zeigten, waren bei den LPC<sup>NC</sup>-Tieren vereinzelt proliferierende Hepatozyten erkennbar (Abbildung 16A). Erneut ist mit dem durchschnittlichen Anstieg der Hepatozyten-Proliferation um das 10-fache der Unterschied in den LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern klar von den anderen Modellen abzugrenzen (Abbildung 16B). Zusätzlich zur erhöhten Proliferation der Hepatozyten wurde auch eine verstärkte Proliferation in den biliären Kompartimenten festgestellt.



**Abbildung 16: LPC<sup>C+NC</sup>-Tiere weisen eine erhöhte Proliferation der Hepatozyten auf.** (A) Repräsentative Ausschnitte der immunhistochemischen Ki67-Färbung von 3 µm dicken Gewebsschnitten aus in Paraffin eingebetteter Leber von 6-Wochen alten Tieren. (B) quantitative Auswertung der Ki67-Färbung. One-way ANOVA mit Tukey post-hoc Vergleich. \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001. n=6

Zur weiteren Charakterisierung der Periportalfelder wurde die vorliegende Fibrose mittels Sirius Red-Färbung der Lebergewebsschnitte von 6 Wochen alten Mäusen quantifiziert (Abbildung 17A, oben). Die Quantifizierung zeigt, dass bei LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen bis zu 20 % der Leberfläche mit fibrotische Kollagenstrukturen durchzogen war (Abbildung 17B).

Als zentraler Bestandteil der Leberfibrose gilt die Aktivierung von hepatischen Sternzellen in Kollagen-synthetisierende Myofibroblasten, welche sich durch die Expression von  $\alpha$ SMA auszeichnen. Auf dieser Grundlage wurde in den Leberschnitten ebenfalls  $\alpha$ SMA immunhistochemisch angefärbt (Abbildung 17A, Mitte). Auf den repräsentativen Ausschnitten von den Lebern der  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse und deren Quantifizierung war ein signifikanter Anstieg von  $\alpha$ SMA positivem Gewebe zu beobachten (Abbildung 17B).

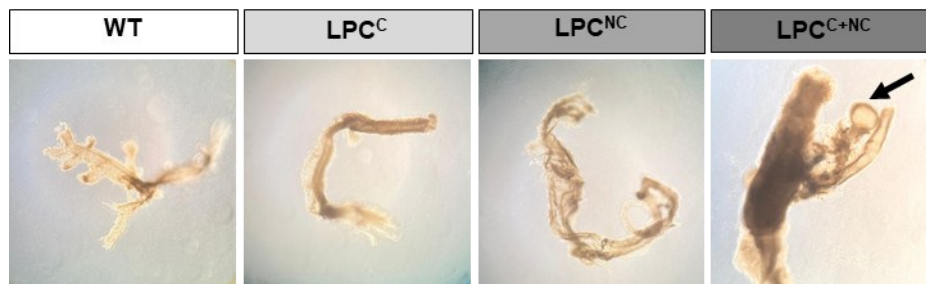


**Abbildung 17: Leberschnitte der  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse weisen eine starke Fibrose auf.** (A) 3 $\mu$ m dicke Leberschnitte von in Paraffin eingebetteter Leber 6-Wochen alter Mäuse gefärbt mit Sirius Red und Immunhistochemische Färbung von  $\alpha$ SMA und CK19. Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m. (B) Quantitative Auswertung der Färbungen. One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , n=6

Aufgrund der Expansion der biliären Kompartimente wurde eine immunhistochemische Färbung von Cytokeratin 19 (=CK19), welches vorzugsweise in Cholangiozyten exprimiert wird, durchgeführt (Abbildung 17A, unten). Hiermit lässt sich überprüfen, ob es sich bei den

vielen Gefäßen in den Periportalbereichen um expandierende Gallengänge handelt. Im Vergleich mit den Leberschnitten von Wildtypen aber auch mit denen der Einzelmutanten ist eine Steigerung der CK19<sup>+</sup>-Fläche um das 10-fache zu erkennen (Abbildung 17B).

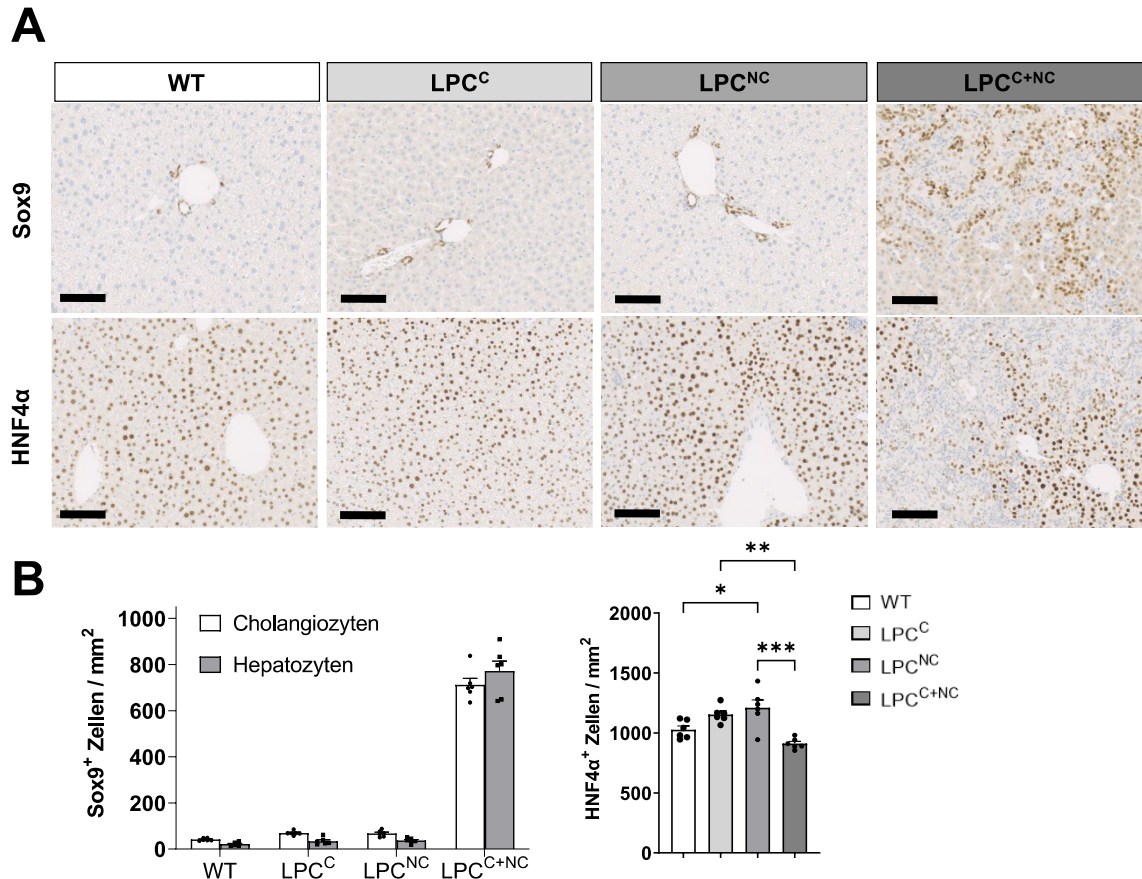
Zudem konnten bei der Isolierung intrahepatischer Gallengänge zur anschließenden Kultivierung von Cholangiozyten unter dem Mikroskop bei LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen mehrfach Gallengangszysten beobachtet werden (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Intrahepatische LPC<sup>C+NC</sup>-Gallengänge bilden Zysten aus.** Repräsentative mikroskopische Bilder von isolierten intrahepatischen Gallengängen aus den verschiedenen Mauslinien. Der Pfeil zeigt eine Gallengangszyste.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, waren die fibrotischen Bereiche in den Lebern der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse signifikant größer als Leberareale, die Hepatozyten aufweisen. Normale Strukturen, wie sie in einer gesunden Leber vorliegen, sind kaum noch erkennbar.

Zur Identifizierung der in den veränderten Bereichen vorkommenden Zelltypen sowie zur Quantifizierung der verbleibenden intakten Hepatozyten wurden immunhistochemische Färbungen gegen HNF4 $\alpha$  als Hepatozyten-Marker und Sox9 als Cholangiozyten- und Ovalzell-Marker durchgeführt (Abbildung 19A). Sox9 ist ein Cholangiozytenmarker, der allerdings auch verwendet wird, um hepatische Stammzellen (Ovalzellen) und Vorläuferzellen in bestimmten Gallenwegs-assoziierten Lebererkrankungen zu identifizieren. Ovalzellen (=Progenitorzellen) sind hepatische Vorläuferzellen, die normalerweise während der embryonalen Entwicklung zu Hepatozyten oder Cholangiozyten ausdifferenzieren (Sahoo et al. 2022).

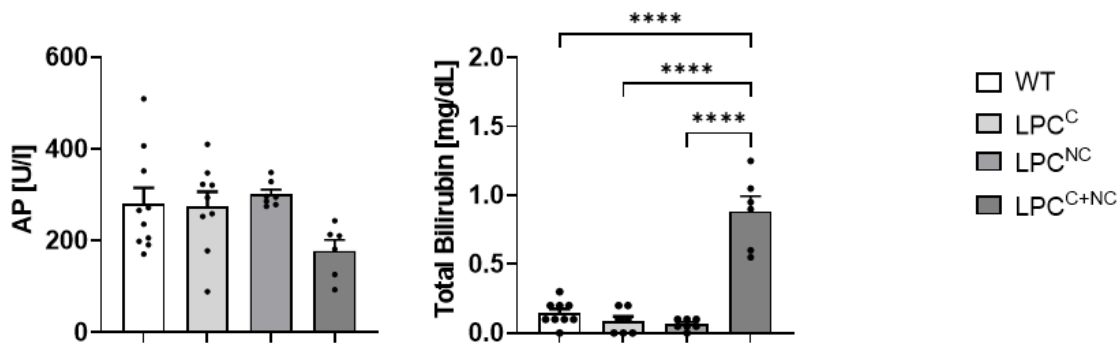


**Abbildung 19: LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern zeigen eine veränderte zelluläre Zusammensetzung.** (A) IHC-Färbung von in Paraffin eingebetteten Lebern aus 6-Wochen alten Tieren in 3µm dicken Gewebsschnitten auf Sox9 und HNF4α. (B) Quantitative Auswertung der Färbung. One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, n=6.

Bei 6-Wochen alten LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen waren die HNF4α-positiven Hepatozyten nur noch in kleinen Arealen vorhanden, wohingegen in den periportalen Bereichen eine signifikante Zunahme von Sox9-positive Zellen im Vergleich zu den anderen Genotypen zu beobachten war (Abbildung 19B). Die einzelne Aktivierung der NF-κB-Signalwege in LPC<sup>C</sup>- und LPC<sup>NC</sup>-Lebern führte hingegen zu keiner veränderten Verteilung der Zellpopulationen. Bei der simultanen Aktivierung beider NF-κB-Signalwege war das Gleichgewicht zwischen Hepatozyten und Cholangiozyten in der Leber zugunsten von Sox9-positiven Zellen verschoben. Die Quantifizierung der Färbungen zeigt einen starken Anstieg der Sox9-positiven Zellen im Vergleich zu den anderen Gruppen, wohingegen die Zahl der HNF4α-positiven Hepatozyten abnahm (Abbildung 19B).

Um die biliären Veränderungen funktionell zu untersuchen, wurden die Serumspiegel der Alkalischen Phosphatase (AP) und Bilirubin in den verschiedenen Mausmodellen untersucht. AP- und Bilirubin-Serumspiegel steigen beispielsweise mit einer voranschreitenden Cholestase

oder chronischer Lebererkrankung an ('Cholestatic Hepatitis' 2012).  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen zeigten eine tendenzielle Reduktion der AP-Serumspiegel im Vergleich zu den Single-Mutanten oder den wildtypischen Tieren, die keine statistische Signifikanz erreichten. Allerdings waren die Bilirubin-Serumspiegel signifikant erhöht im Vergleich zu den drei anderen Genotypen (Abbildung 20).



**Abbildung 20:**  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse weisen einen signifikant erhöhten Serumbilirubinspiegel auf. AP- bzw. Bilirubin-Serumspiegel von 6-Wochen alten Mäusen des jeweiligen Genotyps. One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ,  $n = 6$ .

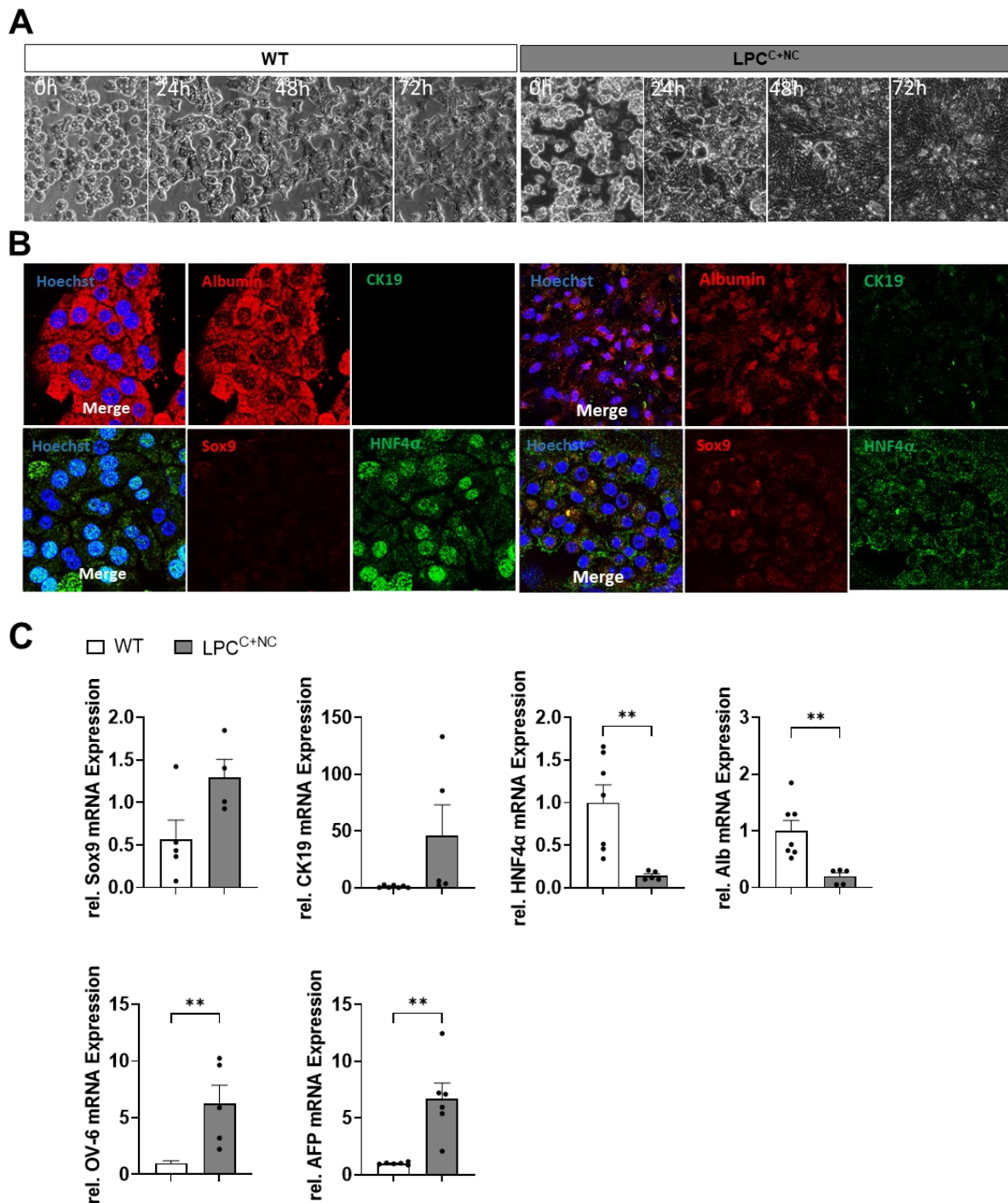
Ein isolierter Bilirubinanstieg bei unveränderter alkalischer Phosphatase deutet oft auf eine Störung des Bilirubinstoffwechsels hin, der die Leber betrifft, ohne jedoch eine Cholestase oder Gallenwegserkrankung zu verursachen. Es stellte sich somit die Frage, ob die verbleibenden Hepatozyten bei  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen die Leberfunktion ausreichend erhalten können.

### 3.5 Beeinträchtigung der Hepatozyten- und Leberfunktion in $LPC^{C+NC}$ -Mäusen

Basierend auf den vorangegangenen Ergebnissen, konnte eine Reduktion der Hepatozyten in  $LPC^{C+NC}$ -Lebern festgestellt werden. Um die Hepatozyten-Funktion genauer zu untersuchen, wurden aus den Mäusen primäre Hepatozyten isoliert. In diesem Abschnitt werden zur besseren Übersicht lediglich die Vergleiche zwischen den WT- und  $LPC^{C+NC}$ -Hepatozyten dargestellt, da die Single-Mutanten bezüglich der Expression von HNF4 $\alpha$  und Sox9 keine signifikanten Veränderungen zeigten.

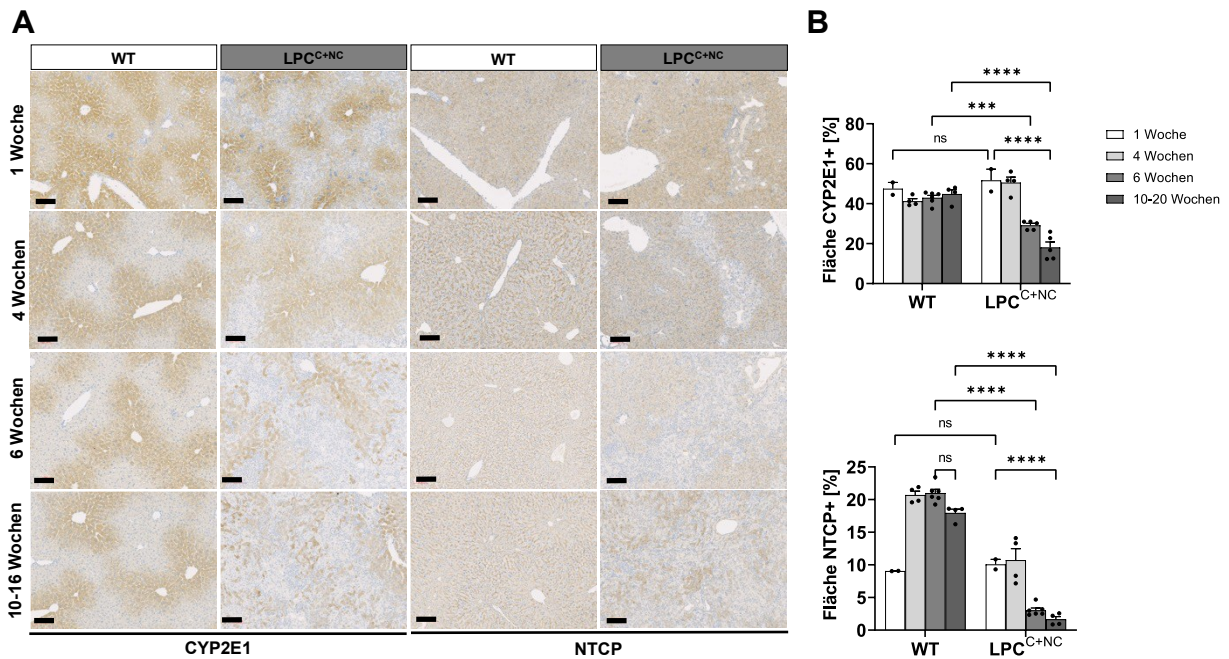
Bei der Kultivierung der Hepatozyten fiel auf, dass die  $LPC^{C+NC}$ -Hepatozyten sich stärker ausbreiteten und proliferierten. Wildtypische Hepatozyten sind bei einer Kultivierung über 48 Stunden hinaus stark verändert und sterben zunehmend ab. Im Live-Cell-Imaging nahm die Zahl vitaler Wildtyp-Hepatozyten bereits nach 48 Stunden ab (Abbildung 21A). Bei den

LPC<sup>C+NC</sup>-Hepatozyten war hingegen über den gesamten Zeitraum dieser Verlust nicht erkennbar. Interessanterweise proliferierten diese, sodass kaum bedeckte Areale nach 36-48 h komplett mit Zellen überwuchert waren.



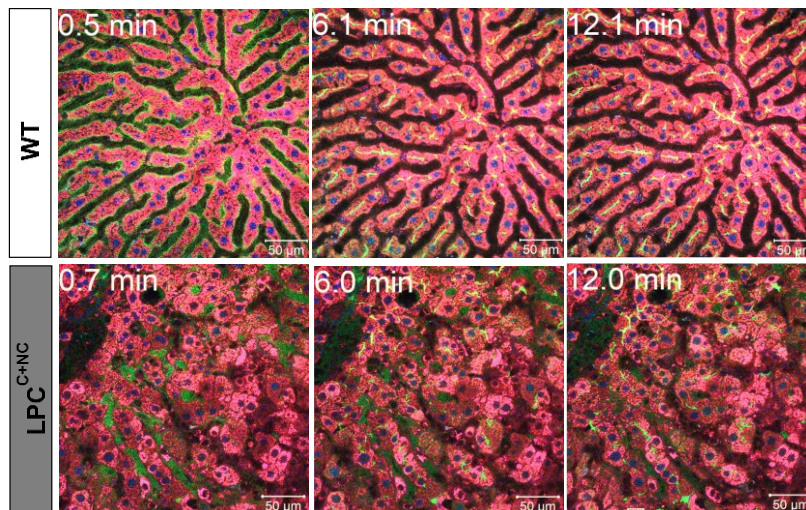
**Abbildung 21: LPC<sup>C+NC</sup>-Hepatozyten proliferieren und exprimieren Cholangiozytenmarker in vitro.** (A) Gleicher Bildausschnitt im Durchlichtmikroskop im Rahmen eines Live-Cell-Imaging im Verlauf der Zeit, Zeitangabe in Stunden (h) oben links. (B) Immunfluoreszenzfärbung der isolierten Hepatozyten nach 24h Kultivierung auf Sox9, HNF4α, CK19 und Albumin sowie Hoechst. n=4 (C) mRNA-Expression der Cholangiozyten- (Sox9, CK19), Hepatozytenmarker (Albumin, HNF4α) und Ovalzellmarkern (OV-6, AFP) in isolierten Hepatozyten nach 24h Kultivierung von 6 Wochen alten Mäusen, n=6.

Um diese Beobachtung eingehender zu untersuchen und mögliche Kontaminationen mit biliären Zellen auszuschließen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen der Hepatozyten auf Cholangiozyten- (CK19), Hepatozyten- (Albumin, HNF4 $\alpha$ ) und Ovalzellmarkern (Sox9) erstellt. Bereits in den IHC-Färbungen der Gewebsschnitte konnten zuvor vermehrt Sox9 und CK19 detektiert werden, wohingegen die HNF4 $\alpha$ - und Albumin-positiven Bereiche im Vergleich zum Wildtyp kleiner erschienen (Abbildung 19). Auch die Immunfluoreszenz-Färbung der isolierten primären Hepatozyten zeigte, dass die LPC<sup>C+NC</sup>-Hepatozyten im Vergleich zu den wildtypischen Zellen weniger Hepatozyten-Marker und mehr Cholangiozyten-/Progenitorzellmarker exprimieren (Abbildung 21B). Dieses Expressionsmuster der isolierten Hepatozyten konnte mittels RT-qPCR bestätigt und quantifiziert werden (Abbildung 21C). Zusätzlich zu den angefärbten Cholangiozyten- und Hepatozyten-Markern wurden noch die Ovalzellmarker OV-6 und AFP untersucht. Auch diese waren in den LPC<sup>C+NC</sup>-Hepatozyten signifikant erhöht. Da die Marker für Ovalzellen signifikant erhöht waren, während die Cholangiozyten-Marker zwar erhöht, aber keine Signifikanz festzustellen war, deutet dies in erster Linie auf eine Dedifferenzierung der Hepatozyten hin, die zunehmend Eigenschaften von Oval-/Progenitorzellen annehmen. Da die LPC<sup>C+NC</sup>-Hepatozyten sich bezüglich ihrer Zellmarker deutlich unterscheiden, wurden im Folgenden die Hepatozyten in den Gewebsschnitten hinsichtlich ihrer Eigenschaften im Verlauf des Alters weiter charakterisiert. Dafür wurden CYP2E1- und NTCP (= Natrium Taurocholat-cotransportierendes Polypeptid) -Färbungen durchgeführt. CYP2E1 wird von Hepatozyten produziert und gehört zu den Cytochrom-P450-Isoenzymen. Es ist involviert in die Metabolisierung von Xenobiotika und die damit verbundene immunvermittelte Hepatotoxizität (Lu and Cederbaum 2008). NTCP ist ein Membrantransporter, der von ausgereiften Hepatozyten exprimiert wird und erforderlich für deren Aufnahme von Gallensäuren ist, wodurch die Gallensäurehomöostase und der Cholesterinstoffwechsel gesteuert wird (Tan et al. 2024). In Abbildung 22A ist zu erkennen, dass die 1 Wochen alten Tiere den wildtypischen Vergleichstieren noch sehr ähnelten, was mit zunehmendem Alter immer mehr abnahm, sowohl bezüglich der CYP2E1-Expression, als auch der NTCP-Expression. Auch die Quantifizierung bestätigte diese Beobachtung (Abbildung 22B).



**Abbildung 22: Hepatozyten-abhängige CYP2E1- und NTCP-Expression nehmen in LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern mit zunehmendem Alter ab.** (A) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen CYP2E1- und NTCP-Färbung von 3 µm dicken Gewebsschnitten aus in Paraffin eingebetteter Leber von Tieren jeweils angegebenen Alters. Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (B) Quantitative Auswertung der Färbungen. One-way ANOVA mit Tukey- post-hoc Vergleich. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001, n=2-6.

Um die Funktionalität der verbleibenden Hepatozyten im Lebergewebe *in vivo* beurteilen zu können, wurde eine intravitale Zwei-Photon-Mikroskopie durchgeführt. In Abbildung 23 ist der zeitliche Verlauf der Aufnahme des Gallensalz-Analogons CLF in der Leber im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen dargestellt. Während bei wildtypischen Mäusen bereits nach 6 Minuten das Gallensalz-Analogon fast vollständig von den Hepatozyten aus den Sinusoiden in die Canaliculi weitergegeben wurde, ist bei den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen nur eine partielle Aufnahme durch die Hepatozyten zu erkennen. Ein Teil des CLF wurde zwar von den Hepatozyten in die Canaliculi weitergegeben, jedoch verblieb auch ein erheblicher Teil im Blut in den Sinusoiden.



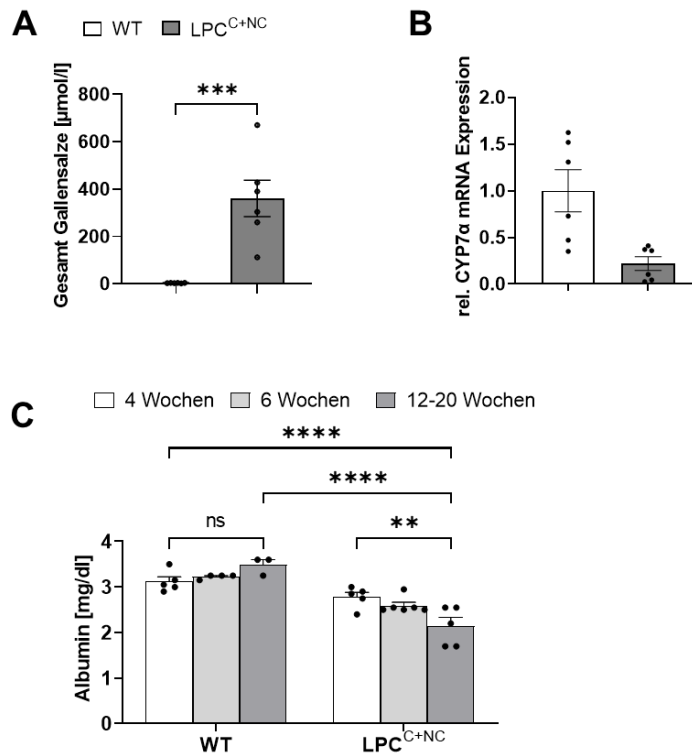
**Abbildung 23: Die LPC<sup>C+NC</sup> Hepatozyten zeigen *in vivo* eine langsamere und geringere Aufnahme des Gallensalz-Analogs.** Repräsentative Bilder der Zwei-Photonen-Mikroskopie von anästhesierten Mäusen *in vivo*. Zeitangabe oben links in Minuten, i.v.-Injektion der Farbstoffe (rot: TMRE = Tetramethylrhodaminethylester (Mitochondrienmembranpotential), blau: Hoechst (Zellkerne), grün: CLF = Cholyl-Lysyl-Fluorescein (Gallensalz analogon)) zum Zeitpunkt 0 min.

Die massenspektrometrische Bestimmung der Gallensalze im Serum zeigte ein erhöhtes Vorkommen der Gesamt-Gallensalze im Serum der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen (Abbildung 24A) und bestätigt die Beobachtungen aus der Zwei-Photonen-Mikroskopie, dass die Hepatozyten die Gallensalze nur unzureichend aufnehmen können, wodurch diese im Serum akkumulierten.

CYP7 $\alpha$  ist zur initialen Synthese von Gallensalzen erforderlich und wird in Hepatozyten exprimiert. Die Aktivität von CYP7 $\alpha$  wird durch negative Rückkopplung von Gallensäuren reguliert. Eine Zunahme der Konzentration von Gallensäuren im Darm und der Leber führt zu einer Herunterregulierung der Expression von CYP7 $\alpha$ , wodurch die Produktion des Enzyms gedrosselt wird (Zhang et al. 2009). Die Analyse der mRNA-Expression von CYP7 $\alpha$  war signifikant reduziert in LPC<sup>C+NC</sup>-Hepatozyten (Abbildung 24B), was eine Folge der Gallensalzzakkumulation sein kann.

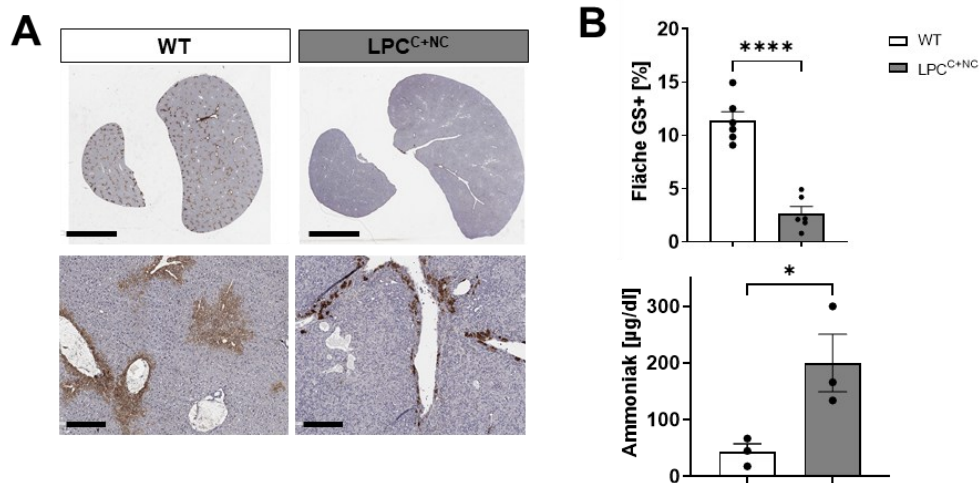
Neben der reduzierten Aufnahmeaktivität der Hepatozyten, könnte auch die enorme strukturelle Veränderung der Leberarchitektur für den Funktionsverlust der Leber verantwortlich sein. Um die Funktionalität der Hepatozyten weiter zu untersuchen, wurde zusätzlich der Albumin-Gehalt im Serum gemessen. Die Serumalbumin-Konzentration korreliert eng mit der Albumin-Genexpression in der Leber und ist bei akutem Leberversagen und dekompensierter Leberzirrhose signifikant reduziert (Ozaki et al. 1991). In Abbildung 24C ist zu erkennen, dass die Albuminkonzentration im Serum mit zunehmendem Alter in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen signifikant reduziert vorlag, verglichen mit den Wildtyp-Mäusen. Normalerweise kann die Serumalbumin-Konzentration durch nur 10 % der normalen Hepatozyten-Masse aufrechterhalten werden

(Lala, Zubair, and Minter 2024). Somit weisen die Ergebnisse auf eine dekompensierte Leberschädigung hin.



**Abbildung 24: LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse zeigen eine dekompensierte Leberschädigung.** (A) Massenspektrometrische Bestimmung von Gesamtmenge der Gallensalze in Serum. ungepaarter t-Test, \*\*\* p<0,001, n=6. (B) RT-qPCR der Cyp7a1 Expression in isolierten Hepatozyten. n=6 (C) Klinisch chemische Bestimmung von Albumin aus dem Serum. One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich, \*\* p<0,01, \*\*\* p< 0,001, \*\*\*\* p<0,0001, n=5.

Bei einer dekompensierten Leberschädigung kann die Leber unter anderem ihre Funktion zur Entgiftung nicht mehr vollständig bewältigen. Um die LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Entgiftung des Ammoniaks zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung der Glutaminsynthetase (GS), welches primär an der Entgiftung des Ammoniaks durch die Leber beteiligt ist, durchgeführt. In den repräsentativen Bildern der Färbungen von wildtypischen Lebern ist erkennbar, dass zwei bis drei Hepatozyten-Schichten, die um die Zentralvene angeordnet sind, GS exprimieren (Abbildung 25A). In den geschädigten LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern hingegen, waren nur noch vereinzelt Zellen, die GS exprimieren, vorhanden. Die Gefäße sind nicht mehr vollständig von GS-exprimierenden Hepatozyten umschlossen. Sowohl in der Übersicht der Färbung, als auch in der quantitativen Auswertung (Abbildung 25B) ließ sich eine Reduktion der GS-exprimierenden Hepatozyten auf weniger als ein Drittel im Vergleich zu den gesunden Wildtyp-Tieren feststellen. Zusätzlich lag eine signifikant erhöhte Ammoniak-Konzentration im Vollblut vor (Abbildung 25B).



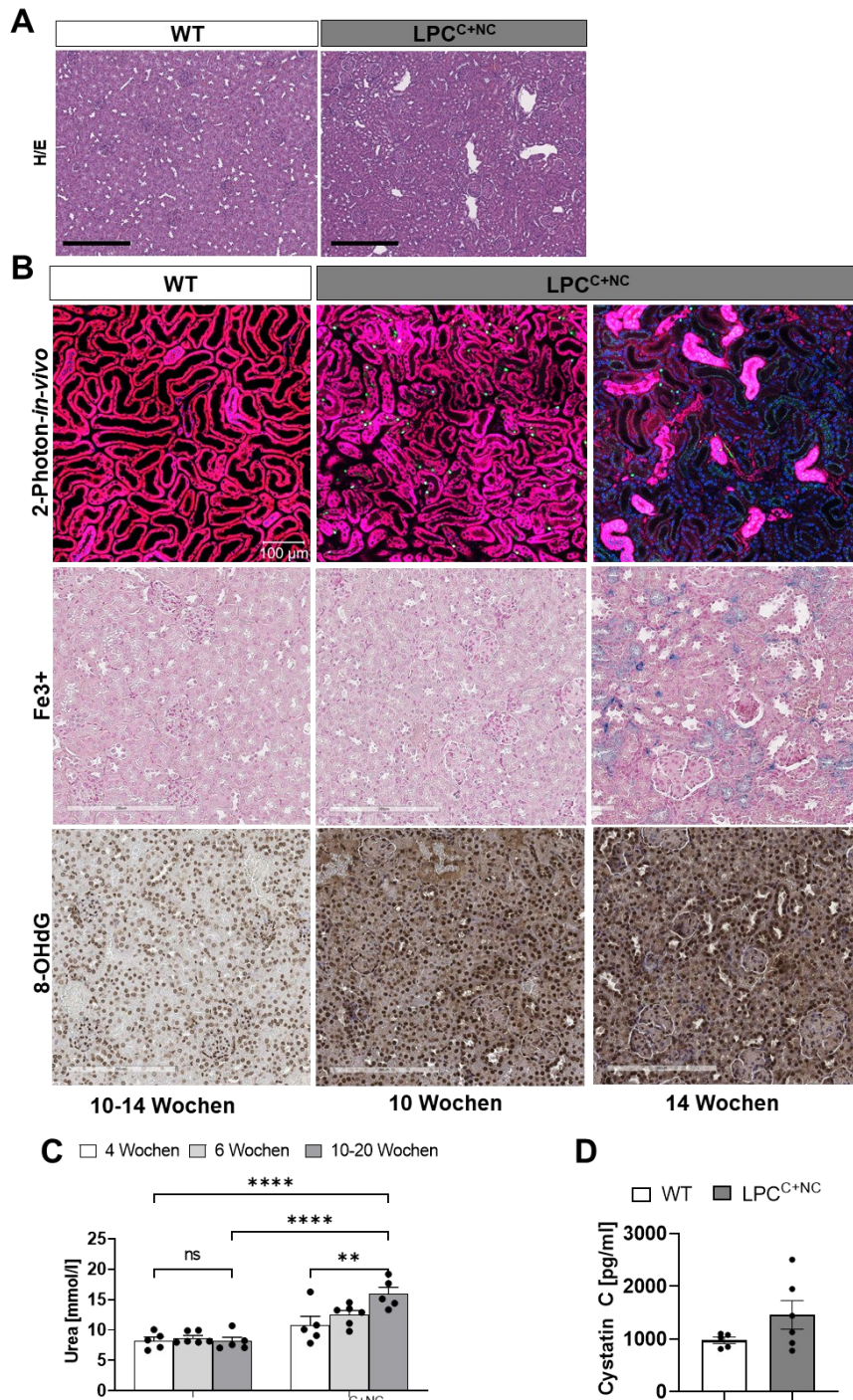
**Abbildung 25: Beeinträchtigung der Ammoniak-Entgiftung in LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren.** (A) Immunhistochemische Färbung der 3µm dicken Gewebsschnitte von in Paraffin eingebetteter Leber aus 6-Wochen alten Tieren auf Glutaminsynthetase (GS). Maßstabsbalken entspricht 4mm (oben) bzw. 150 µm (unten). (B) Quantitative Auswertung der GS-Färbung. Ungepaarter t-Test. \*\*\*\* p<0,0001, \* p<0,05. n=6 (C) Ammoniak-Konzentration im Vollblut der 4-Wochen alten Tiere. n=3

Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine funktionelle Beeinträchtigung der Hepatozyten- und Leberfunktion in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen hin, die mit einer unzureichenden Entgiftungsfunktion einhergehen. Zudem konnte eine Erhöhung der Gallensalz-Konzentration im Serum auf ein 400-faches festgestellt werden, welche für den Körper toxisch ist und sich auch auf die Funktionsfähigkeit anderer Organe auswirken kann.

### 3.6 Beeinträchtigung der Nieren- und Lungenfunktion in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen

Das Organ, das am Häufigsten von den toxischen Auswirkungen einer Gallensalzzakkumulation betroffen ist, ist die Niere. Da die enorme Gallensalzanreicherung nur im Serum der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse vorliegt, wird im Folgenden ausschließlich auf den Vergleich dieser Mäuse mit den wildtypischen Wurfgeschwistern eingegangen.

Zunächst wurden Paraffin-Gewebsschnitte der Niere von 12-20 Wochen alten Mäuse H/E gefärbt. Bei LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen sind keine eindeutigen Zellschäden oder fibrotische Areale erkennbar, wie sie für eine cholehmische Nephropathie als Folge cholestatischer Lebererkrankungen beschrieben ist (Ghallab, 2024). Zu erkennen sind jedoch ausgeprägt dilatierte Tubuli (Abbildung 26A).



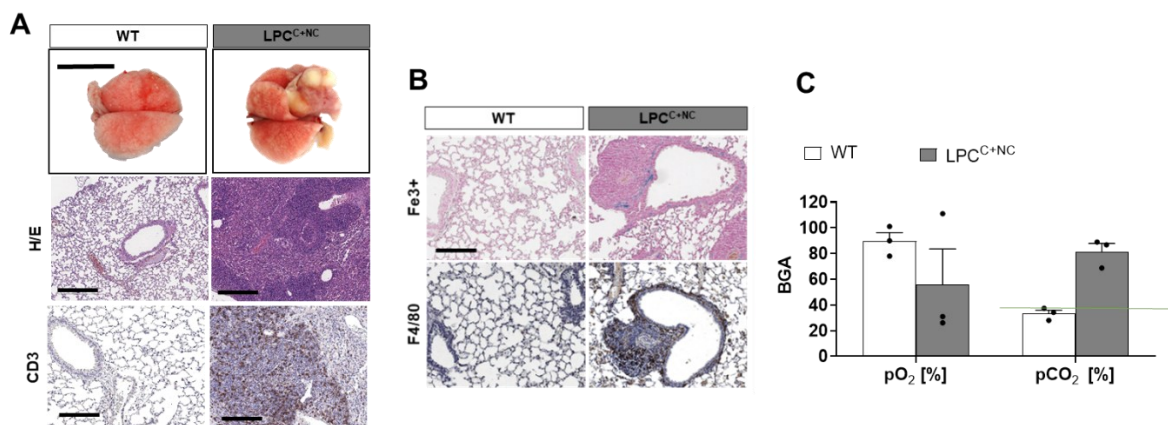
**Abbildung 26: Im Alter fortschreitende Einschränkung der Nierenfunktion bei LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen.** (A) H/E-Färbung von 3 µm dicken Gewebsschnitten von in Paraffin eingebetteter Niere aus 14 Wochen alten Tieren. Maßstabsbalken entspricht 300 µm. (B) Two-Photon-in-vivo Mikroskopie der Niere von 10-14 Wochen alten Tieren. Vorherige i.v.-Injektion der Farbstoffe Hoechst (blau: Zellkerne), TMRE = Tetramethylrhodaminethylester (rot: Mitochondrienmembranpotential), Sytox green (grün: Zellkern bei durchlässiger Membran), Fe<sup>3+</sup>-Färbung von in Paraffin eingebetteten Gewebsschnitten mit Haematogost® Fe Kit (Best.-Nr.: 112084) mittels Turnbull-Blau-Reaktion, immunhistochemische Färbung von 8-OHdG von in Paraffin eingebetteten Gewebsschnitten. n=2. (C) Urea-Konzentration im Serum im Alter von 4-, 6- und 10-20 Wochen. One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich, \*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,0001, n=5. (D) ELISA zur Messung der Cystatin C Konzentration im Serum, n=6.

Um die Funktionalität der Niere weiter zu analysieren, wurden diese *in vivo* mit Hilfe einer Zwei-Photon-Mikroskopie untersucht. Im Alter von 10 Wochen wiesen LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren vereinzelt absterbende oder tote Zellen auf, die durch das Eindringen des Sytox green durch die beschädigte Membran grün gefärbte Zellkerne gekennzeichnet sind (Abbildung 26B). Im Alter von 14 Wochen zeigte ein Großteil der Nierenzellen einen Verlust des rot dargestellten mitochondrialen Membranpotenzials. Da der Großteil der Zellkerne blau und nicht durch das Sytox green grün angefärbt war, lässt sich ableiten, dass die Membran noch intakt ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die Zellen keinen Zelltod eingeleitet hatten, jedoch starkem zellulären Stress ausgesetzt waren, wodurch das Membranpotenzial nicht mehr vorhanden war. Dieser zelluläre Stress lässt sich ebenfalls durch die Fe<sup>3+</sup>-Färbung darstellen, da oxidativer Stress eine Umwandlung von Fe<sup>2+</sup> zu Fe<sup>3+</sup> in den Zellen bewirkt. Durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die bei mitochondrialer Dysfunktion und zellulärem Stress vermehrt auftreten, wird Fe<sup>2+</sup> oxidiert und akkumuliert als Fe<sup>3+</sup> (Koppenol 2001). Diese Akkumulation war in der Färbung der LPC<sup>C+NC</sup>-Gewebschnitte im Alter von 14 Wochen sichtbar und somit ein Indikator für oxidative Prozesse (Abbildung 26B). Zusätzlich zeigte die 8-OHdG (8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin)-Färbung, die auf oxidativ geschädigte DNA hinweist (Valavanidis, Vlachogianni, and Fiotakis 2009), bereits im Alter von 10 Wochen Anzeichen für oxidativen Stress. Dieser verstärkte sich im Alter von 14 Wochen weiter, was die Beteiligung von oxidativem Stress an der Zellschädigung in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen untermauert.

Zur Beurteilung der Nierenfunktion in Abhängigkeit vom Alter, wurde die Urea-Konzentration und der Cystatin-C-Spiegel im Serum von Mäusen im Alter von 4-, 6- und 10-20 Wochen gemessen. Erhöhte Urea- und Cystatin-C-Spiegel können auf eine Nierenfunktionsstörung hindeuten (Filler, Huang, and Lindsay 2011). Bei den gesunden Wildtyp-Kontrollen lag die Urea-Konzentration über die Altersgruppen hinweg konstant bei circa 8 mmol/l. Im Serum der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse war im Verlauf des Alters ein signifikanter Anstieg zu beobachten. Im Alter von 12-20 Wochen zeigte sich eine im Mittel doppelt so hohe Urea-Konzentration im Vergleich zu den Werten der Wildtypen (Abbildung 26C). In LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen war die Tendenz erhöhter Cystatin-C-Spiegel im Vergleich zum Serum aus wildtypischen Kontrolltieren erkennbar (Abbildung 26D).

All diese Merkmale deuten auf einen chronisch voranschreitenden Verlust der Nierenfunktion hin. Der Verlust des Membranpotenzials bei intakter Zellmembran der Nierenzellen könnte ein Hinweis auf eine reversible Schädigung des Nierenparenchyms sein. Diese kann unter anderem als Folge einer starken Leberschädigung auftreten und im fortgeschrittenen Stadium als hepatorenales Syndrom (HRS) bezeichnet (Blum 2018). Durch erhöhten Portalvenendruck bei

zirrhotischer Leber kommt es mit verminderter renaler Perfusion zu einer reversiblen Schädigung der Niere. Durch die chronischen Entzündungsprozesse wird die Nierenschädigung verstärkt und ihre Funktion wird zunehmend eingeschränkt (Velez, Latt, and Rodby 2024). Mit der Funktionseinschränkung der Niere kann es durch unzureichende Flüssigkeitsausscheidung zur hydropen Dekompensation kommen, wodurch Lungenödeme entstehen können (Parivakkam Mani et al. 2023). Bei der Organentnahme der Lunge aus den  $LPC^{C+NC}$ -Tieren konnten bereits makroskopisch Veränderungen festgestellt werden. In allen drei  $LPC^{C+NC}$ -Tieren im Alter von 10-14 Wochen, bei denen die Lunge entnommen wurde, waren mehrere Veränderungen mit schleimigem Sekret erkennbar, möglicherweise Stauungsinfiltrate als Folge von Lungenödem (Abbildung 27A).

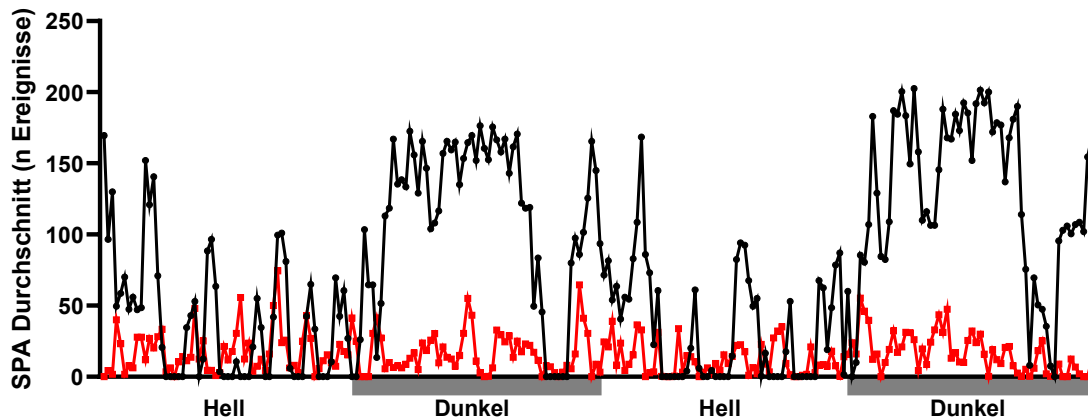


**Abbildung 27: Immuninfiltrate und veränderte Gewebsstruktur der Lungen von  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen.** (A) Repräsentative makroskopische Bilder der Lunge, H/E-Färbung und Immunhistochemische Färbung auf CD3 von 3µm dicken Gewebsschnitten aus in Paraffin eingebettetem Lungengewebe von 11-16-Wochen alten Mäusen. Maßstabsbalken entspricht 1mm (oben), 100 µm (unten). n=3 (B) Serielle Färbung des gleichen Gewebeareals auf Fe<sup>3+</sup>-Färbung mit Haematognost® Fe Kit (Best.-Nr.: 112084) mittels Turnbull-Blau-Reaktion, sowie immunhistochemische Färbung von F4/80 von in Paraffin eingebetteten Lungengewebschnitten 11-16 Wochen alter Mäuse. n=3 (C) Blutgasanalyse (BGA) aus arteriellem Vollblut 4-Wochen alter Mäuse. Die grüne Linie kennzeichnet den pCO<sub>2</sub>-Normwert von < 45 mmHg. n=3

Neben dem Vorhandensein von Immuninfiltraten, zeigten die H/E-Färbung, dass das verbliebene Lungengewebe verengt war und kaum noch Bereiche mit Alveolen erkennbar waren, in denen ein Sauerstoffaustausch stattfinden könnte. Durch die Flüssigkeitsansammlung in den Alveolen kann es durch die mechanische Belastung mit der Freisetzung von Zytokinen zur Aktivierung von Entzündungsmediatoren und Infiltration von Immunzellen kommen (El Alam et al. 2022). Die immunhistochemische Färbung des Transmembranproteins CD3 von T-Lymphozyten belegte, dass eine massive Immunzellinfiltration in den  $LPC^{C+NC}$ -Lungen vorlag (Abbildung 27A, unten). Zusätzlich zeigte sich eine Anreicherung von Fe<sup>3+</sup>-positiven Zellen in

der Lunge. Diese sogenannten Herzhelferzellen stammen aus dem Herzen und werden bei kardialen Stress, wie er bei Herzinsuffizienz auftreten kann, mobilisiert. Sie sind  $\text{Fe}^{3+}$ -positiv, da es sich um eisenhaltige Makrophagen handelt, die durch phagozytische Aufnahme von Hämoglobin oder Eisenkomplexen aus geschädigten Erythrozyten angereichert sind (Abbildung 27B, oben). Durch die ergänzende immunhistochemische F4/80-Färbung des gleichen Gewebeareals konnte bestätigt werden, dass es sich bei den  $\text{Fe}^{3+}$ -positiven Zellen um Makrophagen handelt, was ihre Identifikation als Herzhelferzellen weiter untermauert (Abbildung 27B, unten). Ihre Anwesenheit weist nicht nur auf eine systemische Beteiligung des Herzens hin, sondern auch auf eine erhebliche vaskuläre Belastung der Lunge. Der erhöhte hydrostatische Druck in den Kapillaren der Lunge, der durch eine Herzinsuffizienz oder eine eingeschränkte kardiale Pumpleistung entsteht, führt zu einer verstärkten Kapillarpermeabilität und Flüssigkeitsansammlung (Becroft and Lockett 1997). Diese vaskuläre Belastung trägt zur Rekrutierung von Herzhelferzellen bei und verstärkt die entzündlichen Prozesse in der Lunge. Die Kombination aus vaskulärer Belastung und entzündlichen Veränderungen verschärft die funktionelle Beeinträchtigung der Lunge und verschlimmert die zugrundeliegende Pathologie. In Abbildung 27C sind die Ergebnisse der Blutgasanalyse (BGA) dargestellt. Sie zeigt, dass die  $\text{LPC}^{\text{C+NC}}$ -Mäuse überproportional  $\text{CO}_2$  im Blut anreicherten und eine Decarboxylierungsstörung aufwiesen. Eine Decarboxylierungsstörung beeinträchtigt die Energieproduktion und die Funktion von Neurotransmittern, wodurch die körperliche Aktivität beeinträchtigt wird und es zu Müdigkeit, eingeschränkter Bewegungsfähigkeit kommt (Garcia-Rio et al. 2009). Zur Bestätigung wurde die spontane körperliche Aktivität der Mäuse über mehrere Tage gemessen. Abbildung 28 zeigt, dass die  $\text{LPC}^{\text{C+NC}}$ -Mäuse signifikant weniger körperlich aktiv waren, als wildtypische Tiere. Vor allem in den Dunkelphasen, welche die Aktivitätsphasen darstellen, war eine deutliche Verringerung der Aktivität zu erkennen. Die

LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse bewegten sich über die gesamte Zeit nur so wenig, wie die Wildtyp-Mäuse in den Ruhephasen.



**Abbildung 28: LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse zeigen signifikant geringere spontane körperliche Aktivität verglichen mit wildtypischen Tieren.** Spontane körperliche Aktivität (SPA, engl.: *spontaneous physical activity*), gemessen über 48h, angegeben in Anzahl der Events. Die schwarze Linie stellt die Bewegungsdaten der wildtypischen Vergleichstiere, die rote Linie die der LPC<sup>C+NC</sup>-Tiere dar. n=3

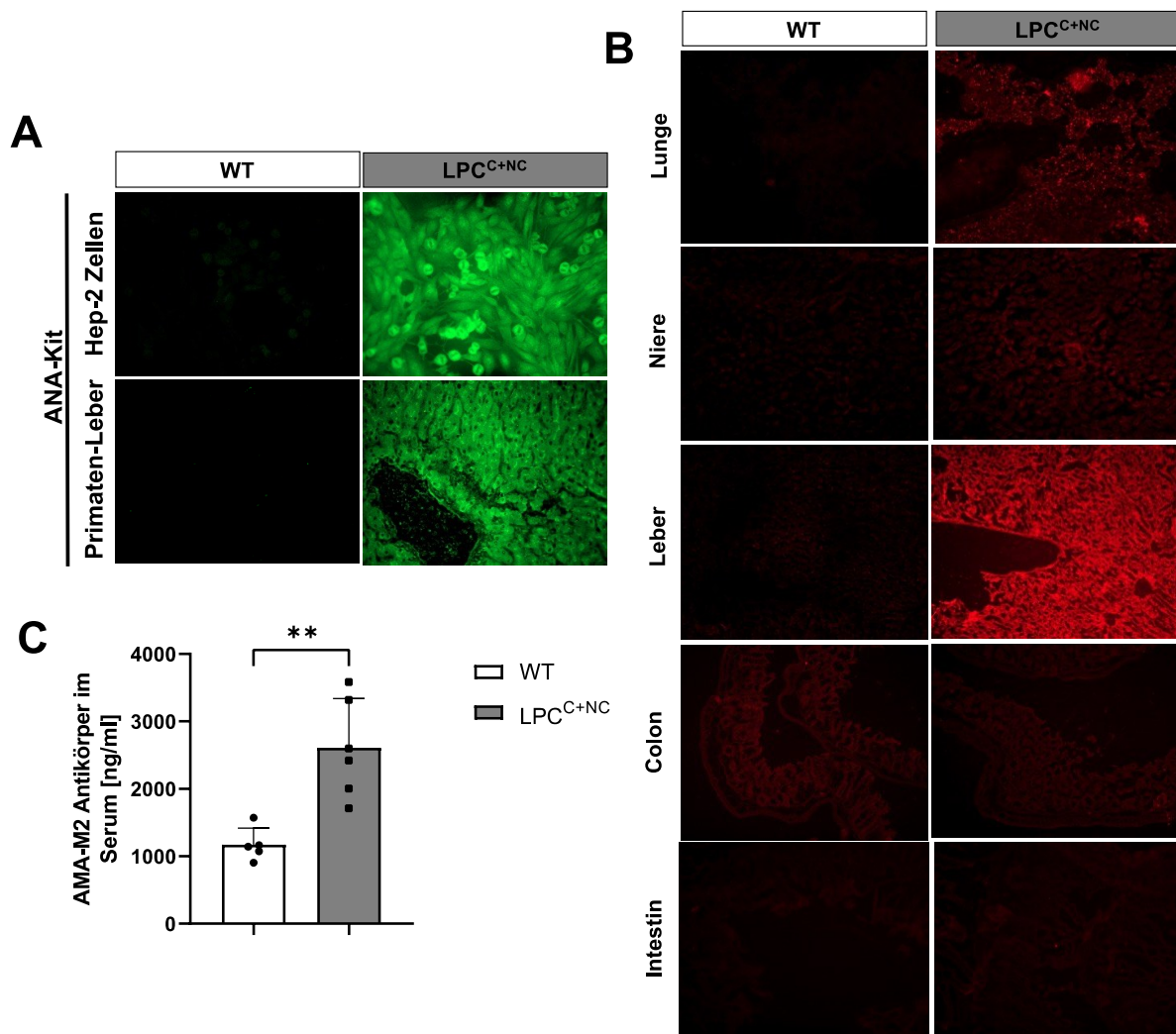
Die beobachteten Veränderungen deuten darauf hin, dass die Funktionsbeeinträchtigung der Nieren eine Flüssigkeitsretention mit Bildung entzündlicher Infiltrate in der Lunge begünstigt haben könnte. Die Schädigungen der Organe wurden durch die zunehmende Entzündungsreaktion weiter verstärkt und die Funktionseinschränkungen verschlimmert, was schließlich zur Verringerung der körperlichen Aktivität und einer Apnoe führte.

### 3.7 Entwicklung einer Autoimmunerkrankung durch Defekt der Antikörper-Ausreifung in den mTECs des Thymus

Da sowohl in der Leber, als auch in der Lunge der LPC<sup>C+NC</sup>-Tiere verstärkte Immunzellinfiltration nachgewiesen werden konnten (Abschnitte 3.3 und 3.6) und auch die Entzündungsmarker andeuten, dass eine Autoimmunerkrankung vorliegen könnte, die das Inflammationsgeschehen intensiviert und aufrechterhält (Abschnitt 3.3), wurde anschließend das Vorhandensein autoreaktiver Antikörper im Serum der LPC<sup>C+NC</sup>-Tiere überprüft. Dafür wurde das Serum der Versuchstiere mithilfe eines klinischen Euroimmun-Diagnostik-Kits auf antinukleäre Antikörper (ANA) mittels indirekter Immunfluoreszenz getestet. Da lediglich die LPC<sup>C+NC</sup>-Tiere ein so starkes Inflammationsgeschehen aufwiesen, werden in diesem Abschnitt nur die Daten dieser Tiere im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen aufgeführt.

Abbildung 29A zeigt, dass im LPC<sup>C+NC</sup>-Serum mit Hilfe des verwendeten Kits autoreaktive Antikörper nachgewiesen werden konnten. Diese richten sich zwar nicht gegen die Zellkerne, binden jedoch an andere Strukturen des fixierten Gewebes, wodurch sie detektiert werden konnten. Zur Quantifizierung der Autoantikörper wurde ein ELISA zur Detektion von AMA-M2-Antikörpern durchgeführt. Im Serum der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse wurden durchschnittlich mehr als doppelt so viele AMA-M2-Antikörper nachgewiesen wie in der Kontrollgruppe (Abbildung 29B). In der Diagnostik humaner Autoimmunerkrankungen der Leber gilt das Vorhandensein der AMA-M2-Antikörper als spezifisch für eine PBC-Erkrankung. Experimentelle Modelle in der Maus deuten darauf hin, dass AMA-M2-Antikörper in der Maus auch im Rahmen anderer Autoimmunprozesse auftreten könnten, wodurch ihr Vorhandensein eher ein allgemeines Zeichen für eine Autoimmunerkrankung und nicht spezifisch für eine PBC ist (Colapietro, Leo, and Generali 2022).

Um zu überprüfen, ob die autoreaktiven Antikörper ausschließlich gegen Lebergewebe gerichtet sind oder ob auch andere Organe von der Immunreaktion betroffen sein könnten, wurde das Serum auf die Reaktivität gegenüber Gewebeproben verschiedener Organe einer Rag1-defizienten-Maus untersucht. Das stärkste Immunfluoreszenz-Signal zeigte sich im Lebergewebe, aber auch in der Lunge wurden Areale identifiziert, mit denen Antikörper aus dem Serum interagierten. In den Gewebeproben von Niere, Intestin und Colon war hingegen ein nennenswertes Signal nachweisbar. Die Daten deuten darauf hin, dass die autoreaktiven Antikörper sich hauptsächlich gegen die Leber richteten (Abbildung 29C).

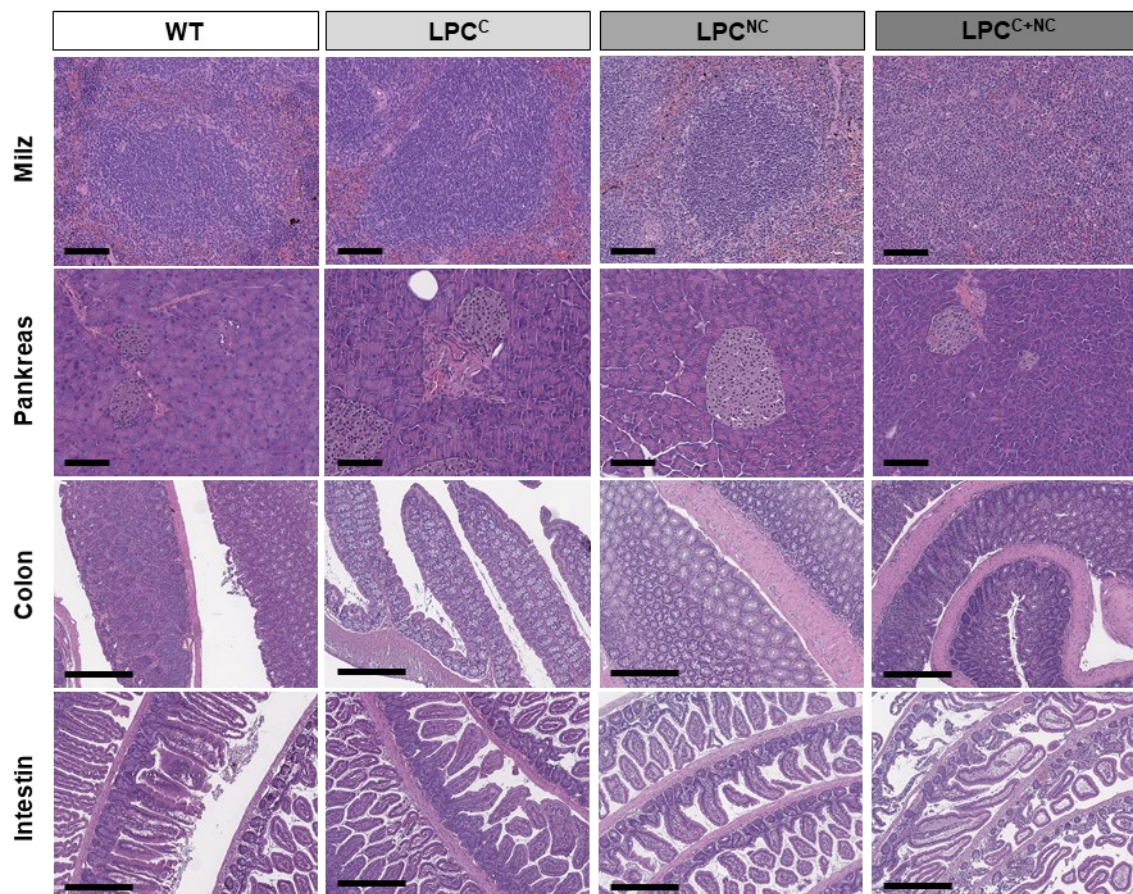


**Abbildung 29: Im Serum von LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen sind mittels indirekter Immunfluoreszenz und ELISA autoreaktive Antikörper vorhanden, die vor allem gegen das Lebergewebe gerichtet sind.** (A) Euroimmun ANA-Kit zur Detektion von Autoantikörpern im Serum: fixierte Hep-2-Zellen und Primatenleber wird mit Serum behandelt, anschließend werden die an das Gewebe und die Zellen gebundenen Antikörper mit einem FITC-gekoppelten anti-mouse IgG Zweitantikörper unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. n=6 (B) ELISA zur Quantifizierung von AMA-M2-Antikörpern im Serum von LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen. Ungepaarter t-Test, \*\* p<0,01, n=5. (C) 10 µm dicke Gefrierschnitte verschiedener Gewebe (Lunge, Niere, Leber, Colon, Intestin) von einer Rag1-defizienten Maus, die mit Serum von WT bzw. LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen behandelt und anschließend mit einem Cy3-gekoppelten anti-IgG-Maus-Antikörper behandelt wurden. So werden unter dem Fluoreszenzmikroskop in dem Serum vorhandene Antikörper, die an das entsprechende Gewebe binden, mittels indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. n=3

Zur weiteren Charakterisierung der Autoimmunreaktion und der möglichen Beteiligung weiterer Organe, wurden von 10-16 Wochen alten Tieren neben der Leber, der Lunge und der Niere auch Pankreas, Milz, Dünndarm (Intestin) und Colon entnommen.

Die Milz war makroskopisch bei allen LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren deutlich vergrößert im Vergleich zu Kontrolltieren, was auf eine Splenomegalie hinweist – ein häufiges Begleitphänomen bei

Lebererkrankungen, insbesondere in Verbindung mit hepatorenalem Syndrom, sowie auch einer Autoimmunerkrankung (Ozen et al. 2001; Aldulaimi and Mendez 2021). Das Pankreas zeigte eine auffällige bräunliche Verfärbung statt der normalerweise weißlichen Farbe und erschien kleiner als bei den Kontrolltieren. Aufgrund der diffusen Struktur des Organs konnte die Größe jedoch nicht eindeutig beurteilt werden. In der H/E-Färbung wirken die Zellen, insbesondere im exokrinen Gewebe, kleiner als in den Vergleichsproben. Trotz dieser morphologischen Veränderungen konnte keine verstärkte Immunzellinfiltration im Pankreas festgestellt werden. Auch im Colon und im Dünndarm waren in der H/E-Färbung keine Immunzellinfiltrate erkennbar. Die Mikrovili wiesen allerdings eine weniger einheitliche Struktur und leichte Unregelmäßigkeiten auf. Ob diese strukturellen Veränderungen funktionelle Beeinträchtigungen nach sich ziehen, ist derzeit unklar (Abbildung 30).

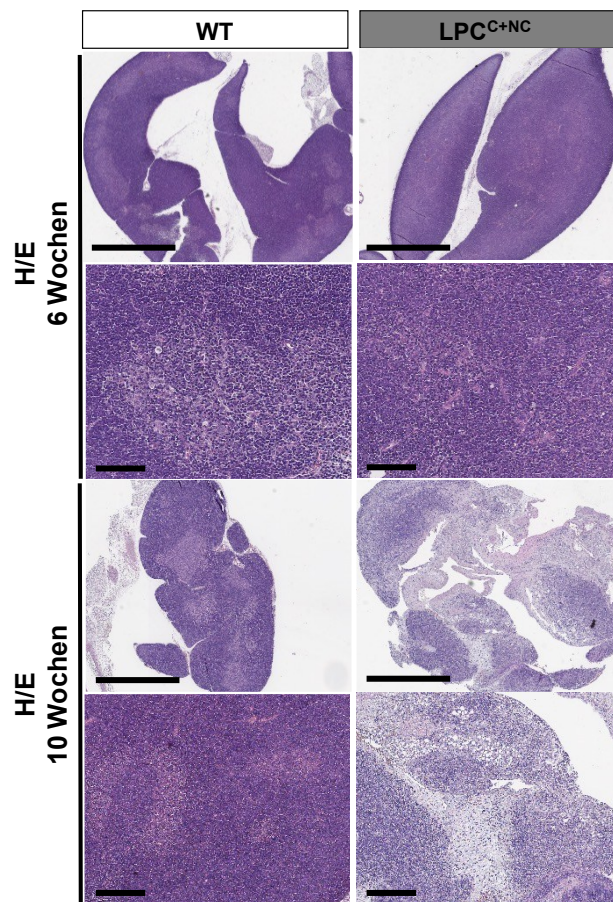


**Abbildung 30: In anderen Organen der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse sind zwar Veränderungen, jedoch keine Immunzellinfiltrate erkennbar.** H/E-Färbungen der 3 µm dicken Gewebeschnitten von in Paraffin eingebettetem Gewebe (Milz, Pankreas, Colon, Intestin und Niere). Maßstabsbalken entspricht 300 µm bzw. 100 µm.

Die Veränderungen könnten auch eine sekundäre Reaktion auf die enorme Beeinträchtigung der Stoffwechselfunktionen durch die Veränderungen in der Leber und, angesichts des Fehlens

von Immunzellinfiltraten, weniger auf direkte Schädigungen durch die Autoimmunerkrankung zurückzuführen sein.

Da in dem Serum der  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen autoreaktive Antikörper nachgewiesen wurden, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob deren Entstehung ein Defekt des Thymus zugrunde liegt. Dafür wurden die Thymi der Mäuse entnommen, in Paraffin eingebettet und Schnitte davon erstellt, die anschließend H/E-gefärbt wurden (Abbildung 31).

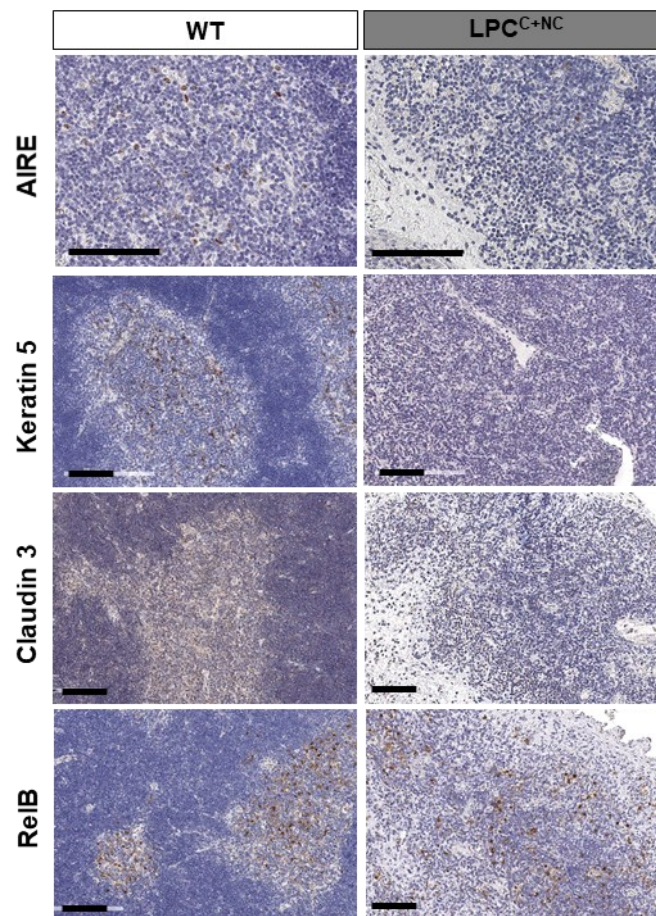


**Abbildung 31: Der Thymus von  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen verändert sich bereits im Alter von 6-Wochen und weist im Alter von 10 Wochen nur noch eine diffuse Struktur auf.** H/E-Färbung von 3  $\mu$ m dicken Gewebsschnitten aus in Paraffin eingebettetem Thymus von WT- und  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen im Alter von 6- und 10 Wochen. Maßstabsbalken entspricht 2 mm (oben) bzw. 100  $\mu$ m (unten).

In der H/E-Färbung des Thymus erscheinen die medullären thymischen Epithelzellen (= mTECs) durch die geringere Zellzahl im Vergleich zum umliegenden Gewebe als helle Areale. Sie befinden sich in der Markzone (Medulla) des Thymus und sind beteiligt an der T-Zell-Reifung und der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen (Klein 2020). Bereits im Alter von 6 Wochen waren in den Thymi der  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse die mTECs nicht mehr erkennbar und auch bei Vergrößerung des Bildes nicht abzugrenzen. Die wildtypischen Thymi wiesen diese Areale hingegen auf. Während im Alter von 10 Wochen in wildtypischem Thymus-

Gewebe weiterhin das Vorhandensein von mTECs erkennbar war, so war die Struktur in  $LPC^{C+NC}$ -Thymi vollständig verloren und bestand nur noch aus diffusem Gewebe (Abbildung 31).

Um den Funktionsverlust zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. In der AIRE-Färbung ist eine deutliche Reduktion dessen in den  $LPC^{C+NC}$ -Schnitten zu erkennen. Dies kann als Indiz für ein autoimmunes Geschehen angesehen werden. Auch die Reduktion von Keratin 5, Claudin 3 und RelB, als Marker für funktionsfähige mTECs, implizieren die Störung der Thymusfunktion in den  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Thymi der  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse besitzen weniger funktionsfähige mTECs.** Immunhistochemische Färbung von  $3\mu\text{m}$  dicken Gewebsschnitten aus in Paraffin eingebettetem Thymus von 10-Wochen alten WT- und  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen auf AIRE, Keratin 5, Claudin 3 und RelB. Maßstabsbalken entspricht  $100\mu\text{m}$ .

Die Ergebnisse lassen auf eine Schädigung der mTECs schließen, die mit einer Beeinträchtigung der negativen Selektion im Thymus einhergehen und so das Eindringen autoreaktiver Antikörper in den Organismus sowie die Entstehung autoimmuner Reaktionen begünstigen könnte.

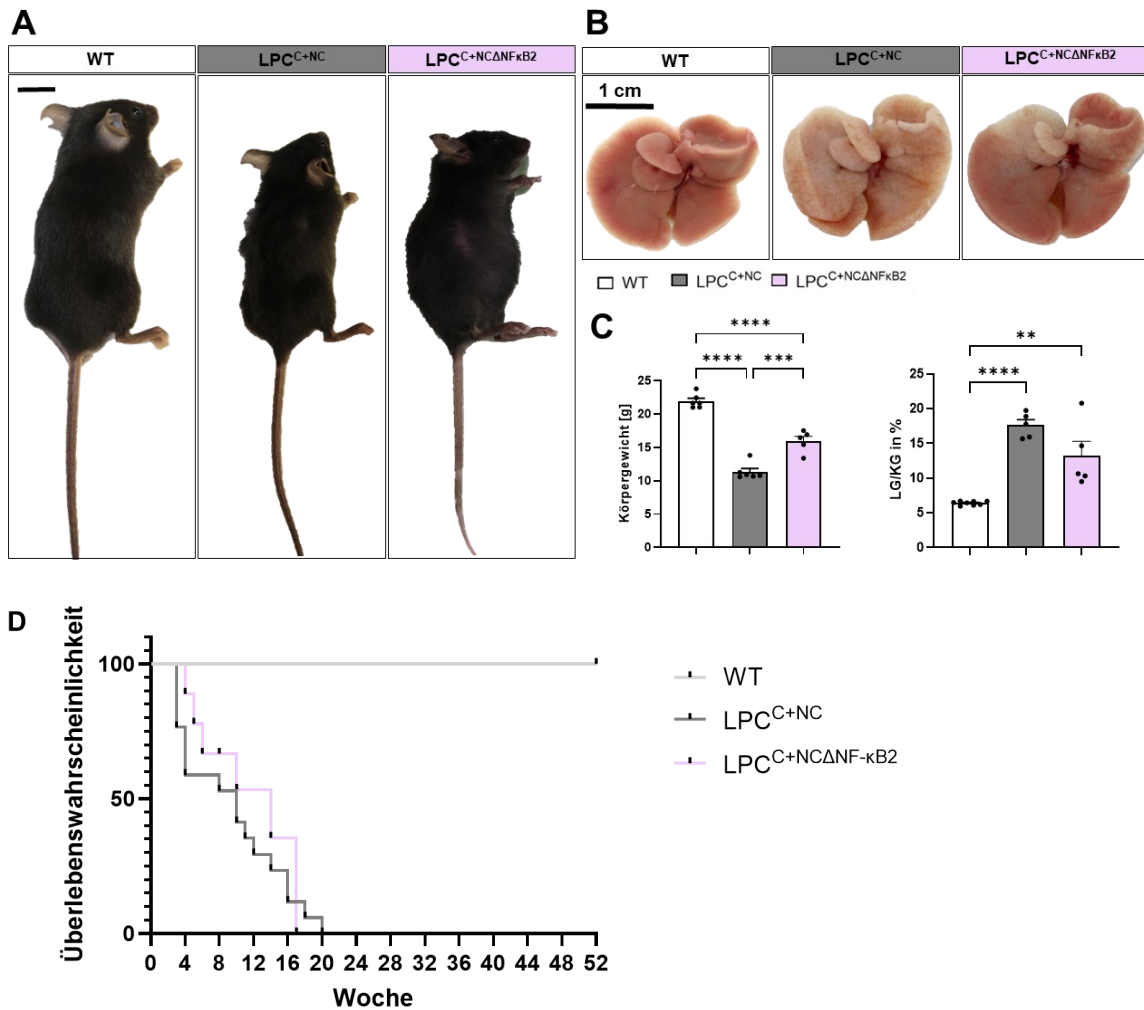
Anhand dieser Ergebnisse ist abzuleiten, dass sich vorliegende Autoimmun-Reaktion primär gegen die Leber richtete, was die Strukturveränderungen, die initial durch die Hyperaktivierung beider NF- $\kappa$ B Signalwege ausgelöst wurden, vermutlich verstärkt.

### 3.8 Zusätzliche Deletion von NF- $\kappa$ B2 beeinträchtigt kaum die Ausprägung des Phänotyps der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse

Da für alle bislang aufgeführten Aspekte neben der Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs ebenfalls die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs erforderlich scheint, sollte die Bedeutung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs weiter differenziert werden. Der Transkriptionsfaktor RelB ist ein zentraler Effektor des nicht-kanonischen Signalwegs, dessen Aktivierung von der Prozessierung von NF- $\kappa$ B2 abhängt (He et al. 2006). Durch die gezielte Deletion von NF- $\kappa$ B2 in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen sollte die Aktivierung des RelB-NF- $\kappa$ B2-Dimers inhibiert werden, um die Rolle der vorgeschalteten Kinasen NIK und Ikk1 bei der Überaktivität des Signalwegs zu überprüfen. Die Erzeugung von LPC<sup>C+NC $\Delta$ NF $\kappa$ B2</sup>-Mäusen (Triple-Mutanten, Tabelle 1) durch Kreuzung mit NF- $\kappa$ B2-gefloxten Mäusen ermöglichte es, die spezifische Relevanz des NF- $\kappa$ B2-RelB-Dimers für den Phänotyp der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse zu bestimmen. Dies bot die Grundlage, um zu analysieren, ob die Überaktivität der vorgeschalteten Kinasen NIK und Ikk1 allein ausreicht, um den Phänotyp zu verursachen.

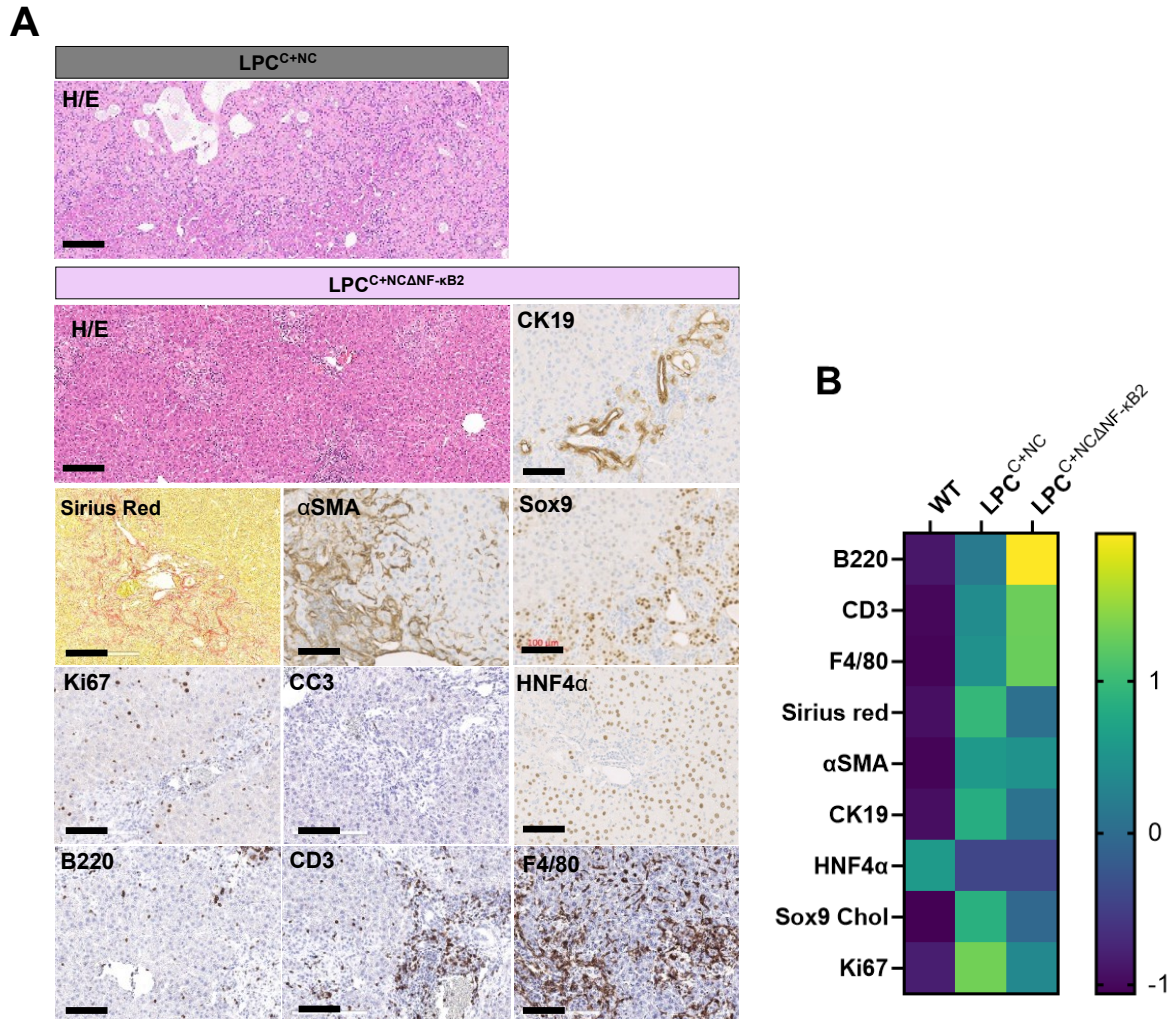
Die NF- $\kappa$ B2<sup>LPC-KO</sup>-Mäuse selbst wiesen allein keine Anzeichen auf eine Leberschädigung hin. Weder auf makroskopischer noch auf mikroskopischer Ebene oder anhand der Serumwerte waren Hinweise auf eine Schädigung vorhanden und auch die Immunzellinfiltration von B-, T-Zellen oder Makrophagen war nicht signifikant höher als in den wildtypischen Vergleichstieren (siehe Phänotyp-Darstellung der NF- $\kappa$ B2<sup>LPC-KO</sup> im Anhang: Abschnitt 6).

Die Triple-Mutante LPC<sup>C+NC $\Delta$ NF $\kappa$ B2</sup> hatte zwar ein etwas höheres Körpergewicht, jedoch ist zu erkennen, dass die Maus durch die zusätzliche Deletion von NF- $\kappa$ B2 nicht vollständig vor der Schädigung geschützt werden konnte (Abbildung 33A+C). Das makroskopische Bild der Leber bestätigte dies. Zwar war die Leber etwas besser durchblutet, jedoch war die Leber im Vergleich mit wildtypischen Organen ebenfalls sehr fibrotisch (Abbildung 33B). Der Kaplan-Meier-Plot zeigt zudem, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit nicht erhöht werden konnte (Abbildung 33D).



**Abbildung 33: Zusätzliche Deletion von NF-κB2 kann nicht vor einer Leberschädigung schützen.** (A) Repräsentative Bilder des äußeren Erscheinungsbilds der angegebenen Mausmodelle. (B) repräsentative Fotos der Lebern aus den verschiedenen Mausmodellen. (C) Gegenüberstellung von Körpergewicht und LG/KG Verhältnis. One-way ANOVA mit Tukey post-hoc Vergleich. \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p>0,0001, n=5-6 (D) Kaplan-Meier-Plot zur Überlebenswahrscheinlichkeit. n=4-15 (Die Daten und Bilder der WT- und LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse sind in Abbildungen 7+8 bereits präsentiert und hier zur besseren Vergleichbarkeit erneut angeführt.)

In der H/E-Färbung ist zu erkennen, dass die periportalen Bereiche ebenfalls expandierten und eine duktiläre Reaktion mit Ansammlung αSMA-positiver Myofibroblasten und durch Sirius red angefärbten fibrotischen Arealen vorhanden war (Abbildung 34A). Im direkten Vergleich mit der H/E-Färbung der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse erscheinen die expandierenden periportalen Areale jedoch kleiner und die Bereiche mit Hepatozyten größflächiger, welche durch eine Quantifizierung der Hepatozyten- und Cholangiozyten-Marker (CK19, Sox9, HNF4α) bestätigt wurden (Abbildung 34).

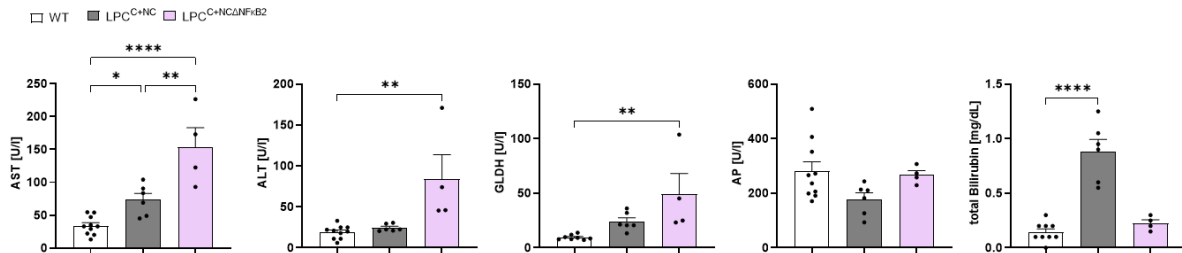


**Abbildung 34: LPC<sup>C+NCΔNFκB2</sup>-Mäuse weisen ähnliche Charakteristika hinsichtlich der veränderten Leberstruktur auf.** (A) repräsentative Ausschnitte der H/E-, Sirius-Red- und immunhistochemischen Färbungen (wie deklariert) von 3 µm dicken Gewebsschnitten aus in Paraffin eingebettetem Gewebe 6-Wochen alter Mäuse. Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. (B) Heat-Map der quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen im Vergleich zu den Wildtyp- und LPC<sup>C+NC</sup>-Färbungen. Die Daten von Wildtyp- und LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren sind bereits in vorherigen Abbildungen präsentiert (Abbildung 17, Abbildung 19 und Abbildung 14) und ausschließlich die ausgewerteten Daten werden zur Vergleichbarkeit erneut angeführt. n=2-5.

Die Fibrose war zwar im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht, aber im Vergleich zu den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen etwas geringer ausgeprägt, erkennbar an den Sirius red- und αSMA-Färbungen (Abbildung 34). Die Immunzellinfiltration durch B-Zellen (B220), T-Zellen (CD3) und Makrophagen (F4/80) war hingegen noch stärker ausgeprägt, als in den LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern (Abbildung 34). Ebenso wie in den LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern lag eine stark ausgeprägte Proliferation (Ki67) ohne Vorhandensein von programmiertem Zelltod (CC3) vor (Abbildung 34).

Die Analyse der Serumwerte zeigte, dass die Transaminasen- (AST und ALT), sowie auch die GLDH-Werte im Vergleich zu den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen signifikant erhöht waren (Abbildung 35).

Insgesamt übersteigt jedoch keiner dieser Werte die Referenzbereiche, die für C57BL/6-Mäuse vom *UDCA – Division of Laboratory Animal Medicine* in Los Angeles herausgegeben sind, was ein Hinweis darauf ist, dass auch hier kein übermäßiger Zelltod stattfand. Der Bilirubin-Wert im Serum der  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Mäuse sank auf ein mit dem Wildtyp vergleichbares Level. Das bestätigt, dass der Bilirubinstoffwechsel, der ein Marker für eine biliäre Schädigung darstellt, weniger beeinträchtigt ist, als in den  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen.



**Abbildung 35: Serumwerte der  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Mäuse im Vergleich zu den  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen und Wildtyp-Kontrollen.** One-way ANOVA mit Tukey post-hoc Vergleich. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (Die dargestellten Serumwerte der  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse sind die identischen Werte, die bereits in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** und Abbildung 20 dargestellt sind, um einen anschaulichen Vergleich zu präsentieren.)

Obwohl einige Veränderungen in der Leberarchitektur beobachtet wurden, ähneln die charakteristischen Merkmale insgesamt noch stark denen, die auch in den  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen zu finden sind. Dies wirft die Frage auf, in wie weit die nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Aktivierung tatsächlich von p100/p52 (NF- $\kappa$ B2) abhängt oder ob möglicherweise alternative NF- $\kappa$ B-Dimere an diesem Prozess beteiligt sind.

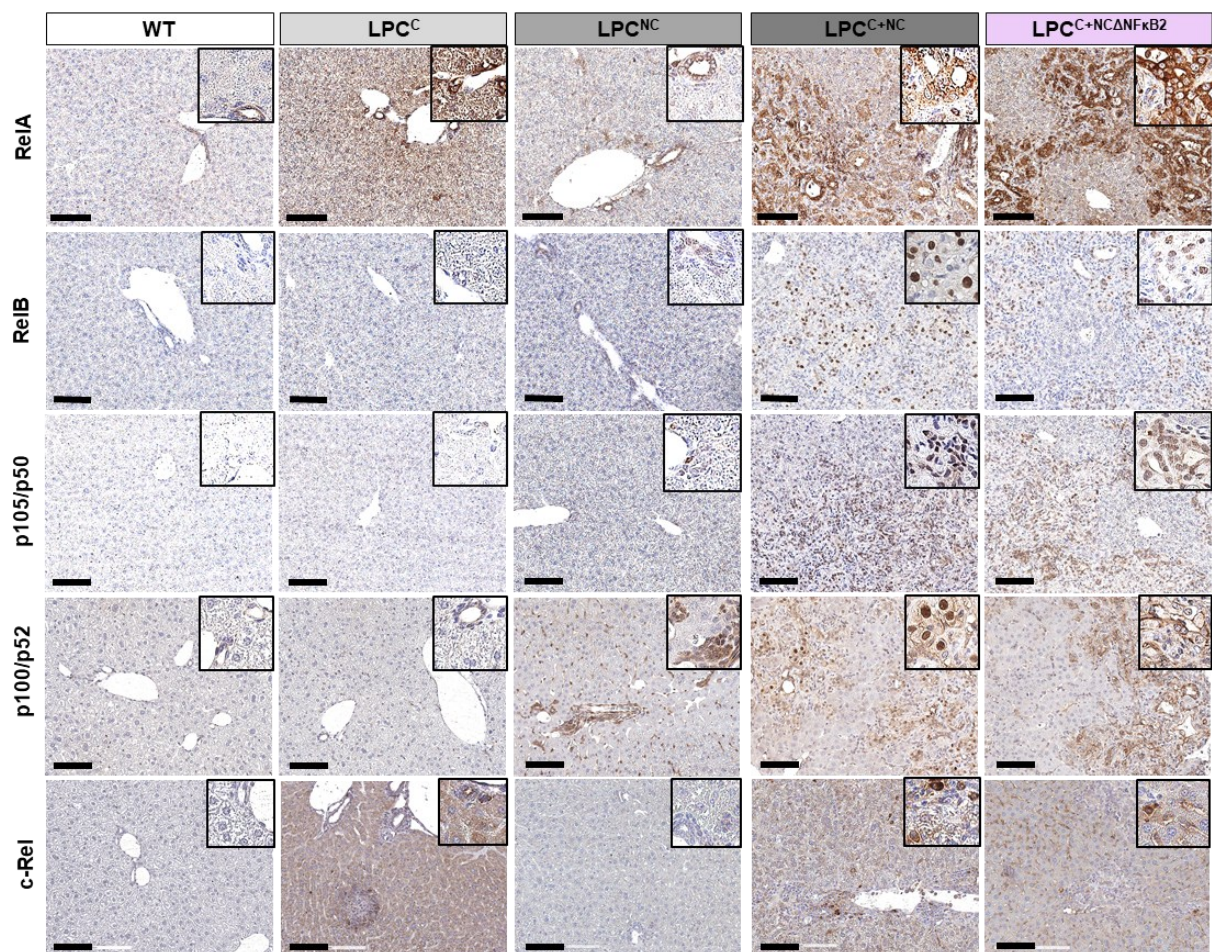
### 3.9 RelB-Kernlokalisierung erfolgt unabhängig von NF- $\kappa$ B2

Um die Aktivierung aller fünf NF- $\kappa$ B-Untereinheiten experimentell zu überprüfen, wurden immunhistochemische Färbungen von Leberschnitte der verschiedenen Mausmodelle angefertigt. Da die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten mit einer Translokation in den Nukleus verbunden sind, lässt die Lokalisation einen Hinweis auf die Aktivierung zu und spiegelt den chronischen Kreislauf aus Aktivierung (Kernlokalisierung) und Inaktivierung (Rücktransport ins Zytoplasma) wider (Abschnitt 1.3.1).

In allen Mausmodellen, bei denen *Ikk2* und damit der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert vorlagen, zeigte die Färbung eine Kernlokalisierung von RelA, insbesondere in den Cholangiozyten (Abbildung 36). In den Hepatozyten war die Färbung ebenfalls verstärkt,

jedoch hauptsächlich im Zytoplasma, was auf eine anhaltende Aktivierung und kontinuierlichen Rücktransport hinweist. Die stärkere Kernlokalisierung in den Cholangiozyten deutet darauf hin, dass die NF- $\kappa$ B-Signalgebung in diesen Zellen eine größere Rolle spielt. Das identische Muster wird in der c-Rel-Färbung dargelegt (Abbildung 36, unten), das ebenfalls vor allem durch den kanonischen Signalweg aktiviert wird (Milanovic et al. 2017).

Die RelB-Färbung zeigte eine nahezu ausschließliche Kernlokalisierung in den Cholangiozyten der LPC<sup>NC</sup>-Lebern. In den LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern schien die RelB-Kerntranslokation weiter verstärkt, was auf die synergistische Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen Signalwegs hinweist. Auch in den LPC<sup>C+NC $\Delta$ NF $\kappa$ B2</sup>-Lebern war eine deutliche Kernlokalisierung von RelB nachweisbar. Dies legt nahe, dass in Abwesenheit von NF- $\kappa$ B2 alternative Dimere gebildet werden können, die eine RelB-Kerntranslokation ermöglichen und deutet darauf hin, dass diese nicht ausschließlich von NF- $\kappa$ B2 abhängig ist.

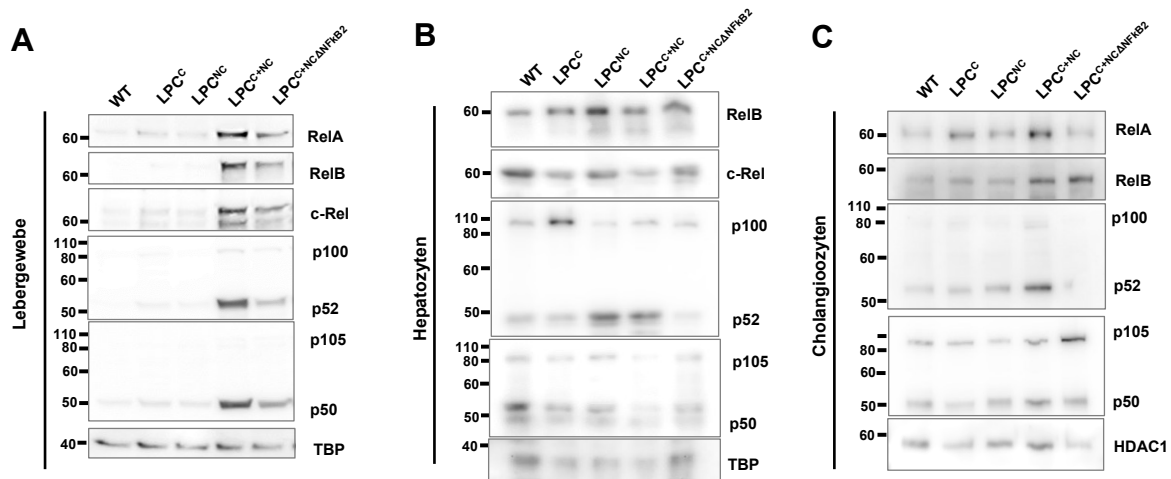


**Abbildung 36: Immunhistochemische Färbung der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten.** Immunhistochemische RelA-, RelB-, c-Rel-, p105/p50- und p100/p52-Färbung von 3  $\mu$ m-dicken Gewebsschnitten aus in Paraffin eingebetteter Lebern 6 Wochen alter Tiere. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

Die p105/p50-Färbung zeigte vor allem in den geschädigten  $LPC^{C+NC}$ - und  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Lebern eine verstärkte Expression und war auch in dem  $LPC^C$ -Modell nicht besonders prägnant. Bei der Anfärbung von NF- $\kappa$ B2 (p100/p52) ist vor allem die Kernlokalisierung in den biliären Zellen erkennbar. Auch in den portalen Bereiche der  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Lebern war eine Färbung erkennbar. Es fällt hierbei auf, dass nicht die Kerne gefärbt sind, sondern die Färbung sich auf den Extrazellularraum der biliären Zellen beschränkte. Dies könnte auf eine Färbung der Immunzellen hindeuten, die nicht zu den Leberparenchym-Zellen gehören und somit die Gendelektion auch nicht aufweisen und eine NF- $\kappa$ B2-Expression aufweisen können.

Ergänzend zu den Färbungen wurden aus Lebergewebe, primären Hepatozyten und Cholangiozyten Kernproteine isoliert und mittels Western Blot auf das Vorhandensein der verschiedenen NF- $\kappa$ B-Untereinheiten im Kern untersucht. In den Kernproteinen aus dem gesamten Lebergewebe war ein verstärktes Signal bei den  $LPC^{C+NC}$ - und  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Proben erkennbar und geht somit mit dem Ergebnis der immunhistochemischen Färbung der Leberschnitte einher (Abbildung 37A). Auch hier war bei den  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Proben ein Signal bei der Detektion von p52 zu erkennen, das eigentlich durch die NF- $\kappa$ B2-Deletion ausgeschaltet sein sollte. Da jedoch ebenso wie bei der Färbung des Gewebsschnitts bei der Isolation von Kernproteinen aus dem gesamten Lebergewebe auch Immunzellen vorhanden waren, wurde der Versuch mit isolierten primären Hepatozyten und Cholangiozyten reproduziert.

Der Western Blot mit Kernproteinen aus den isolierten primären Hepatozyten zeigt, dass die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten - entgegen des Eindrucks in den immunhistochemischen Färbungen der Leberschnitte und dem Western Blot aus Gesamtlebergewebe - auch in den Hepatozyten der Single Mutanten wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, aktiviert wurden (Abbildung 37B). In den  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Hepatozyten war kein p52 detektierbar, was dessen erfolgreiche Deletion bestätigt. RelB hingegen wurde weiterhin in der Kernproteinfraktion detektiert, was bestätigt, dass RelB auch in Abwesenheit von NF- $\kappa$ B2, möglicherweise in Form alternativer Homo- oder Heterodimere, in den Kern translokieren kann. Auch in den Cholangiozyten konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Zudem wurde auch hier in den  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Cholangiozyten die Deletion von NF- $\kappa$ B2 bei zeitgleicher Kerntranslokation von RelB nachgewiesen (Abbildung 37C).



**Abbildung 37: Bestätigung der RelB-Aktivierung in Abwesenheit von NF-κB2.** Western Blot von Kernprotein-Isolaten aus Lebergewebe, primären Hepatozyten und Cholangiozyten über die Kerntranslokation der verschiedenen NF-κB-Untereinheiten. TBP und HDAC1 dienen als Kern-Ladekontrollen.

Dadurch, dass RelB trotz Abwesenheit von NF-κB2 in den Kern gelangt, wurde der nicht-kanonische Signalweg mit der Deletion von NF-κB2 nicht vollständig inhibiert. Die Abwesenheit beeinflusste nicht die Aktivierung der transkriptionsaktiven NF-κB-Untereinheit. In der Literatur wird bei Beeinträchtigung von NF-κB2 häufig ein Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen gezogen (Wirasinha et al. 2021; Sundaram et al. 2023; Klemann et al. 2019).

### 3.10 Autoimmungeschehen und Schädigung weiterer Organe in LPC<sup>C+NCΔNFκB2</sup>-Tieren

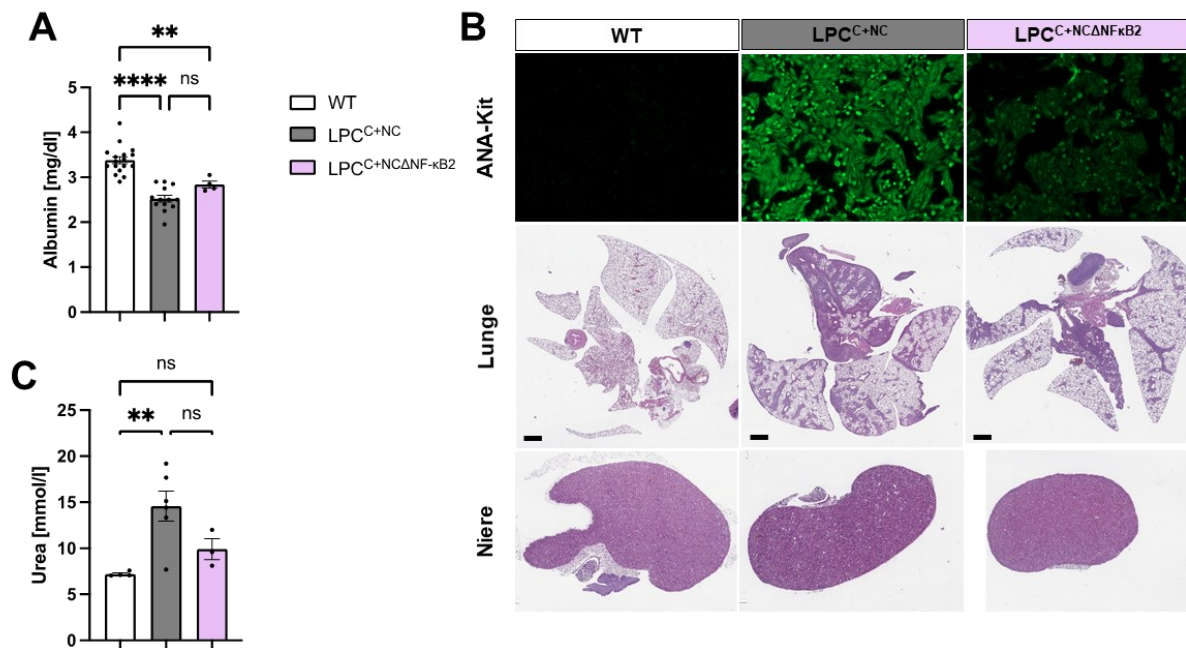
Da auch die LPC<sup>C+NCΔNFκB2</sup>-Mäuse vorzeitig verstarben, wurde zusätzlich zur Beeinträchtigung der Leber-, auch die Nieren- und Lungenfunktion sowie das Vorhandensein eines systemischen Autoimmungeschehens untersucht und mit dem der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse verglichen werden.

Der Albumin-Serumspiegel war auf einem vergleichbaren Level, wie bei den LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren und im Vergleich mit dem Wildtyp ebenfalls signifikant reduziert (Abbildung 38A). Das deutet ebenfalls auf eine beeinträchtigte Leberfunktion, wie sie in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen gezeigt wurde, hin.

Zur Untersuchung einer systemischen Autoimmunität, wurde das Serum auf das Vorhandensein autoreaktiver Antikörper überprüft und mit dem LPC<sup>C+NC</sup>-, sowie wildtypischem Serum verglichen. In Abbildung 38B (oben) ist zu erkennen, dass verglichen mit dem Wildtyp zwar autoreaktive Antikörper vorhanden waren, jedoch nicht in dem Ausmaß wie im Serum der

LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse. Während die Beeinträchtigung der Lungen weiterhin ausgeprägt war, so waren die Veränderungen in der Niere abgemildert verglichen mit den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen (Abbildung 38B+C).

Zusammengefasst implizieren diese Ergebnisse, dass die zusätzliche Deletion von NF-κB2 den nicht-kanonischen NF-κB-Signalweg durch die Bildung alternativer NF-κB-Dimere nicht vollständig inhibiert. Die LPC<sup>C+NCΔNFκB2</sup>-Mäuse weisen weiterhin ähnliche Leber- und Lungenpathologien wie LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse auf, während die Nierenbeteiligung abgemildert und das Autoimmungeschehen weniger ausgeprägt war.



**Abbildung 38: Beeinträchtigung der Funktion weiterer Organe in LPC<sup>C+NCΔNFκB2</sup>-Mäusen.** (A) Albumin-Konzentration im Serum 4-16 Wochen alter Tiere. One-way mit Tukey-post-hoc Vergleich. \*\*\*\* p<0,0001, \*\* p<0,01, ns nicht signifikant. n=5-12 (B) repräsentative Bilder über das Vorhandensein von Autoantikörpern im Serum mittels ANA-Kit und H/E-Färbung 3 μm-dicker Gewebsschnitte von in Paraffin eingebetteter Leber 10-11 Wochen alter Tiere. (C) Urea-Konzentration im Serum 4-16 Wochen alter Tiere. One-way ANOVA mit Tukey-post-hoc Vergleich. \*\* p<0,01, ns nicht signifikant, n=3-5

## 4 Diskussion

Die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege ist ein häufiges und frühes Ereignis bei menschlichen Leberkarzinomen viraler oder nichtviraler Ätiologie (Luedde and Schwabe 2011; Liu et al. 2002). Trotz dieser Erkenntnis bleibt weitgehend unklar, inwieweit der kanonische und der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg parallel aktiv vorliegen und welche Rolle die Interaktion der Signalwege bei chronischen Lebererkrankungen spielt. Der Entzündungsmediator NF- $\kappa$ B reguliert zentrale Prozesse, indem er die mit chronischen Lebererkrankungen einhergehende Wundheilungsreaktion kontrolliert und so den Krankheitsverlauf maßgeblich beeinflusst (Abschnitt 1.3.2). Ein verbessertes Verständnis für das Zusammenspiel der NF- $\kappa$ B-Signalwege könnte neue Ansätze zur gezielten therapeutischen Modulation von NF- $\kappa$ B eröffnen, insbesondere da eine vollständige Blockade aufgrund schädlicher Nebenwirkungen nicht praktikabel erscheint (Yamamoto and Gaynor 2001; Rahman and Fazal 2011).

Chronische Lebererkrankungen gehen oft mit anhaltenden Entzündungsprozessen einher, die die Krankheitsprogression aktiv fördern (Luedde and Schwabe 2011). Während eine kurzfristige Inflammation vorteilhaft sein kann, wird die chronische Entzündung und die assoziierte Wundheilung mit der Fibrose-Entstehung in Verbindung gebracht, die schließlich zu Zirrhose und HCC-Entstehung führen kann. Die Leberzirrhose stellt dabei das Endstadium vieler chronischer Lebererkrankungen dar und ist mit mehr als 2 % aller weltweiten Todesfälle assoziiert (Huang et al. 2023). Ihre Inzidenz steigt mit zunehmenden Alkoholkonsum und der wachsenden Anzahl adipöser Personen stetig an, wodurch die klinischen Folgen der Erkrankung ein zunehmendes Gesundheitsproblem darstellen. Darüber hinaus zählt die Zirrhose, selbst wenn sie stabil ist, zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms. Auch die Mortalitätsrate der Leberzirrhose ist in den letzten Jahrzehnten angestiegen (Nassereldine et al. 2024). Auch wenn experimentelle Studien gezeigt haben, dass Fibrose unter bestimmten Bedingungen reversibel sein kann, ist die Diagnose häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium möglich, wenn therapeutische Optionen bereits stark eingeschränkt sind (Fallowfield and Hayes 2011) (Divens and Rivera 2022).

In dieser Arbeit wurde eine direkte Gegenüberstellung von überaktiviertem kanonischem und nicht-kanonischem NF- $\kappa$ B-Signalweg in Leberparenchymzellen (LPC) durchgeführt und untersucht, inwieweit sie zusammenwirken.

Die Deletion von *Traf3* in LPC führt zur Überaktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs (Abbildung 6), was in vereinzelter Hepatozyten-Proliferation und duktilärer Reaktion mit Entzündung resultiert (Abbildung 8 und Abbildung 16). Eine isolierte

Überaktivierung des kanonischen Signalwegs in LPC durch konstitutive Aktivierung von Ikk2 zeigt erst nach 12-18 Monaten Veränderungen in der Leber, die mit einer HCC-Entwicklung assoziiert sind (Svinarenko et al. 2019; Finkin et al. 2015).

Bei simultaner Aktivierung beider Signalwege potenzieren sich die schädlichen Effekte: Die Tiere entwickeln eine ausgeprägte Zirrhose mit duktilärer Reaktion einschließlich Gallengangszystenbildung und starker Entzündung der Leber, die mit einer Dedifferenzierung der Hepatozyten einhergeht (Abschnitt 3.4). Der fortschreitende Verlust der Leberfunktion führt schließlich zu Funktionsstörungen sekundärer Organe (Abschnitt 3.6) mit letalen Folgen innerhalb weniger Wochen (Abbildung 10).

Die Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Rolle einer gemeinsamen Aktivierung beider NF- $\kappa$ B-Signalwege in der Progression zirrhotischer Lebererkrankungen, die zudem auch negative Auswirkungen auf sekundäre Organe wie der Lunge oder der Niere zur Folge hatte. Welche molekularen Mechanismen und Begleitumstände für diese Auswirkungen verantwortlich sind, wird im Folgenden punktuell diskutiert.

#### 4.1 Überaktivierung beider NF- $\kappa$ B-Signalwege in LPC führt zu Multiorganversagen

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die konstitutive Einzelaktivierung des kanonischen - oder nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs in Leberparenchymzellen nur geringfügige pathologische Auswirkungen innerhalb des beobachteten Zeitrahmens von 52 Wochen haben, was sich durch den Einfluss von Kompensationsmechanismen erklären lässt: In den LPC<sup>C</sup>-Mäusen liegt beispielsweise eine Hochregulierung von Traf3 vor (Abbildung 5), einem negativen Regulator des nicht-kanonischen Signalwegs (He et al. 2007a), wodurch der nicht-kanonische Signalweg verstärkt inhibiert wird. Ebenso wird die isolierte Aktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs (LPC<sup>NC</sup>) dadurch limitiert, dass die transkriptionsaktiven RelB-NF- $\kappa$ B2-Dimere Zielgene des kanonischen Signalwegs sind und bei isolierter Aktivierung nur begrenzt verfügbar sind. In den LPC<sup>NC</sup>-Mäusen kommt es dadurch zu einer verringerten Expression von NF- $\kappa$ B2 verglichen mit der simultanen Aktivierung in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen (Abbildung 6). Dies bestätigt eine Abhängigkeit der Aktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs vom kanonischen Signalweg.

Die vorliegenden Ergebnisse werden durch weitere Literatur bestätigt. Yu et al. beschreiben, dass eine gesteigerte Ikk1-Aktivität durch Phosphorylierung von RelA dessen Abbau sowie die Rekrutierung von PIAS1 (*engl.: protein inhibitor of activated STAT1*) zur Promotorregion der

NF- $\kappa$ B-Zielgene fördert, wodurch dessen Bindung an die DNA nennenswert inhibiert wird (Yu et al. 2020). Die durch die Traf3-Deletion bedingte Hyperaktivität von Ikk1 in den LPC<sup>NC</sup>-Tieren, inhibiert nicht nur die kanonische Signalwegaktivierung, sondern auch die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs durch die damit verbundene geringere Zielgenexpression von RelB und NF- $\kappa$ B2. Zudem konnte bei einer kinaseinaktiven Form von NIK, nicht nur eine Inaktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs, sondern ebenfalls die Inaktivierung des kanonischen Signalwegs beobachtet werden (Willmann et al. 2014). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B scheint nicht nur die Aktivierung weiterer Signalwege zu beeinflussen (Abschnitt 1.3.2), sondern auch in sich reguliert zu sein. Das verdeutlicht welche strenger gegenseitiger Regulation die beiden Signalwege unterliegen.

Die Tatsache, dass die Single Mutanten auch innerhalb der 52 Lebenswochen keine merklichen Störungen aufweisen, bestätigt, dass die konstitutive Aktivierung der Signalwege in diesen Modellen auch langfristig kompensiert werden kann (Abbildung 10). Obwohl auch die Inhibierung von NF- $\kappa$ B-Signalwegen durch die Beeinträchtigung physiologischer Prozesse schädliche Folgen haben kann (Yamamoto and Gaynor 2001; Rahman and Fazal 2011), deutet eine Studie darauf hin, dass zur Genregulation neben der NF- $\kappa$ B-Untereinheit zusätzliche Transkriptionsfaktoren an die Zielgenregionen rekrutiert werden und ihre kombinierte Aktivität schließlich die Genexpression bestimmt. Neben der NF- $\kappa$ B-Untereinheit RelA binden beispielsweise bei der Regulation des Illa-Gens in dendritischen Zellen acht weitere Transkriptionsfaktoren an die Enhancer- und Promotorregionen (Meier-Soelch et al. 2021). Diese kooperative Aktivität erklärt, warum der Verlust einer einzelnen NF- $\kappa$ B-Untereinheit nicht zwangsläufig den vollständigen Ausfall der Genexpression bewirkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ebenso die Überaktivierung eines einzelnen Signalwegs (in LPC<sup>C</sup>- und LPC<sup>NC</sup>-Mäusen), eventuell durch die hier beschriebenen komplexen Interaktionen der Genregulation durch zusätzliche Transkriptionsfaktoren kompensiert sein könnten.

Im Gegensatz dazu führt die simultane Aktivierung beider Signalwege in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen zu einer Dysregulation der Gewebshomöostase, die letztlich eine Leberzirrhose mit fortschreitender Hepatozyten-Dedifferenzierung und Verlust des klassischen Leberläppchen-Aufbaus verursacht. Dies verdeutlicht die Rolle der NF- $\kappa$ B-Signalwege in der Regulierung der Leberhomöostase und zeigt, wie die parallele Dysregulation zur Pathogenese von Fibrose und Zirrhose beiträgt. Durch die gleichzeitige Modifikation beider Signalwege scheinen mögliche Kompensationsmechanismen umgangen zu werden, was den Zusammenbruch der Gewebshomöostase begünstigt. Das verdeutlicht, dass Patienten, bei denen eine Dysregulation der NF- $\kappa$ B-Aktivierung vorliegt, besonders gefährdet sind, insbesondere wenn die

Beeinflussung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung als therapeutischer Ansatzpunkt in Betracht gezogen wird (Yu et al. 2020).

LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse zeigen eine signifikante Expansion des biliären Kompartiments (Abbildung 17, Abbildung 22). Damit einhergehend weisen die verbleibenden Hepatozyten verstärkt Marker auf, die vorwiegend in Progenitor- oder Gallengangszellen exprimiert werden und es ist eine altersabhängige Abnahme der Hepatozytenfunktion zu erkennen (Abbildung 19, Abbildung 21 und Abbildung 22). Dies deutet auf eine Dedifferenzierung und potenzielle Transdifferenzierung von Hepatozyten in Cholangiozyten hin, die zu Lasten der verbleibenden Hepatozyten stattfindet. Untersuchungen belegen, dass eine Transdifferenzierung von Hepatozyten in Cholangiozyten möglich ist und als ein signifikanter Reparaturmechanismus fungiert, um Gewebeschädigungen zu kompensieren (Schaub et al. 2018; Deng et al. 2018; Wells and Watt 2018). Unterstützt wird diese Hypothese durch die erhöhten Bilirubin-Serumspiegel in Kombination mit unveränderten AP-Werten in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen (Abbildung 20). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Leber Bilirubin zwar nur unzureichend verarbeitet, die Funktion der Gallenwege und der Gallenfluss aber weitgehend intakt bleibt und vermutlich keine Gallenstauung vorliegt. Der Anstieg der Bilirubin-Spiegel lässt sich durch den zunehmenden Verlust ausgereifter Hepatozyten erklären, da er auf eine Störung des Bilirubinstoffwechsels oder der allgemeinen Leberfunktion hinweist.

Das Fehlen eines ausgeprägten Gallenstaus bei LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren, könnte auf die stark expandierenden Gallengänge zurückzuführen sein, obwohl Cholangiozyten unter normalen Bedingungen in der Leber überwiegend quieszent sind und kaum proliferieren. Bei Erkrankungen werden in Abhängigkeit pathologischer Veränderungen Reparaturmechanismen aktiviert, welche mit Immunzellen-Rekrutierung, Cholangiozyten-Proliferation und einer Dedifferenzierung der Hepatozyten einhergehen können (Lan et al. 2022). Mit der Modifikation der NF- $\kappa$ B-Signalwege in den LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren scheint im biliären System ein Reparaturmechanismus aktiviert zu sein, wodurch es zu einer so starken Proliferation und Expansion kommt. Die Tatsache, dass das biliäre Kompartiment erheblich von der Stimulierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs beeinträchtigt wird, deckt sich mit vorherigen Beobachtungen, die ebenfalls darauf hindeuten, dass der Signalweg in diesem Kompartiment eine besondere Rolle einnimmt. So reguliert Ikk1 wichtige Funktionen biliärer Epithelzellen und eine Blockade der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Ikk1/2<sup>LPC-KO</sup> führt zum Verlust von Gallengängen mit Entwicklung einer teils letalen Cholestase (Luedde et al. 2008). Auch in Abschnitt 3.9 konnte gezeigt werden, dass gerade die Cholangiozyten von einer Hyperaktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs durch Traf3-Deletion betroffen sind. Das bestärkt die Bedeutung des nicht-kanonischen

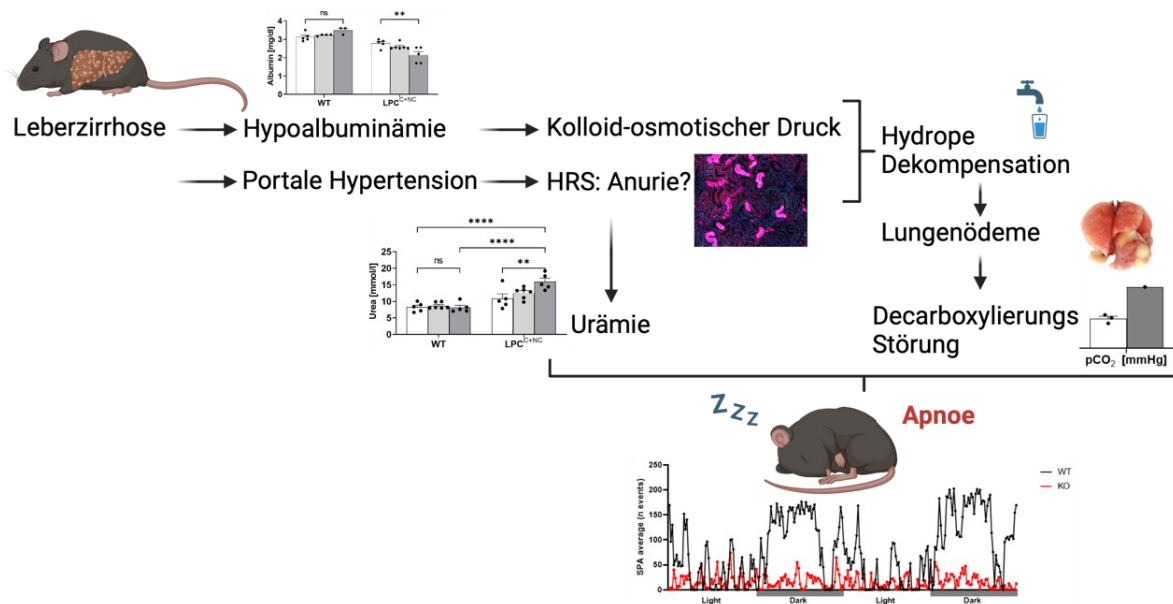
Signalwegs oder im Besonderen von Ikk1 in den Gallengangszellen, was letztlich die gesamte Leberstruktur beeinträchtigt. Chen et al. beschreiben, dass die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs mit einer Leberregeneration assoziiert ist (Chen, Lu, and Zhang 2021). Anhand der vorliegenden Daten scheint vor allem das biliäre Kompartiment von der dort beschriebenen NF- $\kappa$ B-assoziierten Regeneration betroffen zu sein.

Als Reaktion auf die periportale Schädigungen konnte in Studien ebenfalls eine Reaktivierung von Reprogrammierungs- und Progenitor-Genen in ausdifferenzierteren Hepatozyten identifiziert werden (Li et al. 2023). Es wurde gezeigt, dass der Prozess vor allem durch den Entzündungsfaktor IL-6, der von Kupffer-Zellen freigesetzt wird und STAT3 (*engl.: signal transducer and activator of transcription 3*) aktiviert, die Veränderungen der Hepatozytenmarker induziert. Ursprünglich wurde IL-6 als Differenzierungsfaktor für B-Zellen identifiziert und ist dort für die Antikörperproduktion erforderlich. Eine IL-6 Überproduktion stimuliert die Produktion von Autoantikörpern und wird mit der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Mihara et al. 2012). Auch im Zusammenhang mit anderen Zelltypen wird IL-6 als Promotor für Dedifferenzierungsprozesse beschrieben (Zhang et al. 2023; Zhu et al. 2022).

Zudem wird IL-6, als Zielgen der NF- $\kappa$ B -Aktivierung, eine wesentliche Funktion bei der Aufrechterhaltung der Leberhomöostase zugesprochen (Son et al. 2008). Dies lässt sich auch anhand einer erhöhten Expression in den LPC<sup>C+NC</sup>-Hepatozyten beobachten (Abbildung 15). Im Gegensatz zu Hepatozyten wird Cholangiozyten durch die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren und Zytokine eine zentrale Bedeutung in der Entzündungsreaktion der Leber beigemessen (Yoo, Lim, and Choi 2016), wodurch potenziell auch IL-6 freigesetzt werden könnte. In den Leberschädigungsmodellen, die von Li et al. untersucht wurden, wird hingegen eine Freisetzung von IL-6 aus infiltrierten Kupffer-Zellen beschrieben, das schließlich in den Hepatozyten über die STAT3-Aktivierung eine Dedifferenzierung fördert (Li et al. 2023). Auch LPC<sup>C+NC</sup>-Lebergewebsschnitte zeigen eine ausgeprägte Infiltration von Kupffer-Zellen, wodurch eine IL-6-Freisetzung auch hier denkbar wäre (Abbildung 14).

Die progressive Abnahme der Hepatozytenfunktion in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen, die unter anderem mit einer Hypoalbuminämie einhergeht (Abbildung 24), könnte ebenfalls mit der verstärkten IL-6- und TNF-Expression in Verbindung stehen, da diese mit einer Reduktion der Albumin-Synthese assoziiert ist (Blunt, Nicholson, and Park 1998). Albumin trägt wesentlich zur Erhaltung des kolloidosmotischen Drucks bei, indem es Flüssigkeit im Blutgefäß hält (Lala, Zubair, and Minter 2024). Folglich gelangt bei niedriger Albumin-Blutkonzentration vermehrt Flüssigkeit in den extravasalen Raum und lagert sich dort an (Blunt, Nicholson, and Park 1998).

Zudem führt die zirrhotische Leberstrukturveränderung zu einer portalen Hypertension, die das hepatorenale Syndrom fördert (Iwakiri and Trebicka 2021). Die verringerte Nierendurchblutung beeinträchtigt dessen Funktion mit der Folge einer Urämie (Abbildung 26). Zusätzlich kann durch die verringerte Nierenfunktion weniger Flüssigkeit ausgeschieden werden, wodurch die Flüssigkeitsansammlungen noch verstärkt werden können (Egerod Israelsen, Gluud, and Krag 2015). Besonders risikobehaftet sind Wasseransammlungen in der Lunge, die Entzündungen mit sich ziehen können (Guo et al. 2024), wie es auch in den  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen der Fall ist (Abbildung 27A). Die damit verbundene Beeinträchtigung der Atmung führt dazu, dass sich  $CO_2$  im Blut anreichern kann (Abbildung 27B). Sowohl die Urämie, als auch die Anreicherung des  $CO_2$  bewirken eine Einschränkung der körperlichen Aktivität (Abbildung 28) und können schließlich in einer  $CO_2$ -Narkose enden (Prezant 1990), die als Grund für das frühzeitige Versterben der Mäuse angenommen wird. Der hypothetische Krankheitsverlauf ist schematisch in Abbildung 39 dargestellt.



**Abbildung 39: Hypothese über den Verlauf des Multiorganversagens in  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen.** Zur Veranschaulichung sind die wichtigsten Daten, die schon im Ergebnis-Teil gezeigt worden sind, hier erneut aufgeführt.

Die Lebensdauer der untersuchten Mäuse variierte und lag zwischen 3 und 20 Wochen (Abbildung 10). Dieses breite Spektrum deutet auf erhebliche interindividuelle Unterschiede

im Krankheitsverlauf hin. Bei einigen jungen Tieren, die frühzeitig eine Verschlechterung des Allgemeinzustands aufwiesen, war eine starke Beeinträchtigung der Nierenfunktion erkennbar (Abbildung 26), während bei genetisch identischen Geschwistern solche Schäden noch nicht nachweisbar waren. Diese Unterschiede lassen vermuten, dass der Krankheitsverlauf maßgeblich von der Ausbreitung der strukturellen Leberveränderungen und den individuellen Kompensationsmechanismen des Organismus abhängt. Dies unterstreicht die Variabilität im Verlauf und im Ausgang des Multiorganversagens.

Die Entwicklung biliärer Zysten und einer Zirrhose sind bekannte Risikofaktoren für die Entstehung primärer Leberkarzinome (Jablonska 2012; Pinter et al. 2016). Ein Transkriptionsfaktor, der neben NF- $\kappa$ B bei der Entstehung hepatozellulärer Karzinome (HCC) eine entscheidende Rolle spielt, indem er die kompensatorische Leberregeneration beeinflusst, ist STAT3, der unter anderem von IL-6 aktiviert wird (He and Karin 2011). Zudem wird die Rekrutierung hepatischer Ovalzellen, ausgelöst durch die Dedifferenzierung von Hepatozyten, sowie eine intensive Zellproliferation mit der Entwicklung primärer Leberkarzinome in Verbindung gebracht (Sell and Leffert 2008; Zheng et al. 2011). Die LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse zeigen daher eine Vielzahl von Risikofaktoren für die Entstehung primärer Leberkarzinome. Aufgrund ihres frühen Versterbens lässt sich diese jedoch hier nicht beobachten oder überprüfen. Das Modell beweist jedoch auch die Relevanz der hepatischen Läppchenstruktur für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen. Mausmodelle mit ähnlich starker Fibrose bei denen die Struktur geordneter bleibt und die Zentralvene und periportale Bereiche klar voneinander differenziert werden können, zeigten kein frühzeitiges Versterben durch ein Multiorganversagen (Vucur et al. 2023).

Die Ergebnisse legen dar, dass die simultane Aktivierung von kanonischem und nicht-kanonischem NF- $\kappa$ B-Signalweg nicht nur zur Dysregulation der Leberhomöostase führt, sondern auch strukturelle und funktionelle Veränderungen auslöst, die zur Entwicklung von Leberzirrhose und Multiorganversagen beitragen. Die Beobachtungen unterstreichen die Relevanz einer präzisen NF- $\kappa$ B-Regulation für die Aufrechterhaltung der Leberhomöostase und betonen dessen maßgebliche Rolle in der Pathogenese der Lebererkrankungen. Die präzise Regulation und verschiedenste Kompensationsmechanismen helfen der Progression von Fibrose und Zirrhose, sowie der Entstehung von Multiorganschäden vorzubeugen.

## 4.2 Genetische Konstellation der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse inhibiert den Zelltod

Während der Zelltod von Hepatozyten klassischerweise als zentraler Treiber der fibrotischen Umstrukturierung in der Pathogenese der Leberzirrhose betrachtet wird (Lu, Yu, and Song 2023; Zhou, Zhang, and Qiao 2014) und als kennzeichnendes Merkmal vieler chronischer Lebererkrankungen gilt (Gautheron, Gores, and Rodrigues 2020; Shojaie, Iorga, and Dara 2020), zeigt das LPC<sup>C+NC</sup>-Modell, dass die schädliche Gewebeveränderung auch ohne signifikanten Hepatozytenverlust durch programmierten Zelltod erfolgt. Die LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse bieten Einblicke in die Mechanismen der Leberzirrhose, die unabhängig von einer verstärkten Apoptose oder Nekroptose auftreten (Abbildung 13). Die Anzahl funktionsfähiger Hepatozyten reduziert sich zwar, jedoch ist das auf eine vermutliche Dedifferenzierung zurückzuführen (Abbildung 21). Die Serum-Transaminasen und GLDH als Marker für hepatozellulären Tod, sind bei den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen nur leicht erhöht und zeigen teilweise vergleichbare Werte wie die Kontrollgruppe (Abbildung 11), was auf das Ausbleiben eines massiven hepatozellulären Sterbens hindeutet. Im Gegensatz dazu deuten erhöhte AST-Werte in Abwesenheit von erhöhtem ALT auf strukturelle Veränderungen im Lebergewebe hin, die möglicherweise auf eine sich entwickelnde Leberzirrhose zurückzuführen sind (Lala, Zubair, and Minter 2024).

Im Vergleich zu jüngeren Tieren (1 und 4 Wochen alt) zeigen die 6 Wochen alten LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse bereits fortgeschrittene periportale Umstrukturierungen (Abbildung 9 und Abbildung 8), die mit einem leichten Anstieg der Transaminasen einhergehen (Abbildung 11 und 6.1). Dies könnte unabhängig vom Zelltod auch aus einer metabolischen Belastung der Hepatozyten hervorgehen (Schuster et al. 2024). Die Hyperammonämie, die bei den LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren vorliegt (Abbildung 25), trägt zu dem metabolischem Stress bei, der die Zellfunktion beeinträchtigt, ohne den vollständigen Zelluntergang auszulösen (Wang et al. 2022). Dabei wird beschrieben, dass die Zellmembranstruktur der Hepatozyten erhalten bleibt, aber eine erhöhte Permeabilität für die Transaminasen vorliegt, wodurch moderate Erhöhungen im Serum zu verzeichnen sein können, ohne dass eine massive Zellzerstörung stattfindet (Oh et al. 2017). Das könnte erklären, wodurch die leicht erhöhten Werte zustande kommen, ohne dass programmierter Zelltod verstärkt auftritt, was durch die immunhistochemische CC3- und TUNEL-Färbungen in den LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern dargelegt wird (Abbildung 12).

Die zusätzliche Deletion von Caspase 8 und MLKL hingegen, kann die LPC<sup>C+NC</sup>-Tiere *in vivo* nicht vor der Entwicklung der Leberzirrhose und den damit verbundenen Auswirkungen, wie der verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit schützen (Abbildung 13B). Diese Ergebnisse belegen, dass die Inhibierung des programmierten Zelltods die Krankheitsprogression nicht

beeinträchtigt und eventuell sogar eine nachteilige Wirkung auf die Leberhomöostase haben kann. Die Gesamtheit der Beobachtungen lässt den Schluss zu, dass eine Hemmung von Apoptose und Nekroptose keine präventive Wirkung auf das Fortschreiten der entzündlichen Prozesse sowie der Gewebsumstrukturierung im LPC<sup>C+NC</sup>-Modell hat.

Die Überaktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege im LPC<sup>C+NC</sup>-Modell unterdrückt Zelltodprozesse durch die Förderung antiapoptotischer und antioxidativer Gene, sowie die Inhibierung der Caspase-Aktivität (Papa et al. 2009; Luo, Kamata, and Karin 2005). Diese Konstellation unterbindet den programmierten Zelltod und bewirkt möglicherweise eine nachteilige Akkumulation geschädigter Zellen, was die Leberhomöostase beeinträchtigt und die Entwicklung von Fibrose und Zirrhose unterstützt.

Ein weiterer zentraler Regulator des programmierten Zelltods ist RIPK1 (Abschnitt 1.2, Abbildung 2). Dessen Kinase-Aktivität wird durch überaktive Ikk1- und Ikk2-Signalübertragung mittels inhibitorischer Phosphorylierung gehemmt (Imai et al. 2024). Durch die genetische Konstellation in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen kommt es dazu, dass insbesondere Ikk2, durch die Traf3-Deletion jedoch auch Ikk1 überaktiv vorliegt und RIPK1 inhibitorisch phosphorylieren können. Dies verhindert den Zelltod, was wiederum die Expansion des Gallengangssystems und die Zystenbildung durch eine ungehemmte Proliferation der Cholangiozyten fördert. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass mit der zusätzlichen Deletion von RIPK1 und der damit verbundenen Aktivierung von programmiertem Zelltod, in JNK1/2<sup>LPC-KO</sup>-Mäusen eine biliäre Expansion und Zystenbildung verhindert wird (Muller et al. 2021). Es ist zu vermuten, dass eine zusätzliche Deletion von RIPK1 und damit einhergehende Zelltodaktivierung möglicherweise auch in dem vorliegenden LPC<sup>C+NC</sup>-Modell eine protektive Wirkung haben würde.

In cholestatischen Lebererkrankungen führt die Akkumulation von Gallensäuren in der Regel zur Apoptose von Hepatozyten (Shojaie, Iorga, and Dara 2020). In LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern hingegen versterben die Hepatozyten trotz stark erhöhter Gallensäurespiegel nicht (Abbildung 12 und Abbildung 24), was bestärkt, dass die genetische Modifikation einen zellprotektiven Mechanismus aktiviert. Diese Inhibierung des Zelltods könnte zudem die Dedifferenzierung der Hepatozyten fördern und eine dysfunktionale Zellpopulation schaffen, die für die Krankheitsprogression anfällig ist.

Darüber hinaus verursacht die chronische Cholestase eine biliäre Entzündung, die permanente Schäden wie biliäre Zirrhose begünstigt (Menon and Holt 2019). Diese Entzündung geht einher mit einer Umstrukturierung des Lebergewebes, wobei sowohl Hepatozyten als auch Cholangiozyten involviert sind. Die Cholangiozyten, welche die Gallengänge auskleiden,

reagieren auf den chronischen Entzündungsreiz und proliferieren verstärkt, was zu einer Expansion des Gallengangskompartmentes führt und eine biliäre Fibrose begünstigt. Diese duktiläre Reaktion ist ein typisches Merkmal cholestase-assoziierten Erkrankungen und trägt durch die proinflammatorischen Signale zur Progression der Leberfibrose bei (Wu et al. 2021). In der Literatur wird die Leberzirrhose meist als wiederholter Zelltod- und Regenerationszyklus von Hepatozyten beschrieben (Zhou, Zhang, and Qiao 2014; Gaul et al. 2021). Die hier vorliegenden Ergebnisse betonen jedoch die Rolle der NF- $\kappa$ B-aktivierten Entzündung als wichtigen Faktor für die Krankheitsprogression. Chronische Entzündung, wie sie in der Hepatokarzinogenese als Tumorinitiator fungiert, zeigt hier eine ähnliche Wirkung, indem sie zur Leberfibrose beiträgt und die Immunzellinfiltration fördert (He and Karin 2011). Vor allem die Nekroptose wird durch die Freisetzung von DAMPs (*engl.: damage associated molecular patterns*) und Zytokinen als eine proinflammatorische Zelltodform beschrieben, die möglicherweise eine Schlüsselrolle bei der Entzündungsreaktion und der Pathogenese entzündlicher Lebererkrankungen spielt (Pasparakis and Vandenabeele 2015; Weinlich et al. 2017). Die Ergebnisse unterstreichen, dass nicht der Zelltod selbst, sondern die daraus resultierende entzündliche Mikroumgebung und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B maßgeblich die Entwicklung und Progression der Leberzirrhose beeinflussen.

In dem Zusammenhang von Zelltod und Fibrinogenese in der Leber sind TGF- $\beta$  und der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) wesentliche Mediatoren, die fibrotische Prozesse fördern (Bonner 2004). Ein direkter Zusammenhang zwischen Zelltod und Fibrose bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Der Rezeptor P2Y<sub>14</sub>, der in Sternzellen angereichert ist, könnte jedoch eine Verbindung zwischen epithelalem Zelltod und der Fibrinogenese herstellen (Mederacke et al. 2022). Seine Aktivierung wird durch Liganden wie UDP-Glucose und -Galactose vermittelt, die in der Regel bei Zelltod freigesetzt werden. Da jedoch kein verstärkter Zelltod in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen nachgewiesen wurde, bleibt unklar ob die Liganden unabhängig vom Zelltod freigesetzt werden oder diese Signalübertragung nicht involviert ist. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass die Krankheitsprogression und Entwicklung der Leberzirrhose weniger auf den Zelltod selbst als auf die daraus resultierende Entzündung und die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zurückzuführen sind. Die Immunzellinfiltration in die Leber scheint ein zentraler Aspekt für die pathologische Gewebeumstrukturierung und das Fortschreiten der Zirrhose zu sein.

### 4.3 Wechselseitige Interaktionen von Immunantwort und Leberstruktur

Die Immunezellinfiltration stellt einen wesentlichen Faktor bei der Prognose des Krankheitsbildes dar (Lan et al. 2022). In den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen führt die chronische NF-κB-Aktivierung zu einer anhaltenden Immunezellinfiltration mit einer Ansammlung von Makrophagen (Abbildung 14), die die Leberstruktur und -funktion signifikant beeinträchtigt (Abbildung 22). Eine intakte Leberarchitektur ist zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz durch die Präsentation von Antigenen in den Sinusoiden erforderlich (Parlar et al. 2023; Grakoui and Crispe 2016), wobei die Rolle der adaptiven Immunität bei Leberschädigungen bislang noch nicht hinreichend erforscht ist (Shen et al. 2017). Die Überaktivierung der NF-κB-Signalwege führt in den LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern zu einer Destruktion der Leberarchitektur mit einer fibrotischen Gewebeveränderung (Abbildung 8), wodurch sich neue Einblicke in die Auswirkungen auf die Immunität gewinnen lassen. Die kontinuierliche Entzündung und Umstrukturierung der Leber in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen mindert somit wahrscheinlich deren physiologische Antigen-spezifische Toleranz und begünstigt die systemische Autoimmunität (Abbildung 29).

Chronische Leberentzündungen stehen im engen Zusammenhang mit der Aktivierung von Kupffer-Zellen, den in der Leber ansässigen Makrophagen, die Hepatozyten angreifen und hepatische Sternzellen (HSC, *engl.: hepatic stellate cell*) aktivieren. HSCs stellen die wichtigsten Kollagen-produzierenden Zellen in der Leber dar und sind maßgeblich an der Fibroseentwicklung beteiligt (Zhou, Zhang, and Qiao 2014). Während HSCs traditionell als Hauptverursacher der Fibrose dargestellt werden, die die Rekrutierung von Immunezellen initiieren (Gutierrez-Ruiz and Gomez-Quiroz 2007; Kisseleva and Brenner 2006), zeigen neuere Untersuchungen, dass ihre Aktivierung vielmehr als nachgeschaltete Reaktion auf die Aktivierung von Kupffer-Zellen erfolgt (Li, Chang, and Li 2022). In den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen indizieren die erhöhten Cytokinspiegel und die gesteigerte Freisetzung von TNF-α und IL-6 eine Aktivierung der zahlreichen infiltrierten Makrophagen (Abbildung 14Abbildung 15). Somit spielt deren Aktivierung vermutlich auch hier eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsprogression und der Verstärkung des Entzündungsprozesses. Die Gruppe um Shen et al. zeigte, dass bei hepatozyten-spezifischer Überaktivität von Nik, welche zu einer ähnlichen Leberumstrukturierung, Entzündung und Fibrose wie in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen führt, durch eine Makrophagen-Deletion eine Verbesserung des Phänotyps erzielt werden konnte (Shen et al. 2014). Diese Ergebnisse bestärken die Vermutungen und unterstreichen die zentrale Bedeutung der Makrophagen in einem immungeführten Kontext.

Die  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen zeigen durch die anhaltende NF- $\kappa$ B-Aktivierung eine dauerhafte Infiltration von Immunzellen und eine chronische Entzündungsreaktion (Abbildung 15), die die Entwicklung einer Autoimmunität begünstigt und eine immunsystemvermittelten Zerstörung kleiner Gallengänge hervorrufen könnte, wie sie bei einer PBC auftritt. Bei einer PBC tritt in frühen Stadien des Krankheitsverlaufs eine kompensatorische Proliferation der Gallengänge auf, wie sie auch in  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen zu beobachten ist (Abbildung 17). Diese kompensatorische Reaktion wird im weiteren Verlauf jedoch von einer immunvermittelten Zerstörung kleiner Gallengänge durch Apoptose abgelöst (Harada et al. 1997). Allerdings konnte in  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen, bei denen der programmierte Zelltod durch die genetische Konstellation stark gehemmt ist (Abschnitt 4.2), kein solcher Verlust im weiteren Verlauf der Pathogenese beobachtet werden. Dies weist auf wesentliche Unterschiede im Verlauf der Gallengangsproliferation und -erhaltung hin und verdeutlicht, dass das  $LPC^{C+NC}$ -Modell die pathologische Gallengangsschädigung bei PBC nicht vollständig abbildet. Trotz dieser Unterschiede, gibt es einige gemeinsame Charakteristika zwischen PBC und der Lebererkrankung der  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse. So ist bei beiden zu Beginn ein Anstieg der AP zu beobachten (Abschnitt 6.1), der im späteren Verlauf wieder abnimmt, während andere Marker wie Bilirubin und Transaminasen erst in späteren Krankheitsphasen ansteigen (Abbildung 11 und Abbildung 20). Dieser Verlauf deutet auf ein gemeinsames Muster der Gallengangsbelastung hin, gefolgt von einer allmählichen systemischen Beteiligung (Abschnitt 3.6), obwohl die Mechanismen der Schädigung und die pathologischen Befunde Unterschiede aufweisen.

Der Einfluss des Autoimmungeschehens auf die strukturellen und funktionellen Veränderungen in der Leber ist jedoch insgesamt nicht vollständig aufgeklärt. Im  $LPC^{C+NC}$ -Modell führt die chronische NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu einer persistierenden Immunantwort, die nicht nur zur Fibrose, sondern auch zu einer erhöhten Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen führt. Auch bei  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Mäusen liegt, wenngleich auch eine etwas schwächere, eine Autoimmunitätsreaktion vor (Abbildung 34), was darauf hindeutet, dass die NF- $\kappa$ B-Signalwege und ihre Aktivierung in der Leber zwar einen Einfluss auf die Immunantwort und die damit verbundenen Autoimmunprozesse haben, aber nicht allein entscheidend sind.

Im Verlauf einer Leberzirrhose bleibt die Immunantwort häufig aktiv, obwohl sie in fortgeschrittenen Stadien der Zirrhose in der Regel systemisch abnimmt – ein Phänomen, das als CAID (*engl.: cirrhosis-associated immune dysfunction*) bekannt ist. Diese CAID-Phase wird durch eine Schwächung der Immunabwehr und eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen und Komplikationen gekennzeichnet (Trebicka et al. 2019). In den  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen bleibt

jedoch eine dauerhafte Immunzellinfiltration bestehen, was möglicherweise die Ursache für das vermehrte Auftreten autoimmuner Reaktionen darstellt und die fortschreitende Leberfibrose fördert (Abbildung 17 und Abbildung 29).

Trotz der aktiven Immunzellinfiltrationen zeigen die  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse eine verstärkte Infektanfälligkeit, die sich in häufigen Augeninfektionen bei knapp der Hälfte der Tiere und Stauungsinfiltraten in der Lunge äußert (Abbildung 27). Das deutet darauf hin, dass die Immunantwort in diesen Tieren zwar lokal in der Leber hochreguliert ist, jedoch eine systemische Immunschwäche vorliegen könnte, ähnlich der CAID-Phase bei fortgeschrittener Zirrhose. Dieser Widerspruch zwischen lokaler Überaktivierung und systemischer Immunschwäche könnte darauf hinweisen, dass die dauerhafte Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege in Leberparenchymzellen zu einer Umverteilung der Immunressourcen führt, die die Immunabwehr in anderen Organen beeinträchtigt. Die Literatur belegt, dass CAID mit einer gestörten Funktion von Immunzellen und einer reduzierten Reaktionsfähigkeit auf Pathogene verbunden ist (Albillos et al. 2022). Die gestörte Funktion von Phagozyten und eine verminderte Fähigkeit zur Antigenpräsentation tragen zu dieser Dysfunktion bei, was Patienten mit fortgeschrittener Zirrhose anfälliger für Infekte macht, insbesondere Atemwegsinfektionen und Sepsis (Bajpai et al. 2019; Philips et al. 2020). Bei den  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen ist ein ähnliches Muster zu beobachten, indem die Immunantwort durch die Lebererkrankung eingeschränkt ist, was zu einer erhöhter Anfälligkeit für Infektionen außerhalb der Leber führen könnte.

Die chronische NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den  $LPC^{C+NC}$ -Mäusen führt zu einer persistierenden Entzündungsreaktion, die die Ansammlung insbesondere von Makrophagen, vor allem in den periportalen Bereichen der Leber beiträgt (Abbildung 14). Aktivierte Cholangiozyten scheiden chemotaktische Mediatoren wie MCP-1 und Osteopontin aus, die Makrophagen zur Leber rekrutieren (Li and Hua 2017). Diese Makrophagen setzen dann proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 frei, die über den STAT3-Signalweg in Hepatozyten eine proliferative Antwort stimulieren und so zur weiteren Gewebsumstrukturierung beitragen. In den  $LPC^{C+NC}$ -Hepatozyten sind TNF- $\alpha$  und IL-6, sowie dessen Proliferation, deutlich erhöht (Abbildung 16 und Abbildung 15), was darauf hinweist, dass die Cholangiozytenaktivierung und die damit verbundene Makrophageninfiltration zur Progression der Fibrose und Zirrhose beitragen. Parallel zur proinflammatorischen Aktivierung sezernieren aktivierte Cholangiozyten pro-fibrinogene Moleküle, die die Gallengangsproliferation und Fibrinogenese verstärken (Liberal and Grant 2016). Diese enge Interaktion zwischen Cholangiozyten und Immunzellen fördert die biliäre Entzündung und Expansion und begünstigt vermutlich die Entwicklung der Autoimmunreaktionen.

In der Leber ist der Verlauf chronischer Entzündung häufig das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels zahlreicher Zellpopulationen, darunter Hepatozyten, Kupffer-Zellen, HSCs und Cholangiozyten, deren Interaktionen die Immunantwort und die Gewebereparatur beeinflussen (Li and Hua 2017). In den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen sind vermutlich vor allem die große Anzahl infiltrierter Kupffer-Zellen ein wesentlicher Treiber der entzündlichen Reaktion. Kupffer-Zellen fördern die Dedifferenzierung und Proliferation von Hepatozyten (Abschnitt 4.1) und aktivieren HSCs, welche für die Kollagenproduktion entscheidend sind und somit die Entwicklung der Fibrose vorantreiben (Zhou, Zhang, and Qiao 2014).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Regulation der Immunantwort ist die Interaktion zwischen der Leber und dem Thymus bei der Regulation der Immunantwort. Dabei beschreiben mehrere Studien eine Verbindung zwischen Thymusfunktion und Leberfunktion oder -schädigung (Shen et al. 2017; Stutman, Yunis, and Good 1970). Der Thymus fungiert als Hauptregulator der T-Zell-Reifung und der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz insbesondere durch die Funktion der medullären Thymusepithelzellen (mTECs) (Benlaribi, Gou, and Takaba 2022). Diese Zellen sind für die Präsentation von Selbst-Antigenen relevant und verhindern die Entstehung autoimmuner T-Zellen, welche mit einer gesteigerten Reaktivität gegenüber der Leber beschrieben werden (Bonito et al. 2013). Auch die Thymi der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse weisen eine Beeinträchtigung der mTECs und dessen Funktion auf, die im Alter sogar fortzuschreiten scheint (Abbildung 31 und Abbildung 32). Der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg ist essenziell für die Reifung und Funktion der mTECs, sodass eine Inhibierung der RelB-Aktivierung, sowohl durch RelB-Beeinträchtigung direkt und Aktivierung durch Nik, als auch die beeinträchtigte Transkription von RelB durch den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg, zu einer gestörten T-Zell-Toleranz und Autoimmunreaktionen führt (Riemann et al. 2017; Shen et al. 2017). Da in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen die Modifikationen zur Überaktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege spezifisch nur in Leberparenchymzellen vorliegen, ist der Thymus davon zunächst nicht betroffen. Durch die Vielzahl von negativen Rückkopplungseffekten, die die NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit sich zieht (Abschnitt 1.3.1 und 4.1), könnte die kontinuierliche Aktivierung im Lebergewebe zur Freisetzung von systemisch wirkenden Faktoren führen, die NF- $\kappa$ B-inhibierend auf den Thymus wirken, was eine dysfunktionale Thymusreaktion und Autoimmunprozesse begünstigen könnte. Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Lebergewebe wird dadurch hingegen nicht beeinträchtigt, da sie durch die genetischen Modifikationen intrinsisch aktiviert bleibt. Ebenso könnten die aus der Leber freigesetzten Faktoren auch eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Thymus induzieren. Diese Aktivierung könnte entweder durch

Rückkopplungsmechanismen inaktiviert werden oder eine konstitutive Aktivierung auslösen, die sich potenziell schädlich auf die Thymusfunktion auswirken könnte.

Auch bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose ist das Risiko für Komplikationen wie akutes Leberversagen vor allem dann erhöht, wenn die systemische Inflammation stark ausgeprägt ist und mit hohen Leukozytenzahlen einhergeht (Trebicka et al. 2019). Studien zeigen, dass sich die Dekompensation und das akute Leberversagen unabhängig voneinander entwickeln können, wobei der Zusammenhang mit einer hohen Immunzellinfiltration für eine negative Prognose spricht (Moreau et al. 2013). Bei den LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren variiert der Todeszeitpunkt zwischen 3 Wochen und bis zu 20 Wochen, was auf eine ähnliche Variabilität in der Immunantwort und der Schwere der Lebererkrankung hindeutet (Abbildung 10). Jüngste Studien belegen zudem, dass die Beweglichkeit und Zusammensetzung der infiltrierenden Immunzellen zur Früherkennung von Komplikationen bei Leberzirrhose dienen können, wobei eine pathologische Immunzellinfiltration als negativer Prädiktor gilt (Langer et al. 2023; Chiriac et al. 2020).

Die Beobachtungen in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen zeigen, dass die andauernde Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die damit verbundene chronische Entzündung in der Leber sowohl strukturelle Leberschädigungen als auch systemische Autoimmunreaktionen und eine verstärkte Infektanfälligkeit begünstigen können. Die erhöhte Infektanfälligkeit der Mäuse unterstreicht die Bedeutung einer funktional ausgewogenen Immunantwort in der Leber. Die lokale Überaktivierung beider NF- $\kappa$ B-Signalwege scheint zur systemischen Immuninsuffizienz beizutragen und zeigt, dass eine intensive Immunreaktion in der Leber die systemische Abwehr beeinträchtigen kann. Diese Autoimmunität wird durch die veränderte Leberarchitektur und durch komplexe Interaktionen zwischen der Leber und dem Thymus verstärkt, was auf eine wechselseitige Beeinträchtigung von Leberentzündung und Thymusfunktion hindeutet.

Das Mausmodell bietet somit wertvolle Einblicke in die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und chronischen Lebererkrankungen, die durch eine unkontrollierte Entzündungsreaktion hervorgerufen wird. Mit der Aufklärung verschiedenster Pathogenesen wurden zuletzt immer mehr Erkrankungsentstehungen mit Autoimmunprozessen in Verbindung gebracht (Blum 2018), und dieses Modell könnte zur weiteren Aufklärung der immunologischen Mechanismen bei Lebererkrankungen und deren Einfluss auf die Entstehung von Autoimmunität beitragen. Die Daten belegen einen Zusammenhang zwischen der lokalen Immunreaktion der Leber und der systemischen Abwehr, wobei zur Abgrenzung des Einflusses auf die Infektanfälligkeit und die Förderung der Krankheitsprogression weitere Untersuchungen erforderlich sind.

#### 4.4 Auswirkungen des Ungleichgewichts im Vorhandensein der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten

Die NF- $\kappa$ B-Untereinheiten RelB und NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), sind von zentraler Bedeutung für die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs und haben erhebliche Auswirkungen auf die Immunität und Autoimmunität, wie sie im LPC<sup>C+NC</sup>-Mausmodell beobachtet werden. Die Aktivierung von RelB erfolgt fast ausschließlich in Verbindung mit NF- $\kappa$ B2, das RelB im Zytosol stabilisiert und in Form von p52 dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht (Fusco et al. 2008). RelB kann jedoch durch posttranskriptionelle Modifikationen kontroverse Genregulation auslösen, indem es Co-Regulatoren und Co-Repressoren rekrutiert (Yang et al. 2019). Diese Interaktionen spielen eine entscheidende Rolle bei der präzisen Abstimmung des nicht-kanonischen Signalweges und dessen Funktion im Rahmen immunologischer Prozesse. NF- $\kappa$ B2 (p100) fungiert als Inhibitor, der NF- $\kappa$ B-Dimere im Zytosol zurückhält und so deren Aktivierung hemmt. Im Vergleich zu klassischen I $\kappa$ B-Inhibitoren bildet es hochmolekulare Komplexe, die eine effiziente Bindung aller NF- $\kappa$ B-Untereinheiten ermöglichen (Tao et al. 2014). Eine gestörte Spaltung von p100 zu p52 führt zur Akkumulation von p100, wodurch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung blockiert wird. Solche Spaltungsdefekte, wie sie bei Patienten mit NF- $\kappa$ B2-Mutationen vorkommen, sind häufig mit Autoimmunerkrankungen assoziiert, was auf eine dysregulierte RelB-Aktivität zurückzuführen ist (Wirasinha et al. 2021; Chen et al. 2013). Darüber hinaus verursachen Mutationen, die zu einer beeinträchtigten Degradierung, aber nicht zu einer vollständigen Deletion von NF- $\kappa$ B2 führen, verstärkt Autoimmunreaktionen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das stabilisierte, nicht-abbaubare p100 die Aktivierung von RelB übermäßig inhibiert, während eine vollständige Deletion von NF- $\kappa$ B2 alternative Kompensationsmechanismen zulässt, die den Autoimmunphänotyp verhindern. Die Deletion von Traf3 in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen führt hingegen zu einer verstärkten Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, was zu einer übermäßigen RelB-Aktivität und einer Anfälligkeit für Autoimmunreaktionen und Entzündungsprozessen führt (Abschnitt 4.3). Die zusätzliche Deletion von NF- $\kappa$ B2 in diesem Modell resultiert in vergleichbaren Symptomen einschließlich pulmonaler und nephrologischer Komplikationen (Abbildung 34). Die Daten belegen außerdem, dass RelB trotz Abwesenheit von NF- $\kappa$ B2 in den Kern transloziert (Abbildung 36 und Abbildung 37). Vermutlich handelt es sich dabei um alternative RelB-Heterodimere zum Beispiel mit NF- $\kappa$ B1, da RelB-Homodimere nicht transkriptionsaktiv sind und *in vivo* nicht existieren (Fusco et al. 2008). Es ist jedoch zu beachten, dass die alleinige Kerntranslokation von RelB zwar ein Indiz für dessen Aktivierung und Genregulation ist, aber letztlich nicht die Bindung an der DNA und die Transkriptionsaktivität bestätigt.

Die Ergebnisse der  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Mäuse widersprechen teilweise anderen Studien, in denen die zusätzliche Deletion von NF- $\kappa$ B2 bei Traf3-Deletion die Schädigungen größtenteils aufheben konnte (He et al. 2006). Die Leberschädigungen der  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse werden kaum durch die zusätzliche NF- $\kappa$ B2-Deletion beeinträchtigt (Abbildung 34) und auch die verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit kann nicht verbessert werden, die  $LPC^{C+NC\Delta NF\kappa B2}$ -Mäuse versterben ebenfalls noch in jungem Alter (Abbildung 33). Die unveränderte Beeinträchtigung der zusätzlichen NF- $\kappa$ B2-Deletion in Leberparenchymzellen könnte auf gewebsspezifische Effekte von NF- $\kappa$ B2 und RelB oder die bereits durch mehrere Modifikationen, wie auch die zusätzliche Ikk2-Aktivierung, stark veränderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung zurückzuführen sein, die möglicherweise die Kompensationsmechanismen übersteigt.

Die therapeutische Beeinflussung der NF- $\kappa$ B-Signalwege ist aufgrund der komplexen und oft gegensätzlichen Effekte in verschiedenen Zelltypen und Geweben mit einer großen Anzahl von Kompensationsmechanismen herausfordernd (Yu et al. 2020). Der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg ist, wie klinische Studien zu NF- $\kappa$ B2-Mutationen zeigen, stark mit Autoimmunphänomenen assoziiert (Klemann et al. 2019; Wirasinha et al. 2021). Jedoch könnte eine gezielte Hemmung von RelB oder NF- $\kappa$ B2 potenziell das Risiko für andere Immunerkrankungen oder Infektionen erhöhen. Die Mutationen der verschiedenen NF- $\kappa$ B-Untereinheiten, wie RelA-Mutationen, die zu mukokutanen Ulzerationen führen (Badran et al. 2017) und mit einer anti-TNF-Therapie behandelbar sind, oder NF- $\kappa$ B1- und NF- $\kappa$ B2-Mutationen, die mit CVID (*engl.: common variable Immunodeficiency*) assoziiert sind (Fliegaut et al. 2015; Chen et al. 2013), zeigen die Vielschichtigkeit der NF- $\kappa$ B-Signalwege und deren unterschiedliche Rollen in verschiedenen Erkrankungen.

Am Beispiel der  $LPC^{C+NC}$ -Mäuse sind die Herausforderungen und potenziellen Gefahren einer therapeutischen Manipulation des NF- $\kappa$ B-Signalwegs aufgezeigt. Die Vielzahl an Kompensationsmechanismen und die heterogene Reaktion auf die Hemmung einzelner NF- $\kappa$ B-Untereinheiten machen es notwendig, dass therapeutische Eingriffe sehr gezielt und optimalerweise auf spezifische Zelltypen beschränkt erfolgen. Innovative Arzneiformen könnten hier gezielte Anwendungen in bestimmten Zellpopulationen ermöglichen, doch müssen die komplexen Rückkopplungsmechanismen und die daraus resultierenden systemische Effekte berücksichtigt werden.

## 4.5 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit hebt die zentrale Bedeutung des simultanen Zusammenspiels von kanonischem und nicht-kanonischem NF- $\kappa$ B-Signalweg in der Pathogenese der Leberzirrhose und des Multiorganversagens hervor. Mit dem LPC<sup>C+NC</sup>-Mausmodell werden wertvolle Einblicke in die Auswirkungen unkontrollierter NF- $\kappa$ B-Aktivierung auf die Leberhomöostase und die Immunzellinfiltration ermöglicht. Die isolierte Rolle des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs lässt sich aufgrund der umfangreichen Interaktionen und Kompensationsmechanismen zwischen den beiden Signalwegen nicht vollständig abgrenzen, sondern muss in diesem Zusammenspiel betrachtet werden. Die Ergebnisse belegen, dass nicht der NF- $\kappa$ B-abhängige Zelltod, sondern vielmehr die daraus resultierende Entzündungsreaktion die Krankheitsprogression und Phänotypentwicklung vorantreiben. Bedeutend ist die Erkenntnis, dass die chronische Entzündung und die hepatische Immunzellinfiltration maßgeblich zur pathologischen Gewebeumstrukturierung, zur Progression der Fibrose und letztlich zur Entstehung von Zirrhose beitragen. Es werden neue Perspektiven zur Untersuchung von Autoimmunmechanismen ermöglicht, die nicht nur lokal die Leber betreffen, sondern auch systemische Auswirkungen haben. Die Ergebnisse unterstreichen den Bedarf an innovativen, zellspezifischen Ansätzen, die die komplexen systemischen Effekte berücksichtigen, um die Therapie chronischer Lebererkrankungen zu verbessern.

Die Trans- und Dedifferenzierung von Hepatozyten ist ein Schlüsselaspekt der Lebererkrankung und bedarf einer genaueren Untersuchung. Bei einer Langzeitkultivierung von Hepatozyten könnten Differenzierungsmarker über die Zeit bestimmt werden. Dies würde ermöglichen, frühzeitig potenzielle Angriffspunkte zu identifizieren, die die Dedifferenzierung aufhalten oder sogar umkehren ließen. Eine ergänzende Sekretomanalyse der Zell-Zell-Interaktion aus Zellkulturen von Hepatozyten und Cholangiozyten wäre hilfreich, um zu identifizieren, welche Faktoren von Cholangiozyten sezerniert werden, die eine Veränderung der Hepatozyten induzieren. Diese Untersuchungen würden dazu beitragen zugrundeliegende Signalmoleküle und Mechanismen aufzudecken, die durch entzündliche Prozesse oder Gewebeschädigungen ausgelöst werden und zur Fibrose beitragen. Dadurch ergäbe sich die Möglichkeit potenziell schädliche Interaktionen zu unterbrechen und die Funktionalität der Hepatozyten zu bewahren.

Sollten die Mechanismen durch Untersuchungen der Hepatozyten und Cholangiozyten in der Zellkultur nicht ausreichend aufgedeckt werden, könnten die Interaktionen mit Sternzellen und Immunzellen, wie Kupffer-Zellen, in die Analyse mit einbezogen werden. Präzise Identifikation und Funktionsanalysen spezifischer Zelltypen und ihrer Interaktionen würde

ermöglichen Zellpopulationen zu identifizieren, die potenzielle therapeutische Ziele für entzündungshemmende oder antifibrotische Behandlungen darstellen könnten.

Um die Bedeutung der Zelltod-Exekution zu adressieren, bietet sich die vollständige Deletion von RIPK1 in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen an. Durch die vollständige Deletion von RIPK1 wird die Inhibierung des Zelltods möglicherweise minimiert, wodurch die entzündliche Gewebsumstrukturierung reduziert und der Phänotyp verbessert würde. Dies führt zu einem besseren Verständnis, wie entzündliche Prozesse gezielt abgeschwächt würden, um die Progression von Lebererkrankungen zu verhindern.

Anhand der bisherigen Ergebnisse konnte bislang keine spezifische NF- $\kappa$ B-Untereinheit ausgemacht werden, die durch ihre Überaktivierung die pathologischen Veränderungen hauptsächlich vorantreibt. Um diese zu identifizieren, könnten Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) oder Co-Immunpräzipitationen (co-IP) durchgeführt werden. Anders als die Analyse der Kernlokalisation, kann ein EMSA nachweisen, welche NF- $\kappa$ B-Untereinheiten tatsächlich an die DNA binden und eine Genexpression induzieren. Mit Hilfe der co-IP kann im Anschluss aufgeschlüsselt werden, welche alternativen Dimere sich abweichend bilden. Diese Erkenntnisse sind entscheidend, da therapeutische Manipulationen des NF- $\kappa$ B-Signalwegs aufgrund der zahlreichen Kompensationsmechanismen und Rückkopplungseffekte äußerst gezielt erfolgen müssen.

Die Analyse der Immunsignatur während des Krankheitsverlaufs könnte zudem Aufschluss über die Rolle der adaptiven Immunität bei Leberschädigungen geben. Die dynamische Veränderung von Immunzellpopulationen und -funktionen könnte genutzt werden um Mechanismen der Immunantwort und deren Einfluss auf die Krankheitsprogression aufzudecken. Um die Rolle der adaptiven Immunität bei der Krankheitsprogression genauer zu verstehen und potenzielle therapeutische Interventionen zu entwickeln, wären Immunmodulationsstudien geeignet. Mit der Deletion spezifischer Immunzellen in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen ließe sich verdeutlichen, ob und durch Behandlung welcher Immunzellpopulation die Gewebsveränderungen in der Leber verbessert werden können.

Ein weiterer potenzieller Ansatz wäre die Blockade des IL-6-Signalwegs, um dessen Relevanz in der Beeinträchtigung der Leberhomöostase und der Entstehung der systemischen Autoimmunerkrankung aufzuzeigen. Antikörper wie Tocilizumab (anti-IL-6R) oder Siltuximab (IL-6-Antagonist) sind bereits für entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis und idiopathische multicentrische Castleman-Krankheit (iMCD) zugelassen. Die hohe Ansprechrate der genannten Substanzen bei iMCD von 90 % könnte auf eine vielversprechende Therapiemöglichkeit hindeuten (Uciechowski and Dempke 2020). Weitere Untersuchungen

könnten zeigen, ob diese Behandlungen die Krankheitsprogression in den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen beeinflussen und neue Therapiemöglichkeiten bei chronischen Lebererkrankungen eröffnen.

## 5 Referenzen

- Albillos, A., R. Martin-Mateos, S. Van der Merwe, R. Wiest, R. Jalan, and M. Alvarez-Mon. 2022. 'Cirrhosis-associated immune dysfunction', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 19: 112-34.
- Aldulaimi, S., and A. M. Mendez. 2021. 'Splenomegaly: Diagnosis and Management in Adults', *Am Fam Physician*, 104: 271-76.
- Álvarez-Villanueva, Daniel, Luis Galán-Palma, Joan Bertran, Martin Floor, Laura Solé, Teresa Lobo-Jarne, María Maqueda, Rajani Rajbhandari, Laura Marruecos, Jordi Villà-Freixa, Markus Bredel, Anna Bigas, and Lluís Espinosa. 2023. 'Separation-of-function mutants reveal the NF- $\kappa$ B-independent involvement of I $\kappa$ B $\alpha$  in the regulation of stem cell and oncogenic programs', *bioRxiv*: 2023.06.21.545928.
- Badran, Y. R., F. Dedeoglu, J. M. Leyva Castillo, W. Bainter, T. K. Ohsumi, A. Bousvaros, J. D. Goldsmith, R. S. Geha, and J. Chou. 2017. 'Human RELA haploinsufficiency results in autosomal-dominant chronic mucocutaneous ulceration', *J Exp Med*, 214: 1937-47.
- Bajpai, V., E. Gupta, L. G. Mitra, H. Kumar, R. Maiwall, K. D. Soni, and A. Gupta. 2019. 'Spectrum of respiratory viral infections in liver disease patients with cirrhosis admitted in critical care unit', *J Lab Physicians*, 11: 356-60.
- Banales, J. M., R. C. Huebert, T. Karlsen, M. Strazzabosco, N. F. LaRusso, and G. J. Gores. 2019. 'Cholangiocyte pathobiology', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16: 269-81.
- Bansal, K., M. Gore, and S. Mittal. 2024. 'Hepatopulmonary Syndrome.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Becroft, D. M., and B. K. Lockett. 1997. 'Intra-alveolar pulmonary siderophages in sudden infant death: a marker for previous imposed suffocation', *Pathology*, 29: 60-3.
- Benlaribi, R., Q. Gou, and H. Takaba. 2022. 'Thymic self-antigen expression for immune tolerance and surveillance', *Inflamm Regen*, 42: 28.
- Bettermann, K., M. Vucur, J. Haybaeck, C. Koppe, J. Janssen, F. Heymann, A. Weber, R. Weiskirchen, C. Liedtke, N. Gassler, M. Muller, R. de Vos, M. J. Wolf, Y. Boege, G. M. Seleznik, N. Zeller, D. Erny, T. Fuchs, S. Zoller, S. Cairo, M. A. Buendia, M. Prinz, S. Akira, F. Tacke, M. Heikenwalder, C. Trautwein, and T. Luedde. 2010. 'TAK1 suppresses a NEMO-dependent but NF-kappaB-independent pathway to liver cancer', *Cancer Cell*, 17: 481-96.
- Blum, Hubert E. 2018. *Klinische Pathophysiologie* (Georg Thieme Verlag: Stuttgart ; New York).
- Blunt, M. C., J. P. Nicholson, and G. R. Park. 1998. 'Serum albumin and colloid osmotic pressure in survivors and nonsurvivors of prolonged critical illness', *Anaesthesia*, 53: 755-61.
- Bonito, A. J., C. Aloman, M. I. Fiel, N. M. Danzl, S. Cha, E. G. Weinstein, S. Jeong, Y. Choi, M. C. Walsh, and K. Alexandropoulos. 2013. 'Medullary thymic epithelial cell depletion leads to autoimmune hepatitis', *J Clin Invest*, 123: 3510-24.
- Bonner, J. C. 2004. 'Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases', *Cytokine Growth Factor Rev*, 15: 255-73.
- Bovensiepen, C. S., M. Schakat, M. Sebode, R. Zenouzi, J. Hartl, M. Peiseler, J. Li, L. Henze, A. Woestemeier, C. Schramm, A. W. Lohse, J. Herkel, and C. Weiler-Normann. 2019. 'TNF-Producing Th1 Cells Are Selectively Expanded in Liver Infiltrates of Patients with Autoimmune Hepatitis', *J Immunol*, 203: 3148-56.
- Boyce, B. F., J. Li, L. Xing, and Z. Yao. 2018. 'Bone Remodeling and the Role of TRAF3 in Osteoclastic Bone Resorption', *Front Immunol*, 9: 2263.

- Bren, G. D., N. J. Solan, H. Miyoshi, K. N. Pennington, L. J. Pobst, and C. V. Paya. 2001. 'Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB', *Oncogene*, 20: 7722-33.
- Cao, X., J. Tan, R. Zheng, F. Wang, L. Zhou, J. Yi, R. Yuan, Q. Dai, L. Song, and A. Dai. 2024. 'Targeting necroptosis: a promising avenue for respiratory disease treatment', *Cell Commun Signal*, 22: 418.
- Cattley, Russell C., and John M. Cullen. 2013. 'Chapter 45 - Liver and Gall Bladder.' in Wanda M. Haschek, Colin G. Rousseaux and Matthew A. Wallig (eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)* (Academic Press: Boston).
- Chaouali, M., M. Ben Azaiez, A. Tezeghdenti, B. Yacoubi-Oueslati, E. Ghazouani, and R. Kochkar. 2020. 'High levels of proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, TNF-Alpha, IL-23, and IFN- in Tunisian patients with type 1 autoimmune hepatitis', *Eur Cytokine Netw*.
- Chen, J., R. Kos, J. Garssen, and F. Redegeld. 2019. 'Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis: The Necrosome As a Potential Therapeutic Target', *Cells*, 8.
- Chen, K., E. M. Coonrod, A. Kumanovics, Z. F. Franks, J. D. Durtschi, R. L. Margraf, W. Wu, N. M. Heikal, N. H. Augustine, P. G. Ridge, H. R. Hill, L. B. Jorde, A. S. Weyrich, G. A. Zimmerman, A. V. Gundlapalli, J. F. Bohnsack, and K. V. Voelkerding. 2013. 'Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF-kappaB pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency', *Am J Hum Genet*, 93: 812-24.
- Chen, Q., X. Lu, and X. Zhang. 2021. 'Noncanonical NF-kappaB Signaling Pathway in Liver Diseases', *J Clin Transl Hepatol*, 9: 81-89.
- Chiriac, S., C. Stanciu, A. M. Singeap, C. V. Sfarti, T. Cuciureanu, and A. Trifan. 2020. 'Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in cirrhotic patients with acute-on-chronic liver failure', *Turk J Gastroenterol*, 31: 868-76.
- 'Cholestatic Hepatitis.' in. 2012. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* (Bethesda (MD)).
- Colapietro, F., A. Lleo, and E. Generali. 2022. 'Antimitochondrial Antibodies: from Bench to Bedside', *Clin Rev Allergy Immunol*, 63: 166-77.
- Czauderna, C., D. Castven, F. L. Mahn, and J. U. Marquardt. 2019. 'Context-Dependent Role of NF-kappaB Signaling in Primary Liver Cancer-from Tumor Development to Therapeutic Implications', *Cancers (Basel)*, 11.
- Deng, X., X. Zhang, W. Li, R. X. Feng, L. Li, G. R. Yi, X. N. Zhang, C. Yin, H. Y. Yu, J. P. Zhang, B. Lu, L. Hui, and W. F. Xie. 2018. 'Chronic Liver Injury Induces Conversion of Biliary Epithelial Cells into Hepatocytes', *Cell Stem Cell*, 23: 114-22 e3.
- Divens, L. L., and S. L. Rivera. 2022. 'Hepatorenal Syndrome: From the Beginning to Now', *Crit Care Nurs Clin North Am*, 34: 321-29.
- Dufour, Jean-François. 2005. *Signaling Pathways in Liver Diseases* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Egerod Israelsen, M., L. L. Gluud, and A. Krag. 2015. 'Acute kidney injury and hepatorenal syndrome in cirrhosis', *J Gastroenterol Hepatol*, 30: 236-43.
- El Alam, S., E. Pena, D. Aguilera, P. Siques, and J. Brito. 2022. 'Inflammation in Pulmonary Hypertension and Edema Induced by Hypobaric Hypoxia Exposure', *Int J Mol Sci*, 23.
- Elssner, C., B. Goepfert, T. Longerich, A. L. Scherr, J. Stindt, L. K. Nanduri, C. Rupp, J. N. Kather, N. Schmitt, N. Kautz, K. Breuhahn, L. Ismail, D. Heide, J. Hetzer, M. Garcia-Beccaria, N. Hovelmeyer, A. Waisman, T. Urbanik, S. Mueller, G. Gdynia, J. M. Banales, S. Roessler, P. Schirmacher, D. Jager, S. Scholch, V. Keitel, M. Heikenwalder, H. Schulze-Bergkamen, and B. C. Kohler. 2019. 'Nuclear Translocation of RELB Is Increased in Diseased Human Liver and Promotes Ductular Reaction and Biliary Fibrosis in Mice', *Gastroenterology*, 156: 1190-205 e14.

- Fallowfield, J., and P. Hayes. 2011. 'Pathogenesis and treatment of hepatic fibrosis: is cirrhosis reversible?', *Clin Med (Lond)*, 11: 179-83.
- Feng, Fan, Heng Mao, Aimin Wang, and Liangyi Chen. 2021. 'Two-Photon Fluorescence Imaging.' in Xunbin Wei and Bobo Gu (eds.), *Optical Imaging in Human Disease and Biological Research* (Springer Singapore: Singapore).
- Feoktistova, M., R. Makarov, A. S. Yazdi, and D. Panayotova-Dimitrova. 2021. 'RIPK1 and TRADD Regulate TNF-Induced Signaling and Ripoptosome Formation', *Int J Mol Sci*, 22.
- Filler, G., S. H. Huang, and R. M. Lindsay. 2011. 'Residual renal function assessment with cystatin C', *Pediatr Nephrol*, 26: 333-5.
- Finkin, S., D. Yuan, I. Stein, K. Taniguchi, A. Weber, K. Unger, J. L. Browning, N. Goossens, S. Nakagawa, G. Gunasekaran, M. E. Schwartz, M. Kobayashi, H. Kumada, M. Berger, O. Pappo, K. Rajewsky, Y. Hoshida, M. Karin, M. Heikenwalder, Y. Ben-Neriah, and E. Pikarsky. 2015. 'Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma', *Nat Immunol*, 16: 1235-44.
- Finkin, Shlomi, and Eli Pikarsky. 2011. 'NF- $\kappa$ B in Liver Cancer: The Plot Thickens.' in Michael Karin (ed.), *NF- $\kappa$ B in Health and Disease* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Fliegau, M., V. L. Bryant, N. Frede, C. Slade, S. T. Woon, K. Lehnert, S. Winzer, A. Bulashevskaya, T. Scerri, E. Leung, A. Jordan, B. Keller, E. de Vries, H. Cao, F. Yang, A. A. Schaffer, K. Warnatz, P. Browett, J. Douglass, R. V. Ameratunga, J. W. van der Meer, and B. Grimbacher. 2015. 'Haploinsufficiency of the NF-kappaB1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency', *Am J Hum Genet*, 97: 389-403.
- Fusco, A. J., O. V. Savinova, R. Talwar, J. D. Kearns, A. Hoffmann, and G. Ghosh. 2008. 'Stabilization of RelB requires multidomain interactions with p100/p52', *J Biol Chem*, 283: 12324-32.
- Garcia-Rio, F., V. Lores, O. Mediano, B. Rojo, A. Hernanz, E. Lopez-Collazo, and R. Alvarez-Sala. 2009. 'Daily physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease is mainly associated with dynamic hyperinflation', *Am J Respir Crit Care Med*, 180: 506-12.
- Gaul, S., A. Leszczynska, F. Alegre, B. Kaufmann, C. D. Johnson, L. A. Adams, A. Wree, G. Damm, D. Seehofer, C. J. Calvente, D. Povero, T. Kisseleva, A. Eguchi, M. D. McGeough, H. M. Hoffman, P. Pelegrin, U. Laufs, and A. E. Feldstein. 2021. 'Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis', *J Hepatol*, 74: 156-67.
- Gautheron, J., G. J. Gores, and C. M. P. Rodrigues. 2020. 'Lytic cell death in metabolic liver disease', *J Hepatol*, 73: 394-408.
- Göke, Burkhard. 2007. *Gastroenterologie systematisch* (Uni-Med-Verl.: Bremen u.a.).
- Grakoui, Arash, and Ian Nicholas Crispe. 2016. 'Presentation of hepatocellular antigens', *Cellular & Molecular Immunology*, 13: 293-300.
- Guo, R., L. Wang, T. Liu, S. Li, Y. Liu, H. Yang, L. Chen, C. Ji, and Y. Xia. 2024. 'Pulmonary function, genetic predisposition, and the risk of cirrhosis: A prospective cohort study', *Prev Med*, 185: 108030.
- Gutierrez-Ruiz, M. C., and L. E. Gomez-Quiroz. 2007. 'Liver fibrosis: searching for cell model answers', *Liver Int*, 27: 434-9.
- Harada, K., S. Ozaki, M. E. Gershwin, and Y. Nakanuma. 1997. 'Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis', *Hepatology*, 26: 1399-405.
- He, G., and M. Karin. 2011. 'NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer', *Cell Res*, 21: 159-68.
- He, J. Q., G. Oganessian, S. K. Saha, B. Zarnegar, and G. Cheng. 2007a. 'TRAF3 and its biological function', *Adv Exp Med Biol*, 597: 48-59.

- He, J. Q., B. Zarnegar, G. Oganessian, S. K. Saha, S. Yamazaki, S. E. Doyle, P. W. Dempsey, and G. Cheng. 2006. 'Rescue of TRAF3-null mice by p100 NF-kappa B deficiency', *J Exp Med*, 203: 2413-8.
- He, Jeannie Q., Gagik Oganessian, Supriya K. Saha, Brian Zarnegar, and Genhong Cheng. 2007b. 'TRAF3 and Its Biological Function.' in Hao Wu (ed.), *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)* (Springer New York: New York, NY).
- Heinzeller, Thomas. 2001. *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg 47 Tabellen* (Thieme: Stuttgart u.a.).
- Herrero, R., G. Sanchez, and J. A. Lorente. 2018. 'New insights into the mechanisms of pulmonary edema in acute lung injury', *Ann Transl Med*, 6: 32.
- Hoesel, B., and J. A. Schmid. 2013. 'The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer', *Mol Cancer*, 12: 86.
- Hofmann, Eberhard. 2006. *Biochemie systematisch* (UNI-MED-Verl.: Bremen u.a.).
- Huang, D. Q., N. A. Terrault, F. Tacke, L. L. Glud, M. Arrese, E. Bugianesi, and R. Loomba. 2023. 'Global epidemiology of cirrhosis - aetiology, trends and predictions', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 20: 388-98.
- Imai, T., J. Lin, G. G. Kaya, E. Ju, V. Kondylis, K. Kelepouras, G. Liccardi, C. Kim, and M. Pasparakis. 2024. 'The RIPK1 death domain restrains ZBP1- and TRIF-mediated cell death and inflammation', *Immunity*, 57: 1497-513 e6.
- Iwakiri, Y., and J. Trebicka. 2021. 'Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy', *JHEP Rep*, 3: 100316.
- Jablonska, B. 2012. 'Biliary cysts: etiology, diagnosis and management', *World J Gastroenterol*, 18: 4801-10.
- Jasso-Baltazar, E. A., G. A. Pena-Arellano, J. Aguirre-Valadez, I. Ruiz, B. Papacristofilou-Riebeling, J. V. Jimenez, C. J. Garcia-Carrera, F. E. Rivera-Lopez, J. Rodriguez-Andoney, F. C. Lima-Lopez, J. L. Hernandez-Oropeza, J. A. T. Diaz, E. Kauffman-Ortega, J. Ruiz-Manriquez, P. Hernandez-Reyes, J. Zamudio-Bautista, C. A. Rodriguez-Osorio, T. Pulido, S. Munoz-Martinez, and I. Garcia-Juarez. 2023. 'Portopulmonary Hypertension: An Updated Review', *Transplant Direct*, 9: e1517.
- Kayagaki, N., J. D. Webster, and K. Newton. 2024. 'Control of Cell Death in Health and Disease', *Annu Rev Pathol*, 19: 157-80.
- Kellendonk, C., C. Opherk, K. Anlag, G. Schutz, and F. Tronche. 2000. 'Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase', *Genesis*, 26: 151-3.
- Kim, H., M. Kim, S. K. Im, and S. Fang. 2018. 'Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes', *Lab Anim Res*, 34: 147-59.
- Kisseleva, T., and D. A. Brenner. 2006. 'Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis', *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3: S84-7.
- Klein, L. 2020. 'Recollections of the discovery of promiscuous antigen expression in mTECs', *Nat Immunol*, 21: 1303-05.
- Klemann, C., N. Camacho-Ordonez, L. Yang, Z. Eskandarian, J. L. Rojas-Restrepo, N. Frede, A. Bulashevskaya, M. Heeg, M. S. Al-Ddafari, J. Premm, M. Seidl, S. Ammann, R. Sherkat, N. Radhakrishnan, K. Warnatz, S. Unger, R. Kobbe, A. Hufner, T. R. Leahy, W. Ip, S. O. Burns, M. Fliegau, and B. Grimbacher. 2019. 'Clinical and Immunological Phenotype of Patients With Primary Immunodeficiency Due to Damaging Mutations in NFKB2', *Front Immunol*, 10: 297.
- Koop, Irmtraut. 2013. *Gastroenterologie compact alles für Klinik und Praxis* (Thieme: Stuttgart u.a.).
- Koppenol, W. H. 2001. 'The Haber-Weiss cycle--70 years later', *Redox Rep*, 6: 229-34.
- Kyrylkova, K., S. Kyryachenko, M. Leid, and C. Kioussi. 2012. 'Detection of apoptosis by TUNEL assay', *Methods Mol Biol*, 887: 41-7.

- Lala, V., M. Zubair, and D. A. Minter. 2024. 'Liver Function Tests.' in *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Lan, T., S. Qian, C. Tang, and J. Gao. 2022. 'Role of Immune Cells in Biliary Repair', *Front Immunol*, 13: 866040.
- Langer, M. M., S. Sichelschmidt, A. Bauschen, L. Bornemann, S. Guckenbiehl, M. Gunzer, and C. M. Lange. 2023. 'Pathological neutrophil migration predicts adverse outcomes in hospitalized patients with liver cirrhosis', *Liver Int*, 43: 896-905.
- Lawrence, T. 2009. 'The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a001651.
- Li, L., L. Cui, P. Lin, Z. Liu, S. Bao, X. Ma, H. Nan, W. Zhu, J. Cen, Y. Mao, X. Ma, L. Jiang, Y. Nie, F. Ginhoux, Y. Li, H. Li, and L. Hui. 2023. 'Kupffer-cell-derived IL-6 is repurposed for hepatocyte dedifferentiation via activating progenitor genes from injury-specific enhancers', *Cell Stem Cell*, 30: 283-99 e9.
- Li, N., and J. Hua. 2017. 'Immune cells in liver regeneration', *Oncotarget*, 8: 3628-39.
- Li, W., N. Chang, and L. Li. 2022. 'Heterogeneity and Function of Kupffer Cells in Liver Injury', *Front Immunol*, 13: 940867.
- Liberal, R., and C. R. Grant. 2016. 'Cirrhosis and autoimmune liver disease: Current understanding', *World J Hepatol*, 8: 1157-68.
- Liu, P., E. Kimmoun, A. Legrand, A. Sauvanet, C. Degott, B. Lardeux, and D. Bernuau. 2002. 'Activation of NF-kappa B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas', *J Hepatol*, 37: 63-71.
- Liu, T., L. Zhang, D. Joo, and S. C. Sun. 2017. 'NF-kappaB signaling in inflammation', *Signal Transduct Target Ther*, 2: 17023-.
- Lopez De Padilla, C. M., M. J. Coenen, A. Tovar, R. E. De la Vega, C. H. Evans, and S. A. Muller. 2021. 'Picrosirius Red Staining: Revisiting Its Application to the Qualitative and Quantitative Assessment of Collagen Type I and Type III in Tendon', *J Histochem Cytochem*, 69: 633-43.
- Lu, J. L., C. X. Yu, and L. J. Song. 2023. 'Programmed cell death in hepatic fibrosis: current and perspectives', *Cell Death Discov*, 9: 449.
- Lu, Y., and A. I. Cederbaum. 2008. 'CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol', *Free Radic Biol Med*, 44: 723-38.
- Luedde, T., J. Heinrichsdorff, R. de Lorenzi, R. De Vos, T. Roskams, and M. Pasparakis. 2008. 'IKK1 and IKK2 cooperate to maintain bile duct integrity in the liver', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 9733-8.
- Luedde, T., N. Kaplowitz, and R. F. Schwabe. 2014. 'Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance', *Gastroenterology*, 147: 765-83 e4.
- Luedde, T., and R. F. Schwabe. 2011. 'NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8: 108-18.
- Lüllmann-Rauch, Renate. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie 10 Tabellen* (Thieme: Stuttgart u.a.).
- Luo, J. L., H. Kamata, and M. Karin. 2005. 'IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy', *J Clin Invest*, 115: 2625-32.
- Martin, Michael. 2009. *Immunologie 26 Tabellen* (Ulmer: Stuttgart).
- Maslov, Leonid N., Sergey V. Popov, Natalia V. Naryzhnaya, Alexandr V. Mukhomedzyanov, Boris K. Kurbatov, Ivan A. Derkachev, Alla A. Boshchenko, Igor Khaliulin, N. Rajendra Prasad, Nirmal Singh, Alexei Degterev, Evgenia A. Tomilova, and Ekaterina V. Sapozhenkova. 2022. 'The regulation of necroptosis and perspectives for the development of new drugs preventing ischemic/reperfusion of cardiac injury', *Apoptosis*, 27: 697-719.
- Mederacke, I., A. Filliol, S. Affo, A. Nair, C. Hernandez, Q. Sun, F. Hamberger, F. Brundu, Y. Chen, A. Ravichandra, P. Huebener, H. Anke, H. Shi, R. A. Martinez Garcia de la

- Torre, J. R. Smith, N. C. Henderson, F. W. R. Vondran, C. V. Rothlin, H. Baehre, I. Tabas, P. Sancho-Bru, and R. F. Schwabe. 2022. 'The purinergic P2Y14 receptor links hepatocyte death to hepatic stellate cell activation and fibrogenesis in the liver', *Sci Transl Med*, 14: eabe5795.
- Meier-Soelch, J., C. Mayr-Buro, J. Juli, L. Leib, U. Linne, J. Dreute, A. Papantonis, M. L. Schmitz, and M. Kracht. 2021. 'Monitoring the Levels of Cellular NF-kappaB Activation States', *Cancers (Basel)*, 13.
- Menon, S., and A. Holt. 2019. 'Large-duct cholangiopathies: aetiology, diagnosis and treatment', *Frontline Gastroenterol*, 10: 284-91.
- Messmann, Helmut. 2012. *Klinische Gastroenterologie das Buch für Fort- und Weiterbildung plus DVD mit über 1400 Befunden ; 312 Tabellen* (Thieme: Stuttgart u.a.).
- Mihara, M., M. Hashizume, H. Yoshida, M. Suzuki, and M. Shiina. 2012. 'IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions', *Clin Sci (Lond)*, 122: 143-59.
- Milanovic, M., N. Heise, N. S. De Silva, M. M. Anderson, K. Silva, A. Carette, F. Orelli, G. Bhagat, and U. Klein. 2017. 'Differential requirements for the canonical NF-kappaB transcription factors c-REL and RELA during the generation and activation of mature B cells', *Immunol Cell Biol*, 95: 261-71.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. 'RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes', *Cell*, 68: 869-77.
- Moore, C. R., Y. Liu, C. Shao, L. R. Covey, H. C. Morse, 3rd, and P. Xie. 2012. 'Specific deletion of TRAF3 in B lymphocytes leads to B-lymphoma development in mice', *Leukemia*, 26: 1122-7.
- Moreau, R., R. Jalan, P. Gines, M. Pavesi, P. Angeli, J. Cordoba, F. Durand, T. Gustot, F. Saliba, M. Domenicali, A. Gerbes, J. Wendon, C. Alessandria, W. Laleman, S. Zeuzem, J. Trebicka, M. Bernardi, V. Arroyo, and Canonic Study Investigators of the EASL-CLIF Consortium. 2013. 'Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis', *Gastroenterology*, 144: 1426-37, 37 e1-9.
- Müller-Esterl, Werner. 2011. *Biochemie eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler* (Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg).
- Muller, K., H. Honcharova-Biletska, C. Koppe, M. Egger, L. K. Chan, A. T. Schneider, L. Kuschgens, F. Bohm, Y. Boege, M. E. Healy, J. Schmitt, S. Comtesse, M. Castoldi, C. Preisinger, M. Szydłowska, E. Focaccia, N. T. Gaisa, S. H. Loosen, S. Jors, F. Tacke, C. Roderburg, V. Keitel, J. G. Bode, P. Boor, R. J. Davis, T. Longerich, F. Geisler, M. Heikenwalder, A. Weber, M. Vucur, and T. Luedde. 2021. 'JNK signaling prevents biliary cyst formation through a CASPASE-8-dependent function of RIPK1 during aging', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.
- Muratori, L., A. W. Lohse, and M. Lenzi. 2023. 'Diagnosis and management of autoimmune hepatitis', *BMJ*, 380: e070201.
- Murphy, J. M., P. E. Czabotar, J. M. Hildebrand, I. S. Lucet, J. G. Zhang, S. Alvarez-Diaz, R. Lewis, N. Lalaoui, D. Metcalf, A. I. Webb, S. N. Young, L. N. Varghese, G. M. Tannahill, E. C. Hatchell, I. J. Majewski, T. Okamoto, R. C. Dobson, D. J. Hilton, J. J. Babon, N. A. Nicola, A. Strasser, J. Silke, and W. S. Alexander. 2013. 'The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism', *Immunity*, 39: 443-53.
- Nassereldine, Hasan, Kelly Compton, Zhuochen Li, Mathew M. Baumann, Yekaterina O. Kelly, Wichada La Motte-Kerr, Farah Daoud, Erik J. Rodriguez, George A. Mensah, Anna M. Nápoles, Eliseo J. Pérez-Stable, Christopher J. L. Murray, Ali H. Mokdad, and Laura Dwyer-Lindgren. 2024. 'The burden of cirrhosis mortality by county, race,

- and ethnicity in the USA, 2000–2013; a systematic analysis of health disparities', *The Lancet Public Health*, 9: e551-e63.
- Netter, Frank H. 2014. *Netters Innere Medizin* (Thieme: Stuttgart u.a.).
- Newton, K., A. Strasser, N. Kayagaki, and V. M. Dixit. 2024. 'Cell death', *Cell*, 187: 235-56.
- Oeckinghaus, A., M. S. Hayden, and S. Ghosh. 2011. 'Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways', *Nat Immunol*, 12: 695-708.
- Oh, R. C., T. R. Hustead, S. M. Ali, and M. W. Pantsari. 2017. 'Mildly Elevated Liver Transaminase Levels: Causes and Evaluation', *Am Fam Physician*, 96: 709-15.
- Orning, P., and E. Lien. 2021. 'Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity', *J Leukoc Biol*, 109: 121-41.
- Ozaki, I., M. Motomura, Y. Setoguchi, N. Fujio, K. Yamamoto, T. Kariya, and T. Sakai. 1991. 'Albumin mRNA expression in human liver diseases and its correlation to serum albumin concentration', *Gastroenterol Jpn*, 26: 472-6.
- Ozen, H., N. Kocak, I. N. Saltik, A. Yuce, and F. Gurakan. 2001. 'Autoimmune hepatitis', *Indian J Pediatr*, 68: 725-8.
- Papa, S., C. Bubici, F. Zazzeroni, and G. Franzoso. 2009. 'Mechanisms of liver disease: cross-talk between the NF-kappaB and JNK pathways', *Biol Chem*, 390: 965-76.
- Parivakkam Mani, A., S. K. R. Sundar, and S. Yadav. 2023. 'Pulmonary Manifestations at Different Stages in the Chronic Kidney Disease: An Observational Study', *Cureus*, 15: e39235.
- Parlar, Y. E., S. N. Ayar, D. Cagdas, and Y. H. Balaban. 2023. 'Liver immunity, autoimmunity, and inborn errors of immunity', *World J Hepatol*, 15: 52-67.
- Pasparakis, M., and P. Vandenabeele. 2015. 'Necroptosis and its role in inflammation', *Nature*, 517: 311-20.
- Philips, C. A., R. Ahamed, S. Rajesh, T. George, M. Mohanan, and P. Augustine. 2020. 'Update on diagnosis and management of sepsis in cirrhosis: Current advances', *World J Hepatol*, 12: 451-74.
- Pinter, M., M. Trauner, M. Peck-Radosavljevic, and W. Sieghart. 2016. 'Cancer and liver cirrhosis: implications on prognosis and management', *ESMO Open*, 1: e000042.
- Pistorio, V., J. Tokgozoglu, V. Ratziu, and J. Gautheron. 2022. 'The scaffold-dependent function of RIPK1 in experimental non-alcoholic steatohepatitis', *J Mol Med (Berl)*, 100: 1039-42.
- Prezant, D. J. 1990. 'Effect of uremia and its treatment on pulmonary function', *Lung*, 168: 1-14.
- 'Pulmonary Complications of Cirrhosis'. 2015. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 11: 126-8.
- Rahman, A., and F. Fazal. 2011. 'Blocking NF-kappaB: an inflammatory issue', *Proc Am Thorac Soc*, 8: 497-503.
- Riemann, M., N. Andreas, M. Fedoseeva, E. Meier, D. Weih, H. Freytag, R. Schmidt-Ullrich, U. Klein, Z. Q. Wang, and F. Weih. 2017. 'Central immune tolerance depends on crosstalk between the classical and alternative NF-kappaB pathways in medullary thymic epithelial cells', *J Autoimmun*, 81: 56-67.
- Rosien, Ulrich. 2021. *Facharztwissen Gastroenterologie und Hepatologie* (Elsevier: München).
- Sahoo, S., A. Mishra, A. M. Diehl, and M. K. Jolly. 2022. 'Dynamics of hepatocyte-cholangiocyte cell-fate decisions during liver development and regeneration', *iScience*, 25: 104955.
- Salmena, L., B. Lemmers, A. Hakem, E. Matysiak-Zablocki, K. Murakami, P. Y. Au, D. M. Berry, L. Tambllyn, A. Shehabeldin, E. Migon, A. Wakeham, D. Bouchard, W. C. Yeh, J. C. McGlade, P. S. Ohashi, and R. Hakem. 2003. 'Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity', *Genes Dev*, 17: 883-95.

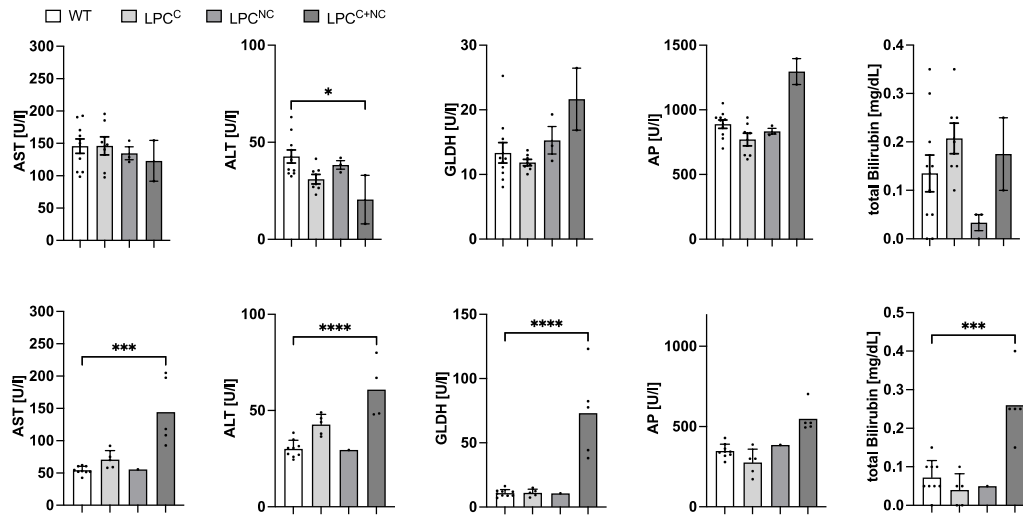
- Sarcognato, S., D. Sacchi, F. Grillo, N. Cazzagon, L. Fabris, M. Cadamuro, I. Cataldo, C. Covelli, A. Mangia, and M. Guido. 2021. 'Autoimmune biliary diseases: primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis', *Pathologica*, 113: 170-84.
- Sasaki, Y., E. Derudder, E. Hobeika, R. Pelanda, M. Reth, K. Rajewsky, and M. Schmidt-Suppran. 2006. 'Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation', *Immunity*, 24: 729-39.
- Schaps, Klaus-Peter. 2007. <<Das>> *Zweite - kompakt GK2* (Springer: Heidelberg).
- Schaub, J. R., K. A. Huppert, S. N. T. Kurial, B. Y. Hsu, A. E. Cast, B. Donnelly, R. A. Karns, F. Chen, M. Rezvani, H. Y. Luu, A. N. Mattis, A. L. Rougemont, P. Rosenthal, S. S. Huppert, and H. Willenbring. 2018. 'De novo formation of the biliary system by TGFbeta-mediated hepatocyte transdifferentiation', *Nature*, 557: 247-51.
- Schomaker, S., D. Potter, R. Warner, J. Larkindale, N. King, A. C. Porter, J. Owens, L. Tomlinson, J. M. Sauer, K. Johnson, and J. Aubrecht. 2020. 'Serum glutamate dehydrogenase activity enables early detection of liver injury in subjects with underlying muscle impairments', *PLoS One*, 15: e0229753.
- Schünke, Michael. 2024. <<Der>> *Körper des Menschen Einführung in Bau und Funktion : 4 Poster mit Übersichten: Skelett, Gefäße, Nerven, Muskulatur* (Thieme: Stuttgart).
- Schuster, K., A. Staffeld, A. Zimmermann, N. Boge, S. Lang, A. Kuhla, and L. Frinotrop. 2024. 'Starvation in Mice Induces Liver Damage Associated with Autophagy', *Nutrients*, 16.
- Sell, S., and H. L. Leffert. 2008. 'Liver cancer stem cells', *J Clin Oncol*, 26: 2800-5.
- Shen, H., L. Sheng, Z. Chen, L. Jiang, H. Su, L. Yin, M. B. Omary, and L. Rui. 2014. 'Mouse hepatocyte overexpression of NF-kappaB-inducing kinase (NIK) triggers fatal macrophage-dependent liver injury and fibrosis', *Hepatology*, 60: 2065-76.
- Shen, H., L. Sheng, Y. Xiong, Y. H. Kim, L. Jiang, Z. Chen, Y. Liu, K. Pyaram, C. H. Chang, and L. Rui. 2017. 'Thymic NF-kappaB-inducing kinase regulates CD4(+) T cell-elicited liver injury and fibrosis in mice', *J Hepatol*, 67: 100-09.
- Shojaie, L., A. Iorga, and L. Dara. 2020. 'Cell Death in Liver Diseases: A Review', *Int J Mol Sci*, 21.
- Son, Y. H., Y. T. Jeong, K. A. Lee, K. H. Choi, S. M. Kim, B. Y. Rhim, and K. Kim. 2008. 'Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells', *J Cardiovasc Pharmacol*, 51: 71-7.
- Stamataki, Z., and L. Swadling. 2020. 'The liver as an immunological barrier redefined by single-cell analysis', *Immunology*, 160: 157-70.
- Stutman, O., E. J. Yunis, and R. A. Good. 1970. 'Studies on thymus function. II. Cooperative effect of newborn and embryonic hemopoietic liver cells with thymus function', *J Exp Med*, 132: 601-12.
- Sundaram, K., M. Ferro, Consortium Inborn Errors of Immunity Functional Diagnostics, G. Hayman, and M. A. A. Ibrahim. 2023. 'Novel NFKB2 Pathogenic Variants in Two Unrelated Patients with Common Variable Immunodeficiency', *J Clin Immunol*, 43: 1159-64.
- Svinarenko, M., S. F. Katz, U. Tharehalli, M. A. Mulaw, H. J. Maier, Y. Sunami, S. K. Fischer, Y. Chen, S. Heurich, L. Erkert, A. Tannapfel, T. Wirth, R. Schirmbeck, T. Seufferlein, and A. Lechel. 2019. 'An IKK/NF-kappaB Activation/p53 Deletion Sequence Drives Liver Carcinogenesis and Tumor Differentiation', *Cancers (Basel)*, 11.
- Tan, X., Y. Xiang, J. Shi, L. Chen, and D. Yu. 2024. 'Targeting NTCP for liver disease treatment: A promising strategy', *J Pharm Anal*, 14: 100979.

- Tao, Z., A. Fusco, D. B. Huang, K. Gupta, D. Young Kim, C. F. Ware, G. D. Van Duyne, and G. Ghosh. 2014. 'p100/IkappaBdelta sequesters and inhibits NF-kappaB through kappaBsome formation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 15946-51.
- Terziroli Beretta-Piccoli, B., D. Vergani, and G. Mieli-Vergani. 2018. 'Autoimmune sclerosing cholangitis: Evidence and open questions', *J Autoimmun*, 95: 15-25.
- Trebicka, J., A. Amoros, C. Pitarch, E. Titos, J. Alcaraz-Quiles, R. Schierwagen, C. Deulofeu, J. Fernandez-Gomez, S. Piano, P. Caraceni, K. Oettl, E. Sola, W. Laleman, J. McNaughtan, R. P. Mookerjee, M. J. Coenraad, T. Welzel, C. Steib, R. Garcia, T. Gustot, M. A. Rodriguez Gandia, R. Banares, A. Albillos, S. Zeuzem, V. Vargas, F. Saliba, F. Nevens, C. Alessandria, A. de Gottardi, H. Zoller, P. Gines, T. Sauerbruch, A. Gerbes, R. E. Stauber, M. Bernardi, P. Angeli, M. Pavesi, R. Moreau, J. Claria, R. Jalan, and V. Arroyo. 2019. 'Addressing Profiles of Systemic Inflammation Across the Different Clinical Phenotypes of Acutely Decompensated Cirrhosis', *Front Immunol*, 10: 476.
- Uciechowski, P., and W. C. M. Dempke. 2020. 'Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network', *Oncology*, 98: 131-37.
- Valavanidis, A., T. Vlachogianni, and C. Fiotakis. 2009. '8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis', *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 27: 120-39.
- Velez, J. C. Q., N. Latt, and R. A. Rodby. 2024. 'Pathophysiology of Hepatorenal Syndrome', *Adv Kidney Dis Health*, 31: 87-99.
- Verzella, D., A. Pescatore, D. Capece, D. Vecchiotti, M. V. Ursini, G. Franzoso, E. Alesse, and F. Zazzeroni. 2020. 'Life, death, and autophagy in cancer: NF-kappaB turns up everywhere', *Cell Death Dis*, 11: 210.
- Vucur, M., A. Ghallab, A. T. Schneider, A. Adili, M. Cheng, M. Castoldi, M. T. Singer, V. Buttner, L. S. Keysberg, L. Kuschgens, M. Kohlhepp, B. Gorg, S. Gallage, J. E. Barragan Avila, K. Unger, C. Kordes, A. L. Leblond, W. Albrecht, S. H. Loosen, C. Lohr, M. S. Jordens, A. Babler, S. Hayat, D. Schumacher, M. T. Koenen, O. Govaere, M. V. Boekschoten, S. Jors, C. Villacorta-Martin, V. Mazzaferro, J. M. Llovet, R. Weiskirchen, J. N. Kather, P. Starlinger, M. Trauner, M. Luedde, L. R. Heij, U. P. Neumann, V. Keitel, J. G. Bode, R. K. Schneider, F. Tacke, B. Levkau, T. Lammers, G. Fluegen, T. Alexandrov, A. L. Collins, G. Nelson, F. Oakley, D. A. Mann, C. Roderburg, T. Longerich, A. Weber, A. Villanueva, A. L. Samson, J. M. Murphy, R. Kramann, F. Geisler, I. G. Costa, J. G. Hengstler, M. Heikenwalder, and T. Luedde. 2023. 'Sublethal necroptosis signaling promotes inflammation and liver cancer', *Immunity*, 56: 1578-95 e8.
- Wang, B., C. C. Norbury, R. Greenwood, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, and J. A. Frelinger. 2001. 'Multiple paths for activation of naive CD8+ T cells: CD4-independent help', *J Immunol*, 167: 1283-9.
- Wang, Q., K. Guan, Y. Lv, Y. Zhang, Z. Yu, and Q. Kan. 2022. 'Disturbance of hepatocyte growth and metabolism in a hyperammonemia microenvironment', *Arch Biochem Biophys*, 716: 109109.
- Weinlich, R., A. Oberst, H. M. Beere, and D. R. Green. 2017. 'Necroptosis in development, inflammation and disease', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 127-36.
- Wells, J. M., and F. M. Watt. 2018. 'Diverse mechanisms for endogenous regeneration and repair in mammalian organs', *Nature*, 557: 322-28.
- Willmann, K. L., S. Klaver, F. Dogu, E. Santos-Valente, W. Garncarz, I. Bilic, E. Mace, E. Salzer, C. D. Conde, H. Sic, P. Majek, P. P. Banerjee, G. I. Vladimer, S. Haskologlu, M. G. Bolkent, A. Kupesiz, A. Condino-Neto, J. Colinge, G. Superti-Furga, W. F. Pickl, M. C. van Zelm, H. Eibel, J. S. Orange, A. Ikinciogullari, and K. Boztug. 2014.

- 'Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity', *Nat Commun*, 5: 5360.
- Wirasinha, R. C., A. R. Davies, M. Srivastava, J. M. Sheridan, X. Y. X. Sng, O. M. Delmonte, K. Dobbs, K. L. Loh, L. A. Miosge, C. E. Lee, R. Chand, A. Chan, J. Y. Yap, M. D. Keller, K. Chen, J. Rossjohn, N. L. La Gruta, C. G. Vinuesa, H. H. Reid, M. S. Lionakis, L. D. Notarangelo, D. H. D. Gray, C. C. Goodnow, M. C. Cook, and S. R. Daley. 2021. 'Nfkb2 variants reveal a p100-degradation threshold that defines autoimmune susceptibility', *J Exp Med*, 218.
- Wu, H., C. Chen, S. Ziani, L. J. Nelson, M. A. Avila, Y. A. Nevzorova, and F. J. Cubero. 2021. 'Fibrotic Events in the Progression of Cholestatic Liver Disease', *Cells*, 10.
- Xiao, G., A. Fong, and S. C. Sun. 2004. 'Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation', *J Biol Chem*, 279: 30099-105.
- Xie, P., L. L. Stunz, K. D. Larison, B. Yang, and G. A. Bishop. 2007. 'Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs', *Immunity*, 27: 253-67.
- Yamamoto, Y., and R. B. Gaynor. 2001. 'Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer', *J Clin Invest*, 107: 135-42.
- Yang, Meng-ge, Li Sun, Jinming Han, Chao Zheng, Hudong Liang, Jie Zhu, and Tao Jin. 2019. 'Biological characteristics of transcription factor RelB in different immune cell types: implications for the treatment of multiple sclerosis', *Molecular Brain*, 12: 115.
- Yoo, K. S., W. T. Lim, and H. S. Choi. 2016. 'Biology of Cholangiocytes: From Bench to Bedside', *Gut Liver*, 10: 687-98.
- Yu, H., L. Lin, Z. Zhang, H. Zhang, and H. Hu. 2020. 'Targeting NF-kappaB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study', *Signal Transduct Target Ther*, 5: 209.
- Zhang, G. Q., C. Xi, C. T. Shen, H. J. Song, Q. Y. Luo, and Z. L. Qiu. 2023. 'Interleukin-6 promotes the dedifferentiation of papillary thyroid cancer cells', *Endocr Relat Cancer*, 30.
- Zhang, Lisheng, Xiongfei Huang, Zhipeng Meng, Bingning Dong, Steven Shiah, David D. Moore, and Wendong Huang. 2009. 'Significance and Mechanism of CYP7a1 Gene Regulation during the Acute Phase of Liver Regeneration', *Molecular Endocrinology*, 23: 137-45.
- Zhang, R., G. Zhang, B. Xiang, X. Chen, L. Tang, S. Shi, Y. Liu, X. Ai, P. Xie, and Z. Li. 2017. 'TRAF3 negatively regulates platelet activation and thrombosis', *Sci Rep*, 7: 17112.
- Zhang, Z., X. Zhong, H. Shen, L. Sheng, S. Liangpunsakul, A. S. Lok, M. B. Omary, S. Wang, and L. Rui. 2022. 'Biliary NIK promotes ductular reaction and liver injury and fibrosis in mice', *Nat Commun*, 13: 5111.
- Zheng, T., J. Wang, H. Jiang, and L. Liu. 2011. 'Hippo signaling in oval cells and hepatocarcinogenesis', *Cancer Lett*, 302: 91-9.
- Zhou, W. C., Q. B. Zhang, and L. Qiao. 2014. 'Pathogenesis of liver cirrhosis', *World J Gastroenterol*, 20: 7312-24.
- Zhu, H., X. Liu, Y. Ding, K. Tan, W. Ni, W. Ouyang, J. Tang, X. Ding, J. Zhao, Y. Hao, Z. Teng, X. Deng, and Z. Ding. 2022. 'IL-6 coaxes cellular dedifferentiation as a pro-regenerative intermediate that contributes to pericardial ADSC-induced cardiac repair', *Stem Cell Res Ther*, 13: 44.

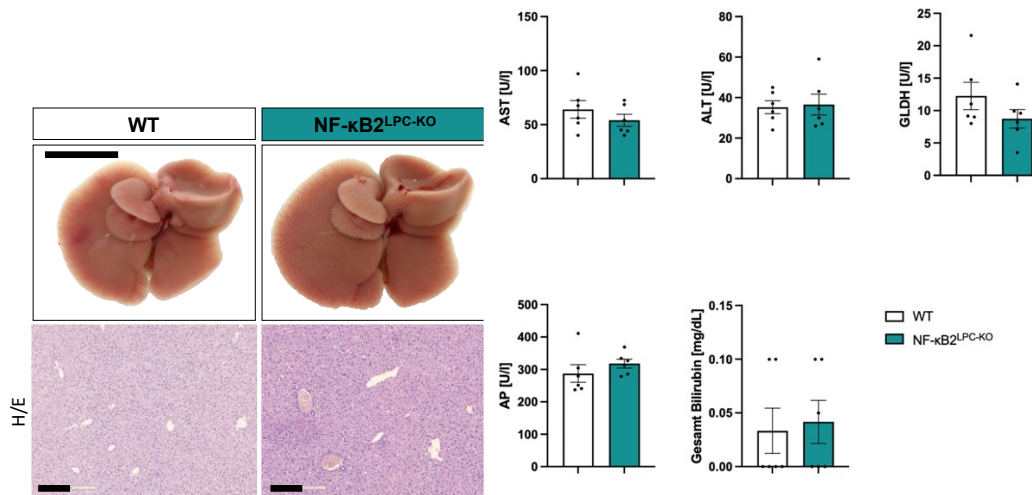
## 6 Anhang

### 6.1 Serumwerte LPC<sup>C+NC</sup> im Alter von 1 Woche und 4 Wochen

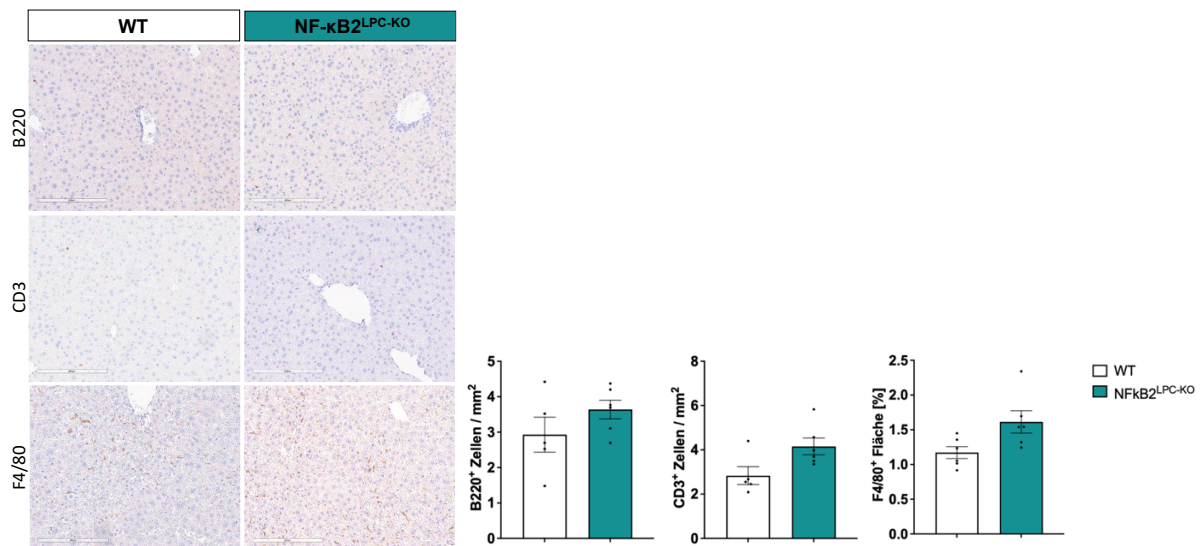


**Abbildung 40: Veränderungen der Serumparameter im jungen Alter.** AST-, ALT-, GLDH-, AP- und Bilirubin-Werte im Serum von 1-Wochen alten Tieren oben und 4-Wochen alten Tieren unten.

### 6.2 Phänotyp der NF- $\kappa$ B<sup>LPC-KO</sup> Mäuse



**Abbildung 41: NF- $\kappa$ B<sup>LPC-KO</sup> –Mäuse entwickeln keinen spontanen Phänotyp.** Repräsentative mikroskopische und makroskopische Bilder der Leber von 6-Wochen alten Tieren. Maßstabsbalken entspricht 1 cm (oben) bzw. 100  $\mu$ m (unten). Zudem die Ast-, ALT- GLDH-, AP- und Bilirubin-Spiegel im Serum.



**Abbildung 42: Keine verstärkte Immuneinfiltration in die Leber bei NF-κB2<sup>LPC-KO</sup>-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp.** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen B220-, CD3- und F4/80-Färbung von in Paraffin eingebetteter Leber 6-Wochen alter Tiere, sowie die quantitative Auswertung der Färbungen. Maßstabsbalken 100 µm. Zudem die Ast-, ALT- GLDH-, AP- und Bilirubin-Spiegel im Serum.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

#

αSMA = engl.: α-smooth muscle actin

A

AF488 = Alexa Fluor 488

AFP = Alpha-Fetoprotein

AIH = Autoimmunhepatitis

AIRE = engl.: autoimmune regulator

ALT = Alanin-Aminotransferase

AMA-M2 Antimitochondriale Antikörper M2

ANA = antinukleäre Antikörper

ANA = Antinukleäre Antikörper 39

AP = Alkalische Phosphatase

APS = Ammoniumpersulfat

AST = Aspartat-Aminotransferase

B

B220 = CD45R; CD45 Isoform

BGA = Blutgasanalyse

BSA = Bovines Serum Albumin

C

CaCl<sub>2</sub> = Calciumchlorid

CAID = engl.: cirrhosis-associated immune dysfunction

CC3 = gespaltene Caspase 3, engl.: cleaved caspase 3

CCC = cholangiozelluläres Karzinom

CD3 = engl.: cluster of differentiation 3

CD4 = engl.: cluster of differentiation 4

CD8 = engl.: cluster of differentiation 8

cDNA = engl.: complementary DNA

cIAP1/2 = engl.: cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2

CK19 = Cytokeratin 19

CLF = Cholyl-Lysyl-Fluorescein

CO<sub>2</sub> = Kohlenstoffdioxid

Cy3 = Cyanine 3

CYP = Cytochrom P450

D

DAMPs = engl.: damage associated molecular patterns

DMEM = engl.: Dulbeccos Modified Eagle Medium

DMSO = Dimethylsulfoxid

DNA = Desoxyribonukleinsäure

DTT = Dithiothreitol

dUTPS = Deoxyuridintriphosphate

E

EBSS = engl.: Earle's balanced salt solution

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, engl.: epidermal growth factor

EGTA = Ethylenglycolbistetraessigsäure

ELISA = engl.: enzyme-linked immunosorbent assay

## F

F4/80 = EMR1; *engl.: EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*  
FADD = *engl.: Fas-associated death domain protein*  
FBS = *engl.: fetal bovine serum*  
FITC = Fluorescein  
for = *engl.: forward*

## G

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  
GLDH = Glutamin-Dehydrogenase  
GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-stimulierendem Faktor  
GS = Glutaminsynthetase

## H

H/E = Hämatoxylin/Eosin  
HCC = Hepatozelluläres Karzinom, *engl.: hepatocellular carcinoma*  
HCl = Hydrochlorid  
HE = hepatische Enzephalopathie  
HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Ethansulfonsäure  
HNF4 $\alpha$  = *engl.: hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$*   
HRP = *engl.: horseradish peroxidase*  
HRS = hepatorenales Syndrom  
HSC *hepatische Sternzellen, engl.: hepatic stellate cell*

## I

IBDU = *engl.: intrahepatic bile ducts*  
IfADo = Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund  
IHC = Immunhistochemisch  
Ikk =  $\kappa$ B-Kinase  
IL-6 = Interleukin-6  
IVC = individuell ventilierten Käfigen  
 $\kappa$ B = inhibitorisches  $\kappa$ B

## K

KCl = Kaliumchlorid, Kaliumchlorid

## L

LANUV = Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz  
LG/KG = Verhältnis aus Lebergewicht zu Körpergewicht  
loxP = locus of x-over, P1  
LPC = Leberparenchymzellen  
LPS = Lipopolysaccharide  
LT- $\beta$  = Lymphotoxin- $\beta$   
LT $\alpha$  = Lymphotoxin- $\alpha$

## M

MAPK = *engl.: Mitogen-activated protein-kinases*  
MCP-1 = *engl.: monocyte chemotactic protein 1*  
MeOH = Methanol  
MgCl<sub>2</sub> = Magnesiumchlorid, Magnesiumchlorid  
MgSO<sub>4</sub> = Magnesiumsulfat  
MLKL = *engl.: mixed lineage kinase domain-like*  
mRNA = *engl.: messenger ribonucleic acid*

mTECs = *medulläre Thymusepithelzellen*

## N

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = Natriumhydrogenphosphat  
NaCl = Natriumchlorid  
NaOH = Natriumhydroxid  
NEAA = *engl.: non essential amino acid*  
NF- $\kappa$ B = *engl.: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
NF- $\kappa$ B1 = p105/p50  
NF- $\kappa$ B2 = p100/p52  
NIK = NF- $\kappa$ B-induzierenden Kinase  
NMC = primäre Mauscholanziozyten, *engl.: normal mouse cholangiocytes*  
NP40 = Nonident P-40  
NTCP = Natrium Taurocholat-cotransportierendes Polypeptid

## O

OD = optische Dichte  
OV-6 = *engl.: oval cell marker*

## P

Pan-CK = Pan-Cytokeratin  
PBC = primär biliäre Cholangitis  
PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung *engl.: phosphate-buffered saline*  
PBS-T = Phosphatgepufferte Saline mit Tween 20  
PCR = Polymerase-Kettenreaktion  
pH = pondus Hydrogenii  
PIAS1 = *engl.: protein inhibitor of activated STAT1*  
PSC = primär sklerosierende Cholangitis

## Q

qRT-PCR = *engl.: quantitative Real-Time PCR*

## R

RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System  
rev = *engl.: reverse*  
RIPK1 = *engl.: receptor interacting protein kinase 1*  
RIPK3 = *engl.: receptor interacting protein kinase 3*

## S

SDS = Natriumdodecylsulfat, *engl.: sodium dodecylsulfate*  
SEM Standardfehler des Mittelwerts, *engl.: standard errors of the mean*  
Sox9 = SRY-Box Transkriptionsfaktor 9  
STAT3 *engl.: signal transducer and activator of transcription 3*  
STI = *engl.: Soybean Trypsin Inhibitor*

## T

TAE = Tris-Acetat-EDTA  
TAK1 = *engl.: transforming growth factor beta-activated kinase 1*  
TBS-T = *engl.: tris-buffered saline with Tween 20*  
TEMED = Tetramethylethylendiamin  
TMRE = Tetramethylrhodamin  
TNFR1 = TNF-Rezeptor 1

TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$   
 TRADD = *engl.: TNFR1-associated death domain*  
 TRADD = *engl.: TNFR1-associated death domain protein*  
 Traf2 = *engl.: TNF-receptor-associated factor 2*  
 Traf3 = *engl.: TNF-receptor-associated factor 3*  
 TUNEL = *engl.: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*

## U

UV = Ultraviolettstrahlung

## V

VE-Wasser = vollentsalztes Wasser

## W

WT = Wildtyp

## Z

ZETT = Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutz-Aufgaben  
 ZV = Zentralvene

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen zur Benennung der Mauslinien und Mausmodelle und Übersicht über die Auswirkungen der Genkonstellationen auf die Signalweg-Aktivierung.....	22
Tabelle 2: Verwendung von Softwares und Internetdiensten .....	22
Tabelle 3: Reagenzien zur Probenaufreinigung der Maus-Biopsien für die Genotypisierung.	23
Tabelle 4: Mastermix-Zusammensetzung für die PCR zur Genotypisierung der Versuchsmäuse.....	24
Tabelle 5: PCR-Primer zur Maus-Genotypisierung: .....	25
Tabelle 6: verwendete Antikörper für IHC-Färbungen.....	28
Tabelle 7: Zusammensetzung der Blockierlösungen für die IHC-Färbungen.....	28
Tabelle 8: Puffer-Zusammensetzungen Gesamtprotein-Isolation.....	30
Tabelle 9: Sammelgel- und Trenngel-Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele für die Western Blots .....	31
Tabelle 10: Zusammensetzung der für die Western Blots verwendeten Puffer.....	33
Tabelle 11: verwendete Antikörper für Western Blots .....	33
Tabelle 12: Pufferzusammensetzung für die Kernprotein-Isolation aus Gewebe und Zellpellets .....	34
Tabelle 13: Sequenzen der verwendeten Primer-Paare für die qRT-PCR .....	36
Tabelle 14: Zusammensetzung von Puffern und Medien für die Isolation primärer Hepatozyten.....	38
Tabelle 15: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung .....	39
Tabelle 16: Zusammensetzung von Puffern und Medien für die Isolation primärer Mauscholangozyten (NMC).....	43
Tabelle 17: Medien und Lösungen zum Passagieren und Einfrieren von Cholangiozyten.....	45

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Übersichtsdarstellung des histologischen Aufbaus von Leberparenchym-Gewebe. ....</b>	<b>2</b>
<b>Abbildung 2: Schematische Darstellung über die Signalwege zur Einleitung von programmiertem Zelltod durch Aktivierung des TNFR1.....</b>	<b>9</b>
<b>Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierung des kanonischen- und nicht-kanonischen NF-<math>\kappa</math>B-Signalwegs.....</b>	<b>12</b>

<b>Abbildung 4: Übersicht zur Funktion der Cre-spezifischen Deletion von Genabschnitten:</b> .....	18
<b>Abbildung 5: Validierung der spezifischen konstitutiven Aktivierung von Ikk2 bzw. der Gendeletion von Traf3 in Leberlysaten und isolierten primären Hepatozyten mittels Western Blot.</b> .....	47
<b>Abbildung 6: Nachweis der konstitutiven Aktivierung des kanonischen bzw. nicht-kanonischen NF-κB-Signalwegs aufgrund der genetischen Manipulation von Ikk2 und Traf3.</b> .....	48
<b>Abbildung 7: Die simultane Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF-κB Signalwegs resultiert in einem erhöhten Leber-/Körpergewichts-Verhältnis.</b> .....	49
<b>Abbildung 8: Erhebliche morphologische Veränderungen der Leberstruktur durch aktivierende Modifikation beider NF-κB Signalwege.</b> .....	50
<b>Abbildung 9: Die Phänotypausprägung der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse entwickelt sich in den ersten 4 Lebenswochen.</b> .....	51
<b>Abbildung 10: LPC<sup>C</sup>- und LPC<sup>NC</sup>-Mäuse weisen eine deutlich erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit gegenüber den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen und auch im Alter keine strukturelle Veränderung der Leber auf.</b> .....	52
<b>Abbildung 11: Im LPC<sup>C+NC</sup>-Serum sind moderate Erhöhungen der Transaminasen (AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase), sowie GLDH (= Glutamin-Dehydrogenase) erkennbar.</b> .....	53
<b>Abbildung 12: In der TUNEL- und CC3-Färbung konnte kein Anstieg des Zelltods in LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern aufgezeigt werden.</b> .....	54
<b>Abbildung 13: Die zusätzliche Blockade der Apoptose bzw. Nekroptose hat keinen protektiven Einfluss auf die Leberstruktur oder die Überlebenswahrscheinlichkeit.</b> .....	55
<b>Abbildung 14: LPC<sup>C+NC</sup>-Tiere weisen eine erhöhte Proliferation der Leberparenchym-Zellen auf.</b> .....	58
<b>Abbildung 15: Leberschnitte der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse weisen eine starke biliäre Fibrose auf.</b> .....	59
<b>Abbildung 16: Intrahepatische LPC<sup>C+NC</sup>-Gallengänge bilden Zysten aus.</b> .....	60
<b>Abbildung 17: LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern zeigen eine veränderte zelluläre Zusammensetzung.</b> ..	61
<b>Abbildung 18: LPC<sup>C+NC</sup> führt zu einem signifikanten Bilirubinanstieg im Serum.</b> .....	62
<b>Abbildung 19: LPC<sup>C+NC</sup> führt zur Hepatozytenproliferation und Expression von Cholangiozytenmarkern.</b> .....	63
<b>Abbildung 20: Hepatozyten-abhängige Funktionen in LPC<sup>C+NC</sup>-Lebern nehmen im Alter zunehmend ab.</b> .....	65
<b>Abbildung 21: Die LPC<sup>C+NC</sup> Hepatozyten zeigen in vivo eine langsamere und geringere Aufnahme des Gallensalz-Analogons.</b> .....	66
<b>Abbildung 22: LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse zeigen eine dekompenzierte Leberschädigung.</b> .....	67
<b>Abbildung 23: Ammoniak-Entgiftung kann in LPC<sup>C+NC</sup>-Tieren nicht mehr gewährleistet werden.</b> .....	68
<b>Abbildung 24: Im Alter fortschreitende Einschränkung der Nierenfunktion bei LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen.</b> .....	69
<b>Abbildung 25: Stauungsinfiltrate und veränderte Gewebsstruktur der Lungen von LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen.</b> .....	71
<b>Abbildung 26: LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse zeigen signifikant geringere spontane körperliche Aktivität verglichen mit wildtypischen Tieren.</b> .....	73
<b>Abbildung 27: Ausgeprägte Immunezellinfiltration in Lebergewebe der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse.</b> .....	56
<b>Abbildung 28: RT-qPCR der unbehandelten isolierten primären Hepatozyten bestätigt erhöhte Entzündungsmarker.</b> .....	57

<b>Abbildung 29: Im Serum von LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen sind mittels indirekter Immunfluoreszenz und ELISA autoreaktive Antikörper vorhanden, die vor allem gegen das Lebergewebe gerichtet sind.</b> .....	75
<b>Abbildung 30: In anderen Organen der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse sind zwar Veränderungen, jedoch keine Immunzellinfiltrate erkennbar.</b> .....	76
<b>Abbildung 31: Der Thymus von LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen verändert sich bereits im Alter von 6-Wochen und weist im Alter von 10 Wochen nur noch eine diffuse Struktur auf.</b> .....	77
<b>Abbildung 32: Thymi der LPC<sup>C+NC</sup>-Mäuse besitzen weniger funktionsfähige mTECs.</b> ..	78
<b>Abbildung 33: Zusätzliche Deletion von NF-<math>\kappa</math>B2 kann nicht vor einer Leberschädigung schützen.</b> .....	80
<b>Abbildung 34: LPC<sup>C+NC</sup><math>\Delta</math>NF<math>\kappa</math>B2-Mäuse weisen ähnliche Charakteristika hinsichtlich der veränderten Leberstruktur auf.</b> .....	81
<b>Abbildung 35: Serumwerte der LPC<sup>C+NC</sup><math>\Delta</math>NF<math>\kappa</math>B2-Mäuse im Vergleich zu den LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen.</b> .....	82
<b>Abbildung 36: Immunhistochemische Färbung der NF-<math>\kappa</math>B-Untereinheiten.</b> .....	83
<b>Abbildung 37: Bestätigung der RelB-Aktivierung in Abwesenheit von NF-<math>\kappa</math>B2.</b> Western Blot von Kernprotein-Isolaten aus Lebergewebe, Hepatozyten und Cholangiozyten über die Kerntranslokation der verschiedenen NF- $\kappa$ B-Untereinheiten. ....	85
<b>Abbildung 38: Beeinträchtigung der Funktion weiterer Organe in LPC<sup>C+NC</sup><math>\Delta</math>NF<math>\kappa</math>B2-Mäusen.</b> .....	86
<b>Abbildung 39: Hypothese über den Verlauf des Multiorganversagens in LPC<sup>C+NC</sup>-Mäusen.</b> .....	92
<b>Abbildung 40: Veränderungen der Serumparameter im jungen Alter.</b> AST-, ALT-, GLDH-, AP- und Bilirubin-Werte im Serum von 1-Wochen alten Tieren oben und 4-Wochen alten Tieren unten. ....	117
<b>Abbildung 41: NF-<math>\kappa</math>B2<sup>LPC-KO</sup>-Mäuse entwickeln keinen spontanen Phänotyp.</b> .....	117
<b>Abbildung 42: Keine verstärkte Immunzellinfiltration in die Leber bei NF-<math>\kappa</math>B2<sup>LPC-KO</sup>-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp.</b> .....	118

## **10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Frau Leonie Sophia Keysberg, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, der 20. Oktober 2025

---

(Unterschrift)

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen meinen Dank aussprechen, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Diese intensive Zeit der Forschung war geprägt von vielen Herausforderungen, aber auch wertvollen Momenten der Zusammenarbeit und Unterstützung, die maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Tom Lüdde, der mir die Möglichkeit gab, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Vielen Dank für das Vertrauen, die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen und die stets konstruktive Unterstützung, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Ein besonderer Dank geht ebenfalls an PD Dr. rer. nat. Mihael Vucur für die Betreuung, den fachlichen Rat und die enorme Unterstützung während der gesamten Promotion. Deine Anmerkungen und Begleitung haben entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Ebenso möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Holger Gohlke für die unterstützende Begleitung während meiner Forschungsarbeit bedanken.

Ein weiterer ausgesprochener Dank gilt Prof. Dr. Jan Hengstler und Prof. Dr. Ahmed Ghallab vom Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund für die Unterstützung bei diesem Projekt und die hervorragende Zusammenarbeit.

Darüber hinaus möchte ich meinen herzlichen Dank an alle Mitglieder der AG Lüdde aussprechen, die durch ihre Hilfsbereitschaft und ihren fachlichen Austausch wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders hervorheben möchte ich Vangelis Kondylis und Matthias Dille, sowie Carolin Angendoehr, Michael Singer und Anna-Lena Hartel für ihre Unterstützung bei Experimenten und dem alltäglichen Laborleben. Die morgendlichen Frühbesprechungen haben so manches Mal der physischen und seelischen Stärkung – und nicht selten auch zur Rettung – beigetragen.

Von Herzen danke ich außerdem meiner Familie für ihren Rückhalt und ihre Ermutigung – und ganz besonders meinem Freund Philipp, der mich in dieser intensiven Zeit mit seiner unglaublichen Geduld und so viel Verständnis unterstützt hat. Danke, dass du mich auch an schwierigen Tagen ertragen und aufgebaut hast und immer an meiner Seite warst und bist.

Danke an alle, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit begleitet und das Gelingen möglich gemacht haben – eure Unterstützung bedeutet mir sehr viel und ist in dieser Zeit besonders wertvoll gewesen.