

**Technische Universität München  
Fakultät für Medizin**

# **Dreidimensionale Darstellung der duktafen Reaktion nach chemischer Leberschädigung**

Jasna Kovačević

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitz:

Prof. Dr. Wolfgang A. Weber

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Fabian Geisler

2. apl. Prof. Dr. Rickmer Braren

Die Dissertation wurde am 07.11.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.06.2023 angenommen.

Für meine Eltern.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
2.1	Aufbau der Leber.....	9
2.2	Die duktale Reaktion: Von Gallengängen und möglichen adulten Stammzellen	11
2.3	Mausmodell und Lineage Tracing.....	16
2.4	Leberschädigungsmodelle.....	18
2.5	Eine Dimension mehr: 3D-Imaging der Leber.....	20
2.5.1	Bisherige Fortschritte.....	21
2.5.2	Tissue Clearing und konfokale Mikroskopie .....	22
2.5.3	Optimierung der Immunfluoreszenz.....	26
2.5.4	Dreidimensionale Bildgewinnung.....	28
<b>3.</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>31</b>
4.1	Materialverzeichnis.....	31
4.1.1	Allgemeine Reagenzien und Geräte .....	31
4.1.2	Reagenzien für Tissue Clearing.....	32
4.1.3	Tierversuche .....	32
4.1.4	Einmalutensilien.....	32
4.1.5	Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	33
4.2	Tierversuche .....	33
4.2.1	Molekulargenetische Methoden .....	33
4.2.2	Intraperitoneale Tamoxifeninjektion.....	33
4.2.3	Chemische Leberschädigung .....	34
4.2.4	Maussektion und Organgewinnung .....	35
4.2.5	Perfusion.....	35
4.3	Histologische Methoden.....	36
4.3.1	Immunfluoreszenz.....	36
4.3.2	Bildgewinnung und -bearbeitung.....	37
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
5.1	Protokolletablierung.....	41
5.1.1	Vollständiges 3D Immunfluoreszenz- und Tissue-Clearing-Protokoll.....	44

5.1.2	Protokollanwendung – praktische Aspekte.....	46
5.2	Gallengangssystem der gesunden Leber.....	47
5.3	Duktale Reaktion – biliäres Remodelling der geschädigten Leber .....	51
5.3.1	Duktale Reaktion nach toxischer CDE-induzierter Leberschädigung .....	51
5.3.2	Remodellierung der CDE-induzierten duktaalen Reaktion nach Wegfall des toxischen Stimulus .....	53
5.4	Netzwerk der Gallenkanalikuli .....	55
5.4.1	3D Architektur der Gallenkanalikuli in der homöostatischen Leber .....	56
5.4.2	3D Architektur der Gallenkanalikuli nach CDE-induzierter toxischer Leberschädigung.....	59
5.4.3	3D Architektur der Gallenkanalikuli in der CDE-induzierten Leberschädigung nach Wegfall des toxischen Stimulus .....	61
5.5	Perfusion .....	64
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
6.1	Möglichkeiten der dreidimensionalen Gewebedarstellung .....	70
6.2	Auswahl der Tissue Clearing Methode .....	72
6.3	Anwendung der Methode – Herausforderungen und Lösungen .....	76
6.4	Immunfluoreszenzfärbung der Gallenkanalikuli.....	77
6.5	Generierung und Bearbeitung von Bilddateien .....	78
6.6	Die Architekturstudie: Neues über die duktaale Reaktion und die Kanalikuli .....	79
6.6.1	Duktale Reaktion .....	80
6.6.2	Netzwerk der Gallenkanalikuli .....	81
6.7	Limitationen und praktische Aspekte der Methode.....	83
6.8	Perspektiven: Gewebepfusion und funktionelle Studien .....	85
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>88</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>105</b>

## 1. Verzeichnis der Abkürzungen

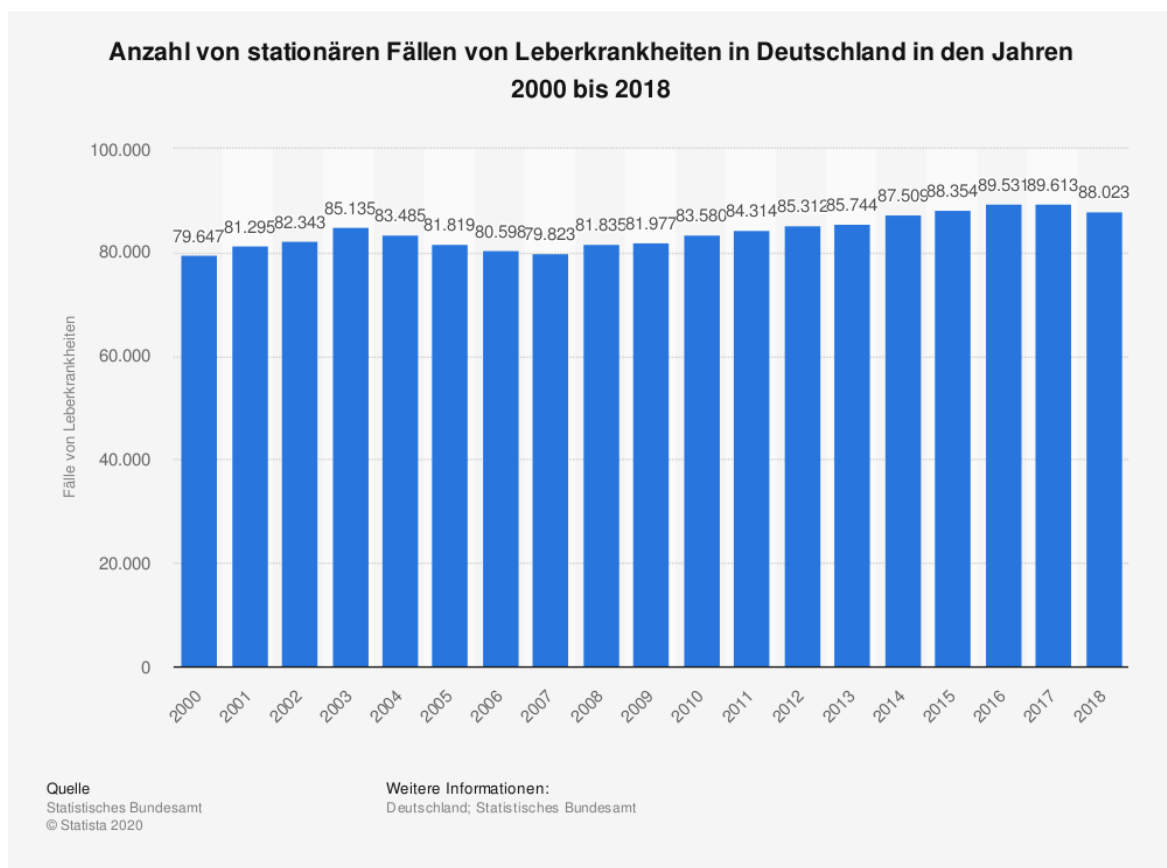
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
3DISCO	eng. "Three-Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs"
A.	lat. Arteria, Arterie
A6	Annexin 6
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AFP	Alpha-Fetoprotein
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
BABB	eng. "Benzyl Alcohol and Benzyl Benzoate"
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	lat. circa, ungefähr
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlormethan
CD...	eng. cluster of differentiation
CDE	eng. "choline deficient ethionine supplemented diet", Cholin-arme Ethionin-angereicherte Diät
CK19	Cytokeratin 19
Cre	eng. causes recombination
CUBIC	eng. "Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis"
Cy5	Cyanine 5
d	lat. die, Tag
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DBE	Dibenzylether
DCM	Dichlormethan
DDC	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPIV	Dipeptylpeptidase IV (4)
DR	Duktale Reaktion
DRC	eng. ductular reactive cell, duktale Reaktionszelle
dsDNA	Doppelstrang-DNA
eng.	englisch
EpCAM	eng. epithelial cell adhesion molecule, epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ERT2	eng. estrogen receptor 2, Östrogenrezeptor 2
Fa.	Firma
g	Gramm
h	lat. hora, Stunde

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HNF...	eng. hepatocyte nuclear factor
i.p.	intraperitoneal
iCCA	Intrahepatisches Cholangiokarzinom
iDISCO	eng. "Immunolabeling-Enabled Three-Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs"
IF	Immunfluoreszenz
lat.	latein
loxP	eng. locus of crossing over, P1
LPC	eng. liver progenitor cell, Leberprogenitorzelle
min	Minute(n)
ml	Mililiter
nm	Nanometer
PACT	eng. "Passive Clarity Technique"
PARS	eng. "Perfusion-assisted Agent Release in Situ"
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
PBS	eng. phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	eng. polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFA	para-Formaldehyd
pH	eng. power of hydrogen
PV	Portalvene
Reg.	Regeneration
ROI	eng. region of interest, Bereich von Interesse
RT	Raumtemperatur
S.	Seite(n)
SDS	eng. sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SeeDB	eng. "See Deep Brain"
sog.	sogenannt-
SOX9	eng. sex determining region Y-box 9
TDE	2,2' Thiodiethanol
THF	Tetrahydrofuran
tom, tdTom	tdTomato, "tandem dimeric Tomato"
TX100	Triton™ X-100
uDISCO	eng. "Ultimate DISCO", "Ultimate (Three-)Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs"
ÜN	über Nacht
V.	lat. Vena, Vene
z.B.	zum Beispiel
z.Dt.	zu Deutsch
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

## 2. Einleitung

Die Leber als das zentrale Stoffwechselorgan besitzt eine vielfältige Funktion und ist somit von vitaler Bedeutung für den gesamten Organismus. Sie ermöglicht nicht nur eine regelrechte Verdauung und Verwertung von Nährstoffen, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung und Eliminierung von Stoffwechselabbauprodukten, Medikamenten und Toxinen aus dem Blutkreislauf. Außerdem dient sie der Speicherung vieler überlebenswichtiger Stoffe sowie Synthese von verschiedenen, teils essenziellen Molekülen, wie zum Beispiel Gerinnungsfaktoren und Albumin. Folglich kann ein Ausfall von nur einer oder wenigen Funktionen dieses Organs zu schwerwiegenden Störungen der allgemeinen Homöostase des Organismus führen.

Die Leberkrankheiten sind eine breitgefächerte Entität mit großen sozioökonomischen Auswirkungen. Im Jahr 2016 litten bundesweit rund 90 Tausend Menschen an einer Lebererkrankung (ICD10: K70-77), mit steigender Tendenz seit dem Jahr 2000 (**Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Statistik der Leberkrankheiten in Deutschland in den Jahren 2000 bis 2018. (Statista, 2020)

Alleine im Jahr 2019 starben rund 15 600 Menschen bundesweit an Krankheiten der Leber. (GBE, 2021) Den bei Weitem größten Anteil daran machten mit über 14 000 Todesfälle die nicht-neoplastischen Lebererkrankungen wie die alkoholbedingten Leberkrankheiten, Leberfibrose und -zirrhose sowie chronische Hepatitis aus. (Destatis, 2021)

Zur effektiven und zielgerichteten Bekämpfung von Lebererkrankungen ist ein tiefgründiges Verständnis ihrer Entstehungsmechanismen und Funktionsweisen unentbehrlich. Hierfür ist es zunächst notwendig, die genaue funktionelle Anatomie des Organs im physiologischen Zustand sowie in verschiedenen Pathologien gründlich zu verstehen. Vielen Lebererkrankungen sind distinkte strukturelle Veränderungen im periportalen Grenzbereich zwischen dem intrahepatischen Gallengangssystem und Hepatozyten, bzw. dem hepatozellulären Netzwerk der Gallenkanalikuli gemeinsam. Eine der führenden Veränderungen in nahezu jeder Art von Leberschädigung ist dabei die sogenannte duktale Reaktion. Diese besteht aus Proliferaten immunphänotypisch biliärer Zellen und nimmt je nach Art und Dauer der Schädigung unterschiedliche, jeweils distinkte Formen an. (Alvaro et al., 2007; Desmet, 2011; Falkowski et al., 2003; Gouw et al., 2011; Jors et al., 2015; Theise und Kuwahara, 2007) Die Funktion und biologische Rolle dieser Proliferate wurde in der Vergangenheit sehr kontrovers diskutiert. Laut der historisch am weitesten verbreiteten Theorie sollen sie den adulten Leberstammzellen aus terminalen Abschnitten intrahepatischer Gallengänge, den sog. Hering-Kanalchen, entstammen und als bipotente Progenitorzellen, d.h. mögliche Vorläufer des sowohl hepatozellulären als auch biliären Kompartimentes dienen. (Fausto, 1990) Grundsätzlich jedoch gilt die biologische Signifikanz der dukталen Reaktion bis heute als nicht abschließend geklärt. Aufgrund teils widersprüchlicher Ergebnisse und insbesondere mangels eindeutiger Beweise für den bipotenten Charakter dieser Zellen außerhalb von Zellkulturbedingungen (Carpentier et al., 2011; Malato et al., 2011; Rodrigo-Torres et al., 2014) sind Zweifel an dieser gängigen Theorie angebracht und weitere Untersuchungen notwendig. Die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. F. Geisler stellt folglich die alternative Hypothese auf, dass die dukталen Proliferate eine Schlüsselrolle bei der Erneuerung des geschädigten Gallengangssystems und somit Aufrechterhaltung des Galleflusses nach einer Leberschädigung spielen. (Jors et al., 2015)

Um die dynamischen Veränderungen des intrahepatischen Gallengangssystems und eine möglicherweise funktionelle Rolle der dukталen Reaktion in der geschädigten Leber zu adressieren, ist es zunächst notwendig, die Anatomie der intrahepatischen Gallengänge unter physiologischen Bedingungen aufzuzeigen und anschließend ihre Veränderungen im Rahmen pathologischer Prozesse zu erfassen. Mittels moderner Bildgebung wie Computer- und Kernspintomographie (CT bzw. MRT) sowie endoskopischer Verfahren wie ERCP und MRCP gelingt inzwischen eine zunehmend genaue makroskopische Darstellung von extra- und zum Teil auch intrahepatischen Gallenwegen. Hingegen erfolgt eine routinemäßige Darstellung auf mikroskopischer Ebene heutzutage hauptsächlich in Form von konventioneller Histologie, d.h. mikroskopischer Darstellung ausgewählter Gewebeabschnitte in zwei Dimensionen. Zwar eignet sich diese Methode, insbesondere unter Hinzunahme von Immunhistochemie, hervorragend für die pathologische Routinediagnostik, aufgrund ihrer naturgemäßen Beschränkung auf eine räumliche

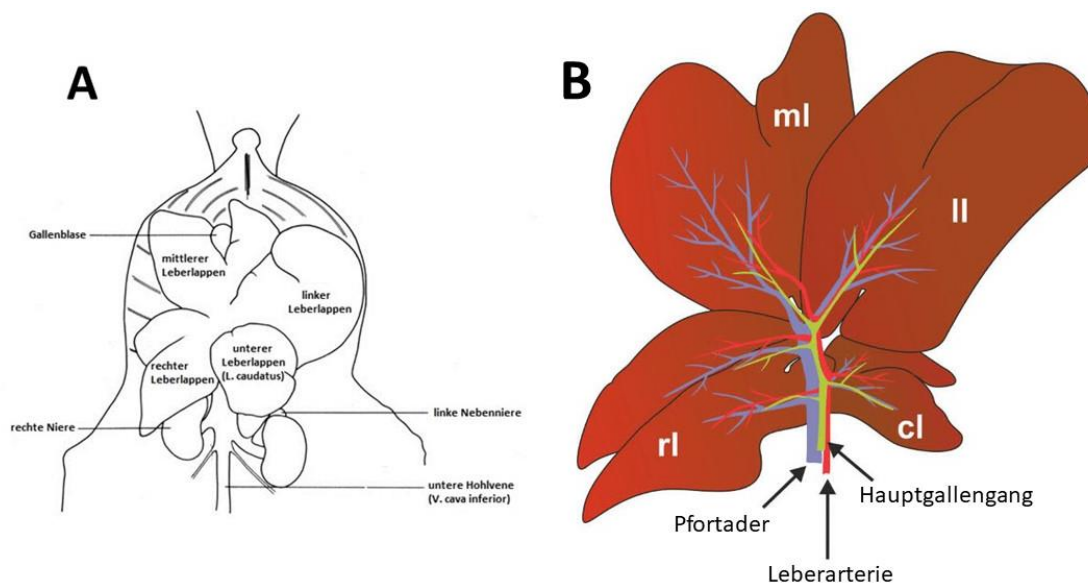


Ebene ist sie jedoch für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen hinsichtlich der Gewearchitektur stark limitiert. Für die genaue Erforschung räumlicher Verhältnisse innerhalb eines Gewebes ist eine umfassende Gewebedarstellung in drei Dimensionen erforderlich.

Die Entwicklung einer solchen Methode stellt das primäre Ziel dieser Doktorarbeit dar. Auf Basis der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie und verschiedener Verfahren zur Verbesserung optischer Gewebeeigenschaften wird dabei ein neuartiges Protokoll etabliert, welches dreidimensionale Aufnahmen dicker Lebergewebeschnitte ermöglicht. Anschließend wird diese neuartige Methode angewandt, um die duktale Reaktion im Rahmen eines definierten Schädigungsmechanismus bzw. experimentellen Modells einer Lebererkrankung kontinuierlich dreidimensional abzubilden und somit einen ganz neuen Ansatz bei der Erforschung schädigungsbedingter Remodellierungsprozesse in der Leber zu etablieren.

## 2.1 Aufbau der Leber

Die Leber ist ein unpaariges, parenchymatöses Organ, welches im rechten oberen Abdomenquadranten unterhalb des Zwerchfells lokalisiert ist.



**Abbildung 2: Makro- und mikroskopischer Aufbau der Mausleber.** (A) Oberbauch-Anatomie der Maus: Mausleber mit den getrennten Leberlappen. Modifiziert nach M.J. Cook (Cook, 1965); (B) Überblick der Anatomie der extrahepatischen Gallenwege der Maus: Hauptgallengang mit zunächst Aufzweigung in die einzelnen Leberlappengänge und anschließend kleine extrahepatische Gallengangäste; zusätzlich dargestellt Leberarterie und Pfortader mit ihren Aufzweigungen. Modifiziert nach C. G. Tag (Tag et al., 2015)

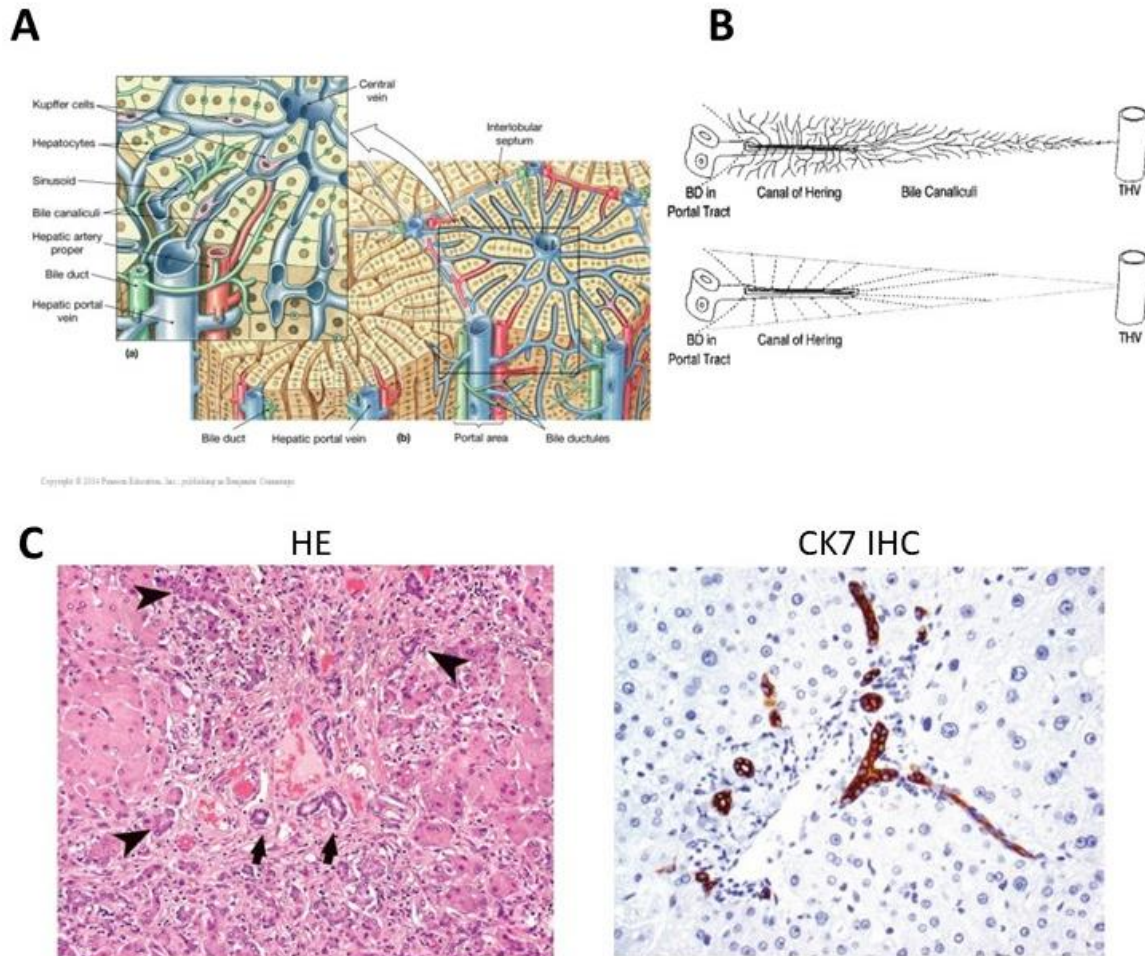
Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus besteht sie aus mehreren Leberlappen. Während die Lappen beim Menschen fusioniert sind und makroskopisch ein

zusammenhängendes Organ bilden, unterscheidet man bei der Maus vier einzelne Hauptleberlappen, die teilweise auch unterteilt sind und lediglich dorsal über gefäßführendes Bindegewebe miteinander verbunden sind (**Abbildung 2**). (Hollander et al., 1987; Martins et al., 2008) Der mikroskopische Aufbau des Leberparenchyms, insbesondere in Hinblick auf seine kleinste Einheit, das Leberläppchen, ist jedoch allen Säugetieren nahezu identisch. (Macchiarelli et al., 2012)

Die umfassenden Funktionen der Leber sind in erster Reihe ihrer spezifischen Anatomie zu verdanken. Besonders hervorzuheben ist dabei ihre duale Blutversorgung. Von der Gesamtmenge an Blut, welches die Leber erreicht, werden ungefähr zwei Drittel aus dem Darm über die Pfortader (Vena portae) und ein Drittel aus dem großen Kreislauf über die Leberarterie (Arteria hepatica propria) geliefert. Der Blutabfluss erfolgt über die gemeinsame Lebervene (Vena hepatica) und findet über die untere Hohlvene (V. cava inferior) Anschluss an den Körperkreislauf. Zudem verfügt die Leber über ein weiteres Gefäßsystem, nämlich das der intrahepatischen Gallengänge. Die von den Hepatozyten ausgeschiedene Galle wird in diesen gesammelt und über den gemeinsamen Ausführungsgang, den Ductus choledochus communis, in den Dünndarm transportiert. (Aumüller, 2014)

Diese Bauweise lässt sich in der Leber bis auf ihre kleinste funktionelle Einheit, das Zentralvenenläppchen, verfolgen (**Abbildung 3A**). Diese im zweidimensionalen Anschnitt meist sechseckige Struktur besteht aus einer bis zwei Zelllagen breiten Bälkchen aus Leberzellen (Hepatozyten), radiär angeordnet um einen Ast der Lebervene - Zentralvene oder Vena centralis genannt. An jeder Ecke befindet sich ein sogenanntes Portalfeld, bestehend aus jeweils einem Ast der Pfortader, der Leberarterie sowie einem Gallengang, dem Ductus biliferus. Diese drei Gefäße werden zusammenfassend als Glisson-Trias bezeichnet. Das aus den beiden Blutgefäßen des Portalfeldes kommende Blut sammelt sich zunächst im gemeinsamen Blutgefäßsystem der Sinusoide an und fließt zwischen den Leberzellbalken zur Zentralvene hin. Auf dieser Strecke werden Nährstoffe aus dem Darm und Sauerstoff an Hepatozyten abgegeben. Dies erfolgt über den Disse-Raum, einen schmalen Spalt zwischen dem diskontinuierlichen Endothel der Sinusoide und dem basalen Pol des Hepatozyten.

Der Gallenabfluss erfolgt grundsätzlich in die entgegengesetzte Richtung, d.h. von zentral nach portal. Die Galle wird dabei von den Hepatozyten zunächst in die Gallenkanälchen (Canaliculi biliferi) ausgeschieden und fließt zum nächstgelegenen interlobulären Gallengang hin. Im Gegensatz zu Sinusoide (Endothel) und Gallengang (kubisches Epithel) besitzen die Kanalikuli keinerlei Innenauskleidung und stellen nur schmale, spaltförmige Räume zwischen den apikalen Membranen zweier benachbarter Hepatozyten dar. Im traditionellen Modell der Mikroanatomie der Leber (**Abbildung 3B**) wird die Verbindung zwischen dem interlobulären Gallengang der Glisson-Trias und den feinen Gallenkanälchen Hering-Kanälchen genannt. (Welsch und Sobotta, 2006) Dieses kurze Verbindungsstück ist der erste Abschnitt, der eine epitheliale Auskleidung enthält, wie sie in nachgeschalteten Gallengängen zu finden ist. Die Epithelzellen der Hering-Kanälchen werden häufig in Verbindung mit der Leberregeneration gebracht, da ihnen Stammzeleigenschaften zugesprochen werden. (Fausto, 2001; Theise et al., 1999)



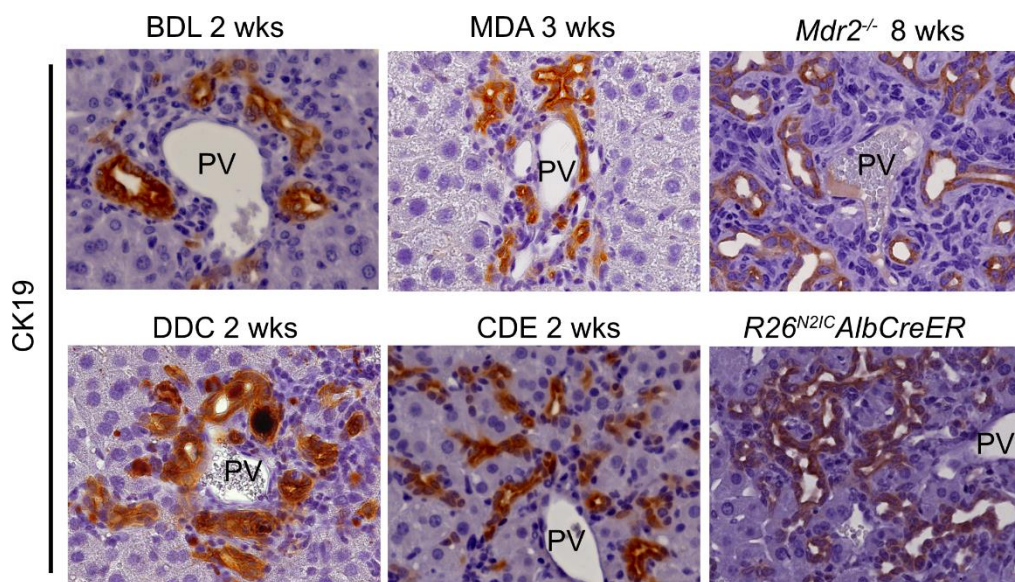
**Abbildung 3: Traditionelles Modell der Mikromorphologie der Leber.** (A) Das Leberparenchym besteht aus annähernd hexagonalen Lobuli bzw. Leberläppchen, an jeder Ecke befindet sich ein Portalfeld (im Ausschnitt hervorgehoben) mit den dadurch ziehenden Portalstrukturen: Pfortaderast (Blau), Leberarterienast (Rot) und ein größerer, interlobulärer Gallengang mit seinen radiären Verzweigungen (Grün). (Pearson Education, 2004); (B) Laut der gängigen Vorstellung der terminalen Gallenwege entspringt jedem interlobulären Gallengangsegment (links) ein radiärer Ast, aus welchem sog. Hering-Kanälchen (mittig) hervorgehen. Diese münden direkt im Netzwerk der Gallenkanalikuli, welche lediglich als interzelluläre Ausparungen von Hepatozyten flankiert werden. In der unteren Bildhälfte sind die hepatozellulären Schichten, welche die zugehörigen Gallenkanalikuli umranden schematisch dargestellt. (Saxena et al., 1999); (C) In der konventionell-lichtmikroskopischen Aufnahme (HE, linke Bildhälfte) erkennt man ein Portalfeld mit Blutgefäßanschnitten sowie Gallengängen (Pfeile) und den kleineren, etwas weiter peripher gelegenen und schlechter abgrenzbaren Gallenduktuli (Pfeilköpfe); die immunhistochemische Färbung gegen CK7 (rechte Bildhälfte) hebt die biliären Strukturen, d.h. die Gallengänge, -duktuli sowie die zarten Hering-Kanälchen hervor. (Mills, 2012)

## 2.2 Die duktale Reaktion: Von Gallengängen und möglichen adulten Stammzellen

Unter duktaler Reaktion versteht man eine geregelte, in vielen Spezies beobachtete, zelluläre Antwort auf akute und chronische Leberschädigung beinahe jeglicher Art. Vorrangig tritt sie im Rahmen biliärer bzw. cholestatischer Erkrankungen, wie der primären sklerosierenden Cholangitis (PSC), primären biliären Cholangitis (PBC) und



Gallengangsobstruktion auf (Desmet, 2011), ist aber auch nach akutem fulminantem Leberversagen (Craig et al., 2004; Theise et al., 1999) sowie bei diversen Leberparenchymerkrankungen wie der alkoholischen und nicht-alkoholischen Lebererkrankung (ASH bzw. NAFLD/NASH), viralen und Autoimmunhepatitis sowie diversen Formen reaktiver Leberumbauprozesse zu beobachten. (Brunt et al., 2010; Clouston et al., 2005; Falkowski et al., 2003) Die duktale Reaktion äußert sich in Form von periportalen Zellproliferaten an der Kontaktstelle zwischen dem intrahepatischen Gallengangssystem und dem Leberparenchym. Diese Zellen zeigen eine Expression von vornehmlich biliären Proteinen wie CK19, EpCAM, CD133, SOX9, HNF1 $\beta$  sowie A6 in Nagetieren. (Jors et al., 2015; Nikoozad et al., 2014; Rodrigo-Torres et al., 2014) Je nach Art der Schädigung weist die duktale Reaktion distinkte Proliferationsmuster auf: Bei vollständiger Obstruktion der Gallendrainage, z.B. im Rahmen einer Gallengangsligatur, werden vorwiegend gut definierte, kurze periportale Gangproliferate mit sichtbaren Lumina beobachtet. Bei prädominant hepatozellulärer Schädigung oder massiver intrahepatischer Cholestase finden sich in konventionell- bzw. immunhistologischer Darstellung hingegen tiefer in Richtung Zentralvenenast reichende, unregelmäßig eingestreute kleine Zellverbände oder einzelne Zellen der dukталen Reaktion, oft ohne offensichtliche Kontinuität zum intrahepatischen Gallengangssystem. (**Abbildung 4**) Historisch wurde der erste Typ als "typische" und der zweite als "atypische" duktale Reaktion bezeichnet. (Alvaro et al., 2007) Da sich jedoch in den meisten Lebererkrankungen, sowohl des Menschen als auch in Tiermodellen, zahlreiche Misch- und Übergangsformen finden, wird von dieser Nomenklatur tendenziell abgeraten.



**Abbildung 4: Verschiedene Formen der dukталen Reaktion:** Mittels spezifischer Immunhistochemie für den biliären Marker CK19 werden Veränderungen der (peri-)portalen Gallengänge der Mausleber in einigen Schädigungsmodellen demonstriert: prädominant cholestatischer bzw. biliärer Schaden mittels Gallengangsligatur für 2 Wochen (BDL 2 wks) und chemisch-nutritiv mit Methylensianilin für 3 Wochen (MDA 3 wks); gemischt hepatozellulär cholestatisch mit DDC für 2 Wochen (DDC 2 wks); prädominant hepatozellulär mit CDE für 2 Wochen (CDE 2 wks) sowie zwei genetische Schädigungsmodelle (jeweils rechts im Bild). Diese Aufstellung verdeutlicht die Unterschiede in Erscheinungsformen und Ausmaß der dukталen Reaktion in Abhängigkeit vom prädominanten Schädigungsmechanismus. (Mikroskopische Aufnahmen Labor Dr. F. Geisler; Vergrößerung jeweils 40x)

Die duktale Reaktion wurde in der Leberforschung schon sehr lange in verschiedensten Schädigungsmodellen beobachtet. Ihre biologische Signifikanz gilt bis heute jedoch als nicht vollständig geklärt und ist Gegenstand eines kontroversen wissenschaftlichen Diskurses. Historisch wird in den Forschungskreisen diesem Zellkompartiment vorrangig eine wichtige Rolle im Rahmen der schädigungsbedingten Leberregeneration zugeschrieben. Die Fähigkeit der Leber zur Regeneration ist seit Langem bekannt. Einen der ersten Hinweise darauf stellt die häufig zitierte altgriechische Tragödie „Der gefesselte Prometheus“ (Aischylos, ca. 5. Jh. v. Chr.) dar, laut welcher der Titan Prometheus zur Strafe an das Atlasgebirge gefesselt und jeden Tag von einem Adler aufgesucht wurde, welcher seine Leber bei lebendigem Leibe fraß. Über Nacht soll sich das Organ vollständig erneuert haben, sodass sich die Strafe täglich so lange wiederholen konnte, bis Prometheus letztlich von Heracles befreit wurde. Ob die alten Griechen tatsächlich konkrete Kenntnisse über die Leberregeneration besaßen oder die Beschreibungen in der Mythologie eine eher symbolische Bedeutung trugen, lässt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen. Die ausgesprochene Regenerationsfähigkeit der Leber als solches gilt aber als mittlerweile bestens belegtes und klinisch hochrelevantes physiologisches Phänomen. (Power und Rasko, 2008; Tiniakos et al., 2010) Einerseits kann die Leber nach einer chirurgischen Resektion von bis zu 80% des Parenchyms ihre Funktion und nahezu vollständig ihr Ausgangsvolumen innerhalb weniger Wochen wiederherstellen (Fausto, 2000; Fausto et al., 2006), andererseits wurden ähnliche Regenerationsphänomene auch bei chemisch-toxischer Schädigung, z.B. im Rahmen von Paracetamolvergiftungen beschrieben (Bhushan et al., 2014; Hoehme et al., 2010; Portmann et al., 1975). Die zugrundeliegenden Mechanismen der Leberregeneration wurden in den vergangenen Jahrzehnten intensiv erforscht, gelten aber dennoch auch heutzutage als nicht vollständig geklärt. (Michalopoulos, 2013; Michalopoulos und DeFrances, 1997) Während die Regeneration der Leber nach einer chirurgischen Resektion vorrangig mit Hypertrophie und einfacher Zellteilung zu erklären ist (Fausto et al., 2006; Itoh, 2016; Itoh und Miyajima, 2014; Michalopoulos, 2007), herrschen über die Regenerationsmechanismen in anderweitig geschädigtem Lebergewebe noch viele Kontroversen. Eine der umstrittensten Theorien postuliert das Vorhandensein von lebereigenen pluripotenten Stammzellen in den terminalen Abschnitten des intrahepatischen biliären Gangsystems, den sog. Hering-Kanälchen (**Abbildung 3B**), welche in erster Linie durch eine chemisch-toxische Schädigung zur Differenzierung angeregt werden können. (Evarts et al., 1987; Fausto, 2004; Miyajima et al., 2014; T. Roskams und Desmet, 2008; T. A. Roskams et al., 2004; Turanyi et al., 2010) Als dessen morphologisches Korrelat wird die eingangs beschriebene sog. „atypische duktale Reaktion“ angesehen. Dabei wird angenommen, dass die Zellen der dukталen Reaktion ihren Ursprung im postulierten Kompartiment der pluripotenten Stammzellen nehmen und eine Zwischenstufe auf der Differenzierungstrecke zu sowohl Hepatozyten als auch Cholangiozyten darstellen. Daher werden die Zellen der dukталen Reaktion („ductular reactive cells“, DRC) häufig auch als bipotente Leber-Progenitorzellen („liver progenitor cells“, LPC) oder gar als adulte Leberstammzellen („liver stem cells“, LSC) bezeichnet. In der Literatur findet sich zudem in Bezug auf Nagetiere auch der morphologisch geprägte Begriff „oval cells“ (z. Dt. ovale Zellen). (Farber, 1956; Popper et al., 1957) Laut einer der ältesten Arbeiten in diesem Feld soll die Differenzierung aus solchen bipotenten

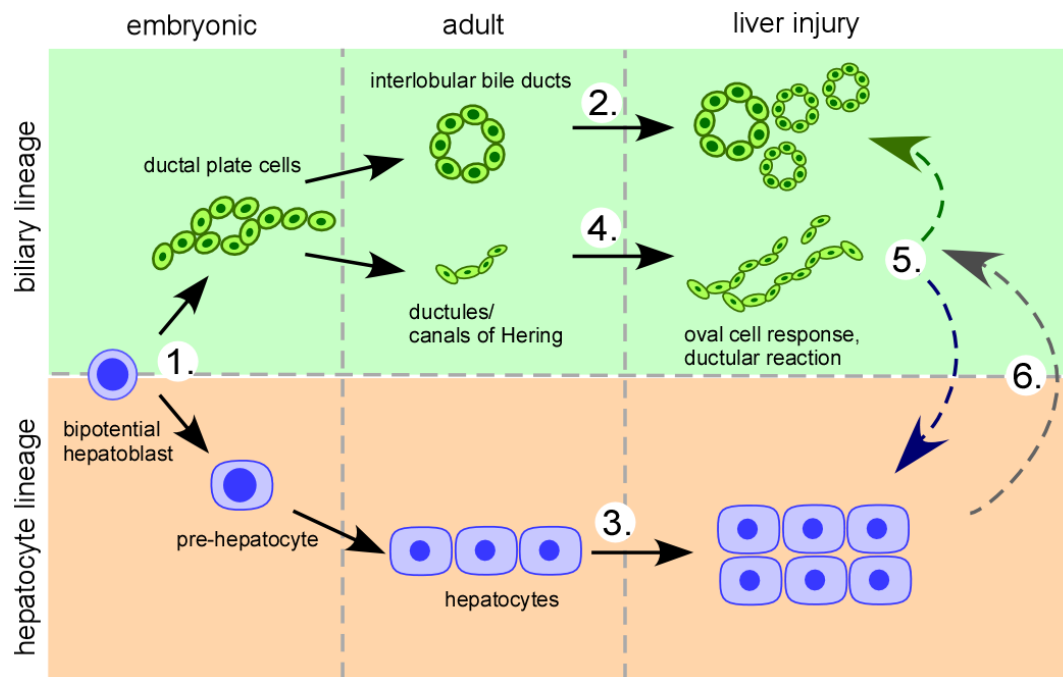
Progenitorzellen sogar für eine kontinuierliche, schädigungsunabhängige Leberregeneration verantwortlich sein, und zwar in Form von stetiger Auswanderung der neu entstehenden Hepatozyten von periportal bis in die inneren Abschnitte des Zentralvenenläppchens hinein. Dieses Modell wurde „streaming liver“, z. Dt. „fließende Leber“ genannt. (Zajicek et al., 1985)

Während der Hypothese der „streaming liver“ in der Leberhomöostase inzwischen zahlreiche, sehr kräftige Gegenargumente entgegengebracht wurden (Bralet et al., 1994; Kennedy et al., 1995; Malato et al., 2011) und die meisten Forscher sich darin einig sind, dass die Zellen der duktaalen Reaktion in ihrer ruhenden Form den Zellen des Gallengangsystems phänotypisch am ähnlichsten sind (Carpentier et al., 2011; Gouw et al., 2011; T. A. Roskams et al., 2004), herrschen nach wie vor große Meinungsunterschiede in Bezug auf die tatsächliche Funktion und das Teilungspotenzial dieser Zellpopulation. Insbesondere besteht eine fortlaufende wissenschaftliche Kontroverse darüber, ob in Zuständen eines vollständigen Proliferationsblocks des hepatozellulären Kompartimentes, wie zum Beispiel bei akutem Leberversagen, die Zellen der duktaalen Reaktion in der Tat als Progenitorzellen fungieren und eine relevante Masse an Hepatozyten regenerieren können. (Duncan et al., 2009; Espanol-Suner et al., 2012; Evarts et al., 1987; Marongiu et al., 2014) Im Rahmen von in-vitro-Versuchen wurde beispielsweise eindrücklich gezeigt, dass unter bestimmten, streng kontrollierten Bedingungen die duktaalen Proliferate sowohl Hepatozyten als auch biliäre Zellen hervorbringen können (Azuma et al., 2003; Huch et al., 2013; Schmelzer et al., 2007; Suzuki et al., 2008). Dies ließ sich allerdings in in-vivo-Versuchen nicht bestätigen. Vielmehr konnte in den letzten Jahren mithilfe der Lineage-Tracing-Technologie an Tiermodellen gezeigt werden, dass die mutmaßlichen Progenitorzellen der duktaalen Reaktion in den meisten Formen akuter oder chronischer Leberschädigung keine relevante Rolle hinsichtlich der Regeneration durch die Neogenese von Hepatozyten spielen und somit ausschließlich einer Erneuerung von Cholangiozyten dienen. (Jors et al., 2015; Rodrigo-Torres et al., 2014)

Darüber hinaus stellt sich die Frage nach einem möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen der duktaalen Reaktion und der zeitlich und räumlich assoziierten portalen und periportal Fibrose. Diese beiden Prozesse, d.h. die duktaale Reaktion und die Fibrogenese, werden in praktisch allen genannten Leberschädigungen, bzw. -erkrankung gemeinsam beobachtet und zeigen vergleichbare Dynamiken. In der Literatur finden sich Hypothesen, dass die Zellen der duktaalen Reaktion für die Aktivierung von Sternzellen im Disse-Raum und somit die gesteigerte Produktion extrazellulärer Matrix im Rahmen der Fibrose mitverantwortlich sind. (Clouston et al., 2009; Williams et al., 2014) Ob dies der Fall ist oder die duktaale Reaktion vielmehr durch die gleichzeitige (peri-)portale Entzündung und Fibrose angetrieben wird, ist jedoch weiterhin Gegenstand reger Diskussion. (Alison et al., 2009; Friedman, 2008; Greenbaum und Wells, 2011; Kallis et al., 2011; Yin et al., 2021)

Aufgrund ihres vermuteten pluripotenten, stammzellartigen Charakters wurden die Zellen der duktaalen Reaktion letztlich auch als potentielle Ursprungszellen des hepatozellulären Karzinoms und intrahepatischen Cholangiokarzinoms (HCC bzw. iCCA)

diskutiert. Diese Frage wird aktuell sehr intensiv erforscht und ist, dem aktuellen Forschungsstand nach zu urteilen, mindestens genauso kontrovers wie die oben aufgeführten Hypothesen. (Nio et al., 2017; Rountree et al., 2012; Yamashita und Kaneko, 2014; Yamashita und Wang, 2013)



**Abbildung 5: Biologisches Verhalten der hepatozellulären und biliären Zellreihe unter physiologischen Bedingungen und nach Leberschädigung:** (1.) Aus den bipotenten Hepatoblasten entstehen während der embryonalen Entwicklung die Hepatozyten und das biliäre Zellkompartiment; (2./3.) In der Homöostase und bei physiologischer Regeneration stelle die Selbsterneuerung des jeweiligen Zellkompartimentes den wichtigsten Mechanismus dar; (4.) Die meisten Formen der Leberschädigung führen zu duktaler Reaktion, welche laut der gängigen Lehrmeinung bipotente Zellen enthalten soll, die als Ursprung von sowohl Cholangiozyten als auch Hepatozyten dienen können (5.). Die Hepatozyten seien zudem fähig, durch eine Transdifferenzierung (Metaplasie) den biliären (Immun-)Phänotyp, vergleichbar mit den Zellen der duktaalen Reaktion, anzunehmen. Modifiziert nach (Geisler und Strazzabosco, 2015)

Aufgrund des ubiquitären Auftretens duktaaler Reaktionen bei Leberschädigungen, die allenfalls unter Extrembedingungen als Vorläufer für die Neogenese von Hepatozyten fungieren, bleibt unklar, ob diese Proliferate eine funktionelle Rolle besitzen oder vornehmlich negative Auswirkungen im Rahmen von Inflammations- und Schädigungsprozessen durch eine Propagation der Fibrogenese haben.

Die aktuellen Forschungsarbeiten von Herrn Dr. F. Geisler (Jors et al., 2015) adressierten diese Frage anhand tierexperimenteller Untersuchungen, im Speziellen an einem explizit zu diesen Zwecken generierten Mausmodell. Mittels verschiedener chemischer Leberschädigungsmodelle sowie Alteration bestimmter, an der Leberregeneration beteiligter, molekularer Mechanismen wurde einerseits bewiesen, dass die duktaale Reaktion als Teil des biliären Systems anzusehen ist und fast ausschließlich Cholangiozyten generiert. Zudem wurde eindrücklich gezeigt, dass diese Zellen über bestimmte molekulare Mechanismen nicht umprogrammiert werden können, um in-vivo Hepatozyten zu erzeugen. Außerdem wurde in zwei typischen Mausmodellen für Karzinogenese der Leber demonstriert, dass die duktaale Reaktion hierbei nicht als Ursprung des hepatozellulären Leberkarzinoms dient. Anhand der einerseits endogenen

und andererseits immunbasierten Fluoreszenzmarkierung verschiedener Zellkompartimente sowie konsekutiver Mikroskopie im zeitlichen Verlauf konnte letztlich auch die traditionsreiche „streaming liver“-Hypothese widerlegt werden. Zusammenfassend sprechen diese sowie die eingangs aufgeführten, zahlreichen Forschungsergebnisse der letzten Jahre dagegen, dass die duktale Reaktion eine entscheidende Rolle für die Erneuerung des Leberparenchyms spielt - und zwar sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen.

Daher wird alternativ von der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. F. Geisler postuliert, dass die duktale Reaktion vorrangig einer Wiederherstellung bzw. Aufrechterhaltung der Gallendrainage nach fulminanter Parenchymschädigung dient. Es sei davon auszugehen, dass die neuentstandenen Gangproliferate einerseits die Speicherkapazität des biliären Systems erhöhen und andererseits das partiell destruierte hepatozelluläre kanalikuläre Netzwerk an die noch intakten intrahepatischen Gallenwege erneut anschließen, um den Galleabfluss zu gewährleisten und eine weiter fortschreitende cholestatische Gewebeschädigung zu verhindern. Um dieser Frage nachzugehen wird im Rahmen dieser Doktorarbeit eine mikroskopisch-bildgebende Methode etabliert, die eine neuartige, dreidimensionale Darstellung der dukталen Reaktion in charakteristischen Schädigungsmodellen ermöglicht. Ein besonderes Augenmerk wird dabei der Konnektivität der neu entstandenen dukталen Proliferate zu sowohl dem vorbestehenden intrahepatischen Gallengangssystem als auch dem Kanalikuli-Netzwerk gelten, wodurch die Funktionalität der dukталen Reaktion im Rahmen der Gallendrainage belegt werden soll. Hierfür wird das im Labor von Dr. F. Geisler etablierte und in den oben genannten Versuchen verwendete Mausmodell eingesetzt, das auf dem Prinzip des sogenannten „Lineage Tracing“ beruht. Die darin eingesetzte endogene Fluoreszenz des biliären Kompartimentes und die neu entwickelte bildgebende Methode sollen eine Zelllinienspezifische Detektion und virtuelle Rekonstruktion der dukталen Reaktion im zeitlichen Verlauf der Schädigung ermöglichen.

### **2.3 Mausmodell und Lineage Tracing**

Um eine zuverlässige Darstellung der dukталen Reaktion im zeitlichen Verlauf zu erzielen, wurde von Herrn Dr. F. Geisler eine Mauslinie nach dem sogenannten Lineage Tracing-Prinzip generiert. Dies ist eine relativ junge Methode, die auf gezielter Markierung einer Zelllinie mittels eines DNA-kodierten, intrinsischen Fluoreszenzfarbstoffes beruht. Durch die endogene Fluoreszenzmarkierung bleiben alle Nachkommen jeder solchen Zelle dauerhaft detektierbar und die zeitlichen Veränderungen innerhalb des Zellkompartimentes nachverfolgbar. Werden mehrere solche Tiere parallel dem gleichen Schädigungsreiz in unterschiedlicher Dauer ausgesetzt, stellen die entstandenen Effekte verschiedene Stadien des Schädigungsprozesses dar. Eine chronologische Aneinanderreihung solcher Aufnahmen ermöglicht somit die Einsicht in die schädigungsbedingten Gewebeveränderungen im zeitlichen Verlauf.

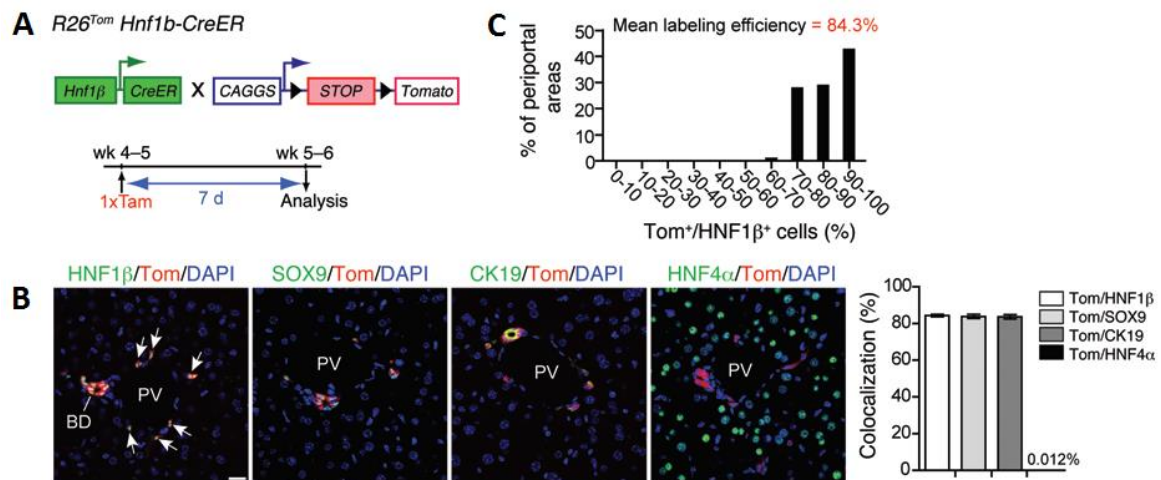


Im Speziellen wurde für die Darstellung der duktaalen Reaktion von Herrn Dr. F. Geisler die Mauslinie *Hnf1bCreERT<sup>2</sup>* (Solar et al., 2009) mit einer tdTomato Fluoreszenzreporter-Mauslinie, *Ai14-R26<sup>lox-STOP-lox-tdTom/+</sup>* (Madisen et al., 2010) verkreuzt. Die resultierende Mauslinie wird vereinfacht als *R26<sup>Tom</sup> Hnf1bCreERT<sup>2</sup>* bezeichnet und beruht, wie viele Lineage Tracing Modelle, auf dem Cre/loxP-Rekombinationssystem. Solche Systeme bestehen üblicherweise aus einem zelltypspezifischen Promoter gekoppelt an ein induzierbares Enzym, welches in aktiver Form die Expression eines Markers erzeugt. Im genannten Mausmodell wurde der biliäre *Hnf1b*-Promoter gewählt und an die Sequenz der CreERT2-Rekombinase gekoppelt. ERT2 bezeichnet einen mutierten humanen Östrogenrezeptor, welcher eine vielfach höhere Affinität zum synthetischen Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen als zu den körpereigenen Östrogenen besitzt. Diese Eigenschaft ist entscheidend für die Stabilität des Systems unter physiologischen Bedingungen. Ein weiterer Bestandteil des Mausmodells ist die im Rosa26-Lokus befindliche Reporter-Kassette, die ein gefloxtes Stopp-Signal und nachfolgend die Sequenz für das fluoreszierende Protein tdTomato beinhaltet. In unbehandeltem Zustand wird die CreERT2-Rekombinase in HNF1 $\beta$ -positiven Zellen exprimiert und befindet sich in ruhendem Zustand im Zytoplasma. Nach einer Injektion von Tamoxifen wird die Rekombinase dank dem ERT2-Rezeptor aus dem Zytoplasma in den Zellkern überführt und kann dort die gefloxt Stopp-Sequenz ausschneiden. Dadurch wird ihre Wirkung aufgehoben und die Expression von tdTomato induziert. (Feil et al., 2014; Feil et al., 2009) Daraus resultiert eine irreversible intrinsische, in-vivo Fluoreszenzmarkierung des gesamten HNF1 $\beta$ -positiven biliären Systems und konsekutiv aller daraus entstehender Proliferate inkl. Zellen der duktaalen Reaktion. (Jors et al., 2015)

Der eingesetzte rote Fluoreszenzfarbstoff tdTomato gehört zu den intensivsten und robustesten bekannten Fluoreszenzstoffen (Piatkevich und Verkhusha, 2011). Seine Induktion erfolgt in unserem Modell in Abhängigkeit vom Promoter für das HNF1 $\beta$ -Protein, welches in der postnatalen Leber spezifisch in den biliären Zellen exprimiert wird (Coffinier et al., 2002; Isse et al., 2013), sodass hierdurch hochspezifisch und ausschließlich Cholangiozyten markiert werden. Die Spezifität von HNF1 $\beta$  in der Leber gilt allerdings nur für adulte, ausdifferenzierte biliäre Zellen. Perinatal, d.h. bis einige Wochen nach der Geburt wird dieses Protein teilweise auch von Hepatozyten exprimiert (Jors et al., 2015; Schrem et al., 2004). Eine zu frühe und damit unspezifische Expression von tdTomato wird dadurch verhindert, dass der Fluoreszenz-kodierenden Sequenz die Stopp-Kassette vorgeschaltet wird. Dies ermöglicht, dass die rote tdTomato-Fluoreszenz erst durch die Tamoxifen-Gabe zum gewählten Zeitpunkt, das heißt gezielt nach dem Abschluss der Hepatoblastendifferenzierung „eingeschaltet“ wird. (T. Roskams et al., 2008; Shiojiri, 1997)

In früheren Versuchen von Herrn Dr. F. Geisler wurde die Zuverlässigkeit dieser genetischen Fluoreszenzmarkierung überprüft. (**Abbildung 6**) Dazu wurden die Cholangiozyten zusätzlich mit anderen etablierten biliären Markern, wie zum Beispiel CK19 oder SOX9, gefärbt und die Kolokalisation mit dem intrinsischen tdTomato-Signal ausgewertet. Im biliären System wurde hierbei eine >84%-ige Übereinstimmung der beiden Signale und somit eine hervorragende Labeling-Effizienz des genetischen Modells demonstriert. Gleichzeitig fand sich die endogene Fluoreszenzmarkierung in nur 0,012%

der HNF4 $\alpha$ -positiven Hepatozyten, was ebenfalls für eine sehr hohe Spezifität dieser Methode spricht. (Jors et al., 2015)



**Abbildung 6: Spezifische Markierung des biliären Kompartiments durch Lineage Tracing und endogene Fluoreszenz.** (A) Mausmodell mit eingekreuztem tdTomato-Genkonstrukt. Zur Induktion der Rekombinase und folglich Expression der Fluoreszenz wurde Mäusen im Alter von vier bis fünf Wochen Tamoxifen i.p. verabreicht und eine Woche bis zur Sektion abgewartet. (B) Die tdTomato-Fluoreszenz ist nahezu ausschließlich in Hnf1 $\beta$ /Sox9/CK19-positiven biliären Zellen zu sehen, dabei sind Hnf4 $\alpha$ -positive Hepatozyten äußerst selten markiert (0,012%  $\pm$  0,003%, n=10). (C) Die Effizienz der tdTomato-Markierung wird mit 84,3%  $\pm$  0,6%, (n=5) angegeben. Modifiziert nach (Jors et al., 2015)

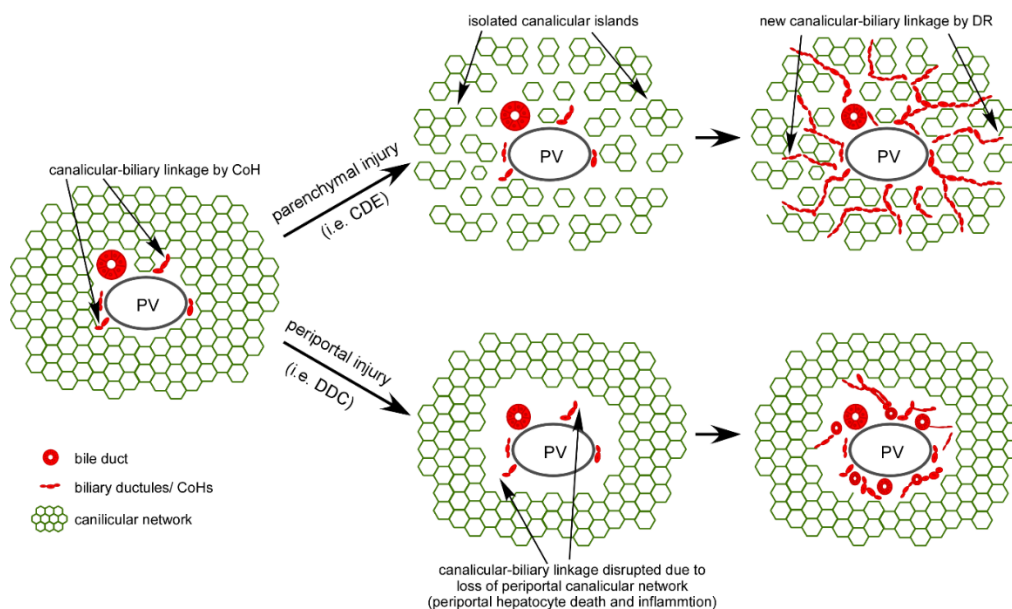
Aufgrund der hocheffizienten und spezifischen intrinsischen Fluoreszenzmarkierung des biliären Zellkompartimentes und der Robustheit des Genkonstruktes gegenüber physiologischen Einflüssen bietet dieses Mausmodell eine hervorragende Grundlage, um das intrahepatische Gallengangssystem in seiner Gesamtheit sowie die daraus entstehende duktale Reaktion spezifisch und zuverlässig abzubilden. Die Markierung auf der DNA-Ebene ermöglicht zudem die Detektion aller nachfolgenden dukталen Proliferate über Zellgenerationen hinweg und bietet somit eine Basis für die Nachverfolgung und Darstellung von chemisch-toxisch induzierten dukталen Remodellierungsprozessen im Rahmen dieser Doktorarbeit.

## 2.4 Leberschädigungsmodelle

Für Untersuchungen an Mausmodellen gibt es verschiedene experimentelle Ansätze, durch Leberschädigung eine duktale Reaktion auszulösen. Grundsätzlich unterscheidet man dabei mechanische und chemische Methoden. Ein klassisches und am häufigsten verwendetes Beispiel mechanischer Methoden ist die Gallengangsligatur. Die chemischen Methoden beinhalten hingegen eine ganze Reihe von experimentellen Modellen, welche überwiegend auf oraler Gabe spezifischer Schadstoffe beruhen, wodurch gezielt und kontrolliert eine Lebererkrankung ausgelöst wird. Für diese Arbeit wurde ein solches

chemisch-nutritives Schädigungsmodell gewählt, nämlich das etablierte und in diesem Forschungsfeld oft verwendete Fütterungsmodell CDE.

Das CDE-Fütterungsmodell (eng. „choline deficient ethionine supplemented diet“, Cholin-arm Ethionin-angereichert) ist ein klassisches Modell für die schwere entzündliche Fettlebererkrankung des Menschen. Es verursacht in erster Linie eine hepatozelluläre Schädigung mit rascher konsekutiver Steatose und Steatohepatitis, verbunden mit dem Auftreten einer charakteristischen dukталen Reaktion. Dabei kommt es zu einer diffusen neoduktulären Proliferation, welche mit der fortschreitenden CDE-Schädigung ihre schmalen, langen Ausläufer bis tief in das lobuläre Parenchym entsendet. (**Abbildung 7**) In Langzeitfütterungsversuchen kommt es zu progredientem fibrotischem Leberumbau bis hin zu Leberzirrhose und schließlich Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms. (Gogoi-Tiwari et al., 2017; Passman et al., 2015; Shinozuka et al., 1978)



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der dukталen Reaktion in den prädominanten Pathomechanismen der Leberschädigung. Im Rahmen einer Parenchymschädigung, wie bei dem in dieser Arbeit eingesetzten CDE-Modell (obere Bildhälfte) kommt es infolge des diffusen Hepatozytenuntergangs zu einer zunächst eindrucksmäßig disseminierten dukталen Reaktion, die in fortgeschritteneren Stadien eine Kontinuität der schmalen Ausläufer bis tief in das Läppcheninnere aufweist. Es wird postuliert, dass die stark verzweigten langen Neoduktuli einer Wiederherstellung des Galleabflusses nach Disruption des kanalikulären Netzwerkes innerhalb des Läppchens dienen. Im Gegensatz dazu führt eine prädominant biliäre Schädigung (untere Bildhälfte) zu einer vorwiegend (peri-)portal lokalisierten und kompakten dukталen Reaktion, welche der Überbrückung des hierfür charakteristischen Untergangs von periportal Hepatozyten dienen soll. (Skizze: Dr. F. Geisler)

Das CDE-Schädigungsmodell wird in dieser Arbeit als Beispiel für die Anwendbarkeit des entwickelten Protokolls dienen. Die bislang zweidimensional bereits ausführlich beschriebene Morphologie der CDE-typischen dukталen Reaktion wird im Vorliegenden zum ersten Mal in drei räumlichen Ebenen dargestellt und deskriptiv charakterisiert, was den Mehrwert der hier etablierten bildgebenden Methode demonstrieren wird.

## 2.5 Eine Dimension mehr: 3D-Imaging der Leber

Historisch wurde die Mikroarchitektur der Leber in erster Linie anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen und später Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie erforscht. Die Lichtmikroskopie bediente sich lange Zeit nur konventionell-histologischer Färbemethoden, die unter Einsatz von Farbstoffen das Gewebe mikroskopisch sichtbar und dadurch einer histomorphologischen Begutachtung zugänglich machen. Eine Weiterentwicklung stellte die Einführung von immunbasierten Färbemethoden dar. Diese beruhen auf spezifischer Bindung von markierten, d.h. sichtbar gemachten Antikörpern an Antigene einer Zelle. Erfolgt die Sichtbarmachung des Antikörpers durch eine chemische Reaktion, spricht man von Immunhistochemie, wird hingegen ein Fluoreszenzfarbstoff benutzt, handelt es sich um Immunfluoreszenz. Durch die spezifische Anfärbung von Zellen anhand ihrer Antigene ermöglichen diese Färbemethoden im Rahmen der Lichtmikroskopie eine weiterführende, genauere Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen sowie Rückschlüsse zu ihrem Ursprung und biologischem Verhalten. Mit zunehmender Verfügbarkeit dieser Methoden seit ungefähr 50 Jahren (Childs, 2014) gelang eine immer genauere Zuordnung verschiedener Zellpopulationen der Leber wie der Hepatozyten, Gallengangs- und Gefäßzellen, wodurch sich auch neue Dimensionen zum funktionellen Verständnis der hepatischen Mikroarchitektur öffneten. Trotz dieser großen Fortschritte durch die immunhistochemischen Färbemethoden bestand aber nach wie vor die Einschränkung der Mikroskopie auf zwei räumliche Dimensionen. Dadurch, dass das Gewebe im Rahmen der konventionellen Mikroskopie nur in einer Ebene betrachtet wird, können Strukturen, die sich über die angeschnittene Zelllage hinaus erstrecken, nicht in ihrer Kontinuität abgebildet werden. Angewendet an ein aus mehreren Kompartimenten aufgebautes Gewebe wie die Leber, generiert die konventionelle Mikroskopie damit lediglich Aufnahmen einer isolierten Ebene, welche die Binnenarchitektur einzelner Komponenten, z.B. kommunizierender lumenhaltiger Strukturen, nicht zusammenhängend abbilden.

Die intrahepatischen Gallenwege erscheinen in der konventionellen zweidimensionalen Histologie vorwiegend als einzelne von kubischem Epithel ausgekleidete Tubuli. Dabei lassen sich in aller Regel die ungefähr in der Mitte des jeweiligen Portalfeldes gelegenen interlobulären Gallengänge mit erkennbaren Lumina sowie kleinere, etwas peripher im Portalfeld liegenden Duktuli unterscheiden. In der konventionellen zweidimensionalen Histologie kann in diesen Duktuli meist nur eine Epithelschicht detektiert werden und Nachweis von Lumina ist oft nicht möglich. Letztere stellen die kleinsten in der konventionellen Histologie noch sichtbaren Einheiten des biliären Kompartimentes dar. Die Hering-Kanälchen als terminale Verbindungsstücke zum kanalikulären Netzwerk kommen in der Routinehistologie oft gar nicht zum Vorschein. (Mills, 2012) Die Verbindungen zwischen den beschriebenen biliären Strukturen des Portalfeldes lassen sich nur selten, in meist zufälligen tangentialen Anschnitten darstellen. Die genaue, realitätsgetreue Architektur des Gallengangsystems und somit die der Gallendrainage zugrundeliegende funktionelle Anatomie bleibt dieser Methode jedoch nach wie vor unzugänglich.

Unsere bisherigen, von der Lichtmikroskopie hergeleiteten Vorstellungen über die dreidimensionale Mikromorphologie der Leber stellen also lediglich ein virtuelles Modell, d.h. eine Annäherung an die tatsächliche Leberarchitektur dar. Für eine realistische Darstellung der Architektur mit dem Ziel, die funktionellen räumlichen Beziehungen verschiedener Leberkompartimente zu verstehen, ist daher die Einbeziehung der dritten Dimension, d.h. eine kontinuierliche dreidimensionale Darstellung des Gewebes notwendig. Im Gegensatz zu den üblicherweise nur 2 bis 5  $\mu\text{m}$  dicken Paraffinschnitten müssten hierfür wesentlich dickere Gewebeschnitte angefertigt werden. Der Durchmesser von kleinen Gallenduktuli beträgt bis zu 15  $\mu\text{m}$  und von interlobulären Gängen zwischen 15 bis 100  $\mu\text{m}$  (Strazzabosco und Fabris, 2008), sodass eine optimale Darstellung des intrahepatischen biliären Gangsystems in drei Dimensionen erst bei einer Schnittdicke von mindestens 100  $\mu\text{m}$  zu erwarten wäre. Dies bringt jedoch erhebliche technische Schwierigkeiten mit sich und die gängigen bildgebenden bzw. Färbeprotokolle stoßen hierbei sehr bald an ihre Grenzen. Somit sind Methoden, die eine Anfärbung und Abbildung von dicken Gewebeschnitten ermöglichen würden, von hohem wissenschaftlichem Interesse.

### 2.5.1 Bisherige Fortschritte

Um die Limitationen der konventionellen zweidimensionalen Histologie zu überwinden und die Mikroarchitektur von Organen wie der Leber in ihren drei Dimensionen besser abzubilden, wurden in der jüngeren Vergangenheit verschiedene Ansätze erprobt. Die wichtigsten Herangehensweisen waren zum einen die Anfertigung und Aufnahme von konventionellen Serienschnitten mit anschließender Rekonstruktion und zum anderen die Erzeugung von Ausgusspräparaten luminaler Leberstrukturen. Eine immer größere Bedeutung erlangen neuerdings auch das „Durchsichtigmachen“ von Geweben mittels sog. Tissue Clearing sowie die Immunfluoreszenz-basierte konfokale Mikroskopie.

Die erstgenannte Herangehensweise beruht auf einer Anfertigung von Serienschnitten, also zahlreichen konsekutiven konventionell-histologischen Schnitten in genau definierten Abständen, und ihrer anschließenden sequentiellen mikroskopischen Aufnahme. Dabei können bestimmte Strukturen beispielsweise durch den Einsatz von Immunhistochemie spezifisch markiert und als solches aufgenommen werden. Durch eine nachträgliche Rekonstruktion, d.h. erneutes „Stapeln“ der Serienschnitte werden sie über die dritte räumliche Achse zusammengeführt, wodurch auf die allgemeine Architektur des abgebildeten Gewebestückes geschlossen werden kann. Auf diese Art wurde im Jahr 1999 von Theise et al. eine beeindruckende Analyse der Architektur von intrahepatischen Gallenwegen, insbesondere der Hering-Kanälchen und der duktaalen Reaktion unter spezifischen Bedingungen aufgestellt. Sie beinhaltete die Anfertigung von zwischen 20 und 63 Serienaufnahmen pro Fall und anschließende aufwendige Rekonstruktion sowie schematisch-tabellarische Auswertung der erzeugten räumlichen Daten. (Theise et al., 1999) Im Allgemeinen lassen sich mit dieser Methode zwar hochwertige und realitätsnahe Daten über die Mikroarchitektur generieren, allerdings geht sie mit hohem zeitlichem Aufwand einher und zeigt aufgrund vieler Einzelschritte

eine verhältnismäßig hohe Fehleranfälligkeit. Daher ist sie für größere systematische Studien der Gewebearchitektur nicht uneingeschränkt geeignet.

Eine ganz andere Herangehensweise stellt die kontinuierliche Darstellung von luminalen Strukturen mithilfe von Ausgusstechniken dar. In einer Arbeit aus dem Jahr 2012 wurde ein Protokoll zur Gewinnung solcher Ausgüsse aus Kunstharzen vorgestellt und als Anwendungsbeispiele einerseits die intrahepatischen Pfortaderäste und andererseits das intrahepatische Gallengangssystem dargestellt. (Walter et al., 2012) Dies erfolgte mittels retrograder Kunstharzinjektion in einen extrahepatischen Pfortaderast respektive Gallengang. Nach anschließender chemischer Mazeration des umgebenden Lebergewebes mit Kalilauge verblieb ein realitätsgetreuer Harzausguss der Pfortaderäste bzw. der Gallenwege. Diese Ausgüsse ermöglichten prinzipiell einen näheren Einblick in die Verästelung sowie die Interkonnektivität der jeweiligen luminalen Strukturen. Dennoch weisen Ausgusstechniken naturgemäß entscheidende Limitationen auf. Einerseits können aufgrund der Partikelgröße der injizierten Stoffe die kleinsten Gallenduktuli nicht mehr erreicht werden, sodass ihre Konturen nach Mazeration verloren gehen. Außerdem werden bei diesem Vorgehen nur die Lumina festgehalten, ohne die konturgebenden Zellen der Zielstruktur abzubilden, wodurch ihre weiterführende Untersuchung an einem solchen Präparat nicht mehr möglich ist. Eine interessante Modifikation der indirekten Darstellung der Gallenwege besteht in der retrograden Applikation von Tusche über den extrahepatischen Hauptgallengang (*D. hepaticus communis*) in Verbindung mit Tissue Clearing (Kaneko et al., 2015), wodurch auch die Darstellung kleinerer intrahepatischer Gallengänge möglich ist.

### 2.5.2 Tissue Clearing und konfokale Mikroskopie

Als Tissue Clearing wird eine relativ neue Familie der Methoden bezeichnet, die allesamt zum Ziel haben, biologisches Gewebe annähernd durchsichtig und somit für die Laserstrahlen zugänglicher zu machen. Dies wird durch die Alteration der optischen Gewebeeigenschaften unter Einsatz von chemischen und in manchen Fällen physikalischen Verfahren erreicht. Dadurch wird einerseits die Tiefe und andererseits die Qualität von mikroskopischen Aufnahmen gesteigert. Das Grundprinzip all dieser Methoden ist die Angleichung von Brechungsindizes innerhalb der Probe, bzw. des Gewebestückes. Dies wurde bereits 1914 als Grundlage des „Durchsichtigmachens“ vom deutschen Anatomen Werner Spalteholz postuliert. (Spalteholz, 1914) Im Rahmen moderner Anwendungen erreicht man dadurch eine geringere Streuung von Laserstrahlen, und damit eine größere Eindringtiefe, höhere Auflösung sowie kleinere Signalverzerrung innerhalb der mikroskopischen Aufnahme. (Azaripour et al., 2016; Silvestri et al., 2016; Yu et al., 2017). Gewissermaßen stellt diese Technik eine potenzielle Erweiterung jeder Methode dar, bei welcher ganze Gewebestücke dreidimensional abgebildet werden. Daher können sie im Rahmen von sowohl Ausgusstechniken als auch konfokaler Mikroskopie zum Einsatz kommen.

In der oben beschriebenen Arbeit von Walter et al. wurde nach der erfolgten Harzinjektion als mögliche Alternative zur Gewebemazeration auch Tissue Clearing erprobt, um den Harzausguss innerhalb des noch intakten Organs von außen sichtbar zu machen. Die andere, bereits erwähnte Arbeit von Kaneko et al. basierte hingegen grundsätzlich auf der Kombination eines Injektionsverfahrens mit Tissue Clearing und bildete zudem auch das dem Ausgusspräparat angrenzende Gewebe ab. (Kaneko et al., 2015) Zur luminalen Gallengangsdarstellung wurde hierbei statt Kunstharz schwarze Tusche in einen Gallengang retrograd injiziert. Das Gewebe wurde anschließend mit Tissue Clearing optisch durchsichtig gemacht und als Ganzes aufgenommen. Durch die sich kontinuierlich innerhalb der Gallengänge ausbreitende Tusche wurde sehr eindrücklich das Vorhandensein eines sog. Gallengangsplexus, d.h. zarter zirkumferenzieller Verzweigungen des Gallenganges entlang des Portalvenenastes belegt, was für die Untersuchungen der funktionellen Leberarchitektur eine nahezu revolutionäre Erkenntnis darstellte. In einem weiteren Schritt wurde eine duktale Reaktion ausgelöst, die neuentstandenen Zellen immunhistochemisch markiert und anschließend ihre unmittelbare Anbindung an den tuschemarkierten biliären Plexus konventionell-histologisch gezeigt. Diese Aufnahmen waren hinsichtlich der funktionellen Anatomie der dukталen Reaktion und ihrer Relation zum bestehenden intrahepatischen Gallengangssystem von großer Bedeutung. Allerdings handelte es sich hierbei lediglich um zweidimensionale Aufnahmen von ausgewählten Gewebeschnitten, die nach Tuscheinjektion angefertigt und exemplarisch gefärbt wurden, sodass sie keine dreidimensionale Studie im engeren Sinne darstellten.

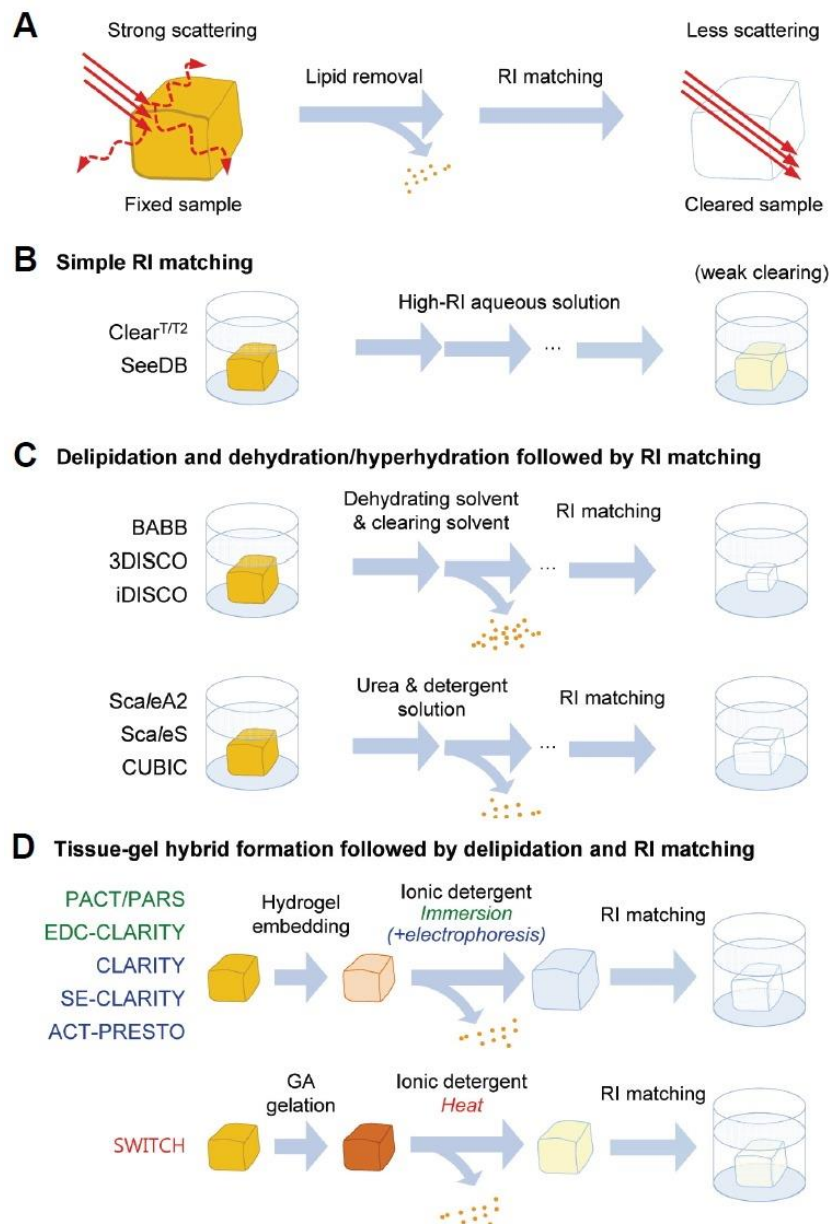
Ein besonderes Augenmerk hinsichtlich dreidimensionaler Gewebedarstellung gilt der relativ neuen Technologie der konfokalen Mikroskopie. Diese wurde speziell mit dem Ziel entwickelt, das Abbilden von in der Regel mit Immunfluoreszenz gefärbten dicken Gewebestücken gleich in drei Dimensionen zu ermöglichen. Im Falle der gängigen konfokalen Laser-Scanner-Mikroskopie (eng. CLSM bzw. LCSM) geschieht dies durch Laserstrahlen, die das Gewebe punktuell abrastern und die von den markierten Zellen emittierte Fluoreszenz registrieren. Dabei werden zunächst zweidimensionale Gewebeschichten sequentiell aufgenommen und anschließend entlang der dritten Achse digital zusammengeführt. So entsteht ein dreidimensionales Mikroskopiebild des gewählten Gewebeabschnittes. Diese Technologie stellt also vom Prinzip her eine automatisierte und digitalisierte Version der eingangs beschriebenen Gewebedarstellung aus Serienschnitten. Da die Leber ein kompaktes, parenchymatöses Organ ist, werden die Laserstrahlen beim Abrastern der Gewebeschichten mit zunehmender Tiefe immer schwächer und es kommt zu steigender Signalstreuung. (S. C. Lee und Bajcsy, 2006; Morales-Navarrete et al., 2015; Richardson und Lichtman, 2015) Folglich ließ sich in unserem Labor mittels konfokaler Mikroskopie mit den gängigen Färbeprotokollen das Lebergewebe nur bis zu einer Tiefe von ungefähr 30 µm verzerrungsfrei darstellen. Im Vergleich zur konventionellen zweidimensionalen Mikroskopie stellt dies durchaus einen großen Fortschritt dar. Für eine kontinuierliche dreidimensionale Darstellung der Architektur von komplex verzweigten Strukturen wie den Gallenwegen reichen solche Aufnahmetiefen allerdings nicht aus, da ihre Verästelung erst in größeren Gewebevolumina adäquat zum Vorschein kommen kann.

Einen vielversprechenden Lösungsansatz hierfür bietet die Kombination von Tissue Clearing mit der konfokalen Mikroskopie. In den letzten Jahren wurden in dieser Hinsicht bemerkenswerte Fortschritte erzielt. Besonders hervorzuheben sind die dreidimensionalen konfokalmikroskopischen Aufnahmen von ganzen Organen und sogar vollständigen Mausembryonen. (Erturk et al., 2012; Hama et al., 2011; Kuwajima et al., 2013; Renier et al., 2014; Yang et al., 2014) Hierfür wurden unterschiedliche Arten von Tissue Clearing verwendet und teilweise speziell für die jeweiligen Anforderungen und Gewebeart entwickelt. Die meisten etablierten Methoden beruhen auf dem Einsatz von entweder organischen Lösungsmitteln oder wasserbasierten Reagenzien. In Einzelfällen werden sie auch durch physikalische Methoden wie die Elektrophorese ergänzt. Sowohl bei auf organischen als auch auf wasserlöslichen Mitteln basierten Methoden wird prinzipiell die Gewebszusammensetzung dahingehend alteriert, dass eine Anpassung von Brechungsindizes innerhalb des Gewebes bei gleichzeitiger Erhaltung der Immunfluoreszenz erzielt wird. (Kolesova et al., 2016; Yang et al., 2014) Biologisches Gewebe besitzt nämlich die Eigenschaft der intrinsischen Lichtstreuung. Das heißt, dass die Licht- bzw. Laserstrahlen beim Durchdringen durch das Gewebe in ihrem Verlauf nicht parallel zueinander bleiben, sondern unregelmäßig in alle Richtungen gestreut werden. Dieser Effekt führt insbesondere in der Tiefe zu zunehmender Signalverzerrung und folglich zu unscharfen Aufnahmen, was am ehesten auf die komplexe Zusammensetzung von biologischem Gewebe zurückzuführen ist. Die festen Bestandteile der Zelle besitzen nämlich einen deutlich höheren Brechungsindex als Wasser ( $n=1,33$ ), von welchem sie umgeben sind. So liegt der Brechungsindex von biologischen Lipidmembranen bei ungefähr 1,45 und der von dehydrierten Proteinen bei über 1,5. (Ke et al., 2013; Richardson et al., 2015) An den Grenzen zwischen den verschiedenen Kompartimenten kommt es aufgrund dieser Unterschiede zu mehrfacher und multidirektionaler Lichtbrechung, was die Aufnahmequalität mit zunehmender Gewebedicke konsekutiv beeinträchtigt. Durch die Anpassung der Brechungsindizes verschiedener Gewebekompartimente mittels Tissue Clearing wird die Lichtbrechung auf ein Minimum reduziert und der geradlinige Verlauf sowie ursprüngliche Intensität der Laserstrahlen unterstützt. Dadurch ergibt sich ein deutlicher Sprung in der maximal möglichen Tiefe und Qualität der konfokalmikroskopischen Aufnahmen.

Es gibt eine ganze Reihe von Methoden, die - getreu dem traditionellen Prinzip nach Spalteholz - auf dem Einsatz von organischen Lösungsmitteln basieren. Die wichtigsten darunter sind: BABB, 3DISCO und iDISCO (Becker et al., 2008; Dodt et al., 2007; Erturk et al., 2012; Erturk und Bradke, 2013; Erturk et al., 2014; Renier et al., 2014). Bei diesen Protokollen wird dem Gewebe zunächst möglichst viel Wasser, z.B. mit Alkoholen oder Tetrahydrofuran (THF) entzogen, um die Heterogenität des Gewebes hinsichtlich seiner Brechungsindizes zu verringern. Anschließend wird es in ein organisches Lösungsmittel, das anhand seines Brechungsindex spezifisch gewählt wurde, getränkt. Dieses füllt die bei der Dehydratation entstandenen Gewebelücken aus. Das resultiert in einer zusätzlichen Angleichung der Brechungsindizes und somit optimierten Bedingungen für die Lasermikroskopie. Einen gegensätzlichen Ansatz bieten die auf wasserlöslichen Mitteln basierte Tissue Clearing Protokolle, wie SeeDB, Scale, Clear<sup>T</sup>, TDE, FRUIT, CUBIC (Hama et al., 2011; Hou et al., 2015; Ke et al., 2013; Kuwajima et al., 2013; Staudt et al., 2007; Susaki et al., 2014; Tainaka et al., 2014). Bei diesen wird das Gewebe über einen längeren



Zeitraum in ein wässriges Medium getränkt (SeeDB, Clear<sup>T</sup> oder TDE), welches einen höheren Brechungsindex als Wasser, bzw. annähernd den der festen Zellbestandteile, besitzt.



**Abbildung 8: Funktionsweise verschiedener Tissue Clearing Techniken.** Nach (Seo et al., 2016). (A) Das Grundprinzip von Tissue Clearing (TC) ist die Anpassung der Brechungsindizes (RI) innerhalb eines Gewebes, wodurch die Lichtstreuung verringert und die Aufnahmequalität verbessert wird. Am einfachsten gelingt dies durch die Entfernung der Lipide aus dem Gewebe. (B-D) Verschiedene methodologische Ansätze: (B) Eine einfache RI-Anpassung durch Ersetzen von Wasser durch wässrige Lösungen mit höherem RI resultiert in einem unvollständigen TC. (C) Eine Kombination von Lipid- und Wasserentfernung, bzw. Lipidentfernung und Hyperhydratation bewirkt eine sehr gute RI-Anpassung. Im Ersteren kommt es zudem zu einer Schrumpfung des Gewebes im Rahmen der Entwässerung, während Letzteres oft zu einer Größenzunahme führt (nicht dargestellt). (D) Komplexere, gelbasierte Methoden mit Einsatz von ionischen Tensiden und teilweise Elektrophorese liefern ebenfalls sehr gute Ergebnisse, sind allerdings mit höherem Aufwand und Kosten verbunden.

Das Medium ersetzt nach und nach das gewebeeigene Wasser, wodurch wiederum eine Angleichung der Brechungsindizes innerhalb der Probe erreicht wird. In manchen Protokollen werden zur Verbesserung des Clearing-Effektes zusätzlich auch Lipide aus den Zellmembranen herausgelöst. Dies erfolgt entweder passiv durch die Hyperhydratation (Scale, Clear<sup>T</sup>, FRUIT, CUBIC) oder durch den Einsatz von Detergenzien wie SDS, oder aber, wie in manchen fortschrittlicheren Methoden, aktiv durch z.B. Elektrophorese (CLARITY, PACT/PARS) (Chung und Deisseroth, 2013; Chung et al., 2013; Yang et al., 2014). Die zusätzliche Lipidentfernung spielt naturgemäß v.a. bei stark fetthaltigem Gewebe wie dem Gehirn eine Rolle, da die Lichtstreuung in solchen Fällen zum größten Teil durch die Lipidkomponente zustande kommt. (Hou et al., 2015) Für das Clearing solider parenchymatöser Organe dürfte dieser Effekt eine untergeordnete Rolle spielen. Einen Überblick über die gängigsten Tissue Clearing Verfahren bietet die **Abbildung 8**.

Verschiedene Tissue Clearing Protokolle, wie ScaleViewA2, SeeDB (Vlieg, 2015 (preprint)); CUBIC (Tainaka et al., 2014) und CLARITY (H.; Park Lee, J-H.; Seo, I.; Park, S-H., Kim, S., 2014) wurden bereits exemplarisch an der Leber angewandt, um ihre Fähigkeit, das kompakte Lebergewebe durchsichtig zu machen zu demonstrieren. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Tissue Clearing hingegen gezielt eingesetzt, um die Mikroarchitektur der Leber im Speziellen zu untersuchen. Unser Vorgehen orientiert sich im Wesentlichen an der 3DISCO-Methode. Sie eignet sich hervorragend für die Behandlung von großen Gewebestücken und auch soliden parenchymatösen Organen. Dies wurde schon von den Entwicklern der Methode, und anschließend von weiteren Forschungsgruppen erfolgreich an Gehirn, Rückenmark, Lymphknoten, Milz, Lunge, Brustdrüse, Pankreas und soliden Tumoren demonstriert. (Erturk et al., 2012; Erturk et al., 2013; Erturk et al., 2014; Renier et al., 2014) Ihre Wirksamkeit am Lebergewebe wurde ebenfalls in der bereits erwähnten Arbeit von Vlieg et al. belegt. Das 3DISCO-Protokoll gehört zu der Gruppe der Methoden, die sich organischer Lösungsmittel bedienen, und besteht aus vergleichsweise wenigen Behandlungsschritten. Dadurch ist es im Vergleich zu den anderen etablierten Protokollen sehr kosteneffizient und einfach durchzuführen. Für die Entwässerung wird das zyklische Ether Tetrahydrofuran (THF) und für das eigentliche „Durchsichtigmachen“ der Chlorkohlenwasserstoff Dichlormethan (DCM) benutzt. Durch die Modifikation einzelner Komponenten des 3DISCO-Standardprotokolls ergibt sich das Grundgerüst unseres Vorgehens, welches dazu führt, dass das Gewebe für die Laserstrahlen des konfokalen Mikroskops auch in tiefen Schichten zugänglich gemacht wird.

### 2.5.3 Optimierung der Immunfluoreszenz

Für die Generierung hochwertiger dreidimensionaler mikroskopischer Aufnahmen mittels Immunfluoreszenz müssen zunächst entscheidende Limitationen des Verfahrens selbst überwunden werden. Im Vergleich zu konventionellen Immunfärbungen bedingt die wesentlich größere Schnittdicke im Rahmen der dreidimensionalen Bildgebung eine deutlich erschwerte Antikörperpenetration, sodass bei der Anwendung von üblichen

Färbeprotokollen nur die oberflächlichen Gewebeschichten erreicht werden können. Die tiefergelegenen Schichten bleiben also in aller Regel ungefärbt und somit selbst bei optimaler Laserpenetration nicht detektierbar. Dieser Effekt fällt insbesondere in kompaktem zell- und matrixreichem Gewebe, wie der Leber, der Niere sowie dem besonders fetthaltigen Gehirn ins Gewicht. Da die dreidimensionale Mikroskopie, insbesondere seit der Entwicklung von Tissue Clearing, für die Erforschung verschiedener Organe viele neue Möglichkeiten geöffnet hat und immer mehr an Bedeutung gewinnt, wurden diese Probleme bereits von Wissenschaftlern jenseits der Leberforschung identifiziert und untersucht. In den letzten Jahren wurden so diverse Lösungsstrategien entwickelt, wie z.B. das chemische Herauslösen störender Gewebekomponenten zur Erhöhung der Gewebedurchlässigkeit oder die Verbesserung der eigentlichen Antikörperbindung an die Zielstrukturen durch Optimierung der Bindungsaffinität und der Gewebefixation. Hinsichtlich der Gewebedurchlässigkeit wurden neuerdings große Fortschritte im Bereich der Gehirnforschung erzielt. Hier befassten sich mehrere Arbeiten (Miyawaki, 2015; Vigouroux et al., 2017; Zhu et al., 2017) mit Möglichkeiten, die Gewebestruktur durch chemische Behandlung aufzulockern, und dadurch eine bessere Antikörperpenetration zu ermöglichen. Das gemeinsame Prinzip dieser Methoden ist das Herauslösen von optisch störenden Zellbestandteilen, insbesondere von Lipiden, unter Erhalt von Zielstrukturen der Immunfärbung. In den meisten Protokollen wurden hierfür Säuren und Detergenzien verwendet. (Erturk et al., 2012; Erturk et al., 2013; Erturk et al., 2014; Hammad et al., 2014) In wiederum anderen Arbeiten wurde der Fokus auf die Verbesserung der Signalqualität durch die Erhöhung der Bindungsaffinität der Antikörper an ihre Zielstrukturen im Gewebe gelegt. Besonders effektiv zeigte sich eine Aufbereitung des Gewebes mit Heparin, welches die Glykoproteine der Zelloberfläche bindet und dadurch verhindert, dass sie sich an freie Epitope und Antikörper lagern. Die Hintergrundfärbung wird somit reduziert, was zu einer verbesserten Signalschärfe führt. (Renier et al., 2014)

Außerdem kann die Erkennung und Bindung an die Antigene durch eine optimierte, d.h. schnelle und gleichmäßige Gewebefixierung verbessert werden. Eine besonders effektive und immer häufiger eingesetzte Methode ist die sog. Gewebepfusion. Die Fixationslösung, in der Regel gepufferte Formalinlösung (PFA), wird dabei intravasal injiziert und verteilt sich dadurch gleichmäßig im Gewebe. Im Vergleich zum klassischen Eintauchen des Präparates in Formalin und somit schrittweise Fixation von äußeren zu inneren Gewebeschichten werden die zellulären Strukturen annähernd gleichzeitig erreicht und dadurch besser erhalten, was die Qualität der Immunfärbung signifikant erhöht. Als besonders wirksam erweist sich dabei die Gewebepfusion über den großen Blutkreislauf im intakten Situs, d.h. noch vor der Organentnahme (Fix und Garman, 2000; Gage et al., 2012; Kasukurthi et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wird die Gewebepfusion exemplarisch als potenzielle Ergänzung des Protokolls vorgestellt.

Die Lipidextraktion, die Heparin-Behandlung sowie die optimierte Formalinfixierung werden dem eigentlichen Tissue Clearing vorangestellt und dienen zusammenfassend einer Verbesserung der Gewebeeigenschaften hinsichtlich der Immunfluoreszenzfärbung. In Zusammenspiel mit dem anschließenden Tissue Clearing werden dadurch optimale optische Bedingungen geschaffen, um große Volumina von Lebergewebe

lasermikroskopisch abzurastern und Fluoreszenzsignale in allen drei Ebenen aufzunehmen.

#### 2.5.4 Dreidimensionale Bildgewinnung

Um eine dreidimensionale Abbildung auf Basis konfokalmikroskopischer Aufnahmen zu generieren, müssen die aufgenommenen Fluoreszenzsignale zunächst digital zusammengeführt, d.h. rekonstruiert werden. Dies kann meist in einfacher Form mit einer Software des entsprechenden Mikroskopherstellers erzielt werden, benötigt jedoch für ausführliche Architekturanalysen in aller Regel separate, komplexere Software-Lösungen. In diversen Publikationen der letzten Jahre (Hammad et al., 2014; Hoehme et al., 2010; Morales-Navarrete et al., 2015) wurden verschiedene, von den jeweiligen Arbeitsgruppen und oft in Kooperation mit Bioinformatikern entwickelte Software-Lösungen vorgestellt. Diese wurden exemplarisch an verschiedenen Gewebearten, u.a. an der Leber angewandt. Dabei wurde gesundes Lebergewebe (Hammad et al., 2014) und in einer Publikation auch exemplarisch die Leberregeneration nach chemischer Schädigung mit CCl<sub>4</sub> in Analogie zu Paracetamolvergiftung dargestellt (Hoehme et al., 2010). Neben individuell angefertigten Software-Lösungen wurden auch zunehmend kommerziell erhältliche Programme für die dreidimensionale Rekonstruktion von konfokalen Fluoreszenzaufnahmen entwickelt. Diese ermöglichen eine standardisierte Bildbearbeitung und somit Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und besitzen einige praktische Vorteile, wie z.B. stetige Updates und Wartung durch den Hersteller. Für die dreidimensionale Rekonstruktion wurde für diese Arbeit die kommerziell erhältliche Software IMARIS der Firma Bitplane eingesetzt.

### 3. Zielsetzung

Die duktale Reaktion stellt eine geregelte zelluläre Antwort auf eine Vielzahl akuter oder chronischer Leberschädigungen dar und entstammt laut dem aktuellen Forschungsstand der biliären Zellreihe. Zu ihrer Funktion und biologischer Signifikanz herrscht in der Forschungsgemeinschaft fortwährend ein reger Diskurs. Historisch wurde angenommen, dass diese Zellen im Rahmen der Regeneration als Vorläufer von sowohl Hepatozyten als auch Cholangiozyten dienen, sodass sie häufig auch als bipotente Progenitorzellen oder adulte Leberstammzellen bezeichnet wurden. Mit Hilfe eines eigens etablierten Lineage Tracing Modells konnte u.a. im Labor von Herrn Dr. F. Geisler jedoch eindrücklich gezeigt werden, dass die Zellen der dukталen Reaktion nahezu ausschließlich eine biliäre Differenzierung durchlaufen. Dies steht im Gegensatz zu dem bisher angenommenen Progenitorcharakter der dukталen Reaktion und spricht viel mehr für ihre Rolle bei der Gewährleistung der Gallendrainage nach einer Leberschädigung, indem die Kontinuität zwischen dem intrahepatischen Gallengangssystem und dem geschädigten Kanalikulnetzwerk wiederhergestellt wird. Um dieser Frage nachzugehen, müssen diese Prozesse zunächst auf ihrer mikromorphologischen Ebene untersucht und die räumlichen Verhältnisse der beteiligten Gewebekompartimente aufgezeigt werden.

Aus den bisherigen konventionell-histomorphologischen Studien sind je nach Art der Schädigung unterschiedliche Muster der dukталen Reaktion bekannt. Diese reichen von kurzen, unmittelbar periportal lokalisierten bis hin zu diffusen, bis nach zentrilobulär reichenden, teils auch einzelzellulär erscheinenden Proliferaten. Insbesondere zu den Letzteren stellt sich die Frage nach ihrer Kontinuität sowie Verbindungen zu dem bestehenden intrahepatischen Gallengangssystem. In konventioneller Histologie und Immunhistochemie lassen sich diese Fragen jedoch aufgrund der lediglich zweidimensionalen Darstellung der angeschnittenen Ebene nicht abschließend beantworten. Daher ergibt sich als primäres Ziel dieser Doktorarbeit die räumliche Darstellung von Remodellierungsprozessen der dukталen Reaktion in allen drei Dimensionen.

Um ein ausreichendes Gewebevolumen für die dreidimensionalen Studien zu erfassen, wird zunächst, als zentrales Element dieser Arbeit, ein Protokoll etabliert, welches mikroskopische Aufnahmen von bis zu 100 µm dicken Lebergewebeschnitten ermöglicht. Dieses wird auf konfokaler Mikroskopie basieren, welche an unserem Lineage Tracing Mausmodell mittels endogener Fluoreszenz bereits eine initiale dreidimensionale Darstellung der dukталen Reaktion von bis zu 30 µm Tiefe generieren kann. Zur Erhöhung der Aufnahmetiefe wird das Färbeprotokoll um das sog. Tissue Clearing erweitert, welches durch eine chemische Behandlung das Gewebe nahezu durchsichtig macht, bzw. seine optischen Eigenschaften für die Lasermikroskopie optimiert.

Im nächsten Schritt wird das Protokoll um die Immunfluoreszenz erweitert. Dadurch wird eine spezifische Markierung der Gallenkanalikuli ermöglicht, welche ebenfalls in Zusammenhang mit der dukталen Reaktion zu untersuchen sind. Zur Überwindung der deutlich erschwerten Antikörperpenetration in den dicken Gewebeproben werden die

gängigen Färbemethoden durch chemisch-physikalische Vorbehandlungen und spezielle Färbetechniken ergänzt.

Das optimierte Protokoll wird schließlich zur exemplarischen Darstellung von gesundem sowie chemisch-nutritiv geschädigtem Lebergewebe im standardisierten CDE-Modell eingesetzt, um seine Anwendbarkeit für dreidimensionale Untersuchungen von Lebergewebe zu demonstrieren. Anschließend wird beispielhaft eine Analyse ausgewählter konfokalmikroskopischer Aufnahmen durchgeführt und im Zuge dessen die aufgenommenen Fluoreszenzsignale mittels spezialisierter Software räumlich rekonstruiert. Dadurch werden neuartige, sehr plastische dreidimensionale Abbildungen sowohl des nativen Lebergewebes als auch der Dynamik von biliären Remodellierungsprozessen in einem bislang nur zweidimensional erforschten Schädigungsmodell generiert.

Durch die Etablierung und Implementierung dieser neuen Art von Gewebedarstellung wird also im Rahmen dieser Doktorarbeit zum ersten Mal ein umfassendes dreidimensionales Bild der Leberinnenarchitektur, insbesondere der bis dato noch nicht im Detail verstandenen Mikroarchitektur der intrahepatischen Gallenwege entstehen. Zudem wird die Morphologie der duktaalen Reaktion in Abhängigkeit von Art und Dauer der chemischen Schädigung demonstriert und repräsentativ hinsichtlich der Konnektivität innerhalb ihrer selbst respektive zu den anderen Leberkompartimenten untersucht. Somit wird diese Arbeit einen wichtigen Grundbaustein zur endgültigen Klärung der bisweilen kontrovers diskutierten biologischen Signifikanz der duktaalen Reaktion legen und daher zur Beantwortung einer der größten Unbekannten im Forschungsfeld der Leberregeneration beitragen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Materialverzeichnis

#### 4.1.1 Allgemeine Reagenzien und Geräte

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
Agarose	Sigma
Analysenwaage	Kern
Analysenwaage	Sartorius
Brutschrank	Heraeus Instruments
BSA, bovines Serumalbumin	Serva
Destilliertes Wasser	Braun
EDTA, Ethylendiamintetraacetat	Merck
Einbettmedium für Kryoschnitte, Tissue-Tek O.C.T.	Sakura
Eindeckelmedium Vectashield	Vector Laboratories
Ethanol, 99,9%	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Kryostat HM560	Microm
Magnetrührgerät RCT, REO	IKAMAG
Mikrowelle	Siemens
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck
PBS, Dulbecco Phosphat-gepufferte Saline	Sigma
PFA, para-Formaldehyd (phosphatgepuffert), 4%	Roth
pH-Messgerät WTW Series	inoLab
Pipetten Reference	Eppendorf
Proteinase K Lösung	Applichem
RedTaq Ready Mix	Sigma-Aldrich
Rreagenzglasschüttler VF2	Janke & Kunkel
Schüttler MTS 2	IKA
SDS, Natriumdodecylsulfat $\geq 99\%$	Roth
Serum, Esel (normal)	Jackson Immuno Research
Serum, Ziege (heat inactivted)	Hölzel-Diagnostika
Succrose, D (+)-Saccharose $\geq 99,5\%$ p.a.	Roth
Tris, Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Roth
Triton-X 100, Octoxinol 9	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Tween 80	Sigma
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zitronensäure, citric acid monohydrate	Sigma

#### 4.1.2 Reagenzien für Tissue Clearing

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
THF, Tetrahydrofuran Anhydrat ≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich
DBE, (Di-)Benzylether ≥ 98%	Aldrich
DCM, Dichloromethan Anhydrat ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich
DMSO, Dimethylsulfoxid	Roth
Heparin	Bayer
D(-)-Fruktose, ≥ 99 %	Sigma-Aldrich
1-Thioglycerol ≥ 97 %	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat Anhydrat	Fluka Chemie
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Fluka Chemie

#### 4.1.3 Tierversuche

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
Cholin-defizientes Futter, Pellets	MP Biomedicals, Cat# 960034
DL-Ethionin ≥ 95% TLC	Sigma
Einmalspritzen Injekt, 10 ml	Braun
Einmalspritzen Omnifix, 1 ml	Braun
Isofluran 1ml/1ml	CP-Pharma
Kanülen Sterican (Gr. 1, Gr. 18, Gr. 20)	Braun
Maisöl, corn oil	Sigma
Perfusionsgerät, Masterflex Console Drive	Cole Parmer Instrument Company
Tamoxifen	Sigma-Aldrich
Venenverweilkanüle, 22 G (blau)	Braun

#### 4.1.4 Einmalutensilien

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
Aluminiumfolie, herkömmliche	TIM
Deckgläser	Menzel-Gläser
Konische Zentrifugenröhrchen Falcon, 50 ml	Fisher Scientific
Kryoröhrchen für RNA-Asservierung	Sarstedt
Kryostat-Klingen Feather C35	pfm-Medical/FEATHER
Mikrozentrifugenröhrchen (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml)	Eppendorf
Objektträger, Superforst Plus	Menzel-Gläser, Thermo Scientific
Probenröhrchen, 7 ml	Kartell
Serumröhrchen	Sarstedt
Spacer, Grace Bio-Labs SecureSeal	Sigma-Aldrich
Zellkulturplatten, Multiwell 12 Well	Falcon



#### 4.1.5 Mikroskopie und Bildbearbeitung

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
Mikroskop, konfokal FV10i	Olympus
Mikroskop, konfokal Leica TCS SP8 X	Leica
Illustrator CS v 11.0	Adobe
IMARIS v 8.3	Bitplane
IrfanView v 4.0	IrfanView, Freeware

#### 4.2 Tierversuche

Die Tierhaltung und -versuche wurden ausnahmslos gemäß der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt. Ein genehmigter Tierversuchsantrag nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes lag vor.

##### 4.2.1 Molekulargenetische Methoden

Die benutzten Versuchstiere wurden mittels PCR nach dem Standardprotokoll genotypisiert. Die genauen Primer-Sequenzen für die Lineage Tracing Maus sind der **Tabelle 1** zu entnehmen.

*Tabelle 1: Primer für die PCR (5'-3').*

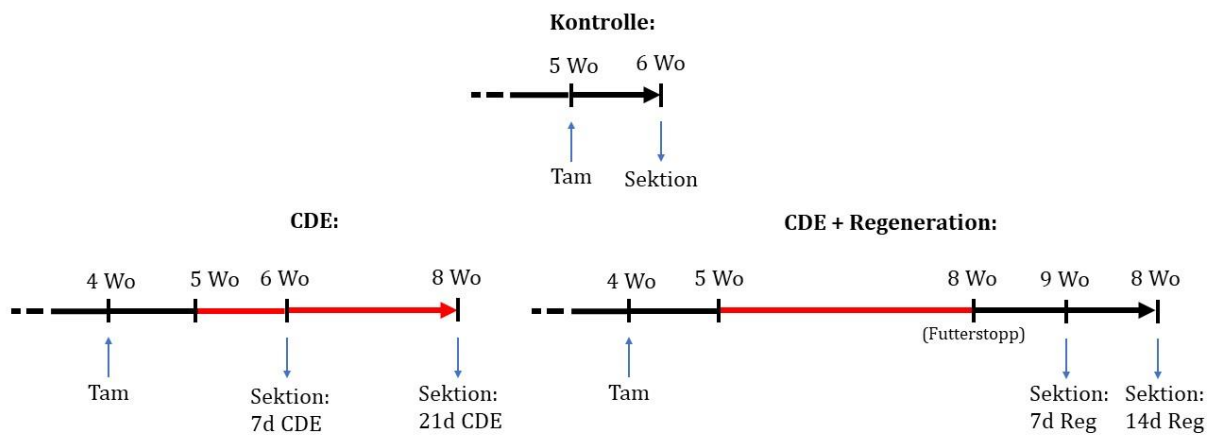
<b>Primer</b>	<b>Vorwärts</b>	<b>Rückwärts</b>
<i>CreERT2</i>	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG	CAGGGTGTTATAAGCAATCCC
<i>tdTom-loxP</i>	CTGTCCTGTACGGCATGG	GGCATTAAAGCAGCGTATCC

##### 4.2.2 Intraperitoneale Tamoxifeninjektion

Die Tamoxifengabe erfolgte als intraperitoneale Injektion im linken unteren Abdomenquadranten. Hierfür wurde eine Tamoxifenlösung in einer Konzentration von 10 mg/ml hergestellt, indem unter sterilen Bedingungen 10 mg Tamoxifen zunächst in 100 µl Ethanol gelöst und anschließend mit 900 µl reinem Maisöl vermischt wurden. Den Versuchstieren wurden pro Gramm Körpergewicht 10 µl der Lösung verabreicht. Somit ergab sich eine Tamoxifendosis von 100 µg/g KG.

### 4.2.3 Chemische Leberschädigung

Zur Induktion der tdTomato-Expression wurde den Mäusen im Alter von 4 Wochen Tamoxifen (einmalig, i.p., 100 µg/g KG) verabreicht. Die Verabreichung der Schadstoffe begann eine Woche nach der Tamoxifengabe. Hiermit wurde sichergestellt, dass alle biliären Zellen, aus denen die duktale Reaktion entstehen würde, vor dem Beginn der Fütterung fluoreszenzmarkiert wurden und somit die komplette duktale Reaktion sicher dargestellt würde. Die Schadstoffe wurden kontinuierlich bis zum Zeitpunkt der Leberentnahme verabreicht. Eine Kohorte von Mäusen wurde eine Woche nach der Gabe von Tamoxifen direkt hepatektomiert und diente als Kontrollgruppe.



**Abbildung 9: Zeitpunkte der Tamoxifen- und Schadstoffgabe sowie der Organentnahme, Kontrolle und CDE-Modell.** Mäusen im Alter von vier Wochen wurde Tamoxifen intraperitoneal verabreicht und eine Woche später die Zufuhr von Cholin-defizientem Futtermittel und Ethionin-haltigem Wasser begonnen. Die Mäuse wurden nach einer und drei Wochen Fütterung hepatektomiert und analysiert. Zudem erfolgten Sektionen eine und zwei Wochen nach dem Fütterungsstopp. Der Kontrollgruppe wurde Tamoxifen im Alter von fünf Wochen verabreicht und die Tiere eine Woche später seziiert.

Das eingesetzte CDE-Modell (Cholin-arm, Ethionin-angereichert) beinhaltet die Verabreichung von käuflichem cholinarmem Trockenfutter sowie ethioninhaltigem Wasser. Letzteres wurde in unserem Labor durch das Lösen von 0,165% DL-Ethionin in Leitungswasser hergestellt. Bei längerer Fütterungsdauer wurde es spätestens alle drei Tage frisch angesetzt und ausgewechselt.

Die typische Behandlungsdauer zur Beobachtung der dukталen Reaktion beträgt im CDE-Modell zwei bis drei Wochen. (Jors et al., 2015; Passman et al., 2015) Um die Kinetik der dukталen Reaktion genauer zu charakterisieren, wurde die CDE-Fütterung im Rahmen dieses Projektes jeweils eine, zwei und drei Wochen lang durchgeführt. Um eventuelle Veränderungen in der Dynamik der dukталen Reaktion nach dem Wegfall des Schädigungsreizes zu veranschaulichen, wurde ausgewählten Mauskohorten nach einer dreiwöchigen CDE-Gabe jeweils eine respektive zwei Wochen lang normales,

schadstofffreies Futter verabreicht. Dieser Zeitraum wurde als Regenerationsphase angesehen. Eine schematische Darstellung aller Behandlungszeitpunkte ist in **Abbildung 9** zu sehen.

Für das CDE-Modell wurden pro Zeitpunkt jeweils mindestens drei Tiere und für die Kontrollgruppe insgesamt fünf Tiere untersucht. In jeder untersuchten Leber wurden jeweils mindestens drei Portalfelder aufgenommen und analysiert.

#### 4.2.4 Mausektion und Organgewinnung

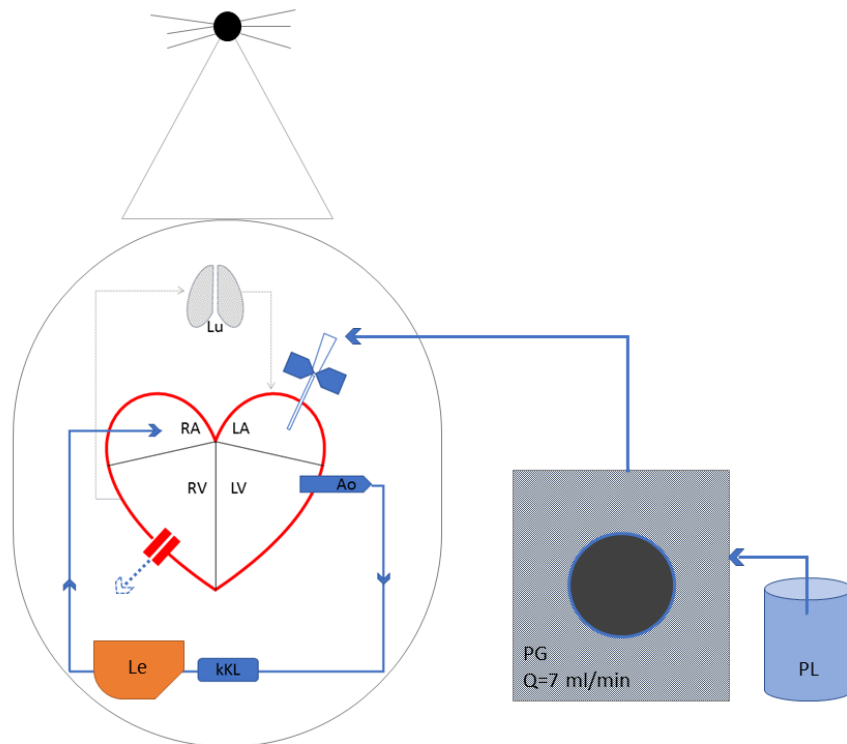
Zur Organgewinnung wurden die Tiere mittels Inhalation von Isofluran und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Es erfolgte eine mediane Laparotomie. Der Darm wurde zur Seite gelegt und zum Entbluten die Vena cava inferior durchtrennt. Anschließend wurde die Leber freigelegt, in toto entnommen und in PBS gesäubert. Nach Zerlegen in einzelne Leberlappen erfolgte die Fixation in 4%-iger PFA-Lösung für eine Stunde bei 4°C. Danach wurde das Gewebe 10 Minuten lang in PBS gewaschen und anschließend entwässert. Dies erfolgte durch schrittweise steigenden Konzentrationsgradienten von Sucrose in PBS, und zwar: 10% für eine Stunde, 20% für 24 Stunden und 30% für 24 Stunden. Diese Schritte wurden ebenfalls bei 4°C durchgeführt. Die einzelnen Leberlappen wurden einzeln in Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™) eingebettet und bei -20°C eingefroren.

Abweichend von diesem Standardprozedere wurde eine exemplarische Versuchsreihe um das Verfahren der Perfusion erweitert. Da die Organe bei diesem Vorgehen noch vor der Entnahme in vivo mit dem Fixationsmittel behandelt werden, wurde das Verfahren der Organgewinnung wie im Nachfolgenden beschrieben angepasst.

#### 4.2.5 Perfusion

Unter einer Perfusion versteht man ein Verfahren, bei welchem noch intakte Organe von intravasal, d.h. über ein (Blut-)Gefäßsystem gespült und anschließend konserviert werden. Da dies üblicherweise in einer sehr schnellen und gleichmäßigen Gewebefixation resultiert, und somit zu besseren Mikroskopieergebnissen führt, wurde sie im Rahmen unserer Protokolletablierung erprobt. Dafür wurde eine transkardiale, orthograde Ganzkörperperfusion über den großen Blutkreislauf durchgeführt. Die Maus wurde zunächst mit Isofluran terminal sediert und zügig laparo- und thorakotomiert. Das linke Herzohr wurde dann mit einer Venenverweilkanüle (22 G) punktiert und an ein elektrisches Perfusionssystem mit einstellbarer stabiler Flussrate angeschlossen. Zur Ausleitung der Perfusionsflüssigkeit wurde der rechte Herzventrikel eröffnet, wodurch der ganze Körperkreislauf durchspült wurde. Es wurde zunächst so lange mit PBS gespült bis das ganze Blut aus dem Kreislauf entfernt, die Spülflüssigkeit klar und die Leber gleichmäßig blass wurde. Durchschnittlich wurden hierfür ca. 20 ml PBS gebraucht.

Anschließend erfolgte eine genauso lange Perfusion mit der 4%-igen PFA-Lösung. Die Perfusion wurde während der gesamten Dauer in gleichmäßiger Geschwindigkeit von 7 ml/min durchgeführt. Der Aufbau des tierexperimentellen Vorgehens wird schemenhaft in **Abbildung 10** veranschaulicht.



**Abbildung 10: Tierexperimenteller Aufbau für die Ganzkörperperfusion.** Blick auf die Maus von ventral. Der linke Herzvorhof (LA) wird mit einer feinumigen Venenverweilkanüle punktiert und die Perfusionslösung (PL) mit Hilfe eines Perforationsgerätes (PG) mit einer konstanten, nahezu physiologischen Flussrate  $Q$  injiziert. Die Perfusionsflüssigkeit erreicht über den Körperkreislauf (kKL) die Leber (Le) und wird über den eröffneten rechten Ventrikel (RV) ausgeleitet. (LV = linker Ventrikel; Ao = Aorta; RA = rechter Vorhof; Lu = Lunge)

### 4.3 Histologische Methoden

#### 4.3.1 Immunfluoreszenz

Die in unserem Lineage Tracing Mausmodell enthaltene endogene Fluoreszenz des Proteins tdTomato ermöglicht bereits an unbehandeltem Gewebe die Darstellung aller biliären Zellen und somit auch der duktaalen Reaktion mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die anderen relevanten zellulären Strukturen mussten hierfür zunächst von außen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Für die Markierung der Kerne wurde eine einfache Chromatinfärbung mit den gängigen Fluoreszenzfarbstoffen DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) bzw. ToPro3 durchgeführt. Die spezifische Markierung der Zellstrukturen hingegen erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung, welche wie die Immunhistochemie auf spezifischer Bindung eines farbstoffmarkierten Antikörpers an das entsprechende Antigen der Zielzelle beruht. Grundsätzlich kann dafür ein bereits mit

dem Fluoreszenzfarbstoff versehener Antikörper verwendet werden, welcher dann das Zielantigen direkt erkennt. Alternativ kann auch ein primärer, unmarkierter Antikörper eingesetzt werden, der zunächst nur an das Antigen bindet, und seinerseits von einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper erkannt wird. Diese beiden Herangehensweisen beschreiben das Prinzip der direkten respektive indirekten Immunfluoreszenz. Aufgrund der größeren Flexibilität bei der Antikörper- und Farbstoffauswahl wurde in diesem Projekt die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

*Tabelle 2: Benutzte Antikörper.*

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Wirt</b>	<b>Firma</b>	<b>Produkt-Nr.</b>
Anti-CD13	Monoklonal, IgG	Ratte	Bio-Rad	MCA2183
Anti-DPPIV	Polyklonal, IgG	Ziege	Novus-Bio R&D Systems	NB100- 64843 AF954
<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Wirt/Ziel</b>	<b>Firma</b>	<b>Produkt-Nr.</b>
Anti-IgG-CF647	Polyklonal, IgG	Ziege/Ratte	Thermo-Fisher	A10525
Anti-IgG-CF647			Biotium	
Anti-IgG-AlexaFluor® 405		Esel/Ziege	Biotium	
<b>Fluoreszenzfarbstoffe</b>	<b>Exzitation/Emission</b>	<b>Ziel</b>	<b>Firma</b>	<b>Produkt-Nr.</b>
TO-PRO™-3	642/661 nm	dsDNA	Invitrogen	T3605
DAPI	345/455 nm		Sigma-Aldrich	D9542

Für die Markierung der Gallenkanalikuli wurden als Zielstrukturen das Oberflächenprotein CD13 sowie das membranständige Protein DPPIV gewählt. Die sekundären Antikörper, die jeweils den primären (Anti-CD13- bzw. Anti-DPPIV-) Antikörper erkennen sollten, trugen unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, die aufgrund ihrer verschiedenen Wellenlängen mit jeweils einer anderen Kernfärbung kombiniert werden mussten. In Kombination mit Anti-CD13 wurde die Markierung mit dem Fluorophor Cy5, bzw. entsprechenden Analoga von Indodicarbocyanin, einem Farbstoff aus der Gruppe der Cyanine, benutzt und stets die Kernfärbung mit DAPI verwendet. Das Exzitationsmaximum von Cy5 beträgt 649 nm und ermöglicht eine sehr gute Trennung gegenüber den Signalen der duktaalen Reaktion (tdTomato, 554 nm) und der Kernfärbung (DAPI, 358 nm). Mit dem Anti-DPPIV-Antikörper wurde hingegen sekundär AlexaFluor® 405 mit einem Exzitationsmaximum von 401 nm verwendet. Zur suffizienten Trennung der Fluoreszenzsignale wurde hier als Kernfärbung der ebenfalls der Cyanin-Familie zugehörige Farbstoff ToPro3 mit dem Exzitationsmaximum von 642 nm eingesetzt. Eine Übersicht der benutzten Antikörper und Farbstoffe bietet die **Tabelle 2**.

#### 4.3.2 Bildgewinnung und -bearbeitung

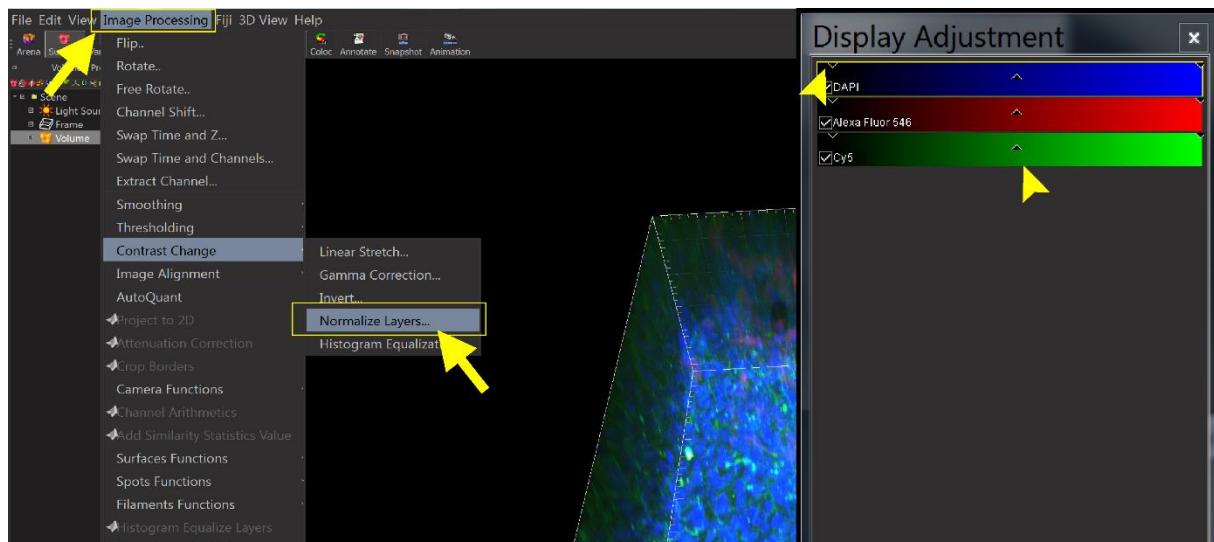
Die Aufnahmen der spezifischen Fluoreszenzsignale wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie generiert. Diese moderne Form der Lichtmikroskopie ermöglicht

die Anfertigung sehr detailreicher, mehrschichtiger Gewebeaufnahmen durch punktuell Abrastern des Gewebes. Die verschiedenen Bereiche im Gewebe werden also nacheinander von einem fokussierten Laserstrahl abgelichtet, aufgenommen und das vollständige Bild anschließend rechnerisch konstruiert. Da hierbei Zellschichten konsekutiv entlang der vertikalen Achse aufgenommen werden, können so dreidimensionale Bilddateien erzeugt werden. (Denk et al., 1990)

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden in Form von sogenannten Z-Stacks (z. Dt. „Z-Stapel“) mit dem Mikroskop Olympus FV-10i und zum kleineren Teil mit Leica TCS SP8 X angefertigt. Für die Übersichtsaufnahmen wurde jeweils die 10-, bzw. 20-fache, und für die Detailansicht die 60-, bzw. 40-fache Vergrößerung gewählt. Das „Z“ in der Bezeichnung des Aufnahmeformats bezieht sich dabei auf die senkrechte Dimension, d.h. die Tiefe des Gewebestückes und symbolisiert den Vorgang, bei welchem zweidimensionale Aufnahmen (in der X-Y-Ebene) nacheinander entlang der Z-Achse angefertigt und zusammengefügt, also virtuell gestapelt werden. Der Abstand zwischen den aufzunehmenden konsekutiven Ebenen kann dabei frei gewählt werden und ist im Wesentlichen maßgebend für die Genauigkeit und Auflösung der dreidimensionalen Abbildung. Für dieses Projekt zeigte sich als optimal ein Abstand von 2,5 µm für die Übersichts- und von 1 µm für die Detailaufnahmen. Die Gesamthöhe der Aufnahmen betrug zwischen 80 und 120 µm. Die Auflösung wurde stets auf 1024 x 1024 Pixel gesetzt. Damit wurden ein ausreichendes Volumen und die optimale Auflösung bei möglichst kleinem Zeitaufwand und geringer Datenmenge erreicht.

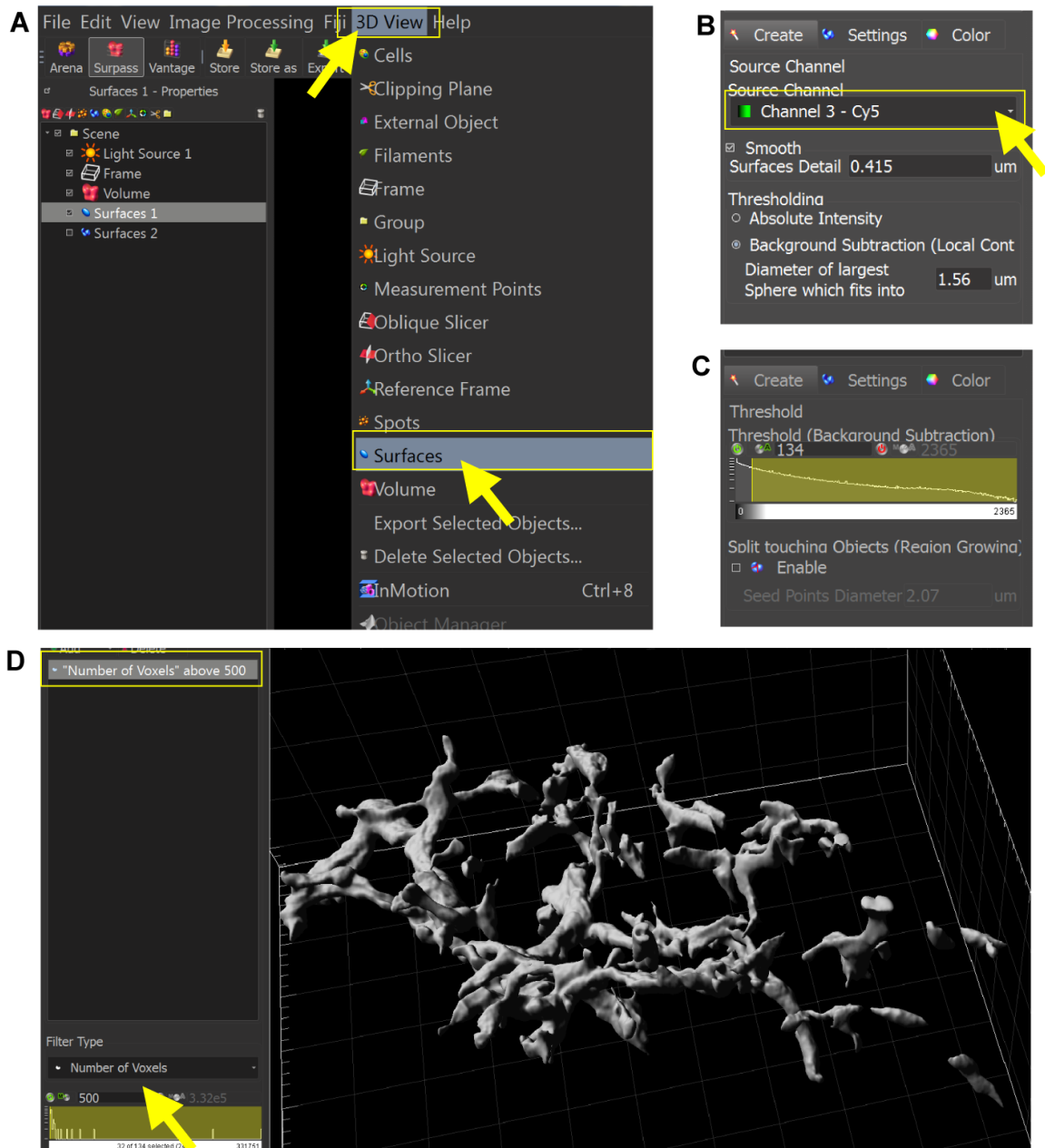
Die so angefertigten Z-Stacks ließen sich mit dem mitgelieferten Computerprogramm des Mikroskopherstellers dreidimensional darstellen, allerdings stellte sich die Qualität dieser Darstellungen für eine hochwertige Rekonstruktion der Gewebearchitektur im Detail nicht als ausreichend heraus. Deswegen wurde im Anschluss an die Fluoreszenzmikroskopie eine zusätzliche Nachbearbeitung und Adaptation der aufgenommenen Z-Stacks vorgenommen. Diese Bearbeitung sowie die anschließende dreidimensionale Rekonstruktion der Bilddateien wurde mit der besonders für diese Zwecke entwickelten kommerziellen Software IMARIS der Firma Bitplane durchgeführt.

Der erste Schritt war die Anpassung der Signalintensität über das gesamte aufgenommene Gewebenvolumen. Da trotz der adäquaten Vorbehandlung des Gewebes nicht alle Schichten mit gleicher Intensität und Präzision abgebildet werden können, musste zunächst eine Angleichung der Fluoreszenzsignalwerte in allen Gewebeschichten durchgeführt werden. Dies erfolgte teilweise manuell für jeden einzelnen Farbkanal, d.h. Signale einer definierten Wellenlänge, über die Option „Display Adjustments“. Zu einem großen Teil wurde aber auch die in der IMARIS-Software integrierte Funktion eingesetzt, die eine Kontrastanpassung über alle Schichten automatisch durchführt. Diese wurde über die Hauptmenüleiste (Image Processing -> Change Contrast-> Normalize Layers) aktiviert, s. **Abbildung 11**.



**Abbildung 11: IMARIS-Benutzerfläche, Kontrastanpassung am Z-Stack.** Automatische Normalisierung der Schichten (Pfeile) und manuelle Einstellung der Farbintensitäten jeweiliger Fluoreszenzsignale (Pfeilköpfe).

Anschließend wurde die eigentliche 3D-Rekonstruktion einzelner Komponenten, d.h. der duktaalen Reaktion und Gallenkanalikuli, durchgeführt. Dies erfolgte durch eine ebenfalls eingebaute Funktion der IMARIS-Software (Modul „Surfaces“), die eine plastische dreidimensionale Darstellung aufgenommener Fluoreszenz liefert. Über eine eigene Kontrollfläche können hier zunächst die Rekonstruktionsparameter eingestellt werden. Als „Region of Interest“ (ROI; z. Dt. Bereich von Interesse) wurde für unsere Abbildungen immer die ganze konfokalmikroskopische Aufnahme definiert und die Auflösung in der X-Y-Achse auf 1024 x 1024 Pixel eingestellt. Für die Rekonstruktion der duktaalen Reaktion wurde unter „Thresholding“ (z. Dt. Schwellensetzung) die Option „Absolute Intensity“ (z. Dt. absolute Intensität) und für die Gallenkanalikuli „Background Subtraction“ (z. Dt. Hintergrundsubtraktion) ausgewählt. Dadurch wurde für den jeweiligen Kanal das bestmögliche Verhältnis zwischen der Signaldetektion und Eliminierung der störenden Hintergrundfluoreszenz erreicht, und somit die Auflösung in der rekonstruierten Abbildung jeweils optimiert. Im nächsten Schritt konnte die jeweilige Schwelle der Erkennungssensitivität manuell verstellt werden, jedoch war es in den meisten Fällen nicht notwendig, die von der Software automatisch ermittelten Werte weiter anzupassen. Anschließend wurde der Filter für die Rekonstruktion der duktaalen Reaktion auf 500-700 Voxel und für die der Gallenkanalikuli auf 200-500 Voxel eingestellt. Dadurch wurden sehr kleine isolierte Signale, welche durch Fluoreszenzartefakte hervorgerufen wurden, herausgefiltert. Die wichtigsten Schritte der dreidimensionalen Rekonstruktion in IMARIS werden in **Abbildung 12** gezeigt.



**Abbildung 12: IMARIS-Benutzeroberfläche - die wichtigsten Schritte der 3D-Rekonstruktion.** (A) Initiierung der 3D-Rekonstruktion, (B) Auswahl der einzelnen Kanäle – hier am Beispiel des Kanalikuli-Signals, (C) Anpassung der Schwellenwerte für die Rekonstruktion, (D) Filtereinstellung am Beispiel des DR-Signals.



## 5. Ergebnisse

### 5.1 Protokolletablierung

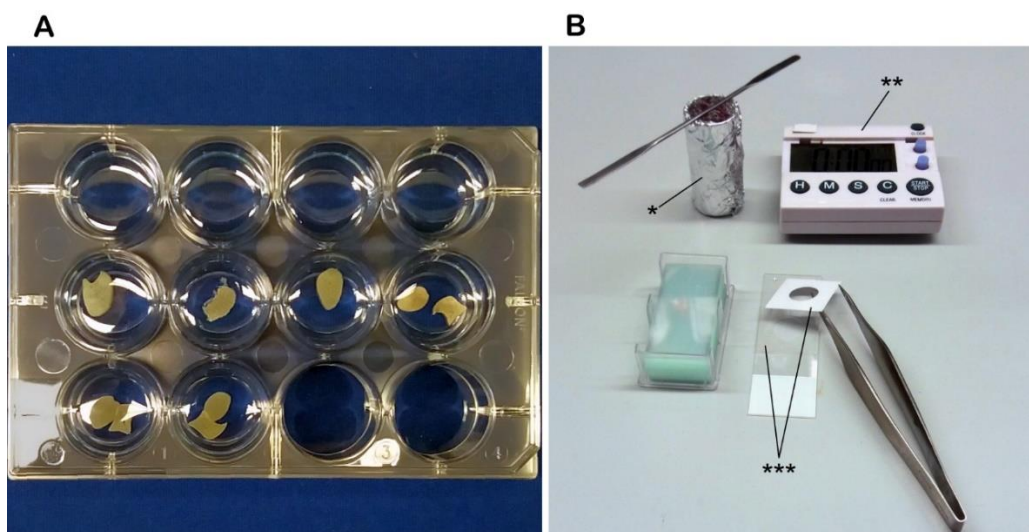
Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer neuartigen Methode, die konfokalmikroskopische Aufnahmen von dicken Leberschnitten ermöglichen sollte. Durch den Einsatz und Anpassung von bereits etablierten histologischen Verfahren sowie Hinzunahme von neuartigen Methoden aus der modernen 3D-Mikroskopie entstand als zentrales Ergebnis dieses Projektes ein eigenständiges Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung und „Durchsichtigmachen“ von soliden parenchymatösen Organen. Im Wesentlichen beruht dieses Verfahren auf der inzwischen standardmäßig eingesetzten Immunfluoreszenzfärbung sowie einer kürzlich publizierten Methode, dem sogenannten Tissue Clearing. Diese beiden Komponenten mussten aufgrund der für die Architekturdarstellung notwendigen Schnittdicke und den Eigenschaften von Lebergewebe überarbeitet und den speziellen Anforderungen des Projektes angepasst werden.

Das klassische Immunfluoreszenzprotokoll für zweidimensionale Aufnahmen beinhaltet die Anfertigung von dünnen Gefrierschnitten, welche dann relativ zügig für die eigentliche Färbung vorbereitet und anschließend dieser unterzogen werden. Da diese Art von Protokollen primär für die Färbung einer Zellschicht auf einem Objektträger entwickelt wurde, lässt sich hiermit bei den wesentlich größeren Schnittstärken von ca. 150-200 µm keine ausreichende Färbung aller Gewebeschichten erreichen. Um die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung zu fördern wurde das Protokoll, zusätzlich zu der standardmäßigen Behandlung mit Tierseren (sog. Blocken) um eine zusätzliche Demaskierung der Epitope sowie sog. Permeabilisierung des Gewebes erweitert. Die Demaskierung wurde mittels heißer Zitronensäure und die Permeabilisierung durch den Einsatz von Detergenzien erreicht. Verwendet wurde, in Anlehnung an die Arbeit von Hammad et al. eine 0,01-molare Zitronensäurelösung (pH=6), die in unserem Labor frisch hergestellt und unmittelbar vor der Anwendung erhitzt (jedoch nicht aufgekocht) wurde. Mit dieser wurde das Gewebe konsekutiv in drei Schritten behandelt. (Hammad et al., 2014) Als Detergens für die Permeabilisierung wurde das potente, nicht-ionische Tensid Triton™ X-100 (Octoxinol 9) in einer Konzentration von 1%, d.h. ungefähr dem Dreifachen des Üblichen entsprechend, eingesetzt. Dies wurde zusammen mit 1,7% NaCl allen Wasch- und Färbepuffern zugesetzt. Der wiederholte Detergenseinsatz in nahezu allen Behandlungsschritten sorgte für seine schrittweise und kontinuierliche Wirkung. Durch diese beiden Maßnahmen, die Antigendemaskierung und das Permeabilisieren, wurden die Antikörper-bindenden Domänen freigelegt und die Gewebestruktur für die Antikörperpenetration in die tiefen Schichten aufgelockert. Das bereits erwähnte sog. Blocken der übrigen, unspezifischen Bindungsdomänen erfolgte mit bovinem Serumalbumin (BSA) und Serum jeweils eines anderen Tieres als des Antikörperwirtes, ebenfalls in verhältnismäßig hoher Konzentration von 10% (statt den üblichen 5%) im Triton-haltigen Färbepuffer. Um eine gleichmäßige Verteilung der aktiven Substanzen und der markierten Antikörper im Gewebe zu gewährleisten, wurden die Gewebeschnitte

nicht auf Objektträger aufgezogen, sondern in der sog. „Free Floating“-Technik behandelt. Dabei wird das Gewebe nach dem Schneiden direkt in eine mit Flüssigkeit gefüllte Kammer platziert, und durch einbringen und abziehen der Wasch- und Färbelösungen mit einer Pipette im selben Gefäß „freischwimmend“ behandelt. Dadurch wurde der Gewebeschnitt stets von allen Seiten von der Flüssigkeit erreicht, was in einer gleichmäßigeren Färbung aller Zellschichten und kürzeren Behandlungsdauer resultierte. Zur Parallelfärbung von mehreren Schnitten in dieser Technik wurden 12-well-Zellkulturplatten benutzt, welche stets lichtgeschützt (z.B. durch das Einwickeln in Aluminiumfolie) gehalten wurden. Um den gleichmäßigen Kontakt des Gewebes mit der jeweiligen Lösung und eine effizientere Penetration der Lösungen bzw. der Antikörper zu sichern, wurden die meisten Färbe- und Waschschrte auf einem Schüttelgerät durchgeführt. Die Antikörperbindung wurde durch längere Inkubationszeiten von bis zu 48 h, optimierte Antikörperkonzentrationen sowie die Durchführung von den meisten Behandlungsschritten bei Raumtemperatur, statt wie üblich bei 4°C, weiter gefördert. In einer Serie von Testläufen zeigte sich dadurch keine oder allenfalls minimale Einschränkung der Fluoreszenzsignale bei insgesamt einer deutlich effizienteren, gleichmäßigeren und schnelleren Färbung (Ergebnisse hier nicht gezeigt). So gefärbte Schnitte konnten entweder einige Tage bis Wochen lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt oder direkt dem Tissue Clearing unterzogen werden, was in einer größeren zeitlichen Flexibilität hinsichtlich des angestrebten Mikroskopiezeitpunktes resultierte.

Da Tissue Clearing Methoden prinzipiell je nach eingesetzten Chemikalien in zwei große Gruppen unterteilt werden, musste zunächst entschieden werden, ob unser Protokoll auf wässrigen Medien oder aber organischen Lösungsmitteln basieren soll. Sowohl nach Literaturrecherche (Kolesova et al., 2016; Richardson et al., 2015; Seo et al., 2016; Silvestri et al., 2016; Yu et al., 2017) als auch in einer Reihe von Experimenten mit ausgewählten Vertretern der jeweiligen Behandlungsarten, wie z.B. wässrigen Fruktose- und Thioglycerol-Lösungen in Anlehnung an die Protokolle SeeDB oder FRUIT (Becker et al., 2012; Dodt et al., 2007; Ke et al., 2013; Ke und Imai, 2014) sowie organischen Verbindungen Tetrahydrofuran und Dibenzylether wie bei Protokollen 3DISCO und iDISCO (Erturk et al., 2012; Erturk et al., 2013; Erturk et al., 2014; Renier et al., 2014), stellten sich die organischen Lösungsmittel für unsere Zwecke als wesentlich besser geeignet. Folglich wurde als Basis für unser Vorgehen das bereits publizierte und an verschiedenen Gewebearten erprobte (Becker et al., 2012; Erturk et al., 2012; Erturk et al., 2014) Tissue Clearing Protokoll 3DISCO gewählt. Da dieses Protokoll jedoch primär für sehr große Gewebestücke, ganze Organe und sogar Mausembryonen entwickelt wurde, musste das ursprüngliche Vorgehen an die vergleichsweise deutlich dünneren Gefrierschnitte sowie die Eigenschaften des Lebergewebes angepasst werden. Die Schlüsselkomponenten des Protokolls bilden das zyklische Ether Tetrahydrofuran (THF) sowie das eigentliche Clearing-Agens Dibenzylether (DBE). Zum graduellen Entwässern und Herauslösen der Lipide aus den Zellmembranen wurden die Schnitte mit in destilliertem Wasser gelöstem THF in aufsteigender Konzentration von 50%, 70% und 100% behandelt. Um der vergleichsweise geringen Gewebedicke gerecht zu werden, wurde die Behandlungsdauer mit THF von den ursprünglich im 3DISCO-Protokoll vorgesehenen 30 Minuten auf 10 Minuten pro Behandlungsschritt verkürzt. Die

anschließende Behandlungsdauer mit dem Clearing-Agens DBE wurde ebenfalls deutlich reduziert. Während von den Autoren der Originalarbeit als geringste Behandlungsdauer mit DBE z.B. für sehr kleine Organe 30 Minuten vorgeschlagen wurden, zeigte sich für die hier behandelten Gefrierschnitte eine Dauer von maximal 5 Minuten als völlig suffizient. Dabei wurde nicht nur ein ausreichender Clearing-Effekt, d.h. Angleichung der Brechungsindizes und optisches „Durchsichtigmachen“ des Gewebes erreicht, sondern auch ein minimaler Verlust der Fluoreszenzsignale gewährleistet. Das ursprüngliche 3DISCO-Protokoll beinhaltete zudem einen Zwischenschritt, nämlich die Behandlung mit Dichlormetan (DCM), welches neben THF einen zusätzlich fettlösenden Effekt haben soll. Da dieser Schritt in unseren Versuchen das Clearing-Ergebnis nicht verbessert hat und gleichzeitig jedoch mit einer deutlichen Abschwächung der Fluoreszenzsignale einherging, wurde in unserem Protokoll darauf komplett verzichtet. In den Folgeversuchen zeigte sich, dass die Einhaltung der jeweiligen Behandlungszeiten essenziell für die Minimierung der Gewebeschädigung durch die aggressiven Lösungsmittel ist. Erwähnenswert ist zudem, dass für das Clearing ausschließlich separate Glasbehälter und Metall- und Glasbesteck benutzt wurden, da die eingesetzten organischen Lösungsmittel gemäß ihrer Natur mit Kunststoffen reagieren können. Zudem musste stets darauf geachtet werden, dass die toxischen und flüchtigen Clearing-Chemikalien nur unter einem Luftabzug eingesetzt werden.



**Abbildung 13: Versuchsaufbau zur Immunfärbung und Tissue Clearing.** (A) Für die Immunfärbung in der „Free floating“-Technik wurde das geschnittene Gewebe in eine 12-Well-Zellkulturplatte mit ausreichend Flüssigkeit platziert und zur Inkubation stets lichtgeschützt auf einem Schüttelgerät belassen. (B) Die gefärbten Schnitte wurden vorsichtig mit einem feinen Spatel in ein lichtundurchlässiges Gefäß (\*; Deckel nicht abgebildet) mit 1-2 ml PBS gegeben. Die Flüssigkeit wurde abpipettiert und die Lösungen für das Tissue Clearing nacheinander ausgewechselt. Entscheidend für eine erfolgreiche und schonende Durchführung war stets die genaue Einhaltung der Einwirkdauer (\*\*) der jeweiligen Substanz. Anschließend wurde der Gewebsschnitt auf einem Objektträger mit zwei Spacern (\*\*\*) und etwas frischen DBE eingedeckt.

Die behandelten Schnitte wurden anschließend auf Objektträger eingedeckt. Da sie aufgrund ihrer Höhe nicht standardmäßig nur mit einem Deckgläschen einzudecken waren, wurden sogenannte Spacer eingesetzt. Das sind vorgefertigte und kommerziell erhältliche (SecureSeal, Sigma-Aldrich), beidseits selbsthaftende Aufkleber mit einer Aussparung in der Mitte, welche zwischen dem Objektträger und dem Deckgläschen eine

eine Art Kammer für das sonst zu hohe Gewebestück formt. Für unsere Anwendung wurden pro Schnitt zwei Spacer übereinander platziert. Statt dem standardmäßig verwendeten Eindeckmedium wurde außerdem eine kleine Menge frischen DBE benutzt. Dadurch wurde die Brechung der Laserstrahlen an der Kontaktfläche zwischen dem Gewebe, dessen Matrix im letzten Schritt des Tissue Clearing mit DBE aufgefüllt wurde, und des Eindeckmediums minimiert und somit die optischen Eigenschaften für die konfokale Mikroskopie optimiert. So eingedockte Proben ließen sich bis zu einer Woche bei 4°C aufbewahren.

Im Folgenden wird unser Protokoll zur dreidimensionalen Gewebedarstellung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie unter Einsatz von Immunfluoreszenz und Tissue Clearing zusammenfassend aufgeführt. Diese endgültige und vollständige Version stellt das Ergebnis vielfacher Modifikation und Optimierung verschiedener Behandlungsschritte dar, und bildet im Detail die Methodik ab, welche bei den exemplarischen Darstellungen der Leberarchitektur im Rahmen dieses Projektes letztlich zur Anwendung kam.

### 5.1.1 Vollständiges 3D Immunfluoreszenz- und Tissue-Clearing-Protokoll

#### Allgemeines:

- Alle Staining-Schritte sind bei Raumtemperatur, abgedunkelt und auf einem Schüttelgerät durchzuführen.
- Alle Clearing-Schritte sind unter einem Abzug durchzuführen. Die Zeitangaben sind genau einzuhalten.
- Die Zitronenlösung ist vor der Anwendung in einer Mikrowelle für ca. 2 Minuten und vor jeder Wiederholung für 5-10 Sekunden zu erhitzen. Die Lösung darf bei der Anwendung nicht kochen.

#### Lösungen:

##### Zitronensäurelösung

- 800 ml dH<sub>2</sub>O
  - 2,1 g citric acid monohydrate
- Vermengen, den pH-Wert auf 6,0 einstellen und mit dH<sub>2</sub>O bis 1 l auffüllen.

##### PBS-NaCl-TritonX (1,7% NaCl, 1% Triton™ X-100)

- 9 g NaCl
- 10 ml Triton™ X-100
- ad 1000ml PBS

##### Blocklösung

- 800 µl PBS-NaCl-TritonX
- 100 µl Serum
- 100 µl BSA

##### AK-Basislösung (PBS-NaCl-TritonX, 5% BSA, 5% Serum)

- 630 µl PBS-NaCl-TritonX
- 35 µl Serum
- 35 µl BSA

## IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG:

### Tag 1:

1. Kryostatschnitte (250-300  $\mu\text{m}$ ) anfertigen und in eine Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen platzieren. Sofort 2 ml PBS hineingeben.
2. Dreimal für jeweils 15 min. mit je 2 ml PBS bei RT waschen.
3. Dreimal für jeweils 2 min. mit je 1 ml heißer Zitronensäurelösung bei RT behandeln.
4. Für 20 min. bei RT abkühlen lassen.
5. Zweimal für jeweils 15 min. mit je 2 ml PBS, dann einmal für 15 min. mit 2 ml PBS-NaCl-TritonX bei RT waschen.
6. Mit 1 ml Blocklösung für 2 h bei 37°C, anschließend ÜN bei 4°C stehen lassen.

### Tag 2:

1. Mit 700  $\mu\text{l}$  Lösung mit primärem AK (7  $\mu\text{l}$ ) für 48h bei RT inkubieren.

### Tag 4:

1. 4x20 min. mit je 2 ml PBS-NaCl-TritonX bei RT waschen.
2. Mit 700 $\mu\text{l}$  Lösung mit sekundärem AK und Kernfarbstoff (3  $\mu\text{l}$  sek. AK / 1  $\mu\text{l}$  Kernfarbstoff) für 48h bei 4°C inkubieren.

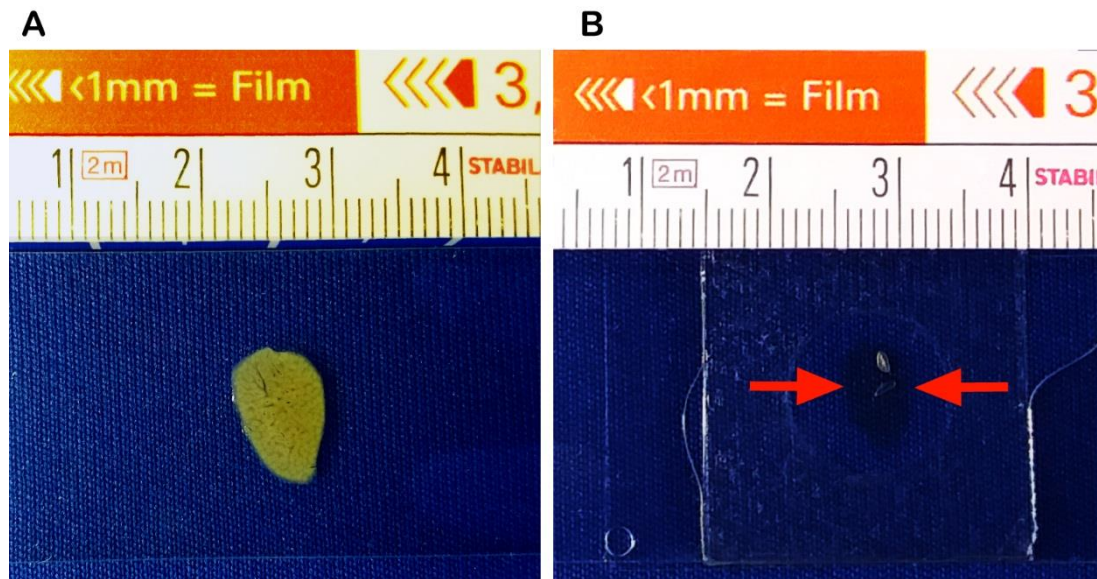
### Tag 6:

1. Für ca. 20 min. mit 2 ml PBS-NaCl-TritonX und anschließend dreimal für jeweils 20 min. mit je 2 ml PBS bei RT waschen.
2. (Bis zur weiteren Verwendung abgedunkelt bei 4°C aufbewahren.)

## TISSUE CLEARING:

1. In kleine lichtundurchlässigen Glasbehälter 1 ml PBS einfüllen, einen Schnitt hineingeben. Anschließend PBS abpipettieren.
2. Mit je 1 ml THF-Lösung in steigender Konzentration (50%, 80% in dH<sub>2</sub>O und 100%) für jeweils max. 15 min. behandeln. THF aus dem Behälter abpipettieren.
3. 1 ml reines DBE für 5 min. hineingeben. Währenddessen zwei Spacer auf einen Glasobjektträger übereinander anbringen.
4. Den Schnitt herausnehmen und mit etwas frischem DBE in der Spacer-Vertiefung mit einem Deckgläschen eindecken.
5. (Abgedunkelt bei 4°C aufbewahren und zeitnah mikroskopieren.)

### 5.1.2 Protokollanwendung – praktische Aspekte



**Abbildung 14:** Gewebsschnitte vor und nach der Protokollanwendung. (A) Unbehandelter Gewebsschnitt von ca. 200 µm Dicke auf einem Objektträger. (B) Derselbe Schnitt nach der Protokollanwendung (zwischen den roten Pfeilen), eingedeckt mit zwei Spacern.

Die Anwendung des Färbe- und Clearingprotokolls resultiert in bereits makroskopisch sichtbaren Veränderungen der Gewebsschnitte. Der Effekt des sog. „Durchsichtigmachens“ ist als solches bereits mit dem bloßen Auge zu erkennen (vgl. **Abbildung 14**), d.h. das Gewebe wird sogar für die einfachen Lichtstrahlen weitgehend durchlässig und erinnert an braungetöntes Glas. Außerdem verliert das Gewebe im Rahmen des Tissue Clearing, vorrangig durch den Wasserentzug, geringfügig an seinem ursprünglichen Volumen, sodass der Schnitt insgesamt etwas kleiner wird. Letztlich ist noch zu erwähnen, dass das Gewebe durch die Behandlung eine härtere, kunststoffartige Konsistenz annimmt und dadurch tendenziell brüchig wird. Dies erfordert ein wenig Vorsicht in der Handhabung, schränkt sie jedoch nicht wesentlich ein.

Durch die anschließende Mikroskopie und entsprechende Bildbearbeitung in IMARIS entstehen dreidimensionale Aufnahmen von Lebergewebe in einer bislang noch nie erreichten Signalqualität. Die großen Gewebevolumina und die durchgehend exzellente Qualität der Aufnahmen eröffnen somit ganz neue, lange ersehnten Möglichkeiten für detaillierte qualitative und quantitative Untersuchungen der Leberarchitektur auf mikroskopischer Ebene.

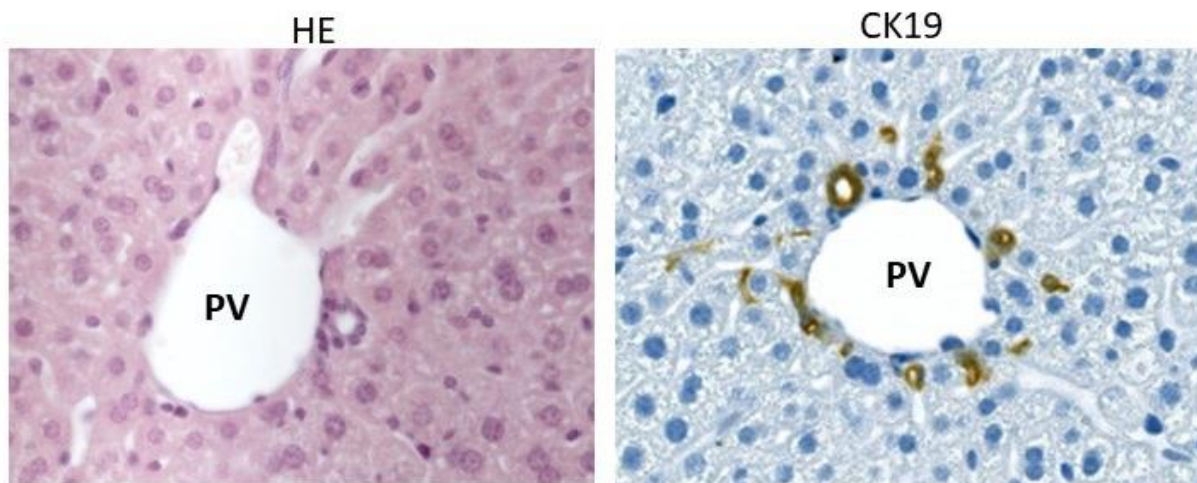
In den nachfolgenden Kapiteln werden repräsentative dreidimensionale Aufnahmen von gesundem sowie CDE-geschädigtem Lebergewebe vorgestellt, welche durch den Einsatz unseres Protokolls ermöglicht wurden. Diese Aufnahmen dienen in erster Linie einer Demonstration der Anwendbarkeit der entwickelten Methode (als sog. „proof of principle“) und sollen das Potenzial der dadurch ermöglichten dreidimensionalen Mikroskopie dicker Gewebeproben für mikromorphologische Studien illustrieren.



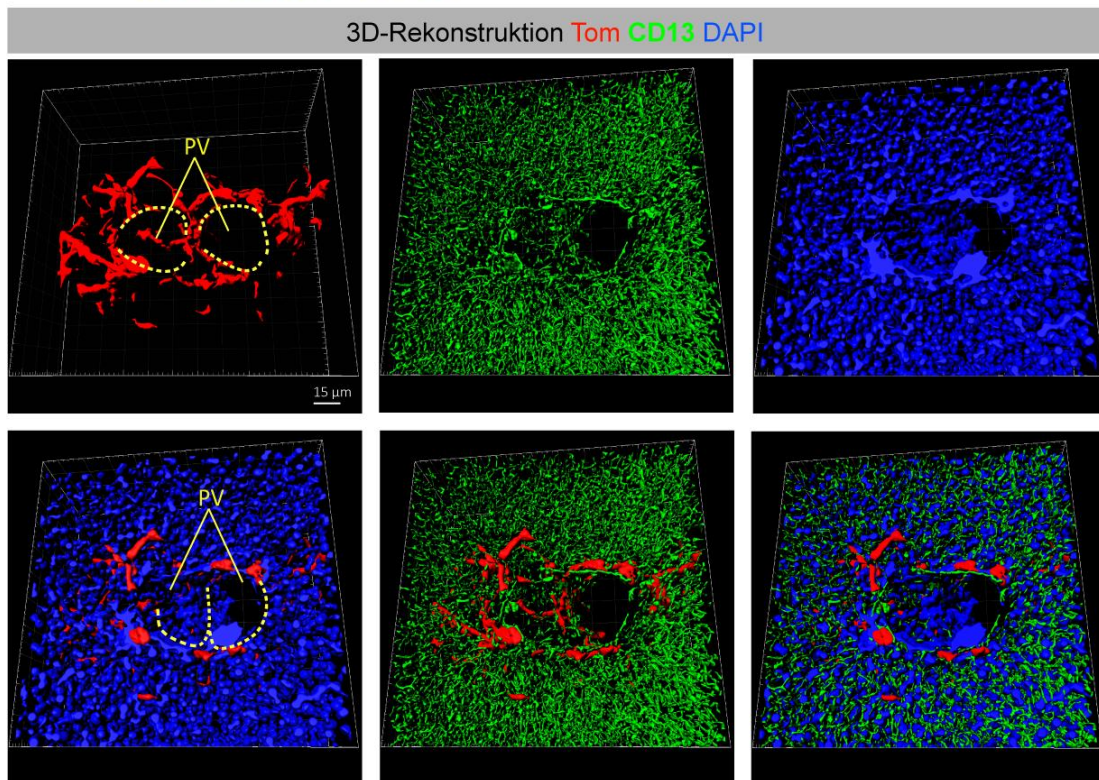
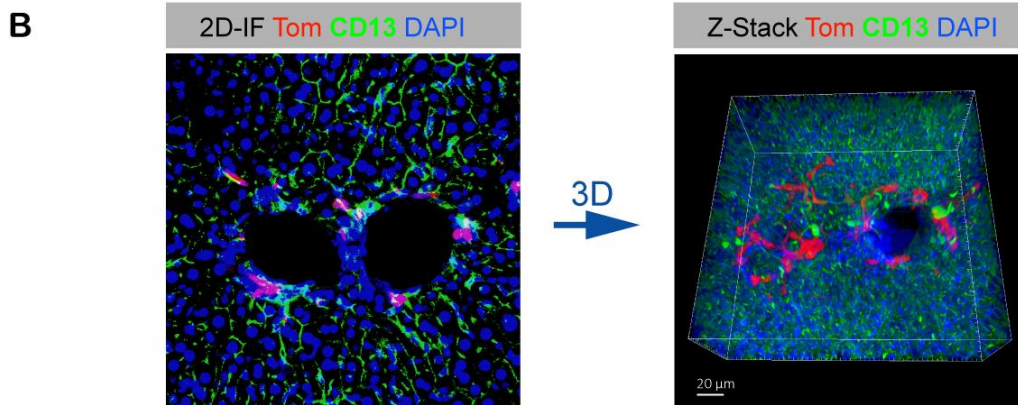
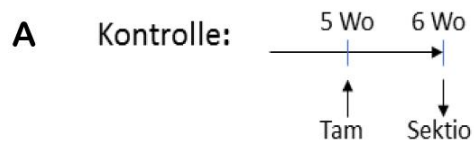
## 5.2 Gallengangssystem der gesunden Leber

Die Implementierung unseres neuartigen Protokolls resultierte in hochwertigen Aufnahmen von Fluoreszenzsignalen über eine Höhe von bis zu 100 µm Lebergewebe. Durch die endogene rote Fluoreszenz (tdTomato), die Immunfluoreszenzmarkierung der apikalen Hepatozytenmembranen sowie die direkte Fluoreszenzfärbung der Zellkerne, werden das biliäre respektive das Leberzellkompartiment sowie das kanalikuläre Netzwerk durch unterschiedliche Farbkanäle hervorgehoben. Insbesondere ist dabei die exzellente Qualität der Immunfluoreszenz, welche die Kanalikuli markiert, hervorzuheben. Die Signaltrennschärfe und die durchgehende Markierung des kanalikulären Netzwerkes bis in die tiefen Gewebeschichten, wie in **Abbildung 16** demonstriert wird, ist ein eindeutiger Beleg für die Leistungsfähigkeit sowie herausragendes Potenzial der entwickelten Methode. Besonders hervorzuheben ist die Darstellung der Gallenkanalikuli, welche sich in der dreidimensionalen Rekonstruktion als ein zusammenhängendes Netzwerk präsentieren. Dies bringt ihre Drainagefunktion gemäß dem traditionellen Verständnis bildhaft zum Ausdruck. Während die Kontinuität des kanalikulären Netzwerkes zunächst lediglich den bisherigen Kenntnisstand bestätigt, verspricht der Zugang zu einer solchen Darstellung neue Möglichkeiten für die Erforschung seiner Veränderungen unter pathologischen Bedingungen.

Der Mehrwert unserer etablierten Methode für die mikromorphologischen Beobachtungen sind besonders eindrücklich in direktem Vergleich mit konventionell-histologischen zweidimensionalen Aufnahmen zu erkennen (**Abbildung 15**).



**Abbildung 15: Zweidimensionale Histologie der Gallengänge in einem Portalfeld.** In dem konventionell HE-gefärbten histologischen Schnitt (linke Bildhälfte) des Portalfeldes erkennt man neben dem Querschnitt des Portalvenenastes bei ca. 3 Uhr einen zu diesem parallel verlaufenden interlobulären Gallengang. Dieser und weitere kleinere, isoliert imponierende biliär differenzierte Strukturen (entsprechend Gallenduktuli und Hering-Kanälchen) werden mittels immunohistochemischer CK19-Färbung hervorgehoben (rechte Bildhälfte, interlobulärer Gang bei ca. 11 Uhr). Die biliären Strukturen zeigen in den zweidimensionalen Aufnahmen keine räumliche Kontinuität - eine genauere Aussage zu deren funktionellen Zusammenhängen ist im Vorliegenden somit nicht möglich. (Mikroskopische Aufnahmen Labor Dr. F. Geisler; Vergrößerung jeweils 40x)

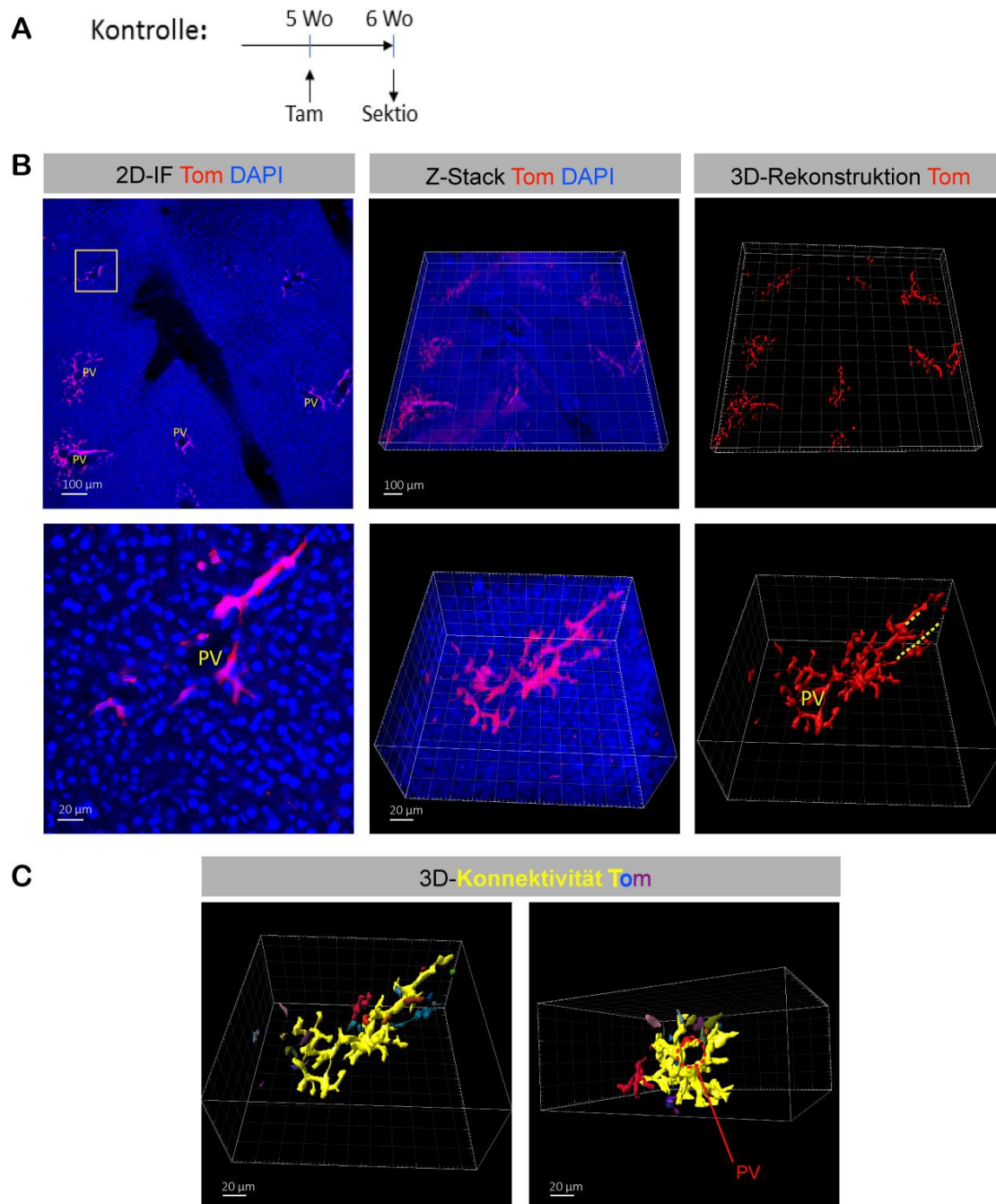


**Abbildung 16: Repräsentative Darstellung einer vollständigen Protokollanwendung an einer Kontrollmaus.** (A) Die Kontrollgruppe erhielt im Alter von 5 Wochen Tamoxifen i.p. Eine Woche später erfolgte die Organentnahme. (B) Mit konfokaler Mikroskopie wurden virtuelle Stapel zweidimensionaler Aufnahmen generiert, die sog. Z-Stacks. Mit der Software IMARIS wurde darin zunächst das Kontrastverhalten der Fluoreszenzsignale angepasst (oben). Anschließend erfolgte die digitale dreidimensionale Rekonstruktion der jeweiligen Signale - diese einzeln (Mitte) oder kombiniert (unten) gezeigt. (Rot = biliäres Kompartiment, Grün = Gallenkanalikuli, Blau = Zellkerne; "PV" = Portalvene; gestrichelte gelbe Linie = angedeutet Verlauf der Portalvene; Maßstab im Bild; Schnittdicke ~100 µm)



Die sicherlich interessanteste neue Erkenntnis in Bezug auf die Mikroanatomie von gesundem Lebergewebe, die durch solch eine dreidimensionale Darstellung überhaupt erst ermöglicht wurde, ist im Kompartiment der biliären Zellen zu beobachten.

In der gesunden Leber markiert die endogene tdTomato-Fluoreszenz die Hnf1 $\beta$ -positiven Zellen und somit ausschließlich Cholangiozyten, welche vorbestehende Gallengänge ausbilden. Während in den zweidimensionalen immun-/histologischen Aufnahmen periportal in der Regel mehrere kleine Gallengänge und teilweise isolierte Zellen ohne offensichtliche Kontinuität zueinander beobachtet werden (**Abbildung 15**), wird im Vorliegenden gezeigt, dass dieses Kompartiment in der Wirklichkeit einen komplexen, feinverzweigten Gallengangplexus mit röhrenartigem Verlauf zirkumferentiell entlang der Portalvene ausbildet. Die konventionell-histologisch gesehenen kurzen Gangsegmente stellen in der räumlichen Darstellung also nicht nur, wie lange angenommen, radiäre Ausläufer des Drainagesystems, sondern zum großen Teil auch Verästelungen und Verbindungsstücke des in sich verzweigten, kontinuierlichen Gallengangplexus dar. Dies wird besonders eindrücklich in den Analysen der sogenannten Konnektivität des markierten Kompartimentes demonstriert. Mittels einer IMARIS-eigenen Funktion werden dabei die in Kontinuität stehenden Anteile eines Fluoreszenzsignales hervorgehoben und somit die zusammenhängenden Abschnitte der markierten Struktur aufgezeigt. In dieser Analyse, wie in **Abbildung 17C** zu sehen, hebt sich nahezu das gesamte biliäre Kompartiment eines Portalfeldes der gesunden Leber als weitgehend zusammenhängendes Gebilde hervor. Das Vorhandensein eines Gallengangplexus in dieser Form stellt eine völlig neue Erkenntnis hinsichtlich der Mikroanatomie des Lebergewebes dar und eröffnet neue Möglichkeiten für eine weiterführende Erforschung der funktionellen Mikroanatomie der Leber.



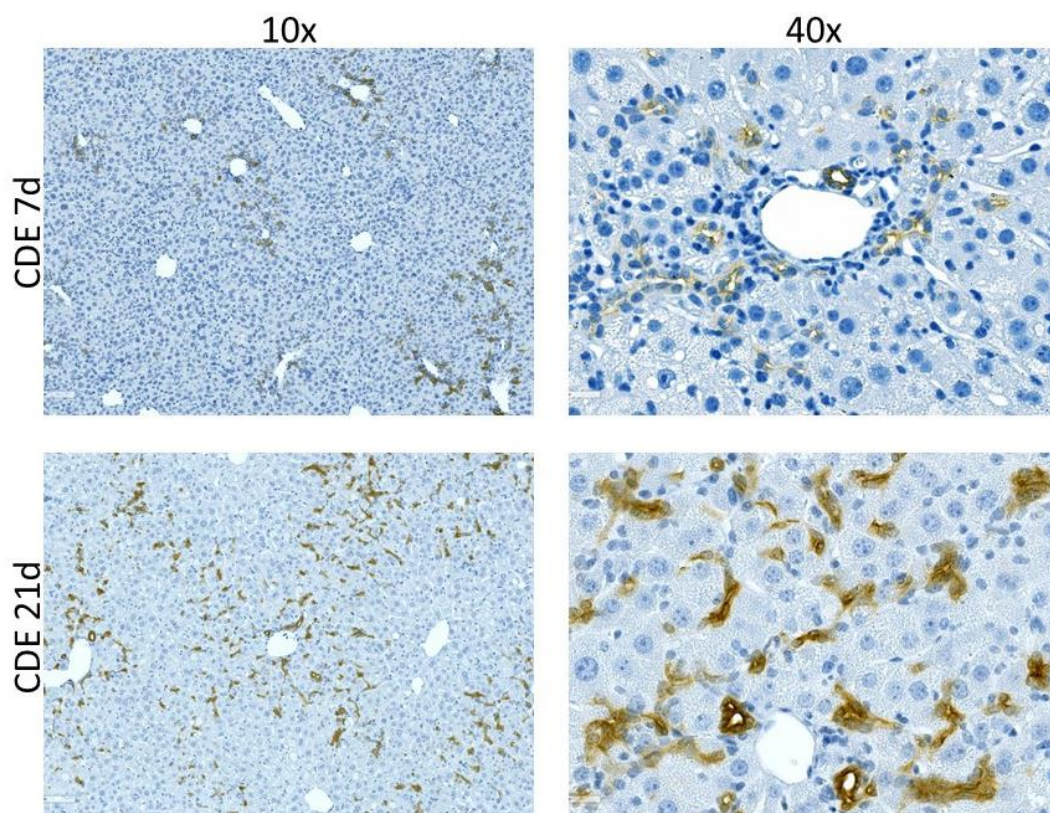
**Abbildung 17: Repräsentative Darstellung des biliären Kompartiments in der homöostatischen, ungeschädigten Leber (Kontrolle).** (A) Die Kontrollgruppe erhielt im Alter von 5 Wochen Tamoxifen i.p. Eine Woche später erfolgte die Organentnahme. (B) Kontrollleber in Übersicht (oben links) und bei starker Vergrößerung des gelb markierten Bereichs (unten). Die tdTom-Fluoreszenz wurde digital dreidimensional rekonstruiert (rechte Spalte in der jeweiligen Vergrößerung) und zeigt die Ausdehnung des biliären Kompartiments, hier zur Übersicht ohne Kernsignale. (Rot = biliäres Kompartiment, Blau = Zellkerne; gelbes Rechteck = vergrößerter Bereich; "PV" = Portalvene; gestrichelte Linie = angedeutet Verlauf der Portalvene) (C) Konnektivität des tdTom-positiven Kompartiments, jede Farbe stellt ein räumlich zusammenhängendes Fluoreszenzsignal dar. Das biliäre Kompartiment um die Portalvene imponiert in gesunder Leber größtenteils als zusammenhängendes Netzwerk (zusammenhängender Anteil gelb, kleinere separate Anteile mehrfarbig hervorgehoben). (jeweils Maßstab im Bild, Schnittdicke ~100 µm)

Diese Abbildungen zeigen allesamt das unbehandelte, d.h. intakte Lebergewebe unter physiologischen Bedingungen auf. Die Frage, die sich jedoch gleich aufdrängt, ist - wie verhalten sich diese Strukturen, wenn das Lebergewebe substanziiell geschädigt wird?

Im Rahmen von chemisch-toxischen Leberschädigungen werden seit langer Zeit phänotypisch biliäre Proliferate beobachtet, die je nach Art und Dauer der Noxe in unterschiedlichen Entfernungen zu den bestehenden periportalen Gallengängen erscheinen. Nachdem diese Phänomene bislang fast ausschließlich in zweidimensionalen konventionell-histologischen Studien untersucht wurden, sind unsere Kenntnisse über den räumlichen Kontext dieser Prozesse, insbesondere angesichts des hier eindrücklich dargestellten Gallengangsplexus, sehr eingeschränkt. Um diese Zusammenhänge näher zu erleuchten, wird nachfolgend mittels unserer Methode die duktale Reaktion in verschiedenen Stadien einer charakteristischen chemisch-toxischen Schädigung abgebildet und in Relation zum Gallengangsplexus untersucht.

### 5.3 Duktile Reaktion – biliäres Remodelling der geschädigten Leber

#### 5.3.1 Duktile Reaktion nach toxischer CDE-induzierter Leberschädigung



**Abbildung 18: Zweidimensionale Immunhistologie der biliären Strukturen (CK19) nach CDE-Schädigung.** In der immunohistochemischen Färbung für CK19 zeigt sich nach einer (oben) und drei (unten) Wochen Behandlung mit CDE eine progrediente Proliferation von biliären Strukturen in der Mausleber. Die biliären Proliferate breiten sich dabei in Form kurzer, teils feintubulär und vereinzelt einzellig imponierender Elemente zunehmend vom Portalfeld weg und in das lobuläre Parenchym hinein. In der zweidimensionalen Histologie ist hier oft keine Kontinuität zwischen den Proliferaten zu erkennen. (Mikroskopische Aufnahmen Labor Dr. F. Geisler; Vergrößerung 10x bzw. 40x)





Dichte der Kernfärbung als Hinweis auf progredienten Hepatozytenverlust erkennen. Hierbei erstrecken sich die neu entstandenen duktales Proliferate interportal über weite Entfernungen und scheinen stellenweise sogar mit den duktales Reaktionen der benachbarten Portalfelder zu fusionieren (**Abbildung 19B, unten links**). In stärkerer Vergrößerung einer periportal duktales Reaktion (**Abbildung 19B, unten mittig**) kommen ihre zahlreichen Verästelungen mit vielfachen filigranen Ausläufern zum Vorschein. Während man in der eine Woche lang behandelten Leber noch eindeutig die Konturen der Portalvene in Analogie zum ursprünglichen Gallengangsplexus erkennen kann, wirkt die Architektur der länger behandelten Organe durch die extensive duktales Reaktion sehr unübersichtlich. Der Portalvenenast erscheint wie überwuchert durch die duktales Proliferate und sein Lumen ist nur noch bei aufmerksamer Inspektion durch Bewegen der 3D-Aufnahme zu erahnen (in **Abbildung 19B** zur Orientierung die Lumenkonturen des Portalvenenastes durch die gestrichelte gelbe Linie hervorgehoben). Die duktales Reaktion füllt nach dreiwöchiger CDE-Fütterung nahezu das gesamte Aufnahmegebiet bei 60-facher Vergrößerung aus und macht zunächst einen ungeordneten bzw. nahezu chaotischen Eindruck. Umso mehr beeindruckt daher das Ergebnis der Konnektivitätsanalyse der duktales Reaktion in CDE-geschädigtem Lebergewebe. Wie in der jeweils äußeren rechten Spalte der **Abbildung 19B** zu sehen ist, stellt sich das biliäre Kompartiment sowohl nach einer als auch nach drei Wochen CDE-Behandlung als jeweils weitgehend zusammenhängende, einheitliche Struktur (gelb) dar. Im Gegensatz zu dem weitgehend diskontinuierlichen bis hin zu einzelligem Erscheinen der duktales Reaktion in zweidimensionalen konventionell-histologischen Aufnahmen (**Abbildung 18**), enthüllt die dreidimensionale Darstellung nicht nur die Kontinuität zwischen den neuen biliären Proliferaten, sondern auch deren engmaschiges Anknüpfen an den bereits bestehenden Gallengangsplexus. Anders formuliert illustriert die beobachtete mikromorphologische Dynamik die eingangs postulierte progrediente Remodellierung des Gallengangsystems durch die Induktion und expansives Wachstum neuer biliärer Proliferate (duktales Reaktion) als Antwort und Anpassung auf den schädigungsbedingten Gewebeuntergang.

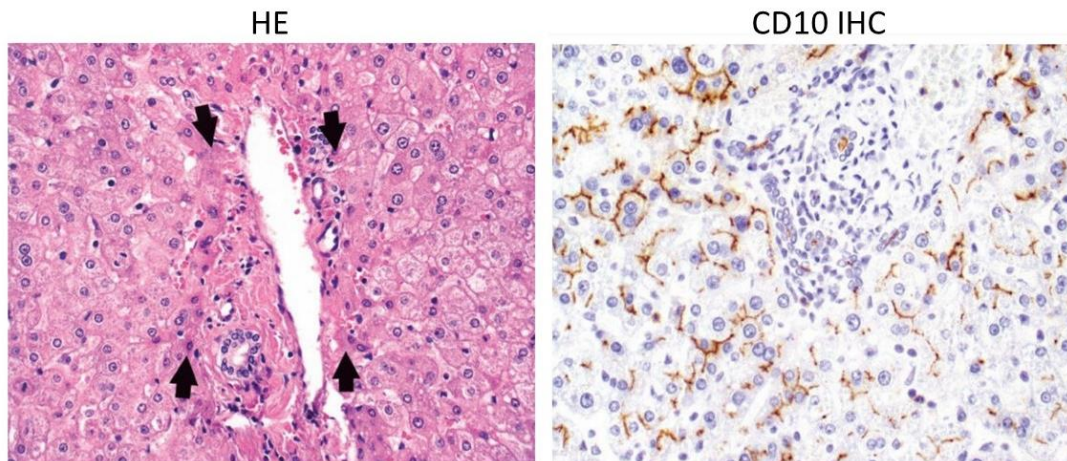
### 5.3.2 Remodellierung der CDE-induzierten duktales Reaktion nach Wegfall des toxischen Stimulus

Um die Effekte der eigentlichen Leberregeneration nach dem Wegfall des Schädigungsreizes zu untersuchen, wurde ein Teil der Versuchstiere im Anschluss an die dreiwöchige CDE-Fütterung zunächst eine bzw. zwei Wochen lang mit schadstofffreiem Standardfutter versorgt und anschließend untersucht. In diesen Organen zeigt sich nicht nur ein unmittelbares Sistieren der Expansion der duktales Reaktion, sondern auch eine deutliche Rückbildung der nach drei Wochen CDE-Fütterung evidenten duktales Proliferate.



entnommenen Organe zeigte. Dies resultierte in einer wesentlich einfacheren Handhabung der Gewebeschnitte sowie problemloser Protokollanwendung und Mikroskopie, insgesamt vergleichbar mit unbehandeltem Lebergewebe.

#### 5.4 Netzwerk der Gallenkanalikuli

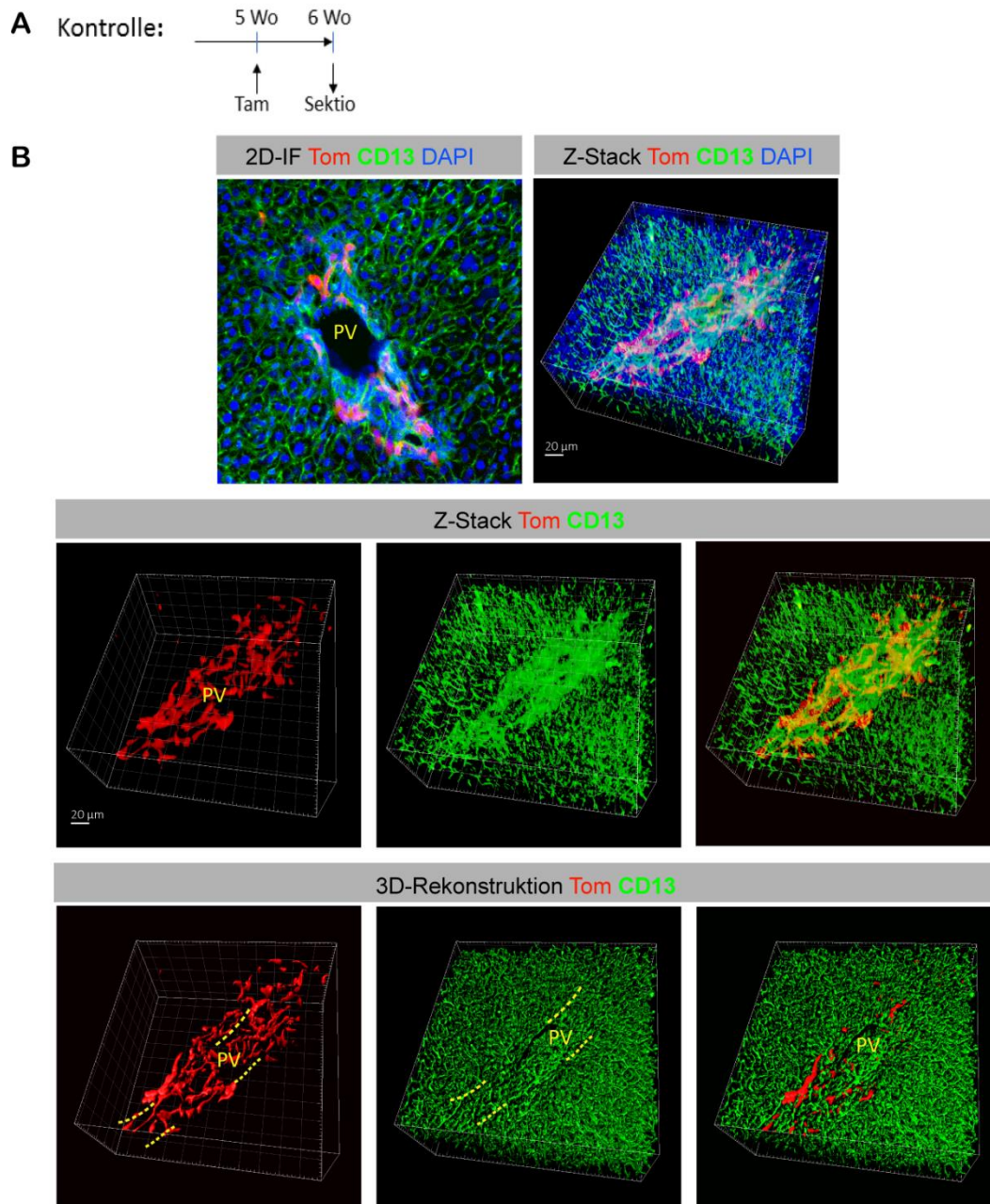


**Abbildung 21: Zweidimensionale Histologie der Leber mit Immunhistologie der Gallenkanalikuli.** In der konventionellen Histologie (HE, linke Bildhälfte) sieht man ein Portalfeld und um diesen perpendikulär angeordnete Hepatozytenbalkchen. In dieser Darstellung sind die Gallenkanalikuli nicht zu erkennen. Erst die immunohistochemische Färbung (CD10, rechte Bildhälfte) lässt die zarten, von den Leberzellen flankierten Kanälchen und vereinzelt ihre wabenartige Verzweigungen erahnen, ohne jedoch die Gesamtheit des (traditionell postulierten) Kanalikulinetzwerkes erfassen zu können. Die schwarzen Pfeile im linken Bild markieren die sogenannte Grenzlamelle, in welcher das portale Feld auf das hepatozelluläre Kompartiment trifft. In dieser Zone sind – gemäß ihrer physiologischen Rolle – auch Verbindungen der Gallenkanalikuli mit dem Gallengangssystem zu erwarten; diese lassen sich jedoch in sowohl HE- als auch immunhistologischen zweidimensionalen Aufnahmen nicht erkennen. (Mills, 2012)

Unsere bisherigen Kenntnisse über das Aussehen und räumliche Konfiguration der Gallenkanalikuli beruhen fast ausschließlich auf zweidimensionaler HE- und Immunhistologie der gesunden Leber (**Abbildung 21**). Die dreidimensionale Darstellung der dukталen Reaktion während der chemisch-toxischen Schädigung und anschließender Regeneration zieht nach sich somit automatisch die Frage nach dem Aussehen und Veränderungen dieses Netzwerkes während dieser Prozesse. Die Gallenkanalikuli wurden mittels unserer modifizierten Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen CD13 und DPPIV detektiert, welche spezifisch die Oberflächenstrukturen der apikalen Hepatozytenmembran und somit die luminale Begrenzung der Kanalikuli markieren. Da der Anti-CD13-Antikörper in unserem Labor eine hohe und beständige Qualität der Färbung aufwies sowie zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse werden im Folgenden durchgehend Aufnahmen von CD13-markierten Proben gezeigt. Der Gallengangplexus bzw. die duktale Reaktion wird, wie im vorausgegangenen Kapitel, durch die endogene tdTomato-Fluoreszenz abgebildet.



### 5.4.1 3D Architektur der Gallenkanalikuli in der homöostatischen Leber



**Abbildung 22: Repräsentative Darstellung der Gallenkanalikuli in der ungeschädigten Leber.** (A) Die Kontrollgruppe erhielt im Alter von 5 Wochen Tamoxifen i.p. Eine Woche später erfolgte die Organentnahme. (B) Zusätzlich zu dem biliären und dem Kernsignal wird das Kompartiment der Gallenkanalikuli durch Immunfluoreszenz dargestellt (oben). Der Z-Stack des tdTom- und Kanalikuli-Signals in einem Portalfeld (Mitte) wurden getrennt dreidimensional rekonstruiert (unten).

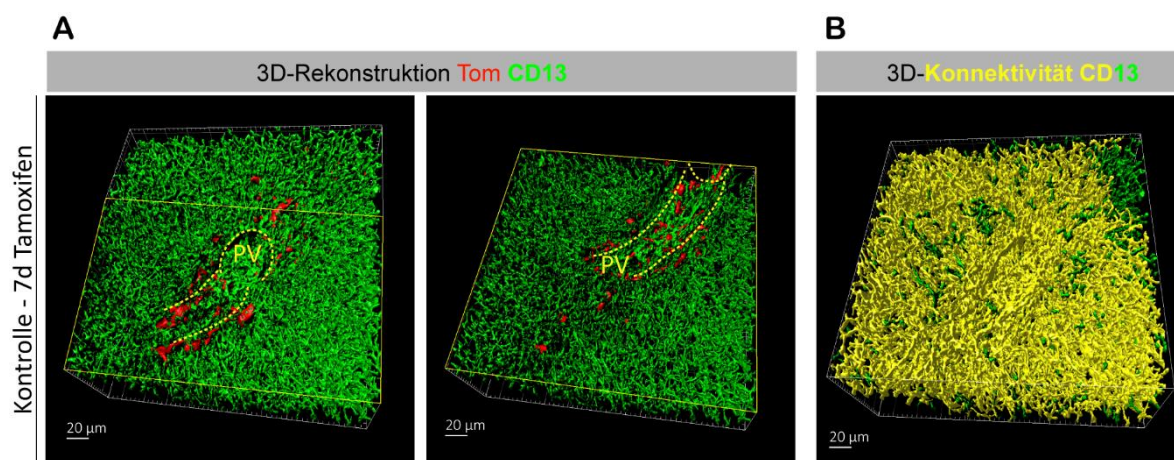
(Rot = biliäres Kompartiment, Blau = Zellkerne, Grün = Gallenkanalikuli; "PV" = Portalvene; gestrichelte Linie = angedeutet Verlauf der Portalvene; Maßstab im Bild; Schnittdicke ~100 μm)

Sowohl die zweidimensionalen Aufnahmen der einzelnen Ebenen als auch die sogenannten Z-Stack-Aufnahmen über die senkrechte Achse (**Abbildung 22B**) zeigen eindrücklich die intakte, durchgehende Markierung der Gallenkanalikuli nach der Behandlung nach unserem optimierten Immunfluoreszenzprotokoll. Die Kanalikuli



erscheinen in der zweidimensionalen Darstellung (**Abbildung 22B, oben links**) als dünne, mehrfach verzweigte Kanälchen, welche in dieser Ansicht die annähernd hexagonalen Mausleberzellen umranden. Dies deckt sich mit unserem bisherigen Wissensstand und den traditionellen Lehrbuchdarstellungen des Lebergewebes (vgl. die konventionell- und immunhistologische Darstellung, **Abbildung 21**).

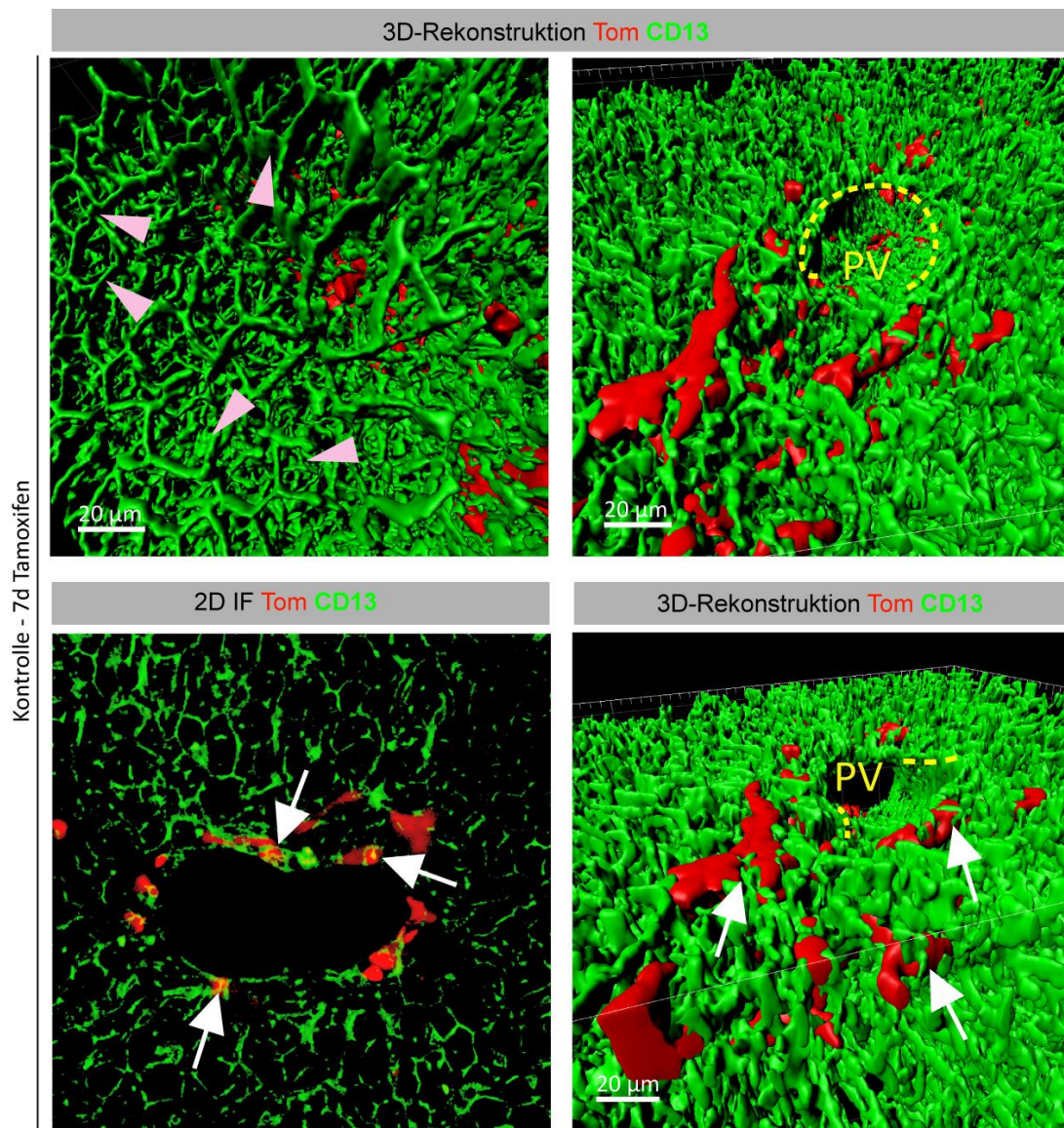
Die dreidimensionale Immunfluoreszenzdarstellung (**Abbildung 22B, oben und mittig**) bestätigt nicht nur diesen Eindruck, sondern zeigt auch die außerhalb der angeschnittenen Ebene gelegenen Verzweigungen sowie Verbindungen zwischen den zweidimensionalen Ebenen entlang der senkrechten Achse. Somit stellt sich das gesamte Kompartiment der Gallenkanalikuli innerhalb des dicken Gewebeschnittes zunächst augenscheinlich als durchgehendes dreidimensionales Netzwerk dar.



**Abbildung 23: Repräsentative 3D-Rekonstruktion der Gallenkanalikuli in der ungeschädigten Leber - Anschnitte und Konnektivitätsanalyse.** (A) Ein schräger (links) und ein nahezu horizontaler (rechts) Anschnitt der Detaildarstellung von Kanalikuli in der unbehandelten Maus, d.h. 7 Tage nach Tamoxifen-Injektion. Dies wurde mithilfe der Funktion „Clipping Plane“ der IMARIS Bildbearbeitungssoftware erreicht. (B) In der Konnektivitätsanalyse der CD13-Fluoreszenz zeigen sich die Kanalikuli in gesundem Lebergewebe als ein weitgehend zusammenhängendes Netzwerk. (Rot = biliäres Kompartiment, Grün = Gallenkanalikuli; „PV“ = Portalvene; gestrichelte gelbe Linie = angedeutet Verlauf der Portalvene; rechteckiger gelber Rahmen = Schnittebene/„Clipping Plane“; Maßstab im Bild; Schnittdicke ~100 µm)

Die anschließende digitale Rekonstruktion der dreidimensionalen Fluoreszenzaufnahmen resultiert durch die Bereinigung der Signale und die Reduktion der Hintergrundfluoreszenz bereits auf den ersten Blick in einer optimierten Darstellung der Kanalikuli (**Abbildung 22B, unten** und **Abbildung 23**). Die Kanälchen erscheinen hier als distinkte zarte tubuläre Strukturen, wobei deren netzartiger Charakter noch stärker zum Vorschein kommt. Besonders aufschlussreiche Einblicke in die Architektur des kanalikulären Netzwerkes ermöglicht das Werkzeug „Clipping Plane“, eine integrierte Funktion der Software IMARIS, mittels welcher beliebige Ebenen der Abbildung in allen Dimensionen freihändig „angeschnitten“ werden können (exemplarisch in **Abbildung 23A** gezeigt). Der Eindruck eines einheitlichen, in sich geschlossenen Netzwerkes lässt sich

besonders effektiv in einer anschließenden Konnektivitätsdarstellung untermauern (Abbildung 23B).



**Abbildung 24: Detailansicht der exemplarischen Darstellung von Kanalikuli und duktaler Reaktion in der ungeschädigten Leber.** Stark vergrößerte Aufnahmen von Gallenkanalikuli sowie DR eines Portalfeldes 7 Tage nach Tamoxifen-Injektion. Die polygonale Umrandung der Hepatozyten durch Kanalikuli ist deutlich erkennbar (oben links, rosa Pfeilköpfe). Bei näherer Betrachtung zweidimensionaler Aufnahmen (unten links) fallen vereinzelte Überlappungen beider Fluoreszenzsignale auf (als gelbe Punkte sichtbar und mit weißen Pfeilen markiert). Nach dreidimensionaler Rekonstruktion (rechts) imponieren diese als Berührungspunkte, bzw. Schnittstellen vom kanalikulären Netzwerk und der dukталen Reaktion.

(Rot = biliäres Kompartiment, Grün = Gallenkanalikuli; „PV“ = Portalvene; gestrichelte gelbe Linie = angedeutet Verlauf der Portalvene; Maßstab im Bild)

Hierbei zeigt sich der weit überwiegende Anteil der Kanalikuli im abgebildeten Gewebestück einfarbig (hier: gelb) und somit als eine zusammenhängende Struktur. Das große zusammenhängende Gebilde füllt im gezeigten Beispiel den zentralen Anteil der

Aufnahme nahezu vollständig aus, und die wenigen, nicht angebondenen Anteile finden sich eher randlich lokalisiert, was möglicherweise als Anschnittphänomen zu deuten ist. Zusammenfassend belegen diese Analysen die allgemeingültige Vorstellung von Gallenkanalikuli der gesunden Leber als kontinuierlichem Reservoir- und Drainagesystem für die anfallende Galle.

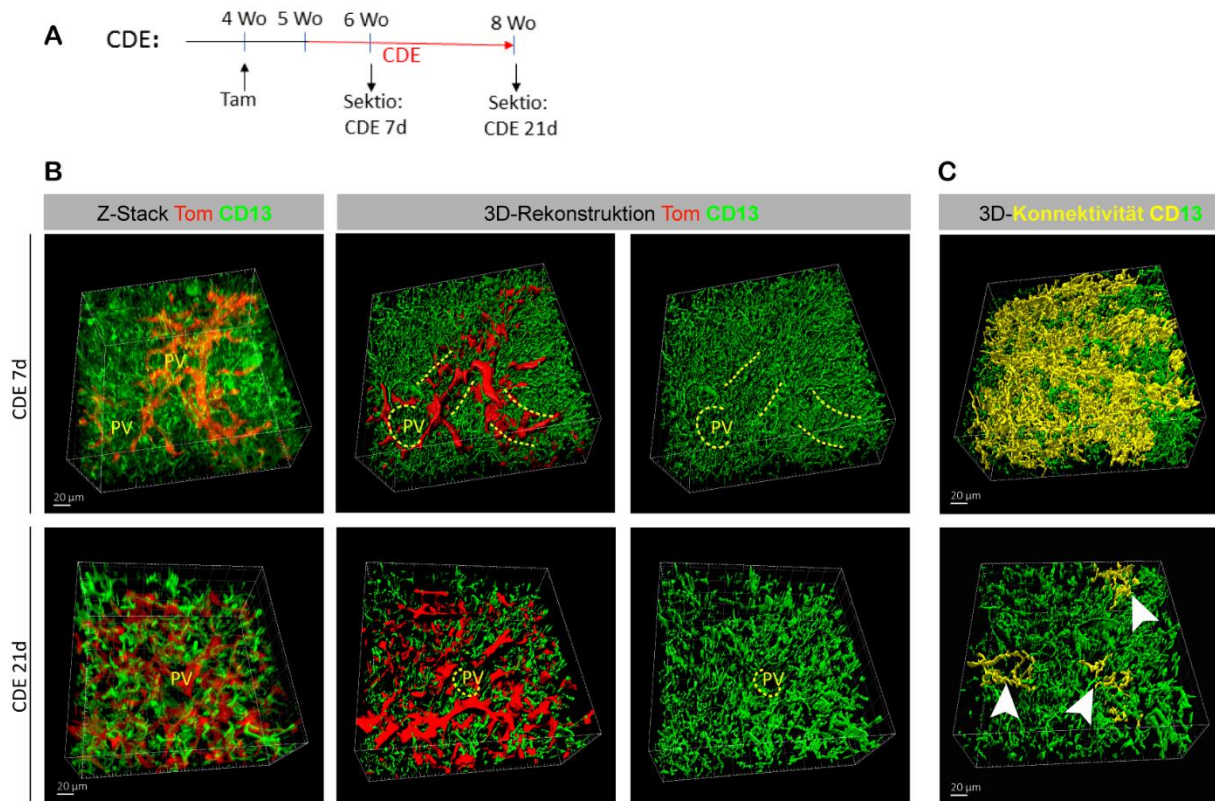
Die polygonale Umrandung einzelner Hepatozyten durch die verzweigten Kanalikuli lässt sich besonders eindrücklich mittels der bereits genannten „Clipping Plane“- sowie der Zoom-Funktion von IMARIS aufzeigen (**Abbildung 24, oben links**). In solch stark vergrößerten Darstellungen kommt außerdem ein weiteres, höchstinteressantes Phänomen zum Vorschein. Bereits in zweidimensionalen Aufnahmen finden sich in fast jedem Portalfeld an mehreren Stellen Signalverschmelzungen zwischen der Immunfluoreszenz der Kanalikuli und der endogenen Fluoreszenz des intrahepatischen Gallengangsplexus (**Abbildung 24, unten links**). In den Detailaufnahmen der dreidimensionalen Signalrekonstruktion (**Abbildung 24, unten rechts**) zeigen sich solche Überscheidungspunkte sehr plastisch als direkte Kontaktstellen bzw. Verbindungen der beiden Strukturen. Somit wird hier zum ersten Mal ein mikromorphologisches Korrelat der Verbindung des kanalikulären Netzwerkes mit dem Gallengangsplexus dreidimensional aufgezeigt.

Die Bedeutung der gezeigten Darstellungen liegt nicht nur in der Demonstration dieser wenig erforschten anatomischen Zusammenhänge im physiologischen Zustand. Vielmehr ermöglichen sie auch weitere, vergleichende Untersuchungen ihrer Veränderungen im Rahmen von Leberschädigungen. Angesichts des Leberzelluntergangs, wie z.B. im CDE-Modell, ist das Aussehen und Kontinuität des dazwischen befindlichen kanalikulären Netzwerkes unter solchen Bedingungen von großem Interesse.

#### 5.4.2 3D Architektur der Gallenkanalikuli nach CDE-induzierter toxischer Leberschädigung

Parallel zur Darstellung der dukталen Reaktion werden in **Abbildung 25** die gleichzeitig stattfindenden Veränderungen des kanalikulären Netzwerkes im Laufe der CDE-Schädigung demonstriert. Da die Gallenkanalikuli anatomisch zwischen den Leberzellenbalken verlaufende Spalträume darstellen und dieses Fütterungsmodell laut dem klassischen Verständnis zu einer überwiegend hepatozellulären Schädigung führt, waren prinzipiell auch flächendeckende Veränderungen des kanalikulären Netzwerkes zu erwarten. Diese Vorstellung lässt sich mittels unserer Methode sehr eindrücklich bestätigen. Nach einer Woche CDE-Fütterung fallen, neben der bereits im Kapitel 5.3.1 besprochenen dukталen Reaktion, schon die ersten Alterationen der Gallenkanalikuli auf. Bei näherer Betrachtung der Aufnahmen findet sich eine beginnende diffuse Rarefizierung des Netzwerkes. Die typischen hexagonalen Hepatozytenkonturen finden sich hier seltener und das Netzwerk erscheint im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr so feinmaschig konturiert.





**Abbildung 25: Repräsentative Darstellung von Gallenkanalikuli nach Leberschädigung im CDE-Modell.** (A) Eine Woche nach der Tamoxifen-Injektion erfolgte die CDE-Fütterung für eine respektive drei Wochen. (B) Parallel zu der progredienten DR stellt sich das kanalikuläre Signal sowohl in Z-Stacks (links) als auch in rekonstruierter Form zunehmend rarefiziert dar. (C) Dies wird insbesondere in Konnektivitätsdarstellungen deutlich. Während nach einer Woche Schädigung das Netzwerk noch relativ zusammenhängt (größter Anteil in Gelb), ist es nach drei Wochen weitgehend fragmentiert (drei größte Fragmente in Gelb und mit weißen Pfeilköpfen). (Rot = biliäres Kompartiment, Grün = Gallenkanalikuli; „PV“ = Portalvene; gestrichelte gelbe Linie = angedeutet Verlauf der Portalvene; Maßstab im Bild; Schnittdicke jeweils ~100 µm)

In der Konnektivitätsdarstellung (**Abbildung 25C, oben**) zeigt sich bereits hier ein etwas reduzierter Zusammenhang des Netzwerkes. Im Vergleich zur Kontrollleber (vgl. **Abbildung 23B**) fällt der größte zusammenhängende Anteil deutlich kleiner aus. Neben diesem stellen sich zudem zahlreiche kleinere, fleckförmig eingestreute und diskontinuierliche, offenbar diskonnektierte Kanalikuliabschnitte dar.

Besonders beeindruckend stellt sich die Rarefizierung der Kanalikuli nach drei Wochen CDE-Fütterung, d.h. in fortgeschrittener Leberschädigung dar. Das kanalikuläre Netzwerk erscheint hier insgesamt „löchriger“ und seine Verzweigungen unregelmäßiger. Die in der isolierten Kanalikulidarstellung erkennbaren Aussparungen lassen sich einerseits auf Leberzellnekrosen und somit den eigentlichen Kanalikuliuuntergang zurückführen. Andererseits ergibt sich dieser optische Effekt aber auch durch die starke Proliferation der sich dazwischen erstreckenden duktaalen Reaktion, wie in der gemeinsamen Rekonstruktion der beiden Kanäle (**Abbildung 25B, mittig**) gut zu sehen ist. Dies resultiert in einer grobmaschigen und irregulären Morphologie des kanalikulären Systems. Dies wird besonders deutlich durch die anschließende Konnektivitätsanalyse unterstrichen, in welcher sich die Kanalikuli als multiple kurze, nicht zusammenhängende Netzwerkfragmente darstellen (**Abbildung 25C, unten**). Das Bild des diskontinuierlichen

kanalikulären Systems visualisiert besonders eindrücklich das Ausmaß des fulminanten hepatozellulären Schadens und weist auf die schwerwiegende Funktionsstörung der intrahepatischen Gallendrainage in diesem Stadium der Schädigung hin.

Diese Aufnahmen wurden im Laufe der stattfindenden Fütterung generiert und demonstrieren somit die Veränderungen der Gallenkanalikuli während des aktiven Schädigungsprozesses. Nachdem im Kapitel 5.3.2 bereits eine Rückbildungstendenz der duktaalen Reaktion nach dem Wegfall des Schädigungsreizes aufgezeigt wurde, stellt sich die Frage, ob im fulminant geschädigten kanalikulären Netzwerk eine vergleichbare Regenerationstendenz zu finden ist.

#### 5.4.3 3D Architektur der Gallenkanalikuli in der CDE-induzierten Leberschädigung nach Wegfall des toxischen Stimulus

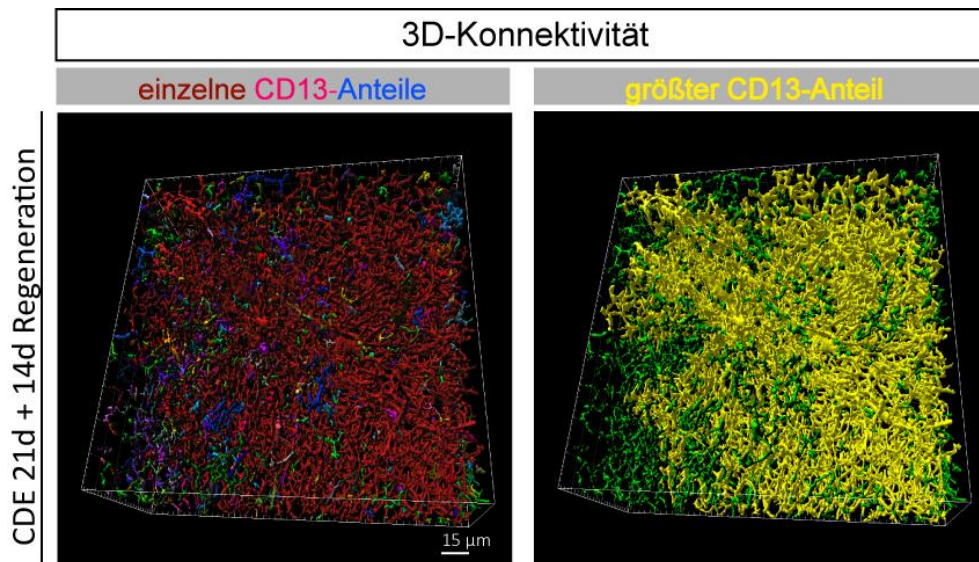
Bereits eine Woche nach dem Wechsel der toxischen CDE-Diät auf normales Futterpellet und Frischwasser zeigt sich in den untersuchten Lebern ein wesentlich geordneteres Bild der Gallenkanalikuli (**Abbildung 26B, oben**). Das kanalikuläre Netzwerk erscheint bereits hier dichter und regelmäßiger verzweigt. Insbesondere die Kanalikuli um die hier schon merklich reduzierte duktaale Reaktion (vgl. initiale Aufnahmen nach der dreiwöchigen Schädigung in **Abbildung 25B, unten**) imponieren wesentlich dichter und vernetzter. Diese Effekte zeigen sich noch deutlicher nach dem Ablauf einer weiteren Regenerationswoche (**Abbildung 26B, unten**). Parallel zum nahezu vollständigen Rückgang der duktaalen Reaktion findet sich hier ein weitgehend regelhaftes kanalikuläres Netzwerk mit erneut identifizierbaren hexagonalen Hepatozytenbegrenzungen durch die einzelnen Kanalikuli. Hinsichtlich der Immunfluoreszenz lassen sich im regenerierten Gewebe zunehmend gleichmäßige und deutlich präzisere Fluoreszenzsignale generieren, was den Rückgang von Leberzellnekrosen bzw. die anschließende Wiederherstellung des Leberparenchyms widerspiegelt.

Insgesamt erinnert das Bild sowohl des kanalikulären Netzwerkes als auch der duktaalen Reaktion in diesem Stadium stark an die Architektur der unbehandelten Leber. Dieser Eindruck lässt sich durch die nachfolgende Konnektivitätsanalyse der Kanalikuli weiter bekräftigen (**Abbildung 27**), wobei sich das kanalikuläre Netzwerk wieder größtenteils als eine durchgehende Struktur entpuppt. Dazwischen finden sich nur wenige kleinere Fragmente des Netzwerkes.





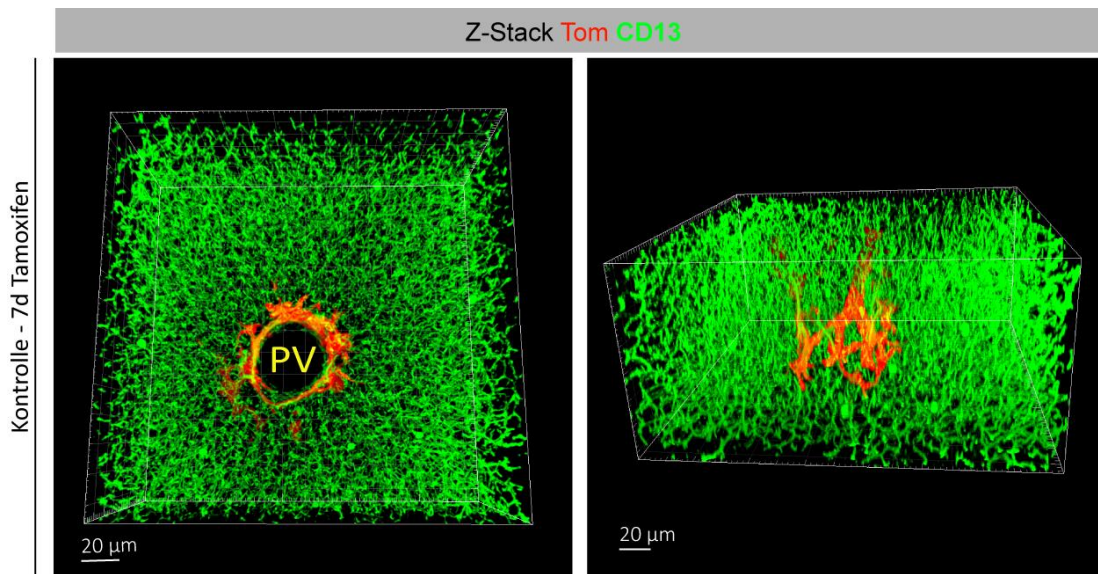
der kräftig expandierenden duktalem Reaktion während der fortschreitenden hepatozellulären Schädigung. In Zusammenschau suggeriert dies einen möglichen kausalen Zusammenhang der invers ablaufenden Veränderungen der beiden galleführenden Systeme, welches als kräftiges Argument für die von uns postulierte Drainagefunktion der duktalem Reaktion dient.



**Abbildung 27: Repräsentative Darstellung der Konnektivität des Kanalikulinnetzes in regeneriertem Lebergewebe nach CDE-Schädigung.** Die Organentnahme erfolgte nach drei Wochen CDE-Behandlung und anschließender zweiwöchiger Regenerationszeit. Das CD13-markierte Kompartiment zeigt sich größtenteils wiederhergestellt und besteht im weit überwiegenden Anteil aus einem großen zusammenhängenden Netzwerk; daneben kommen mehrere deutlich kleinere, noch diskonnektierte Abschnitte zur Darstellung (links: einzelne, in sich zusammenhängende Netzwerkanteile in verschiedenen Farben; rechts: größter zusammenhängender Anteil in Gelb hervorgehoben, restliche kleinere Netzwerkfragmente jeweils Grün). (Maßstab im Bild; Schnittdicke ~100 µm)

Neben der eigentlichen dreidimensionalen Darstellung der Leberarchitektur zwecks morphologischer Studien illustrieren die gezeigten Aufnahmen ebenfalls die breite Anwendbarkeit unserer Methode. Im Laufe der Gewebeschädigung und -regeneration, d.h. bei unterschiedlicher Parenchymschaffenheit zeigt sich durchgehend eine exzellente Aufnahmequalität bei einer Gewebedicke von durchschnittlich 100 µm. Nachdem sich aber im Laufe der Versuche eine potenzielle Erweiterung der Methode um die PFA-Perfusion ergab, welche eine noch bessere Antikörperpenetration und Aufnahmequalität versprach (Eichenbaum et al., 2005; Kasukurthi et al., 2009; Lavenex et al., 2009; Miller, 1998), führten wir eine weitere, exemplarische Mikroskopiereihe an unbehandelte Leber sowie am CDE-Modell unter Hinzunahme der transkardialen intravaskulären Perfusion durch.

## 5.5 Perfusion



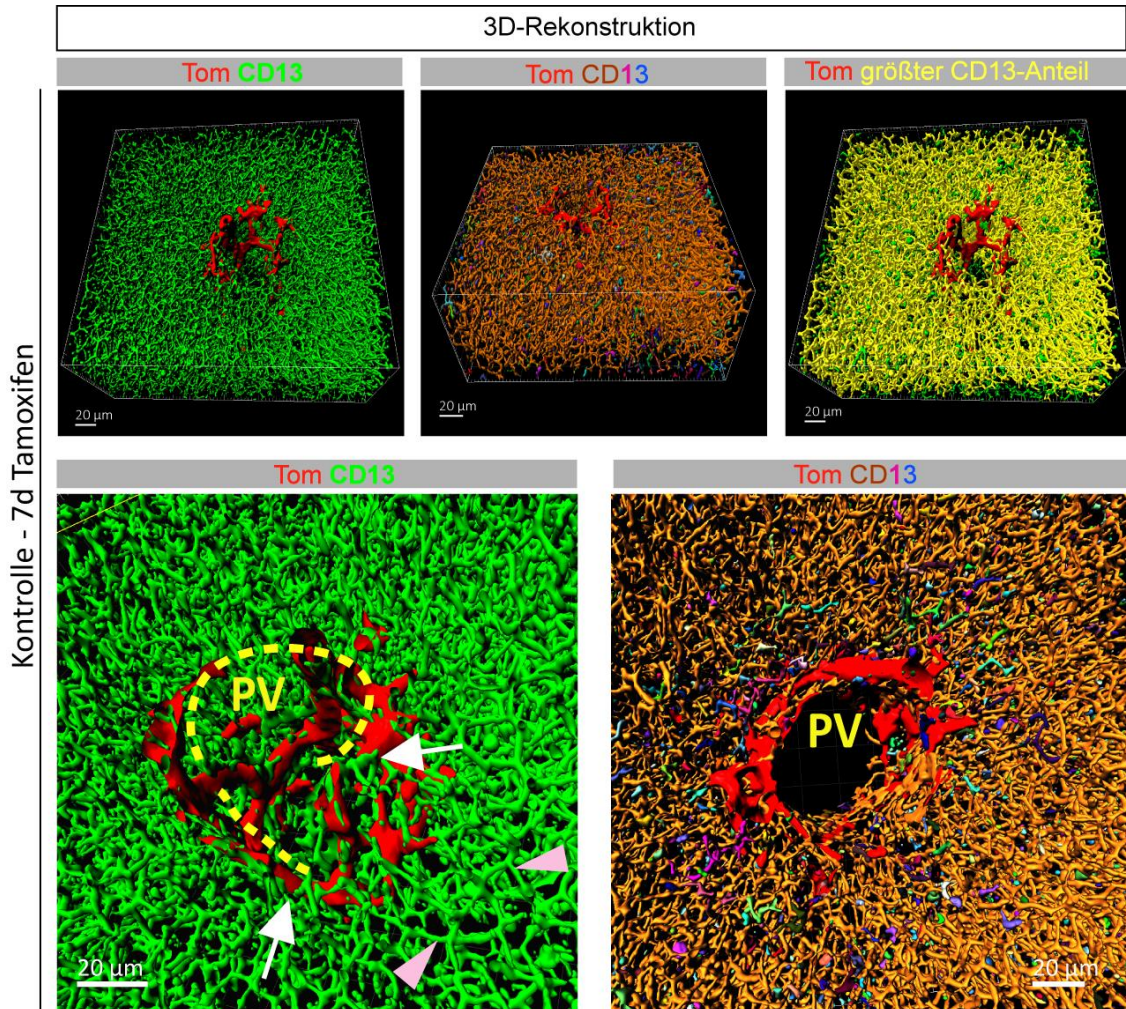
*Abbildung 28: Repräsentative dreidimensionale Darstellung der Immunfluoreszenz für die duktale Reaktion und Kanalikuli in der ungeschädigten Leber nach Perfusion. Die Signalintensität sowohl des Anti-CD13-Antikörpers als auch der endogenen tdTom-Fluoreszenz ist gleichmäßig und erstreckt sich über die gesamte Aufnahme. In der Seitenansicht (rechts) beträgt die Höhe des aufgenommenen Segments ~140 µm. (Rot = biliäres Kompartiment, Grün = Gallenkanalikuli; Maßstab im Bild)*

Wie in **Abbildung 28** zu sehen ist, zeigt sich in transkardial perfundierten Organen bereits in konfokalen Rohaufnahmen eine merkliche Qualitätssteigerung der generierten Fluoreszenzsignale. Während sich die endogene tdTomato-Fluoreszenz wie gewohnt kräftig darstellt, zeigt sich bei der Kanalikularisierung ein großer qualitativer Sprung in der Intensität und Auflösung der Signale im Vergleich zu den nicht-perfundierten Organen (vgl. **Abbildung 22B**). Da die Fluoreszenz in diesem Fall in Verbindung mit einem Antikörper, d.h. von außen, in das Gewebe hineingebracht wird, war bereits zu erwarten, dass sie sich nach dem Herauswaschen der störenden Komponenten wie z.B. des Blutes und der schnellen transvaskulären Fixierung durch die Perfusion gleichmäßiger im Gewebe verteilen kann. Tatsächlich lässt sich die Immunfluoreszenz in den perfundierten Organen über eine viel größere Schnittdicke gleichmäßig detektieren, was bei maximaler Qualität nun Aufnahmen von bis zu ca. 150 µm Höhe ermöglicht.

Besonders deutlich imponieren diese Effekte bei der anschließenden dreidimensionalen Rekonstruktion der Signale. Durch die bereits bei der Rohaufnahme erzielte hohe Trennschärfe kann hier oft auf die erste Nachbearbeitung der Signale verzichtet werden. Dadurch gestaltet sich die Rekonstruktion im Vergleich zu den nicht-perfundierten Organen insgesamt einfacher und bringt hochwertige dreidimensionale Abbildungen hervor. Wie in **Abbildung 28** zu sehen ist, lassen sich die Gallenkanalikuli nun noch besser und deutlicher als feine tubuläre Strukturen erkennen. In Detailaufnahmen der Kontaktstellen zwischen den Gallenkanalikuli und dem biliären Plexus (**Abbildung 29, unten**; in Analogie zu **Abbildung 24**) lassen sich die Schnittstellen der beiden

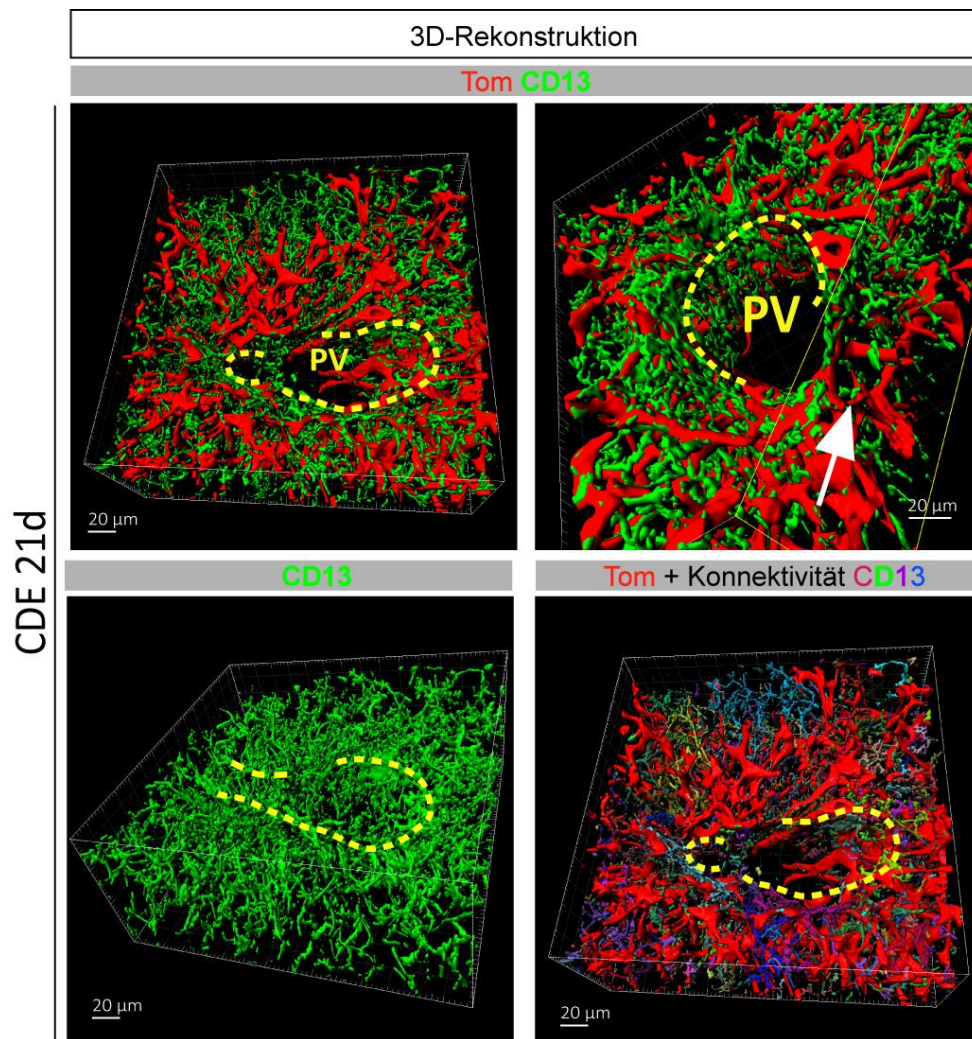


Kompartimente noch leichter identifizieren und gegenüber den benachbarten Abschnitten besser abgrenzen.



**Abbildung 29: Repräsentative dreidimensionale Rekonstruktion der dukталen Reaktion und der Kanalikuli in der ungeschädigten Leber mit Perfusion.** Das CD13-positive Kompartiment zeigt sich nach der Rekonstruktion als ein feines, nahezu vollständig zusammenhängendes Netzwerk dar (oben mittig: einzelne, untereinander zusammenhängende Netzwerkanteile in verschiedenen Farben; oben rechts: größter zusammenhängender Anteil in Gelb hervorgehoben; Schnittdicke jeweils ~140 µm). Bei stärkerer Vergrößerung (unten links) imponieren die feinen, röhrenartigen Lumina der Kanalikuli sowie ihre räumliche Konfiguration im Sinne einer polygonalen Umrandung der angrenzenden Hepatozyten (Pfeilköpfe). Durch die verbesserte Auflösung des kanalikulären Signals werden die Verbindungsstellen zur tdTomato-positiven dukталen Reaktion (Pfeile) noch deutlicher erkennbar. Die vergrößerte Aufnahme der Konnektivitätsanalyse eines Portalfeldes (unten rechts) zeigt zudem nur noch spärliche alleinstehende Kanalikulifragmente. (Rot = biliäres Kompartiment, Grün = Gallenkanalikuli; „PV“ = Portalvene; gestrichelte gelbe Linie = angedeutet Verlauf der Portalvene; Maßstab im Bild)

Die beschriebenen Vorteile der Gewebepfusion lassen sich nicht nur an gesundem, sondern auch an geschädigtem Lebergewebe nachweisen. In **Abbildung 26** werden exemplarisch Ergebnisse einer dreidimensionalen Aufnahme und Rekonstruktion einer perfundierten Leber nach dreiwöchiger CDE-Schädigung dargestellt. Die beschriebenen Effekte - die klar definierten Konturen der Kanalikuli, die bessere Abgrenzung gegenüber dem Hintergrund und der duktaalen Reaktion sowie die klare Darstellung der Schnittstellen beider Kompartimente im Detail - werden hier deutlich hervorgehoben und sprechen für die Gewebepfusion als sinnvolle Ergänzung zu unserer Methode.



**Abbildung 30: Repräsentative dreidimensionale Rekonstruktion der duktaalen Reaktion und der Kanalikuli nach CDE-Schädigung mit Perfusion.** Die Aufnahme und Rekonstruktion der beiden Kompartimente erfolgt nach der Erweiterung der Methode um die Ganzkörperperfusion auch in chemisch geschädigten Organen mit größter Trennschärfe, sowohl in der Übersicht (oben links) als auch im Detail (oben rechts). Dabei kommt die Rarefizierung der Kontaktstellen zwischen den beiden Netzwerken (Pfeil) noch stärker zum Ausdruck. Das sämtliche CD13-positive Kompartiment zeigt sich unregelmäßig und lückenhaft (unten links). (Rot = biliäres Kompartiment, Grün = Gallenkanalikuli) Dieser Eindruck wird durch eine Konnektivitätsanalyse (unten rechts: CD13-positive Strukturen in verschiedenen Farben, daneben die duktaale Reaktion) unterstrichen. Dennoch lassen sich die beiden Signale über größere Abschnitte der Y-Achse gleichmäßig darstellen und nahezu ohne Nachbearbeitung rekonstruieren (Schnittdicke  $\sim 130\mu\text{m}$ ). („PV“ = Portalvene; gestrichelte gelbe Linie = angedeutet Verlauf der Portalvene; Maßstab im Bild)

Im Sinne eines vielversprechenden und möglicherweise in künftigen Untersuchungen entscheidenden Aspektes der Gewebepfusion ist noch zu erwähnen, dass sich so generierte Fluoreszenzaufnahmen aufgrund ihrer großen Präzision für weiterführende quantitative Analysen der dreidimensionalen Daten probeweise als exzellent erwiesen haben (Daten hier nicht gezeigt). Da unser aktuelles Projekt vielmehr die qualitativen Aspekte der Leberarchitektur bzw. ihrer Veränderung bei Schädigung adressiert, standen solche quantitativen Auswertungen dabei zunächst nicht im Fokus. Perspektivisch ist dennoch eine Erweiterung unserer Beobachtungen um quantitative Analysen anzustreben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Hinzunahme der Gewebepfusion hinsichtlich der Aussagekraft und der Reproduzierbarkeit quantitativer Ergebnisse in den künftigen Studien unerlässlich sein wird.



## 6. Diskussion

Die Plastizität und die damit verbundene Regenerationsfähigkeit des Lebergewebes sind ein seit Langem bekanntes Phänomen. Während die Kompensation des Lebertolumens nach einer chirurgischen Resektion laut dem aktuellen Forschungsstand hauptsächlich durch Hyperplasie und teilweise Hypertrophie zustande kommt (Marongiu et al., 2017; Terblanche und Starzl, 1979), ist der Ursprung der Regeneration nach einer chemischen Schädigung nach wie vor Gegenstand regen wissenschaftlichen Diskurses. Bekannt ist bislang, dass es im Rahmen nahezu jeglicher toxisch-nutritiven Schädigung zu einer Entstehung und Expansion eines primär periportal lokalisierten zellulären Kompartimentes kommt. Diese gangartigen Proliferate besitzen einen biliären Immunphänotyp, zeigen je nach Schädigungsart unterschiedliche Ausbreitungsmuster und Dynamiken, und werden zusammenfassend als duktales Reaktion bezeichnet. (Alvaro et al., 2007; Desmet, 2011; Jors et al., 2015; Rodrigo-Torres et al., 2014; Theise et al., 2007; Theise et al., 1999) Ob sie aber als Vorläuferzellen des zu regenerierenden hepatozellulären Parenchyms oder aber als Kompensationsmechanismus für die schädigungsbedingt beeinträchtigte Gallendrainagefunktion dienen, gilt selbst nach mehreren Jahrzehnten multimodaler Forschung als nicht abschließend geklärt.

Um Fragen nach Funktion und biologischer Signifikanz einer Struktur nachzugehen, ist es zunächst notwendig, ihre Morphologie zu verstehen. Insbesondere bei größeren, zusammenhängenden Systemen stellt sich dies als schwierig dar, da die konventionelle mikroskopische Methodik auf lediglich zweidimensionaler Histologie beruht, und somit keine vollständige Information zur eigentlichen Architektur und funktionellen Anatomie des dreidimensionalen Gewebes bereitstellen kann. So entstammt auch der Großteil unserer bisherigen Kenntnisse über den Aufbau der Leber Untersuchungen an konventionellen histologischen Präparaten, der Elektronenmikroskopie und zum kleineren Teil Gefrierbruchaufnahmen. Das heißt, unser Wissen über die Leberarchitektur basiert weit überwiegend auf zweidimensionalen Darstellungen, aus welchen dann auf dreidimensionale Zusammenhänge rückgeschlossen wurde. Für die eigentlichen morphologischen Studien der oben beschriebenen, schädigungsbedingten morphologischen Prozesse ergab sich also die Notwendigkeit einer tatsächlichen, direkten Darstellung des Lebergewebes in drei Dimensionen. In den vergangenen Jahren gab es bereits Versuche, das Lebergewebe und dabei insbesondere die Gallengänge dreidimensional abzubilden. Unter anderem wurden hierzu Injektionen mit Tusche (Kaneko et al., 2015) und synthetischen Polymeren (Walter et al., 2012) durchgeführt und dadurch das gallendrainierende System dargestellt. Die Gallenwege konnten damit also zusammenhängend in allen Raumebenen gezeigt werden, allerdings nur entweder als luminales Ausgusspräparat nach Gewebemazeration oder aber durch direkte Aufnahmen, nachdem das umgebende Gewebe chemisch annähernd durchsichtig gemacht wurde. In beiden Fällen entstanden jedoch lediglich Darstellungen der aufgefüllten Lumina, und der Bezug zum umgebenden Lebergewebe war entweder gar nicht (Ausgusspräparate) oder aber stark eingeschränkt (nach dem „Durchsichtigmachen“) herzustellen. Eine weitere Einschränkung dieser Herangehensweise ergab sich aus der Partikelgröße der injizierten Substanz. Die sehr feinen und stark verzweigten Gallenkanalikuli konnten nur teilweise,

und zwar meistens lediglich in den periportalen Abschnitten, d.h. nahe der Kontaktstellen zu den Gallengängen, erreicht werden, was eine vollständige Darstellung dieses Kompartimentes verhinderte. Andere Methoden, wie z.B. die konfokale Laser-mikroskopie, die eigens für dreidimensionale Gewebeaufnahmen entwickelt wurden, zeigen sich für die Leberdarstellung zwar prinzipiell geeignet, stoßen aber aufgrund optischer Eigenschaften und hoher Zelldichte von Lebergewebe an ihre methodischen Grenzen und lassen nur Darstellungen kleiner Gewebevolumenta zu. Daher ist der Informationsgewinn hinsichtlich dreidimensionaler morphologischer Zusammenhänge selbst mit solchen Technologien bei ihrer standardmäßigen Anwendung stark eingeschränkt. Zusammengefasst bestand also zu Beginn dieses Projektes das Ziel, eine Methode zu entwickeln, welche alle Hauptkomponenten der Leber, also das hepatozelluläre Parenchym und das Gallensystem inklusive der feinsten Gallenkanalikuli, sowie ihre Beziehungen zueinander aufzeigen konnte. Die Entwicklung einer solchen Methode, die ein ausreichend großes Gewebevolumen abbilden und somit eine umfangreiche Darstellung der Leberinnenarchitektur ermöglichen sollte, wurde zum primären Ziel dieser Arbeit.

Das Vorgehen in diesem Projekt bestand aus zwei Stufen, und zwar zunächst der Etablierung einer entsprechenden Methode inklusive der Demonstration ihrer Wirksamkeit an gesundem Lebergewebe im Sinne eines sog. „proof of principle“, und anschließend ihrer exemplarischen Anwendung an einem bereits bekannten und standardisierten Leberschädigungsmodell. Letzteres beinhaltete eine probatorische, in erster Linie deskriptive Studie von Remodellierungsprozessen nach kontrollierter chemisch-toxischer Leberschädigung, welche die Anwendbarkeit des hier vorgestellten Protokolls für zukünftige, sicherlich vielfältige Fragestellungen in diesem Forschungsgebiet demonstrierte. Als Basis für sämtliche Untersuchungen wurde ein in unserem Labor bereits etabliertes und erprobtes Mausmodell unter Einsatz von sog. Lineage Tracing gewählt. Durch die molekulargenetische Fluoreszenzmarkierung der zu untersuchenden - in diesem Fall biliären - Zellreihe, wurde gewährleistet, dass die gesamte biliäre Population einerseits dank der intrinsischen Fluoreszenz unbehindert lasermikroskopisch darstellbar ist, und andererseits alle Nachkommen der markierten Zellen und somit jegliche Umbauprozesse innerhalb dieses Kompartimentes, z.B. im Rahmen der Schädigung, zeitlich verfolgt und abgebildet werden konnten. Zur Induktion der biliären Proliferate wurde das chemisch-toxische Schädigungsmodell CDE eingesetzt, welches in der Vergangenheit in unserem Labor bereits ausführlich erprobt und charakterisiert wurde (Jors et al., 2015). Die verabreichten Schadstoffe führen dabei bereits nach kurzer Behandlungsdauer zu einer fulminanten Steatohepatitis und im Verlauf zur Entstehung von hepatozellulärem Leberkarzinom. Dieses Modell basiert auf nutritiver Schädigung mit toxischen Futterzusätzen und wird in Form eines standardisierten Protokolls mit definierter Behandlungsdauer implementiert. Üblicherweise werden Mäuse im CDE-Modell drei Wochen lang gefüttert bis die typische Schädigung und folglich die duktale Reaktion eingetreten ist.

Da die duktale Reaktion in diesem Stadium als charakteristische und stabile Form für das CDE-Modell gilt und daher gerne als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen eingesetzt wird, existierten davon bereits zahlreiche, weit überwiegend

zweidimensionale Abbildungen in der Literatur (Akhurst et al., 2001; Bisgaard et al., 2002; Desmet, 2011; Gouw et al., 2011; Saxena et al., 1999; Theise et al., 2007; Theise et al., 1999). Um unser Verständnis von räumlichen Zusammenhängen der proliferierenden Strukturen zu vervollständigen, war ein wichtiger Baustein dieses Projektes, genau diese Stadien der duktaalen Reaktion mittels unserer neuen Methode dreidimensional darzustellen und ihre Architektur ausführlich zu untersuchen. Neben diesen „Momentaufnahmen“ war auch von großem Interesse, wie sich die duktaale Reaktion initial entwickelt und im Laufe der Schädigung sowie auch nach dem Wegfall des Schädigungsreizes verändert. Daher wurden ergänzend weitere Zeitpunkte im Rahmen des Fütterungsversuches sowie nach dem Fütterungsstopp gewählt und untersucht. Dank dem eingesetzten Mausmodell mit Lineage Tracing konnte somit mit den Versuchstieren, die zu verschiedenen genau definierten Zeitpunkten analysiert wurden, der zeitliche Verlauf von der nativen Morphologie des biliären Kompartimentes, über die Entwicklung der duktaalen Reaktion und ihrem allmählichen Rückgang nach Beendigung der chemischen Schädigung exemplarisch dargestellt werden.

## **6.1 Möglichkeiten der dreidimensionalen Gewebedarstellung**

Um ein Gewebestück in allen drei Ebenen aufzunehmen sind prinzipiell zwei Herangehensweisen denkbar: das Aufnehmen einzelner serieller Gewebeschnitte und ihre anschließende Rekonstruktion, oder die direkte dreidimensionale Mikroskopie der ganzen Gewebeprobe mittels moderner Technologien.

Bei der ersten Herangehensweise wird die Gewebeprobe zunächst in Serie geschnitten, gefärbt, und die einzelnen Schnitte dann konsekutiv konventionell, d.h. zweidimensional aufgenommen. Anschließend werden diese Aufnahmen, entweder manuell oder durch den Einsatz aufwendiger Software-Lösungen zu einem zusammenhängenden dreidimensionalen Bild über die vertikale Achse rekonstruiert. Diese Methode ist prinzipiell möglich und wurde in der Vergangenheit bereits erprobt (Oh et al., 2014; Toga et al., 1997). Dabei wurden zwar relativ gute Ergebnisse erzielt, dennoch stellte sich diese Herangehensweise als nicht nur sehr zeitintensiv, sondern auch äußerst fehleranfällig dar. Aufgrund von Behandlung vieler Einzelschnitte kann es nämlich zu Schnittartefakten, optischen Verzerrungen bei der Rekonstruktion oder gar Verlusten ganzer Schnitte bzw. Zelllagen in einem der zahlreichen Bearbeitungsschritte kommen, sodass solche Methoden für routinemäßige dreidimensionale Mikroskopie nicht geeignet sind.

Die andere Möglichkeit basiert auf der Färbung der gesamten Gewebestücke und anschließender zusammenhängender Aufnahme der erzeugten (Fluoreszenz-)Signale über die gesamte Präparatedicke in einem Vorgang. Dies beschreibt die Funktionsweise der Immunfluoreszenz-gestützten konfokalen Lasermikroskopie. Ihre Erfindung in den 1980er Jahren erweiterte zwar die Horizonte der klassischen Histomorphologie, die Erfolge hinsichtlich dreidimensionaler Studien großer Gewebevolumina hielten sich jedoch bislang in Grenzen. Obwohl diese moderne Mikroskopiemethode schon aufgrund ihrer technischen Eigenschaften im Stande ist, dreidimensionale Bilddaten zu generieren,

stoßt sie bei der Anwendung an kompaktem biologischem Gewebe schnell an ihre Grenzen. Aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung aus verschiedenen Komponenten, d.h. den Zellen, der bindegewebigen Matrix, der freien Flüssigkeit usw., ergeben sich innerhalb einer solchen Gewebeprobe deutliche Schwankungen in den Brechungsindizes, insbesondere an den Kontaktflächen der verschiedenen Kompartimente. Je dichter, d.h. je parenchym- und bindegewebereicher das Gewebe ist, desto stärker fällt dieser Effekt aus, was dazu führt, dass die Laserstrahlen der konfokalen Mikroskopie abgebremst und gestreut werden, und die dreidimensionalen Aufnahmen nur bei geringer Gewebedicke gelingen. In unseren Versuchen konnte die Leber - als klassisches Beispiel von kompaktem biologischem Gewebe - nur bis zu einer Dicke von ungefähr 30 µm verzerrungsfrei aufgenommen werden. Dies ermöglichte zwar erste orientierende Einblicke in die dreidimensionale Lebermorphologie, reichte allerdings nicht für ausführliche morphologische Studien der Leberarchitektur aus. Da die größeren intrahepatischen bzw. interlobulären Gallengänge einen Durchmesser von bis zu 100 µm aufweisen können (Strazzabosco et al., 2008), wurde dies in unserem Projekt als Richtwert für die minimale erforderliche Aufnahmedicke für umfangreiche Untersuchungen von mikromorphologischen Zusammenhängen der Leber angenommen. Grundsätzlich könnte das Problem der Lichtstreuung durch den Einsatz von Multiphotonenmikroskopie umgangen werden. Diese sehr moderne Technologie zählt ebenfalls zu den Lasermikroskopieverfahren, beruht aber auf gleichzeitiger Anregung von Fluoreszenzmolekülen durch mehrere Photonen mit niedrigerer Energie pro Zelle – im Gegensatz zu einem, höhere Energie tragenden Photon pro Zelle bei der klassischen konfokalen Mikroskopie. (Wikipedia, 2021) Aufgrund der erzeugten nichtlinearen optischen Effekte kommt es dadurch zu einer geringeren Lichtstreuung innerhalb des Gewebes, was wesentlich größere Aufnahmedicken ermöglicht. (Denk et al., 1990; Diaspro et al., 2006). Allerdings ist diese Technologie noch relativ jung und nicht flächendeckend zugänglich. Daher ist aktuell die Steigerung der Effizienz der deutlich kostengünstigeren und weiter verbreiteten konfokalen Mikroskopie von großer Bedeutung, und wurde daher zu einem der grundlegenden Bausteine dieses Projektes.

In der jüngeren Vergangenheit erschienen einige Publikationen, die sich mit den angesprochenen Limitationen der dreidimensionalen Mikroskopie auseinandersetzten. Insbesondere wurden Versuche unternommen, die optischen Gewebeeigenschaften den technischen Möglichkeiten der Lasermikroskopie anzupassen. Eine besonders bemerkenswerte Strategie beruhte auf der Angleichung von Brechungsindizes innerhalb der Probe, um einen weitestgehend parallelen Strahlengang und dadurch deutlich präzisere Aufnahmen zu erzielen. Diese Vorgehensweise wurde schon Anfang des 20. Jahrhunderts von Werner Spalteholz als das sog. „Durchsichtigmachen“ beschrieben und basierte auf vorrangig chemischer Behandlung von aufzunehmenden Gewebeprobe. (Spalteholz, 1914) Bei eingeschränkter Anwendbarkeit geriet dieses Prinzip für längere Zeit in Vergessenheit und wurde erst in der jüngeren Vergangenheit wieder aufgegriffen und zunehmend untersucht. (Becker et al., 2008; Dodt et al., 2007; Staudt et al., 2007) Heutzutage werden die Methoden, die auf diesem Prinzip beruhen, zusammenfassend als Tissue Clearing bezeichnet und bieten einen sehr vielversprechenden Ansatz für die Verbesserung der Aufnahmetiefe und -qualität in der konfokalen Lasermikroskopie.

Deswegen wurde das Tissue Clearing zu einem der wichtigsten Bausteine für unser Protokoll.

Die Versuche der vergangenen Jahre erbrachten mehrere Arten von Tissue Clearing Methoden. Diese basieren auf verschiedenen Ansätzen, setzen z.B. in unterschiedlichem Ausmaß chemische und/oder physikalische Methoden ein und erfordern Reagenzien mit sehr unterschiedlichen, teilweise sogar gegensätzlichen chemischen Eigenschaften und Wirkprinzipien. Daher war es für unsere Protokollentwicklung zunächst notwendig, eine für unsere Zwecke geeignete Modalität von Tissue Clearing auszuwählen. Hierfür wurden verschiedene Ansätze und anschließend die bislang etablierten Methoden untereinander verglichen.

## **6.2 Auswahl der Tissue Clearing Methode**

Prinzipiell können die einzelnen Tissue Clearing Methoden anhand der chemischen Eigenschaften der Clearing-Reagenzien in zwei große Familien eingeteilt werden: wasserbasierte und Methoden auf Basis von organischen Lösungsmitteln. Einige der wichtigsten wasserbasierten Tissue Clearing Verfahren sind SeeDB, Clear, FRUIT und Scale, während die organischen Lösungsmittel in Protokollen wie BABB und der DISCO-Familie (iDISCO, 3DISCO, uDISCO) zum Einsatz kommen. All diese Protokolle dienen dazu, die Gewebeeigenschaften entsprechend zu alterieren und somit ein Clearing im engeren Sinne zu erreichen. Sie weisen jedoch, je nach Gewebeart und spezifischer Fragestellung, Limitationen auf. Dies führt dazu, dass keine dieser Methoden universell einsetzbar ist, und ihre jeweiligen Eigenschaften und Einschränkungen in Bezug auf das konkrete Projekt abgewogen werden müssen.

Die wichtigsten potenziellen Probleme für die Auswahl der Tissue Clearing Methode betreffen den natürlichen Wasser- und Fettgehalt des zu untersuchenden Gewebes. Dies wirkt sich in Abhängigkeit der jeweils eingesetzten Reagenzart, d.h. organisch oder wasserbasiert, direkt auf den Clearing-Effekt aus. Die publizierten experimentellen Ergebnisse zu Beginn unseres Projektes deuteten darauf hin, dass die wasserbasierten Methoden wie Scale und SeeDB besonders gut für embryonales Gewebe geeignet sind. (Azaripour et al., 2016; Ke et al., 2013; Ke et al., 2014; Kolesova et al., 2016) Die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln wie BABB oder DBE lieferte hingegen exzellente Clearing-Ergebnisse vor allem am neuronalen Gewebe sowie auch – wie bereits mehrere Studien belegten – an parenchymatösen Organen. (Becker et al., 2012; Erturk et al., 2012; Erturk et al., 2013; Erturk et al., 2014) Dies veranlasste uns, für die Darstellung der Leber den Fokus zunächst auf die Methoden auf Basis organischer Lösungsmittel zu legen. Zunächst mussten jedoch weitere potenzielle Probleme, wie einerseits die Auswirkung der eingesetzten Reagenzien auf die Größe der behandelten Gewebeprobe und andererseits der Erhalt der üblicherweise empfindlichen Immunfluoreszenz, berücksichtigt werden. Laut allen bisherigen Untersuchungen verursacht die Anwendung von organischen Lösungsmitteln durch die notwendige initiale Dehydratation in der Regel eine Schrumpfung und Formverzerrung des behandelten Gewebestückes (Becker et al., 2012; Erturk et al., 2012; Erturk et al., 2013; Erturk et al., 2014; Pan et al., 2016;



Renier et al., 2014; Richardson et al., 2015). Die wasserbasierten Methoden führen hingegen, insbesondere im Falle einer Hyperhydratation mit z.B. Urea-haltigen Lösungen (Scale, Clear<sup>T</sup>, FRUIT, CUBIC) zu einer deutlichen Gewebsexpansion (Chung et al., 2013; Hama et al., 2011; Richardson et al., 2015; Susaki et al., 2014; Yang et al., 2014). Bei einer Architekturstudie, wie in unserem Fall, sind diese Effekte aufgrund der Veränderung der Probenabmessungen naturgemäß potenziell problematisch. Da aber der Fokus unseres Projektes zunächst qualitativ auf räumlichen Verhältnissen, also relativen Werten, und nicht absoluten Messwerten innerhalb des Gewebes lag, wurde die Gewebeschrumpfung im Rahmen der BABB- und DBE-basierten Verfahren für unsere Zwecke als vertretbar gewertet. Die Immunfluoreszenz hingegen schien in verschiedenen Methoden unterschiedlich gut erhaltbar zu sein. Da für die Fluoreszenzemission in der Regel Wassermoleküle benötigt werden (Richardson et al., 2015), gelten die meisten wasserbasierten Methoden naturgemäß als schonend für die Immunfluoreszenz. Die Protokolle mit organischen Lösungsmitteln erfordern jedoch für das eigentliche Clearing eine weitgehende Dehydratation des Gewebes, was zunächst als Hindernis für die Fluoreszenzfärbung aufgefasst werden kann. Die vorausgegangene Forschung an diesen Methoden zeigte aber, dass dieses Problem umgangen werden kann. Da Fluorophore üblicherweise in wässriger Lösung in das Gewebe hineingebracht werden, wird dieser Schritt früh im Protokoll, d.h. noch vor der Dehydratation durchgeführt. Durch den anschließenden Wasserentzug wird die Fluoreszenzfähigkeit zwar zunächst stark reduziert, jedoch wird dieser Effekt durch das darauffolgende Auffüllen der Gewebematrix mit dem jeweiligen organischen Lösungsmittel wieder aufgehoben. Da es sich hierbei um relativ aggressive chemische Verbindungen handelt, kommt es bei diesen Methoden trotzdem zu einer progredienten Schwächung des fluoreszierenden Signals, und in vielen Fällen auch zu einem kompletten Signalverlust nach wenigen Tagen. (Erturk et al., 2012) Auch wenn dies eine Einschränkung hinsichtlich der möglichen Mikroskopiedauer darstellt, reicht die Zeitspanne in aller Regel selbst für ausführliche und wiederholte Untersuchungen aus, sodass sich der progrediente Signalverlust letztendlich fast ausschließlich auf die Probenarchivierung auswirkt.

Der Vollständigkeit halber soll auch noch auf die praktischen Aspekte verschiedener Clearing-Arten im Rahmen der täglichen Laborarbeit eingegangen werden. Während einige, v.a. wasserbasierte Methoden zwar preisgünstig in ihrer Durchführung sind, kann ihre Umsetzung insbesondere bei passiver Immersion in größeren Gewebeproben mehrere Tage in Anspruch nehmen. Zudem sind die üblichen, oft hochprozentigen Zuckerlösungen durch ihre hohe Viskosität umständlich im Gebrauch. Am anderen Ende des Spektrums stehen moderne, oft mit physikalischen Verfahren kombinierte Methoden, die zwar hocheffizient, aber mit hohen Kosten und technischem Aufwand verbunden sind. Besonders ungünstig ist dieses Verhältnis bei CLARITY und PACT, die teure Reagenzien und entsprechende Elektrophorese-Ausstattung erfordern, und ebenfalls mehrere Tage bis Wochen in Anspruch nehmen können. (Azaripour et al., 2016; Chung et al., 2013; Richardson et al., 2015; Yang et al., 2014) Die Methoden auf Basis organischer Lösungsmittel nehmen in diesem Vergleich eine Mittelstellung ein, da die teilweise problematischen Reagenzien größere Vorsicht und z.B. Arbeiten unter Luftabzug erfordern, jedoch insgesamt bei verhältnismäßig geringen Kosten robuste Clearing-

Ergebnisse mit erhaltener Immunfluoreszenz an parenchymatösen Organen versprechen. (Azaripour et al., 2016; Erturk et al., 2012; Erturk et al., 2013; Erturk et al., 2014; Pan et al., 2016)

**Tabelle 3: Vergleich verschiedener Tissue Clearing Methoden. Modifiziert nach (Richardson et al., 2015; Yang et al., 2014)**

Methode	Reagenzien	Zeitdauer*	Morphologieveränderung	Fluoreszenz-Emission	Validiert an (Gewebeart)	Besonderheiten
BABB <sup>2,3</sup>	Benzylalkohol/ Benzylbenzotriazol	Tage	Schrumpfung	Sehr kurz (1/2 Tag) <sup>4,5</sup>	Nager: Gehirn, Rückenmark, periphere Gewebe	aggressive, toxische Reagenzien <sup>5</sup>
3DISCO <sup>6,7</sup>	Dichlormethan/ Dibenzyläther	Stunden bis Tage	Schrumpfung	Kurz (1-2 Tage)	Periphere und zentrale Organe, Embryo, Tumore	schneller Fluoreszenzverlust, nur kurzfristige Aufnahmen möglich
iDISCO <sup>8</sup>	Dichlormethan/ Dibenzyläther	Stunden bis Tage	Schrumpfung	Kurz (2-4 Tage)	Nager: Gehirn, Organe und Embryo	kompletter Fluoreszenzverlust durch Methanol mit nachträglicher Immunfluoreszenz, Alternativ: DMSO
SeeDB <sup>9</sup>	Fructose/ Thioglycerol	Tage	Keine	Ja	Junges Nagerhirngewebe	Inkomplettes Clearing
Clear <sup>7,10</sup>	Formamid	Stunden bis Tage	Keine	Nur bei Clear <sup>12</sup>	Nagerhirn und-embryo	Antikörperpenetration bis max. 120 µm, teilw. Fluoreszenzverlust <sup>9</sup>
TDE <sup>11</sup>	2,2'-Thiodiethanol	Tage bis Wochen	Keine	Ja	Nagerhirn	
FRUIT <sup>12</sup>	Fructose/ Thioglycerol/ Urea	Tage	Leichte Ausdehnung	Ja	Nagerhirn	Weiterentwicklung von SeeDB
Scale (A2, U2) <sup>13</sup>	Urea/ Glycerol	Wochen bis Monate (am langsamsten)	teilweise Ausdehnung (A2)	Ja	Nager: Gehirn, Embryo	Sehr langsam, Gewebsverformung, teilw. Fluoreszenzverlust <sup>9</sup>
CUBIC <sup>14,15</sup>	Urea/ Saccharose	Tage	Ausdehnung	Ja	Nager: Gehirn, Organe <sup>15</sup> , Affengehirn	Eigene Bildbearbeitungs-Software
CLARITY <sup>16,17</sup>	FocusClear™/ Glycerol	Tage	Leichte Ausdehnung	Ja	Nager-, Affen- und Menschenhirn, Rückenmark;	Hydrogel, besondere Ausstattung und Reagenzien notwendig, teuer
PACT/PARS <sup>18</sup>	Histodenz™	Tage bis Wochen	Keine bis leichte Ausdehnung	Ja	Große Nagerorgane, ganzer Nagerkörper	Weiterentwicklung von CLARITY, besondere Reagenzien notwendig

Unter Berücksichtigung aller genannten Faktoren sollte als eines der Hauptziele dieses Projektes eine Methode etabliert werden, die bei vertretbaren Kosten, zeitlichem und technischem Aufwand ein bestmögliches Clearing-Ergebnis für die konfokale Mikroskopie der Leber liefern soll. Als Basis wurde folgerichtig das Prinzip mit organischen Lösungsmitteln gewählt. Die Leber ist ein zell dichtes Organ und beinhaltet daher viele Zellmembranen, sodass die passiven wasserbasierten Methoden schlichtweg einen zu schwachen Clearing-Effekt ergaben. Exemplarisch wurde in unserem Labor eine Fructose-basierte Methode (mit einer originalgetreuen sowie einer modifizierten Version

des SeeDB-Protokolls) getestet. Dies blieb weitgehend erfolglos, sodass auf eine Präsentation der Ergebnisse an dieser Stelle verzichtet wurde.

Unsere Methode orientierte sich prinzipiell an dem DBE-basierten Protokoll 3DISCO (Erturk et al., 2012). Seine Weiterentwicklung iDISCO (Renier et al., 2014) widmete sich einigen limitierenden Faktoren des ursprünglichen 3DISCO-Protokolls, zeigte sich dennoch für unsere Fragestellung als wenig geeignet, sodass wir uns für eine eigene Adaptation und Weiterentwicklung des ursprünglichen Protokolls entschieden. In iDISCO wurden nämlich zwei Vorgehensweisen vorgeschlagen; einerseits soll die Dehydrierung mit dem aggressiven Methanol durchgeführt werden und anschließend die dadurch zerstörte endogene Fluoreszenz mit Fluorophor-spezifischen Antikörpern wiederhergestellt werden. Das ist mit zusätzlichen Kosten und Färbeschritten verbunden und zeigte in unserem Fall eingeschränkte Praktikabilität. Alternativ soll der Einsatz von DMSO (Dimethyl-Sulfoxid) statt Methanol die Fluoreszenz erhalten. Dies erbrachte in unserem Labor allerdings keine zufriedenstellenden Ergebnisse, was uns dazu bewog, ein eigenes Protokoll zu etablieren. Da 3DISCO ursprünglich vorrangig für die Mikroskopie von ganzen Organen, bzw. großen Gewebsvolumina entwickelt wurde, nimmt das Clearing in seiner ursprünglichen Form mehrere Stunden bis Tage in Anspruch, wodurch das Gewebe vergleichsweise lange aggressiven Reagenzien ausgesetzt bleibt (Erturk et al., 2012; Erturk et al., 2013; Erturk et al., 2014). Da dies potenziell die Fluoreszenz beeinträchtigen kann, wurde das Basis-Protokoll im Laufe dieses Projekts den viel dünneren Gefrierschnitten angepasst. Die Anzahl der Entwässerungsschritte wurde verringert und ihre jeweilige Dauer verkürzt. Zudem wurde die dem Clearing vorgeschaltete Behandlung mit Dichlormethan (DCM) weggelassen, nachdem sich dadurch an den dünneren Schnitten keine signifikante Besserung der mikroskopischen Aufnahmen erkennen ließ. Um dem übermäßigen Ausbleichen der Fluoreszenz sowie dem Schrumpfen und der Formveränderung der Gewebsschnitte entgegenzuwirken, wurde die Dauer der Clearing-Schritte mit dem Lösungsmittel DBE stark verkürzt. Neben der erwartungsgemäß kräftigen, robusten Fluoreszenz des endogenen Farbstoffes tdTomato, zeigte auch die Immunmarkierung mit ToPro3, DAPI und AlexaFluor-Antikörpern nach der Adaptation der Behandlungsdauer sehr gute Ergebnisse. Die Fluoreszenzsignale blieben teilweise bis zu zwei Wochen lang und auch nach erfolgten Laseraufnahmen weiterhin detektierbar.

Somit entstand eine sehr einfache und schnelle Version dieser Methode. Unser adaptiertes Clearing-Protokoll ist gewebschonend, nimmt statt mehreren Stunden oder gar Tagen insgesamt kaum mehr als eine halbe Stunde in Anspruch und ermöglicht sehr gute Immunfluoreszenz-Aufnahmen von bis zu 150 µm dicken Kryoschnitten der Leber. Da das Gewebe nach unserem Basis-Protokoll vor dem Einfrieren nicht anderweitig behandelt werden muss, können beliebige, standardmäßig kryokonservierte Proben mit dieser Methode untersucht werden. In unseren Versuchen ließen sich sogar mehrere Jahre alte Leberproben gut färben und konfokalmikroskopisch untersuchen. Bei lediglich etwas vorsichtiger Handhabung des alten und somit poröseren Gewebes, zeigten sich nur geringfügige Qualitätsunterschiede im Vergleich zu den kürzlich entnommenen Proben. Dies stellt einen großen Vorteil unserer Methode dar, da sich dadurch die Möglichkeit ergab, dreidimensionale Untersuchungen auch an - in vielen Laboratorien sicherlich reichlich vorhandenem - bereits asserviertem Gewebe durchzuführen, was schließlich äußerst ressourcen- und zeitsparend ist. Letztlich soll noch erwähnt werden, dass unser

Protokoll weder eine außerordentliche technische Ausstattung noch besonders teure Reagenzien erfordert. Die benutzten Geräte und Utensilien gehören bis auf wenige Ausnahmen zu Standardausrüstung eines biologischen Labors und die speziellen, protokollspezifischen Reagenzien sind vergleichsweise günstig über die gängigen Anbieter erhältlich. Dies und die Kombination mit der inzwischen weit verbreiteten konfokalen Mikroskopie macht es also möglich, bei relativ geringem zeitlichem Aufwand und überschaubaren Kosten in standardmäßig ausgestatteten Laboratorien herausragende mikroskopisch-bildgebende Ergebnisse zu erzielen.

An dieser Stelle sei noch erwähnt, dass in der Zwischenzeit die Forschergruppe um den Autor von 3DISCO ein weiteres Protokoll namens uDISCO (Pan et al., 2016) vorgestellt hat. Der Schwerpunkt dieser Weiterentwicklung lag einerseits im Einsatz von Reagenzien, die für die Fluoreszenz und das Gewebe im Allgemeinen schonender seien, und andererseits in einer gezielten, viel stärkeren Verkleinerung der Proben. Letzteres war zwar für die o.g. Publikation von großer Bedeutung, da sie die Darstellung des gesamten Nervensystems der Maus anstrebte, spielte aber für unsere Fragestellung zu der Leber als verhältnismäßig kleinem parenchymatösen Organ keine Rolle. Lediglich die neuartigen, mildereren Reagenzien kamen als potenzielle Optimierung in Frage. Da aber der Gewebe- und Fluoreszenzschaden mit unserem Protokoll bereits durch stark verkürzte Behandlungszeiten und Minimierung der Behandlungsschritte stark beschränkt wurde, sahen wir an dieser Stelle letztlich keine Notwendigkeit für weitere Protokollalterationen.

### **6.3 Anwendung der Methode – Herausforderungen und Lösungen**

Um die entscheidenden Fragen unseres Projektes zu adressieren, wurden für die konfokale Mikroskopie einerseits die endogene tdTomato-Fluoreszenz und andererseits die von extern eingebrachte, spezifische Immunfluoreszenz angewendet. Während die Aufnahmetiefe des tdTomato-Signals durch unser Tissue Clearing Protokoll alleine schon von ca. 30  $\mu\text{m}$  auf ca. 100  $\mu\text{m}$  erhöht werden konnte, zeigten sich alle bislang standardmäßig verwendeten Protokolle für die Immunfluoreszenzfärbung an diesen Schnitten als noch unzureichend dar. Selbst bei maximal verlängerten Inkubationszeiten ließen sich damit keine Signalaufnahmen über die gesamte Probendicke erzielen. Diesen Effekt führten wir auf die eingeschränkte Penetrationsfähigkeit der Antikörper im dichten Gewebe zurück und modifizierten den Vorgang der Immunfluoreszenzfärbung. Um die Gewebedurchlässigkeit maximal zu erhöhen, wurden einerseits deutlich prolongierte Inkubationszeiten und andererseits weitere chemisch-physikalische Behandlungsschritte in das Protokoll aufgenommen. Üblicherweise wird für die Immunfluoreszenz die Gewebepерmeabilisierung durch die Mobilisation von Fettmolekülen, in erster Linie aus den Zellmembranen, mittels Detergenzien wie SDS, Tween-20 oder Triton X-100 erzielt. (Erturk et al., 2014; Hammad et al., 2014) Für diese Arbeit wurde zu diesem Zweck Triton X-100 eingesetzt, und zwar in einer relativ hohen Konzentration von 1%. In einer eigenständigen Versuchsreihe zeigte sich dieser Wert als optimal für unsere Anwendung, weil das Gewebe deutlich aufgelockert werden konnte, ohne jedoch die Fluorophore übermäßig zu strapazieren. Um die Permeabilisierung möglichst schonend und gleichmäßig durchzuführen, wurde die Triton-X-haltige Lösung nicht nur initial in einem eigenständigen Behandlungsschritt, sondern auch in allen anschließenden Färbeschritten

als Lösungsmittel für die Antikörper verwendet. Zudem wurde zur Erhöhung der Markierungseffizienz ein weiterer Schritt dem eigentlichen Färbeprotokoll vorgeschaltet. Noch vor der Permeabilisierung wurden die Schnitte mit warmer Zitronensäure behandelt. Dies soll einerseits durch die Wärme und andererseits durch die leicht denaturierende Wirkung der Säure die Epitope, d.h. die eigentlichen Bindungsstellen für Antikörper, demaskieren und somit für diese zugänglicher machen. (Hammad et al., 2014) In unseren Versuchen zeigte sich dies als eine sehr sinnvolle und effektive Ergänzung des Protokolls, sofern – um eine zu aggressive Wirkung zu vermeiden - die Anzahl der Schritte genau eingehalten und die Zitronensäure keinesfalls kochend heiß verwendet wurde. Diese beiden Erweiterungen, also die Permeabilisierung mittels Detergenzien und die Demaskierung der Epitope mit Hitze und Zitronensäure, trugen in großem Maße dazu bei, dass nun eine Immunfluoreszenzmarkierung über viel längere Gewebsstrecken erfolgen konnte.

Um diesen Effekt in drei Dimensionen der dicken Gewebeprobe zu maximieren, wurde eine weitere essenzielle Modifikation des Färbevorgangs vorgenommen. Klassischerweise werden die histologischen Färbungen, inkl. der Immunfluoreszenz, nach Platzierung des Gewebeschnittes auf einen Objektträger durchgeführt. Daher befindet sich hier die untere, dem Objektträger zugewandte Gewebeoberfläche, naturgemäß am Ende der Diffusionsstrecke, was bei einer Schnittdicke von 150 oder 200 µm unter Umständen in einer viel zu langen Diffusionszeit oder sogar insuffizienten bzw. fehlenden Anfärbung der tiefen Zellschichten resultieren kann. Daher wurden in unserem Protokoll sämtliche Färbe- und Clearing-Schritte in der sogenannten „Free Floating“-Technik durchgeführt. Wie der Name (z. Dt. freischwebend) schon verrät, wurde die Gewebeprobe in einen Behälter mit größerer Menge Behandlungslösung gelegt, sodass sie in der Flüssigkeit frei beweglich war und von allen Seiten von Reagenzien erreicht werden konnte. Um den Effekt zu maximieren wurde der Behälter mit der Probe über die gesamte Inkubationsdauer maschinell geschüttelt bzw. geschwenkt.

All diese Protokollmodifikationen resultierten schließlich in einem nahezu durchgehend gleich starken Fluoreszenzsignal in allen Gewebeschichten, was bereits in den Rohaufnahmen der anschließenden konfokalen Mikroskopie festzustellen war.

#### **6.4 Immunfluoreszenzfärbung der Gallenkanalikuli**

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde in diesem Projekt zur dreidimensionalen Darstellung vom Netzwerk der Gallenkanalikuli eingesetzt. Genauso wie die duktile Reaktion, wurde dieses Kompartiment bislang hauptsächlich in der zweidimensionalen Histologie untersucht, sodass unsere Kenntnisse über seine tatsächliche Binnenorganisation sehr begrenzt sind. Da die Kanalikuli im Gegensatz zu den Gallengängen keine epitheliale Auskleidung besitzen, konnten für die Immunfluoreszenz entsprechend keine biliären Marker benutzt werden. Strukturell betrachtet sind die Kanalikuli (lat. Kanälchen) keine Gangstrukturen im engeren Sinne, sondern stellen lediglich spaltförmige Hohlräume zwischen den apikalen Polen der benachbarten, parallel verlaufenden Leberzellbälkchen dar. Daher mussten für die Immunmarkierung Strukturen der Hepatozyten adressiert werden, welche idealerweise nur auf den Seiten

der Kanalikuli anzutreffen wären. Hierzu stellten sich prinzipiell zwei Strukturen der Hepatozytenmembran als geeignete Zielantigene heraus, nämlich das CD13 und das DPPIV. Das Protein CD13, auch Aminopeptidase N genannt, ist eine membranständige Metalloprotease, welche in der Leber, aber auch Dünndarm, Endometrium, Niere, Milz, Gehirn und myeloischen Zellen exprimiert wird. (Lian et al., 1999; Rocken et al., 2005). Die Möglichkeit der hochspezifischen Markierung von Gallenkanalikuli ergibt sich dabei aus der Tatsache, dass CD13 in den Hepatozyten ausschließlich in der apikalen Membran exprimiert wird, wodurch ausschließlich die kanalikulären Lumina flankiert werden. (Rocken et al., 2004) Das Zielantigen Dipeptylpeptidase-IV (DPPIV) hingegen ist ein membranständiges Protein mit enzymatischer Aktivität, welches im Gegensatz zu CD13 nicht nur apikal und somit kanalikulär, sondern auch in geringerem Maße von den Epithelien der Sinusoide exprimiert wird (Godoy et al., 2013; Hammad et al., 2014; Hoehme et al., 2010; Tarantola et al., 2012). Dies resultiert initial zwar in etwas unschärferen Aufnahmen aufgrund der Signalüberlappungen und naturgemäß geringerer Spezifität, lässt sich jedoch durch die anschließende Bildbearbeitung gut beheben. Die apikale Hepatozytenmembran besitzt nämlich eine höhere Expressionsdichte von DPPIV als das Endothel der Sinusoide, sodass hier unterschiedlich starke Signale aufgenommen werden. Mittels nachträglicher Anpassung von Schwellen war es somit möglich, das Fluoreszenzsignal der Kanalikuli sauber hervorzuheben.

In einer initialen Versuchsreihe zeigte sich die Markierung mit dem Anti-CD13-Antikörper aber als sehr robust und aufgrund der hohen Spezifität einfacher in der Umsetzung als Anti-DPPIV, sodass sie im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt wurde. Es wurden jedoch auch ergänzend immer wieder Aufnahmen mit dem Anti-DPPIV-Antikörper angefertigt. Der Vergleich beider Signale erwies sich als besonders nützlich in den Fällen, wo sich die CD13-Markierung als inkonstant und/oder schwach darstellte. Diese Aufnahmen dienten jedoch hauptsächlich als interne Ergebniskontrollen und wurden in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt.

## **6.5 Generierung und Bearbeitung von Bilddateien**

Da unser Protokoll für die Optimierung bildgebender Ergebnisse mittels konfokaler Lasermikroskopie entwickelt wurde, stand diese Technologie im Mittelpunkt unserer Arbeit. Unserem Labor standen zum Zeitpunkt der Protokolletablierung zwei unterschiedliche Modelle von Lasermikroskopen zur Verfügung, nämlich das Olympus FV-10i und das Leica TCS SP8 X. Ursprünglich wurde das Färbe- und Clearing-Protokoll an Aufnahmen mit dem Olympus-Mikroskop entwickelt und adaptiert. Im Laufe des Projektes wurden auch probeweise Aufnahmen an dem neueren und fortschrittlicheren Modell von Leica angefertigt. Dieses lieferte aufgrund seiner technischen Attribute zwar präzisere dreidimensionale Aufnahmen, aber im Vergleich mit den initialen Aufnahmen am Olympus-Gerät zeigten sich diese Effekte nur eingeschränkt relevant für die zentralen Themen dieser Arbeit. Unter Hinzunahme des hier etablierten Protokolls, d.h. der angepassten Immunfärbung und des modifizierten Tissue Clearing Verfahrens, wurden also auch mit einem gewöhnlichen Konfokalmikroskop mit Basisausstattung sehr hochwertige und für Architekturuntersuchungen bestens geeignete dreidimensionale

Aufnahmen generiert. Dies unterstreicht nicht nur die hohe Effizienz, sondern auch den universellen Charakter unserer Methode. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden in dieser Dissertation durchgehend Aufnahmen von Olympus FV-10i demonstriert.

Im Anschluss an die Mikroskopie wurden die rohen Fluoreszenzaufnahmen bereits durch die geräteeigene Software als sog. Z-Stack gespeichert, d.h. die zweidimensionalen Schichtaufnahmen wurden zu einem virtuellen Stapel über die vertikale (Z-) Achse zusammengefügt. Zur Optimierung der Ergebnisse und isolierter Demonstration relevanter Strukturen musste jedoch eine anschließende Software-unterstützte Bildbearbeitung erfolgen. In einigen Arbeiten in diesem Forschungsfeld, welche sich ebenfalls mit Methodenentwicklung für dreidimensionale Mikroskopie auseinandersetzten, wurden eigene Software-Lösungen entwickelt und eingesetzt. (Hoehme et al., 2010; Morales-Navarrete et al., 2015) Ein solcher Ansatz resultierte zwar in einer genau auf die jeweiligen Bedürfnisse maßgeschneiderten Lösung, erforderte aber auch einen erheblichen Mehraufwand sowie Mitarbeitende und/oder Kooperationspartner mit entsprechender technischer und bioinformatischer Expertise. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns für die kommerziell erwerbbar Software IMARIS der Firma Bitplane entschieden. Diese, auf wissenschaftliche dreidimensionale Bildanalyse spezialisierte Software zeigte sich nicht nur bestens geeignet für unsere Bedürfnisse, sondern auch intuitiv in der Anwendung, sodass sich die Bildbearbeitung einfach und effizient gestaltete. Zudem entsprach sie nicht nur allen Anforderungen dieses Projektes, sondern wies zahlreiche zusätzliche Funktionen auf, welche in Hinblick auf andere laufende sowie geplante weiterführende Forschungsarbeiten in unserem Labor sehr vielversprechend erschienen. Die initial hohen Kosten für den Erwerb einer solchen Software, welche oft als großer Nachteil einer kommerziellen Lösung hervorgehoben werden, erachteten wir letztlich als vertretbar, da eine solche Software nicht an ein konkretes Protokoll gekoppelt und somit auch künftig vielfältig einsetzbar ist.

## **6.6 Die Architekturstudie: Neues über die duktale Reaktion und die Kanalikuli**

In einem nächsten Schritt wurde das etablierte Immunhistochemie- und Tissue Clearing Protokoll gezielt für mikromorphologische Leberstudien eingesetzt. Unsere Methode erlaubte nämlich sehr umfangreiches, systematisches Abbilden und Analyse von Lebergewebe sowohl in nativem Zustand als auch nach chemisch-nutritiver Schädigung und anschließender Regeneration. Dadurch gelangen uns ganz neue, vorläufige Einblicke in die dreidimensionale Architektur des nativen biliären Gangsystems, sein Verhalten im Laufe der Schädigung und Regeneration, d.h. die duktale Reaktion im engeren Sinne, sowie auch das Netzwerk der Gallenkanalikuli als solches und in Relation zu den Gallengängen und ihren Proliferaten.



### 6.6.1 Duktale Reaktion

Die dreidimensionalen Rekonstruktionen des Tomato-positiven biliären Kompartimentes in der unbehandelten Leber zeigten im Rahmen unserer Studie zum einen die räumliche Organisation der nativen Gallenwege in Form eines röhrenförmigen, in sich verzweigten Plexus. Darin ließ sich in der Regel ein prominenter, parallel zum Portalvenenast verlaufender großer Gallengang sowie in diesem mündend und den Portalvenenast ringförmig umschließend zahlreiche kurze, fokal anastomosierte Gallengangäste darstellen. Die zahlreichen, in zweidimensionalen Abbildungen als kleinen periportal und teils isoliert imponierenden Gallengänge zeigten dabei in der dreidimensionalen Darstellung eine geflechtartige Anordnung um den zugehörigen Pfortaderast herum mit Ausbildung eines kontinuierlichen Plexus. Vereinzelt ließen sich auch sehr zarte Gänge nachweisen, die nahezu senkrecht dem Plexus entsprangen und nach kurzem Verlauf eindrucksmäßig im Parenchym endeten, welche als Korrelat des traditionsreichen Konzeptes der terminalen Duktuli zu verstehen wären. Diese machten jedoch einen sehr geringen Anteil der identifizierbaren Gänge. Diese Beobachtungen alleine sind in Bezug auf das bisherige Verständnis der Mikroanatomie der intrahepatischen Gallenwege ganz besonders hervorzuheben, da hiermit das traditionelle Modell der zahlreichen einzelnen, dem Hauptgallengang perpendikulär entspringenden und sich zum Parenchym hin verzweigenden kurzen Gänge prinzipiell widerlegt wird. Diese initialen Erkenntnisse unserer Studie unterstützen einen Paradigmenwechsel hinsichtlich der Mikromorphologie der terminalen intrahepatischen Gallengänge der Leber unter physiologischen Bedingungen.

Die Fütterungsversuche mit CDE führten als Antwort auf den chemischen Schädigungsreiz zu fortschreitenden Umbauprozessen der Leberarchitektur. Mittels der endogenen roten Fluoreszenz konnten die Veränderungen des biliären Gangsystems hervorgehoben und zu den gewählten Zeitpunkten konfokalmikroskopisch untersucht werden. Dadurch ließ sich repräsentativ für dieses Modell der zeitliche Verlauf der Schädigungs- und Remodellierungsprozesse in drei Dimensionen aufzeigen. Da die CDE-Fütterungsversuche in diesem Projekt primär zur Demonstration der Anwendbarkeit der Methode und ihres Potenzials für zukünftige Fragen hatten, wurden die induzierten Veränderungen ausschließlich exemplarisch gezeigt und deskriptiv bewertet.

Mit fortschreitender CDE-Schädigung fand sich eine sehr rasche Ausbildung zahlreicher feiner Gallengangäste mit zunehmender Ausbreitung vom Portalfeld weg und in das Parenchym hinein. Hierbei ließen sich auch vermehrt, analog dem klassischen zweidimensionalen Verständnis der CDE-bedingten duktaalen Reaktion, sehr zarte duktaale Proliferate mit tiefem Eindringen in das Parenchym des Zentralvenenläppchens aufzeigen. In konventionell-histologischen Darstellungen machten diese Proliferate häufig den Eindruck isoliert liegender Zellen abseits der eigentlichen duktaalen Reaktion, doch in unseren Untersuchungen gelang zum ersten Mal die Darstellung ihrer räumlichen Beziehung zum Gallengangssystem. Selbst die kleinsten, weit vom Gallengangplexus entfernten und scheinbar diskontinuierlichen Proliferate zeigten sich hierbei als distale Abschnitte des sehr komplex verzweigten, kontinuierlichen und vom Plexus

divergierenden duktalem Reaktion vom CDE-Typ. Die maximale Ausprägung dieses Umbaus in unserer Versuchsreihe ließ sich nach einer dreiwöchigen CDE-Fütterung beobachten, wo sich eine weitestgehende Überwucherung eines jeden abzubildenden konfokalen Gesichtsfeldes fand. Zudem zeigte sich ein beginnendes Eindringen auch in die benachbarten Portalfelder, sodass diese in Übersichtsdarstellungen teilweise nur noch mit Mühen abgegrenzt werden konnten. Diese fulminante Expansion der duktalem Reaktion verhielt sich prinzipiell proportional zu dem beobachteten Parenchymschaden während der Fütterungsphase. Das CDE-Futter verursacht in dieser Phase der Schädigung einen rasch progredienten und fulminanten diffusen Untergang von Hepatozyten, welcher sich auch makroskopisch in einer Erweichung des Parenchyms äußert. Die parallel dazu ablaufende Expansion der biliären Proliferate widerspiegelt die zeitliche Ausdehnung des hepatozellulären Schadens, sodass spekuliert werden kann, dass es sich dabei um einen kompensatorischen Mechanismus zur Erhaltung der Leberfunktion handelt. Diese Annahme wird weiter unterstützt durch die Tatsache, dass die beiden Prozesse nach dem Fütterungsstopp gegensätzlich ablaufen, d.h. das Leberparenchym regeneriert allmählich und die duktalem Reaktion bildet sich nahezu gleichzeitig zurück. Aufgrund der natürlichen Funktion der Gallengänge liegt die Vermutung nahe, dass die biologische Rolle der duktalem Reaktion folglich in dem Erhalt der Gallendrainage nach einer schweren Parenchymschädigung besteht.

#### 6.6.2 Netzwerk der Gallenkanalikuli

Die morphologischen Grundlagen der Gallendrainage konnten nur unter Einbeziehung des Netzwerkes der Gallenkanalikuli in Gänze dargelegt werden. Bislang wurde dieses kräftig verzweigte Kanälchensystem fast ausschließlich zweidimensional untersucht, da zusammenhängende Aufnahmen von größeren Abschnitten des kanalikulären Netzwerkes schließlich mangels geeigneter Methoden lange nicht möglich waren. In diesem Projekt wurden die Gallenkanalikuli mittels Immunfluoreszenz markiert und analog zur duktalem Reaktion dreidimensional aufgenommen. Nach der digitalen Signalrekonstruktion wurde das kanalikuläre Netzwerk zunächst als solches in unbehandelten und geschädigten Lebern, und anschließend in Beziehung zu dem biliären Gangsystem untersucht. Die dünnen hepatozellulären Kanälchen stellten sich in Kontrollaufnahmen als ein einheitliches, dreidimensional vernetztes Gebilde mit regelmäßigen Verzweigungen dar. Die hexagonalen Umrandungen der Hepatozyten ließen sich, entsprechend dem traditionellen Modell, auch über die dritte räumliche Dimension eindeutig darstellen. Die Konnektivitätsanalysen ließen dabei in der unbehandelten Leber eindrücklich erkennen, dass es sich um ein durchgehendes, zusammenhängendes Netzwerk handelt. Bemerkenswerterweise ließen sich zudem in der Grenzregion zwischen Portalfeldern und dem Leberparenchym immer wieder punktuelle Signalüberlappungen der Immunfluoreszenz der Gallenkanalikuli und der endogenen tdTomato-Fluoreszenz des Gallengangplexus beobachten. Diese waren den direkten Kontaktstellen der beiden Kompartimente zuzuordnen, was bedeutete, dass mit unserer Methode inklusive der dreidimensionalen Rekonstruktion mit einer beeindruckenden Präzision die Mündungen der Kanalikuli in den Gallengangplexus

dargestellt wurden. Auch wenn der anatomische Zusammenhang dieser beiden Kompartimente bereits anhand zweidimensionaler Mikroskopie als gesichert galt, ließen sich die direkten Verbindungen der beiden Drainagekomponenten konventionell-histologisch nicht eindeutig aufzeigen. Daher ermöglichen unsere Darstellungen ganz neuartige Einblicke in die Verbindungen der beiden Kompartimente im dreidimensionalen Kontext. Ferner bieten sie, wie sich in weiterführenden Versuchen herausstellte, eine vielversprechende Grundlage für Analysen von strukturell-anatomischen Veränderungen und Intaktheit des gesamten Gallendrainagesystems im Kontext der Leberschädigung.

Die toxische Wirkung der eingesetzten Schadstoffe war erwartungsgemäß auch im kanalikulären Netzwerk deutlich zu erkennen. Das CDE-Modell, welches durch einen fulminanten Hepatozytenuntergang gekennzeichnet ist, resultierte entsprechend in einer rasch progredienten Zerstörung der kanalikulären Architektur. Die feinen Kanälchen imponierten daher bereits nach einer Woche als rarefiziert und es ließen sich immer seltener intakte hexagonale Konturen beobachten, was den Verlust von Hepatozyten und folglich die Disruption im kanalikulären Netzwerk widerspiegelte. Nach Ablauf von drei Wochen, parallel zu der kräftig expandierenden duktalem Reaktion, stellte sich das kanalikuläre Kompartiment in Form von sehr kurzen netzartigen Fragmenten dar, welche zwischen den zahlreichen Verzweigungen der biliären Proliferate zu liegen kamen. Die anschließenden Konnektivitätsanalysen zeigten, dass die einzelnen Fragmente zwar in sich kontinuierlich sind, jedoch nicht miteinander kommunizierten und bestätigten somit den konfokalmikroskopischen Eindruck der weitgehenden Zerstörung der Konnektivität des kanalikulären Netzwerkes in diesem Schädigungsstadium. Gleichzeitig ließen sich aber auch, wie oben beschrieben, Signalüberlappungen und somit Verbindungen dieser kurzen verbliebenen kanalikulären Fragmente zu den jeweils benachbarten Ästen der duktalem Reaktion aufzeigen. Dies stellt eine der Schlüsselbeobachtungen in diesem Projekt dar, da hiermit bildhaft demonstriert wurde, dass die duktalem Reaktion Verbindungen zu den verbleibenden Kanalikuli knüpft. Dieses Phänomen kann schließlich als weiteres Argument für unsere Hypothese über die duktalem Reaktion als Mechanismus zur Wiederherstellung bzw. Erhaltung der Gallendrainage in geschädigter Leber dienen. Diese wird zudem auch dadurch untermauert, dass sich diese Prozesse nach dem Wegfall der CDE-Schädigung im Sinne einer Regenerationsphase sukzessive zurückbildeten. Parallel zu dem Rückgang der duktalem Reaktion wurde auch die Integrität des kanalikulären Netzwerkes zunehmend wiederhergestellt, was in den Rekonstruktionen der Konnektivität besonders deutlich zur Darstellung kam. Die jeweils reziproke Entwicklung dieser beiden Kompartimente in direkter Abhängigkeit von der hepatozellulären Schädigung sowie der Beleg ihrer direkten Verbindungen in verschiedenen Stadien dieser Prozesse stellen, unserer Einschätzung nach, die bislang beste Grundlage für die Erklärung der biologischen Rolle der duktalem Reaktion im Kontext der Gallendrainage dar.

Zusammenfassend ermöglichte unsere neuartige mikroskopisch-bildgebende Methode aufgrund ihrer Dreidimensionalität und Präzision in hohen Vergrößerungen ganz neue Einblicke in die Mikromorphologie des gesamten galledrainierenden Systems. Die

detaillierten, komparativen Darstellungen des biliären und des kanalikulären Kompartimentes zeigten nicht nur ihre grundlegende Architektur, sondern auch die Dynamik ihrer Anpassungsprozesse in drei räumlichen Dimensionen im Laufe der Schädigung und Regeneration innerhalb der klassischen, bislang nur konventionell-histologisch erforschten Modelle. Kumulativ sprechen die erzeugten Abbildungen und anschließende Analysen der gezeigten Remodellierungsprozesse stark für die von unserer Arbeitsgruppe postulierte Hypothese, nämlich dass die Erhaltung der Gallendrainage im Rahmen einer fulminanten und fortschreitenden chemisch-nutritiven Leberparenchymschädigung eine potenziell wichtige biologische Funktion der duktaalen Reaktion darstellt. Somit wurden durch dieses Projekt die Grundlagen für weiterführende, funktionelle Untersuchungen dieses Sachverhaltes in einem ganz neuen Licht gelegt.

## **6.7 Limitationen und praktische Aspekte der Methode**

Neben allen Vorzügen der etablierten Methodik soll letztlich auch auf ihre optimierungsbedürftigen Aspekte näher eingegangen werden.

Obwohl das entwickelte Protokoll eine hohe Praktikabilität aufweist, lassen sich einzelne Einschränkungen bei seiner Anwendung identifizieren. Wie bereits bei der Erwägung verschiedener Tissue Clearing Modalitäten erwähnt, kommt es im Rahmen unseres DBE-basierten Clearings zu einer Schrumpfung sowie Konsistenzveränderung der Gewebsschnitte. Auch wenn diese Effekte mit unserem Protokoll durch die kurzen Behandlungszeiten vergleichsweise gering ausfallen, sind sie hinsichtlich der angestrebten Architekturuntersuchungen potenziell problematisch und müssen berücksichtigt werden. In unseren Versuchen ließ sich beobachten, dass die Schnitte nicht nur erwartungsgemäß kleiner geworden sind, sondern sich auch wellenförmig verbogen. Dies impliziert, dass die Größenveränderung durch die Dehydratation von Gewebeschnitten – im Gegensatz zu annähernd kubischen oder sphärischen Gewebeproben bzw. ganzen Organen – möglicherweise nicht proportional in alle Richtungen verläuft. Prinzipiell kann dieses Phänomen zu Verzerrungen der räumlichen Proportionen innerhalb des Gewebes führen. Da diese Arbeit jedoch der Untersuchung einzelner Portalfelder, also sehr kleiner Areale der behandelten Probe, gewidmet war, wurden diese Effekte hier als nicht gravierend eingestuft. Die aufgenommenen Portalfelder maßen durchschnittlich zwischen 50 und 100  $\mu\text{m}$  im Durchmesser, was ungefähr einem Hundertstel der jeweiligen Gewebeprobe entsprach (ca. 5 bis 10 mm). Ausgehend davon, dass die postulierte räumliche Verzerrung in einem solchen, annähernd punktförmigen Portalfeld minimal ausfällt, betrachteten wir diese Aufnahmen als ausreichend realitätsgetreu und geeignet für unsere Analysen. Dennoch soll betont werden, dass diese räumlichen Effekte gegebenenfalls bei Untersuchungen größerer Architektureinheiten nicht zu vernachlässigen wären. In solchen Fällen wäre aus unserer Sicht möglicherweise von Untersuchungen an Gewebeschnitten abzuraten, und stattdessen Studien an großen dreidimensionalen Proben oder gar ganzen Organen zu bevorzugen. Wie bereits in zahlreichen Publikationen berichtet, (Becker et al., 2008; Chung et al., 2013; Dodt et al., 2007; Erturk et al., 2012; Kolesova et al., 2016; Susaki et al., 2014; Tainaka et al., 2014) ist das Tissue Clearing an solchen Proben ebenfalls möglich. In unserem Labor

wurde mit unserem Protokoll bereits eine ganze Mausleber exemplarisch erfolgreich behandelt, die Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gezeigt.

Ein weiterer, erwähnenswerter praktischer Aspekt betrifft die Gewebekonsistenz nach der Durchführung von Tissue Clearing. Die Behandlung mit den organischen Clearing-Reagenzien verpasst dem Gewebe nämlich eine feste, kunststoffähnliche Konsistenz. Das verhärtete dünne Gewebe ist in dieser gewellten Form brüchig, sodass seine Handhabung etwas Übung erfordert. Insbesondere stellt sich das Eindecken der Gewebeschnitte als herausfordernd dar, da die beschriebenen Verbiegungen des Schnittes nicht begradigt werden können ohne den Schnitt zu beschädigen. Dieses Problem wurde in unserem Projekt dadurch umgangen, indem die festen Gewebeschnitte in einer flüssigkeitsgefüllten Kammer eingedeckt wurden. Diese wurde auf dem Objektträger mittels sogenannter Spacer generiert. Hiermit blieben die Gewebeschnitte zwar intakt, allerdings lagen dabei nicht alle Punkte bzw. Zellschichten des Gewebeschnittes in derselben Ebene über dem Objektträger, sodass sie beim Abrastern durch die Laserstrahlen immer wieder aus dem Fokus gerieten. Daher musste der Fokus während der konfokalen Mikroskopie gelegentlich manuell angepasst werden, was jedoch insgesamt keine schwerwiegende Einschränkung im Mikroskopieablauf darstellte.

Eine weitere Einschränkung zeigt sich in Hinsicht auf den Erhalt der Fluoreszenzsignale in fertig behandelten Gewebeproben. Obwohl sich unsere Methode insgesamt als vergleichsweise gewebe- und fluoreszenzschonend erwies, zeigte sich dennoch eine Tendenz zum progredienten Ausbleichen der Fluoreszenzsignale, einerseits spontan im Laufe der Zeit und andererseits stark beschleunigt nach bereits erfolgter Lasermikroskopie. Letzterer Effekt war deutlich stärker ausgeprägt und fand sich vor allem lokal, d.h. umschrieben an der Stelle der vorausgegangenen Laseraufnahme. Insbesondere Detailaufnahmen mit hoher Auflösung und somit längerer Bestrahlungszeit resultierten in einem viel stärkeren Einbruch der Signalstärke. Dies erlaubte folglich nur eine geringe Anzahl an Aufnahmewiederholungen in jedem einzelnen Areal. Da diese Effekte in direktem Zusammenhang mit den natürlichen Eigenschaften der Fluorophore und ihrer Interaktion mit den eingesetzten Reagenzien stehen, sehen wir in diesem Aspekt zunächst keine direkte Möglichkeit für Optimierung im Rahmen des hier vorgestellten Protokolls. Möglicherweise ließe sich diese Einschränkung durch den Einsatz von gegebenenfalls weniger aggressiven Clearing-Reagenzien umgehen, dies würde jedoch eine umfassende Alteration unserer Methode und somit weiterführende Entwicklungsarbeiten erfordern. Im Gegensatz zu den bereits vollständig behandelten Proben erwies sich die Aufbewahrung von lediglich mit Immunfluoreszenz gefärbten, aber noch nicht dem Tissue Clearing unterzogenen Schnitten selbst über längere Zeiträume als unproblematisch. Solange sie in ausreichend Pufferflüssigkeit (z.B. PBS), abgedunkelt und gekühlt bei 4°C gelagert wurden, zeigten sich solche Proben und die darin enthaltenen Fluorophore als äußerst robust. Die Fluoreszenzsignale zeigten kaum Einbußen, selbst wenn das Tissue Clearing mehrere Tage oder Wochen später durchgeführt wurde. Dies lässt sich potenziell als großer praktischer Vorteil nutzen, indem eine größere Anzahl an Gewebsschnitten zeitgleich gefärbt und zunächst aufbewahrt wird, um dann bei Bedarf dem Tissue Clearing unterzogen zu werden. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die initiale Schnittvorbereitung und insbesondere die Immunfluoreszenzfärbung bei Weitem den zeitintensivsten Anteil der Methode ausmachen. Somit wirkt die zeitversetzte Durchführung von Tissue Clearing einerseits

zeitsparend und sichert gleichzeitig optimale Aufnahmeergebnisse durch die Behandlung des Gewebes unmittelbar vor der Mikroskopie.

Zuletzt soll noch Bezug auf die Handhabung der benötigten, relativ giftigen Substanzen, insbesondere im Rahmen des Tissue Clearing genommen werden. Die Substanzen THF und DBE werden in der toxikologischen Datenbank TOXNET als bedenklich eingestuft, da sie zu Reizungen und Schädigungen der Haut, Schleimhäute und insbesondere der Atemwege führen können. In Bezug auf das zyklische Ether THF werden zudem kanzerogene Eigenschaften diskutiert. (TOXNET, 2003; 2015) Daher verpflichtet unser Protokoll zur Benutzung dieser Substanzen ausschließlich unter einem Luftabzug und die strenge Vermeidung von direktem Haut- und insbesondere Schleimhautkontakt. Dies ist zwar in modernen biologischen Laboren üblicherweise problemlos umsetzbar, gehört jedoch an dieser Stelle erwähnt als – wenn auch geringer – limitierender Faktor der Methode.

Unter Berücksichtigung der genannten Punkte und angesichts des großen Informationsgewinns durch die in dieser Arbeit etablierte Methode sind wir der Ansicht, dass die aufgeführten zeitlichen und praktischen Limitationen durchaus vertretbar sind und die Methode zusammenfassend als hocheffektiv, zeit- und kosteneffizient einzustufen ist. Dennoch werden in unserem Labor laufend weitere Optimierungen des Protokolls angestrebt, wie z.B. die bereits erwähnte transkardiale Ganzkörperperfusion.

## **6.8 Perspektiven: Gewebepfusion und funktionelle Studien**

Wie die vorgestellten Ergebnisse demonstrierten, ließ sich mit unserem Protokoll sowohl das unbehandelte als auch mit CDE geschädigte Lebergewebe problemlos konfokalmikroskopisch in drei Dimensionen darstellen. Allerdings ist davon auszugehen, dass unsere Methode bei anderen Arten von Leberschädigung, welche mit vermehrter Fibrose einhergehen, an seine Grenzen stoßen würde. Als möglichen Lösungsansatz für stärker fibrosiertes Lebergewebe oder auch andere, kollagenreiche Gewebearten erprobten wir daher die sogenannte Organperfusion, im Vorliegenden in Form von transkardialer Ganzkörperperfusion (Gage et al., 2012) mit der Pufferlösung PBS und dem Fixativ Paraformaldehyd (PFA, 4%). Dieses Verfahren wurde bereits während der Mausektion, unmittelbar vor der Organentnahme und somit lange vor der eigentlichen Protokollanwendung durchgeführt. Theoretisch bestand die Möglichkeit einer retrograden venösen Perfusion mit dem Zugang über die kräftige Schwanzvene der Maus. In unseren Versuchen führte dieser Perfusionsweg allerdings aufgrund der unnatürlichen Flussrichtung und unphysiologischer Druckverhältnisse zu starker Dilatation von intrahepatischen venösen Gefäßen und somit artifiziellen Verzerrungen der Leberarchitektur (Bilder nicht gezeigt), sodass er sich für unsere Zwecke als ungeeignet erwies. Alternativ standen uns, angesichts der doppelten Blutversorgung der Leber, grundsätzlich zwei anterograde Perfusionswege zur Verfügung: der arterielle Zugang über den Körperkreislauf oder der portalvenöse, d.h. Zugang über die Pfortader. Nachdem sich eine routinemäßige Präparation und Punktion der Pfortader als technisch relativ umständlich erwies, entschieden wir uns für die arterielle systemische Perfusion mit dem Ausgangspunkt im linken Herzventrikel. Das heißt, die Perfusionslösungen wurden über den eröffneten linken Ventrikel verabreicht, erreichten über den Körperkreislauf alle

Organe und somit auch die Leber, und verließen sie wieder über ihre venösen Gefäße. Indem zu Beginn der Flüssigkeitsinstillation die Vena cava inferior kaudal der Lebervenenmündung eröffnet wurde, entstand ein offenes System und der intravasale Überdruck wurde minimiert. Aufgrund der entspannten intravasalen Druckverhältnisse, der physiologischen Flussrichtung der Perfusionslösungen sowie ihrer geringen Flussrate von 7 ml/min - entsprechend ungefähr einem Drittel des Herzminutenvolumens der Maus (Janssen et al., 2002) - wurde eine druckbedingte Gewebeschädigung und somit gegebenenfalls artifizielle Alteration der Leberarchitektur praktisch ausgeschlossen. Die Perfusion wurde prinzipiell mit der Absicht eingeführt, um durch die aktive PFA-Spülung über das lebereigene Blutgefäßsystem das Gewebe viel schneller und effektiver zu konservieren, was im Vergleich zur üblichen passiven Formalinfixierung seine Binnenarchitektur deutlich besser erhalten sollte. Der momentane Fixationseffekt ließ sich sehr eindrücklich in Echtzeit beobachten, da die Organe bereits wenige Sekunden nach der Instillation von PFA die charakteristische, festere Konsistenz einnahmen. Auch mikroskopisch bestätigte sich der Vorteil des gleichmäßigen Gewebekontaktes mit der Fixationslösung, indem sich die Leberarchitektur in allen Gewebeschichten als hervorragend erhalten zeigte. Zusätzlich ließ sich in dieser Versuchsreihe ein weiteres Phänomen der Gewebepfusion beobachten. In diesen Proben zeigte sich nämlich eine deutlich kräftigere und gleichmäßigere Fluoreszenz über alle Gewebeschichten, und zwar sowohl vom endogenen tdTomato als auch von den Antikörper-gebundenen Fluorophoren. Es ist davon auszugehen, dass dieser Effekt nicht nur durch die schnelle Fixierung von zu markierenden Epitopen, sondern auch durch gründliches Auswaschen von Blutbestandteilen, insbesondere roten Blutkörperchen aus dem Gewebe zu erklären ist. Dadurch wird einerseits die Penetration von Antikörpern während der Färbung verbessert und andererseits die Abschwächung und Streuung von Laserstrahlen bei der anschließenden konfokalen Mikroskopie deutlich verringert. Zudem ist zu postulieren, dass die hierbei resultierende Reduktion der Anzahl und Heterogenität von Zellen im Gewebeblock mit einer geringeren Varianz in Brechungsindizes einhergeht und somit auch der Effekt von Tissue Clearing zusätzlich unterstützt wird. Die in dieser Arbeit exemplarisch demonstrierten Aufnahmen von perfundierten Leberproben zeigen eindrücklich den Mehrwert dieses Verfahrens, sodass wir die Gewebepfusion mittlerweile für prinzipiell unverzichtbar für die Vervollständigung unseres Projektes erachten.

Die bislang erzeugten und in der vorliegenden Arbeit gezeigten Abbildungen dienen als Beispiele für die Anwendbarkeit der entwickelten Methode und boten zunächst orientierende Einblicke in die dreidimensionale Architektur der regenerativen Prozesse nach einer kontrollierten chemischen Leberschädigung. Anstehende Untersuchungen in unserem Labor sollen die biologische Signifikanz und die Entwicklungsdynamik der duktaalen Reaktion weiterführend mittels quantitativer und funktioneller Verfahren erläutern. Beispielsweise soll die Funktionalität der duktaalen Reaktion im Sinne einer Transportfähigkeit einerseits durch immunhistologische Darstellungen ihrer Lumina und andererseits in einem Kooperationsprojekt mit Herrn Professor Jan Hengstler (Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund, IfADo) mittels in-vivo Imaging des Galleflusses belegt werden. Eine weitere, in dieser Arbeit bereits grundlegend adressierte Fragestellung betrifft die Anschlüsse des kanalikulären Netzwerkes an die duktaale Reaktion. Diese Verbindungen wurden hier zwar mikromorphologisch demonstriert, dennoch sind hierzu vor allem quantitative Analysen notwendig, um sie sowohl im



physiologischer Zustand als auch dynamisch über die Schädigungsdauer zu spezifizieren. All diese Schritte werden bereits aktuell in unserem Labor von Frau Dr. S. Jörs konkret adressiert mit dem Ziel, die vorgestellte Hypothese über die duktale Reaktion als Mechanismus zur Erhaltung der Gallendrainage am Mausgewebe zu überprüfen bzw. zu belegen. Perspektivisch sollen diese Beobachtungen auch an humanen Leberproben verifiziert und somit die Übertragbarkeit dieser Studien auf den Menschen bestätigt werden. Als Grundlage für all diese Untersuchungen soll die, in der vorliegenden Arbeit etablierte und um die Gewebepfusion erweiterte, mikroskopisch-bildgebende Methode sowie die dadurch gewonnenen Erkenntnisse dienen.

Schließlich ist anzunehmen, dass die entwickelte Methode nicht nur bei Untersuchungen der Leber, sondern auch für andere parenchymatöse Organe erfolgreich eingesetzt werden kann. Auch der hier gezeigte Ablauf der Gewebepfusion könnte dabei uneingeschränkt übernommen werden, da mit unserem Versuchsaufbau alle Organe erfasst werden. Eine Ausnahme würde hierbei lediglich die Lunge darstellen, welche prinzipiell über den kleinen Kreislauf perfundiert werden müsste. Zur Anwendbarkeit des Protokolls auf anderen Gewebearten und Organen sind jedoch grundsätzlich weitere Untersuchungen notwendig.

## 7. Zusammenfassung

Als Antwort auf nahezu jegliche Art chemischer Leberschädigung kommt es zu Ausbildung und Expansion eines primär periportal lokalisierten, immunphänotypisch biliären Zellkompartimentes. Dieses Phänomen wird traditionell als duktales Reaktion bezeichnet und zeigt je nach Schädigungsreiz unterschiedliche Ausprägungen und Ausbreitungsmuster. In der Vergangenheit wurden zwar zahlreiche Versuche unternommen, die duktales Reaktion genauer zu charakterisieren, allerdings gilt ihre funktionelle Rolle bis dato als unzureichend erklärt. Neuere Untersuchungen, inkl. den aktuellen Forschungsarbeiten in unserem Labor, deuten zunehmend darauf hin, dass ihre primäre biologische Rolle in der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Gallendrainage in der geschädigten Leber bestehe. Um dieser Hypothese genauer nachzugehen, ist ein genaues Verständnis von der Mikromorphologie sowie räumlichen Beziehungen der duktales Reaktion zu den anderen Leberkompartimenten erforderlich. Prinzipiell erfordert dies eine Darstellung und Analyse von Lebergewebe in drei räumlichen Dimensionen, was jedoch aufgrund von aktuellen technischen Limitationen selbst mit modernen Laser-Mikroskopen nicht ohne weiteres möglich ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige Methode entwickelt, welche nach spezifischer Fluoreszenzmarkierung und mittels konfokaler Mikroskopie bis zu 100 µm dicke dreidimensionale Gewebeaufnahmen ermöglicht. Die Methode beruht zum einen auf umfangreichen Modifikationen der gängigen Immunfluoreszenzverfahren, welche zusammenfassend die Reichweite der fluoreszenztragenden Antikörper innerhalb der dicken Gewebeproben erhöhen. Zum anderen wird das Protokoll durch Alterationen von optischen Eigenschaften des Gewebes mittels moderner Tissue Clearing Methoden komplettiert, was die Eindringtiefe der Laserstrahlen durch die zahlreichen Gewebeschichten entscheidend erhöht. Basierend auf einer bereits publizierten Methode namens 3DISCO wurde in diesem Projekt ein eigenständiges, speziell für Gefrierschnitte geeignetes Tissue Clearing Protokoll entwickelt und in unsere Methode integriert.

Die neuartige Methode wurde anschließend an gesundem sowie gezielt chemisch-nutritiv geschädigtem Lebergewebe erprobt. Dieser Schritt diente einerseits der Validierung des neuentwickelten Verfahrens und andererseits einer initialen, zunächst deskriptiven mikromorphologischen Charakterisierung der Leberarchitektur, sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch nach chemischer Schädigung und im Laufe definierter Regenerationsphasen. Um die Veränderungen des biliären Kompartimentes und somit die Entwicklung der duktales Reaktion im Laufe der Schädigung darzustellen, wurden alle Versuche an einem Lineage Tracing Mausmodell durchgeführt, welches ein genetisch kodierte und ausschließlich in biliären Zellen induzierbares Fluoreszenzprotein enthielt. Nach gezielter, unterschiedlich langer Leberschädigung konnte somit die Entwicklung der duktales Reaktion in verschiedenen Stadien visualisiert werden. Die Bearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte mittels einer kommerziell erwerbbarer Software, was die Flexibilität unserer Methode unterstrich.

In den Darstellungen von unbehandeltem Lebergewebe zeigte sich zum ersten Mal die dreidimensionale Organisation des nativen Gallengangsystems in Form eines Plexus, welcher sich mit seinen zahlreichen feinen Verästelungen zirkulär um den zugehörigen Pfortaderast erstreckt. Dies widerspricht ausdrücklich den klassischen, in den Lehrbüchern vermittelten Vorstellungen von der Gallengangarchitektur und stellt somit bereits eine wichtige neue Erkenntnis für die Leberforschung dar.

Die chemisch-toxische Leberschädigung wurde mittels der in diesem Forschungsgebiet häufig eingesetzten CDE-Diät verursacht. Dieses Modell beruht auf oraler Gabe definierter lebertoxischer Substanzen in Form von standardisierten Fütterungsprotokollen, wodurch eine fulminante hepatozelluläre Schädigung ausgelöst wird. Hierbei zeigte sich, analog den Beobachtungen bisheriger zweidimensionaler Studien, eine progrediente, sich multidirektional verzweigende und tief in das Innere der angrenzenden Leberläppchen eindringende duktale Reaktion. Wie die parallele Darstellung des zunehmend fragmentierten Netzwerkes der Gallenkanalikuli demonstrierte, widerspiegelte die kräftige Expansion der dukталen Reaktion das jeweilige Ausmaß des Leberzelluntergangs. Zudem ließen sich in den dreidimensionalen Rekonstruktionen der konfokalen Aufnahmen die Kontaktstellen dieser beiden, sich reziprok verändernden Kompartimente, aufzeigen. Die Dynamik und die morphologischen Zusammenhänge dieser Prozesse sind somit grundsätzlich als starker Hinweis auf ihren funktionellen Zusammenhang im Rahmen der Gallendrainage zu verstehen.

Um die Effizienz der Methode zu erhöhen, wurde im Laufe des Projektes die transkardiale Ganzkörperperfusion als mögliche Protokollerweiterung erprobt. Die Spülung und Fixation der Organe durch das eigene Blutgefäßsystem führten in einer initialen Versuchsreihe in sowohl unbehandelten als auch CDE-geschädigten Lebern zu signifikanter Erhöhung der Aufnahmetiefe und Auflösung der Fluoreszenzsignale. Dieser Effekt ließ sich sowohl in der endogenen als auch in der Immunfluoreszenz beobachten und resultierte in deutlich detaillierteren dreidimensionalen Rekonstruktionen über Schnittdicken von bis zu 150 µm. Daher erachten wir die Gewebepfusion als eine sinnvolle und möglicherweise essenzielle Protokollerweiterung für weiterführende Untersuchungen, insbesondere zur Darstellung von fibrosierten bzw. von Natur aus kollagenreichen Gewebearten.

Zusammenfassend wurde in diesem Projekt eine einfache, kompakte und kostengünstige Methode entwickelt, welche dreidimensionale Darstellung und Analyse von dicken Gefrierschnitten von kompaktem biologischem Gewebe ermöglicht. Die Untersuchungen an Lebergewebe unter physiologischen Bedingungen sowie nach chemisch-nutritiver Schädigung und Regeneration lieferten neue Erkenntnisse über die Architektur einerseits des nativen Gallengangplexus und andererseits der daraus entstehenden dukталen Reaktion. Zudem lieferten sie eine strukturelle Grundlage für die Hypothese, dass die biologische Rolle dieser Proliferate tatsächlich in der Erhaltung der Gallendrainage nach Leberzelluntergang bestehe. Anstehende Untersuchungen in unserem Labor haben zum Ziel, diesen Sachverhalt mittels quantitativer und funktioneller Analysen genauer zu prüfen.

## 8. Literaturverzeichnis

### Publikationen

- Akhurst, B., E. J. Croager, C. A. Farley-Roche, J. K. Ong, M. L. Dumble, B. Knight und G. C. Yeoh (2001). "A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver." Hepatology **34**(3): 519-522.
- Alison, M. R., S. Islam und S. Lim (2009). "Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly." J Pathol **217**(2): 282-298.
- Alvaro, D., M. G. Mancino, S. Glaser, E. Gaudio, M. Marzioni, H. Francis und G. Alpini (2007). "Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver." Gastroenterology **132**(1): 415-431.
- Azaripour, A., T. Lagerweij, C. Scharfbillig, A. E. Jadczyk, B. Willershausen und C. J. Van Noorden (2016). "A survey of clearing techniques for 3D imaging of tissues with special reference to connective tissue." Prog Histochem Cytochem **51**(2): 9-23.
- Azuma, H., T. Hirose, H. Fujii, S. Oe, K. Yasuchika, T. Fujikawa und Y. Yamaoka (2003). "Enrichment of hepatic progenitor cells from adult mouse liver." Hepatology **37**(6): 1385-1394.
- Becker, K., N. Jahrling, E. R. Kramer, F. Schnorrer und H. U. Dodt (2008). "Ultramicroscopy: 3D reconstruction of large microscopical specimens." J Biophotonics **1**(1): 36-42.
- Becker, K., N. Jahrling, S. Saghafi, R. Weiler und H. U. Dodt (2012). "Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains." PLoS One **7**(3): e33916.
- Bhushan, B., C. Walesky, M. Manley, T. Gallagher, P. Borude, G. Edwards, S. P. Monga und U. Apte (2014). "Pro-regenerative signaling after acetaminophen-induced acute liver injury in mice identified using a novel incremental dose model." Am J Pathol **184**(11): 3013-3025.
- Bisgaard, H. C., U. Holmskov, E. Santoni-Rugiu, P. Nagy, O. Nielsen, P. Ott, E. Hage, K. Dalhoff, L. J. Rasmussen und N. Tygstrup (2002). "Heterogeneity of ductular reactions in adult rat and human liver revealed by novel expression of deleted in malignant brain tumor 1." Am J Pathol **161**(4): 1187-1198.

- Bralet, M. P., S. Branchereau, C. Brechot und N. Ferry (1994). "Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver." Am J Pathol **144**(5): 896-905.
- Brunt, E. M., K. Blomenkamp, M. Ahmed, F. Ali, N. Marcus und J. Teckman (2010). "Hepatic progenitor cell proliferation and liver injury in alpha-1-antitrypsin deficiency." J Pediatr Gastroenterol Nutr **51**(5): 626-630.
- Carpentier, R., R. E. Suner, N. van Hul, J. L. Kopp, J. B. Beaudry, S. Cordi, A. Antoniou, P. Raynaud, S. Lepreux, P. Jacquemin, I. A. Leclercq, M. Sander und F. P. Lemaigre (2011). "Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells." Gastroenterology **141**(4): 1432-1438, 1438 e1431-1434.
- Chung, K. und K. Deisseroth (2013). "CLARITY for mapping the nervous system." Nat Methods **10**(6): 508-513.
- Chung, K., J. Wallace, S. Y. Kim, S. Kalyanasundaram, A. S. Andalman, T. J. Davidson, J. J. Mirzabekov, K. A. Zalocusky, J. Mattis, A. K. Denisin, S. Pak, H. Bernstein, C. Ramakrishnan, L. Grosenick, V. Gradinaru und K. Deisseroth (2013). "Structural and molecular interrogation of intact biological systems." Nature **497**(7449): 332-337.
- Clouston, A. D., J. R. Jonsson und E. E. Powell (2009). "Hepatic progenitor cell-mediated regeneration and fibrosis: chicken or egg?" Hepatology **49**(5): 1424-1426.
- Clouston, A. D., E. E. Powell, M. J. Walsh, M. M. Richardson, A. J. Demetris und J. R. Jonsson (2005). "Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis." Hepatology **41**(4): 809-818.
- Coffinier, C., L. Gresh, L. Fiette, F. Tronche, G. Schutz, C. Babinet, M. Pontoglio, M. Yaniv und J. Barra (2002). "Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta." Development **129**(8): 1829-1838.
- Craig, C. E., A. Quaglia, C. Selden, M. Lowdell, H. Hodgson und A. P. Dhillon (2004). "The histopathology of regeneration in massive hepatic necrosis." Semin Liver Dis **24**(1): 49-64.
- Delire, B., P. Starkel und I. Leclercq (2015). "Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development." J Clin Transl Hepatol **3**(1): 53-66.

- Denk, W., J. H. Strickler und W. W. Webb (1990). "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy." Science **248**(4951): 73-76.
- Desmet, V. J. (2011). "Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered." Virchows Arch **458**(3): 251-259.
- Diaspro, A., P. Bianchini, G. Vicidomini, M. Faretta, P. Ramoino und C. Usai (2006). "Multi-photon excitation microscopy." Biomed Eng Online **5**: 36.
- Dotd, H. U., U. Leischner, A. Schierloh, N. Jahrling, C. P. Mauch, K. Deininger, J. M. Deussing, M. Eder, W. Zieglgansberger und K. Becker (2007). "Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain." Nat Methods **4**(4): 331-336.
- Duncan, A. W., C. Dorrell und M. Grompe (2009). "Stem cells and liver regeneration." Gastroenterology **137**(2): 466-481.
- Eichenbaum, K. D., J. W. Eichenbaum, A. Fadiel, D. C. Miller, N. Demir, F. Naftolin, A. Stern und P. H. Pevsner (2005). "Minimally invasive method for murine brain fixation." Biotechniques **39**(4): 487-488, 490.
- Erturk, A., K. Becker, N. Jahrling, C. P. Mauch, C. D. Hojer, J. G. Egen, F. Hellal, F. Bradke, M. Sheng und H. U. Dotd (2012). "Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO." Nat Protoc **7**(11): 1983-1995.
- Erturk, A. und F. Bradke (2013). "High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO)." Exp Neurol **242**: 57-64.
- Erturk, A., D. Lafkas und C. Chalouni (2014). "Imaging cleared intact biological systems at a cellular level by 3DISCO." J Vis Exp(89).
- Espanol-Suner, R., R. Carpentier, N. Van Hul, V. Legry, Y. Achouri, S. Cordi, P. Jacquemin, F. Lemaigre und I. A. Leclercq (2012). "Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice." Gastroenterology **143**(6): 1564-1575 e1567.
- Evarts, R. P., P. Nagy, E. Marsden und S. S. Thorgeirsson (1987). "A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver." Carcinogenesis **8**(11): 1737-1740.



- Falkowski, O., H. J. An, I. A. Ianus, L. Chiriboga, H. Yee, A. B. West und N. D. Theise (2003). "Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells." J Hepatol **39**(3): 357-364.
- Farber, E. (1956). "Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene." Cancer Res **16**(2): 142-148.
- Fausto, N. (1990). "Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells." Curr Opin Cell Biol **2**(6): 1036-1042.
- Fausto, N. (2000). "Liver regeneration." J Hepatol **32**(1 Suppl): 19-31.
- Fausto, N. (2001). "Liver regeneration: from laboratory to clinic." Liver Transpl **7**(10): 835-844.
- Fausto, N. (2004). "Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells." Hepatology **39**(6): 1477-1487.
- Fausto, N., J. S. Campbell und K. J. Riehle (2006). "Liver regeneration." Hepatology **43**(2 Suppl 1): S45-53.
- Feil, S., J. Krauss, M. Thunemann und R. Feil (2014). "Genetic inducible fate mapping in adult mice using tamoxifen-dependent Cre recombinases." Methods Mol Biol **1194**: 113-139.
- Feil, S., N. Valtcheva und R. Feil (2009). "Inducible Cre mice." Methods Mol Biol **530**: 343-363.
- Fix, A. S. und R. H. Garman (2000). "Practical aspects of neuropathology: a technical guide for working with the nervous system." Toxicol Pathol **28**(1): 122-131.
- Friedman, S. L. (2008). "Mechanisms of hepatic fibrogenesis." Gastroenterology **134**(6): 1655-1669.
- Gage, G. J., D. R. Kipke und W. Shain (2012). "Whole animal perfusion fixation for rodents." J Vis Exp(65).
- Godoy, P., N. J. Hewitt, U. Albrecht, M. E. Andersen, N. Ansari, S. Bhattacharya, J. G. Bode, J. Bolleyn, C. Borner, J. Bottger, A. Braeuning, R. A. Budinsky, B. Burkhardt, N. R. Cameron, G. Camussi, C. S. Cho, Y. J. Choi, J. Craig Rowlands, U. Dahmen, G. Damm, O. Dirsch, M. T. Donato, J. Dong, S. Dooley, D. Drasdo, R. Eakins, K. S. Ferreira, V. Fonsato, J. Fraczek, R. Gebhardt, A. Gibson, M. Glanemann, C. E. Goldring, M. J. Gomez-Lechon, G. M. Groothuis, L. Gustavsson, C. Guyot, D. Hallifax, S. Hammad, A.

- Hayward, D. Haussinger, C. Hellerbrand, P. Hewitt, S. Hoehme, H. G. Holzhutter, J. B. Houston, J. Hrach, K. Ito, H. Jaeschke, V. Keitel, J. M. Kelm, B. Kevin Park, C. Kordes, G. A. Kullak-Ublick, E. L. LeCluyse, P. Lu, J. Luebke-Wheeler, A. Lutz, D. J. Maltman, M. Matz-Soja, P. McMullen, I. Merfort, S. Messner, C. Meyer, J. Mwinyi, D. J. Naisbitt, A. K. Nussler, P. Olinga, F. Pampaloni, J. Pi, L. Pluta, S. A. Przyborski, A. Ramachandran, V. Rogiers, C. Rowe, C. Schelcher, K. Schmich, M. Schwarz, B. Singh, E. H. Stelzer, B. Stieger, R. Stober, Y. Sugiyama, C. Tetta, W. E. Thasler, T. Vanhaecke, M. Vinken, T. S. Weiss, A. Widera, C. G. Woods, J. J. Xu, K. M. Yarborough und J. G. Hengstler (2013). "Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME." *Arch Toxicol* **87**(8): 1315-1530.
- Gogoi-Tiwari, J., J. Kohn-Gaone, C. Giles, D. Schmidt-Arras, F. D. Gratte, C. L. Elsegood, G. W. McCaughan, G. A. Ramm, J. K. Olynyk und J. E. E. Tirnitz-Parker (2017). "The Murine Choline-Deficient, Ethionine-Supplemented (CDE) Diet Model of Chronic Liver Injury." *J Vis Exp*(128).
- Gouw, A. S., A. D. Clouston und N. D. Theise (2011). "Ductular reactions in human liver: diversity at the interface." *Hepatology* **54**(5): 1853-1863.
- Greenbaum, L. E. und R. G. Wells (2011). "The role of stem cells in liver repair and fibrosis." *Int J Biochem Cell Biol* **43**(2): 222-229.
- Hama, H., H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, K. Fukami, A. Sakaue-Sawano und A. Miyawaki (2011). "Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain." *Nat Neurosci* **14**(11): 1481-1488.
- Hammad, S., S. Hoehme, A. Friebel, I. von Recklinghausen, A. Othman, B. Begher-Tibbe, R. Reif, P. Godoy, T. Johann, A. Vartak, K. Golka, P. O. Bucur, E. Vibert, R. Marchan, B. Christ, S. Dooley, C. Meyer, I. Ilkavets, U. Dahmen, O. Dirsch, J. Bottger, R. Gebhardt, D. Drasdo und J. G. Hengstler (2014). "Protocols for staining of bile canalicular and sinusoidal networks of human, mouse and pig livers, three-dimensional reconstruction and quantification of tissue microarchitecture by image processing and analysis." *Arch Toxicol* **88**(5): 1161-1183.

- Hoehme, S., M. Brulport, A. Bauer, E. Bedawy, W. Schormann, M. Hermes, V. Puppe, R. Gebhardt, S. Zellmer, M. Schwarz, E. Bockamp, T. Timmel, J. G. Hengstler und D. Drasdo (2010). "Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10371-10376.
- Hou, B., D. Zhang, S. Zhao, M. Wei, Z. Yang, S. Wang, J. Wang, X. Zhang, B. Liu, L. Fan, Y. Li, Z. Qiu, C. Zhang und T. Jiang (2015). "Scalable and DiI-compatible optical clearance of the mammalian brain." Front Neuroanat **9**: 19.
- Huch, M., C. Dorrell, S. F. Boj, J. H. van Es, V. S. Li, M. van de Wetering, T. Sato, K. Hamer, N. Sasaki, M. J. Finegold, A. Haft, R. G. Vries, M. Grompe und H. Clevers (2013). "In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration." Nature **494**(7436): 247-250.
- Isse, K., A. Lesniak, K. Grama, J. Maier, S. Specht, M. Castillo-Rama, J. Lunz, B. Roysam, G. Michalopoulos und A. J. Demetris (2013). "Preexisting epithelial diversity in normal human livers: a tissue-tethered cytometric analysis in portal/periportal epithelial cells." Hepatology **57**(4): 1632-1643.
- Itoh, T. (2016). "Stem/progenitor cells in liver regeneration." Hepatology **64**(2): 663-668.
- Itoh, T. und A. Miyajima (2014). "Liver regeneration by stem/progenitor cells." Hepatology **59**(4): 1617-1626.
- Janssen, B., J. Debets, P. Leenders und J. Smits (2002). "Chronic measurement of cardiac output in conscious mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **282**(3): R928-935.
- Jors, S., P. Jeliaskova, M. Ringelhan, J. Thalhammer, S. Durl, J. Ferrer, M. Sander, M. Heikenwalder, R. M. Schmid, J. T. Siveke und F. Geisler (2015). "Lineage fate of ductular reactions in liver injury and carcinogenesis." J Clin Invest **125**(6): 2445-2457.
- Kallis, Y. N., A. J. Robson, J. A. Fallowfield, H. C. Thomas, M. R. Alison, N. A. Wright, R. D. Goldin, J. P. Iredale und S. J. Forbes (2011). "Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response." Gut **60**(4): 525-533.
- Kaneko, K., K. Kamimoto, A. Miyajima und T. Itoh (2015). "Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis." Hepatology **61**(6): 2056-2066.

- Kasukurthi, R., M. J. Brenner, A. M. Moore, A. Moradzadeh, W. Z. Ray, K. B. Santosa, S. E. Mackinnon und D. A. Hunter (2009). "Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration." J Neurosci Methods **184**(2): 303-309.
- Ke, M. T., S. Fujimoto und T. Imai (2013). "SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction." Nat Neurosci **16**(8): 1154-1161.
- Ke, M. T. und T. Imai (2014). "Optical clearing of fixed brain samples using SeeDB." Curr Protoc Neurosci **66**: Unit 2 22.
- Kennedy, S., S. Rettinger, M. W. Flye und K. P. Ponder (1995). "Experiments in transgenic mice show that hepatocytes are the source for postnatal liver growth and do not stream." Hepatology **22**(1): 160-168.
- Kolesova, H., M. Capek, B. Radochova, J. Janacek und D. Sedmera (2016). "Comparison of different tissue clearing methods and 3D imaging techniques for visualization of GFP-expressing mouse embryos and embryonic hearts." Histochem Cell Biol **146**(2): 141-152.
- Kuwajima, T., A. A. Sitko, P. Bhansali, C. Jurgens, W. Guido und C. Mason (2013). "ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue." Development **140**(6): 1364-1368.
- Lavenex, P., P. B. Lavenex, J. L. Bennett und D. G. Amaral (2009). "Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: hippocampal formation." J Comp Neurol **512**(1): 27-51.
- Lee, H. P., J-H.; Seo, I.; Park, S-H., Kim, S. (2014). "Improved application of the electrophoretic tissue clearing technology, CLARITY, to intact solid organs including brain, pancreas, liver, kidney, lung, and intestine." BMC Developmental Biology **2014 14:781**.
- Lee, S. C. und P. Bajcsy (2006). "Intensity correction of fluorescent confocal laser scanning microscope images by mean-weight filtering." J Microsc **221**(Pt 2): 122-136.

- Lian, W. N., J. W. Tsai, P. M. Yu, T. W. Wu, S. C. Yang, Y. P. Chau und C. H. Lin (1999). "Targeting of aminopeptidase N to bile canaliculi correlates with secretory activities of the developing canalicular domain." Hepatology **30**(3): 748-760.
- Madisen, L., T. A. Zwingman, S. M. Sunkin, S. W. Oh, H. A. Zariwala, H. Gu, L. L. Ng, R. D. Palmiter, M. J. Hawrylycz, A. R. Jones, E. S. Lein und H. Zeng (2010). "A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain." Nat Neurosci **13**(1): 133-140.
- Malato, Y., S. Naqvi, N. Schurmann, R. Ng, B. Wang, J. Zape, M. A. Kay, D. Grimm und H. Willenbring (2011). "Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration." J Clin Invest **121**(12): 4850-4860.
- Marongiu, F., M. Marongiu, A. Contini, M. Serra, E. Cadoni, R. Murgia und E. Laconi (2017). "Hyperplasia vs hypertrophy in tissue regeneration after extensive liver resection." World J Gastroenterol **23**(10): 1764-1770.
- Marongiu, F., M. P. Serra, M. Sini, M. Marongiu, A. Contini und E. Laconi (2014). "Cell turnover in the repopulated rat liver: distinct lineages for hepatocytes and the biliary epithelium." Cell Tissue Res **356**(2): 333-340.
- Martins, P. N., T. P. Theruvath und P. Neuhaus (2008). "Rodent models of partial hepatectomies." Liver Int **28**(1): 3-11.
- Michalopoulos, G. K. (2007). "Liver regeneration." J Cell Physiol **213**(2): 286-300.
- Michalopoulos, G. K. (2013). "Principles of liver regeneration and growth homeostasis." Compr Physiol **3**(1): 485-513.
- Michalopoulos, G. K. und M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." Science **276**(5309): 60-66.
- Miller, D. C. (1998). "Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination." Arch Pathol Lab Med **122**(11): 949.
- Miyajima, A., M. Tanaka und T. Itoh (2014). "Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming." Cell Stem Cell **14**(5): 561-574.
- Miyawaki, A. (2015). "Brain clearing for connectomics." Microscopy (Oxf) **64**(1): 5-8.
- Morales-Navarrete, H., F. Segovia-Miranda, P. Klukowski, K. Meyer, H. Nonaka, G. Marsico, M. Chernykh, A. Kalaidzidis, M. Zerial und Y. Kalaidzidis (2015). "A versatile pipeline for the multi-scale digital reconstruction and quantitative analysis of 3D tissue architecture." Elife **4**.

- Nikoozad, Z., M. T. Ghorbanian und A. Rezaei (2014). "Comparison of the liver function and hepatic specific genes expression in cultured mesenchymal stem cells and hepatocytes." Iran J Basic Med Sci **17**(1): 27-33.
- Nio, K., T. Yamashita und S. Kaneko (2017). "The evolving concept of liver cancer stem cells." Mol Cancer **16**(1): 4.
- Oh, S. W., J. A. Harris, L. Ng, B. Winslow, N. Cain, S. Mihalas, Q. Wang, C. Lau, L. Kuan, A. M. Henry, M. T. Mortrud, B. Ouellette, T. N. Nguyen, S. A. Sorensen, C. R. Slaughterbeck, W. Wakeman, Y. Li, D. Feng, A. Ho, E. Nicholas, K. E. Hirokawa, P. Bohn, K. M. Joines, H. Peng, M. J. Hawrylycz, J. W. Phillips, J. G. Hohmann, P. Wohnoutka, C. R. Gerfen, C. Koch, A. Bernard, C. Dang, A. R. Jones und H. Zeng (2014). "A mesoscale connectome of the mouse brain." Nature **508**(7495): 207-214.
- Pan, C., R. Cai, F. P. Quacquarelli, A. Ghasemigharagoz, A. Lourbopoulos, P. Matryba, N. Plesnila, M. Dichgans, F. Hellal und A. Erturk (2016). "Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO." Nat Methods **13**(10): 859-867.
- Passman, A. M., R. P. Strauss, S. B. McSpadden, M. L. Finch-Edmondson, K. H. Woo, L. A. Diepeveen, R. London, B. A. Callus und G. C. Yeoh (2015). "A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet reduces morbidity and retains a liver progenitor cell response in mice." Dis Model Mech **8**(12): 1635-1641.
- Piatkevich, K. D. und V. V. Verkhusha (2011). "Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry." Methods Cell Biol **102**: 431-461.
- Plum, W., D. F. Tschaharganeh, D. C. Kroy, E. Corsten, S. Erschfeld, U. Dierssen, H. Wasmuth, C. Trautwein und K. L. Streetz (2010). "Lack of glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3-mediated signaling in hepatocytes enhances chronic liver injury and fibrosis progression in a model of sclerosing cholangitis." Am J Pathol **176**(5): 2236-2246.
- Popper, H., G. Kent und R. Stein (1957). "Ductular cell reaction in the liver in hepatic injury." J Mt Sinai Hosp N Y **24**(5): 551-556.
- Portmann, B., I. C. Talbot, D. W. Day, A. R. Davidson, I. M. Murray-Lyon und R. Williams (1975). "Histopathological changes in the liver following a paracetamol overdose: correlation with clinical and biochemical parameters." J Pathol **117**(3): 169-181.



- Power, C. und J. E. Rasko (2008). "Whither prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration." *Ann Intern Med* **149**(6): 421-426.
- Renier, N., Z. Wu, D. J. Simon, J. Yang, P. Ariel und M. Tessier-Lavigne (2014). "iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging." *Cell* **159**(4): 896-910.
- Richardson, D. S. und J. W. Lichtman (2015). "Clarifying Tissue Clearing." *Cell* **162**(2): 246-257.
- Rocken, C., S. Carl-McGrath, I. Grantzdorffer, R. Mantke, A. Roessner und U. Lendeckel (2004). "Ectopeptidases are differentially expressed in hepatocellular carcinomas." *Int J Oncol* **24**(3): 487-495.
- Rocken, C., J. Licht, A. Roessner und S. Carl-McGrath (2005). "Canalicular immunostaining of aminopeptidase N (CD13) as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma." *J Clin Pathol* **58**(10): 1069-1075.
- Rodrigo-Torres, D., S. Affo, M. Coll, O. Morales-Ibanez, C. Millan, D. Blaya, A. Alvarez-Guaita, C. Rentero, J. J. Lozano, M. A. Maestro, M. Solar, V. Arroyo, J. Caballeria, L. A. van Grunsven, C. Enrich, P. Gines, R. Bataller und P. Sancho-Bru (2014). "The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells." *Hepatology* **60**(4): 1367-1377.
- Roskams, T. und V. Desmet (2008). "Embryology of extra- and intrahepatic bile ducts, the ductal plate." *Anat Rec (Hoboken)* **291**(6): 628-635.
- Roskams, T. A., N. D. Theise, C. Balabaud, G. Bhagat, P. S. Bhathal, P. Bioulac-Sage, E. M. Brunt, J. M. Crawford, H. A. Crosby, V. Desmet, M. J. Finegold, S. A. Geller, A. S. Gouw, P. Hytiroglou, A. S. Knisely, M. Kojiro, J. H. Lefkowitz, Y. Nakanuma, J. K. Olynyk, Y. N. Park, B. Portmann, R. Saxena, P. J. Scheuer, A. J. Strain, S. N. Thung, I. R. Wanless und A. B. West (2004). "Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers." *Hepatology* **39**(6): 1739-1745.
- Rountree, C. B., L. Mishra und H. Willenbring (2012). "Stem cells in liver diseases and cancer: recent advances on the path to new therapies." *Hepatology* **55**(1): 298-306.
- Schmelzer, E., L. Zhang, A. Bruce, E. Wauthier, J. Ludlow, H. L. Yao, N. Moss, A. Melhem, R. McClelland, W. Turner, M. Kulik, S. Sherwood, T. Tallheden, N. Cheng, M. E. Furth

- und L. M. Reid (2007). "Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors." J Exp Med **204**(8): 1973-1987.
- Schrem, H., J. Klempnauer und J. Borlak (2004). "Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation." Pharmacol Rev **56**(2): 291-330.
- Shinozuka, H., B. Lombardi, S. Sell und R. M. Iammarino (1978). "Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet." Cancer Res **38**(4): 1092-1098.
- Shiojiri, N. (1997). "Development and differentiation of bile ducts in the mammalian liver." Microsc Res Tech **39**(4): 328-335.
- Silvestri, L., I. Costantini, L. Sacconi und F. S. Pavone (2016). "Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective." J Biomed Opt **21**(8): 081205.
- Solar, M., C. Cardalda, I. Houbracken, M. Martin, M. A. Maestro, N. De Medts, X. Xu, V. Grau, H. Heimberg, L. Bouwens und J. Ferrer (2009). "Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth." Dev Cell **17**(6): 849-860.
- Staudt, T., M. C. Lang, R. Medda, J. Engelhardt und S. W. Hell (2007). "2,2'-thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy." Microsc Res Tech **70**(1): 1-9.
- Strazzabosco, M. und L. Fabris (2008). "Functional anatomy of normal bile ducts." Anat Rec (Hoboken) **291**(6): 653-660.
- Susaki, E. A., K. Tainaka, D. Perrin, F. Kishino, T. Tawara, T. M. Watanabe, C. Yokoyama, H. Onoe, M. Eguchi, S. Yamaguchi, T. Abe, H. Kiyonari, Y. Shimizu, A. Miyawaki, H. Yokota und H. R. Ueda (2014). "Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis." Cell **157**(3): 726-739.
- Suzuki, A., S. Sekiya, M. Onishi, N. Oshima, H. Kiyonari, H. Nakauchi und H. Taniguchi (2008). "Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver." Hepatology **48**(6): 1964-1978.

- Tainaka, K., S. I. Kubota, T. Q. Suyama, E. A. Susaki, D. Perrin, M. Ukai-Tadenuma, H. Ukai und H. R. Ueda (2014). "Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization." Cell **159**(4): 911-924.
- Tarantola, E., V. Bertone, G. Milanesi, E. Capelli, A. Ferrigno, D. Neri, M. Vairetti, S. Barni und I. Freitas (2012). "Dipeptidylpeptidase--IV, a key enzyme for the degradation of incretins and neuropeptides: activity and expression in the liver of lean and obese rats." Eur J Histochem **56**(4): e41.
- Terblanche, J. und T. E. Starzl (1979). "Hepatic Regeneration." Viewp Dig Dis **11**(4): 40182.
- Theise, N. D. und R. Kuwahara (2007). "The tissue biology of ductular reactions in human chronic liver disease." Gastroenterology **133**(1): 350-352.
- Theise, N. D., R. Saxena, B. C. Portmann, S. N. Thung, H. Yee, L. Chiriboga, A. Kumar und J. M. Crawford (1999). "The canals of Hering and hepatic stem cells in humans." Hepatology **30**(6): 1425-1433.
- Tiniakos, D. G., A. Kandilis und S. A. Geller (2010). "Tityus: a forgotten myth of liver regeneration." J Hepatol **53**(2): 357-361.
- Toga, A. W., A. Goldkorn, K. Ambach, K. Chao, B. C. Quinn und P. Yao (1997). "Postmortem cryosectioning as an anatomic reference for human brain mapping." Comput Med Imaging Graph **21**(2): 131-141.
- Turanyi, E., K. Dezso, J. Csomor, Z. Schaff, S. Paku und P. Nagy (2010). "Immunohistochemical classification of ductular reactions in human liver." Histopathology **57**(4): 607-614.
- Vigouroux, R. J., M. Belle und A. Chedotal (2017). "Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing." Mol Brain **10**(1): 33.
- Vlieg, R. C. G., C.; Lee, W.M. (2015 (preprint)). "Evaluating passive optical clearing protocols for twophoton deep tissue imaging in adult intact visceral and neuronal organs." bioRxiv.
- Walter, T. J., E. E. Sparks und S. S. Huppert (2012). "3-dimensional resin casting and imaging of mouse portal vein or intrahepatic bile duct system." J Vis Exp(68): e4272.

- Williams, M. J., A. D. Clouston und S. J. Forbes (2014). "Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion." Gastroenterology **146**(2): 349-356.
- Yamashita, T. und S. Kaneko (2014). "Orchestration of hepatocellular carcinoma development by diverse liver cancer stem cells." J Gastroenterol **49**(7): 1105-1110.
- Yamashita, T. und X. W. Wang (2013). "Cancer stem cells in the development of liver cancer." J Clin Invest **123**(5): 1911-1918.
- Yang, B., J. B. Treweek, R. P. Kulkarni, B. E. Deverman, C. K. Chen, E. Lubeck, S. Shah, L. Cai und V. Gradinaru (2014). "Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing." Cell **158**(4): 945-958.
- Yin, Y., D. Kong, K. He und Q. Xia (2021). "Regeneration and activation of liver progenitor cells in liver cirrhosis." Genes Dis **8**(5): 623-628.
- Yu, T., Y. Qi, H. Gong, Q. Luo und D. Zhu (2017). "Optical clearing for multi-scale biological tissues." J Biophotonics.
- Zajicek, G., R. Oren und M. Weinreb, Jr. (1985). "The streaming liver." Liver **5**(6): 293-300.
- Zhu, X., Y. Xia, X. Wang, K. Si und W. Gong (2017). "Optical Brain Imaging: A Powerful Tool for Neuroscience." Neurosci Bull **33**(1): 95-102.

### **Bücher und Monographien**

- Aischylos (ca. 5. Jh. v. Chr.). Prometheus, gefesselt. Berlin, Suhrkamp Verlag.
- Aumüller, G. (2014). Anatomie. Stuttgart, Thieme.
- Childs, G. C. (2014). History Of Immunohistochemistry. Pathobiology of Human Disease. R. N. M. Linda M. McManus. San Diego, Elsevier: 3775-3796.
- Hollander, C. F., C. F. van Bezooijen und H. A. Solleveld (1987). Anatomy, function and aging in the mouse liver. Mouse Liver Tumors. Boston, MA, Springer Science & Business Media. **10**: 244-250.
- Macchiarelli, G., S. Makabe und P. M. Motta (2012). The structural basis of mammalian liver function. Ultrastructure of the Extraparietal Glands of the Digestive Tract. Boston, MA, Springer Science & Business Media. **6**: 185 - 211.
- Mills, S. E. (2012). Histology for Pathologists, Lippincott Williams&Wilki: 745-746.

Spalteholz, W. (1914). Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen (2. erw. Auflage). Leipzig, S. Hirzel Verlag.

Welsch, U. und J. Sobotta (2006). Lehrbuch Histologie : Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen. München [u.a.], Elsevier, Urban & Fischer.

## **Abbildungen**

Cook, M. J. (1965). The anatomy of the mouse. New York, Academic Press.

Geisler, F. und M. Strazzabosco (2015). "Emerging roles of Notch signaling in liver disease." Hepatology **61**(1): 382-392.

Pearson Education, I. (2004, Stand 17.03.2022). von <https://slidetodoc.com/anatomy-physiology-sixth-edition-chapter-24-part-4/>.

Saxena, R., N. D. Theise und J. M. Crawford (1999). "Microanatomy of the human liver- exploring the hidden interfaces." Hepatology **30**(6): 1339-1346.

Seo, J., M. Choe und S. Y. Kim (2016). "Clearing and Labeling Techniques for Large-Scale Biological Tissues." Mol Cells **39**(6): 439-446.

Statista. (2020, Stand 01.08.2020). "Statistisches Bundesamt. Anzahl der Fälle von Leberkrankheiten in Deutschland in den Jahren 2000 bis 2018." von <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/150960/umfrage/leberkrankheiten-in-deutschland-seit-2000/#professional>.

Tag, C. G., S. Sauer-Lehnen, S. Weiskirchen, E. Borkham-Kamphorst, R. H. Tolba, F. Tacke und R. Weiskirchen (2015). "Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis." J Vis Exp(96).

## **Online-Quellen**

Destatis. (2021). "Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik." von <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=abruftabelleBearbeiten&levelindex=1&levelid=1634063452048&auswahloperation=abruftabelleAuspraegungAuswahlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&code=23211-0001&auswahltext=&werteabruf=Werteabruf#abreadcrumb>.

GBE. (2021, Stand 23.06.2021). "Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert) (ab 1998)." von <https://www.gbe->

[bund.de/gbe/pkg\\_olap\\_tables.prc\\_set\\_hierlevel?p\\_uid=gast&p\\_aid=23220556&p\\_sprache=D&p\\_help=2&p\\_indnr=6&p\\_ansnr=85859822&p\\_version=2&p\\_dim=D.946&p\\_dw=14499&p\\_direction=drill](http://bund.de/gbe/pkg_olap_tables.prc_set_hierlevel?p_uid=gast&p_aid=23220556&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=6&p_ansnr=85859822&p_version=2&p_dim=D.946&p_dw=14499&p_direction=drill).

TOXNET. (2003, Stand 20.08.2018). "Toxicology Data Network: Dibenzyl Ether." von

<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6030>.

TOXNET. (2015, Stand 20.08.2018). "Toxicology Data Network: Tetrahydrofuran." von

<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+125>.

Wikipedia. (2021, 12.12.2021). "Multiphotonenmikroskop." von

<https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Multiphotonenmikroskop&oldid=218126462>.



## 9. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit an dieser Dissertation unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn Professor Dr. med. Roland M. Schmid für die Bereitstellung der technischen Einrichtungen und die Gelegenheit, meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl am Klinikum rechts der Isar absolvieren zu dürfen.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. Fabian Geisler für die Überlassung dieses überaus interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit.

Ebenso danke ich Frau PD Dr. med. Ursula Ehmer für die fortwährende Unterstützung als Promotionsmentorin.

Besonders dankbar bin ich Frau Dr. rer. nat. Simone Jörs für die geduldige Einarbeitung und einwandfreie Unterstützung als erste Ansprechpartnerin vor Ort. Frau Stephanie Dürl möchte ich zudem herzlich für die technische Unterstützung sowie allen Laborkollegen für das angenehme Arbeitsklima danken.

Nicht zuletzt danke ich meinen lieben Eltern, ohne dessen Unterstützung mein Studium und letztlich die Erstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wären.