

Aus dem Institut für vegetative Physiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professorin Dr. med. Michaela Kuhn

Charakterisierung von Zone 1-Sternzellen in der murinen Leber

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Julian Fischer

aus Würzburg

Würzburg, Juni 2023

Referentenblatt

Referent: Prof. Dr. Andreas Friebe

Koreferent: PD Dr. Peter Gallant

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 9.01.2024

Der Promovend ist Zahnarzt

MEINEN ELTERN

-

Für alles, was sie mir ermöglicht haben

Inhaltsverzeichnis

Titelblatt	I
Referentenblatt	II
Widmung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Einleitung	1
1.1 Physiologie und Funktion der Leber	1
1.2 Anatomie der Leber.....	1
1.2.1 Zonierende Gliederung – Leberläppchen und Leberazinus	2
1.2.2 Kapillaren	4
1.2.3 Perizyten.....	4
1.2.4 Sinusoide der Leber.....	5
1.3 Pathophysiologie der Leber.....	6
1.3.1 Leberfibrose	6
1.3.2 Kapillarisation.....	8
1.3.3 Die hepatische Sternzelle	9
1.3.4 Auflösung der Fibrose.....	11
1.3.5 Die NO-GC in der Leber	12
1.4 Die Leber in Mausmodellen.....	12
1.5 Genetisch veränderte Mäuse	13
1.5.1 Cre-LoxP-System	13
1.5.2 Induzierbares Cre-LoxP-System	14
1.5.3 Lineage Tracing und Reportermäuse	14
1.5.4 Fibrosemmodell.....	15
1.6 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	16

1.7	Konfokalmikroskopie.....	16
1.8	Zielsetzungen der Dissertation	17
	Material und Methoden	19
2.1	Ethik- und Tierversuchsvotum	19
2.2	Material	19
2.2.1	Arbeitsgeräte	19
2.2.1.1	Hardware	19
2.2.1.2	Software	20
2.2.2	Verbrauchsmaterial	20
2.2.3	Chemikalien	21
2.2.4	Lösungen	21
2.2.5	Antikörper - Immunhistochemie	22
2.2.5.1	Primäre Antikörper.....	22
2.2.5.2	Sekundäre Antikörper	23
2.2.6	Fluoreszenzfarbstoff – DAPI	23
2.3	Methoden.....	24
2.3.1	Zucht und Genotypisierung.....	24
2.3.2	Haltung.....	25
2.3.3	Tamoxifen-Injektion.....	25
2.3.4	CCl ₄ -Injektion	25
2.3.5	Euthanasierung und Präparatfixierung	26
2.3.6	Anfertigung von Gewebsschnitten am Kryostaten.....	26
2.3.7	Immunhistochemisches Färbungsprotokoll.....	27
2.3.8	Immunfluoreszenzmikroskopie	27
2.4	Statistik.....	28
	Ergebnisse	29

3.1	Sternzellmarker	29
3.2	Verteilung der SMMHC/tdTomato ⁺ Sternzellen im Leberläppchen.....	29
3.3	Lineage Tracing der SMMHC/tdTomato ⁺ Sternzellen	32
3.4	SMMHC/tdTomato ⁺ Sternzellen mit Zonenmarkern	34
3.5	Progenitorzellnische der Zone 1-HSC.....	37
3.6	SMMHC-Expression der Zone 1-HSC	37
3.7	Zone 1-HSC in der Leberfibrose	40
3.8	Zone 1-HSC während der frühen fibrotischen Reaktion.....	45
3.9	Zone 1-HSC und die sinusoidale Kapillarisierung.....	47
3.10	Kapillarisierung und Zone 1-HSC unter frühen fibrotischen Bedingungen ...	48
	Diskussion	53
4.1	Sternzellmarker	54
4.2	Nachweis der SMMHC/tdTomato ⁺ Sternzellen in Zone 1 des Leberazinus (Zone 1-HSC)	54
4.3	Progenitorzellnische der Zone 1-HSC.....	55
4.4	SMMHC-Expression der Zone 1-HSC	56
4.5	Zone 1-HSC sind keine Vorläufer von Myofibroblasten	57
4.5.1	Untersuchung der Zone 1-HSC auf Differenzierung zu Myofibroblasten ..	57
4.5.2	Untersuchung der Zone 1-HSC als Perizyten in Kapillarisierung	59
	Zusammenfassung.....	62
	Literaturverzeichnis.....	63
	Appendix	74
I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Danksagung	

V Lebenslauf

VI Eigene Veröffentlichungen

Einleitung

1.1 Physiologie und Funktion der Leber

Die Leber nimmt im Körper des Menschen eine unverzichtbare und lebensnotwendige Rolle für den gesamten Organismus ein. Zu ihren Funktionen zählen die Verstoffwechslung und Speicherung von Nährstoffen, die Bildung von Blutplasmabestandteilen, die Biotransformation, die Hormonsynthese, Immunabwehrprozesse, Entgiftungsprozesse und einige mehr (Tamm und Kurtz, 2021). Trotz umfangreicher Forschung sind viele metabolische Aspekte der Leber nach wie vor unbekannt (vgl. z.B. Mercado-Irizarry und Torres, 2016; Acharya et al., 2021).

1.2 Anatomie der Leber

Die Leber ist im rechten Oberbauch lokalisiert und wird von der Tunica fibrosa (= Glisson-Kapsel) umschlossen. Von der Tunica fibrosa ausgehende Bindegewebssepten sorgen für eine Aufteilung der Leber in vier makroskopisch sichtbare Lappen. Funktionell zeigt sich eine achteilige Gliederung, welche der Systematik der Gefäßversorgung folgt.

Prinzipiell wird zwischen Vasa privata unterschieden, welche der Eigenversorgung des Organs mit Blut dienen, und Vasa publica, die Blut für übergeordnete, den gesamten Organismus betreffende Stoffwechslaufgaben führen. Zu den zuführenden Gefäßen der Leber gehört die Vena porta hepatis (Vas publicum), welche nährstoffreiches Blut aus dem Darm zur Leber transportiert, und die Arteria hepatica propria (Vas privatum), welche sauerstoffreiches Blut liefert. Arteria hepatica propria und Vena porta hepatis verlaufen parallel und bilden zusammen mit dem ebenfalls parallellaufenden Ductus hepaticus (Gallengang) die portale Trias. Arterie und Vene treten an der Leberpforte in die Leber ein, der Gallengang aus.

Die portale Trias teilt sich in der Leber in zwei Äste auf, sodass aus dieser Aufteilung ein funktioneller rechter und ein linker Leberteile entsteht (Pars hepatis dexter und Pars hepatis sinister). Danach spalten sich die beiden Äste so auf, dass sie insgesamt acht Segmente bilden, die aufgrund der Gefäßteilung funktionell unabhängig voneinander sind. Bis unmittelbar vor den Kapillarbereich fließen Vas privatum und Vas publicum parallel, jedoch getrennt voneinander. Erst im Bereich der Leberkapillaren, der sogenannten

Sinusoide, mischt sich das Blut der zuführenden Gefäße. Nach Durchströmen des Kapillarbereichs sammelt sich das arteriovenöse Mischblut in den Venae centrales (Zentralvenen). Die Gefäßstrukturen des venösen Abflusses verlaufen getrennt von den Portalgefäßen. Die ableitenden Gefäße enden schlussendlich in der Vena cava inferior.

1.2.1 Zonierende Gliederung – Leberläppchen und Leberazinus

Das Leberparenchym lässt sich im histologischen Bau anhand unterschiedlicher Modelle beschreiben. Das Leberläppchen stellt eine traditionelle histologische Beschreibungsform dar (Abbildung 1). Im Zentrum eines jeden Leberläppchens ist die oben erwähnte Zentralvene anzutreffen, die von Periportalfeldern umgeben ist. Aus einem Periportalfeld entspringen rechtwinklig interlobulär gelegene Verzweigungen, die zusammengenommen eine sechseckige Struktur um die Zentralvene ausbilden. Ein Periportalfeld versorgt jeweils zwei „Kanten“ eines Sechsecks mit Blut. Von den terminalen Verzweigungen ausgehend, ziehen die intralobulären Sinusoide sternförmig auf die Zentralvene zu. Im dreidimensionalen Raum erscheint das Leberläppchen als sechseckige Säule mit einem Durchmesser von ca. 1 mm und einer Höhe von ca. 2 mm. Die Leber ist aus ca. 1-1,5 Millionen dieser Leberläppchen aufgebaut (Gerok und Blum, 1995).

Neben der Leberläppchen-Gliederung besteht eine weitere wichtige Einteilung, welche funktionelle Aspekte der histologischen Lebereinheiten in den Vordergrund rückt. Es handelt sich um den Leberazinus (Abbildung 1). Die Gliederung des Leberazinus basiert auf den unterschiedlichen Stoffwechselzonen und den damit einhergehenden Sauerstoff- und Nährstoffkonzentrationsgradienten, welche sich beim Durchlaufen des Blutes durch den stoffwechselaktiven Bereich der Sinusoide ergeben. Der Leberazinus stellt sich geometrisch als Raute dar. Die Mittelachse wird gebildet durch die terminalen Verzweigungen, die, wie oben beschrieben, von den Portalfeldern abgehen. Der Leberazinus beschreibt den Bereich von Hepatozyten, welcher von einer terminalen Verzweigung des Portalfelds ausgehend versorgt wird. Im Bereich der Mittelachse ist die Sauerstoff- und Nährstoffsättigung hoch. Sie entspricht der Zone 1 des Leberazinus. Je weiter das Blut in Richtung Zentralvene vorrückt, desto niedriger werden Sauerstoff- und Nährstoffsättigung. Auf Zone 1 folgt Zone 2 mit einer etwas niedrigeren und um die Zentralvene Zone 3 mit der geringsten Nährstoff- und Sauerstoffsättigung.

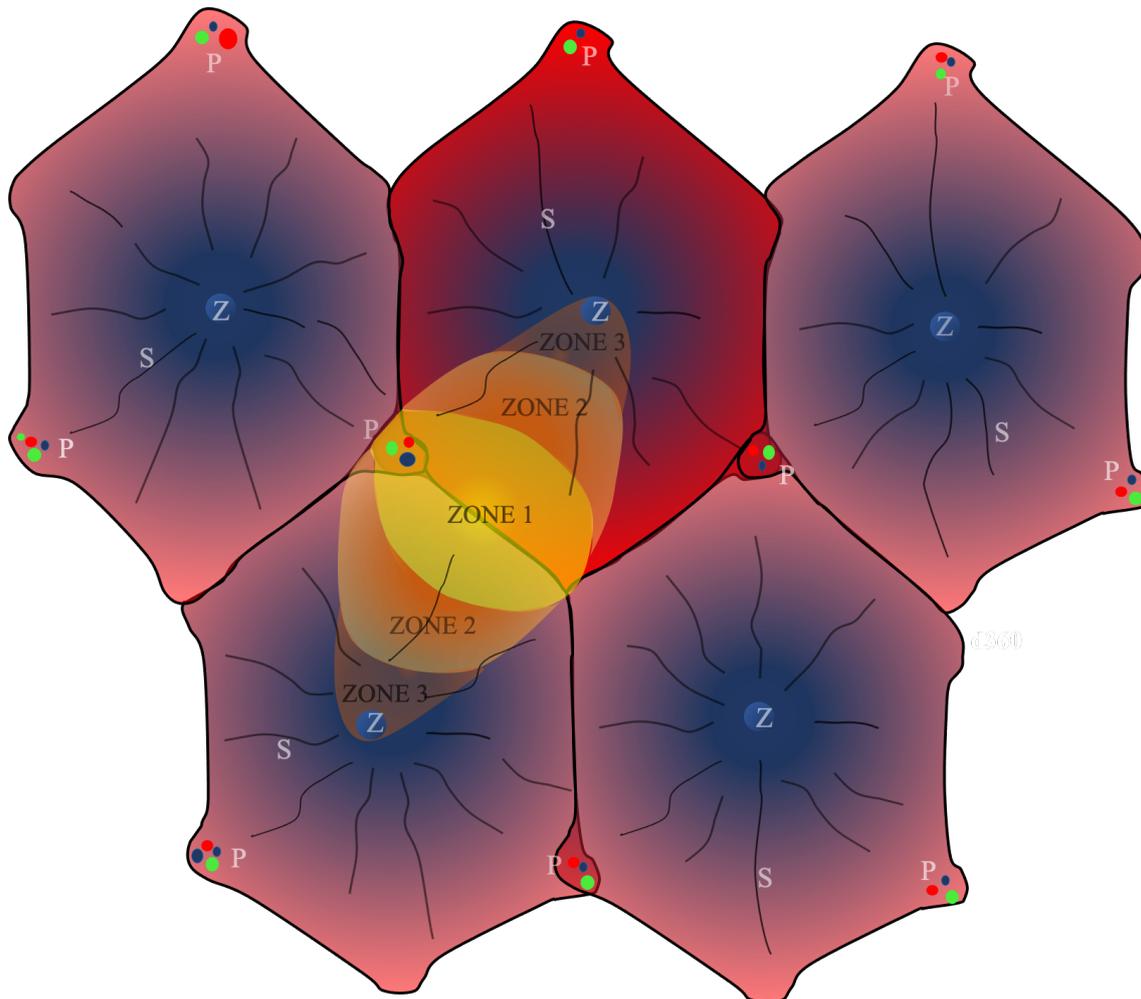


Abbildung 1: Histologische Gliederungskonzepte der Leber

Vereinfachte schematische Darstellung des Leberläppchen (kontraststark hervorgehoben als sechseckige Struktur) und des Leberazinus (gelb hervorgehoben). Leberläppchen: Sechseckige Struktur, die sich um eine in der Mitte gelegene Zentralvene (Z) bildet. In den Ecken des Sechsecks sind Portalfelder (P) zu erkennen, welche die links und rechts angrenzenden terminalen Verzweigungen („Kanten“ des Sechsecks) mit sauerstoff- und nährstoffreichem Blut versorgen. Das Blut fließt über die Sinusoide (S) zur Zentralvene (Z). Leberazinus: Rautenförmige Struktur mit terminaler Verzweigung des Portalfelds als Mittelachse. Zone 1 hat die höchste Sauerstoff- und Nährstoffsättigung, die Richtung Zentralvene (Z) über Zone 2 und 3 kontinuierlich abnimmt. (Eigene Darstellung)

1.2.2 Kapillaren

Die oben beschriebenen intralobulären Sinusoide stellen eine Sonderform von Kapillaren dar (siehe 1.2.4). Bei Kapillaren handelt es sich um Mikrogefäße. Sie haben ein kleines Lumen mit einem Durchmesser von 7 -10 µm und dienen dem Stoff- und Gasaustausch. Zu unterscheiden sind drei unterschiedliche Formen von Kapillaren: geschlossene, fenestrierte und Kapillaren mit diskontinuierlichem Epithel. Die Kapillarwand setzt sich aus Endothelzellen, einer Basallamina und Perizyten zusammen.

Das Endothel ist Bestandteil eines jeden Blutgefäßes und trennt den blutführenden Gefäßraum vom restlichen Gewebe ab. Der Aufbau des Endothels ist dabei maßgeblich für die Unterscheidung der oben genannten Kapillarformen. Die Endothelbarriere ist je nach durchströmtem Organ unterschiedlich durchlässig für im Blutplasma befindliche Makromoleküle. Das diskontinuierliche Endothel ist am durchgängigsten und weist keine/kaum Basallamina auf. Einen diskontinuierlichen Aufbau des Endothels findet man auch in der Leber vor (Wisse, 1970).

Die Basallamina stellt die Verankerungsstelle des Endothels mit umgebenden Zellverbänden dar und setzt sich zusammen aus Lamina rara und Lamina densa. Zusammen mit der Lamina fibroreticularis wird sie als Basalmembran bezeichnet. Die Lamina rara verbindet den darüber liegenden Zellverband mit der Lamina densa und ist reich an Laminin (Tryggvason et al., 1981).

1.2.3 Perizyten

Perizyten stehen im engen Kontakt zu Endothelzellen von Kapillaren (Zimmermann, 1923; Fernando und Movat, 1964). Die Identifikation von Perizyten ist jedoch ein Problem und kann meist nur durch einen Zusammenschluss von Kriterien erfolgen (Lokalisation, Form, Genexpression) (Armulik et al., 2011).

Morphologisch zeichnen sich Perizyten durch einen ovalen Nukleus (Fernando und Movat, 1964) und lange Fortsätze mit weiteren kleinen Verzweigungen aus, welche die Wände der Mikrogefäße umgeben (Zimmermann, 1923; Mazanet und Franzini-Armstrong, 1982). Eine enge Zell-Zell-Interaktion kann durch Membraneinstülpungen im Perizyten und Tight- (Tilton et al., 1979), Gap- (Cuevas et al., 1984) und Adhärenz-Junctions (Gerhardt et al., 2000) vermittelt werden. Das enge Zusammenspiel zwischen

Perizyten und Endothelzellen reguliert so beispielsweise den Bau der Basalmembran (Stratman et al., 2009; Stratman et al., 2010).

Als typische Perizytenmarker werden etwa Desmin (Fujimoto und Singer, 1987) und Platelet-derived growth factor β (PDGFR β) (Lindahl et al., 1997) beschrieben. Dennoch können Perizyten über diese nur bedingt identifiziert werden, da die genannten Marker nicht exklusiv für Perizyten sind und das Expressionsmuster abhängig vom Entwicklungsstand der Perizyten variiert (Hughes und Chan-Ling, 2004; Armulik et al., 2005).

Die Funktion der Perizyten ist bisher nicht vollständig geklärt (Brown et al., 2019). Bekannt ist unter anderem, dass sie die Gefäßweite von Kapillaren regulieren können (Rucker et al., 2000). Die Aufrechterhaltung der Mikrogefäßintegrität durch Perizyten sowie eine Rolle in der Angiogenese und Gefäßremodellierung werden vielfach diskutiert (Armulik et al., 2005; Armulik et al., 2011). Als organspezifische Perizyten der Leber gelten die hepatischen Sternzellen (Hellerbrand, 2013).

1.2.4 Sinusoide der Leber

Die hepatischen Sinusoide sind eine großlumige Sonderform der Kapillaren (Minot, 1900; Wake und Sato, 2015). Sie zeichnen sich durch offene Poren im Endothel, welche nicht durch ein Diaphragma verschlossen sind, sowie durch das Fehlen einer kontinuierlichen Basallamina aus. Es handelt sich dementsprechend um Kapillaren mit diskontinuierlichem Endothel (Wisse, 1970). Lumenwärts lagern sich am Endothel die als Makrophagen fungierenden Kupffer-Zellen an. Auf das Endothel folgt ein Spalt und daran anschließend die parenchymatischen Hepatozyten. Der Spalt zwischen Endothel und Hepatozyten wird als Disse-Raum bezeichnet und beherbergt die hepatischen Sternzellen (siehe 1.3.3) (Wake und Sato, 2015). Aufgrund des perforierten Endothels gelangen im Blutplasma befindliche Makromoleküle frei zu den Hepatozyten. Gleichzeitig sezernieren Hepatozyten Makromoleküle über den Disse-Raum in die Sinusoide (Schulze et al., 2019). Durch chronische Schädigung der Leber (siehe 1.3) kann die Architektur des diskontinuierlichen Endothels verloren gehen und es zur Ausbildung einer Kapillare mit ausgeprägter Basallamina kommen (Schaffner und Popper, 1963; Martinez-Hernandez und Martinez, 1991). Zeitgleich steigt dabei die Expression von Laminin (Bianchi et al., 1984).

1.3 Pathophysiologie der Leber

Erworbene Schädigungen der Leber können unterschiedliche histopathologisch sichtbare Veränderungen wie Leberzellverfettung, Leberfibrose und Leberzirrhose zur Folge haben. Die Leberzellverfettung (Steatose) beispielsweise zeichnet sich durch eine übermäßige Fetteinlagerung in Leberzellen aus und kann ihren Ursprung im Alkoholabusus oder als Nebenwirkung von Medikamenten haben. Bei anhaltender Steatose kann es zur Entzündung und Ausbildung fibrotischer Areale kommen (Bertogg-Seegers und Kuntzen, 2013)

Als Leberfibrose bezeichnet man im Allgemeinen die übermäßige Ansammlung von extrazellulärer Matrix (EZM) als reaktiven Prozess auf chronische Leberschädigung (Friedman, 1993; Moradpour und Lammert, 2020). Die Leberfibrose gilt als Vorstufe der Leberzirrhose (Friedman, 2003; Saile und Ramadori, 2007).

Der Begriff Leberzirrhose beschreibt eine Zerstörung der funktionellen Läppchenarchitektur mit einhergehenden strukturellen Umbauprozessen. Ursächlich können Infektionen (z.B. Virushepatitiden), zirkulatorische Störungen (z.B. venöse Abflussbehinderung), metabolische Erkrankungen (z.B. Hämochromatose) sowie Noxen (z.B. Alkohol, Methotrexat) sein. Auf Grundlage der Leberzirrhose kann sich ein hepatozelluläres Karzinom entwickeln (Williams und Iredale, 1998).

Der Untergang von funktionellem Lebergewebe führt zu einer zunehmenden Leberinsuffizienz mit klinischen Symptomen wie der portalen Hypertension (Williams und Iredale, 1998). Es wird geschätzt, dass global gesehen jährlich ca. 1 Millionen Tote auf Komplikationen zurückgehen, die durch eine Leberzirrhose verursacht wurden (Mokdad et al., 2014).

1.3.1 Leberfibrose

Die Leberfibrose ist nicht charakteristisch für eine typische Erkrankung, sondern kann aus einer Vielzahl an unterschiedlichen chronischen Leberschädigungen hervorgehen. In Industrieländern sind vornehmlich der Alkoholmissbrauch, Hepatitis C und die nichtalkoholische Steatohepatitis als Verursacher zu nennen (Bataller und Brenner, 2005).

Wie oben beschrieben, bezeichnet die Leberfibrose eine übermäßige Ansammlung von EZM im Lebergewebe als Reaktion auf chronische Schädigung des Parenchyms

(Friedman, 1993; Moradpour und Lammert, 2020). EZM setzt sich im Allgemeinen aus Kollagenen, Elastin, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Integrienen zusammen und stellt eine azelluläre Komponente im Gewebe dar (Gerok und Blum, 1995). Sie fungiert unter anderem als stabilisierendes Gerüst für das umliegende Gewebe (Frantz et al., 2010) und ist integraler Bestandteil der Wundheilung (Velnar et al., 2009).

Den Hauptbestandteil der hepatischen EZM bilden die Kollagene I, III, IV, V, VI (Schuppan, 1990; Gerok und Blum, 1995) und VII (Gerok und Blum, 1995).

Die EZM, die in der Leberfibrose verstärkt gebildet wird, zeichnet sich nicht durch grundlegend andere Bestandteile aus, sondern vor allem durch eine generelle Zunahme und andere Verteilung der verschiedenen Komponenten. Kollagen IV Moleküle erfahren beispielsweise anteilmäßig einen enormen Zuwachs (Gerok und Blum, 1995). Hepatische Sternzellen gelten dabei als die Hauptproduzenten von EZM in der Leberfibrose (Shiratori et al., 1987; Maher und McGuire, 1990; Mederacke et al., 2013). Abhängig von der zugrundeliegenden Erkrankung kommt es histopathologisch beispielsweise bei alkoholinduzierter Fibrose zunächst zu einer Anhäufung von EZM im Bereich der Zentralvene (Van Waes und Lieber, 1977; Moradpour und Lammert, 2020), wohingegen chronische Virushepatitiden zur Portalfeld-assoziierten Fibrose führen (Moradpour und Lammert, 2020). Chronischen Leberentzündungen lassen sich anhand ihrer Umbauvorgänge in verschiedene Stadien einteilen: Stadium 1 bezeichnet eine portale Fibrose, Stadium 2 beschreibt eine zusätzliche periportale Fibrose, Stadium 3 eine septale Fibrose und Stadium 4 einen zirrhotischen Umbau des Leberläppchens (Scheuer, 1991; Ludwig, 1993).

Im Überschuss produzierte EZM während der fibrotischen Reaktion (Orrego et al., 1981) und die zunehmende Kontraktilität von Sternzellen (s.u.) beispielsweise, führen zu einer Einengung der blutführenden Sinusoide, wodurch ein erhöhter Strömungswiderstand in der Vena porta hepatis resultiert (Tran-Thi et al., 1993). Anhand der Strömungsgesetze ergibt sich aus einem erhöhten Strömungswiderstand ein erhöhter Druck im Gefäß. Es wird auch von einer intrahepatisch-sinusoidalen portalen Hypertension gesprochen. Die portale Hypertension kann zu portokavalen Anastomosen unter Umgehung der Leber führen. Die Funktionsausübung der Leber wird damit nicht mehr suffizient gewährleistet, da durch das venöse Blut mitgebrachte Substrate nicht mehr entsprechend metabolisiert werden können (Gerok und Blum, 1995).

Neben der Anhäufung von EZM in der Fibrose, hat auch die Kapillarisation der Lebersinusoiden Folgen für den Leberstoffwechsel, auf welche im folgenden Kapitel genauer eingegangen wird.

1.3.2 Kapillarisation

Die Kapillarisation zeichnet sich unter anderem durch eine Defenestration der Sinusoide, die Ausbildung einer kontinuierlichen Basalmembran und einer EZM-Ablagerung im Disse-Raum aus (Schaffner und Popper, 1963; Martinez-Hernandez und Martinez, 1991) (Abbildung 2).

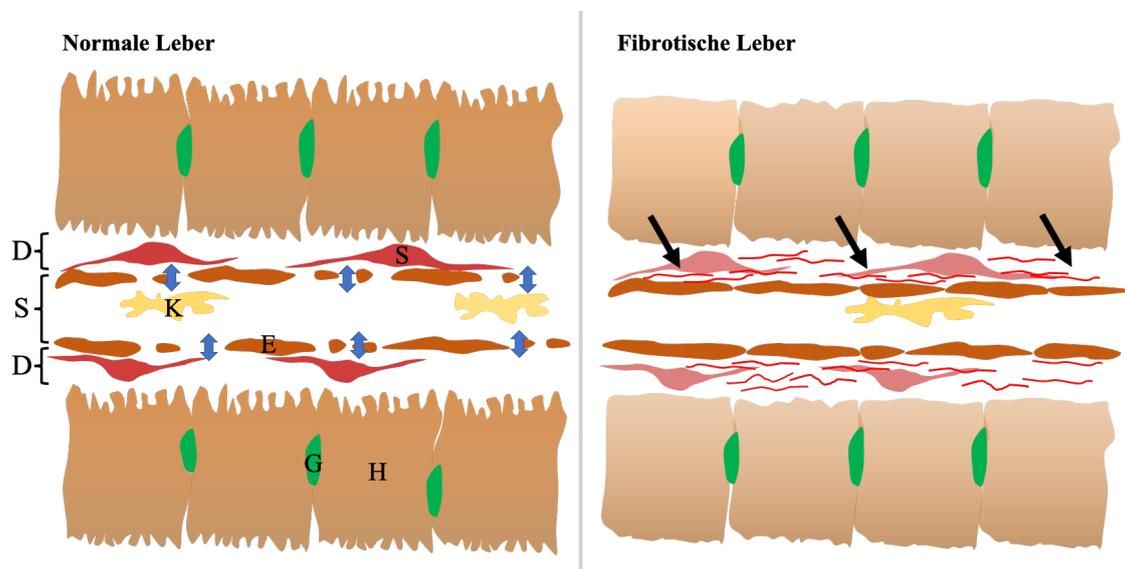


Abbildung 2: Aufbau der Sinusoide - physiologisch und fibrotisch

Dargestellt ist der histologische Aufbau der Sinusoide (S) unter physiologischen (links) und fibrotischen Bedingungen (rechts).

Links: Hepatozyten (H) und Leberendothelzellen (E) grenzen den Disse-Raum (D) ab. Im Disse-Raum sind Sternzellen (S) anzutreffen. Kupferzellen (K) befinden sich lumenwärts. Am apikalen Pol der Hepatozyten befinden sich die Gallenkanälchen (G). Unter physiologischen Bedingungen ist ein Stoffaustausch zwischen Hepatozyten und Sinusoiden möglich (blaue Pfeile).

Rechts: In der Fibrose kommt es zur Ablagerung von EZM (schwarze Pfeile). Der Stoffaustausch ist behindert. (Eigene Darstellung)

Wie in 1.2.4 beschrieben ist das diskontinuierliche Endothel der Sinusoide wichtig für den Stoffaustausch der Leber. Ein Verlust der diskontinuierlichen Struktur hin zu einer kontinuierlichen Kapillare (=Kapillarisation) sorgt für einen verschlechterten Stoffaustausch und verhindert ein regelgerechtes Arbeiten der Hepatozyten (Huet et al., 1982; Varin und Huet, 1985). Die Kapillarisation trägt auch zu einer Erhöhung des Strömungswiderstandes bei und fördert die Entstehung einer portalen Hypertension (Orrego et al., 1981; Gerok und Blum, 1995).

Beim Umbau der Sinusoide hin zu einer Kapillare lässt sich ein verändertes Expressionsmuster der Leberendothelzellen (LSEC = liver sinusoidal endothelial cell) beobachten. Unter physiologischen Bedingungen exprimieren sie kein CD34, unter fibrotischen hingegen schon (Couvelard et al., 1993; Su et al., 2021). Zeitgleich steigt auch die Expression von Laminin (Couvelard et al., 1993; Roehlen et al., 2020; Su et al., 2021).

1.3.3 Die hepatische Sternzelle

Hepatische Sternzellen (HSC) zählen mit Kupffer-Zellen, natürlichen Killerzellen und LSEC zu den nicht-parenchymatischen Leberzellen, wohingegen Hepatozyten als parenchymatische Leberzellen bezeichnet werden (Mazza et al., 2017). Im Jahr 1876 wurden Sternzellen durch Karl Wilhelm von Kupffer beschrieben (Kupffer, 1876). Später sprach man auch von Ito-Zellen (Ito, 1951; Ito und Nemoto, 1952) und gegen Ende des 20. Jahrhunderts einheitlich von hepatischen Sternzellen (HSC) (Ahern et al., 1996).

Histologisch befinden sich hepatische Sternzellen im Disse-Raum der Lebersinusoide. Ihr Zellkörper wird demzufolge von den parenchymatischen Hepatozyten und den nicht-parenchymatischen LSEC eingerahmt (Yamagishi, 1959). Morphologisch zeigen sie eine typische sternförmige Form mit länglichen bis ovalen Zellkern und dendritischen Fortsätzen (Ito und Shibasaki, 1968).

Grundsätzlich ist es möglich, die hepatischen Sternzellen in eine ruhende und in eine aktivierte Form zu unterscheiden (Mak et al., 1984; Geerts et al., 1989; Friedman, 1993; Rockey et al., 1993). Ruhende Sternzellen speichern Vitamin-A (Wake, 1971; Senoo et al., 2007) durch eine Reihe von enzymatischen Reaktionen. Das Enzym Lecithin-Retinol-Acyltransferase (Lrat) ist Bestandteil der enzymvermittelten Speicherkaskade (MacDonald und Ong, 1988; Nagatsuma et al., 2009).

Bei Leberschädigung gehen die Sternzellen vom ruhenden in einen aktivierten Zustand über. Dabei verändern die aktivierten Sternzellen ihren Phänotyp und differenzieren zu EZM produzierenden Zellen (=Myofibroblasten) (Ballardini et al., 1988; Geerts et al., 1989; Friedman, 2008; Bansal, 2016). Myofibroblasten besitzen Charakteristika von Fibroblasten und glatten Muskelzellen und exprimieren deshalb α -Glattmuskelaktin (α SMA = α -smooth-muscle-actin) (Darby et al., 1990; Ramadori et al., 1990; Friedman, 2008; Bochaton-Piallat et al., 2016). Die Kontraktilität ist aus diesem Grund erhöht (Friedman, 2008). Neben der erhöhten Kontraktilität zeigt sich aufgrund des phänotypischen Wandels der aktivierten Sternzellen hin zu Myofibroblasten unter anderem auch ein verändertes Verhalten in der Proliferation (Wong et al., 1994), der Chemotaxis (Melton und Yee, 2007), der Fibrogenese (Tsukada et al., 2006), dem Matrixabbau (Milani et al., 1994) und der Vitamin-A-Speicherfähigkeit. Die Vitamin A-Speicherfähigkeit geht beispielsweise im aktivierten Zustand verloren (Davis und Vucic, 1988).

Die initiale Sternzellaktivierung kann von parenchymatischen und diversen nicht-parenchymatische Leberzellen über unterschiedliche Signalwege erfolgen (Friedman, 2008). Beispielhaft zu nennen sind apoptotische Hepatozyten über Zelltodsignale (Canbay et al., 2002), Thrombozyten über Transforming growth factor β (TGF β)-, Platelet derived growth factor (PDGF)-Signalwege (Bachem et al., 1989) und Kupffer-Zellen über den TGF β -Signalweg (Matsuoka und Tsukamoto, 1990).

Mit Hilfe bestimmter Marker lassen sich Sternzellen in unterschiedlichen Aktivierungsstadien immunhistochemisch voneinander abgrenzen. Mit einem gegen den auf der Sternzelloberfläche exprimierten PDGF β -Rezeptor gerichteten Antikörper können Sternzellen beispielsweise im aktivierten und ruhenden Zustand markiert werden (Pinzani et al., 1994; Henderson et al., 2013; Shang et al., 2018). Eine Auflistung von Markern ist in Tabelle 1 zu sehen.

Tabelle 1: Marker von Sternzellen in unterschiedlichen Aktivierungszuständen

Einige Marker für ruhende HSC (qHSC) und zu Myofibroblasten aktivierte HSC (aHSC) sind in der Tabelle aufgelistet.

Marker	Typisch für	Weitere markierte Zellen
Lrat	qHSC (Nagatsuma et al., 2009)	Glatte Muskelzellen (Mederacke et al., 2013)
PDGFR β	aHSC und qHSC (Pinzani et al., 1994; Henderson et al., 2013)	Glatte Muskelzellen, Fibroblasten (Wang et al., 2021)
α SMA	aHSC (Nouchi et al., 1991)	Glatte Muskelzellen, Myoepithelium (Skalli et al., 1986)

1.3.4 Auflösung der Fibrose

Das Lebergewebe hat ein sehr hohes regeneratives Potential. Solange die Architektur des bindegewebigen Stützgerüsts intakt ist, besteht die Möglichkeit Defekte auszuheilen (Dezső et al., 2022). In fortgeschrittenen Fibrorestadien kann es jedoch auch trotz langsam ablaufender Regeneration zum Auftreten schwerwiegender Komplikationen kommen (Roehlen et al., 2020). Zum aktuellen Zeitpunkt sind die therapeutischen Möglichkeiten bei chronischen Leberkrankungen eingeschränkt und lediglich auf die Beseitigung der krankheitsauslösenden Ursache oder eine Lebertransplantation begrenzt (Ramachandran et al., 2020). Daher scheint eine ergänzende medikamentöse Therapie wünschenswert (Roehlen et al., 2020).

Da Sternzellen eine wichtige Rolle in der fibrotischen Reaktion einnehmen, stellen sie möglicherweise einen vielversprechenden Ansatzpunkt für Therapeutika dar (vgl. Wang et al., 2020). Aktivierte Sternzellen können in die Apoptose eintreten (Issa et al., 2001) oder von der aktivierten Form in den ruhenden Zustand überführt werden (Gaça et al., 2003). Es resultiert eine Reduktion der Zahl an EZM-produzierenden Zellen (Issa et al., 2001). Die Auflösung der EZM wird durch Matrixmetalloproteasen vermittelt (Iredale, 1997).

Der Schutz von Hepatozyten vor Apoptose beispielsweise wirkt sich direkt auf die reduzierte Aktivierung von Sternzellen aus (Witek et al., 2009). Auch durch Immunmodulation kann die Aktivierung der Sternzellen reduziert werden, da einige

Immunzellen (z.B. Makrophagen) profibrotisch wirken (Lefebvre et al., 2016; Roehlen et al., 2020).

1.3.5 Die NO-GC in der Leber

Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Professor Friebe hatten das Ziel, Zellen in der Leber zu identifizieren, welche das Enzym NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) exprimieren (Schwiering, 2019). Bei der NO-GC handelt es sich um ein heterodimeres Enzym, das vielseitige Funktionen im menschlichen Körper wie die Regulation des Blutdrucks (Groneberg et al., 2010) und die Inhibition der Thrombozytenaggregation (Dangel et al., 2010) vermittelt. Außerdem nimmt die NO-GC Einfluss auf das fibrotische Geschehen. Untersuchungen an Ratten belegen, dass durch den NO-GC-Aktivator Bay 60-2770 antifibrotische Effekte in der Leber erzielbar sind (Knorr et al., 2008).

Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten, dass hepatische Sternzellen die NO-GC exprimieren. Die verwendete SMMHC (smooth muscle myosin heavy chain)-CreERT²-tdTomato Mauslinie (s.u.), die insbesondere glatte Muskelzellen kennzeichnet (Deaton et al., 2023), markierte überraschenderweise auch einige HSC (Schwiering, 2019).

1.4 Die Leber in Mausmodellen

Für weiterführende Untersuchungen des durch Schwiering (2019) identifizierten Sternzellsubtyps wurden murine Versuchstiere genutzt. Die Maus ist in vielerlei Hinsicht wichtig für die Forschung im medizinischen Bereich (Houdebine, 2007). So haben 99% der Mausgene eine Entsprechung im humanen Genom (Chinwalla et al., 2002). Außerdem zeichnen sich Mäuse durch eine kurze Generationszeit (Singleton und Krebs, 2007; Phifer-Rixey und Nachman, 2015) und eine verhältnismäßig kostengünstige Haltung und Zucht aus (Vandamme, 2014).

Die Leber der Maus ist in ihrer Funktion und ihrem mikroskopischen Aufbau der menschlichen ähnlich (Kruepunga et al., 2019). Sie setzt sich zusammen aus dem linken Leberlappen (Lobus hepatis sinister), dem rechten Leberlappen (Lobus hepatis dexter), dem Lobus quadratus und dem Lobus caudatus (Waibl et al., 2012). Der Lobus quadratus ist aufgrund seiner geringen Größe klinisch kaum auffindbar. Der Lobus hepatis dexter unterteilt sich in einen Lobus hepatis dexter medialis und lateralis. Genauso lässt sich der Lobus hepatis sinister in einen medialen und einen lateralen Lappenanteil gliedern (Fiebig et al., 2012).

1.5 Genetisch veränderte Mäuse

Gene können dem Genom von Versuchstieren hinzugefügt (transgene Modelle) oder im Genom ausgeschaltet werden (Houdebine, 2007; Vandamme, 2014). Dadurch ist es möglich die spezifische Rolle von Enzymen beziehungsweise Proteinen im Organismus zu untersuchen (vgl. Bosetti, 2007). Transgene Tiermodelle bilden die Realität des menschlichen Körpers nicht vollständig ab, sind jedoch eine gute Basis zur Erforschung humaner Erkrankungen oder der Entwicklung neuartiger Medikamente (Houdebine, 2007). In der Arbeit kamen Mäuse zum Einsatz, die mit dem Cre-LoxP-System genetisch verändert wurden.

1.5.1 Cre-LoxP-System

Bei der Cre-Rekombinase (Cre) handelt es sich um ein Enzym, das die Fähigkeit besitzt, markierte Abschnitte auf der DNA zu erkennen und anschließend auszuschneiden oder zu rekombinieren. Die Cre stammt aus Bakteriophage P1 und wurde erstmals durch Sternberg beschrieben (Sternberg et al., 1981; Sternberg und Hamilton, 1981; Sternberg, 1981). Die auszuschneidende DNA wird durch LoxP-Stellen (locus of X-over of P1) am Anfang und Ende der entsprechenden DNA-Sequenz gekennzeichnet. Die LoxP-Stelle setzt sich aus 34 Basenpaaren zusammen. Der Zentralbaustein der LoxP-Stelle besteht aus 8 Basenpaaren und wird auf beiden Seiten von einer 13 Basenpaare umfassenden palindromischen Sequenzen umschlossen (Hoess und Abremski, 1984). Je nach räumlicher Orientierung der LoxP-Sequenzen kann die Cre den durch zwei LoxP-Stellen gefassten DNA-Abschnitt beispielsweise ausschneiden (Li et al., 1996) oder translozieren (Smith et al., 1995; Van Deursen et al., 1995).

Das Markieren einer bestimmten DNA-Sequenz mit Hilfe von LoxP-Stellen wird als „floxed“ bezeichnet (Feil et al., 2009). Dies geschieht durch Klonierung und anschließende Integration der veränderten DNA mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen (vgl. Capecchi, 1989; Feil et al., 2009). Um eine Mauslinie zu erhalten, in welcher gefloxed DNA durch die zellspezifische Cre ausgeschnitten wird, können zwei Mauslinien miteinander gekreuzt werden. Eine Mauslinie liefert die gefloxed DNA, die andere Mauslinie liefert die Cre, die unter der Kontrolle eines zellspezifischen Promotors steht (vgl. Gu et al., 1994).

1.5.2 Induzierbares Cre-LoxP-System

Die Aktivität des Cre-Enzyms kann durch Modifizierung außerdem zu einem selbstgewählten Zeitpunkt reguliert werden. In diesem CreER^T genannten System ist die Cre mit einem Östrogen-Rezeptor fusioniert, der über eine mutierte Hormonbindungsstelle verfügt. Zu 4-Hydroxytamoxifen metabolisiertes Tamoxifen kann an diesen mutierten Rezeptor binden (Littlewood et al., 1995; Metzger et al., 1995; Feil et al., 1996).

Solange kein Tamoxifen verfügbar ist, bindet das aus Cre und mutiertem Östrogenrezeptor bestehende Fusionsprotein im Zytoplasma an Hitzeschockprotein 90 (HSP90). Sobald Tamoxifen injiziert und metabolisiert wurde, bindet 4-Hydroxytamoxifen an den mutierten Östrogenrezeptor, sorgt für eine Konformationsänderung und der Komplex aus Rezeptor und Cre-Protein löst sich vom HSP90 ab. Dadurch ist eine Passage in den Zellkern möglich. Hier kann nun durch die Cre die Deletion der gewünschten Ziel-DNA erfolgen (Scherrer et al., 1993; Verrou et al., 1999). Das in dieser Arbeit verwendete CreER^{T2} System reagiert auf 4-Hydroxytamoxifen zehnmal empfindlicher als das CreER^T System (Indra et al., 1999).

1.5.3 Lineage Tracing und Reporterermäuse

Beim Lineage Tracing exprimiert eine Zelle ein Reportergen (beispielsweise einen fluoreszierenden Farbstoff), wodurch das Schicksal dieser Zelle und all ihrer Tochterzellen beobachtet werden kann (Kretzschmar und Watt, 2012; Hsu, 2015). Spezifische Zellpopulationen können so anhand ihrer Zellmauserungsrate, ihrem Verhalten unter verschiedenen Versuchsbedingungen und ihrer Lokalisation im Gewebe untersucht werden, da sich die farblich markierten Zellen klar abheben (Kretzschmar und Watt, 2012).

Zur Umsetzung des Lineage Tracings wird häufig das induzierbare Cre-LoxP-System herangezogen (Kretzschmar und Watt, 2012; Matthews et al., 2020). Die Cre kann nach Applikation von Tamoxifen ein mit LoxP-Sites markiertes Stopcodon vor dem Farbstoff-Gen exzidieren, woraufhin der Farbstoff (Reporter) exprimiert wird (Kretzschmar und Watt, 2012) (siehe Abbildung 3).

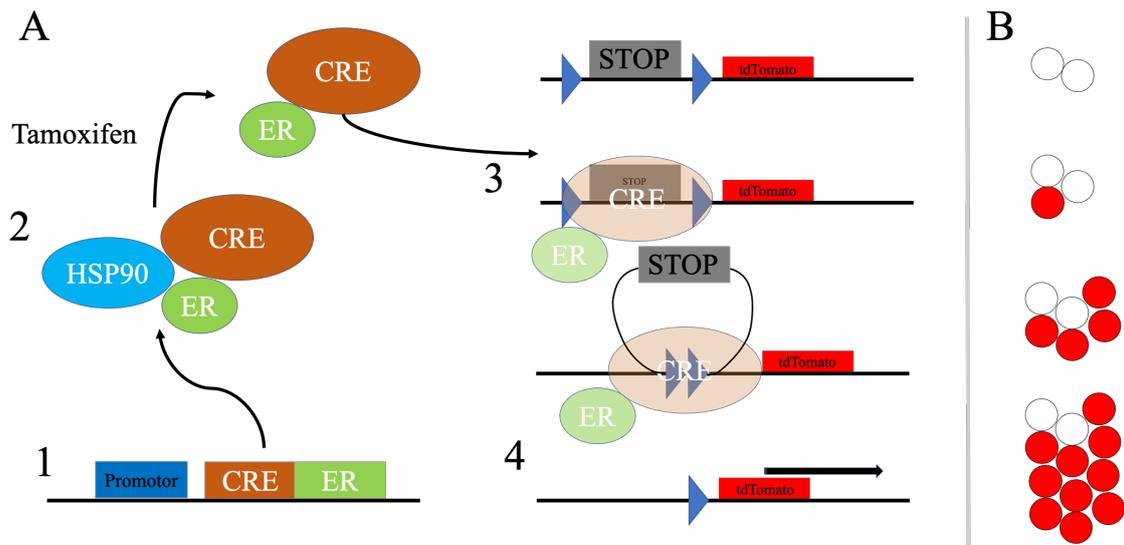


Abbildung 3: Cre-LoxP-System

(A) CreERT² steht unter Kontrolle eines Promotors (1), wird transkribiert und bindet an HSP90 (2). Unter Einfluss von Tamoxifen löst sich CreERT² von HSP90 ab. CreERT² erkennt LoxP-Stellen und schneidet Stop-Codon aus (3). Der Reporterfarbstoff tandem dimer Tomato (tdTomato) wird daraufhin exprimiert (4). (B) TdTomato wird in Zellen exprimiert, bei denen zuvor das Stop-Codon durch die Cre ausgeschnitten wurde. Alle Tochterzelle exprimieren ebenfalls tdTomato. (Eigene Darstellung)

1.5.4 Fibrosemodell

Zur Untersuchung des identifizierten Sternzellsubtyps (vgl. Schwiering, 2019) unter fibrotischen Bedingungen ist ein geeignetes Fibrosemodell notwendig. Eine fibrotische Reaktion kann beispielsweise durch Gallengangligatur (Kountouras et al., 1984), genetische Veränderungen (z.B. Mdr2-Knockout-Maus) (Mauad et al., 1994) und Toxine wie Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) (Slater et al., 1985) oder Thioacetamid (Müller et al., 1988) hervorgerufen werden. In dieser Arbeit wurde ein CCl₄-Fibrosemodell verwendet, da es sich um ein sehr gut etabliertes Modell handelt, das relativ leicht handhabbar ist und dabei geringe Kosten verursacht (Bao et al., 2021). CCl₄ wird durch Monooxygenasen der Cytochrom-Familie zum CCl₃-Radikal umgesetzt und reagiert mit diversen zellulären Molekülen. Die Reaktionen mit DNA, Lipiden und Proteinen kann eine Steatose, reduzierte Proteinsekretion, einen Funktionsverlust der Mitochondrien oder Membranschädigungen zur Folge haben. Dies wiederum führt zu einer fortschreitenden Schädigung der Leber, beginnend mit einer Entzündung, die chronisch zu einer Fibrose, später zu einer Zirrhose manifestiert und kann schlussendlich in einem hepatozelluläres Karzinom münden (Slater et al., 1985; Scholten et al., 2015).

Die Stärke der Fibrose ist abhängig von Parametern wie dem Genotyp der Maus, Dauer und Häufigkeit der CCl₄ Applikation, Applikationsform, etc. (Scholten et al., 2015).

1.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung von immunhistochemisch angefärbten Gewebeschnitten wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Die Identifizierung und Lokalisierung von Proteinen/Molekülen wird mittels Antigen-Antikörper-Reaktion ermöglicht. Ein spezifischer Antikörper bindet an den als Antigen fungierenden nachzuweisenden Stoff. Der an das Antigen gebundene Antikörper kann entweder direkt mit einem Fluorophor konjugiert sein (direkte Methode) oder aber ohne gekoppelten Fluorophoren vorliegen. Ist dies der Fall muss in der sogenannten indirekten Methode mit einem zweiten, sekundären Antikörper der nicht fluoreszierende primäre Antikörper markiert werden, der dann den fluoreszierenden Farbstoff zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop enthält (Buchwalow und Böcker, 2010).

Durch chemische Synthese von organischen Verbindungen mit einer größeren Zahl an konjugierten Doppelbindungen (welche auf chemisch/physikalischer Ebene für die fluoreszenten Eigenschaften verantwortlich sind) konnten weit auseinanderliegende Absorptions- und Emissionsspektren erreicht werden, wodurch eindeutige Signale bei Doppelfärbungen möglich sind (vgl. Sekundär-Antikörper Alexa Fluor) (Lichtman und Conchello, 2005).

Der Farbstoff tdTomato ist ein stark rot fluoreszierendes Reporterprotein, das häufig im Lineage Tracing Anwendung findet (siehe 1.5.2 und 1.5.3) (Kretzschmar und Watt, 2012). Zur Anfärbung der DNA innerhalb der Gewebeschnitte wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) genutzt. DAPI reagiert nicht über eine Antigen-Antikörper-Reaktion, sondern bindet verstärkt an das Basenpaar Adenin und Thymin der DNA (Kapuściński und Szer, 1979).

1.7 Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie unterscheidet sich in ihrer Funktionsweise grundsätzlich von der konventionellen Mikroskopie und bietet diverse Vorteile. Das konfokale Mikroskop bildet das darzustellende Objekt nicht wie ein konventionelles Mikroskop komplett als Bild ab, sondern bestrahlt das Objekt punktwise mit Laserlicht. Ein komplettes Bild wie beim konventionellen Mikroskop erhält man dann, wenn das Objekt relativ zum

feststehenden Laser entlang der x- und y-Achse bewegt wird und die Einzelpunkte dann zu einem größeren Bild zusammengerechnet werden. Der besondere Aufbau des konfokalen Mikroskops ermöglicht es, Gewebeschnitte mit einer gewissen Schichtstärke und im Gegensatz zum konventionellen Mikroskop in jeder Schicht scharf und kontrastreich darzustellen (Inoué, 2006). Bei Mehrfachfärbungen kommt es beim konventionellen Mikroskop im Gegensatz zur Konfokalmikroskopie zu unscharfen Verwaschungen. Aufgrund der Möglichkeit jede Schicht eines Präparates scharf darzustellen, eröffnet ein optisches Durchfahren des Gewebes entlang der z-Achse die Möglichkeit (nach Zusammenrechnen der verschiedenen Ebenen), dreidimensionale Modelle oder scharfe, unverwaschene Summationsaufnahmen zu erzeugen (Wilhelm et al., 2001).

1.8 Zielsetzungen der Dissertation

Daten verschiedener Forschungsgruppen zeigen, dass hepatische Sternzellen keine homogene Zellpopulation darstellen und beschreiben unterschiedliche Sternzellsubtypen im Lebergewebe (Dobie et al., 2019; Rosenthal et al., 2021; Wang et al., 2021; Payen et al., 2021). Schwiering (2019) identifizierte mit Hilfe einer unter der Kontrolle des SMMHC-Promotors stehenden, induzierbaren Cre-Mauslinie bisher unbekannte, im Leberlappen ungleichmäßig verteilte SMMHC/tdTomato exprimierende Sternzellen (im Folgenden auch SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen). Daraus ergab sich die Frage nach:

- Verteilung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen im Leberläppchen unter physiologischen und fibrotischen Bedingungen

Schwiering (2019) postulierte die Zonierung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen, präsentierte jedoch keine eindeutigen Belege. Aus diesem Grund waren folgende Punkte Untersuchungsgegenstände dieser Arbeit:

- Nachweis der Zonierung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen
- Nachweis von Zellmauserung (kontinuierlicher Ersatz durch Proliferation) der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen unter Beibehaltung der Zonierung

- Identifizierung einer eventuellen Progenitorzellnische der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen

Sternzellen spielen in der fibrotischen Reaktion eine wichtige Rolle und differenzieren im aktivierten Zustand zu Myofibroblasten (Ballardini et al., 1988; Geerts et al., 1989; Friedman, 2008). Schwiering (2019) formulierte die Theorie, Zone 1-HSC könnten möglicherweise Sternzellen ersetzen, die aufgrund vorangegangener Verletzungen zu Myofibroblasten differenziert sind, und dadurch die Funktionalität der Leber aufrechterhalten. Diese Theorie sollte in dieser Arbeit untersucht werden:

- Differenzierung von SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen zu Myofibroblasten

In der Literatur wird die Interaktion von Sternzellen und Endothelzellen bei der fibrotischen Kapillarisierung diskutiert (DeLeve, 2015). Die Funktion der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen ist bislang unbekannt, weshalb folgender Aspekt untersucht wurde:

- Rolle der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen in der Kapillarisierung

Material und Methoden

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tierversuche an genetisch veränderten Mäusen durchgeführt. Die Arbeit mit den Mäusen im Rahmen des Projekts lief unter der Antragsnummer AZ-55.2.2-2532-2-502 und wurde durch die Regierung von Unterfranken genehmigt. Bei den in der Arbeit verwendeten Tieren handelt es sich um von Herrn Professor Dr. Andreas Friebe bereitgestellte Mäuse der Linie Lrat-Cre und SMMHC-CreER^{T2}.

2.2 Material

2.2.1 Arbeitsgeräte

2.2.1.1 Hardware

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller
Kryostat	CM 3050s	Leica Microsystems GmbH
Lichtmikroskop	020-435.028	Ernst Leitz Wetzlar GmbH
Konfokales Mikroskop	TCS SP5/SP8	Leica Microsystems GmbH
Fluoreszenzmikroskop	DM6 FS	Leica Microsystems GmbH
Beleuchtungssystem Fluoreszenzmikroskop	pE-4000	CoolLED Ltd.
Kontrollpanel Fluoreszenzmikroskop	STP8000	Leica Microsystems GmbH
Kamera Fluoreszenzmikroskop	sCMOS pco.edge	Excelitas PCO GmbH
Kontrollbox Fluoreszenzmikroskop	CTR6	Leica Microsystems GmbH
Vortex	Vortex-Genie 2	Thermo Fisher Scientific GmbH
Ph-Meter	G1500	GHM Messtechnik GmbH
Elektrode Ph-Meter	GE 114-WD	GHM Messtechnik GmbH
Färbekästen	ROTILABO ®	Simport Scientific Inc.

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller
Feinwaage	R160P	Sartorius Corporate Administration GmbH
Magnetrührer	RH basic 2	IKA® GmbH & Co. KG
Pipetten	Transferpette™ S 200 µl	Brand GmbH & Co. KG
	Research® plus 1000 µl	Eppendorf SE
	Research® plus 2,5 µl	Eppendorf SE

2.2.1.2 Software

Software	Entwickler
Leica Application Suite X (LAS X)	Leica Microsystems GmbH
VisiView	VisitronSystems GmbH
Microsoft Excel 2022	Microsoft Corporation
Microsoft Powerpoint 2022	Microsoft Corporation

2.2.2 Verbrauchsmaterial

Beschreibung	Bezeichnung	Hersteller
Objektträger	Superfrost™ Plus Control Slides	Epredia Europe GmbH
Kryoeinbettformen	Tissue Tek® Cryomold®; Größe: 15 mm *15 mm *5 mm und 10 mm *10 mm *5 mm	Sakura Finetek GmbH
Kältespray	Kälte 75	CRC Industries Europe BVBA
Einbettmedium für Kryoleberschnitte	Tissue Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek GmbH
Schnittklingen für Kryostaten	Leica DB80 LS	Leica Microsystems GmbH
0,2 µm PES-Membran Filter für PBS	Filtropur S 0,2	Sarstedt AG & Co. KG
Immersionsöl Konfokales Mikroskop	ImmersoI™	Carl Zeiss AG

Beschreibung	Bezeichnung	Hersteller
Stift für hydrophobe Barriere	ImmEdge® Pen	Vector Laboratories

Schraubröhren (50ml, 15ml), Reagiergefäße (2 ml, 1,5 ml) und Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 10 µl) wurden von der Firma Sarstedt AG & Co.KG bezogen. Spritzen (BD Plastipak™) verschiedener Volumina und Kanülen 27G x ¾“ wurden von der Firma Becton Dickinson GmbH bezogen.

2.2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Isofluran	CP-Pharma mbH
Natriumhydroxid (NaOH)	Thermo Fisher Scientific GmbH
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tamoxifen	Cayman Chemical Inc.
Miglyol ® 812	Apotheke des Uniklinikums Würzburg
Tetrachlorkohlenstoff (CCl ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Normal Donkey Serum (NDS)	Biowest Inc.
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure	Chemsolute – Th. Geyer GmbH & Co. KG

2.2.4 Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10x

Salz	Menge
KCl	2,0 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
NaCl	80,0 g

Die Salze wurden mit Hilfe einer Feinwaage abgewogen und in ca. 900 ml destilliertem Wasser unter ständigem Rühren gelöst. Das restliche Volumen wurde auf 1 Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt und der pH auf 7,4 mit Hilfe von Natronlauge eingestellt.

Paraformaldehyd (PFA) 4%

Chemikalie	Menge	Hersteller
Paraformaldehyd	40 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

900ml PBS 1x wurde im Laborabzug auf eine Temperatur von 60°C erhitzt und darin unter ständigem Rühren 40g Paraformaldehyd gelöst. Anschließend wurde auf 1 Liter mit PBS 1x aufgefüllt und der pH auf 6,9 mit Hilfe von Natronlauge eingestellt.

Mowiol

Chemikalie	Menge	Hersteller
DABCO	2,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycerol	30,0 g	Merck KGaA
H ₂ O	30 ml	-
Mowiol	12,0 g	Carl Roth GmbH & Co.KG
0,2 M Tris pH 8,5	60 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.2.5 Antikörper - Immunhistochemie

2.2.5.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Wirt	Identifizierung
Anti-alpha smooth muscle actin (<i>Anti-αSMA</i>)	1:400	Hase	Abcam Cat# ab32575, RRID: AB_722538
Anti-Cytokeratin 19 (<i>Anti-CK19</i>)	1:300	Hase	Abcam Cat# ab133496, RRID:AB_11155282
Anti-Platelet-derived growth factor receptor beta (<i>Anti-PDGFRβ</i>)	1:200	Ziege	R and D Systems Cat# AF1042, RRID:AB_2162633

Material und Methoden

Anti-Nerve growth factor receptor (<i>Anti-NGFR</i>)	1:200	Ziege	R and D Systems Cat# AF1157, RRID: AB_2298561
Anti-smooth muscle myosin heavy chain (<i>Anti-SMMHC</i>)	1:200	Hase	Abcam Cat# ab53219, RRID: AB_2147146
Anti-Laminin	1:200	Hase	Acris Antibodies Cat# BP8037, RRID: AB_1004495
Anti-CD34	1:50	Hase	Abcam Cat# ab81289, RRID: AB_1640331
Anti-Glutamin-Synthetase (<i>Anti-GS</i>)	1:200	Hase	Abcam Cat# ab16802, RRID: AB_302521
Anti-Desmin	1:200	Ziege	Antibodies-Online Cat# ABIN33486, RRID: AB_10779881

2.2.5.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Identifizierung
Invitrogen, Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-31573, RRID: AB_2536183
Invitrogen, Donkey anti-Goat IgG (H+L) Highly Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A32849TR, RRID: AB_2866498
Invitrogen, Alexa Fluor™ 488 Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-21206, RRID: AB_2535792

2.2.6 Fluoreszenzfarbstoff – DAPI

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	1:1000	AppliChem GmbH

2.3 Methoden

2.3.1 Zucht und Genotypisierung

Die gewünschten Mauslinien mit entsprechendem Genotyp wurden durch die Verpaarung zweier heterozygoter Weibchen im Alter von 8-45 Wochen mit einem heterozygoten Männchen im Alter von 7-52 Wochen generiert. Im Alter von 18-21 Tagen wurden die Nachkommen von der Mutter abgesetzt und genotypisiert.

In dieser Arbeit wurden Experimente mit einer unter dem SMMHC-Promotor stehenden induzierbaren CreER^{T2}-Mauslinie mit tdTomato als Reporterfarbstoff durchgeführt (SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato Mauslinie). Der verwendete Ai14 Stamm (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J; Jackson #007908) beherbergt das tdTomato-Gen im Gt(ROSA)26Sor Locus. Vor dem tdTomato-Gen befindet sich ein mit LoxP-Stellen markiertes Stopcodon. Durch Kreuzung des Ai14 Stamms mit einer Mauslinie, welche die induzierbare Cre-Rekombinase CreER^{T2} unter dem SMMHC-Promotor exprimiert, wurde eine induzierbare SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato Reportermauslinie generiert. Durch Kreuzung des Ai14 Stamms mit einer Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase konstitutiv unter dem Lrat-Promotor exprimiert, wurde wiederum die nicht-induzierbare Reportermauslinie Lrat-Cre tdTomato erzeugt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Generierte tdTomato-Reportermäuse

Mauslinie mit tdTomato-Gen wurde mit Mauslinie, die (1) eine durch Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des SMMHC-Promotors exprimiert, gekreuzt. (2) konstitutiv eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Lrat-Promotors exprimiert, gekreuzt.

	Reporter Farbstoff	Cre-Linie	Spezifität
1	tdTomato	SMMHC-CreER ^{T2}	Glatte Muskulatur/Perizyten (Deaton et al., 2023)/HSC (Schwiering, 2019)
2	tdTomato	Lrat-Cre	HSC/Glatte Muskelzellen (Mederacke et al., 2013)

Die Genotypisierung erfolgte nach Gewebegewinnung durch Ohrstanzen und Amplifikation der aus dem Gewebe gewonnenen DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Gelelektrophorese. Aufgrund der Lokalisation des SMMHC-Cre Gens auf dem Y-Chromosom wurden nur männliche SMMHC-CreER^{T2} Versuchstiere für die Experimente herangezogen.

2.3.2 Haltung

Die Tierhaltung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte artgerecht und entsprechend den geltenden gesetzlichen Bestimmungen. Zur Haltung wurden zwei unterschiedliche Käfigmodelle vom Makrolon-Typ II und Typ III genutzt, deren Boden mit Tiereinstreu in Form von Holzspänen bedeckt war. Den Tieren stand dauerhaft reichlich Wasser und Nahrung (Nagerstandarddiät (Altromin 1320)) zur Verfügung, die regelmäßig gewechselt beziehungsweise aufgefüllt wurden. Als Spielzeug lagen ein Eierkarton, eine Kartonrolle sowie Zellulosepapier in jedem Käfig vor.

2.3.3 Tamoxifen-Injektion

Tamoxifen vermittelt (siehe 1.5.2) das Lösen der Cre-Rekombinase vom HSP90, wodurch die Cre-Rekombinase das vor dem tdTomato-Gen befindliche Stopcodon ausschneiden kann (Scherrer et al., 1993; Verrou et al., 1999).

Dafür wurde den Mäusen im Alter von sechs bis acht Wochen Tamoxifen (1 mg (gelöst in Miglyol ® 812)) an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal verabreicht. Die Identifikation von Zellen mit einem aktiven SMMHC-Promotor zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Injektion ist somit möglich.

2.3.4 CCl₄-Injektion

Da in dieser Arbeit nicht nur das Verhalten und die Funktion der Zone 1-HSC unter physiologischen, sondern auch unter pathophysiologischen Bedingungen untersucht werden sollte, wurde zur Induktion der Fibrose CCl₄ herangezogen. Die intraperitoneale Applikation von CCl₄ dreimal pro Woche führt nach vier Wochen zu einer ausgeprägten Fibrose (Scholten et al., 2015). Die zehntägige Gabe führt zu einer initialen fibrotischen Reaktion. In Rahmen dieser Arbeit erfolgte dreimal in der Woche eine intraperitoneale Injektion von CCl₄ mit einer Dosis von 1 µl pro g Körpergewicht für 10 Tage bzw. 4 Wochen.

2.3.5 Euthanasierung und Präparatfixierung

Die Versuchstiere wurden zunächst entsprechend der geltenden Regularien aus dem Tierstall in das Labor überführt. Nach Narkotisierung mittels Isofluran wurde die Maus durch zervikale Dislokation euthanasiert. Nach Erfassen des Mausgewichts erfolgte die Entnahme der Leber. Hierfür wurde zunächst der Bauchraum zugänglich gemacht, die Vena cava inferior identifiziert und mittels Schnitts eröffnet. Die Portalvene wurde aufgesucht und 3-5 ml filtrierte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) in die Portalvene injiziert, um die Gefäßstrukturen und das angrenzende Lebergewebe auszuwaschen. Nach Sichtkontrolle über erfolgreiche Spülung der Leber anhand der eröffneten Vena cava inferior erfolgte der Ersatz der PBS durch 3-5 ml 2%iges filtriertes Paraformaldehyd (PFA). Das Organ wurde nun entnommen und anschließend die Gallenblase freipräpariert und entfernt. Nach Waschen der Leberoberfläche in filtrierter PBS erfolgte das Wiegen der Leber und die Fixierung in 2%igem, filtriertem PFA in vorbereiteten Schraubröhren. Das Organ wurde bis zur Weiterverarbeitung in 2%igem, filtriertem PFA im Kühlschrank für 2-4 Stunden gelagert. Daraufhin erfolgte ein 20%iges Saccharosebad über Nacht. Für die Experimente wurde der laterale Anteil des linken Leberlappens genutzt (Lobus hepatis sinister lateralis). Das Präparat konnte nun mit Tissue Tek® O.C.T™ Compound in Kryoeinbettenschälchen eingebettet und nach durchfrieren im Kryostaten weiterverarbeitet oder zur späteren Verwendung im Gefrierschrank gelagert werden.

2.3.6 Anfertigung von Gewebsschnitten am Kryostaten

Der Kryostat wurde arbeitstäglich auf eine Arbeitstemperatur von -22°C (Kammertemperatur) und -13°C (Objekttemperatur) eingestellt. Nach Auffrieren des eingebetteten Gewebes auf der Objektplatte wurden 25-30 μm dicke Schnitte des Lebergewebes angefertigt. Zwei Gewebeschnitte wurden auf einen Objektträger übertragen und stichprobenartig die Schnittqualität wahlweise unter dem Lichtmikroskop oder Fluoreszenzmikroskop überprüft. Darauffolgend wurden die Objektträger für einige Minuten bei Kammertemperatur gelagert. Anschließend wurden die Schnitte in Objektträgerboxen einsortiert, auf Eis in Kühlboxen zum Gefrierschrank transferiert und dort bis zur immunhistochemischen Färbung bei -20°C aufbewahrt.

2.3.7 Immunhistochemisches Färbungsprotokoll

Die nach dem in 2.3.6 beschriebenen Vorgehen gewonnenen Gewebeschnitte wurden nach mindestens eintägiger Lagerung in der Tiefkühltruhe bei -20°C für sieben Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Daraufhin erfolgte die Fixierung der ausgewählten Gewebe mittels 2%igen, gefiltertem PFA für sieben Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit gefiltertem PBS erfolgte das Umkreisen der Schnitte möglichst nah am Gewebeschnitt mittels Barrierestift, um eine hydrophobe Barriere zu erzeugen und ein Verlaufen der aufgetragenen Lösungen zu verhindern. Danach wurde der Blockpuffer (10% Normal Donkey Serum in 0,3% Triton X-100 (filtriert)) innerhalb der hydrophoben Barriere auf das Gewebe aufgebracht (pro Gewebeschnitt ca. 150 μl), mit dem Ziel, unspezifische Bindungsstellen im Gewebe zu blocken. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Objektträger erneut mit gefiltertem PBS gewaschen. Nach Kontrolle der hydrophoben Barriere auf Unterbrechungen und etwaigem Nachziehen dieser mit dem Barrierestift wurde der entsprechende primäre Antikörper aufgebracht (pro Gewebeschnitt ca. 150 μl). Die Primär-Antikörper wurden in der Tabelle 2.2.5.1 gezeigten Verdünnung mit dem gefilterten Blockpuffer verdünnt. Die mit Primär-Antikörper inkubierten Gewebe wurden in einer lichtundurchlässigen, mit Wasserdampf gesättigten Box platziert und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am Folgetag wurden die Gewebe dreimalig mit gefiltertem PBS gewaschen, bevor der entsprechende, wirtskompatible Sekundär-Antikörper in der Verdünnung 1:500 zusammen mit DAPI in der Verdünnung 1:1000 (verdünnt in filtriertem Blockpuffer) für 60 Minuten aufgebracht wurde. Die Inkubation des Sekundär-Antikörpers erfolgte zum Schutz der Fluorophore in einer lichtundurchlässigen Objektträgerbox bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit gefiltertem PBS wurden die Präparate mit Mowiol eingedeckelt und die Deckgläser an den Rändern mit zwei kleinen Tropfen Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Bis zur Untersuchung unter dem konfokalen Mikroskop wurden die Objektträger in lichtundurchlässigen Objektträgerboxen im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.3.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Charakterisierung der Zone 1-HSC ist eine geeignete Methode notwendig, welche die Lokalisation der Zellen im Gewebe und gleichzeitig Expression von

Proteinen/Molekülen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Bedingungen darstellen kann. Geeignet hierfür ist die Immunfluoreszenzmikroskopie. Genutzt wurde der Modelltyp TCS SP5/SP8 der Firma Leica Microsystems GmbH.

2.4 Statistik

Da die Charakterisierung eines Sternzellensubtyps erfolgte und grundlegende Fragen zur Funktion in dieser Orientierungsstudie beantwortet werden sollten, fand vor allem eine deskriptive Auswertung der gewonnenen Daten statt. Die dargestellten Daten sind repräsentativ. Für jede Versuchsreihe wurden mindestens $N=3$ Versuchstiere untersucht.

Ergebnisse

3.1 Sternzellmarker

Zu Beginn der Untersuchungen sollten Sternzellen im Lebergewebe anhand gängiger immunhistochemischer HSC-Marker visualisiert werden. Mederacke et al. (2013) beschrieben, dass mit Hilfe einer Reportermauslinie, in welcher die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Lrat-Promotors steht, 99% der hepatischen Sternzellen markiert werden können. Da Sternzellen PDGFR β exprimieren (Heldin et al., 1991), wurden Gewebeschnitte von Lrat-Reportermausen mit primären Antikörper gegen PDGFR β inkubiert (Abbildung 4).

Die Kolo-kalisation (gelb) von PDGFR β - (grün) und tdTomato-Signal (rot) ist zu erkennen. Eine gleichmäßige Verteilung der HSC über das gesamte Leberläppchen ist ersichtlich. Die Sternzellen zeigen morphologisch feine Ausläufer. Neben einzelnen Sternzellen sind im Schnittbild auch Gefäßstrukturen zu erkennen, die ebenfalls durch tdTomato und den PDGFR β -Antikörper markiert wurden. Eine Unterscheidung der Gefäßstrukturen von Sternzellen ist jedoch aufgrund der optischen Darstellung als lumenartige Struktur und ihrer Lokalisation gut möglich (markiert mit „G“), weshalb PDGFR β in weiteren Experimenten als Marker für HSC verwendet wurde.

3.2 Verteilung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen im Leberläppchen

Im Folgenden ist die Verteilung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen im Leberläppchen gezeigt. Hierfür wurden SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato Reportermause 30 Tage nach Tamoxifengabe euthanasiert, Gewebeschnitte hergestellt und anschließend mit Antikörper gegen PDGFR β inkubiert (Abbildung 5).

Es lässt sich feststellen, dass SMMHC/tdTomato⁺ Zellen PDGFR β exprimieren (weiße Pfeile). Durch die typische Morphologie und Lokalisation im Gewebe, sind SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen von glatter Muskulatur der Gefäße gut abzugrenzen.

Erkennbar ist außerdem, dass ein Teil der PDGFR β ⁺ Sternzellen kein tdTomato exprimiert (blaue Pfeile). Zudem ist ersichtlich, dass SMMHC/tdTomato⁺ HSC scheinbar zoniert und nicht wie PDGFR β ⁺ Sternzellen gleichmäßig über das gesamte Leberläppchen verteilt sind (vgl. auch Abbildung 4).

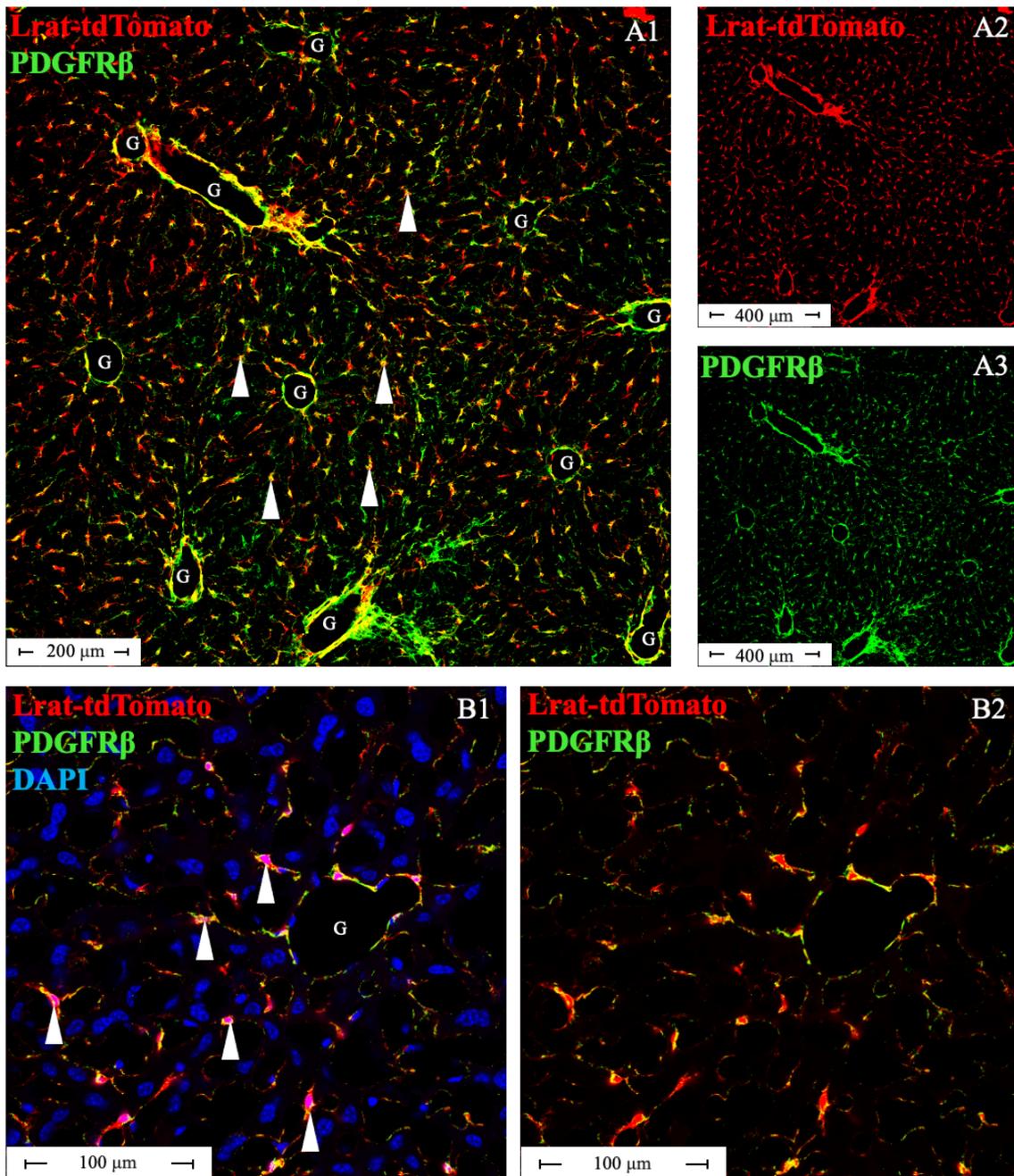


Abbildung 4: Lrat-Cre/tdTomato-Reportermaus und Sternzellmarker PDGFR β

Gewebeschnitte mit Tamoxifen behandelte Lrat-Cre/tdTomato-Reportermause wurden hergestellt und mit Antikörper gegen PDGFR β (grün) und DAPI (blau) inkubiert. tdTomato (rot) wurde nach Tamoxifeninjektion exprimiert. Im Überlagerungsbild ist zu erkennen, dass PDGFR β ⁺ Zellen tdTomato exprimieren (Kolokalisation = gelb) (weiße Pfeile). Gefäße sind mit „G“ markiert. A zeigt durch tdTomato und Anti-PDGFR β markierte Sternzellen in niedriger Vergrößerung, B in hoher Vergrößerung.

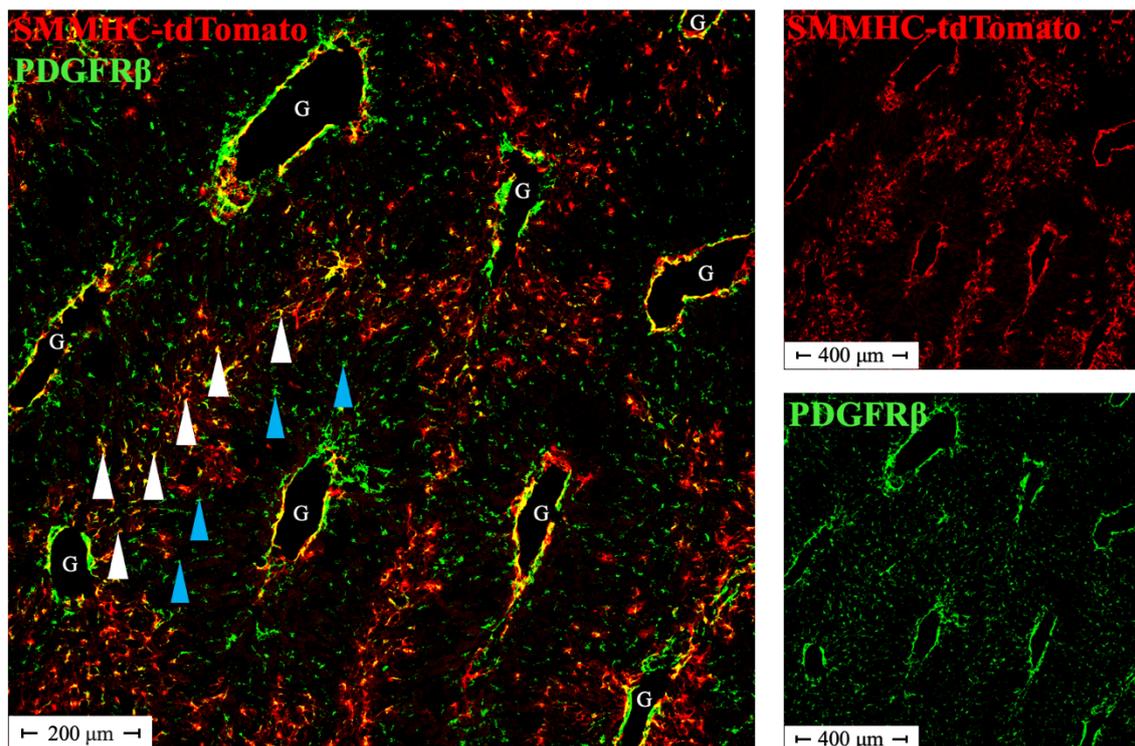


Abbildung 5: SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen mit möglicher Zonierung

Gewebeschnitte mit Tamoxifen behandelter SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermause wurden hergestellt. tdTomato (rot) wurde nach Tamoxifeninjektion exprimiert. Die Gewebeschnitte wurden außerdem mit Antikörper gegen PDGFRβ (grün) angefärbt. Im Überlagerungsbild sind grüne (=HSC) (blaue Pfeile) und gelb/rote Signale (Kokoloration des tdTomato-Signal der SMMHC/tdTomato⁺ HSC mit Signalen des PDGFRβ-Antikörpers) zu erkennen (weiße Pfeile). SMMHC/tdTomato⁺ HSC scheinen zoniert. Gefäße sind mit „G“ markiert.

Da einige PDGFRβ⁺ Sternzellen kein tdTomato exprimieren, existierten im Lebergewebe anscheinend Sternzellen, deren SMMHC-Promotor zum Zeitpunkt der Tamoxifengabe aktiv war (=SMMHC/tdTomato⁺/PDGFRβ⁺ HSC), sowie Sternzellen, deren SMMHC-Promotor zum Zeitpunkt der Tamoxifeninjektion nicht aktiv war (=SMMHC/tdTomato⁻/PDGFRβ⁺ HSC). Möglich ist, dass SMMHC/tdTomato⁺ HSC einen HSC-Subtyp der PDGFRβ⁺ Sternzellen darstellen und anhand eines aktiven SMMHC-Promotors von anderen Sternzellen mit inaktivem SMMHC-Promotor unterschieden werden können. Wäre dies der Fall, müssten auch bei einem größeren zeitlichen Abstand zwischen Tamoxifengabe und Euthanasierung (hier nur 30 Tage) Sternzellen nachweisbar sein, die ausschließlich PDGFRβ exprimieren.

Offen bleibt außerdem, ob die beobachtete Zonierung der SMMHC/tdTomato⁺ HSC lediglich ein Ergebnis des gewählten Euthanasierungszeitpunktes ist und daher nur eine Momentaufnahme darstellt, oder die Zonierung auch über eine längere Beobachtungsspanne hinweg erhalten bleibt.

3.3 Lineage Tracing der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen

Mit einem Lineage Tracing Experiment sollte deshalb die Zonierung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen, die bereits von Schwiering (2019) postuliert wurde, untersucht werden. Für die Versuchsreihe wurde SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato Reporter-mäusen 6-8 Wochen nach Geburt Tamoxifen verabreicht und die Tiere anschließend an Tag 0 (d0), Tag 3 (d3), Tag 10 (d10), Tag 20 (d20), Tag 30 (d30), Tag 180 (d180) und Tag 360 (d360) nach Tamoxifengabe euthanasiert. Die gewonnenen Gewebeschnitte wurden zunächst nicht mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert und lediglich die Signale des Farbstoffs tdTomato (rot) ausgewertet, der von SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen in entsprechenden Reporter-mäusen exprimiert wird (Abbildung 6).

Eine Proliferation von SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen ist über den Beobachtungszeitraum nachweisbar und deutet auf stattfindende Zellmauserung hin. Zudem sind SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen in den Gewebeschnitten der Reporter-mäuse zu allen ausgewählten Zeitpunkten zониert, sogar ein Jahr nach Tamoxifengabe ist die Zonierung der SMMHC/tdTomato Zellen belegbar.

Da die Zonierung auch ein Jahr nach Tamoxifengabe besteht, ist damit auch gezeigt, dass SMMHC/tdTomato⁺ HSC einen HSC-Subtyp der PDGFRβ⁺ Sternzellen darstellen, weil PDGFRβ⁺ Sternzellen über das gesamte Leberläppchen nachgewiesen werden können (vgl. Abbildung 5) und SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen zониert sind.

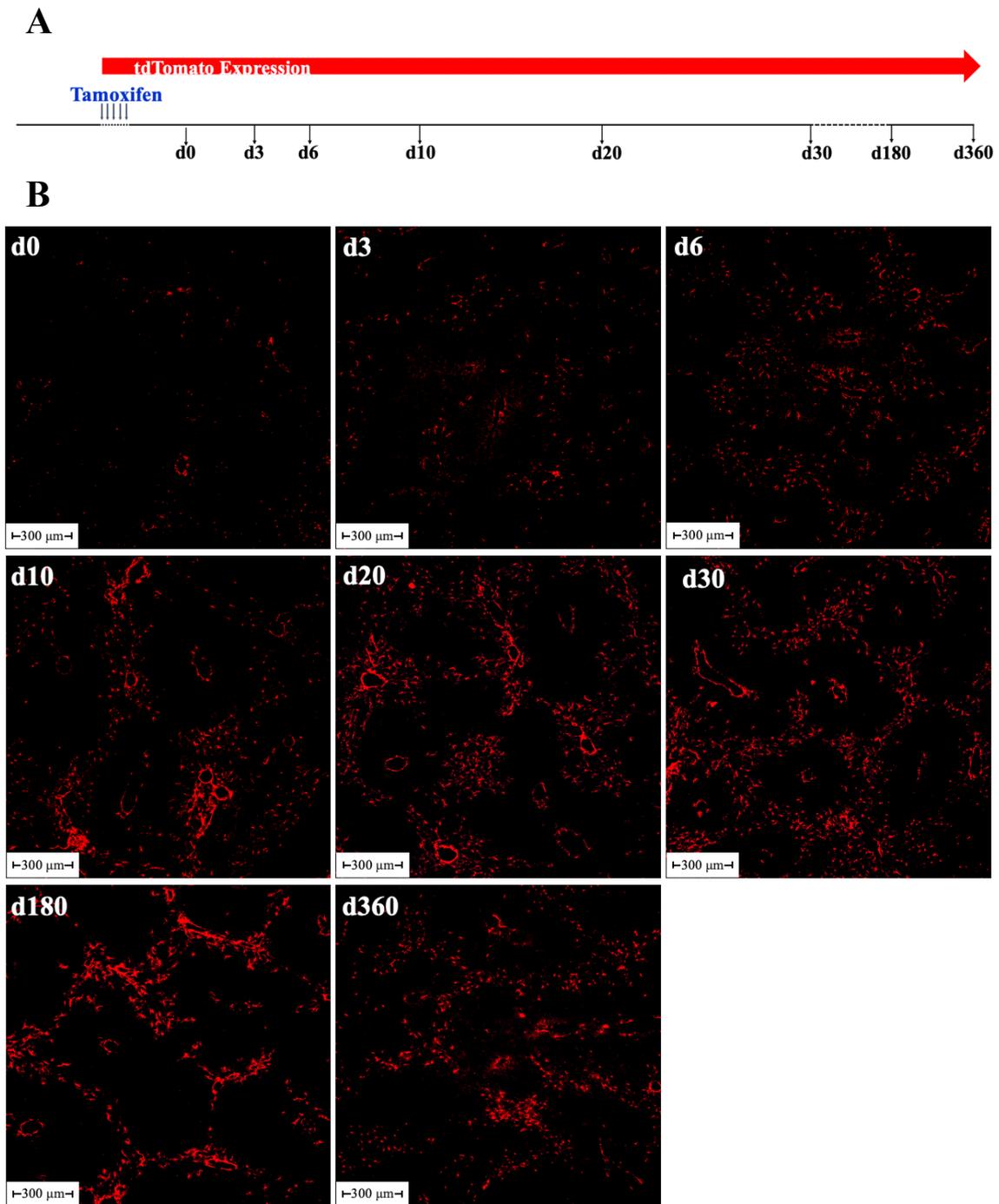


Abbildung 6: Lineage Tracing der SMMHC/ tdTomato⁺ Sternzellen

Gewebeschnitte mit Tamoxifen behandelter SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäuse wurden hergestellt. A: Die Mäuse wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0 (d0), Tag 3 (d3), Tag 6 (d10), Tag 10 (d10), Tag 20 (d20), Tag 30 (d30), Tag 180 (d180) und Tag 360 (d360)) nach Tamoxifengabe euthanasiert und die Gewebeschnitte auf die Verteilung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen untersucht. B: Es zeigt sich ein Turnover und eine Zonierung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen.

3.4 SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen mit Zonenmarkern

Schwiering (2019) lokalisierte SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen tentativ in Zone 1 des Leberazinus, was im Folgenden überprüft werden sollte. Zunächst wurde Glutaminsynthetase (GS) als Marker ausgewählt, welcher Hepatozyten um die Zentralvene markiert (Gebhardt und Mecke, 1983). Abbildung 7 lässt grün markierte Hepatozyten um die Zentralvene erkennen.

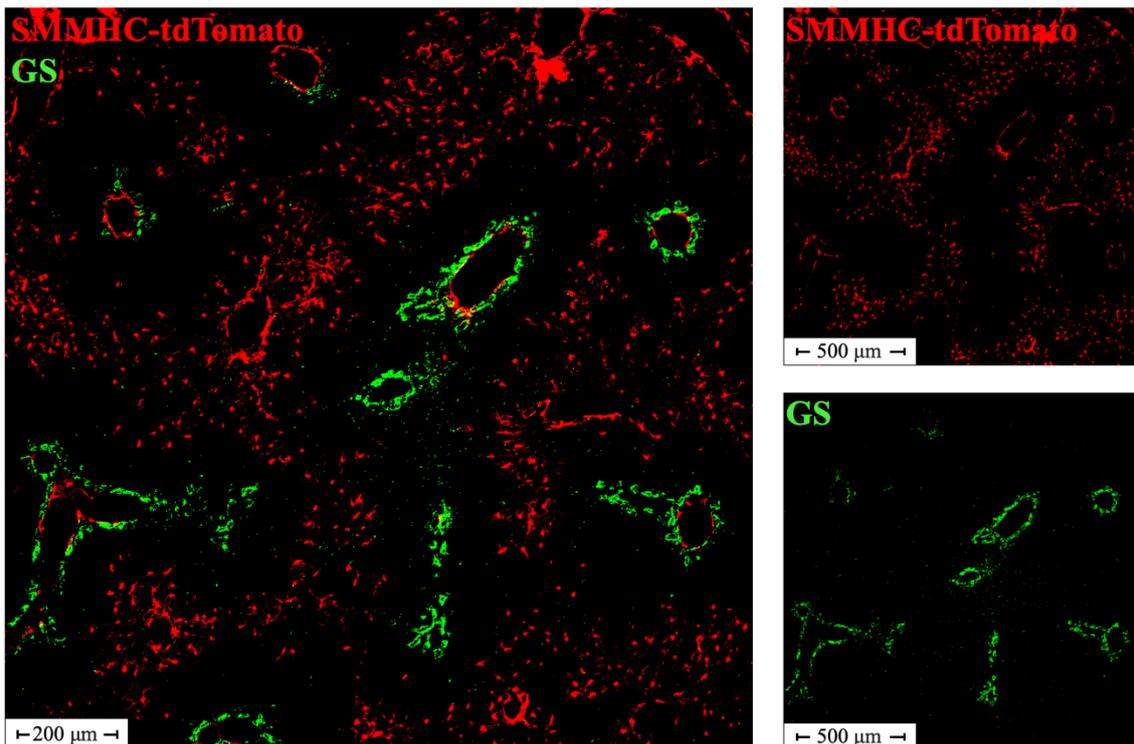


Abbildung 7: Entfernte Lage der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen von Zentralvenen

Gewebeschnitte mit Tamoxifen behandelter SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäuse wurden hergestellt und mit Antikörper gegen GS inkubiert. Hepatozyten um die Zentralvene sind durch die Antikörperfärbung gut zu erkennen. SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen befinden sich nicht nahe der Zentralvene.

Deutlich sichtbar ist, dass SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen nicht in den durch GS angefärbten Arealen nahe der Zentralvene nachweisbar sind. SMMHC/tdTomato⁺ Zellen, die im Bereich der durch GS angefärbten Bereiche identifiziert werden können, stellen glatte Muskelzellen der Zentralvenen dar.

Dobie et. al. (2019) beschrieben Portalvenen-assoziierte Sternzellen (PaHSC), die im Bereich der Portalvenen des Leberläppchens lokalisiert sind und durch Nerve growth

factor receptor (NGFR) Marker markiert werden können. Da auch SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen in der Portalvenen-nahen Zone 1 des Leberazinus vermutet wurden (vgl. Schwiering, 2019), sollte im Folgenden überprüft werden, ob es sich bei SMMHC/tdTomato⁺ HSC um PaHSC handelt. In einem Gewebeschnitt einer 30 Tage nach Tamoxifengabe euthanasierten Maus, sind durch NGFR-Antikörper markierte PaHSC erkennbar (Abbildung 8).

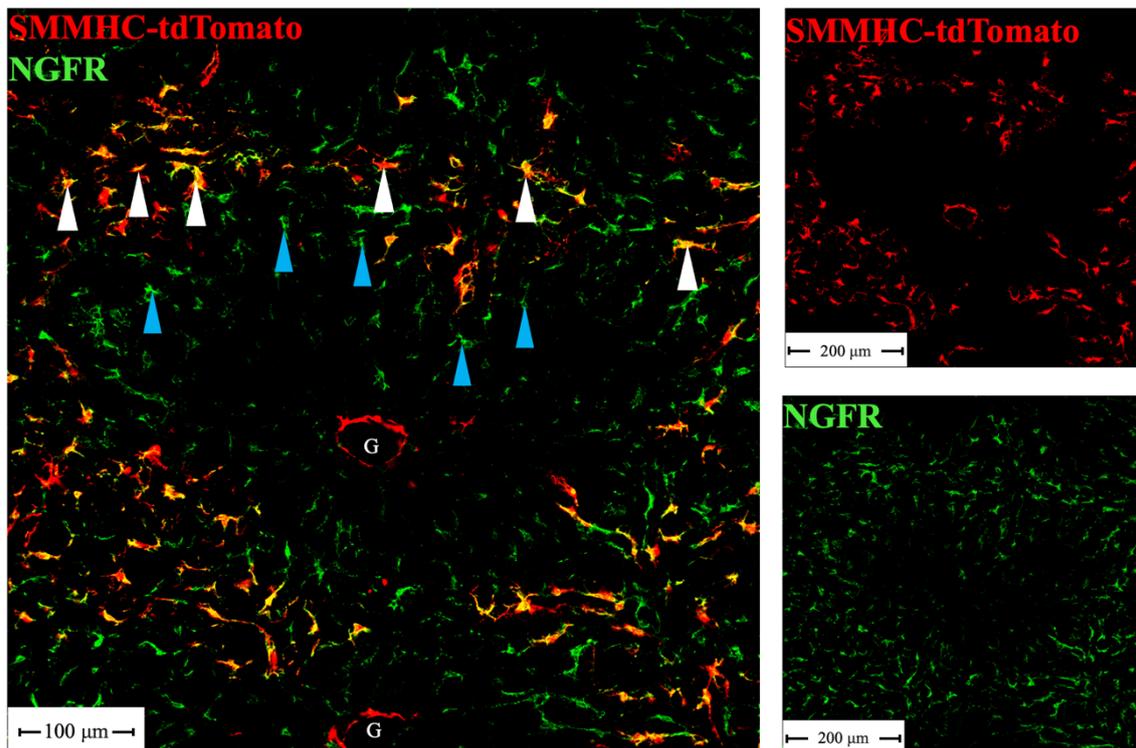


Abbildung 8: Zonierte Verteilung der SMMHC/tdTomato⁺ HSC

Gewebeschnitte mit Tamoxifen behandelte d30 SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermause wurden hergestellt und mit Antikörper gegen NGFR (grün) inkubiert. Das tdTomato-Signal kolokalisiert mit dem NGFR-Signal (weiße Pfeile; glatte Muskelzellen der Gefäße „G“ ausgenommen). Richtung Zentralvene (G) sind keine tdTomato-Signale (glatte Muskelzellen der Gefäße „G“ ausgenommen) zu erkennen, dahingegen jedoch NGFR⁺/tdTomato⁻ Sternzellen (blaue Pfeile).

tdTomato- und NGFR-Signale kolokalisieren (weiße Pfeile). Auffällig ist jedoch, dass mittelständige, NGFR⁺ Zellen kein SMMHC/tdTomato exprimieren (blaue Pfeile). Offen bleibt dadurch, ob es sich bei den SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen um eine Subpopulation der NGFR⁺ PaHSC handelt. Aus diesem Grund sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob, zu einem späteren Euthanasiezeitpunkt, die

exklusiv NGFR exprimierenden Zellen ein tdTomato Signal zeigen. Daher wurden Gewebeschnitte von SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäusen untersucht, die 180 Tage nach Tamoxifengabe euthanasierten wurden (Abbildung 9).

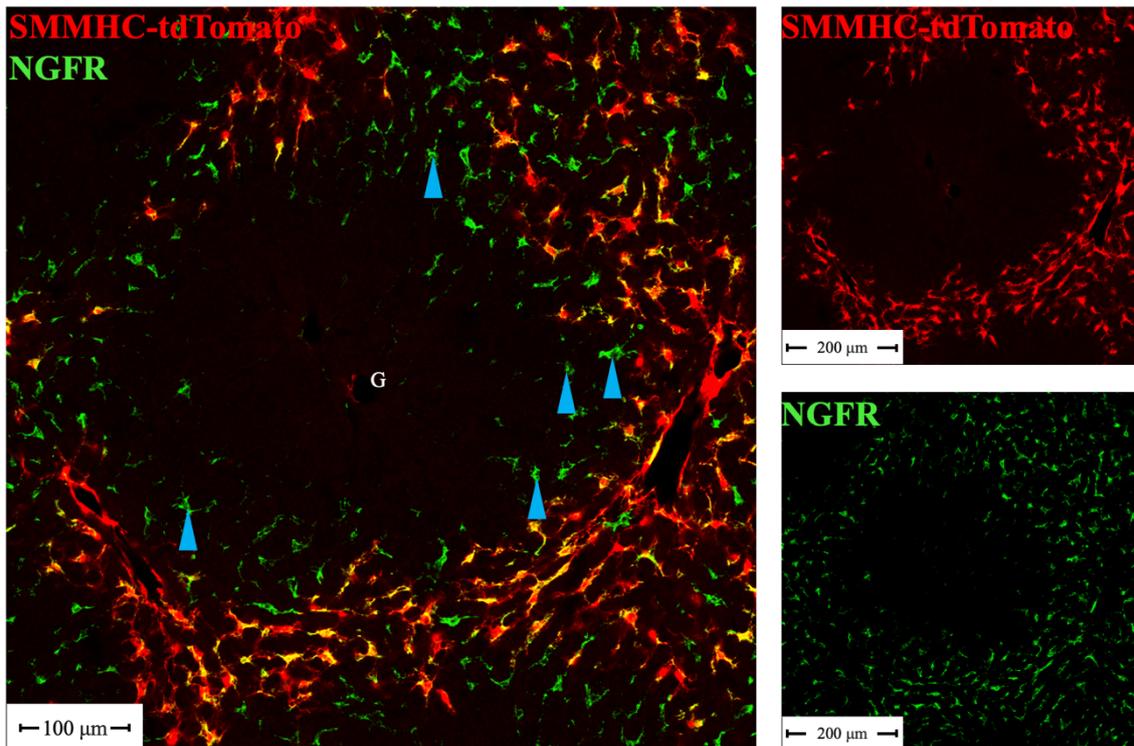


Abbildung 9: SMMHC/tdTomato⁺ HSC stellen Subpopulation der PaHSC dar

Gewebeschnitte mit Tamoxifen behandelte d180 SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäuse wurden hergestellt und mit Antikörper gegen NGFR (grün) inkubiert. NGFR⁺ Zellen Richtung Zentralvene (G) exprimieren kein tdTomato (blaue Pfeile). SMMHC/tdTomato⁺ HSC sind folglich Subpopulation der PaHSC.

Wie in Abbildung 8 sind auch hier durch NGFR-Antikörper markierte Portalvenen-assoziierte HSC identifizierbar (vgl. Dobie et al. (2019)) und tdTomato- und NGFR-Signale kolokalisieren. Auch in Abbildung 9 ist erkennbar, dass mittelständige, durch Anti-NGFR markierte Zellen kein SMMHC/tdTomato exprimieren (blaue Pfeile). SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen stellen demnach eine Subpopulation der Portalvenen-assoziierten NGFR exprimierenden HSC dar. Daher werden SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen im Weiteren als „Zone 1-HSC“ bezeichnet.

3.5 Progenitorzellnische der Zone 1-HSC

Betrachtet man Abbildung 6 fällt auf, dass tdTomato-Signale (= Zone 1-HSC) über die Zeit zunehmen. In Tieren, die kurz nach Tamoxifengabe (Tag 0) euthanasiert wurden, exprimieren nur wenig Zellen tdTomato (siehe Abbildung 6B und 10).

Die gezeigte Proliferation deutet auf die Anwesenheit von Progenitorzellen und deren Proliferation, sowie Migration deren Tochterzellen über die Zeit hin. Zone 1-HSC-Tochterzellen würden demnach von den Vorläuferzellen ausgehend ins Lebergewebe migrieren. Da zum Zeitpunkt der Tamoxifeninjektion der SMMHC-Promotor in Zone 1-HSC aktiv war, müssten einige der wenigen tdTomato-Signale, der an Tag 0 nach Tamoxifengabe euthanasierten Mäuse, von den Progenitorzellen der Zone 1-HSC stammen.

Im Folgenden sollte daher der Bereich des Leberläppchens eingegrenzt werden, der die möglichen Vorläuferzellen beherbergt. Auf Annahme, dass die Vorläuferzellen der Zone 1-HSC im Bereich des Portalfelds liegen könnten, wurde das Gallengangepithel mit Antikörper gegen Cytokeratin 19 (CK19) (grün) angefärbt (Jain et al., 2010), da Gallengänge und das dazugehörige Gallengangepithel Bestandteil der portalen Trias im Periportalfeld sind (Abbildung 10 A und B). Tatsächlich zeigt Abbildung 10, dass durch tdTomato rot markierte Zone 1-HSC verstärkt im Bereich des Gallengangepithels identifizierbar sind.

3.6 SMMHC-Expression der Zone 1-HSC

Interessanterweise zeigen Sternzellen, die von Fibroblasten und glatten Muskelzellen in einem t-distributed Stochastic Neighbor Embedding (tSNE)-Cluster anhand ihrer Genexpression unterschieden werden, kaum Expression von SMMHC (Myh11) (Dobie et al., 2019). Da diese Feststellung konträr zu den Ergebnissen dieser Arbeit schien, sollten im folgenden Versuchsteil Zone 1-HSC durch einen Antikörper gegen SMMHC identifiziert werden. Dafür wurden Gewebeschnitte der SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato Reportermaus, die an Tag 6 nach letzter Tamoxifeninjektion euthanasiert wurde, mit SMMHC-Antikörper inkubiert (Abbildung 11). Aufgrund präliminärer Daten (vgl. Schwiering, 2019) war zu erwarten, dass das SMMHC-Antikörper-Signal in einer Einzelaufnahme gering und schwer zuordenbar ist. Daher wurde eine

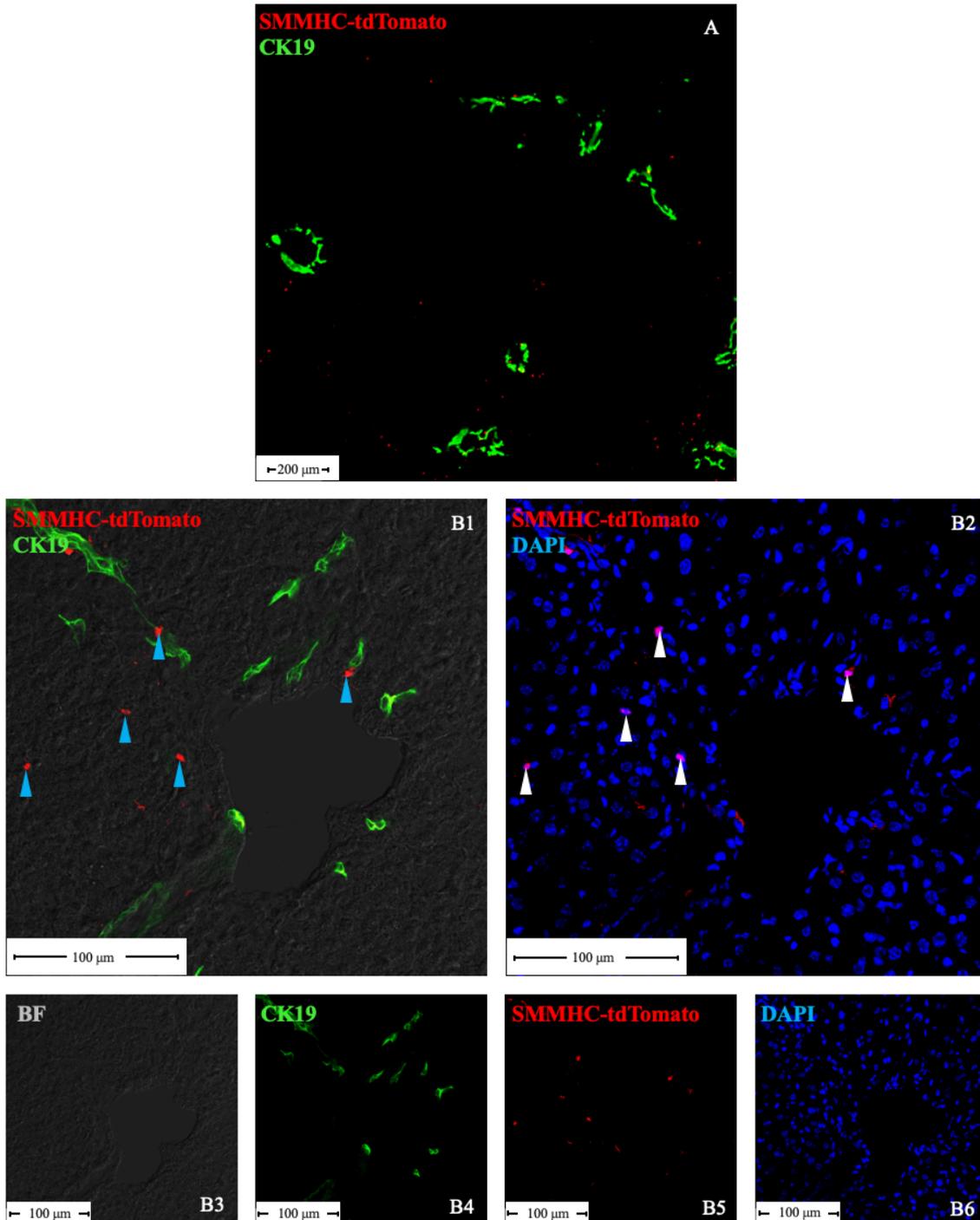


Abbildung 10: Progenitorzellnische der Zone 1-HSC

Gewebeschnitte von unmittelbar nach Tamoxifengabe euthanasierten SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäusen wurden hergestellt und mit Antikörper gegen CK19 (grün) inkubiert (A: Gewebeschnitt in niedriger Vergrößerung; B: Gewebeschnitt in hoher Vergrößerung). Zellkerne der Zone 1-HSC (tdTomato⁺/DAPI (blau)⁺) wurden markiert (weiße Pfeile). Zone 1-HSC sind vor allem in der Region des Gallengangepithels (grün) zu identifizieren (blaue Pfeile). Dies legt die Lage einer eventuellen Progenitorzellnische in diesem Bereich nahe.

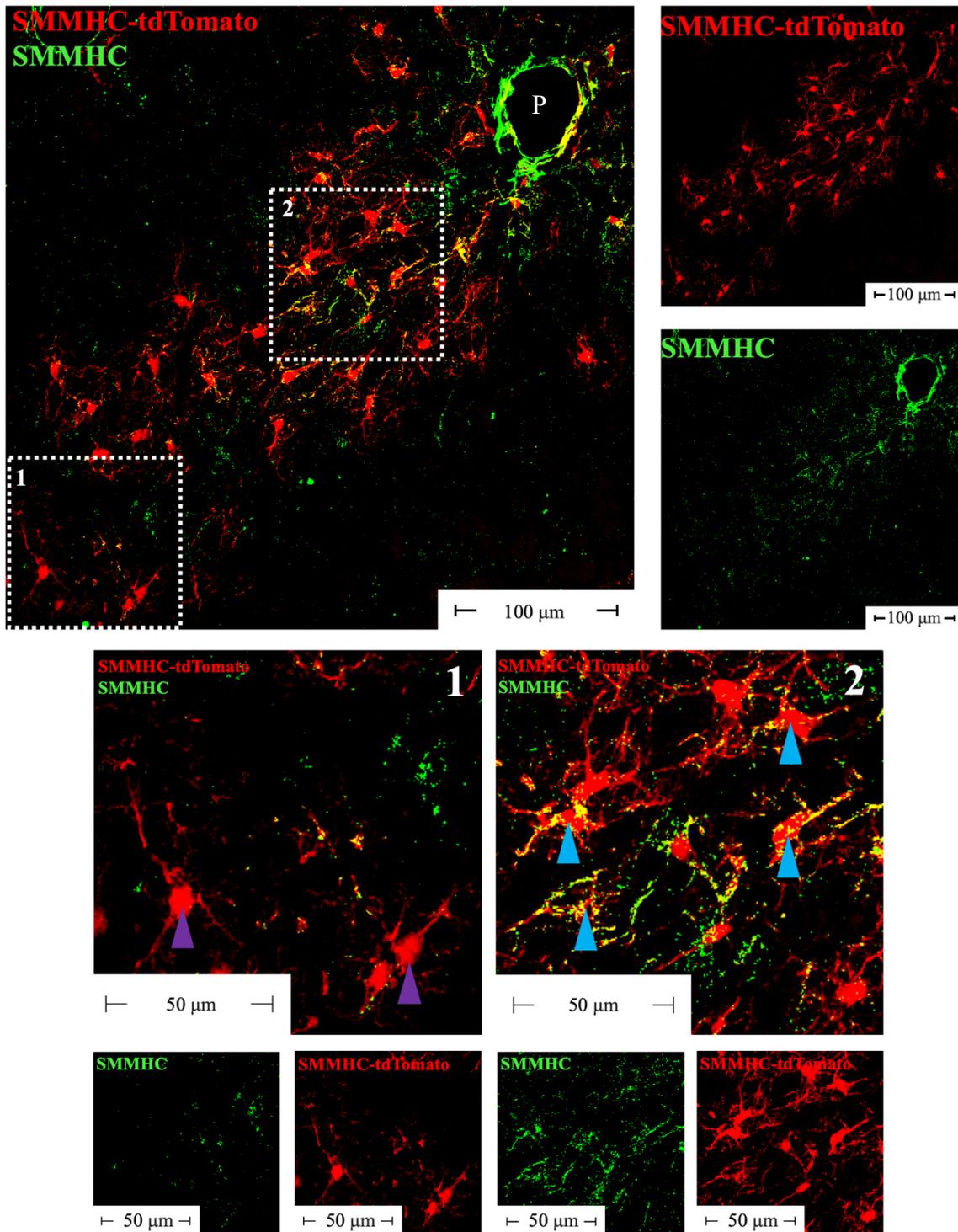


Abbildung 11: Differenzen in der SMMHC-Expression der Zone 1-HSC

SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäuse wurden an Tag 6 nach letzter Tamoxifengabe euthanasiert und Gewebeschnitte mit Antikörper gegen SMMHC (grün) angefärbt. Eine Kolo­kalisierung ist anhand der Gelbfärbung ersichtlich. Auffällig ist, dass vor allem Zone 1-HSC in der Nähe des Portal­felds eine hohe Expression von SMMHC aufweisen (2; blaue Pfeile). Zellen entfernt vom Portal­feld weisen eine geringere SMMHC-Expression auf (1; violette Pfeile). Das erkennbare Portal­feld ist mit (P) eingezeichnet.

„Z-Stack“-Summationsaufnahme durchgeführt. Zone 1-HSC können durch SMMHC-Antikörper angefärbt werden und exprimieren daher SMMHC. Es scheint allerdings Differenzen in der Expression von SMMHC zu geben. In der Nähe des Periportalfeldes sind Zone 1-HSC mit starker SMMHC-Antikörper-Färbung zu identifizieren (weißer Kasten 2, blaue Pfeile). Je größer die Entfernung vom Periportalfeld wird, desto geringer scheint die Anzahl der gebundenen Antikörper (weißer Kasten 1, violette Pfeile).

3.7 Zone 1-HSC in der Leberfibrose

Um die Funktion der Zone 1-HSC besser zu verstehen, wurden im folgenden Abschnitt Zone 1-HSC unter fibrotischen Bedingungen untersucht. HSC werden in der Literatur generell als Quelle für Myofibroblasten beschrieben (Mederacke et al., 2013), dennoch deuteten präliminäre Daten eine ausbleibende Differenzierung der Zone 1-HSC zu Myofibroblasten an (Schwiering, 2019). Schwiering (2019) formulierte die Theorie, Zone 1-HSC könnten möglicherweise Sternzellen ersetzen, die aufgrund vorangegangener Verletzungen zu Myofibroblasten differenziert sind, und dadurch die Funktionalität der Leber aufrechterhalten. Zone 1-HSC hätten also, der Theorie folgend, bei anreihenden fibrotischen Reaktionen das Potential zu Myofibroblasten zu differenzieren.

Zur Untersuchung der Zone 1-HSC in der Fibrose wurde deshalb nach dem in Abbildung 12 gezeigten Schema vorgegangen:

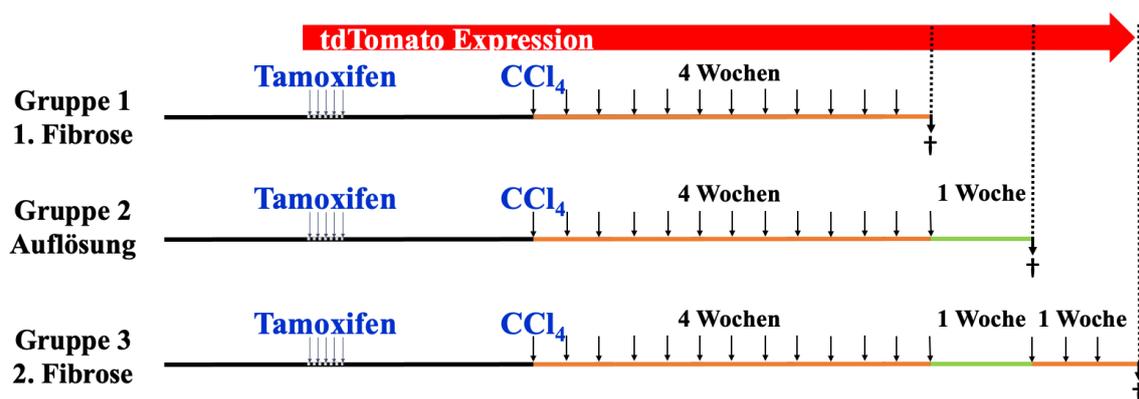


Abbildung 12: CCl₄ Behandlungsprotokoll

Allen Tieren wurde im Alter von 6-8 Wochen Tamoxifen injiziert. Nach weiteren 30 Tagen begann das CCl₄-Behandlungsprotokoll. Gruppe 1 wurde 4 Wochen dreimal wöchentlich CCl₄ verabreicht. Gruppe 2 erhielt nach der vierwöchigen CCl₄-Behandlung eine Regenerationszeit von einer Woche. Gruppe 3 folgte dem Behandlungsprotokoll von Gruppe 2, nach der Regenerationszeit erfolgte nochmals dreimalig die Injektion von CCl₄. In allen Gruppen schloss sich nach dem CCl₄-Protokoll die Euthanasierung (†) an.

In allen Gruppen wurde den Tieren über 4 Wochen dreimal wöchentlich CCl₄ injiziert. Nach 4 Wochen wurde die erste Tiergruppe euthanasiert (Gruppe 1 = 1. Fibrose). In Tiergruppe 2 erfolgte die Euthanasierung nach einer Regenerationszeit von einer Woche (Gruppe 2 = Auflösung). Tiergruppe 3 folgte dem Protokoll von Gruppe 2, allerdings wurde nach der Regenerationswoche erneut eine Woche CCl₄ (3-mal wöchentlich) verabreicht. Danach erfolgte auch die Euthanasierung der dritten Tiergruppe (Gruppe 3 = 2. Fibrose).

Abbildung 13 zeigt in der 1. Fibrose über das gesamte Leberläppchen verteilt tdTomato-Signale. Die Zonierung der Zone 1-HSC ist also nach Fibroseinduktion durch CCl₄ aufgelöst. Auch nach einwöchiger Regeneration (Auflösung) ist tdTomato nicht nur in Zone 1, sondern auch in Zone 2 und 3 nachzuweisen. In der Gruppe der 2. Fibrose ist das tdTomato-Signal wie in Gruppe 1 und 2 ebenfalls in Zone 2 und 3 des Leberazinus identifizierbar.

Da beantwortet werden sollte, ob Zone 1-HSC zu Myofibroblasten differenzieren, wurde α SMA als Marker für Myofibroblasten verwendet (Ramadori et al., 1990). Abbildung 14 stellt mit α SMA-Antikörper inkubierte Gewebeschnitte der Gruppen 1, 2 und 3 dar. Im Gewebeschnitt der 1. Fibrose ist ein starkes α SMA-Signal als Zeichen einer ausgeprägten fibrotischen Reaktion im Randbereich des Leberläppchens zu erkennen. Nach einwöchiger Unterbrechung der CCl₄-Behandlung ist in Gruppe 2 (Auflösung) ein deutlicher Rückgang des α SMA-Signals zu verzeichnen, was auf einen Rückgang von Myofibroblasten hinweist. In der Gruppe der 2. Fibrose sind erneut, wie nach der 1. Fibrose, α SMA-Signale im Randbereich des Leberläppchens zu erkennen, was wiederum auf eine fibrotische Reaktion hindeutet.

Die Expression von α SMA durch Zone 1-HSC wurde in höherer Vergrößerung betrachtet. Dabei sind um die Portalfelder Bereiche mit α SMA-Signalen erkennbar (Abbildung 15). In keiner der Gruppen (1. Fibrose, Auflösung, 2. Fibrose) ist nachzuweisen, dass Zone 1-HSC α SMA exprimieren. Zone 1-HSC nehmen demnach in keiner der Versuchsgruppen (1. Fibrose, Auflösung, 2. Fibrose) an der fibrotischen Reaktion als Myofibroblasten teil. Da auch nach erneuter Fibroseinduktion (2. Fibrose) keine Differenzierung der Zone 1-HSC zu Myofibroblasten nachweisbar ist, konnte die von Schwiering (2019) aufgestellte Theorie (s.o.) widerlegt werden.

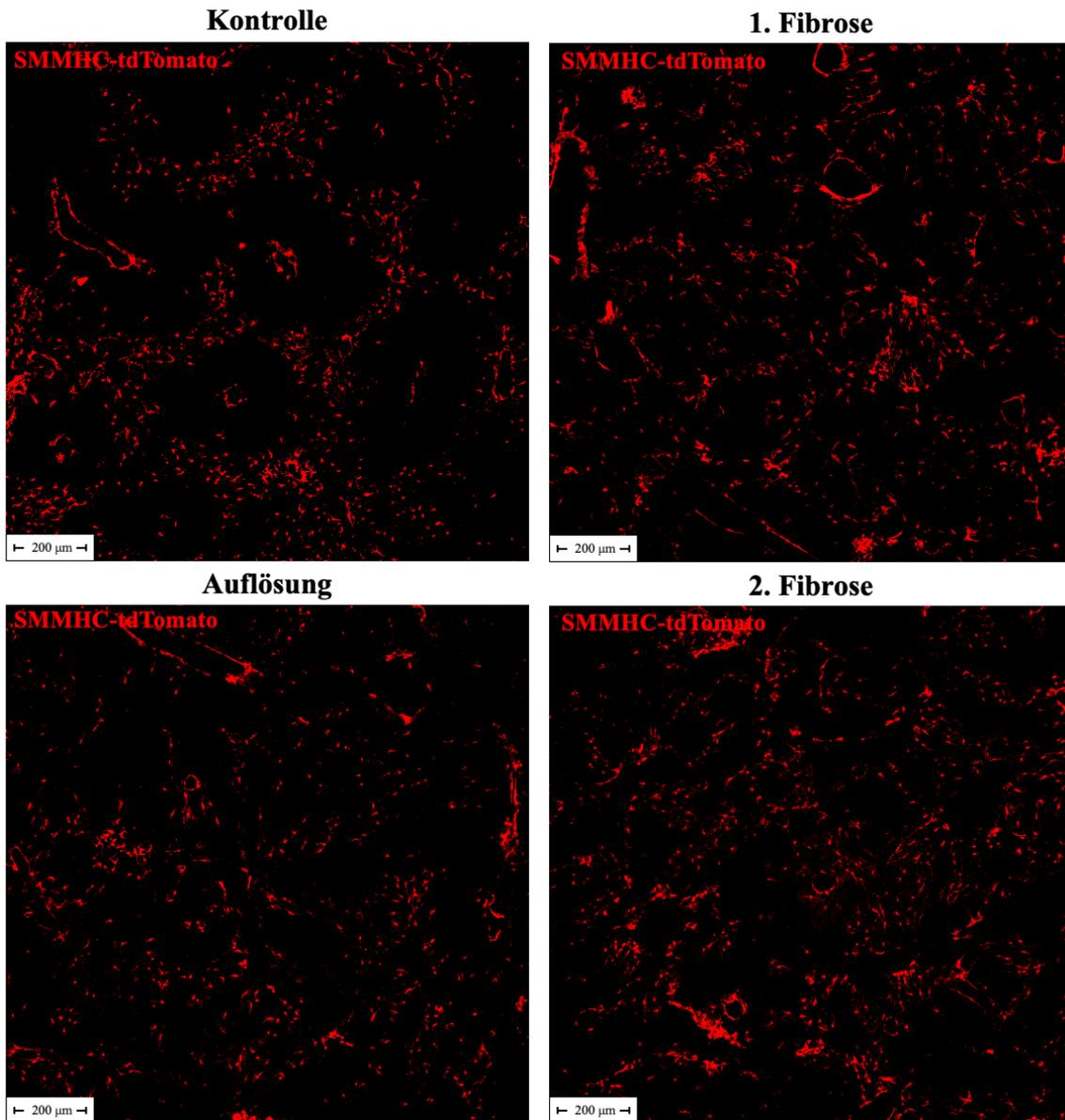


Abbildung 13: Auflösung der Zonierung der Zone 1-HSC nach CCl₄-Behandlung und Auslösung einer fibrotischen Reaktion

Gewebeschnitte mit Tamoxifen und CCl₄ behandelte SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäuse wurden hergestellt. Das CCl₄-Behandlungsprotokoll variierte ((Kontrolle = nicht CCl₄ behandelt), (Gruppe 1 = 1. Fibrose), (Gruppe 2 = Auflösung der Fibrose), (Gruppe 3 = 2. Fibrose)). Die Zonierung der Zone 1-HSC ist nach CCl₄-Behandlung unter fibrotischen Bedingungen aufgelöst.

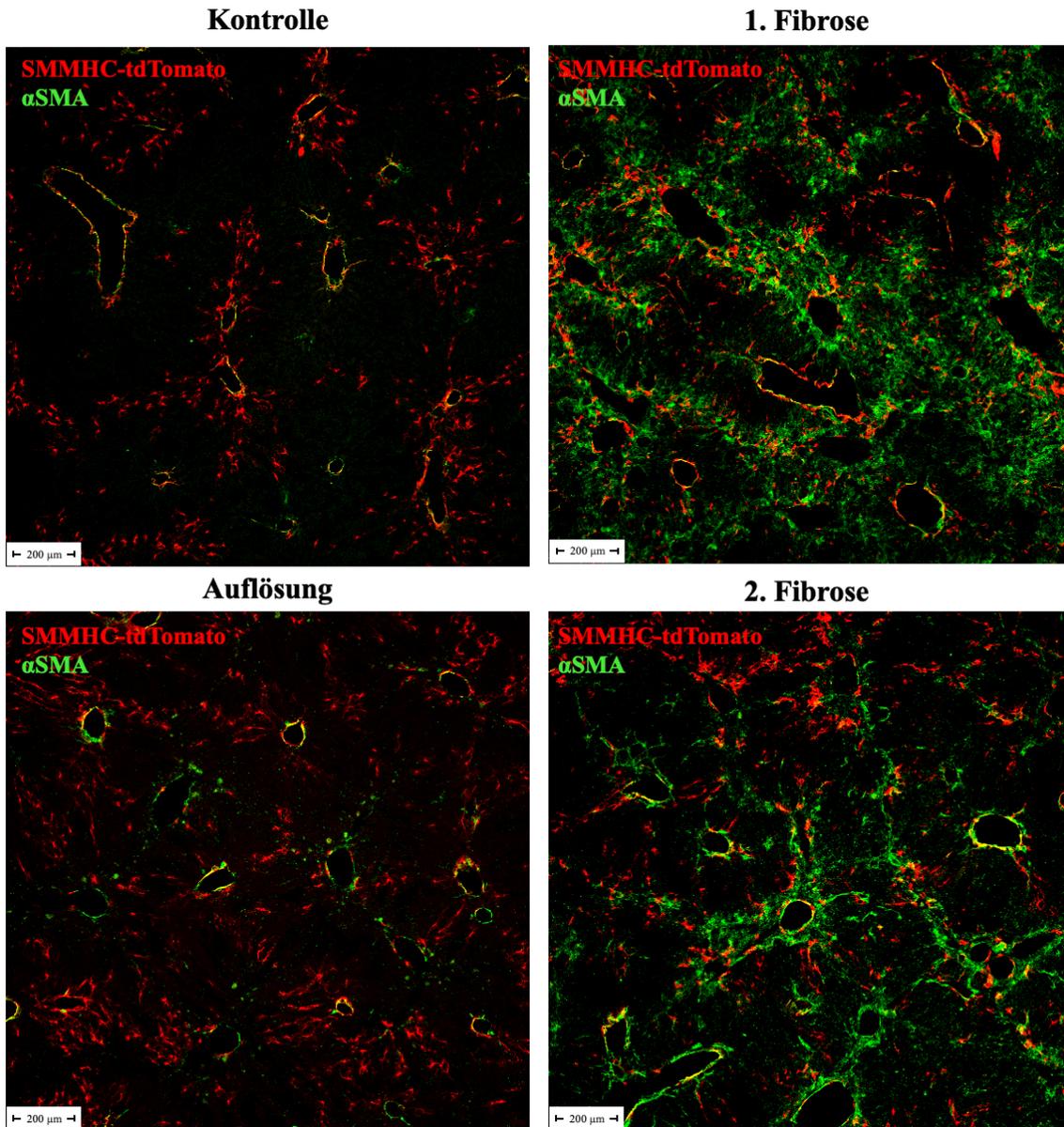


Abbildung 14: Fibroseinduktion in SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermaus

Gewebeschnitte mit Tamoxifen und CCl₄ (siehe 3.7) behandelte SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermaus wurden hergestellt und mit αSMA-Antikörper inkubiert. Die Fibroseinduktion im Bereich der Portalfelder ist in Gruppe 1 und 3 erkennbar (Fibrosemarker: αSMA). Gruppe 2 zeigt eine Auflösung der Fibrose. Die Kontrollgruppe wurde nur mit Tamoxifen behandelt, eine CCl₄-Injektion erfolgte nicht.

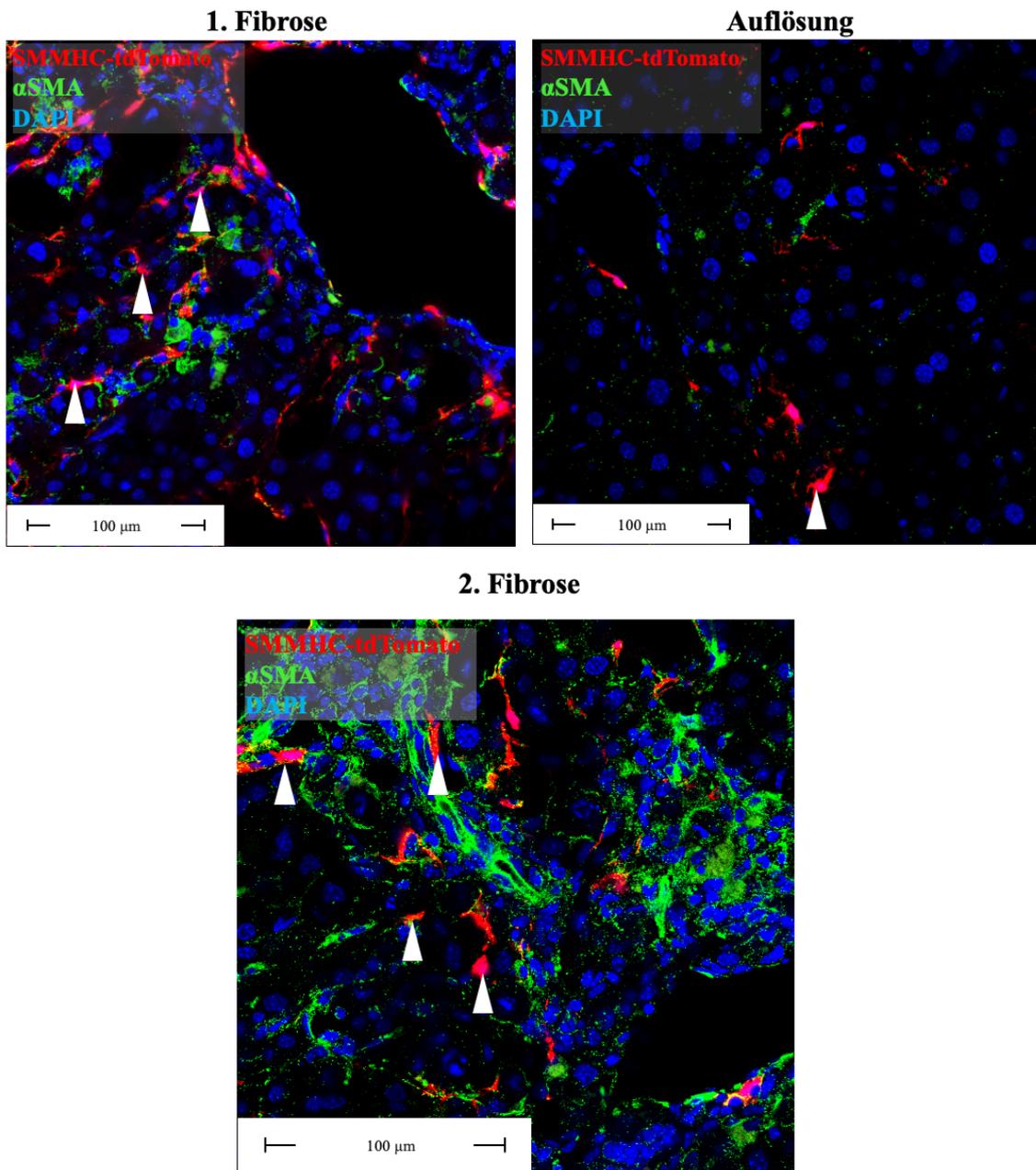


Abbildung 15: Ausbleibende Differenzierung der Zone 1-HSC zu Myofibroblasten

Gewebeschnitte mit Tamoxifen und CCl₄ (siehe 3.7) behandelter SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reporterermäuse wurden hergestellt und mit αSMA-Antikörper inkubiert. Zellkerne der Leberzellen sind mit DAPI (blau) angefärbt. αSMA-Expression ist in Gruppe 1 und 3 erkennbar. Zone 1-HSC exprimieren in keiner der Gruppen 1-3 αSMA (weiße Pfeile). Zone 1-HSC wandeln sich demnach nicht in Myofibroblasten um.

3.8 Zone 1-HSC während der frühen fibrotischen Reaktion

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass Zone 1-HSC in der Fibrose ihre Zonierung verlieren und nicht zu Myofibroblasten differenzieren. Im folgenden Versuchsteil sollen Zone 1-HSC zu einem frühen Zeitpunkt der Fibrose untersucht werden. Die Tiere wurden dafür an Tag 10 nach viermaliger CCl₄-Gabe euthanasiert.

Abbildung 16 zeigt deutlich, dass Zone 1-HSC unter frühen fibrotischen Bedingungen kein α SMA exprimieren (weiße Pfeile). Demnach differenzieren Zone 1-HSC auch zu einem frühen Zeitpunkt der Fibrose nicht zu Myofibroblasten (grün). Zudem ist die Zonierung der Zone 1-HSC bereits nach viermaliger CCl₄-Gabe aufgelöst.

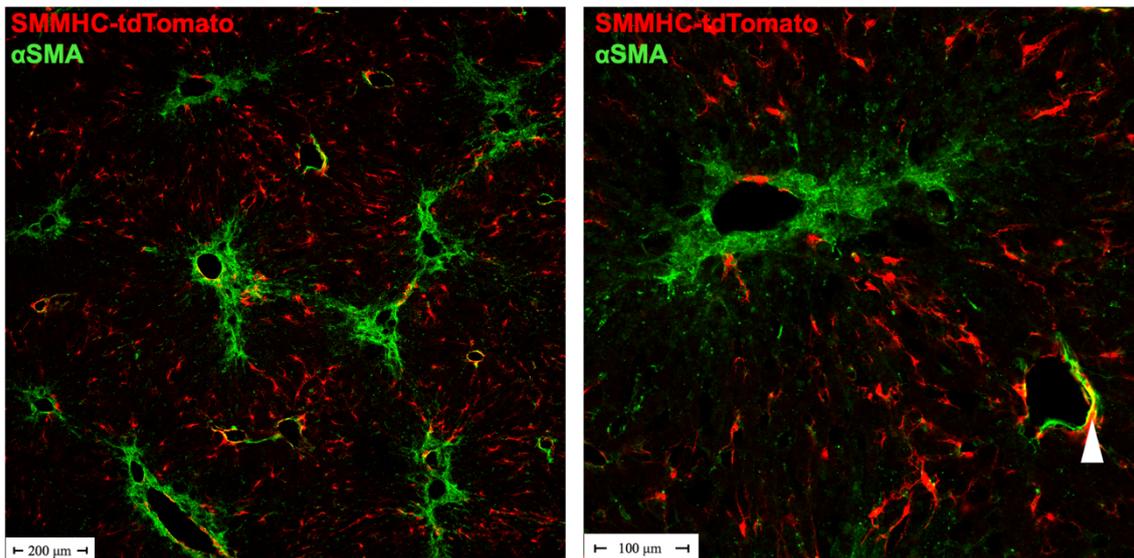


Abbildung 16: Zone 1-HSC differenzieren auch in früher Fibrose nicht zu Myofibroblasten

SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäuse wurde mit Tamoxifen behandelt und nach viermaliger CCl₄-Gabe an Tag 10 euthanasiert. Die Gewebeschnitte wurden mit Antikörper gegen α SMA inkubiert (grün). Zone 1-HSC exprimieren kein α SMA und differenzieren daher nicht zu Myofibroblasten. Eine Kolokalisation von α SMA und tdTomato (gelb) ist ausschließlich in den glatten Muskelzellen nachzuweisen (weißer Pfeil).

Werden Gewebeschnitte der mit CCl₄ und Tamoxifen behandelten Reportermäuse mit Antikörper gegen PDGFR β inkubiert (Abbildung 17), ist eine große Ansammlung von PDGFR β ⁺/SMMHC⁻ Zellen im Bereich der Portalfelder zu erkennen. Zone 1-HSC akkumulieren dahingegen nicht im Bereich der Portalfelder, obwohl Myofibroblasten

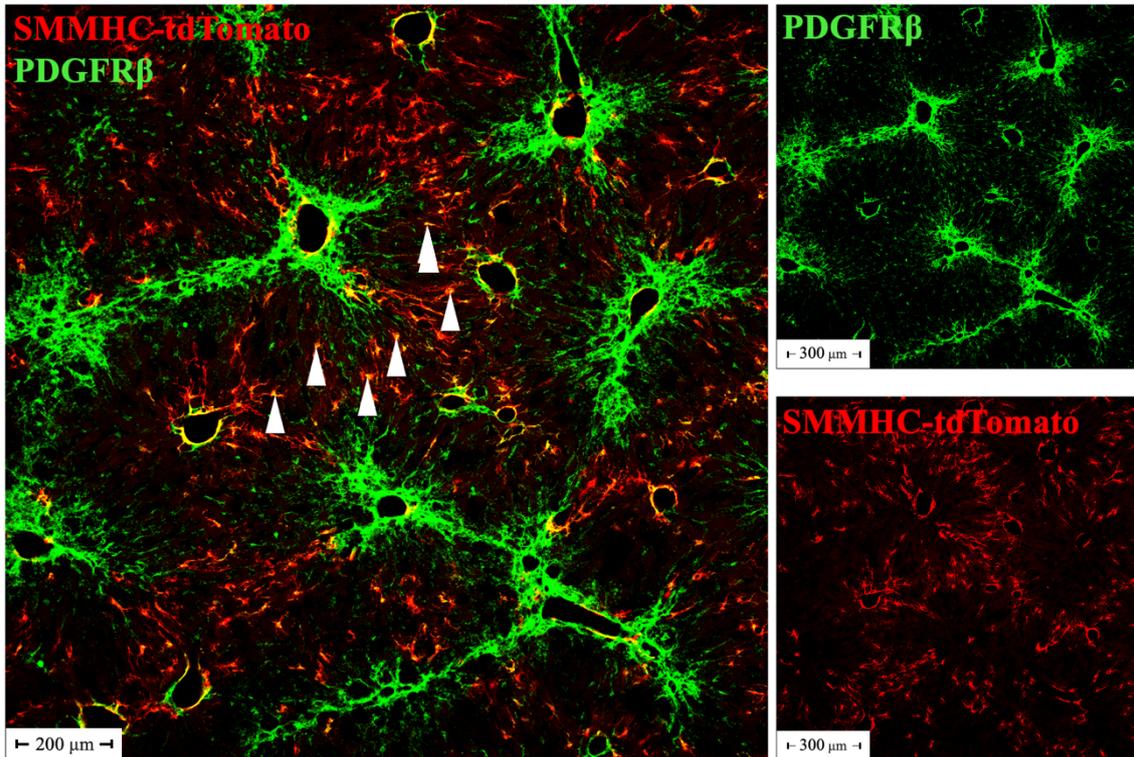


Abbildung 17: Zonierung der Zone 1-HSC auch in früher Fibrose aufgelöst

Eine SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermaus wurde mit Tamoxifen behandelt und nach viermaliger CCl₄-Gabe an Tag 10 euthanasiert. Nach Inkubation mit PDGFRβ-Antikörper (grün) ist eine Akkumulation der PDGFRβ⁺ tdTomato⁻ Sternzellen im Bereich des Portalfeldes erkennbar. Zone 1-HSC verlieren ihre Zonierung und zeigen keine verstärkte Akkumulation im Bereich des Portalfeldes (weiße Pfeile).

normalerweise während der fibrotischen Reaktion direkt in der fibrotischen Narbe lokalisiert sind (Brenner et al., 2012). Die Lokalisation der Zone 1-HSC unterscheidet sich demnach deutlich von der Stelle des Lebergewebes, an der Myofibroblasten in der Fibrose zu erwarten sind.

Zone 1-HSC differenzieren zusammenfassend also weder zum Zeitpunkt einer frühen Fibrose noch in der 1. Fibrose und 2. Fibrose aus 3.7 zu Myofibroblasten. Außerdem sind sie in der Fibrose nicht dort lokalisiert, wo aktivierte Sternzellen normalerweise zu erwarten sind, weshalb die Frage nach ihrer Funktion aufgeworfen wird.

3.9 Zone 1-HSC und die sinusoidale Kapillarisation

Sternzellen gelten als Perizyten der Leber (Hellerbrand, 2013). Außerdem ist von Perizyten bekannt, dass sie mit ihren Ausläufern Kapillaren umschlingen, wodurch sie die Gefäßweite regulieren können (Rucker et al., 2000), weshalb in diesem Versuchsteil die Rolle von Zone 1-Sternzellen bei der fibrosebedingten sinusoidalen Kapillarisation untersucht wird.

Als Kapillarisationmarker wurde zunächst Laminin an Gewebeschnitten von mit CCl_4 behandelten Mäusen genutzt. Unter fibrotischen Bedingungen wird das Basalmembranprotein Laminin verstärkt exprimiert und weist damit auf Kapillarisationvorgänge der Sinusoide hin (Hahn et al., 1980; Su et al., 2021).

Mit Laminin-Antikörper inkubierte Gewebeschnitte der Kontrollgruppe zeigen, dass die Laminin-Expression unter nicht fibrotischen Bedingungen nur im Bereich der Gefäße des Portalfeldes und der Zentralvene nachzuweisen ist (Abbildung 18). In Gewebeschnitten

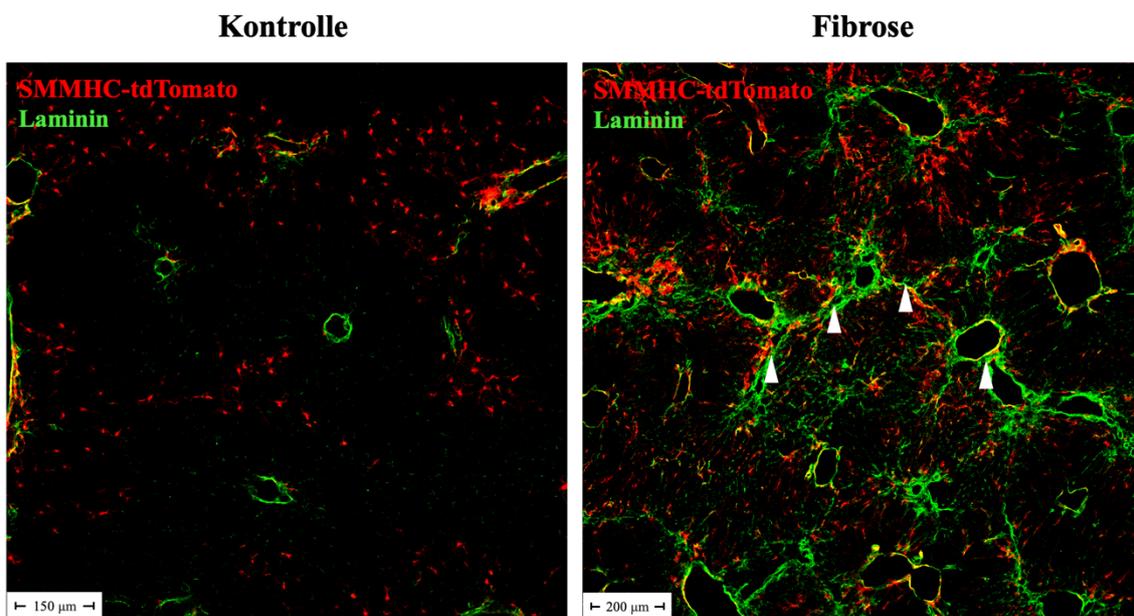


Abbildung 18: Zone 1-HSC und Kapillarisationmarker Laminin

SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäuse wurden nach 12maliger CCl_4 -Gabe (4 Wochen) bzw. keiner CCl_4 -Gabe (Kontrolle) euthanasiert, Gewebeschnitte hergestellt und mit Laminin-Antikörper (grün) inkubiert. Kontrolle: Nur großkalibrige Gefäße zeigen Laminin-Expression. Fibrose: Laminin-Expression ist septal, im Bereich der Portalfelder und angrenzenden Sinusoide erhöht (weiße Pfeile).

der mit CCl₄ behandelten 1. Fibrose-Gruppe (aus 3.7) ist eine Laminin-Expression nicht mehr nur auf die Zentralvenen und Gefäße des Portalfeldes beschränkt, sondern auch septal und im Bereich der Portalfelder mit angrenzenden Sinusoiden erkennbar (weißer Pfeil). Die *denovo* Laminin-Expression deutet auf die Ausbildung einer Basalmembran hin und damit auf die Entstehung von geschlossenen Kapillaren (= sinusoidale Kapillarisation).

Abbildung 19 stellt Gewebeschnitte der mit CCl₄ behandelten Versuchstiere in hoher Vergrößerung dar. Zu erkennen sind Zellkörper der Zone 1-HSC, sowie deren feine Ausläufer, welche kreisrunde, Laminin-exprimierende Sinusoide umschließen. Es lässt sich vermuten, dass Zone 1-HSC möglicherweise in der Kapillarisation die Rolle eines vaskulären Perizyten einnehmen. Jedoch sind nicht alle Laminin-exprimierenden Sinusoide auch von Ausläufern der Zone 1-HSC Zellkörper umgeben. Vermuten lässt sich daher, dass die durch Laminin angezeigte Ausbildung einer Basalmembran dem Umschlingen durch die Zone 1-HSC vorausgeht.

Neben Laminin wurde zudem auch CD34 als Kapillarisationmarker eingesetzt. CD34 ist ein Transmembranprotein, das unter anderem in Endothelzellen exprimiert wird und in der Leber in kapillarisierten Sinusoiden nachzuweisen ist (Couvelard et al., 1993). In der Kontrollgruppe ist lediglich eine schwache CD34-Expression nachweisbar. In Gewebeschnitten der mit CCl₄ behandelten Mäuse, ist die CD34-Expression dahingegen septal und im Bereich der Portalfelder erhöht und weist somit auf eine Kapillarisation der Sinusoide hin (Abbildung 20). In hoher Vergrößerung war es mit der Anti-CD34-Färbung jedoch im Gegensatz zur Anfärbung der Gewebeschnitte mit Laminin-Antikörper nicht möglich, kreisrunde, kapillarisierte Sinusoide nachzuweisen (Abbildung 21). Demnach war es auch nicht möglich das Umschlingen der kapillarisierten Sinusoide durch die Ausläufer der Zone 1-HSC-Zellkörper anhand dieses Markers zu bestätigen.

3.10 Kapillarisation und Zone 1-HSC unter frühen fibrotischen Bedingungen

Abschließend wurden Zone 1-HSC zu einem frühen Zeitpunkt der Fibrose unter der Verwendung von Laminin-Antikörper untersucht (Abbildung 22A). Auch in der frühen Fibrose ist die Laminin-Expression vor allem im Bereich der Portalfelder gestiegen, was

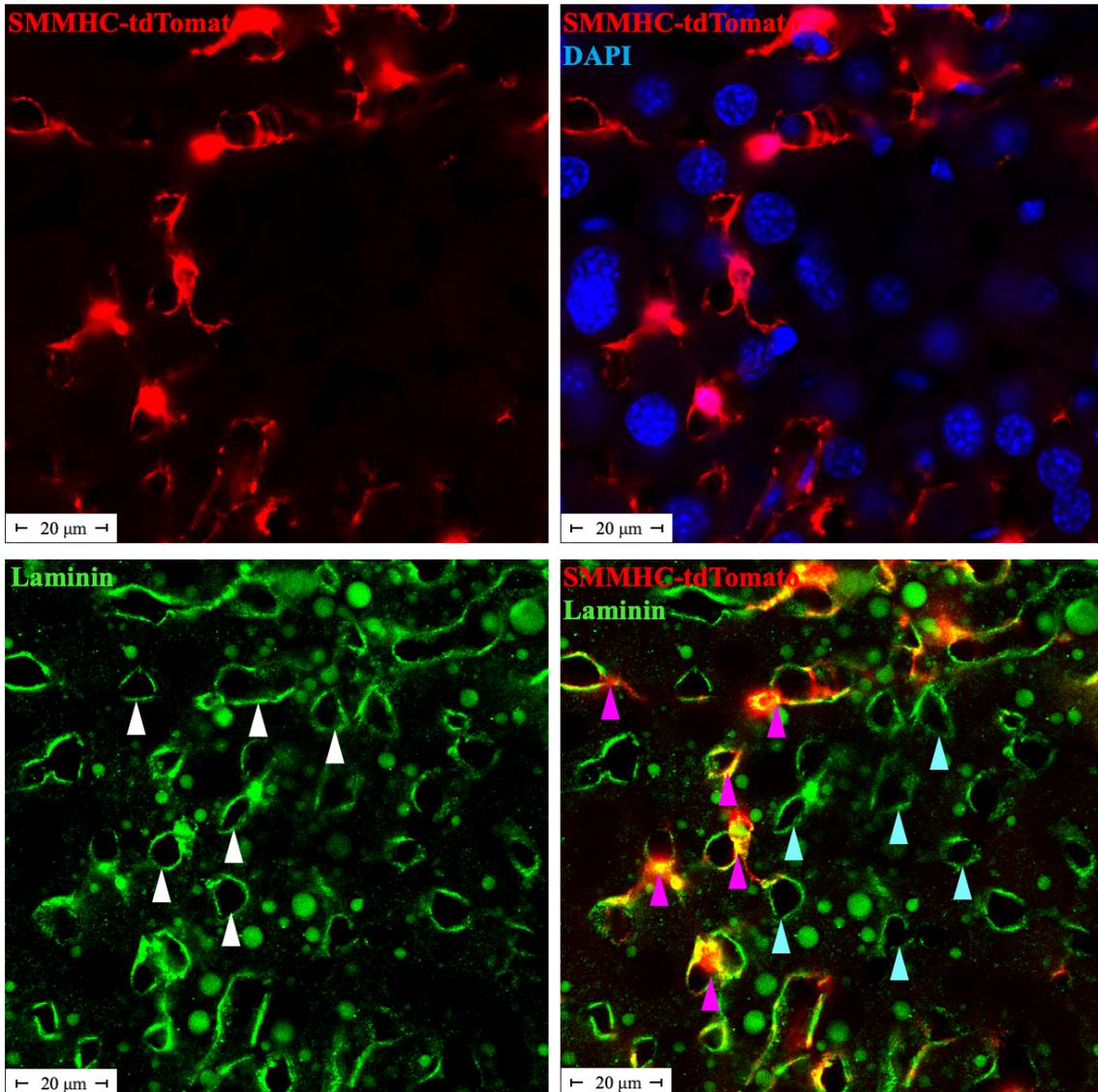


Abbildung 19: Umschlingen der kapillarisierten Sinusoide durch Ausläufer der Zone 1-HSC-Zellkörper

Zu erkennen sind durch Laminin-Antikörper (grün) markierte kapillarisierte Sinusoide (weiße Pfeile). Ausläufer der Zone-1-HSC-Zellkörper umschlingen die kapillarisierten Sinusoide (rosa Pfeile). Einige kapillarisierte Sinusoide werden allerdings nicht von Zone 1-HSC umschlossen (türkisfarbene Pfeile). Zone 1-HSC nehmen möglicherweise in der Kapillarisierung die Rolle eines vaskulären Perizyten ein. Die Ausbildung einer Basalmembran geht anscheinend dem Umschlingen durch Zone 1-HSC voraus.

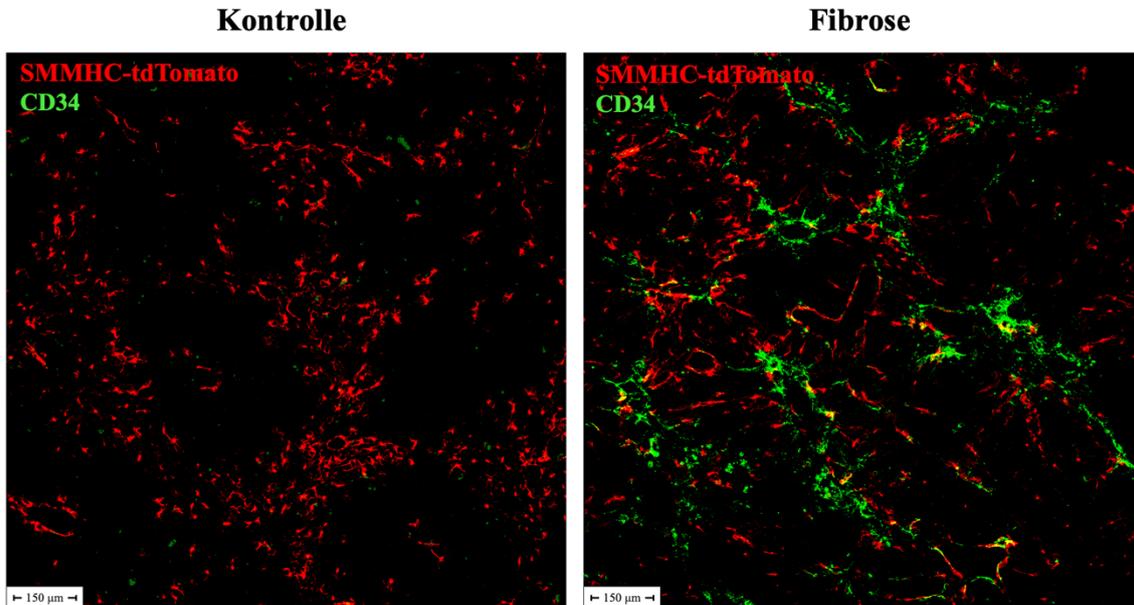


Abbildung 20: Zone 1-HSC und Kapillarierungsmarker CD34

SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäuse wurden nach 12-maliger CCl₄-Gabe (4 Wochen) bzw. keiner CCl₄-Gabe (Kontrolle) euthanasiert. Gewebeschnitte wurden hergestellt und mit CD34-Antikörper (grün) inkubiert. Kontrolle: CD34-Expression ist kaum nachweisbar. Fibrose: CD34-Expression ist septal, im Bereich der Portalfelder erhöht.

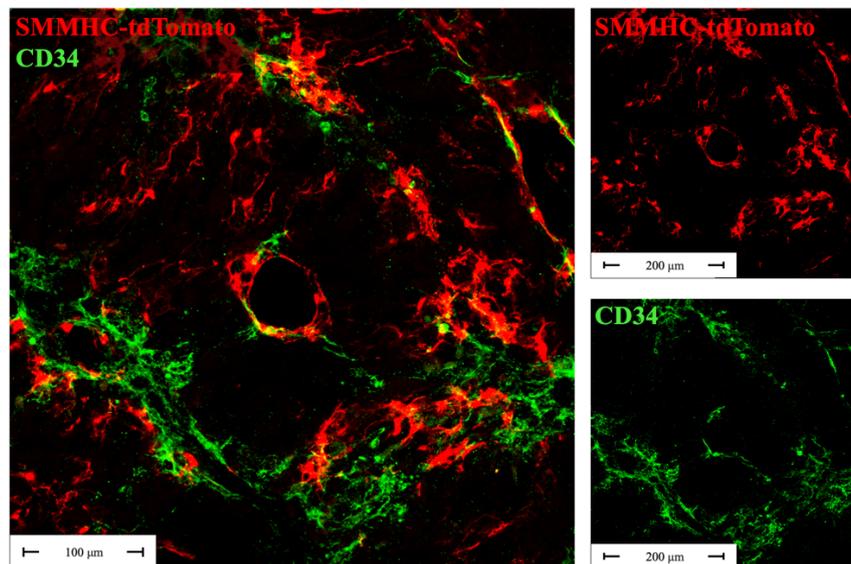


Abbildung 21: Ausbleibender Nachweis der Umschlingung von kapillarisierten Sinusoiden durch Ausläufer der Zone 1-HSC-Zellkörper

In Gewebeschnitten, die mit Anti-CD34 angefärbt wurden, sind, im Vergleich zur Färbung mit Anti-Laminin, kapillarisierte Sinusoide unzureichend markiert. Ein Nachweis der Umschlingung von kapillarisierten Sinusoiden durch Ausläufer der Zone 1-HSC Zellkörper mit dem Marker CD34 bleibt daher aus.

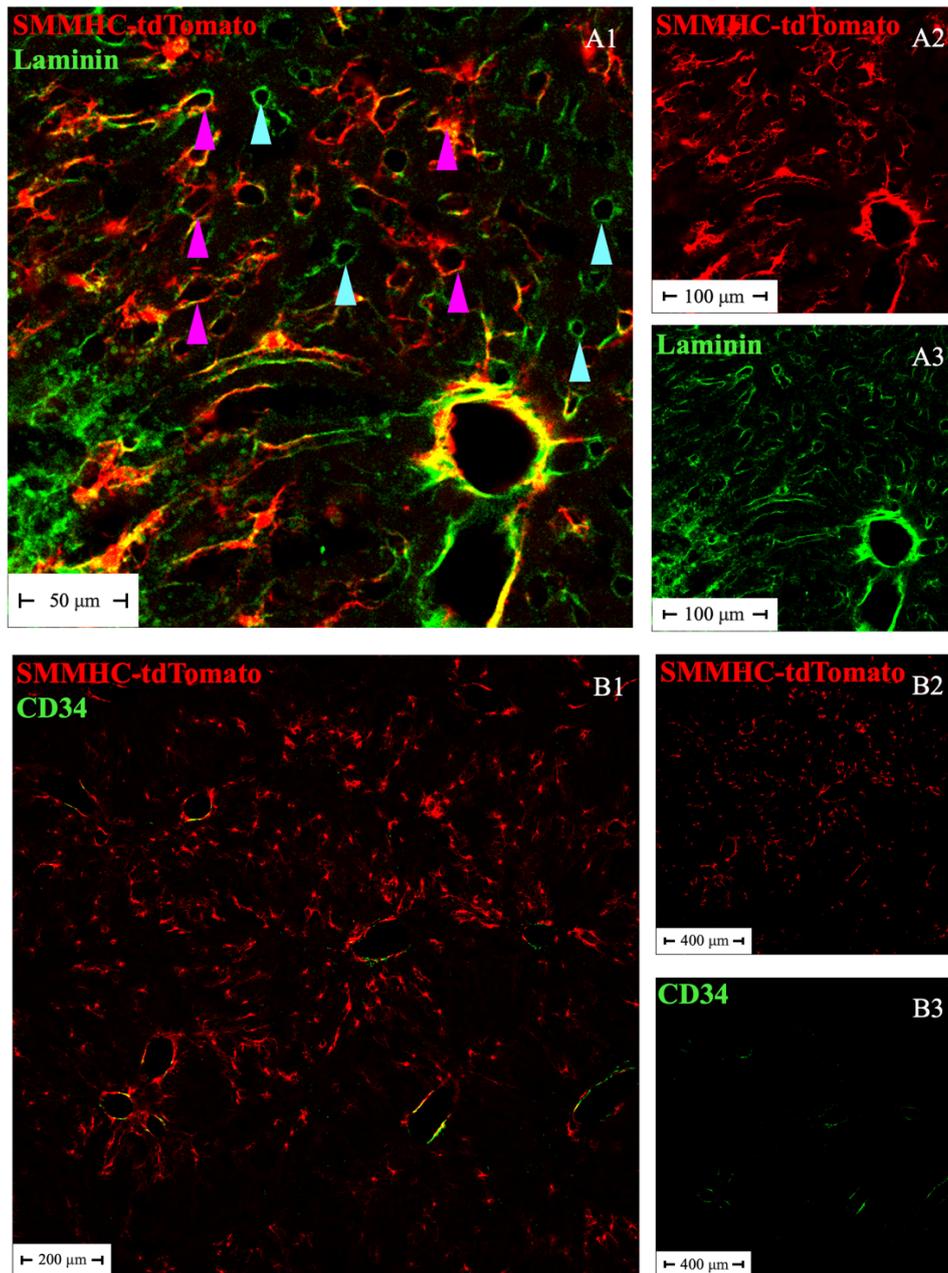


Abbildung 22: Umschlingung der kapillarisierten Sinusoide durch Ausläufer der Zone 1-HSC-Zellkörper in der frühen Fibrose

SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäuse wurden nach 4-maliger CCl₄-Gabe (10 Tage) euthanasiert. Gewebeschnitte wurden hergestellt und mit Laminin-Antikörper (A) bzw. CD34-Antikörper (B) inkubiert. A (Laminin): Ausläufer der Zone-1-HSC-Zellkörper umschlingen die kapillarisierten Sinusoide bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Fibrose (rosa Pfeile). Einige kapillarisierte Sinusoide werden allerdings auch zu einem frühen Zeitpunkt der Fibrose nicht von Zone 1-HSC umschlossen (türkisfarbene Pfeile). B (CD34): Zu einem frühen Zeitpunkt der Fibrose ist eine Expression von CD34 nur an den großen Gefäßen nachweisbar.

wiederum auf eine Kapillarisation hindeutet. Jedoch sind auch hier (vgl. 3.9) nicht alle Laminin-exprimierenden Sinusoide von Ausläufern der Zone 1-HSC Zellkörper umschlossen. Eine Expression von CD34 ist in den Gewebeschnitten septal und im Bereich der Portalfelder mit angrenzenden Sinusioden nicht nachweisbar, lediglich die großen Gefäße sind durch CD34 schwach markiert (Abbildung 22B).

Diskussion

Die hepatische Sternzelle wird auch als Perizyt der Leber bezeichnet (Pinzani et al., 1992; Hellerbrand, 2013) und ist in aktivierter Form als Myofibroblast an der fibrotischen Reaktion beteiligt (Mederacke et al., 2013). In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Sternzellsubtypen der Leber identifiziert (z.B. „Portal vein-associated (PaHSC) und „Central vein-associated HSC“ (CaHSC) (Dobie et al., 2019)) (Rosenthal et al., 2021; Wang et al., 2021; Payen et al., 2021). Auch präliminäre Untersuchungen der Arbeitsgruppe Professor Friebe haben einen bisher nicht identifizierten Sternzellsubtyp gezeigt, für welchen eine Zonierung im Lebergewebe postuliert (vgl. Schwiering, 2019), jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen wurde. Daneben ist auch dessen Funktion nicht abschließend geklärt (Schwiering, 2019).

Der identifizierte Sternzellsubtyp zeichnet sich durch die Expression von tdTomato in Abhängigkeit des SMMHC-Promotors aus und wurde deshalb in dieser Arbeit anhand von Gewebeschnitte einer SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermauslinie weitergehend charakterisiert. Die postulierte Zonierung des identifizierten Sternzellsubtyps (vgl. Schwiering, 2019) wurde anhand eines Lineage Tracing-Experiments unter Zuhilfenahme diverser immunhistochemischer Marker überprüft und auf eine potentielle Zellmauserung untersucht. Außerdem wurde ein CCl₄-Fibrosemodell genutzt, um die Differenzierung des identifizierten Sternzelltypen zu Myofibroblasten sowie die Rolle in der sinusoidalen Kapillarisierung zu untersuchen. Dabei stellte sich unter anderem heraus, dass eine Differenzierung zu Myofibroblasten ausbleibt, dafür aber eine gefäßbezogene Aufgabe des Subtyps in der Kapillarisierung möglich scheint.

Zusammengefasst wurden in dieser Arbeit folgende Aspekte betrachtet und sollen daher hier ausführlich diskutiert werden:

- (1) Die Zonierung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen (= Zone 1-HSC)
- (2) Zellmauserung und potenzielle Progenitorzellnische der Zone 1-HSC
- (3) Differenzierung der Zone 1-HSC zu Myofibroblasten
- (4) Funktion der Zone 1-HSC

4.1 Sternzellmarker

Wie bereits zu Beginn der Arbeit geschildert, stellt die Identifikation von Perizyten ein Problem dar und kann meist nur durch einen Zusammenschluss an Kriterien erfolgen (Lokalisation, Form, Genexpression) (Armulik et al., 2011). Dennoch zeigten Mederacke et al. (2013) anhand von Flowzytometrie und immunhistochemischen Untersuchungen (u.a. mit Anti-PDGFR β), dass 99% der Sternzellen mit einer Lrat-Cre Maus markiert werden können und bestätigten Lrat als HSC-spezifischen Marker. PDGFR β ist als Sternzellmarker etabliert (Henderson et al., 2013; Drinane et al., 2017), da er auf Sternzellen im aktivierten und ruhenden Aktivitätszustand zu finden ist (Wong et al., 1994; Henderson et al., 2013; Shang et al., 2018).

Mit Hilfe eines gegen PDGFR β gerichteten Antikörpers konnten auch in dieser Arbeit PDGFR β als Marker für Sternzellen bestätigt werden. Zusätzlich zu den HSC wurden glatte Muskelzellen der Gefäße durch den Antikörper markiert, diese konnten aber visuell aufgrund ihrer Lumenstruktur und Lokalisation gut von Sternzellen abgegrenzt werden.

4.2 Nachweis der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen in Zone 1 des Leberazinus (Zone 1-HSC)

Neben Payen et al. (2021), Wang et al. (2021), Rosenthal et al. (2021), Su et al. (2021) und Dobie et al. (2019), zeigte auch diese Arbeit, dass Sternzellen nicht als funktionell einheitlich und räumlich gleichmäßig verteilt beschrieben werden können. Präliminäre Untersuchungen (vgl. Schwiering, 2019) und das durchgeführte Lineage Tracing-Experiment dieser Arbeit deuteten eine Zonierung der SMMHC/tdTomato⁺ HSC in der Zone 1 des Leberazinus an.

Tatsächlich konnte anhand von zonenspezifischen Markern gezeigt werden, dass SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen ausschließlich in Zone 1 des Leberazinus zu identifizieren sind. Aus diesem Grund wurde für SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen die Bezeichnung „Zone 1-HSC“ eingeführt.

Zur Demonstration der Zentralvenen-fernen Lage der Zone 1-HSC erfolgte die Anfärbung von Gewebeschnitten mit Antikörper gegen Glutamin-Synthetase (GS). Durch einen spezifischen Antikörper gegen Glutamin-Synthetase kann eine kleine Population von parenchymalen Leberzellen (Hepatozyten) um die Zentralvene markiert werden (Gebhardt und Mecke, 1983), welche, dem Modell des Leberazinus folgend (vgl.

Rappaport, 1976), Zone 3 spezifisch sind (Lamers et al., 1989). Da lediglich gezeigt werden sollte, dass Zone 1-HSC nicht in Kontakt mit der Zone 3 des Leberazinus stehen, war es für die hier erfolgten Untersuchungen nicht von Relevanz, dass GS nur Hepatozyten und nicht Sternzellen um die Zentralvene markiert (vgl. (Gebhardt und Mecke, 1983).

Eine Lage in der Portalvenen-nahen Zone 1 des Leberazinus wurde für die Zone 1-HSC vermutet. Dobie et al. (2019) wiesen mit Hilfe von Single-Cell RNA sequencing die Existenz von „Portal vein-associated HSCs“ (PaHSCs) sowie „Central vein-associated HSCs“ (CaHSCs) nach. Aus einem Pool von HSC-Genen wurden durch Dobie et al. (2019) spezifische Markergene für die beiden Sternzelltypen PaHSC und CaHSC ermittelt, NGFR stellte sich dabei als PaHSC spezifisch heraus. Um herauszufinden, ob es sich bei Zone 1-HSC um PaHSC handelt, wurden mit dem Marker NGFR Gewebeschnitte (Versuchstiere wurden an Tag 30 nach letzter Tamoxifengabe euthanasiert) angefärbt und auf eine Kolo-kalisation mit dem tdTomato Signal der Zone 1-HSC untersucht. Wie in Abbildung 8 ersichtlich, exprimieren Zone 1-HSC NGFR. Allerdings ist erkennbar, dass mittelständige NGFR⁺ Zellen kein tdTomato exprimieren. Daraus ergab sich wiederum die Frage, ob Zone 1-HSC eine Subpopulation der NGFR⁺ Sternzellen darstellen. Aus diesem Grund wurden Versuchstiere an Tag 180 nach letzter Tamoxifeninjektion euthanasiert und untersucht, ob alle NGFR⁺ Zellen nun auch ein tdTomato-Signal aufweisen. Es stellte sich heraus, dass auch nach 180 Tagen mittelständige NGFR⁺ Zellen kein SMMHC/tdTomato exprimieren. Schlussfolgernd handelt es sich bei Zone 1-HSC also um einen Sternzellensubtyp in der Zone 1 des Leberazinus, der gleichzeitig einen NGFR⁺ Subtyp der PaHSC darstellt.

Unter fibrotischen Bedingungen löste sich die Zone 1-spezifische Lokalisation dieses HSC-Subtyps jedoch auf. Zone 1-HSC (d.h. tdTomato Signale) waren dann auch in Zone 2 und 3 des Leberazinus zu identifizieren. Nach Regeneration der Leber waren Zone 1-HSC weiterhin über das gesamte Leberläppchen verteilt.

4.3 Progenitorzellnische der Zone 1-HSC

Das durchgeführte Lineage Tracing zeigte eine Zunahme an Zone 1-HSC im Zeitverlauf an. Mit Hilfe des Markers CK19 (wird im Gallengangepithel (Cholangiozyten) der Leber exprimiert (Chu und Weiss, 2002)) konnte gezeigt werden, dass Zone 1-HSC zu einem

frühen Zeitpunkt des Lineage Tracings vor allem im Bereich der Gallengänge von Portalfeldern identifizierbar sind. Eine Progenitorzellnische der Zone 1-HSC könnte also ebenfalls in diesem Bereich lokalisiert sein.

Die Herkunft der embryonalen HSC ist viel diskutiert (Kiassov et al., 1995; Enzan et al., 1997; Niki et al., 1999) und eine Progenitorzellnische bisher nicht bekannt. Allerdings wurden für Hepatozyten und Cholangiozyten sogenannte oval Zellen als Progenitorzellen, ebenfalls in der Nähe der Gallengänge, identifiziert (Evarts et al., 1996; Yasui et al., 1997; Roskams et al., 1998; Theise et al., 1999). Oval Zellen sind im Bereich der Hering-Kanäle nachzuweisen (Roskams et al., 2004; Katoonizadeh, 2017). Hering-Kanäle stellen wiederum den Übergangsbereich zwischen Gallenkanälchen und Gallengängen am Randbereich der Portalfelder dar (Roskams et al., 2004; Roskams, 2006; Lüllmann-Rauch und Asan, 2019) und scheinen ein günstiges Milieu für Progenitorzellen von Hepatozyten und Cholangiozyten zu bieten. Zusammengefasst mit den Ergebnissen dieser Arbeit scheint es möglich, dass die Progenitorzellnische der Zone 1-HSC ebenfalls in diesem Bereich lokalisiert ist.

4.4 SMMHC-Expression der Zone 1-HSC

tdTomato markierte alle Zellen der SMMHC-CreER^{T2}/tdTomato-Mauslinie, in welchen zum Zeitpunkt der Tamoxifengabe der SMMHC-Promotor aktiv war (vgl. Kretzschmar und Watt, 2012). Gleichzeitig zeigte die Anfärbung der Gewebeschnitte mit Antikörper gegen SMMHC aber, dass nicht alle Zone 1-HSC durch einen SMMHC-Antikörper markiert werden können und vor allem Portalfeldnahe Zone 1-HSC SMMHC exprimieren. Erklärend für die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Zone 1-HSC könnte ein gewandeltes Expressionsmuster mit veränderter Aktivität des SMMHC-Promotors sein.

In Zellen, die durch tdTomato markiert wurden, war der SMMHC-Promotor zum Zeitpunkt der Tamoxifeninjektion auf jeden Fall aktiv. Möglich ist, dass der SMMHC-Promotor danach nicht weiterhin aktiv blieb, denn Zone 1-HSC wären dann nicht durch den SMMHC-Antikörper anfärbbar, die bereits markierten Zellen aber weiterhin tdTomato⁺.

Da vor allem Zone 1-HSC im Bereich des Portalfeldes durch den SMMHC-Antikörper markiert wurden, lässt sich zusammengefasst mit den Ausführungen in 4.3, welche

die Lage einer eventuellen Progenitorzellnische der Zone 1-HSC um den Bereich des Portalfeldes eingegrenzen, vermuten, dass es sich bei den mit SMMHC-Antikörper markierten Sternzellen, um Vorläuferzellen der Zone 1-HSC handelt.

Interessanterweise zeigen bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Professor Friebe ein ähnliches Muster bei einer CreER^{T2}/tdTomato Mauslinie, die unter Kontrolle des PDGFR β -Promotors steht. Auch hier konnten mit einem Antikörper, der gegen PDGFR β gerichtet war, nicht alle tdTomato⁺ Zellen angefärbt werden.

4.5 Zone 1-HSC sind keine Vorläufer von Myofibroblasten

Hepatische Sternzellen wurden als Hauptquelle für Myofibroblasten in der fibrotischen Reaktion identifiziert (Mederacke et al., 2013), sind in der Wundheilung aktiv und nach Verletzung wichtiger Bestandteil der körpereigenen Reparaturmechanismen (Hinz et al., 2007). Die ununterbrochene chronische Aktivierung von Myofibroblasten sorgt für eine übermäßige Akkumulation von EZM und ist dysfunktional (Hinz, 2016).

Präliminäre Daten deuteten an, dass Zone 1-HSC in der Fibrose überraschenderweise nicht zu Myofibroblasten differenzieren (Schwiering, 2019). In dieser Arbeit sollte daher die Differenzierung der Zone 1-HSC zu Myofibroblasten überprüft werden. Hierfür wurde α SMA als Myofibroblasten-Marker genutzt (Darby et al., 1990; Ramadori et al., 1990; Friedman, 2008; Bochaton-Piallat et al., 2016).

4.5.1 Untersuchung der Zone 1-HSC auf Differenzierung zu Myofibroblasten

Durch Single-Cell-RNA-Sequencing gewonnene Daten lassen die funktionelle Einheit der hepatischen Sternzellen hinterfragen und rücken die strukturelle und funktionelle Heterogenität von HSC in den Vordergrund (Dobie et al., 2019; Rosenthal et al., 2021; Wang et al., 2021; Payen et al., 2021).

Payen et al., (2021) beschrieben so beispielsweise Sternzellpopulationen (Glypican-3 (GPC3)⁺ Sternzellen und Dopamin-beta-Hydroxylase exprimierende (DBH⁺) Sternzellen), die sowohl anhand ihrer räumlichen Verteilung im Leberläppchen, als auch in funktioneller Hinsicht differenzierbar sind. Die Zentralvenen- und Portalfeld-assoziierten GPC3⁺ Sternzellen, exprimieren verstärkt Gene, welche Relevanz im Glycosaminoglykan-Stoffwechsel zeigen (Payen et al., 2021). DBH⁺ Sternzellen

dahingegen sind perisinusoidal lokalisiert und weisen ein für Immunzellen typisches Genmuster auf (Payen et al., 2021).

Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte im Rahmen dieser Arbeit eindrücklich gezeigt werden, dass Zone 1-HSC nicht zu Myofibroblasten differenzieren und sie demnach nicht nur anhand der räumlichen Zonierung (Zone 1), sondern auch anhand funktioneller Gesichtspunkte (ausbleibende Differenzierung zu Myofibroblasten) von anderen Sternzellen abgrenzbar sind.

Schwiering (2019) formulierte die Theorie, Zone 1-HSC könnten möglicherweise Sternzellen ersetzen, die aufgrund vorangegangener Verletzungen zu Myofibroblasten differenziert sind und dadurch die Funktionalität der Leber aufrechterhalten. Der Theorie folgend müssten Zone 1-HSC demnach auch das Potential besitzen, bei wiederholter Verletzung zu Myofibroblasten zu differenzieren. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde im Rahmen der Arbeit ein Experiment entwickelt, in welchem zwei fibrotische Reaktionen mit intermittierender Regenerationszeit aufeinander folgten. Nach Auslösung der zweiten fibrotischen Reaktion differenzierten Zone 1-HSC jedoch nicht zu Myofibroblasten und ersetzten Sternzellen nicht, die bereits in der vorherigen Fibrose zu Myofibroblasten differenziert waren, womit Schwierings Theorie widerlegt werden konnte.

Trotz des Nachweises einer ausbleibenden Differenzierung der Zone 1-HSC zu Myofibroblasten, gilt es zu beachten, dass im Rahmen dieser Arbeit eine Charakterisierung lediglich anhand eines Fibrosemodells (CCl₄) erfolgte. Wang et al. (2021) richten die Aufmerksamkeit darauf, dass Sternzellen abhängig vom verwendeten Fibrosemodell (Gallengangligatur bzw. CCl₄) ein unterschiedliches funktionelles Verhalten vorweisen können. Gezeigt wurde dies bei Transcription Factor 21 (Tcf21)-CreER^{T2}/tdTomato-Reportermäusen (Tcf21 wurde als spezifische Marker von ruhenden HSC identifiziert (Wang et al., 2021)), in welchen eine fibrotische Reaktion durch Gallengangligatur bzw. CCl₄ induziert wurde. Tcf21⁺ Sternzellen, die insbesondere um die portalen und zentralen Venen der Leber zu identifizieren sind, proliferierten bei mit CCl₄ induzierter Fibrose vor allem perizentral und wurden zu Myofibroblasten aktiviert. Durch Gallengangligatur induzierte Fibrose hingegen zog eine Proliferation der periportal gelegenen Tcf21⁺ HSC sowie Aktivierung jener zu Myofibroblasten nach sich (Wang et al., 2021).

Für diese Arbeit kann daraus abgeleitet werden, dass weiterführende Untersuchungen der Zone 1-HSC auch unter Zuhilfenahme anderer Fibrosemodelle (z.B. Gallengangligatur) erfolgen müssen. Trotzdem kann, unabhängig des gewählten Fibrosemodells, durch die Ergebnisse dieser Arbeit festgehalten werden, dass Sternzellen nicht generell in der Fibrose zu Myofibroblasten differenzieren.

Deshalb stellte sich die Frage nach der Funktion dieses Sternzellsubtyps. Initiativ erfolgte aus diesem Grund die Untersuchung der Zone 1-HSC in der sinusoidalen Kapillarisation der Leber.

4.5.2 Untersuchung der Zone 1-HSC als Perizyten in Kapillarisation

Prinzipiell stehen Endothelzellen im Fokus der Gefäßdifferenzierung und -remodellierung (Lee et al., 2007). Dennoch wird der Einfluss der hepatischen Sternzellen auf die Angiogenese und den Gefäßumbau der Leber in der Literatur immer wieder aufgegriffen (vgl. Thabut und Shah, 2010; Lee et al., 2007). Hepatische Sternzellen spielen demnach in der fibrotischen Reaktion nicht nur eine Rolle als EZM-bildende Myofibroblasten (Mederacke et al., 2013), sondern sind z.B. auch am sinusoidalen Gefäßumbau durch das Umwickeln von Sinusoiden beteiligt (Semela et al., 2008).

Um Zone 1-HSC in der Kapillarisation zu untersuchen, wurde ein Antikörper gegen das Basalmembranprotein Laminin als Marker eingesetzt (vgl. Hahn et al., 1980; Parise et al., 1985; Su et al., 2021), da die Ausbildung einer Basalmembran im Zuge einer fibrotischen Reaktion nachgewiesen werden kann (=Kapillarisation der Sinusoide) (Schaffner und Popper, 1963). Neben Laminin wurde zudem CD34 als Marker für Kapillarisationvorgänge in der Leber genutzt (Desroches-Castan et al., 2019; Frachon et al., 2001). CD34 ist ein Transmembranprotein (Lanza et al., 2001) und wird verstärkt in Folge der Kapillarisation von LSECs exprimiert (Couvelard et al., 1993; Fischer et al., 2008; Su et al., 2021).

Unter fibrotischen Bedingungen waren in den Ergebnissen dieser Arbeit ausgeprägte, feine Fortsätze der Zone 1-HSC-Zellkörper erkennbar, welche Sinusoide mit ausgebildeter Basalmembran kreisrund umschlossen. Semela et al. (2008) beschreibt parallel dazu, dass hepatische Sternzellen in der Fibrose verstärkt Sinusoide umwickeln, wobei kritisch anzumerken ist, dass die Qualität der mikroskopischen Aufnahmen, auf welchen die Beobachtungen von Semela et al. (2008) fußen, als eher nicht

zufriedenstellend einzustufen sind. Im Fokus der Untersuchungen von Semela et al. (2008) stand allerdings PDGF. Mit Gallengangligatur wurde eine fibrotische Reaktion in Versuchsmäusen induziert, wobei sich zeigte, dass der PDGF-Inhibitor Imatinib eine Reduktion der portalen Hypertension hervorruft. Gleichzeitig wurde der Fibrosegrad der untersuchten Mäuse nicht verringert, obwohl gleichzeitig die Reduktion von α SMA⁺ Sternzellen nachweisbar war. Vermutet wurde daher, dass heterogene Sternzellpopulationen existieren, von denen einige eher fibrotische Aufgaben und andere eher gefäßbezogene Aufgaben übernehmen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die Vermutung von Semela et al. (2008), es würden Sternzellen in der Leber existieren, die eher gefäßbezogene Aufgaben haben, da Zone 1-HSC in der Fibrose nicht zu Myofibroblasten differenzieren und nach Fibroseinduktion Sinusoide umwickeln. Die Tatsache, dass Zone 1-HSC nach Fibroseinduktion nicht direkt in der fibrotischen Narbe zu identifizieren sind, sondern über das gesamte Leberläppchen verteilt, ist also möglicherweise durch den Aufbau echter Kapillaren während der fibrotischen Reaktion zu begründen. Diese Vermutung unterstützend beschreiben auch Lee et al. (2007) die Notwendigkeit der Migration von Sternzellen (wie es die Zonierungsauflösung von Zone 1-HSC darstellt), um in der Fibrose das verstärkte Umwickeln der Sinusoide durch Sternzellen überhaupt zu realisieren.

Im Kontrast dazu konnte durch die Anfärbung der Gewebeschnitte mit Antikörper gegen CD34 das Umwickeln der Sinusoide durch Zone 1-HSC nicht untermauert werden, was gegebenenfalls auf die durch den Marker markierten Strukturen zurückzuführen ist. Couvelard et al. (1993) zeigte, dass durch Anti-CD34 hauptsächlich vereinzelte Endothelzellen, insbesondere in der Peripherie der fibrotisch geschädigten Leber, markiert werden, wohingegen Anti-Laminin kapillarisierte Sinusoide über das gesamte Leberläppchen markiert. Couvelard et al. (1993) argumentierten, die lückenhafte Expression von CD31 und CD34 (interzelluläre Adhäsionsmoleküle) in der nicht fibrotischen Leber würde der reduzierten Anzahl von Zell-Zell-Kontakten entsprechen, die natürlicherweise in diskontinuierlichen Kapillaren vorzufinden sind. Während der Fibrose sei zwar eine verstärkte Expression von insbesondere CD31 (und CD34) nachzuweisen, dennoch beobachteten auch Couvelard et al. (1993) eine nicht komplett durchgängige Expression von CD31 und CD34 entlang der Sinusoide.

Dadurch könnte in einem Querschnitt der Sinusoide mit CD34 als Marker das Umwickeln durch Zone 1-HSC nur unzureichend dargestellt werden. Die Basalmembran hingegen, welche durch Laminin-Antikörper markiert wird, ist kontinuierlich ausgebildet und die Anfärbung damit nicht lückenhaft.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ausläufer der Zone 1-HSC-Zellkörper kapillarisierte Sinusoide umwickeln. Die Ausbildung einer Basalmembran scheint der Migration von Zone 1-HSC voranzugehen, da Zone 1-HSC stets Sinusoide mit ausgebildeter Basalmembran umwickeln, aber gleichzeitig im Gewebeschnitt Sinusoide mit Basalmembran zu identifizieren sind, welche nicht durch die Ausläufer der Zone 1-HSC-Zellkörper umwickelt sind. Der Zusammenhang sollte in weiteren Untersuchungen genauer betrachtet werden, auch unter Einbeziehung weiterer Kapillarisierungsmarker und anderer Fibrosemodelle (z.B. Gallengangligatur).

Zusammenfassung

Die im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnisse liefern neue Erkenntnisse über einen neuen Sternzellsubtyp der murinen Leber. Bei Gewebeverletzung differenzieren Sternzellen im Allgemeinen zu Myofibroblasten, welche Extrazellulärmatrix produzieren. Des Weiteren sind Sternzellen die Perizyten der Leber und spielen eine Rolle in der Angiogenese und Gefäßremodellierung.

Der in präliminären Untersuchungen identifizierte Sternzellsubtyp zeichnet sich durch die Expression von tdTomato in Abhängigkeit des SMMHC-Promotors aus (SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen). In dieser Arbeit wurden SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen immunhistochemisch unter physiologischen und fibrotischen Bedingungen untersucht.

Mit Hilfe von Lineage Tracing konnte zunächst die Zellmauserung der SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen gezeigt werden. Durch Leberzonen-spezifische Marker wurde daraufhin nachgewiesen, dass SMMHC/tdTomato⁺ Sternzellen in Zone 1 des Leberazinus lokalisiert sind, weswegen diese Zellen im Weiteren „Zone 1-HSC“ genannt wurden. Als potenzielle Progenitorzellnische der Zone 1-HSC wurde das Portalfeld eingegrenzt.

Außerdem wurde die Funktion der Zone 1-HSC in der CCl₄-induzierten Leberfibrose untersucht. Es stellte sich heraus, dass Zone 1-HSC bereits früh in der Fibrose die Zonierung verlieren und diese auch nach Regenerationszeit nicht wiederhergestellt wird. Es wurde nachgewiesen, dass Zone 1-HSC nicht zu Myofibroblasten differenzieren. Stattdessen spielen Zone 1-HSC möglicherweise eine Rolle in der sinusoidalen Kapillarisation in Folge einer CCl₄-induzierten Fibrose.

Literaturverzeichnis

- Acharya, P., Chouhan, K., Weiskirchen, S. & Weiskirchen, R. 2021. Cellular Mechanisms of Liver Fibrosis. *Front Pharmacol*, 12, 671640.
- Ahern, M., Hall, P., Halliday, J., Liddle, C., Olynyk, J., Ramm, G., Denk, H., Desmet, V., Geerts, A., Petersen, T., Balabaud, C., Bioulac-sage, P., Clement, B., Housset, C., Loreal, O., Mallat, A., Mavier, P., Rosenbaum, J. & Zern, M. 1996. Hepatic stellate cell nomenclature. *Hepatology*, 23, 193.
- Armulik, A., Abramsson, A. & Betsholtz, C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97, 512-23.
- Armulik, A., Genové, G. & Betsholtz, C. 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21, 193-215.
- Bachem, M. G., Melchior, R. & Gressner, A. M. 1989. The role of thrombocytes in liver fibrogenesis: effects of platelet lysate and thrombocyte-derived growth factors on the mitogenic activity and glycosaminoglycan synthesis of cultured rat liver fat storing cells. *J Clin Chem Clin Biochem*, 27, 555-65.
- Ballardini, G., Fallani, M., Biagini, G., Bianchi, F. B. & Pisi, E. 1988. Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 56, 45-9.
- Bansal, M. B. 2016. Hepatic stellate cells: fibrogenic, regenerative or both? Heterogeneity and context are key. *Hepatol Int*, 10, 902-908.
- Bao, Y.-L., Wang, L., Pan, H.-T., Zhang, T.-R., Chen, Y.-H., Xu, S.-J., Mao, X.-L. & Li, S.-W. 2021. Animal and Organoid Models of Liver Fibrosis. *Frontiers in Physiology*, 12.
- Bataller, R. & Brenner, D. A. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115, 209-18.
- Bertogg-Seegers, K. & Kuntzen, T. 2013. Lebererkrankungen In: Fried, M., Manns, M. P., Rogler, G., Luescher, T. & Steffel, J. (eds.) *Magen-Darm-Trakt*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bianchi, F. B., Biagini, G., Ballardini, G., Cenacchi, G., Faccani, A., Pisi, E., Laschi, R., Liotta, L. & Garbisa, S. 1984. Basement membrane production by hepatocytes in chronic liver disease. *Hepatology*, 4, 1167-72.
- Bochaton-Piallat, M. L., Gabbiani, G. & Hinz, B. 2016. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. *F1000Res*, 5.
- Bosetti, F. 2007. Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models. *J Neurochem*, 102, 577-86.
- Brenner, D. A., Kisseleva, T., Scholten, D., Paik, Y. H., Iwaisako, K., Inokuchi, S., Schnabl, B., Seki, E., De Minicis, S., Oesterreicher, C. & Taura, K. 2012. Origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 5, S17.
- Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J.-M., King, N. E., Howells, D. W. & Sutherland, B. A. 2019. Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13.
- Buchwalow, I. B. & Böcker, W. 2010. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*, Springer Berlin.
- Canbay, A., Higuchi, H., Bronk, S. F., Tani, M., Sebo, T. J. & Gores, G. J. 2002. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: A link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology*, 123, 1323-1330.

- Capecchi, M. R. 1989. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet*, 5, 70-6.
- Chinwalla, A. T., Cook, L. L., Delehaunty, K. D., Fewell, G. A., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Graves, T. A., Hillier, L. W., Mardis, E. R., McPherson, J. D., Miner, T. L., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Pepin, K. H., Pohl, C. S., Ponce, T. C., Schultz, B., Thompson, J., Trevaskis, E., Waterston, R. H., Wendl, M. C., Wilson, R. K., Yang, S.-P. & Et Al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 520-562.
- Chu, P. G. & Weiss, L. M. 2002. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*, 40, 403-39.
- Couvelard, A., Scoazec, J. Y. & Feldmann, G. 1993. Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. *Am J Pathol*, 143, 738-52.
- Cuevas, P., Gutierrez-Diaz, J. A., Reimers, D., Dujovny, M., Diaz, F. G. & Ausman, J. I. 1984. Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anat Embryol (Berl)*, 170, 155-9.
- Dangel, O., Mergia, E., Karlisch, K., Groneberg, D., Koesling, D. & Friebe, A. 2010. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost*, 8, 1343-52.
- Darby, I., Skalli, O. & Gabbiani, G. 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 63, 21-29.
- Davis, B. H. & Vucic, A. 1988. The effect of retinol on Ito cell proliferation in vitro. *Hepatology*, 8, 788-93.
- Deaton, R. A., Bulut, G., Serbulea, V., Salamon, A., Shankman, L. S., Nguyen, A. T. & Owens, G. K. 2023. A New Autosomal Myh11-CreERT2 Smooth Muscle Cell Lineage Tracing and Gene Knockout Mouse Model; Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 43, 203-211.
- Deleve, L. D. 2015. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology*, 61, 1740-1746.
- Desroches-Castan, A., Tillet, E., Ricard, N., Ouarné, M., Mallet, C., Belmudes, L., Couté, Y., Boillot, O., Scoazec, J.-Y., Bailly, S. & Feige, J.-J. 2019. Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Paracrine Factor Controlling Liver Sinusoidal Endothelial Cell Fenestration and Protecting Against Hepatic Fibrosis. *Hepatology*, 70, 1392-1408.
- Dezsó, K., Paku, S., Kóbori, L., Thorgeirsson, S. S. & Nagy, P. 2022. What Makes Cirrhosis Irreversible?—Consideration on Structural Changes. *Frontiers in Medicine*, 9.
- Dobie, R., Wilson-Kanamori, J. R., Henderson, B. E. P., Smith, J. R., Matchett, K. P., Portman, J. R., Wallenborg, K., Picelli, S., Zagorska, A., Pendem, S. V., Hudson, T. E., Wu, M. M., Budas, G. R., Breckenridge, D. G., Harrison, E. M., Mole, D. J., Wigmore, S. J., Ramachandran, P., Ponting, C. P., Teichmann, S. A., Marioni, J. C. & Henderson, N. C. 2019. Single-Cell Transcriptomics Uncovers Zonation of Function in the Mesenchyme during Liver Fibrosis. *Cell Rep*, 29, 1832-1847.e8.
- Drinane, M. C., Yaqoob, U., Yu, H., Luo, F., Greuter, T., Arab, J. P., Kostallari, E., Verma, V. K., Maiers, J., De Assuncao, T. M., Simons, M., Mukhopadhyay, D., Kisseleva, T., Brenner, D. A., Urrutia, R., Lomberk, G., Gao, Y., Ligresti, G.,

- Tschumperlin, D. J., Revzin, A., Cao, S. & Shah, V. H. 2017. Synectin promotes fibrogenesis by regulating PDGFR isoforms through distinct mechanisms. *JCI Insight*, 2.
- Enzan, H., Himeno, H., Hiroi, M., Kiyoku, H., Saibara, T. & Onishi, S. 1997. Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microsc Res Tech*, 39, 336-49.
- Evarts, R. P., Hu, Z., Omori, N., Omori, M., Marsden, E. R. & Thorgeirsson, S. S. 1996. Precursor-product relationship between oval cells and hepatocytes: comparison between tritiated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers. *Carcinogenesis*, 17, 2143-51.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., Lemeur, M., Metzger, D. & Chambon, P. 1996. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10887-90.
- Feil, S., Valtcheva, N. & Feil, R. 2009. Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol*, 530, 343-63.
- Fernando, N. V. P. & Movat, H. Z. 1964. The fine structure of the terminal vascular bed: III. The capillaries. *Experimental and Molecular Pathology*, 3, 87-97.
- Fiebig, T., Boll, H., Figueiredo, G., Kerl, H. U., Nittka, S., Groden, C., Kramer, M. & Brockmann, M. A. 2012. Three-dimensional in vivo imaging of the murine liver: a micro-computed tomography-based anatomical study. *PLoS One*, 7, e31179.
- Fischer, H. P., Flucke, U. & Zhou, H. 2008. Pathology along the liver sinusoids: endothelial and perisinusoidal findings. *Pathologe*, 29, 37-46.
- Frachon, S., Gouysse, G., Dumortier, J., Couvelard, A., Nejjari, M., Mion, F., Berger, F., Paliard, P., Boillot, O. & Scoazec, J.-Y. 2001. Endothelial cell marker expression in dysplastic lesions of the liver: an immunohistochemical study. *Journal of Hepatology*, 34, 850-857.
- Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123, 4195-200.
- Friedman, S. L. 1993. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med*, 328, 1828-35.
- Friedman, S. L. 2003. Liver fibrosis – from bench to bedside. *Journal of Hepatology*, 38, 38-53.
- Friedman, S. L. 2008. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 88, 125-72.
- Fujimoto, T. & Singer, S. J. 1987. Immunocytochemical studies of desmin and vimentin in pericapillary cells of chicken. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 35, 1105-1115.
- Gaça, M. D., Zhou, X., Issa, R., Kiriella, K., Iredale, J. P. & Benyon, R. C. 2003. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol*, 22, 229-39.
- Gebhardt, R. & Mecke, D. 1983. Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *Embo j*, 2, 567-70.
- Geerts, A., Vrijssen, R., Rauterberg, J., Burt, A., Schellinck, P. & Wisse, E. 1989. In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J Hepatol*, 9, 59-68.

- Gerhardt, H., Wolburg, H. & Redies, C. 2000. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Developmental Dynamics*, 218, 472-479.
- Gerok, W. & Blum, H. E. 1995. *Hepatologie*, München; Wien; Baltimore, Urban & Schwarzenberg.
- Groneberg, D., König, P., Wirth, A., Offermanns, S., Koesling, D. & Friebe, A. 2010. Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation*, 121, 401-9.
- Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H. & Rajewsky, K. 1994. Deletion of a DNA Polymerase β Gene Segment in T Cells Using Cell Type-Specific Gene Targeting. *Science*, 265, 103-106.
- Hahn, E., Wick, G., Pencev, D. & Timpl, R. 1980. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut*, 21, 63-71.
- Heldin, P., Pertoft, H., Nordlinder, H., Heldin, C. H. & Laurent, T. C. 1991. Differential expression of platelet-derived growth factor alpha- and beta- receptors on fat-storing cells and endothelial cells of rat liver. *Exp Cell Res*, 193, 364-9.
- Hellerbrand, C. 2013. Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver. *Pflugers Arch*, 465, 775-8.
- Henderson, N. C., Arnold, T. D., Katamura, Y., Giacomini, M. M., Rodriguez, J. D., Mccarty, J. H., Pellicoro, A., Raschperger, E., Betsholtz, C., Ruminski, P. G., Griggs, D. W., Prinsen, M. J., Maher, J. J., Iredale, J. P., Lacy-Hulbert, A., Adams, R. H. & Sheppard, D. 2013. Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nature Medicine*, 19, 1617-1624.
- Hinz, B. 2016. Myofibroblasts. *Exp Eye Res*, 142, 56-70.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L. & Gabbiani, G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 170, 1807-16.
- Hoess, R. H. & Abremski, K. 1984. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 1026-9.
- Houdebine, L. M. 2007. Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol*, 360, 163-202.
- Hsu, Y.-C. 2015. Theory and Practice of Lineage Tracing. *Stem Cells*, 33, 3197-3204.
- Huet, P. M., Goresky, C. A., Villeneuve, J. P., Marleau, D. & Lough, J. O. 1982. Assessment of liver microcirculation in human cirrhosis. *J Clin Invest*, 70, 1234-44.
- Hughes, S. & Chan-Ling, T. 2004. Characterization of Smooth Muscle Cell and Pericyte Differentiation in the Rat Retina In Vivo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, 2795-2806.
- Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J. M., Xiao, J. H., Chambon, P. & Metzger, D. 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res*, 27, 4324-7.
- Inoué, S. 2006. Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. In: Pawley, J. B. (ed.) *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. Boston, MA: Springer US.

- Iredale, J. P. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 43-54.
- Issa, R., Williams, E., Trim, N., Kendall, T., Arthur, M. J., Reichen, J., Benyon, R. C. & Iredale, J. P. 2001. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut*, 48, 548-57.
- Ito, T. 1951. Cytological studies on stellate cells of Kupffer and fat-storing cells in the capillary wall of human liver (abstract). *Acta Anat Jpn*, 26, 42.
- Ito, T. & Nemoto, M. 1952. Kupfer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 24, 243-58.
- Ito, T. & Shibasaki, S. 1968. Electron microscopic study on the hepatic sinusoidal wall and the fat-storing cells in the normal human liver. *Arch Histol Jpn*, 29, 137-92.
- Jain, R., Fischer, S., Serra, S. & Chetty, R. 2010. The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 18, 9-15.
- Kapuściński, J. & Szer, W. 1979. Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Res*, 6, 3519-34.
- Katoonizadeh, A. 2017. Chapter 7 - Liver Regeneration. In: Muriel, P. (ed.) *Liver Pathophysiology*. Boston: Academic Press.
- Kiassov, A. P., Van Eyken, P., Van Pelt, J. F., Depla, E., Fevery, J., Desmet, V. J. & Yap, S. H. 1995. Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an immunohistochemical and morphometric study. *Differentiation*, 59, 253-8.
- Knorr, A., Hirth-Dietrich, C., Alonso-Alija, C., Härter, M., Hahn, M., Keim, Y., Wunder, F. & Stasch, J. P. 2008. Nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase by BAY 60-2770 in experimental liver fibrosis. *Arzneimittelforschung*, 58, 71-80.
- Kountouras, J., Billing, B. H. & Scheuer, P. J. 1984. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*, 65, 305-11.
- Kretzschmar, K. & Watt, Fiona m. 2012. Lineage Tracing. *Cell*, 148, 33-45.
- Kruepunga, N., Hakvoort, T. B. M., Hikspoors, J. P. J. M., Köhler, S. E. & Lamers, W. H. 2019. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865, 869-878.
- Kupffer, C. 1876. Ueber Sternzellen der Leber. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 12, 353-358.
- Lamers, W. H., Hilberts, A., Furt, E., Smith, J., Jonges, G. N., Van Noorden, C. J. F., Janzen, J. W. G., Charles, R. & Moorman, A. F. M. 1989. Hepatic enzymic zonation: A reevaluation of the concept of the liver acinus. *Hepatology*, 10, 72-76.
- Lanza, F., Healy, L. & Sutherland, D. R. 2001. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J Biol Regul Homeost Agents*, 15, 1-13.
- Lee, J. S., Semela, D., Iredale, J. & Shah, V. H. 2007. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: A new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology*, 45, 817-825.
- Lefebvre, E., Moyle, G., Reshef, R., Richman, L. P., Thompson, M., Hong, F., Chou, H. L., Hashiguchi, T., Plato, C., Poulin, D., Richards, T., Yoneyama, H., Jenkins, H., Wolfgang, G. & Friedman, S. L. 2016. Antifibrotic Effects of the Dual

- CCR2/CCR5 Antagonist Cenicriviroc in Animal Models of Liver and Kidney Fibrosis. *PLoS One*, 11, e0158156.
- Li, Z. W., Stark, G., Götz, J., Rülcke, T., Gschwind, M., Huber, G., Müller, U. & Weissmann, C. 1996. Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6158-62.
- Lichtman, J. W. & Conchello, J.-A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2, 910-919.
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P. & Betsholtz, C. 1997. Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice. *Science*, 277, 242-245.
- Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G. & Evan, G. I. 1995. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res*, 23, 1686-90.
- Ludwig, J. 1993. The nomenclature of chronic active hepatitis: an obituary. *Gastroenterology*, 105, 274-8.
- Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. 2019. In: Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. (eds.) *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- Macdonald, P. N. & Ong, D. E. 1988. Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 12478-12482.
- Maher, J. J. & Mcguire, R. F. 1990. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest*, 86, 1641-8.
- Mak, K. M., Leo, M. A. & Lieber, C. S. 1984. Alcoholic liver injury in baboons: Transformation of lipocytes to transitional cells. *Gastroenterology*, 87, 188-200.
- Martinez-Hernandez, A. & Martinez, J. 1991. The role of capillarization in hepatic failure: Studies in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology*, 14, 864-874.
- Matsuoka, M. & Tsukamoto, H. 1990. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology*, 11, 599-605.
- Matthews, B. G., Ono, N. & Kalajzic, I. 2020. Chapter 81 - Methods in lineage tracing. In: Bilezikian, J. P., Martin, T. J., Clemens, T. L. & Rosen, C. J. (eds.) *Principles of Bone Biology (Fourth Edition)*. Academic Press.
- Mauad, T. H., Van Nieuwkerk, C. M., Dingemans, K. P., Smit, J. J., Schinkel, A. H., Notenboom, R. G., Van Den Bergh Weerman, M. A., Verkruisen, R. P., Groen, A. K., Oude Elferink, R. P. & Et Al. 1994. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*, 145, 1237-45.
- Mazanet, R. & Franzini-Armstrong, C. 1982. Scanning electron microscopy of pericytes in rat red muscle. *Microvasc Res*, 23, 361-9.
- Mazza, G., Al-Akkad, W. & Rombouts, K. 2017. Engineering in vitro models of hepatofibrogenesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 121, 147-157.
- Mederacke, I., Hsu, C. C., Troeger, J. S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D. H., Pradere, J. P. & Schwabe, R. F. 2013. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun*, 4, 2823.

- Melton, A. C. & Yee, H. F. 2007. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology*, 45, 1446-53.
- Mercado-Irizarry, A. & Torres, E. A. 2016. Cryptogenic cirrhosis: Current knowledge and future directions. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, 7, 69-72.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H. & Chambon, P. 1995. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6991-5.
- Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Grappone, C., Pellegrini, G., Pinzani, M., Casini, A., Calabró, A., Ciancio, G., Stefanini, F. & Et Al. 1994. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol*, 144, 528-37.
- Minot, C. S. 1900. On the hitherto unrecognized form of blood circulation without capillaries in the organs of vertebrates. *J Boston Soc Med Sci*, 4, 133-134.
- Mokdad, A. A., Lopez, A. D., Shahrzad, S., Lozano, R., Mokdad, A. H., Stanaway, J., Murray, C. J. & Naghavi, M. 2014. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med*, 12, 145.
- Moradpour, D. & Lammert, F. 2020. Leber. In: Blum, H. E., Müller-Wieland, D. & Siegenthaler, W. (eds.) *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag.
- Müller, A., Machnik, F., Zimmermann, T. & Schubert, H. 1988. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats usefulness and reliability of this animal model. *Experimental Pathology*, 34, 229-236.
- Nagatsuma, K., Hayashi, Y., Hano, H., Sagara, H., Murakami, K., Saito, M., Masaki, T., Lu, T., Tanaka, M., Enzan, H., Aizawa, Y., Tajiri, H. & Matsuura, T. 2009. Lecithin: retinol acyltransferase protein is distributed in both hepatic stellate cells and endothelial cells of normal rodent and human liver. *Liver Int*, 29, 47-54.
- Niki, T., Pekny, M., Hellems, K., Bleser, P. D., Berg, K. V., Vaeyens, F., Quartier, E., Schuit, F. & Geerts, A. 1999. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 29, 520-7.
- Nouchi, T., Tanaka, Y., Tsukada, T., Sato, C. & Marumo, F. 1991. Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis. *Liver*, 11, 100-5.
- Orrego, H., Blendis, L. M., Crossley, I. R., Medline, A., Macdonald, A., Ritchie, S. & Israel, Y. 1981. Correlation of intrahepatic pressure with collagen in the Disse space and hepatomegaly in humans and in the rat. *Gastroenterology*, 80, 546-556.
- Parise, E. R., Summerfield, J. A., Hahn, E., Wiedmann, K. H. & Doenhoff, M. J. 1985. Basement membrane proteins and type III procollagen in murine schistosomiasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79, 663-670.
- Payen, V. L., Lavergne, A., Alevra Sarika, N., Colonval, M., Karim, L., Deckers, M., Najimi, M., Coppieters, W., Charlotheaux, B., Sokal, E. M. & El Taghdouini, A. 2021. Single-cell RNA sequencing of human liver reveals hepatic stellate cell heterogeneity. *JHEP Reports*, 3, 100278.
- Phifer-Rixey, M. & Nachman, M. W. 2015. Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. *Elife*, 4.
- Pinzani, M., Failli, P., Ruocco, C., Casini, A., Milani, S., Baldi, E., Giotti, A. & Gentilini, P. 1992. Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest*, 90, 642-6.

- Pinzani, M., Milani, S., Grappone, C., Weber, F. L., Jr., Gentilini, P. & Abboud, H. E. 1994. Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury. *Hepatology*, 19, 701-7.
- Ramachandran, P., Matchett, K. P., Dobie, R., Wilson-Kanamori, J. R. & Henderson, N. C. 2020. Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 17, 457-472.
- Ramadori, G., Veit, T., Schwögler, S., Dienes, H. P., Knittel, T., Rieder, H. & Meyer Zum Büschenfelde, K. H. 1990. Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 59, 349-57.
- Rappaport, A. M. 1976. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr Pathol*, 157, 215-43.
- Rockey, D. C., Housset, C. N. & Friedman, S. L. 1993. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest*, 92, 1795-804.
- Roehlen, N., Crouchet, E. & Baumert, T. F. 2020. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9.
- Rosenthal, S. B., Liu, X., Ganguly, S., Dhar, D., Pasillas, M. P., Ricciardelli, E., Li, R. Z., Troutman, T. D., Kisseleva, T., Glass, C. K. & Brenner, D. A. 2021. Heterogeneity of HSCs in a Mouse Model of NASH. *Hepatology*, 74, 667-685.
- Roskams, T. 2006. Different types of liver progenitor cells and their niches. *Journal of Hepatology*, 45, 1-4.
- Roskams, T., De Vos, R., Van Eyken, P., Myazaki, H., Van Damme, B. & Desmet, V. 1998. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatol*, 29, 455-63.
- Roskams, T. A., Theise, N. D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P. S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E. M., Crawford, J. M., Crosby, H. A., Desmet, V., Finegold, M. J., Geller, S. A., Gouw, A. S., Hytioglou, P., Knisely, A. S., Kojiro, M., Lefkowitz, J. H., Nakanuma, Y., Olynyk, J. K., Park, Y. N., Portmann, B., Saxena, R., Scheuer, P. J., Strain, A. J., Thung, S. N., Wanless, I. R. & West, A. B. 2004. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*, 39, 1739-45.
- Rucker, H. K., Wynder, H. J. & Thomas, W. E. 2000. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull*, 51, 363-9.
- Saile, B. & Ramadori, G. 2007. Fibrogenese – Zirrhose. *Der Gastroenterologe*, 2, 228-237.
- Schaffner, F. & Popper, H. 1963. Capillarization of Hepatic Sinusoids in Man. *Gastroenterology*, 44, 239-242.
- Scherrer, L. C., Picard, D., Massa, E., Harmon, J. M., Simons, S. S., Jr., Yamamoto, K. R. & Pratt, W. B. 1993. Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry*, 32, 5381-6.
- Scheuer, P. J. 1991. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol*, 13, 372-4.
- Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C. & Weiskirchen, R. 2015. The carbon tetrachloride model in mice. *Laboratory Animals*, 49, 4-11.
- Schulze, R. J., Schott, M. B., Casey, C. A., Tuma, P. L. & Mcniven, M. A. 2019. The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *Journal of Cell Biology*, 218, 2096-2112.

- Schuppan, D. 1990. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis*, 10, 1-10.
- Schwiering, F. 2019. *Lokalisation und Bedeutung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase bei der Leberfibrose in der Maus*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Semela, D., Das, A., Langer, D., Kang, N., Leof, E. & Shah, V. 2008. Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function. *Gastroenterology*, 135, 671-9.
- Senoo, H., Kojima, N. & Sato, M. 2007. Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam Horm*, 75, 131-59.
- Shang, L., Hosseini, M., Liu, X., Kisseleva, T. & Brenner, D. A. 2018. Human hepatic stellate cell isolation and characterization. *Journal of Gastroenterology*, 53, 6-17.
- Shiratori, Y., Ichida, T., Geerts, A. & Wisse, E. 1987. Modulation of collagen synthesis by fat-storing cells, isolated from CCl₄- or vitamin A-treated rats. *Dig Dis Sci*, 32, 1281-9.
- Singleton, G. & Krebs, C. 2007. The Secret World of Wild Mice. *The Mouse in Biomedical Research*, 1, 25-51.
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzouana, G., Gillessen, D. & Gabbiani, G. 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*, 103, 2787-96.
- Slater, T. F., Cheeseman, K. H. & Ingold, K. U. 1985. Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 311, 633-45.
- Smith, A. J., De Sousa, M. A., Kwabi-Addo, B., Heppell-Parton, A., Impey, H. & Rabbitts, P. 1995. A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nat Genet*, 9, 376-85.
- Sternberg, N. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at lox sites. *J Mol Biol*, 150, 603-8.
- Sternberg, N. & Hamilton, D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 150, 467-86.
- Sternberg, N., Hamilton, D. & Hoess, R. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol*, 150, 487-507.
- Stratman, A. N., Malotte, K. M., Mahan, R. D., Davis, M. J. & Davis, G. E. 2009. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*, 114, 5091-101.
- Stratman, A. N., Schwindt, A. E., Malotte, K. M. & Davis, G. E. 2010. Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood*, 116, 4720-30.
- Su, T., Yang, Y., Lai, S., Jeong, J., Jung, Y., McConnell, M., Utsumi, T. & Iwakiri, Y. 2021. Single-Cell Transcriptomics Reveals Zone-Specific Alterations of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Cirrhosis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 11, 1139-1161.
- Tamm, E. R. & Kurtz, A. 2021. Leber. In: Messmann, H. (ed.) *Klinische Gastroenterologie* Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Thabut, D. & Shah, V. 2010. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: New targets for the treatment of portal hypertension? *Journal of Hepatology*, 53, 976-980.

- Theise, N. D., Saxena, R., Portmann, B. C., Thung, S. N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A. & Crawford, J. M. 1999. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*, 30, 1425-33.
- Tilton, R. G., Kilo, C. & Williamson, J. R. 1979. Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries. *Microvasc Res*, 18, 325-35.
- Tran-Thi, T. A., Kawada, N. & Decker, K. 1993. Regulation of endothelin-1 action on the perfused rat liver. *FEBS Lett*, 318, 353-7.
- Tryggvason, K., Oikarinen, J., Viinikka, L. & Ylikorkala, O. 1981. Effects of laminin, proteoglycan and type IV collagen, components of basement membranes, on platelet aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 100, 233-239.
- Tsukada, S., Parsons, C. J. & Rippe, R. A. 2006. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta*, 364, 33-60.
- Van Deursen, J., Fornerod, M., Van Rees, B. & Grosveld, G. 1995. Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous mouse chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 7376-7380.
- Van Waes, L. & Lieber, C. S. 1977. Early Perivenular Sclerosis in Alcoholic Fatty Liver: An Index of Progressive Liver Injury. *Gastroenterology*, 73, 646-650.
- Vandamme, T. F. 2014. Use of rodents as models of human diseases. *J Pharm Bioallied Sci*, 6, 2-9.
- Varin, F. & Huet, P. M. 1985. Hepatic microcirculation in the perfused cirrhotic rat liver. *J Clin Invest*, 76, 1904-12.
- Velnar, T., Bailey, T. & Smrkolj, V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*, 37, 1528-42.
- Verrou, C., Zhang, Y., Zürn, C., Schamel, W. W. & Reth, M. 1999. Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biol Chem*, 380, 1435-8.
- Waibl, H., Gasse, H., Constantinescu, G., Hashimoto, Y. & Simoens, P. 2012. *Nomina anatomica veterinaria*, Hannover, Germany; Columbia, MO, USA; Ghent, Belgium, Editorial Committee.
- Wake, K. 1971. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat*, 132, 429-62.
- Wake, K. & Sato, T. 2015. "The sinusoid" in the liver: lessons learned from the original definition by Charles Sedgwick Minot (1900). *Anat Rec (Hoboken)*, 298, 2071-80.
- Wang, S. S., Tang, X. T., Lin, M., Yuan, J., Peng, Y. J., Yin, X., Shang, G., Ge, G., Ren, Z. & Zhou, B. O. 2021. Perivenous Stellate Cells Are the Main Source of Myofibroblasts and Cancer-Associated Fibroblasts Formed After Chronic Liver Injuries. *Hepatology*, 74, 1578-1594.
- Wang, Z.-M., Xia, S.-W., Zhang, T., Wang, Z.-Y., Yang, X., Kai, J., Cheng, X.-D., Shao, J.-J., Tan, S.-Z., Chen, A.-P., Wang, S.-J., Zhang, F., Zhang, Z.-L. & Zheng, S.-Z. 2020. LncRNA-H19 induces hepatic stellate cell activation via upregulating alcohol dehydrogenase III-mediated retinoic acid signals. *International Immunopharmacology*, 84, 106470.
- Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M. & Heinz, H. 2001. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie - Optische Abbildung, Elektronische Signalverarbeitung. *Mikroskopie von Carl Zeiss*.
- Williams, E. J. & Iredale, J. P. 1998. Liver cirrhosis. *Postgrad Med J*, 74, 193-202.

- Wisse, E. 1970. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res*, 31, 125-50.
- Witek, R. P., Stone, W. C., Karaca, F. G., Syn, W. K., Pereira, T. A., Agboola, K. M., Omenetti, A., Jung, Y., Teaberry, V., Choi, S. S., Guy, C. D., Pollard, J., Charlton, P. & Diehl, A. M. 2009. Pan-caspase inhibitor VX-166 reduces fibrosis in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 50, 1421-30.
- Wong, L., Yamasaki, G., Johnson, R. J. & Friedman, S. L. 1994. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest*, 94, 1563-9.
- Yamagishi, M. 1959. Electron Microscope Studies on the Fine Structure of the Sinusoidal Wall and Fat-Storing Cells of Rabbit Livers. *Archives of Histology and Cytology*, 18, 223-261.
- Yasui, O., Miura, N., Terada, K., Kawarada, Y., Koyama, K. & Sugiyama, T. 1997. Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. *Hepatology*, 25, 329-334.
- Zimmermann, K. W. 1923. Der feinere Bau der Blutcapillaren. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 68, 29-109.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

aHSC	Aktivierte Sternzellen
CaHSC	Zentralvenen-assoziierte Sternzellen
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CK19	Cytokeratin 19
Cre	Cre-Rekombinase
CreER ^{T/T2}	An mutierten Östrogenrezeptor gekoppelte Cre-Rekombinase, die durch Tamoxifen induzierbar ist
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase
EZM	Extrazellulärmatrix
GPC3	Glypican 3
GS	Glutamin-Synthetase
HSC	Hepatic stellate cell = Hepatische Sternzelle
LoxP	Locus of X-over of P1
Lrat	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
LSEC	Liver sinusoidal endothel cell
NGFR	Nerve growth factor receptor
NO-GC	NO-sensitive Guanylyl-Cylcase
PaHSC	Portalvenen-assoziierte Sternzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-driven growth factor
PDGFRβ	Platelet-derived growth factor receptor β
PFA	Paraformaldehyd
qHSC	Ruhende Sternzellen
SMMHC	Smooth muscle myosin heavy chain
SMMHC-CreER ^{T2} /tdTomato	Induzierbare Cre-Rekombinase CreER ^{T2} unter Kontrolle des SMMHC-Promotor mit tdTomato als Reporterfarbstoff
SMMHC/tdTomato ⁺	Zellen der SMMHC-CreER ^{T2} /tdTomato Reportermaus, die nach Tamoxifengabe tdTomato exprimieren
Tcf21	Transcription Factor 21
tdTomato	Tandem dimer Tomato
TGFβ	transforming growth factor β
tSNE	T-distributed stochastic neighbor embedding
αSMA	α-smooth muscle actin

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Histologische Gliederungskonzepte der Leber.....	3
Abbildung 2	Aufbau der Sinusoide - physiologisch und fibrotisch.....	8
Abbildung 3	Cre-LoxP-System.....	15
Abbildung 4	Lrat-Cre/tdTomato-Reportermaus und Sternzellmarker PDGFR β .	30
Abbildung 5	SMMHC/tdTomato ⁺ Sternzellen mit möglicher Zonierung.....	31
Abbildung 6	Lineage Tracing der SMMHC/ tdTomato ⁺ Sternzellen.....	33
Abbildung 7	Entfernte Lage der SMMHC/tdTomato ⁺ Sternzellen von Zentralvenen.....	34
Abbildung 8	Zonierte Verteilung der SMMHC/tdTomato ⁺ HSC.....	35
Abbildung 9	SMMHC/tdTomato ⁺ HSC stellen Subpopulation der PaHSC dar...	36
Abbildung 10	Progenitorzellnische der Zone 1-HSC.....	38
Abbildung 11	Differenzen in der SMMHC-Expression der Zone 1-HSC	39
Abbildung 12	CCl ₄ Behandlungsprotokoll.....	40
Abbildung 13	Auflösung der Zonierung der Zone 1-HSC nach CCl ₄ -Behandlung und Auslösung einer fibrotischen Reaktion.....	42
Abbildung 14	Fibroseinduktion in SMMHC-CreER ^{T2} /tdTomato-Reportermaus..	43
Abbildung 15	Ausbleibende Differenzierung der Zone 1-HSC zu Myofibroblasten.....	44
Abbildung 16	Zone 1-HSC differenzieren auch in früher Fibrose nicht zu Myofibroblasten.....	45
Abbildung 17	Zonierung der Zone 1-HSC auch in früher Fibrose aufgelöst.....	46
Abbildung 18	Zone 1-HSC und Kapillarisierungsmarker Laminin.....	47
Abbildung 19	Umschlingen der kapillarisierten Sinusoide durch Ausläufer der Zone 1-HSC-Zellkörper.....	49
Abbildung 20	Zone 1-HSC und Kapillarisierungsmarker CD34.....	50
Abbildung 21	Ausbleibender Nachweis der Umschlingung von kapillarisierten Sinusoiden durch Ausläufer der Zone 1-HSC-Zellkörper.....	50
Abbildung 22	Umschlingung der kapillarisierten Sinusoide durch Ausläufer der Zone 1-HSC-Zellkörper in der frühen Fibrose.....	51

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Marker von Sternzellen in unterschiedlichen Aktivierungszuständen..	11
Tabelle 2	Generierte zellspezifische tdTomato-Reportermäuse.....	24

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die auf unterschiedliche Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich Herrn Professor Dr. Andreas Friebe für die Überlassung des Dissertationsthemas. Besonders hervorzuheben ist die -im wahrsten Sinne des Wortes- stets offene Tür bei auftretenden Problemen sowie seine geduldige und motivierende Art, die ich im gesamten Entstehungsprozess dieser Arbeit erfahren habe.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. Andreas Geier und Herrn Dr. Peter Gallant für die Zweit- bzw. Drittbetreuung dieser Arbeit. Größter Dank gilt auch Herrn Dr. Muhammad Ashfaq-Khan für die Unterweisung in alle relevanten Methoden, ein ständig offenes Ohr und große Tatkraft bei auftretenden Schwierigkeiten. Weiterhin ist seine umgängliche Art hervorzuheben, die mir die Arbeit im Labor stets erleichtert und schlussendlich dafür gesorgt hat, dass auch der Spaß nicht zu kurz kam.

Ein großes Dankeschön ist auch Frau Bianca Röger und Herrn Dr. Dieter Groneberg auszusprechen. Danke für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung, die ich erlebt habe bei meiner Arbeit im physiologischen Institut.

Danke auch an die Arbeitsgruppe um Herrn Professor Dr. Kai Schuh für die gute Kommunikation, gelungene gemeinsame Freizeitgestaltung und allen Beschäftigten des physiologischen Instituts, die ich während meiner Arbeit dort kennenlernen durfte.

Dank ist auch Niklas Ohrlein für das Korrekturlesen dieser Arbeit auszusprechen. Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern Ulli und Lothar und meiner großen Schwester Katrin dafür, dass sie mich stets bei allen Vorhaben und Zielen unterstützen und immer zu mir halten.

VI Eigene Veröffentlichungen

- Ashfaq-Khan, M., **Fischer, J.**, Schwiering, F., Groneberg, D. & Friebe, A. 2023.
Hepatic stellate cells in zone 1 engage in capillarization rather than myofibroblast formation during fibrosis, *Hepatology* - Eingereicht, bisher unveröffentlicht
- Ashfaq-Khan, M., **Fischer, J.**, Schwiering, F., Groneberg, D. & Friebe, A. 2023.
Characterization of a zone-specific hepatic stellate cell subtype in the liver, *Journal of Translational Medicine*.