
Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie

**Komposition der löslichen, angeborenen Immunbarriere
der Leber und deren Rolle bei pädiatrischen cholestati-
schen Lebererkrankungen und nach Lebertransplantation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Basenach, Jule

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Sturm, Ph.D.

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Schmidt

Tag der Disputation: 03.09.2025



Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Formelverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Angeborene Immunbarriere der Leber	1
1.2 Antimikrobielle Peptide	3
1.3 Neonataler Ikterus	9
1.4 Gallengangsatresie	10
1.5 Die Darm-Leber-Achse	14
1.6 Lebertransplantation im Kindesalter	16
1.7 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Patient*innenkollektiv	19
2.1.1 Übersicht über die Studienpopulation mit nativer Leber	20
2.1.2 Übersicht über die Studienpopulation mit Biopsien nach Lebertransplantation	22
2.2 Analyse der mRNA und Errechnung der Expressionslevel	23
2.2.1 RNA Isolation	23
2.2.2 Primerauswahl	23
2.2.3 Etablierung und Standardreihen	24
2.2.4 Quantitative Real-Time PCR	25
2.2.5 Überprüfung der korrekten Amplifikation durch Gelelektrophorese	26
2.2.6 Auswertung und Errechnung der Expressionslevel	26
2.3 Erhebung der klinischen Daten	28
2.4 Statistische Verfahren	28
2.4.1 Unterschiedsanalysen	29
2.4.2 Regressionsanalysen	29
2.4.3 Korrelationsanalysen	30
2.4.4 Überlebensanalysen und Kaplan-Meier-Schätzer	30
2.4.5 Auftretenswahrscheinlichkeiten anhand des χ^2 - Tests	31
2.5 Deskriptive Statistik der gemessenen Parameter und klinischen Daten	31
2.5.1 Deskriptive Statistik und Ergebnisse der Überprüfung der Voraussetzungen für die angewandten statistischen Verfahren der nativen Leberproben	32

2.5.2	Deskriptive Statistik und Ergebnisse der Überprüfung der Voraussetzungen für die angewandten statistischen Verfahren nach LTx	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Die Immunbarriere nativen Lebergewebes im Kindesalter in Physiologie und Pathologie	37
3.1.1	Die Expression des humanem β -Defensin 1 ist in fortgeschrittenen Stadien cholestatischer Lebererkrankungen im Kindesalter erhöht	37
3.1.2	LL-37 ist signifikant erhöht exprimiert in der Frühphase der GGA und korreliert mit der Expression des TGF β	44
3.1.3	Die Leberexpression des LEAP-1 ist vermindert im Verlauf pädiatrischer Cholestaseerkrankungen mit Auswirkung auf das Überleben mit nativer Leber	46
3.1.4	Die Leberexpression von Lysozym variiert zwischen den untersuchten pädiatrischen Cholestaseerkrankungen und Krankheitsstadien	48
3.1.5	Die Leberexpression der Komplementfaktoren MBL und C5 zeigt sich unverändert bei GGA, korreliert aber mit dem Outcome nach Kasai-Operation	49
3.1.6	Eine erfolgreiche Bilirubin-Clearance drei Monate nach Kasai-Operation ist assoziiert mit einer niedrigen Leberexpression von MBL.....	51
3.2	Die Immunbarriere der Leber nach pädiatrischer Lebertransplantation.....	53
3.2.1	Die Leberexpression von hBD1 ist erhöht im pädiatrischen Lebertransplantat und korreliert mit dem Serumbilirubin	53
4	Diskussion.....	56
5	Zusammenfassung	63
6	Summary	65
7	Literaturverzeichnis.....	67
8	Anhang	78
9	Eigenanteilserklärung	79
10	Danksagung	80

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1.</i> Schemadarstellung der antimikrobiellen und modulierenden Funktionen der AMPs.....	2
<i>Abbildung 2.</i> HBD1-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen.	37
<i>Abbildung 3.</i> TXN-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen.	38
<i>Abbildung 4.</i> HBD1- und TGF β -Expression aufgeteilt nach Alter bei Biopsie sowie lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor hBD1 und TGF β als abhängige Variable.	40
<i>Abbildung 5.</i> Korrelationsanalyse der Leberexpression von hBD1 bei GGA mit GOT, GPT, γ GT und CRP.	42
<i>Abbildung 6.</i> Lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor Serumbilirubin gesamt und hBD1 als abhängige Variable. ...	43
<i>Abbildung 7.</i> Kaplan-Meier-Schätzer zu erniedrigten hBD1-Expressionen und dem Alter bei Transplantation.	44
<i>Abbildung 8.</i> LL-37-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen sowie lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor LL-37 und TGF β als abhängige Variable.....	45
<i>Abbildung 9.</i> LEAP-1-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen.	47
<i>Abbildung 10.</i> Lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor Serumbilirubin gesamt und LEAP-1 als abhängige Variable.	48
<i>Abbildung 11.</i> Lysozym-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen und lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor Lysozym und TGF β als abhängige Variable.....	49
<i>Abbildung 12.</i> MBL- und C5-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen.	50
<i>Abbildung 13.</i> MBL- und C5-Expression korrelieren mit dem Outcome nach HPE.	51
<i>Abbildung 14.</i> Eine erfolgreiche Bilirubin-Clearance drei Monate nach Kasai-Operation ist assoziiert mit einem niedrigeren Risiko für eine frühe LTx und einer niedrigen MBL-Expression.	52
<i>Abbildung 15.</i> HBD1- und TXN-Expression im pädiatrischen Lebertransplantat.	54
<i>Abbildung 16.</i> Korrelationsanalyse der Leberexpression von hBD1 mit dem Serumwert des gesamten Bilirubins.	55

<i>Abbildung 17.</i> Postuliertes pathophysiologisches Modell der gemessenen Dysregulation der Expression antimikrobieller Peptide und ihrer potenziellen Rolle im Rahmen der irreversiblen Obstruktion im Krankheitsverlauf.	61
<i>Abbildung 18.</i> Signifikante Gruppenunterschiede der hBD1, LL-37 und LEAP-1-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen.	78
<i>Abbildung 19.</i> Signifikante Gruppenunterschiede der Lysozym- und TGF β -Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen.	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Deskriptive Statistik der Gesamtstichprobe.....	19
Tabelle 2.	Patient*innencharakteristika der Studienpopulation mit nativer Leber.	21
Tabelle 3.	Altersverteilung der Diagnosegruppen.	21
Tabelle 4.	Patient*innencharakteristika bei Biopsie nach LTx.....	22
Tabelle 5.	Verwendete Primer.....	24
Tabelle 6.	Deskriptive Statistik der Expressionen der nativen Leberproben.....	32
Tabelle 7.	Deskriptive Statistik der Δ CT der nativen Leberproben und der Laborparameter.....	32
Tabelle 8.	Statistik zur Prüfung der Normalverteilung der Werte des nativen Lebergewebes.	33
Tabelle 9.	Deskriptive Statistik der Expressionen und Δ CT-Werte der Leberproben und des Bilirubins nach LTx.	35
Tabelle 10.	Statistik zur Prüfung der Normalverteilung der Werte nach LTx.	36

Formelverzeichnis

Formel 1.	Letzter Rechenschritt $\Delta\Delta$ C _T -Methode.....	28
-----------	---	----

Abkürzungsverzeichnis

BA	Biliary atresia
CCR2	Chemokin-Rezeptor Typ 2
CCR6	Chemokin-Rezeptor Typ 6
CRP	C-reaktives Protein
FCE	Familiär cholestatische Erkrankungen
fFCE	frühe familiär cholestatische Erkrankungen
fGGA	frühe Gallengangsatresie
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GGA	Gallengangsatresie
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
γ GT	Gamma-Glutamyltransferase
hBD1	humanes β -Defensin 1
hBD2	humanes β -Defensin 2
HPE	Hepatoportoenterostomie
IL	Interleukin
LEAP-1	Liver Expressed Antimicrobial Peptide 1
LTx	Lebertransplantation
MBL	Mannose-binding lectin
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain protein
PFIC	Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
sFCE	späte familiär cholestatische Erkrankungen
sGGA	späte Gallengangsatresie
TNF	Tumornekrosefaktor
TGF β	Tissue Growth Factor β

TNC	Transiente neonatale Cholestase
TXN	Thioredoxin

1 Einleitung

1.1 Angeborene Immunbarriere der Leber

Die angeborene Immunbarriere der Leber stellt eine bedeutende Grenzfläche zwischen dem körpereigenen Milieu und exogenen Antigenen wie Mikroorganismen und Umweltstoffen dar, welche die Leber über die Pfortader aus dem Darm erreichen (Son et al., 2010). Um das Lebergewebe vor potenziell gefährlichen exogenen Antigenen zu schützen und gleichzeitig die Absorption von Nahrung in Form von tolerierbaren Eiweißen und anderen potenziell abwehrinduzierenden Substanzen zu ermöglichen, nimmt die angeborene Immunbarriere in der Leber eine wichtige immunmodulierende Rolle ein. Im physiologischen Zustand wird eine überschießende Entzündungsreaktion verhindert. Als Abwehrreaktion kann jedoch eine ausgeprägte adaptive Immunantwort initiiert werden (Kubes and Jenne, 2018). Antimikrobielle Peptide und Proteine (AMPs), eine diverse Gruppe an Molekülen, welche von mehrzelligen Organismen gebildet werden und ein außergewöhnlich weites Wirkungsspektrum gegen Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten aufweisen, nehmen eine besondere Funktion in dieser Erstlinien-Verteidigung ein (Zhang and Gallo, 2016). Im menschlichen Organismus wurden drei Hauptuntergruppen beschrieben: Defensine, Histatine und das Cathelicin LL-37, welche alle über ein spezifisches Aktivitätsmuster verfügen (Bals, 2000). Neben dem direkten Inaktivieren von Mikroorganismen besitzen AMPs ebenfalls die Fähigkeit, über z.B. eine Vielzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren, Komponenten des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems zu aktivieren (Abb. 1), (Hancock and Sahl, 2006; Zhang and Gallo, 2016). Subgruppen von Lymphozyten, welche als residente Immunzellen einen weiteren Teil der Immunbarriere darstellen, können nach Aktivierung durch Epithelzellen oder Kontakt mit natürlichen Killerzellen wiederum antimikrobielle Peptide produzieren (Albillos et al., 2020). Die initiierte Immunreaktion schädigt allerdings auch das umliegende Gewebe und muss nach Bekämpfung des Triggers wieder aktiv reguliert werden, um einen Schaden am gesunden Gewebe zu begrenzen. AMPs können dabei

direkt und indirekt antiinflammatorische Effekte auslösen und dabei zelluläre Komponenten des Immunsystems beeinflussen (Abb. 1), (Hazlett and Wu, 2011). Ebenfalls wurden Einflüsse auf Zellproliferation, Wundheilung, Balance von Proteasen und die Redoxhomöostase in der Literatur beschrieben (Bals, 2000). Die folgende Abbildung (Abb. 1) stellt diese beiden Wirkungsfelder nochmals anschaulich dar.

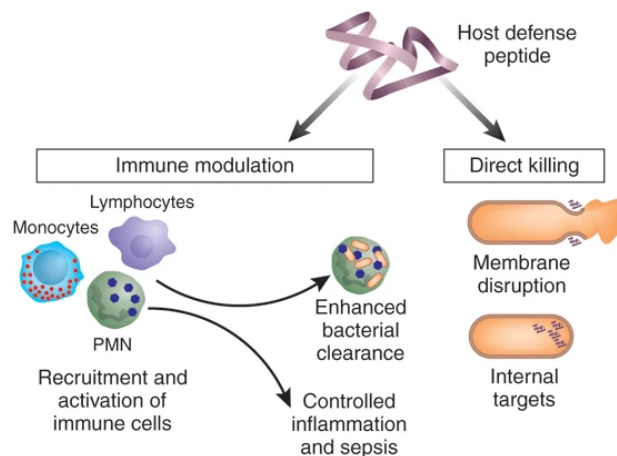


Abbildung 1. Schemadarstellung der antimikrobiellen und modulierenden Funktionen der AMPs. Die Grafik wurde übernommen aus der Publikation von Hancock and Sahl aus dem Jahr 2006 (Hancock and Sahl, 2006).

Durch die direkte Verbindung über die Pfortader besteht eine bidirektionale Beeinflussung des Immungeschehens zwischen Leber und Darm, welche auch als Darm-Leber-Achse bezeichnet wird (Albillos et al., 2020). Durch die Besiedlung des Darms mit Mikroorganismen, welche bei Kontakt mit Epithelien zu einer Immunreaktion führen können, liegt der intestinalen mukosalen Barriere eine zusätzliche Funktion inne (Caruso et al., 2020). Bestimmte AMPs kontrollieren die Homöostase, indem sie das Gleichgewicht zwischen bakteriellen Kommensalen und Pathobionten regulieren (Meade and O'Farrelly, 2018). Eine Schädigung dieses Gleichgewichts, verursacht durch eine Infektion, ein ischämisches Geschehen oder eine Dysregulation der Bestandteile des Immunsystems, kann eine erhöhte Permeabilität zur Folge haben, die durch direkten Kontakt der Mikroorganismen mit der Epithelschicht zu Zellschäden führen kann (Nalle and Turner, 2015). Dadurch entsteht eine Entzündungsreaktion, die wiederum eine

Darmdysbiose induzieren kann. Diese Veränderung des Mikrobioms im Zusammenhang mit Entzündungen kann einen ungünstigen Einfluss auf die Leberfunktion haben (Milosevic et al., 2019). Die Dysbalance zwischen Mikrobiom und Immunantwort wurde bereits als zentraler Faktor in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben (Xavier and Podolsky, 2007).

Es ist bislang nicht hinreichend geklärt, wie AMPs in der Leber im Kindesalter exprimiert werden und wie deren Regulation bei cholestatischen Lebererkrankungen gesteuert wird.

1.2 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide sind äußerst vielfältige und dynamische Moleküle und lassen sich anhand ihrer Struktur in drei Untergruppen unterteilen: Defensine, Histatine und das Cathelictin LL-37 (Bals, 2000). Defensine sind kationische Peptide mit Zystinresten, welche durch intramolekulare Disulfidbrücken ihre Struktur formen (Lehrer, 2004). Durch Unterschiede in diesen Brücken lassen sich Subgruppen differenzieren, von denen bisher α - und β -Defensine im menschlichen Körper beschrieben wurden (Semple and Dorin, 2012). Vor allem durch neutrophile Granulozyten und Epithelzellen sezerniert, können Defensine einerseits mit Strukturen der bakteriellen Zellwand interagieren, diese zerstören oder sequestrieren und die Zellwandsynthese behindern. Andererseits können sie Viren am Zelleintritt hindern oder z.B. durch Aktivierung von Chemotaxis diverser Immunzellen immunmodulatorisch wirken (Zhao and Lu, 2014). α -Defensine werden vor allem von Neutrophilen und Panethzellen des Darms exprimiert (Cunliffe, 2003). Die Relevanz der α -Defensine 5 und 6 in der Bakterienabwehr und Immunmodulation des Dünndarms wurde bereits mehrfach beschrieben (Cunliffe, 2003). β -Defensine stellen eine der zahlreichsten Klassen von antimikrobiellen Peptiden im menschlichen Körper dar und besitzen sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Aktivitäten (Semple and Dorin, 2012). Sie können durch die Hemmung der Apoptose von Neutrophilen und anderen Mechanismen die Produktion proinflammatorischer Zytokine induzieren und die Immunantwort amplifizieren (Semple and Dorin, 2012). Auf der anderen Seite werden ihnen wichtige

Funktionen in der Wundheilung und Angiogenese zugeordnet (Mangoni et al., 2016; Umehara et al., 2022). Eine Expression von β -Defensinen wurde in der Haut sowie in der Mukosa des Respirations-, des Genitourethral- und des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen (Holly et al., 2017).

Im Jahr 1999 wurde das humane β -Defensin 1 (hBD1) in Dünndarm-Xenografts konstitutiv exprimiert gemessen, während dem humanen β -Defensin 2 (hBD2) eine besondere Rolle bei Infektionen zugeschrieben wurde, da die Expression z.B. bei Salmonellen-Infektionen deutlich hochreguliert war (O'Neil et al., 1999). Neuere Studien zeigten eine erhöhte hBD1-Expression bei fortgeschrittener Lebererkrankung im Erwachsenenalter, welche mit dem Schweregrad der Cholestase, gemessen am Bilirubin im Serum, korrelierte und *in vitro* in Hepatozyten durch Bilirubin und Gallensäuren induziert werden konnte (Klag et al., 2018). In einer weiteren Studie konnten erhöhte hBD1-Serumkonzentrationen als unabhängiger Prädiktor für eine schlechtere Prognose und eine erhöhte Mortalität bei Patient*innen mit einem akuten Leberversagen bei vorbestehender Lebererkrankung beschrieben werden (Mani et al., 2019). Die Serumkonzentration des hBD1 war bei erwachsenen Patient*innen mit zirrhotischer Leber signifikant erhöht und zeigte eine moderate Korrelation mit Procalcitonin-Werten sowie der Anzahl weißer Blutzellen und neutrophiler Granulozyten (Kaltsa et al., 2016; Mani et al., 2019). Für eine effektive antimikrobielle und immunmodulatorische Aktivität benötigt hBD1 einen reduzierten Status, welcher vor allem durch die Oxidoreduktase Thioredoxin-1 (TXN) hergestellt werden kann (Jaeger et al., 2013). TXN wird ebenfalls konstitutiv exprimiert und ist mit hBD1 kolokalisiert (Jaeger et al., 2013; Klag et al., 2018). Das hBD2 gilt als eines der wichtigsten bei Infektion induzierten AMPs und zeigte in Immunoblot-Analysen vor allem in den großen Gallengängen bei obstruktiv cholestatischen Erkrankungen eine erhöhte Expression (Harada et al., 2004). Die hBD2-Expression ist sowohl über Toll-like Rezeptoren durch Kontakt von Epithelzellen mit Mikroorganismen als auch durch proinflammatorische Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) induzierbar (Harada et al., 2004; Holly et al., 2017; Lehrer, 2004). hBD2 wirkt chemotaktisch sowohl auf unreife dendritische Zellen, CD4+ T-Gedächtniszellen und Neutrophile via Bindung an den Chemokin-Rezeptor Typ 6 (CCR6), (Lehrer,

2004; Semple and Dorin, 2012) als auch auf Monozyten und Makrophagen via Bindung an den Chemokin-Rezeptor Typ 2 (CCR2), (Holly et al., 2017). CCR6-Knockout Mäuse zeigten eine signifikant verminderte Konzentration von B- und regulatorischen T-Zellen (Kim et al., 2019).

Das Cathelicidin LL-37 ist ein α -helikales, amphipathisches, positiv geladenes antimikrobielles Peptid. Es wird von Neutrophilen und Makrophagen konstitutiv, hingegen von Keratinozyten, der Synovialmembran, der Nasenschleimhaut und den Darmepithelzellen nur als Reaktion auf eine Infektion exprimiert (Sørensen et al., 1997; Zanetti, 2005). Das Peptid wirkt direkt antimikrobiell, verbindet die angeborene mit der erworbenen Immunantwort und moduliert letztere durch spezifische Aktivierung von Immunzell-Rezeptoren und der Modulation der Genexpression (B. Yang et al., 2020). Eine induzierte Expression des LL-37 in Epithelzellen kann direkt Neutrophile, Monozyten und dendritische Zellen anlocken und letztere wie auch Fibroblasten und Epithelzellen induzieren, IL-8 zu sekretieren, wodurch die Chemotaxis der Immunzellen verstärkt wird (B. Yang et al., 2020). Apolipoproteine wie das Serum-Amyloid-A (SAA), welches als deutlicher Indikator für den Schweregrad einer Inflammation im Körper fungiert, besitzen die Fähigkeit, Neutrophile noch effektiver chemotaktisch anzulocken. LL-37 wirkt dabei immunmodulatorisch, indem es diese Aktivität hemmt und somit eine überschießende Entzündungsreaktion durch SAA verhindert (B. Yang et al., 2020). Unter physiologischen Konditionen trägt es demnach zur Homöostase von Entzündungsreaktionen bei. Bei Störung des Gleichgewichts, wie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, der Psoriasis und dem Lupus erythematodes, zeigte sich LL-37 überexprimiert (Kusaka et al., 2018; Pahar et al., 2020; B. Yang et al., 2020). In Zellkulturen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen induzierte LL-37 sowohl eine ausgeprägte Inflammation, neutralisierte jedoch ebenfalls die Lipopolysaccharid-Aktivität, um eine Pathogeninvasion ins Darmgewebe zu verhindern (Kusaka et al., 2018; B. Yang et al., 2020).

Das Liver Expressed Antimicrobial Peptide 1 (LEAP-1) ist ein kurzes, cysteinereiches, kationisches antimikrobielles Peptid, auch bekannt als Hepcidin, und wird hauptsächlich von Hepatozyten produziert (Deicher and Hörl, 2004). Es wirkt antimikrobiell, indem es sowohl die intestinale Aufnahme als auch die zelluläre

Freisetzung von Eisen (z.B. ins Blut) bremst. Da Eisen ein wichtiges Stoffwechselelement für fast alle lebenden Organismen darstellt, verteidigt es den Körper bei Infektionen und Entzündungsprozessen, indem die Expression des LEAP-1 so gesteigert wird, dass nur noch deutlich verminderte Mengen an Eisen für Mikroorganismen verfügbar sind (Deicher and Hörl, 2004; Y. Yang et al., 2020). Die Expression der Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA-Expression) des LEAP-1 in der Leber Erwachsener korrelierte im physiologischen Zustand mit LEAP-1-Werten im Serum wie auch mit Ferritin im Serum, nicht jedoch mit Serumwerten des Bilirubins (Park et al., 2001; Tan et al., 2012). Im späten Stadium der Gallengangsatresie (GGA) wurden signifikant erniedrigte LEAP-1-Expressionswerte im Vergleich zum Frühstadium beschrieben (Huang et al., 2006). *In vitro* konnte eine Herunterregulierung der LEAP-1-Expression durch Gallensäuren über eine Hemmung der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung beobachtet werden (Huang et al., 2009). Die zentrale zelluläre Rolle in der Leberfibrose nehmen aktivierte hepatische Sternzellen ein, welche bei chronischer Lebergewebsschädigung zu myofibroblastenähnlichen Zellen differenzieren und einen großen Anteil an extrazellulärer Matrix darstellen. LEAP-1 hemmte in einem Mausmodell zur Leberfibrose die Aktivierung hepatischer Sternzellen durch Blockade der TGF β 1-induzierten Smad3-Phosphorylierung und wirkte einer Exazerbation der Fibrose entgegen (Han et al., 2016).

Dem antimikrobiellen Enzym Lysozym kommt eine Schlüsselrolle in der Erstlinienerverteidigung des Immunsystems zu, da es unter anderem durch Hydrolyse von Zellwandpeptidoglycan Gram-positive Bakterien abtötet und durch die Freisetzung bakterieller Produkte unter anderem NOD1- und/oder NOD-2-Signalwege (Nucleotide-binding oligomerization domain protein), Toll-like Rezeptoren und Inflammasome aktiviert (Ragland and Criss, 2017). Durch eine Vielzahl an Zellen produziert, kommt Lysozym sehr häufig im Speichel und der Mukosa vor (Bergamo et al., 2019). Im Darm wird es vor allem von Panethzellen gebildet und balanciert proinflammatorische und antiinflammatorische Effekte aus (Yu et al., 2020). In immunhistochemischen Untersuchungen bei chronischen gastrointestinalen Entzündungsgeschehen, welche bei der Zöliakie, der kollagenen Kolitis, der lymphozytären Kolitis und beim Morbus Crohn auftreten können, konnten

erhöhte Expressionswerte gemessen werden, was als Reaktion auf das in den beschriebenen Erkrankungen veränderte Mikrobiom gewertet wurde (Rubio, 2014). Lysozym-defiziente Mäuse reagierten mit einer verringerten Immunreaktion im Darm auf Bakterien, was für einen Schutz des Gewebes bei experimenteller Kolitis sprechen könnte (Yu et al., 2020). Jedoch zeigte ein weiteres Mausmodell eine erhöhte Anfälligkeit für eine intestinale Infektion mit *Listeria monocytogenes* bei defizienter Lysozymproduktion in Panethzellen (Zhang et al., 2015). Eine Analyse des Transkriptoms monozytärer Zellen nach *in vitro* Induktion durch Lysozym ergab eine Hemmung der Gene des TNF- α /IL-1 β -Signalwegs sowie anderer Gene, welche regulierend auf Entzündungsprozesse wirken, und könnte folglich einen möglichen Signalweg der entzündungseindämmenden Wirkung des Lysozyms darstellen (Bergamo et al., 2019). Auch nach oraler Verabreichung von Hühnerei-Lysozym im Mausmodell mit Lipopolysaccharid-induzierter Entzündung zeigte sich eine deutliche Reduktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 durch Lysozym in der Leber (Tagashira et al., 2019). Im Kolitis-induzierten Schweinmodell reduzierte die Gabe von Hühnerei-Lysozym die lokale Expression proinflammatorischer Zytokine und steigerte die Expression antiinflammatorischer Mediatoren (Lee et al., 2009).

Wichtige lösliche Komponenten des angeborenen Immunsystems sind die Faktoren des Komplementsystems. Bestehend aus mehr als dreißig Proteinen lässt sich das Komplementsystem in drei Signalwege einteilen: Den klassischen, den Lektin- und den alternativen Weg (Walport, 2001). Die antimikrobiellen und immunregulatorischen Mechanismen des Komplementsystems sind austariert, um fremde Strukturen zu identifizieren und körpereigene zu schonen (Walport, 2001). Bei exzessiver Aktivierung kann es zu einem Zellschaden kommen, welcher z.B. auch beim autoimmunen Geschehen eines schweren Verlaufs des hyperinflammatorischen multisystemischen Entzündungssyndrom bei Kindern gemessen wurde (Porritt et al., 2021). Bei einem Mangel an Komplementfaktoren hingegen kann der Körper anfälliger für Infektionen werden (Conigliaro et al., 2019). Das Mannose-bindende Lektin (MBL) ist ein protektiver Immunfaktor bei Neugeborenen (Super et al., 1989). Als Startmolekül des Lektin-Signalwegs agiert es als wichtiges Strukturerkennungsmolekül für eine Vielzahl an

Mikroorganismen (Takahashi and Ezekowitz, 2005; Walport, 2001) und ist in der Lage, auch antikörperunabhängig seine Effektormoleküle zu aktivieren (Worthley et al., 2005). MBL bindet an Mannose- und Zuckerstrukturen eingedrungener Mikroorganismen und kann diese so opsonisieren. Dies führt zur Aktivierung der Komplementkaskade und des erworbenen Immunsystems (Neth et al., 2000). Mehrere Studien konnten zeigen, dass ein MBL-Mangel bei Neugeborenen das Risiko für wiederkehrende Infektionen erhöht (Keizer et al., 2014). Eine MBL-Defizienz, charakterisiert durch MBL2-Genotypisierung und MBL-Plasmalevel, ist mit dem Auftreten einer neonataler Sepsis und einer Pneumonie assoziiert (Frakking et al., 2007). Paradoxerweise wurde ebenfalls eine Assoziation niedriger MBL-Expressionlevel zu Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus erythematoses und systemischen Entzündungssyndromen in mehreren Studien beschrieben (Takahashi and Ezekowitz, 2005). Das finale Effektormolekül der Signalwege der Komplementkaskade ist C5 (Vignesh et al., 2017). Die Spaltung des C5 durch die C5-Konvertase ergibt C5a, eines der potentesten Mediatoren einer Entzündung und Chemotaxis, und C5b, welches die Bildung des Membran-Attacke-Komplexes initiiert und das Endprodukt des Komplementsignalwegs darstellt (Gros et al., 2008; Vignesh et al., 2017). Im Mausmodell zeigten Mäuse, welche C5 exprimierten, nach 10-wöchiger Fütterung einer fettreichen, glukosehaltigen Diät eine deutlich aggressivere hepatische Steatose und eine deutliche zentrolobuläre Inflammation der Leber im Vergleich zu C5-defizienten Mäusen (Bavia et al., 2016). Äquivalent dazu war bei Mäusen mit C5-Mangel eine abgeschwächte Entzündungsreaktion sowie eine signifikante Reduktion der Leberfibrose zu erkennen (Schmitt et al., 2012). Bei komplement-medierten Erkrankungen wie z.B. der nächtlichen Hämoglobinurie (PNH), der anti-Acetylcholin-Antikörper-positiven generalisierten Myasthenia gravis und der anti-Aquaporin-4-Antikörper-positiven Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung konnte bereits eine effektive Befundverbesserung durch den C5-Inhibitor Eculizumab nachgewiesen werden (Mannes et al., 2021).

1.3 Neonataler Ikterus

Ein neonataler Ikterus stellt die klinische Manifestation erhöhter Bilirubinwerte im Serum dar. Eine Erhöhung des indirekten/unkonjugierten Bilirubins in den ersten zwei Lebenswochen kommt häufig beim Neugeborenen vor und tritt physiologisch z.B. muttermilchassoziiert auf (Feldman and Sokol, 2021). Bei prolongiertem Ikterus (ab 10-14 Tagen nach Geburt) ist die differenzierte Bestimmung des Bilirubins notwendig, da eine Erhöhung der direkten/ konjugierten Fraktion auf potentiell vital bedrohliche cholestatische Erkrankungen hinweisen kann, die eine schnelle und spezifische Behandlung erforderlich machen (Fawaz et al., 2017). Klinische Befunde wie eine Hepatomegalie, eine verhärtete Leberstruktur, ein heller Stuhl, dunkler Urin und/oder Juckreiz können klinisch wegweisend sein (Fischler and Lamireau, 2014). Ursachen für eine neonatale Cholestase sind vielfältig, wie z.B. Infektionen, Obstruktionen der Gallenwege, Endokrinopathien, genetische Erkrankungen, Stoffwechselstörungen, Toxin- und Medikamentenexpositionen, kardiovaskuläre Anomalien und weitere (Feldman and Sokol, 2019). Ein cholestatischer Ikterus betrifft etwa eins von 2.500 Neugeborenen (Fawaz et al., 2017). Die häufigste diagnostizierte Ursache ist die GGA mit 25–40% (Fawaz et al., 2017). Bei etwa 13% der Neugeborenen mit Cholestase ist eine kausale Diagnosestellung nicht möglich (Fawaz et al., 2017; Hoerning et al., 2014), wobei der Großteil dieser Patient*innen nur zeitweise eine Cholestase aufweist und als transiente neonatale Cholestase (TNC) geführt wird. In uni- und bivariaten Analysen konnten signifikante Assoziationen einer TNC zu den Risikofaktoren frühes Gestationsalter, niedriges Geburtsgewicht, parenterale Ernährung >7 Tage, Sepsis, Hypoxie oder hämodynamische Instabilität gefunden werden (Santos Silva et al., 2021). Wichtige Differentialdiagnosen genetischen Ursprungs stellen familiäre cholestatische Lebererkrankungen (FCE) dar, die ebenfalls oft im Kindesalter mit einer Cholestase vorstellig werden (Amer and Hajira, 2014; Gilbert and Loomes, 2021). Hervorzuheben sind dabei die Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase (PFIC) und das Alagille-Syndrom (ALGS). Die Symptome der PFIC entstehen durch einen gestörten Gallensäuretransport über die kanalikuläre Zellmembran der Hepatozyten (Davit-Spraul et al., 2009). Es werden auf Basis genetischer Varianten Subgruppen unterschieden, die einem autosomal-

rezessivem Erbgang folgen und mit einer geschätzten Inzidenz von einer auf 50.000 bis zu einer auf 100.000 Geburten auftreten (Srivastava, 2014). Die Subtypen weisen pathologische Variablen in Genen auf, welche für die Proteine FIC1 (*ATP8B1*, PFIC 1), BSEP (*ABCB11*, PFIC 2) und MDR3 (*ABCB4*, PFIC 3), TJP2 (*TJP2*, PFIC 4), FXR (*NR1H4*, PFIC 5) und MYO5B (*MYO5B*) codieren (Amirneni et al., 2020), und bedürfen in vielen schwer verlaufenden Fällen einer Lebertransplantation (LTx) in der ersten Lebensdekade, da bisher keine kausalen Therapien existieren (Amer and Hajira, 2014). Das ALGS führt zu einer verminderten Anlage von Gallengängen und ist als autosomal-dominante Multisystemerkrankung mit Fehlbildungen anderer Organe wie Herz oder Wirbelsäule vergesellschaftet (Gilbert and Loomes, 2021). Beim ALGS finden sich im Großteil der Fälle Punktmutationen im Notch-Signalweg, entweder aufgrund einer Mutation im *JAG1*-Gen oder seltener aufgrund einer Mutation im Gen, welches das neurogene Locus-Notch-homologe-Protein (*NOTCH2*) codiert (Gilbert et al., 2019). Die Angaben zur Inzidenz liegen bei etwa einem auf 30.000 Neugeborenen. Auch hier existiert bislang keine kausale Therapie und nur 40,3% der Kinder mit ALGS erreichen mit nativer Leber das Erwachsenenalter (Vandriel et al., 2023).

Bei der diagnostischen Aufarbeitung einer neonatalen Cholestase ist besonders das Erkennen oder der Ausschluss einer GGA bedeutend, da hier die frühe Diagnose und Therapie die Prognose wesentlich beeinflussen (Lien et al., 2011; Serinet et al., 2009).

1.4 Gallengangsatresie

Die GGA ist eine cholestatische Lebererkrankung des Neugeborenen und manifestiert sich häufig bereits in den ersten Lebenstagen als Ikterus, verursacht durch erhöhtes direktes Bilirubin (Noorulla et al., 2019). Ursächlich ist eine progressive inflammatorische und im Verlauf fibrotische Obstruktion der Gallengänge nach bisher unbekanntem Triggern (Kilgore and Mack, 2017). Die Neugeborenen entwickeln zunächst eine schwere Cholestase und in der Folge eine Schädigung und Fibrose der Leber, welche unbehandelt im chronischen Leberversagen endet (Bezerra et al., 2018). Mit dem Ziel, den Gallefluss

wiederherzustellen, werden die extrahepatischen Gallenwege durch eine Hepatoportoenterostomie (HPE) nach Kasai reseziert und ein Gallenabflusssystem rekonstruiert. Die Manifestation einer extrahepatischen Atresie ist zudem assoziiert mit einer Inflammation und fortschreitenden Fibrose der intrahepatischen Gallenwege. Daher ist die Prognose nach HPE, gekennzeichnet durch das komplikationsarme Überleben mit eigener (nativer) Leber, bedeutend von einer frühzeitigen Operation abhängig (Bezerra et al., 2018; Schreiber et al., 2007). Obwohl die HPE inzwischen häufiger zeitgerecht in einem geeigneten Fenster durchgeführt wird, stellt die GGA die häufigste Indikation für eine LTx im Kindesalter dar (Min et al., 2020). Eine LTx verhindert zwar das Fortschreiten der Lebererkrankung, geht jedoch mit lebenslanger Immunsuppression und den damit assoziierten Begleiterkrankungen einher (Cuenca et al., 2017). Ein Herauszögern der erforderlichen LTx ist zudem relevant, da die Auswahl geeigneter Spenderorgane bei Säuglingen und jungen Kleinkindern sehr eingeschränkt ist und zudem schwere Komplikationen häufiger als bei älteren Patient*innen auftreten (Arnon et al., 2016). Die GGA tritt bei einem von 8.000 bis 18.000 Neugeborenen mit einer starken geographischen Variation und einer leicht gehäuften Inzidenz bei weiblichen Neugeborenen auf (Bezerra et al., 2018). Verschiedene klinische Varianten wurden beschrieben, wobei in 80–90% der Fälle eine isolierte, sogenannte typische GGA auftritt. In 5–10% der Fälle sind zystische Dilatationen in den Gallengängen zu finden. Auch syndromale Phänotypen wurden beschrieben und sind charakterisiert durch zusätzliche kongenitale Anomalien, wovon die häufigsten Lateralisierungsdefekte, Milzmalformationen und Herzfehler darstellen (Bezerra et al., 2018; Davenport et al., 2006).

In der wissenschaftlichen Literatur werden zahlreiche Hypothesen der Pathogenese der GGA diskutiert. Auf der Basis experimenteller und klinischer Studien ist aktuell die führende Hypothese die Verlegung der Gallengänge durch eine von einem Virus oder einem toxischen Trigger pränatal induzierte Schädigung, welche durch eine überschießende Immunreaktion aufrechterhalten und aggraviert wird (Tam et al., 2024). Ein weiteres diskutiertes Konzept ist eine fetale oder perinatale Hypoxie, welche bedingt durch Mikro- oder Makrozirkulationsstörungen zur Inflammation beiträgt (Bezerra, 2006; Quelhas et al., 2023). Das

ausschließliche Auftreten bei Neugeborenen unterstützt die bedeutende Rolle der angeborenen Immunabwehr in der Pathogenese (Bezerra, 2006). Es wurde eine erhöhte T-Zell-Toxizität beschrieben, Toleranzdefekte der B-Zellen führten zur Autoreaktivität und CD68+ Makrophagen sowie autoreaktive IgGs akkumulierten (Wang et al., 2020). Anhand einer differenzierten Betrachtung der Immunhistochemie zeigte sich während der entzündlichen Phase eine Infiltration der Portalfelder mit CD8+ und CD4+ T-Zellen und CD68+ Makrophagen (Mack et al., 2004; Zhang et al., 2019). Von den Untergruppen der CD4+ T-Zellen, waren Th1-, Th2-, Th17- und ICOS+ Treg-Zellen bei GGA-Patient*innen im Vergleich zu Kontrollpersonen via Multiplex Immunhistochemie signifikant erhöht zu messen. ICOS als Abkürzung für induzierbarer Co-Stimulator ist ein homodimeres Protein, welches die T-Zell-Reaktionen auf fremde Antigene verstärkt (Hutloff et al., 1999). Eine verstärkte Infiltration mit ICOS+ Zellen korrelierte mit einer schlechteren Prognose, gemessen an den Serumaktivitäten der GOT und GPT sowie der Serumkonzentrationen des gesamten Bilirubins und des direkten Bilirubins 6 Monate nach HPE. Die verstärkte Infiltration ICOS- T-Zellen wurde hingegen als günstiger prognostischer Faktor beschrieben, gemessen an einer guten Funktion der Gallensäuresekretion im Verlauf (Zhang, 2019). Bei fortgeschrittener Fibrose zeigten sich vermehrt CD8+ T-Zellen und $\gamma\delta$ -T Zellen (Yang et al., 2022). Auch im Mausmodell der GGA war eine deutliche Infiltration der Portalfelder durch $\gamma\delta$ -T Zellen vorzufinden. Diese kommunizieren zwischen Aktivitäten der angeborenen und erworbenen Immunantwort und führten im GGA-Modell zu einer deutlich erhöhten Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17. Eine Hemmung dieser Überexpression des IL-17 führte schließlich zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik sowie einer Verminderung der Bilirubin-Werte und der Immunzellinfiltration in die Leber. Diese pathologische Induktion der Expression des Zytokins IL-17 konnte auch bei Leberproben erkrankter Kinder gemessen werden (Klemann et al., 2016). IL-17 kann wiederum die Produktion antimikrobieller Peptide induzieren und wurde als wichtiges Zytokin in chronischen Entzündungsprozessen beschrieben (Kuwabara et al., 2017). $\gamma\delta$ -T Zellen werden ebenfalls immunmodulierende Funktionen zugeschrieben, indem sie Foxp3+ regulatorische T-Zellen durch Antigenpräsentation induzieren (Rezende et al., 2015).

Diese Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen waren signifikant vermindert in Leberbiopsien bei GGA zu finden (Li et al., 2015), was im Mausmodell die Anfälligkeit für RRV-induzierte Verletzungen der Gallengänge erhöhte (Lages et al., 2012). Auf genetischer Ebene wurden veränderte Genexpressionsprofile und Einzelnukleotid-Polymorphismen untersucht, welche über die Aktivierung hepatischer Sternzellen eine signifikant positive Korrelation mit dem Schweregrad der Fibrose im Krankheitsprogress aufzeigten, wie z.B. für die Gene *SLIT2* und *CXCL6* beschrieben (Min et al., 2020; Zhang et al., 2021). In einer groß angelegten Genom- und Transkriptomanalyse aus Blut- und Lebergewebeproben von Kindern mit GGA wurde ein komplexes Netzwerk an veränderten Genen identifiziert, welche Fibrose, Inflammation, Immunität, Zellentwicklung und Hypoxie beeinflussen (Min et al., 2020). Weiter konnten Mutationen in Genen zur Zilienfunktion in Leberproben bei GGA identifiziert werden (Lam et al., 2021). Auch kongenitale morphologische Defekte des Gallengangsystems werden diskutiert (Vij and Rela, 2020). Zum Beispiel zeigten Neugeborene mit GGA eine Hochregulation von Liganden und der Expression von Zielgenen des Hedgehog-Signalwegs, welcher eine bedeutende Rolle in der Organogenese und dem Zell-Remodeling einnimmt (Omenetti et al., 2011). Die Annahme, dass Viren in der Pathogenese beteiligt sein könnten, wird gestützt durch die Messung gesteigerter Expressionen der Toll-like-Rezeptoren TLR3 und TLR7 in Leberproben, welche Teil des angeborenen Immunsystems sind und spezifisch Viruskomponenten erkennen (Feldman and Mack, 2012). Mäuse, welche mit Rhesus Rotavirus infiziert wurden, entwickelten, in seit 1993 umfangreichen Forschungsarbeiten reproduzierbar, eine Obstruktion der Gallengänge, welche dem Befund der erkrankten Neugeborenen nahe kommt (Allen et al., 2007; Riepenhoff-Talty et al., 1993; Wang et al., 2011). Auch menschliche Cholangiozyten zeigten in der Zellkultur vergleichbare Infektionsmuster (Coots et al., 2012). Eine Untersuchung von Rotavirus-RNA im menschlichen Gewebe oder deren Antikörper beim Neugeborenen zeigte bisher keine kongruenten Ergebnisse (Clemente et al., 2015; Mack, 2007). Jedoch scheinen in von Rotavirus infizierten neonatalen Mäusen duktale Reaktionen über den Notch-Signalweg hervorgerufen zu werden (Si et al., 2021), dessen Gene bei GGA-Leberbiopsien im Vergleich zu Kontrollleberbiopsien erhöht

exprimiert gemessen wurden (Zagory et al., 2017). In einer aktuellen weltweiten Meta-Analyse konnte bei 25,4% der Patient*innen mit GGA das Zytomegalievirus (CMV) via DNA-Nachweis in der PCR, Virusisolierung durch Kultur oder Nachweis viraler Antigene nachgewiesen werden, wobei auch hier geographische Schwankungen zu erkennen waren (Mohamed et al., 2022).

Klinisch konnten bestimmte Parameter identifiziert werden, die das Outcome nach HPE bei GGA einschätzen lassen. Die Bilirubinkonzentration im Serum als bedeutender laborchemischer Parameter einer Cholestase stellt drei und/oder sechs Monate nach HPE einen wichtigen klinischen Prädiktor zum Überleben mit nativer Leber dar (Hukkinen et al., 2020). Zudem wird ein junges Alter bei HPE als protektiv und ein Überleben mit nativer Leber als Erfolgsparameter der HPE gewertet (Chardot, 2006; Kumar et al., 2019). Als adjuvante Therapien wurden und werden folgende Ansätze diskutiert: eine Gabe von Glucocorticoiden, einer antibiotischen Prophylaxe, Ursodesoxycholsäure, Nährstoffsupplementationen oder antiviraler Pharmaka (Fligor et al., 2022). Für keinen dieser Ansätze reicht die bisherige Evidenz aus, um eine uneingeschränkte Anwendung zu empfehlen. In aktuellen klinischen Studien wird versucht durch Pharmazeutika wie z.B. N-Acetylcystein, einer Glutathionvorstufe, oder Odevixibat, einem Gallensäuretransportinhibitor, nach HPE die Gallensäuredrainage zu fördern mit dem Ziel, die Symptome zu verbessern und das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen (Hu et al., 2015; Lendahl et al., 2021). Ein weiterer Ansatz ist die Gabe des gegen das CD20-Oberflächenantigen gerichteten chimären, monoklonalen Antikörpers Rituximab zur Beeinflussung der dysregulierten Immunfunktion (Wang et al., 2020). In einem experimentellen Ansatz ist es gelungen, ex vivo in menschlichem Lebergewebe mithilfe von Organoiden die Gallengänge zu reparieren (Sampaziotis et al., 2021). Eine kausale Therapie liegt bislang nicht vor.

1.5 Die Darm-Leber-Achse

Die Darm-Leber-Achse ergibt sich aus den engen anatomischen und funktionalen Gegebenheiten der beiden Organsysteme, welche bidirektional miteinander interagieren (Milosevic et al., 2019). Das Mikrobiom des Darms und die

Immunbarriere der Leber regulieren, stabilisieren und verändern sich gegenseitig durch ein Netzwerk an metabolischen, immunologischen und neuroendokrinen Molekülen und Aktivitäten (Kho and Lal, 2018). Das Darmmikrobiom ist ein komplexes Ökosystem, bestehend aus Bakterien, Protozoen, Archaeen, Pilzen und Viren, welche im Gesunden in einer orchestrierten Symbiose miteinander und dem menschlichen Körper agieren. Diese Symbiose übernimmt einen wichtigen Teil der Verdauung, der Vitamin-B-Synthese, der Immunmodulation, der Unterstützung der Angiogenese und der Funktion des Nervensystems, was die Bedeutung für gastrointestinale, hepatische, endokrine und viele anderen Erkrankungen deutlich macht (Milosevic et al., 2019). Von hier aus kommunizieren die einzelnen Bestandteile über die Pfortader, die Gallengänge und den systemischen Kreislauf mit der Leber. Eine Dysbiose kann z.B. die Aktivierung des nukleären Gallensäure-Rezeptors FXR und des membranösen G-Protein-gekoppelten Rezeptors TGR5 reduzieren und zu einer verminderten Synthese von sekundären Gallensäuren führen. Dies kann eine Retention der Gallenflüssigkeit, eine Störung der Darmpermeabilität, ein gesteigertes bakterielles Wachstum und eine Leberschädigung zur Folge haben (Sinal et al., 2000). Die Relevanz der Darm-Leber-Achse wurde bereits für zahlreiche chronische Lebererkrankungen wie Hepatitis B, C, Alkohol-assoziierte Lebererkrankungen, die MASLD (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease), die MASH (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis) und das HCC (hepatozelluläre Karzinom) belegt (Milosevic et al., 2019). Außerdem konnte eine direkte Korrelation zwischen dem Schweregrad von Lebererkrankungen und dem Ausmaß der Dysbiose festgestellt werden (Bajaj et al., 2014). Auch bei Kindern mit diagnostizierter GGA wurde ein verändertes intestinales Mikrobiom im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit einer Zunahme der Abweichung nach Kasai-Operation beobachtet (Sun et al., 2022). Der Einfluss des Crosstalks von intestinalem Mikrobiom und hepatischer Immunbarriere auf cholestatische Lebererkrankungen im Kindesalter ist bisher kaum untersucht.

1.6 Lebertransplantation im Kindesalter

Die LTx stellt eine etablierte Behandlungsoption für Kinder mit fortgeschrittener Lebererkrankung dar (Kohli et al., 2018), was auf die erfolgreichen Ergebnisse mit mehr als 85% Überlebensraten (bei GGA 82–95%) in den meisten Zentren zurückzuführen ist (Cuenca et al., 2017; Kasahara et al., 2017). Die häufigste Indikation für eine LTx im Kindesalter ist die GGA mit 30–50% aller transplantierten Kinder, gefolgt von Kindern mit ALGS, PFIC Typ 1 oder 2 und metabolischen Erkrankungen (Cuenca et al., 2017). Während ursprünglich nur Lebererkrankungen im Endstadium wie ein Leberversagen, ein nicht resezierbarer Tumor oder eine metabolische Störung Indikationen für eine LTx darstellten, kann die Indikation mittlerweile auch bei ausgeprägten Wachstumsstörungen, hartnäckigem therapieresistentem Juckreiz, metabolischen Lebererkrankungen mit extrahepatischer Manifestation oder verschiedenen seltenen Lebertumoren bei Fehlen von Kontraindikationen diskutiert werden (Kohli et al., 2018). Eine der gefürchtetsten Komplikationen einer LTx stellt das primäre Transplantatversagen dar, welches mit einem Auftreten von 1–2% der Fälle zwar selten ist, jedoch mit einer deutlich erhöhten Mortalität einhergeht (Cuenca et al., 2017). Im Verlauf erleiden 8% der Kinder eine Thrombose der Arteria hepatica, 2–10% eine Pfortaderthrombose und in 5–25% der Fälle kommt es zu Komplikationen der rekonstruierten Gallengänge (Yazigi, 2013). Bei über der Hälfte der Transplantierten tritt innerhalb des ersten Jahres eine akute Abstoßungsreaktion auf, welche durch eine Biopsie gesichert werden muss, in der, wie auch bei chronischen Abstoßungsprozessen, oft eine Endolithiasis, eine Infiltration der Portalfelder mit Lymphozyten und eine Schädigung des Leberparenchyms zu erkennen sind (Cuenca et al., 2017). Je nach Studie zeigten 32–97% der Kinder trotz normaler Leberparameter im Serum eine chronische Entzündung und/oder eine Fibrose des Transplantats, deren Ursachen bisher nicht hinreichend geklärt sind (Vij et al., 2022). Die Transplantation bedarf aktuell einer lebenslangen Immunsuppression, die mit deutlichen Komorbiditäten einhergeht (Jadlowiec and Taner, 2016). Die Verwendung von Steroiden nach der Transplantation scheint das Risiko für arterielle Hypertension, Hyperglykämie, Hypercholesterinämie, Adipositas sowie ein beeinträchtigtes Längenwachstum zu beeinflussen und kann einen Diabetes induzieren (Fairfield et

al., 2018; Leiskau et al., 2021; Segev et al., 2008). Die bedeutendsten Nebenwirkungen von Calcineurin-Inhibitoren, welche aktuell den Goldstandard der medikamentösen Immunsuppression nach LTx darstellen, reichen von Nephrotoxizität (Liu and Mao, 2018) bis zu Lebensmittelallergien (Ozdemir, 2013). Eine weitere gefürchtete Komplikation der Immunsuppression stellen die posttransplantationslymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD) dar (Absalon et al., 2017). Die Inzidenz schwankt je nach transplantiertem Organ, Follow-up Zeit der Studie und EBV-Monitoring zwischen 1–10% bzw. 2–16% (Kremers et al., 2006; Lee et al., 2005). Die LTx ist eine gute und sichere Therapieoption für Kinder mit fortgeschrittenen Lebererkrankungen im Endstadium, jedoch sind vor dem Hintergrund der beschriebenen Komplikationen, der noch unklaren Langzeitprognose bei im Kindesalter durchgeführten Transplantationen und des Mangels an geeigneten Spenderorganen Therapien im Fokus, die zur Regeneration und langfristigen Funktionserhaltung der patienteneigenen Leber beitragen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das angeborene Immunsystem spielt eine zentrale Rolle in der Immunabwehr, indem es durch direkte Abwehr von Mikroorganismen und Induktion einer Entzündungsreaktion vor Infektionen schützt sowie diese eindämmt. Der genaue Mechanismus, inwiefern die Expression häufiger antimikrobieller Peptide, Proteine und Komplementfaktoren Einfluss auf klinische Parameter und Erkrankungsverläufe pädiatrischer cholestatischer Lebererkrankungen nimmt, verbleibt noch unzureichend erforscht. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden die Expressionsprofile der humanen β -Defensine 1 und 2 (hBD1 und hBD2), des Cathelicins LL-37, des Peptids LEAP-1, des Enzyms Lysozym sowie der Komplementfaktoren MBL und C5 in normalem und erkranktem pädiatrischen Lebergewebe erstellt, um diese im Zusammenspiel mit klinischen Parametern, Erkrankungsursachen und -verläufen zu untersuchen. Ein besonderer Fokus wurde hierbei auf mögliche Korrelationen veränderter Expressionsmuster mit dem Tissue Growth Factor- β (TGF β) gelegt, welcher als Schlüsselenzym des fibrotischen Signalwegs bei cholestatischen Lebererkrankungen beschrieben wurde und die Bildung einer Leberfibrose initiiert.

Diese Arbeit dient der Beantwortung folgender Forschungsfragen:

1. Zeigen die AMPs hBD1, hBD2, LL-37, LEAP-1, Lysozym und die Komplementfaktoren MBL und C5 ein verändertes Expressionsprofil in den verschiedenen Krankheitsstadien der GGA sowie im Vergleich zu gesunden Kontrollen, zu Kindern mit TNC und vergleichbaren cholestatischen Erkrankungen des Kindesalters? Könnten veränderte Expressionslevel zu den vermuteten pathogenetischen Faktoren eines überschießenden Entzündungsgeschehens, einer potenziellen Barrierestörung mit Translokation von Bakterien oder der Fibrosierung der Leber im Verlauf zugeordnet werden? Korrelieren die gemessenen Expressionswerte mit der Expression des profibrotischen Schlüsselenzym TGF β und/oder den etablierten Laborparametern GOT, GPT, γ GT, CRP und Bilirubin?
2. Ist eine Identifikation einzelner AMPs als potenziell selektive Biomarker zur besseren Differentialdiagnostik bei Diagnosestellung und als prädiktive Biomarker zur besseren Verlaufsbeurteilung und Risikostratifizierung bei GGA möglich? Können somit ggf. Kinder mit einer schlechteren Prognose früher identifiziert und somit enger therapeutisch betreut werden?
3. Zeigt sich das AMP hBD1 auch nach LTx bei Protokoll- und/oder Indikationsbiopsien verändert exprimiert? Bestehen Unterschiede der Expressionslevel im zeitlichen Verlauf nach LTx? Korrelieren in dieser Kohorte die gemessenen Expressionswerte mit dem etablierten Laborparametern Bilirubin? Könnte eine dysregulierte Zusammensetzung der antimikrobiellen Barriere einen neuen Ansatz zur Erklärung der chronischen Entzündungsreaktion und Fibrosierung der Leber nach LTx darstellen?

2 Material und Methoden

2.1 Patient*innenkollektiv

Die Leberbiopsien wurden von der Abteilung Kindergastroenterologie und -hepatologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Diese Biopsien wurden seit 2004 zur Diagnosestellung oder zur Kontrolle des Krankheitsverlaufes durchgeführt und teilweise in flüssigem Stickstoff sowie spätere Proben in RNA-Later® Stabilisation Solution von Sigma (Cat. No. R0901) konserviert. Dabei entstand die im Folgenden beschriebene Studienpopulation mit einem Umfang von N= 171. Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden von der Ethikkommission in Tübingen überprüft (No. 230/2021/BO2) und nach der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Die Studienpopulation der Lebergewebeproben (Tab. 1) setzt sich aus zwei Teilstichproben zusammen, welche im Folgenden einzeln betrachtet und unabhängig voneinander ausgewertet werden. Unterschieden wird zwischen Biopsien, welche nativer Leber entnommen wurden (n=77), gesundem Lebergewebe (n=10) und Biopsien, welche nach LTx durchgeführt wurden (n=84).

Tabelle 1. Deskriptive Statistik der Gesamtstichprobe.

Kohorten	n (%)
Natives Lebergewebe	77 (45,03%)
Gewebe nach LTx	84 (49,12%)
Gesundes Lebergewebe	10 (5,85%)
Geschlecht	
Männlich	99 (57,89%)
Weiblich	72 (42,11%)

Anmerkungen. N = 171.

2.1.1 Übersicht über die Studienpopulation mit nativer Leber

Im Folgenden sind die Patient*innencharakteristika der Studienpopulation mit nativer Leber anhand der Häufigkeit bzw. dem Anteil des Geschlechts, des Alters bei Biopsie sowie der Diagnose dargestellt (Tab. 2).

Um verschiedene Erkrankungen und Krankheitsstadien miteinander vergleichen zu können, wurden die Patient*innen zunächst in Diagnosegruppen unterteilt, welche den Arztbriefen zu entnehmen waren. Bei Patient*innen mit der Diagnose GGA wurde nach klinisch hinweisenden Symptomen und präoperativer Diagnostik die Diagnose intraoperativ bestätigt. Patient*innen mit einer syndromalen Erscheinungsform wurden nicht in die Studienpopulation einbezogen, da ein Einfluss weiterer Fehlbildungen auf das Expressionsprofil nicht auszuschließen war. In einem zweiten Schritt wurden die Proben der an GGA- und FCE-Erkrankten in ein frühes (fGGA bzw. fFCE) und ein Endstadium der Erkrankung (sGGA bzw. sFCE) aufgeteilt. Zum frühen Krankheitsstadium der GGA zählten die Biopsien, welche zur Diagnostik transkutan oder bei Kasai-Operation gewonnen wurden, die späten Krankheitsstadien stammten aus Explantaten bei Transplantation. Die Unterteilung der Krankheitsstadien der FCE erfolgte nach histologischem Befund. Als spätes Krankheitsstadium galten Biopsien mit zirrhotischem Lebergewebe. Bei Vorhandensein mehrerer Proben einer Patientin oder eines Patienten wurden nur die Proben verwendet, welche eine eigenständige Aussagekraft hatten, so zum Beispiel, wenn diese sich in zwei zeitlich verschiedenen Gruppen befanden (bei Diagnose oder LTx) oder wenn die Krankheitsverläufe explizit dargestellt wurden.

Zum besseren Verständnis der eingeteilten Krankheitsstadien folgt in Tabelle 3 die Altersverteilung für die einzelnen Untergruppen, angegeben in der Spannbreite des Alters bei Biopsie.

Tabelle 2. Patient*innencharakteristika der Studienpopulation mit nativer Leber.

	n (%)
Geschlecht	
Männlich	50 (57,5%)
Weiblich	37 (42,5%)
Alter bei Biopsie	
	11. Lebenstag bis 16. Lebensjahr
Median (Tage)	187
<45 Tage	16 (18,4%)
Zw. 45 und 90 Tagen	17 (19,5%)
>90 Tage	54 (62,1%)
Gruppen nach Diagnosen	
GGA Diagnosebiopsien (fGGA)	19 (21,8%)
GGA Explantat bei LTx (sGGA)	30 (34,5%)
TNC	11 (12,6%)
FCE im frühen Stadium (fFCE)	11 (12,6%)
FCE im späten Stadium (sFCE)	6 (6,9%)
Gesundes Gewebe von Tumorpatient*innen	10 (11,5%)
Alter bei LTx	
≤2 Jahre	40 (46,0%)
>2 Jahre	31 (35,6%)
Keine LTx und <2 Jahre	6 (11,5%)
Gesundes Lebergewebe (GLG)	10 (6,9%)
<i>Anmerkungen. N = 87.</i>	

Tabelle 3. Altersverteilung der Diagnosegruppen.

Diagnose	Alter bei Biopsie in LT (bzw. LJ)
fGGA	11. – 86. LT
sGGA	123. – 4404. LT (13. LJ)
TNC	19. – 74.LT
fFCE	19. – 2100. LT (6. LJ)

sFCE	312. – 5691.LT (16. LJ)
gesundes Gewebe	261. – 1849. LT (5. LJ)

Anmerkungen. LT = Lebenstage; LJ = Lebensjahre. fGGA = frühe Gallengangsatresie, sGGA = späte Gallengangsatresie, TNC = transiente neonatale Cholestase, fFCE = frühe familiär cholestatiche Erkrankungen, sFCE = späte familiär cholestatiche Erkrankungen.

2.1.2 Übersicht über die Studienpopulation mit Biopsien nach Lebertransplantation

Im Folgenden sind die Patient*innencharakteristika der Studienpopulation bei Biopsie nach LTx anhand der Häufigkeit bzw. dem Anteil des Geschlechts, des Alters bei Biopsie, der Altersverteilung sowie der Biopsieindikation dargestellt (Tab. 4).

Tabelle 4. Patient*innencharakteristika bei Biopsie nach LTx.

	n (%)
Geschlecht	
Männlich	49 (58,33%)
Weiblich	35 (41,6%)
Alter bei Biopsie	
Minimum	4 Monate
Maximum	227 Monate
Altersverteilung	
<1Jahr	10 (11,9%)
Zw. 1 und 5 Jahren	33 (39,29%)
Zw. 6 und 10 Jahren	18 (21,43%)
>10 Jahre	23 (27,38%)
Transplantatalter bei Biopsie	
<1Jahr	34 (40,48%)
Zw. 1 und 5 Jahren	22 (26,19%)
Zw. 6 und 10 Jahren	16 (19,04%)

>10 Jahre	12 (14,29%)
-----------	-------------

Gruppen nach Biopsieindikation

Indikationsbiopsie	45 (53,57%)
--------------------	-------------

Protokollbiopsie	39 (46,43%)
------------------	-------------

Anmerkungen. N = 84. Die gesunden Kontrollen sind nicht erneut aufgeführt (Vgl. Tab. 4).

2.2 Analyse der mRNA und Errechnung der Expressionslevel

2.2.1 RNA Isolation

Die gesamte RNA wurde aus Leberbiopsien extrahiert. Hierfür wurde im gefrorenen Zustand mit einem sterilen Fadenmesser ein Stück entnommen und unter dem Abzug direkt in Röhrchen mit 400–600 µl TRIzol und Bashing Beats (2 mm) von Zymo Research überführt. Die Menge an TRIzol wurde der entnommenen Probengröße angepasst. Mithilfe der Fast Prep (Fast-Prep-24™ beat beating grinder und lysis system) von MP Biomedicals wurde das Gewebe je nach Probengröße bei zwei bzw. drei Durchgängen von je 40 Sekunden und einer Einstellung auf 40x aufgeschlossen. Die RNA wurde mithilfe des Direct-zol RNA Miniprep Plus (Cat. No. R2073) isoliert und mit DNase 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zentrifugationsschritte fanden bei 14.000xg bis 16.000xg statt und die Säule wurde nach dem DNase-Verdau dreimal gewaschen, um eine möglichst reine RNA zu erhalten. Abschließend wurde die RNA je nach erwarteter Konzentration in 60 bzw. 100 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Um die Quantität und Qualität der RNA zu messen, wurde ein Nanodrop™2000- Spektralphotometer verwendet. Die anschließend aliquotierten Proben wurden bei –80°Celsius gelagert. Durch die Reinigung der Arbeitsflächen und Materialien mit RNase-ExidusPlus von PanReac AppliChem konnte die Qualität und Quantität der RNA gewährleistet werden.

2.2.2 Primerauswahl

Die Primerpaare wurden in Bezug auf die Publikation von Klag, et al. (Klag et al., 2018) ausgewählt oder mithilfe der Webseite Primer 3 Input erstellt. Die Zielgröße

wurde auf 100 bis 300 Basenpaare festgelegt, das Längenoptimum lag bei 20 Basen, die optimale T_m bei 59 °C mit einer maximalen Differenz von 3°C und einem GC-Gehalt zwischen 45–70%. Zusätzlich enthalten die Primer, wenn möglich, eine Intron-überspannende Sequenz. Die für diese Arbeit verwendeten Primer Sequenzen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5. Verwendete Primer.

Name	5' ->3' Sequenz vorwärts	5' ->3' Sequenz rückwärts
GAPDH	cca gcc gag cca cat cgc tc	atg agc ccc agc ctt ctc cat
TXN JC 1	tgg tga agc aga tcg aga gca ag	tga agc aac atc ctg aca gtc atc
hBD-1 TK	ggc ctc agg tgg taa ctt tct	ttc ttc tgg tca ctc cca gc
hBD-2 JC ori	ata ggc gat cct gtt acc tgc c	cat cag cca cag cag ctt ctt g
TGF beta JC 1	gca agt gga cat caa cgg gtt c	gtg gcc atg aga agc agg aaa g
LL-37 JC 1	gac aca gca gtc acc aga gga t	tca caa ctg atg tca aag gag cc
MBL	tag tag cct ggc tgc ctc aga a	cac cat tgg tca gga aga act tg
C5	gac agt gct gtg tat gga gtc c	cca gct agg tgg aac aca ttg g
LEAP-1	ctg acc agt ggc tct gtt ttc c	aag tgg gtg tct cgc ctc ctt c
Lysozym	act aca atg ctg gag aca gaa gc	gca caa gct aca gca tca gcg a
GAPDH new	gtc tcc tct gac ttc aac agc g	acc acc ctg ttg ctg tag cca a

2.2.3 Etablierung und Standardreihen

Für jeden Primer wurden zur Etablierung Standardreihen erstellt sowie eine Negativkontrolle (Non-Template-Kontrolle) durchgeführt. Die in den Versuchen verwendeten unterschiedlich hohen Primer-Konzentrationen beruhen auf den

Ergebnissen von Standardreihen mit verschiedenen Konzentrationen. Hiermit konnte die korrekte Primerbindung maximiert und falsche Anlagerungen minimiert werden. Für die Parameter humanes β -Defensin 3 und 4 konnten trotz der Verwendung verschiedener Primer keine für eine Messung ausreichenden Standardreihen etabliert werden, weshalb diese nicht in die Messungen aufgenommen wurden. Um eine maximale Standardisierung zu erhalten, wurden zunächst die Standardreihen mit der Quantitativ PCR Human Referenz Total RNA von Agilent durchgeführt, welche folgende Zelllinien enthielt:

- Adenokarzinom (Brustdrüse)
- Hepatoblastom (Leber)
- Adenokarzinom (Zervix)
- embryonales Hodenkarzinom (Testis)
- Glioblastom (Gehirn)
- Melanom (Haut)
- Liposarkom
- Histiocytäres Lymphom (Makrophagen, Histiocyten)
- Lymphoblastische Leukämie (T-Lymphoblast)
- Plasmazytom, Myelom (B-Lymphozyten)

Die Startkonzentration lag bei 500 ng/ μ l und es wurde eine 4er-Verdünnungsreihe angewandt. Da bei den Primern hBD1 und hBD2 hiermit keine ausreichende Spannweite erreicht werden konnte, wurde aus 13 beliebigen Proben ein RNA-Pool erstellt. Es wurde auf ein repräsentatives Verhältnis aus verschiedenen Diagnosen geachtet. Die Startkonzentration dieses Pool betrug 595,9 ng/ μ l, was später in die Rechnungen miteinbezogen wurde. So konnte eine größere Konzentrationsspannweite abgedeckt werden.

2.2.4 Quantitative Real-Time PCR

Die fluoreszenzbasierte quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) stellt zurzeit den Goldstandard zur Quantifizierung der Menge an mRNA-Transkripten dar (Feuer et al., 2015). Die reverse Transkription zu cDNA und die Quantifizierung erfolgten in einem Schritt. Hierfür wurde das iTaq™

Universal SYBR Green One-Step Kit von Bio-Rad verwendet. Die qRT-PCR wurde mit einem Reaktionsvolumen von 10 μ l durchgeführt, welches sich aus Primern mit je 1 μ M (bzw. 800 nM) für den forward-Strang, 1 μ M (bzw. 800 nM) für den reverse-Strang, template RNA mit einer Konzentration von 10 ng/ μ l sowie 5 ng/ μ l, dem Quantifast Mix, dem Quantifast RT Mix und nucleasefreiem Wasser zusammensetzte. Die unterschiedliche Primerkonzentrationen beruhten auf der Etablierung der Primer anhand von Standardreihen. Die Reaktionen wurden auf der MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate von Applied Biosystems ange-setzt. Zu jeder Probe wurden 4 Replikate gemessen, je 10 ng und 5 ng Konzentration im ersten Durchgang, welcher nochmals auf einer unabhängigen Platte wiederholt wurde.

Die reverse Transkription erfolgte bei 10 Minuten auf 50 °C. Während dieser Phase war die HotStarTaq Plus DNA-Polymerase noch inaktiv. Zur Aktivierung erfolgte als Nächstes ein Schritt von 5 Minuten bei 95 °C. Die Denaturierung fand bei 95°C für 15s statt, die kombinierte Anlagerungs- und Extensionsphase betrug 50 Sekunden bei 60°C. Es liefen 40 Zyklen.

2.2.5 Überprüfung der korrekten Amplifikation durch Gelelektrophorese

Um die Amplifikation der korrekten DNA-Fragmente in den Standardkurven bei Etablierung der Primer und in fraglichen Probenmessungen zu prüfen, wurden diese über 1,5% Agarosegele elektrophoretisch bei 120 V für ca. 35 Minuten aufgetrennt. Als Längenreferenz wurden je 5 μ l Gen-Ruler 50 bp verwendet. Auf 10 μ l Probe kamen 2 μ l 6xLadepuffer. Als Färbung wurde SYBR Green verwendet.

2.2.6 Auswertung und Errechnung der Expressionslevel

Die Auswertung erfolgte durch die QuantStudio™Design and Analysis Software®. Zunächst wurden die Schmelzkurven der Standardreihen ausgewertet und die Primer, welche unspezifische Bindung aufwiesen, ausgeschlossen. Die Identifikation unspezifischer Bindungen erfolgte anhand einer Schmelzkurve, welche nicht mit der zu erwartenden Schmelztemperatur übereinstimmte und oftmals ebenfalls in der Negativkontrolle zu finden war. Im zweiten Schritt wurden

die C_t -Kurven analysiert. Diese sollten einen klaren Peak aufweisen und einen ausreichenden Bereich abdecken. Im Rahmen der Etablierung wurde eine 4-fache Verdünnung als beste Einstellung festgesetzt. Eine höhere Verdünnung führte zu einer geringeren Anzahl verwertbarer Kurven. Außerdem sollte die Steigung der Standardkurve zwischen -3 und $-3,6$ betragen. Alle Standardkurven von Primern mit einem R^2 -Wert unter $0,95$ und einer Effizienz über 115% wurden ausgeschlossen, um Fehlamplifikationen oder fehlerhafte Messungen zu vermeiden. In solchen Fällen wurden neue Primerpaare erstellt und etabliert. Der Threshold wurde bei fehlgeschlagenem Logarithmus manuell angepasst. Dieser wurde auf das untere Drittel der linearen Steigung der C_t -Kurve gelegt.

Da die Primer hBD2 TK, hBD JC2 und hBD JC3 nur Amplifikationen ähnlich denjenigen der Negativkontrolle aufwiesen, wurde ein Gel-Elektrophorese durchgeführt, um potenzielle unspezifische Banden zu erkennen. Auch hier konnte keine spezifische Amplifikation festgestellt werden. Die Primer wurden nicht für die Analyse verwendet.

Auch bei den gemessenen Proben wurden zunächst Schmelzkurven und C_t -Kurven analysiert. Wenn die Schmelzkurve des Primers für GAPDH bei mehr als zwei der Replikate nicht an der für den Parameter passenden Temperatur aufzufinden war, wurde die Messung aller Parameter dieser Probe mit einem neu designierten Primer für GAPDH (GAPDHnew) wiederholt. Wenn auch dann keine korrekte Bindung des Primers zu erzielen war, wurde die Probe nicht in die Studienpopulation eingeschlossen, da davon auszugehen ist, dass das Gewebe im Entnahme- oder Konservierungsprozess zu sehr beschädigt wurde, um eine sinnvolle Aussage zu treffen.

Wenn jedoch eine Messung von GAPDH und allen anderen gemessenen Parametern dieser Probe möglich war, sich bei hBD2 jedoch eine zu kleine oder keine Schmelzkurve an der erwarteten Temperatur vorfand, kann davon ausgegangen werden, dass die Probe intakt, hBD2 jedoch nur unter der Nachweisgrenze exprimiert wurde. In diesem Fall wurde die Expression auf einen C_t -Wert von 40 festgelegt und Berechnungen hiermit durchgeführt.

Anhand der C_t -Werte konnte mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen et al. (Livak and Schmittgen, 2001) die relative Expression ermittelt werden. Hierfür wurden die C_t -Werte auf die des Housekeeping Gens (*GAPDH*) derselben Probe und der gleichen Konzentration normalisiert. Es wurden die Mittelwerte der Replikate verwendet. Im nächsten Schritt wurden die Werte auf den Mittelwert der C_t -Werte der gesunden Kontrollen normalisiert und dann durch einen letzten Schritt mithilfe der im Folgenden gezeigten Formel die relative Expression berechnet.

Formel 1. Letzter Rechenschritt $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

$$\text{fold expression} = 2^{-(\Delta\Delta C_T)}$$

2.3 Erhebung der klinischen Daten

Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte retrospektiv mithilfe des Verwaltungsprogramms SAP® und der Laborsoftware Lauris®. Die Diagnosen wurden aus den Arztbriefen übernommen. Die Biopsie-Daten konnten aus den Pathologieberichten entnommen werden. Die Labordaten entstammen entweder alten Arztberichten, eingescannten Laborberichten oder dem System Lauris. Teilweise waren nicht alle Daten zu erheben, da das Biopsiedatum zu weit zurücklag und die Daten nicht ins Programm aufgenommen wurden sowie keine analogen Dokumente zur Verfügung standen. Es wurde bei den direkten Bilirubin-Werten drei Monate nach Kasai-Operation eine Abweichung von maximal einem Monat vor bzw. nach Blutentnahme toleriert. Im Anschluss wurden die Daten pseudonymisiert in IBM® SPSS® Statistics (IBM Corporation, 2022) übernommen und dort sowie in Graph Pad Prism 10.1 ausgewertet.

2.4 Statistische Verfahren

Für eine statistische Überprüfung von Mittelwertsunterschieden wurden Unterschiedsanalysen, für eine Überprüfung potenzieller Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern bzw. Fibrosemarkern und den Expressionslevels regressionsanalytische Verfahren bzw. Korrelationsanalysen und im Anschluss

Überlebensanalysen mittels Kaplan-Meier-Schätzer durchgeführt. Diese werden im Folgenden genauer erläutert.

Zur Auswertung wurde das Statistikprogramm IBM® SPSS® Statistics (IBM Corporation, 2022) verwendet. Für die Darstellung der Ergebnisse und weitere statistische Auswertungen wurde das Programm Graph Pad Prism 10.2.3 genutzt.

2.4.1 Unterschiedsanalysen

Intervallskalenniveau und Unabhängigkeit der Messwerte wurden vorausgesetzt. Zur Prüfung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test, welcher zur Testung der Normalverteilung den Goldstandard darstellt, durchgeführt (Razali and Wah, 2011; Yap and Sim, 2011). Von einer Normalverteilung kann ausgegangen werden, wenn ein nicht signifikantes Ergebnis vorliegt ($p > ,05$). Die Homoskedastizität wurde mithilfe des Levene-Tests ermittelt. Bei einem nicht signifikanten Ergebnis ($p > ,05$) kann von einer Varianzhomogenität ausgegangen werden. Bei gegebener Varianzgleichheit wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt und ein Tukey-HSD Post Hoc Test angeschlossen, da dieser eine gute Balance zwischen zu konservativen und zu liberalen Testverfahren bietet. Wenn keine Varianzgleichheit vorzufinden war, wurde eine Welch-ANOVA angewandt, welche als robuster dem Fehler 1. Art gegenüber gilt (Rasch et al., 2011) und ein Games-Howell Post-hoc Test angeschlossen.

Bei Parametern mit deutlichen Ausreißern, welche nicht klinisch zu begründen waren, wurde auf eine Kruskal-Wallis-Analyse mit anschließenden paarweisen Vergleichen zurückgegriffen.

2.4.2 Regressionsanalysen

Um einen möglichen Zusammenhang veränderter Expressionsprofile mit der Fibrosierung der Leber und die Beeinflussung der Expressionen durch Laborparameter zu untersuchen, wurden einfache lineare Regressionsanalysen berechnet.

A priori wurde der Datensatz auf Linearität, Ausreißer, Unabhängigkeit der Residuen, Homoskedastizität der Residuen und Normalverteilung der Residuen überprüft sowie Multikollinearität ausgeschlossen. Anhand visueller Inspektion der

Daten in Streudiagrammen wurden nicht-lineare Zusammenhänge und Homoskedastizität der Residuen kontrolliert, indem überprüft wurde, ob die Messpunkte im Streudiagramm gleichmäßig über die horizontale Achse verteilt waren. Anhand der studentisierten ausgeschlossenen Residuen wurde der Datensatz auf Ausreißer untersucht. Eine Unabhängigkeit der Residuen wurde anhand der Durbin-Watson-Statistik überprüft, wonach Werte, welche näherungsweise zwei betragen, darauf hindeuten, dass keine Autokorrelation in den Residuen anzunehmen ist. Eine Multikollinearität wurde anhand der VIF-Werte examiniert, wobei ein Wert >10 als starkes Indiz für eine Multikollinearität definiert wurde. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt. Zur Berechnung der Stärke des linearen Zusammenhangs wurde der Determinationskoeffizient R^2 berechnet. R^2 dient als quantitatives Bestimmtheitsmaß und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Zur Einstufung der Varianzaufklärung wurde die Interpretation von R^2 nach Cohen herangezogen, wobei Werte von $R^2 = 0.02$ für eine schwache, Werte von $R^2 = 0.13$ für eine moderate und Werte von $R^2 = 0.26$ für eine starke Varianzaufklärung sprechen. Zunächst stellten die Expressionen der AMPs die Prädiktoren dar, während die Expression von TGF β als abhängige Variable (Kriterium) festgelegt wurde. In einer zweiten Berechnung diente der Laborparameter Bilirubin als Prädiktor, während die Expressionslevel der AMPs als abhängige Variable fungierten.

2.4.3 Korrelationsanalysen

Bei Verletzung der Normalverteilungsannahme wurden nicht parametrische Spearman Korrelationen durchgeführt. Dies betraf die Laborparameter GOT, GPT und CRP als Prädiktoren, während die Expressionslevel die abhängigen Variablen darstellten. Die Voraussetzungen waren ein mindestens ordinalskaliertes Skalenniveau und eine paarweise Beobachtung.

2.4.4 Überlebensanalysen und Kaplan-Meier-Schätzer

Für die Überprüfung potenzieller Zusammenhänge zwischen den Expressionsprofilen und dem Überleben mit nativer Leber wurden Überlebensanalysen berechnet. Der Status des Ereignisses war folglich „Ereignis“ zum Zeitpunkt der LTx

und „zensiert“, wenn bis zum Ende des Beobachtungszeitraums ein Überleben mit nativer Leber gegeben war. Da die meisten LTx bei Kindern mit GGA in den ersten beiden Lebensjahren durchgeführt werden, ist eine ansatzweise gleiche Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Ereignisses, unabhängig davon, wann die Biopsie stattfand, anzunehmen. Auch von einer näherungsweise ähnlichen Zensierung der Gruppen kann ausgegangen werden. Es wurde ein Chi-Quadrat-Test angewandt und anhand des Logrank-Tests überprüft, ob signifikante Zusammenhänge zwischen den zwei Gruppen der Überlebenskurven bestehen.

2.4.5 Auftretenswahrscheinlichkeiten anhand des χ^2 - Tests

Ein χ^2 -Test wurde durchgeführt, um die Häufigkeiten eines direkten Bilirubinwertes unter 2 mg/dl zum Zeitpunkt von drei Monaten nach Kasai-Operation und die der Durchführung einer LTx vor bzw. nach dem 1. Lebensjahr auf Abhängigkeit zu prüfen. Die Variablen müssen normalskaliert sein und eine Unabhängigkeit der Messungen muss gegeben sein. Bei Zellhäufigkeiten <5 wurde der exakte Test nach Fischer-Freemann-Halton verwendet.

2.5 Deskriptive Statistik der gemessenen Parameter und klinischen Daten

Die Expressionslevel wurden mithilfe der in Kapitel 2.2.6 beschriebenen $\Delta\Delta$ -CT-Methode errechnet und für die graphische Darstellung verwendet, da sie anschaulich die Unterschiede und Zusammenhänge zwischen den Gruppen aufzeigen (Tab. 6 und 9). Für die statistischen Tests wurden die Δ CT-Werte verwendet, welche weniger anfällig für Verzerrungen sind, da der letzte Schritt des Logarithmierens nicht durchgeführt wurde (Tab. 7 und 9).

2.5.1 Deskriptive Statistik und Ergebnisse der Überprüfung der Voraussetzungen für die angewandten statistischen Verfahren der nativen Leberproben

In den folgenden Tabellen sind die deskriptiven statistischen Analysen der Expressionslevel und der Δ CT-Werte der nativen Leberproben sowie der Laborparameter dargestellt.

Tabelle 6. Deskriptive Statistik der Expressionen der nativen Leberproben.

	M	Md	SD	SEM	Min	Max	Q1	Q3
Alter	616,10	187	1073,21	115,06	11	5691	56	625
hBD1_fold	4,5	2,14	7,66	,82	,03	61,08	,76	5,54
TXN_fold	1,47	1,23	,81	,1	,33	3,93	,88	1,94
LL-37_fold	5,88	1,67	12,84	1,4	,09	80,3	,66	4,13
LEAP-1_fold	,75	,39	,96	,10	,00	5,38	,05	1,16
Lysozym_fold	1,72	1,13	1,76	,19	,13	10,84	,7	2,09
hBD2_fold	42,1	11,85	235,06	25,29	,00	2208,06	4,26	22,03
MBL_fold	1,15	,90	,81	,10	,06	3,94	,56	1,44
C5_fold	1,17	,97	,78	,09	,14	3,31	,62	1,58
TGF β _fold	2,09	1,45	2,03	,24	,28	12,07	,99	2,39

Anmerkungen. M = Mittelwert. Md = Median. SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler. Min = Minimum. Max = Maximum. Q1 = 25. Perzentile. Q3 = 75. Perzentile.

Tabelle 7. Deskriptive Statistik der Δ CT der nativen Leberproben und der Laborparameter.

	M	MD	SD	SEM	Min	Max	Q1	Q3
hBD1_ Δ CT	,85	,72	2,06	,22	-4,16	6,63	-,70	2,31
TXN_ Δ CT	-1,70	-1,65	,80	,10	-3,33	,24	-2,3	-1,16
LL-37_ Δ CT	9,17	9,29	2,10	,23	3,71	13,46	7,99	10,63
LEAP-1_ Δ CT	-,14	-1,12	3,2	,35	-4,9	8,88	-2,68	1,85
Lysozym_ Δ CT	2,18	2,22	1,30	,14	-1,04	5,31	1,33	2,92
hBD2_ Δ CT	9,73	8,25	3,96	,42	0,71	20,73	7,36	9,73

MBL_ΔCT	-1,07	-1,11	1,16	,14	-3,24	2,77	-1,78	-,41
C5_ΔCT	-2,07	-2,12	,99	,12	-3,89	,72	-282	-1,47
TGFβ_ΔCT	2,65	2,72	1,10	,13	-,33	5,09	2,01	3,27
Bilirubin ges.	6,36	6,20	5,16	0,61	0,2	27,5	1,45	9,43
GOT	309,83	175,5	433,49	51,09	32	2617	78,25	329,75
γGT	271,55	145,0	314,64	37,88	15	1244	56,50	353,50
CRP	,88	,2	1,91	,23	,00	13,9	,03	1,24

Anmerkungen. M = Mittelwert. Md = Median. SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler. Min = Minimum. Max = Maximum. Q1 = 25. Perzentile. Q3 = 75. Perzentile. Bilirubin [mg/dl], CRP [mg/dl]; GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, γGT = Gamma-Glutamyltransferase; GOT, GPT, γGT = U/L.

Intervallskalenniveau und Unabhängigkeit der Messwerte waren gegeben. Eine Normalverteilung konnte anhand des Shapiro-Wilk-Test bei den Parametern hBD1, TXN, TGFβ, C5, LL-37 nachgewiesen werden ($p > 0,05$). Da es sich um dasselbe Probenmaterial bei allen gemessenen antimikrobiellen Peptiden handelt und die einfaktorielle ANOVA relativ robust gegenüber Verletzungen der Normalverteilungsannahme ist (Blanca et al., 2017), wurde auch bei den anderen Parametern inhaltlich eine Normalverteilung angenommen (Tab. 8).

Tabelle 8. Statistik zur Prüfung der Normalverteilung der Werte des nativen Lebergewebes.

	KI-	KI+	df	p
hBD1_ΔCT	,41	1,29	87	,37
TXN_ΔCT	-1,89	-1,51	70	0,84
LL-37_ΔCT	8,72	9,63	84	0,16
LEAP-1_ΔCT	-,83	,54	85	>,00
Lysozym_ΔCT	1,9	2,46	86	,82
hBD2_ΔCT	8,88	10,57	87	>,001
MBL_ΔCT	-1,4	-,79	68	,01
C5_ΔCT	-2,31	-1,83	68	,46
TGFβ_ΔCT	2,39	2,91	70	,43

Bilirubin ges.	5,15	7,58	72	<,00
Bilirubin_fGGA	7,83	10,86	18	,52
Bilirubin_sGGA	3,38	9,46	21	<,00
Bilirubin_fFCE	1,29	7,56	9	,23
Bilirubin_sFCE	-10,92	28,39	3	,68
Bilirubin_TNC	5,84	8,81	11	,3

Anmerkungen. KI = 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts. KI- = Untergrenze Konfidenzintervall. KI+ = Obergrenze Konfidenzintervall. df = Freiheitsgrade. p= Signifikanz des Shapiro-Wilk-Tests. $p \leq ,05$; Bilirubin in [mg/dl].

Bei der Berechnung der Homoskedastizität war bei den Parametern hBD1, TXN, Lysozym, TGF β , MBL und C5 eine Varianzgleichheit gegeben und es wurde eine einfaktorische ANOVA angewandt und ein Tukey-HSD Post Test angeschlossen. Bei gegebener Varianzgleichheit bei den Parametern LL-37 und LEAP-1 wurde eine Welch-ANOVA und ein Games-Howell post-hoc Test angewandt.

Aufgrund der starken Varianz und Streuung der Expressionsmessung des hBD2 konnte keine valide Aussage zu dessen Expression im Lebergewebe cholestatischer Lebererkrankungen im Kindesalter abgeleitet werden. Daher wurde dieses Peptid von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Auch die Voraussetzungen für die Korrelations- und Regressionsanalysen wurden geprüft. In Streudiagrammen, in welchen die nicht standardisierten vorhergesagten Werte und die studentische Residualgröße dargestellt waren, konnte ein nicht-linearer Zusammenhang ausgeschlossen und bei den Parametern hBD1, TXN, TGF β , LL-37, LEAP-1, Lysozym, MBL und C5 eine Varianzgleichheit der Residuen als gegeben festgelegt werden. Ausgehend von den studentisierten ausgeschlossenen Residuen mit einem festgelegten Bereich von -3 und 3 wurden folgende Ausreißer gefunden und ausgeschlossen (GOT = 2617 U/L; Bilirubin_gesamt= 27.5 mg/dl; GPT = 2020 U/L; CRP = 13.9 mg/dl; γ GT = 1244 U/L). Die Durbin-Watson-Statistik ergab einen Wert von 2.19 für TGF β , 1.92 für Bilirubin gesamt, 2.26 für GOT, 2.25 für GPT, 2.11 für CRP, 2.42 für γ GT, was auf eine Unabhängigkeit der Residuen schließen lässt und somit nicht von einer Autokorrelation ausgegangen werden muss. In der Kollinearitätsstatistik lag der

höchste VIF-Wert der Parameter bei 4.58, wodurch kein Indiz für eine Multikollinearität gegeben war. Die Normalverteilung der Expressionsprofile der gemessenen Parameter wurde bereits bei der Prüfung der Voraussetzungen der Mittelwertvergleiche beschrieben. Auch bei den Laborparametern wurde eine lineare Regression nur bei Gruppen verwendet, welche anhand des Shapiro-Wilk-Tests normalverteilt sind. Bei GOT, γ GT und CRP wurde aufgrund einer nicht gegebenen Normalverteilung die nicht-parametrische Spearman Korrelation durchgeführt. Die Laborparameter dienen als Prädiktoren, während die Expressionslevel die abhängigen Variablen darstellen. Die Voraussetzungen eines mindestens ordinalskalierten Skalenniveau und die notwendige paarweise Beobachtung waren gegeben. Für den χ^2 -Test waren normalskalierte Variablen und eine Unabhängigkeit der Messungen gegeben. Da nicht alle Zellenhäufigkeiten über 5 liegen, wurde der exakte Test nach Fischer-Freemant-Halton verwendet.

2.5.2 Deskriptive Statistik und Ergebnisse der Überprüfung der Voraussetzungen für die angewandten statistischen Verfahren nach LTx

In den folgenden Tabellen ist die statistische deskriptive Analyse der Expressionslevel, der Δ CT-Werte sowie des Bilirubins nach LTx dargestellt (Tab. 9). Die Expressionslevel wurden mithilfe der in Kapitel 2.2.6 beschriebenen $\Delta\Delta$ -CT-Methode berechnet. Diese wurden vor allem für die graphische Darstellung verwendet, da sie anschaulich Unterschiede und Zusammenhänge zwischen den Gruppen aufzeigen. Für die statistischen Tests wurden die Δ CT-Werte verwendet, welche weniger anfällig für Verzerrungen sind, da der letzte Schritt des Logarithmierens nicht durchgeführt wird.

Tabelle 9. Deskriptive Statistik der Expressionen und Δ CT-Werte der Leberproben und des Bilirubins nach LTx.

	M	Md	SD	SEM	Min	Max	Q1	Q3
Alter (Jahre)	6,75	5,00	5,93	,65	,00	18	1,00	11,00
hBD1_fold	12,59	2,78	35,89	3,99	,10	193,04	1,56	6,27
TXN_fold	5,99	1,37	16,69	1,82	,02	99,02	,74	2,30

hBD1_ΔCT	,08	,29	2,03	,23	-5,83	5,07	-,88	1,12
TXN_ΔCT	-2,06	-1,8	1,87	,20	-7,98	4,14	-2,56	-,92
Bilirubin total	1,54	,50	3,75	,46	,10	28,3	0,40	1,18

Anmerkungen. M = Mittelwert. Md = Median. SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler. Min = Minimum. Max = Maximum. Q1 = 25. Perzentile. Q3 = 75. Perzentile.

Intervallskalenniveau und Unabhängigkeit der Messwerte waren gegeben. Durch die Berechnung des Shapiro-Wilk-Test konnte keine Normalverteilung nachgewiesen werden (Tab. 10). Folglich wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test mit anschließenden paarweisen Vergleichen mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Tabelle 10. Statistik zur Prüfung der Normalverteilung der Werte nach LTx.

	KI-	KI+	df	p
hBD1_ΔCT	-,16	,68	91	<,001
TXN_ΔCT	-2,38	-1,62	91	<,001

Anmerkungen. Gesunde Kontrollen sind mit einbezogen; KI = 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts. KI- = Untergrenze des Konfidenzintervall. KI+ = Obergrenze des Konfidenzintervall. df = Freiheitsgrade. p= Signifikanz des Shapiro-Wilk-Tests. $p \leq ,05$.

Für die Überprüfung potenzieller Zusammenhänge zwischen den Variablen wurde die Spearman-Korrelation angewandt. Der Laborparameter Bilirubin diente als Prädiktor, während die Expressionslevel die abhängigen Variablen darstellten. Die Voraussetzungen eines mindestens ordinalskalierten Skalenniveau und die notwendige paarweise Beobachtung waren gegeben.

3 Ergebnisse

Aufbauend auf den deskriptiven Analysen erfolgte eine statistische Prüfung der postulierten Forschungshypothesen, deren berechneten Ergebnisse im Folgenden zu finden sind.

3.1 Die Immunbarriere nativen Lebergewebes im Kindesalter in Physiologie und Pathologie

3.1.1 Die Expression des humanem β -Defensin 1 ist in fortgeschrittenen Stadien cholestatischer Lebererkrankungen im Kindesalter erhöht

In Leberbiopsien erwachsener Patient*innen mit Lebererkrankungen wurde bereits eine erhöhte Expression des hBD1 beschrieben (Klag et al., 2018). Der folgende Abschnitt fasst die Daten zur Expression von hBD1 bei cholestatischen Lebererkrankungen im Kindesalter zusammen.

In der Leber bei GGA und FCE zeigt sich eine signifikant erhöhte hBD1-Expression im Vergleich zum Lebergewebe bei TNC (Abb. 2A). HBD-1 ist signifikant erhöht in den Spätstadien der GGA und der FCE im Vergleich zu den Frühstadien und zu normalem, altersgerechtem Lebergewebe (Abb. 2B). Dieser Anstieg der Expression kann ebenfalls im Krankheitsverlauf einzelner Patient*innen mit GGA beobachtet werden (Abb. 2C).

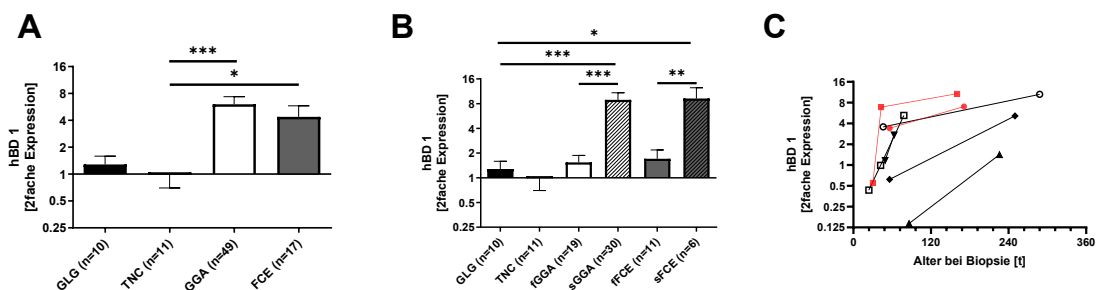


Abbildung 2. HBD1-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen. Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von hBD1 (A) im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei transient neonataler Cholestase (TNC), Gallengangsatresie (GGA) und familiär cholestatischen Erkrankungen (FCE); (B) im gesunden

pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei transientser neonataler Cholestase (TNC), GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA), GGA zum Zeitpunkt der LTx (sGGA), FCE im frühen Krankheitsstadium (fFCE) und FCE im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (sFCE); (C) im Krankheitsverlauf einzelner Patient*innen mit GGA mit seriellen Biopsien; ■/● = LTx im 6. Lebensmonat; ▲ = LTx im 8. Lebensmonat; ▼/◆ = LTx im 9. Lebensmonat; ○ = LTx im 10. Lebensmonat; □ = LTx im 20. Lebensmonat. Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 6 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels einfaktorieller ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet; * = $p \leq ,05$; ** = $p \leq ,01$; *** = $p \leq ,001$; relevante Signifikanzen sind aufgezeigt, alle Weiteren sind im Anhang in Abb. 18 zu finden.

3.1.1.1 Die Expression von TXN, einem Aktivator von hBD1, verbleibt unverändert

Eine Eigenschaft des hBD1 besteht darin, dass es vorwiegend in reduziertem Milieu aktiv ist. TXN wurde als vorrangiger Reduktionsfaktor beschrieben, der essenziell für die Aktivierung des Peptids ist (Jaeger et al., 2013; Schroeder et al., 2011). Um zu prüfen, ob auch dieser beschriebene Aktivator erhöht exprimiert wird, wurde die Expression von TXN aus dem gleichen Lebergewebe bestimmt.

Die Expression von TXN bei der GGA, TNC und FCE ist nicht signifikant verändert verglichen mit normalem Lebergewebe (Abb. 3).

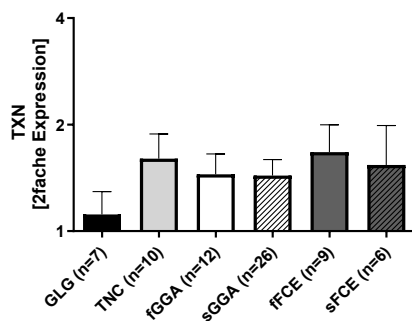


Abbildung 3. TXN-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen. Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von TXN im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei transientser neonataler Cholestase (TNC), GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA), GGA zum Zeitpunkt der LTx (sGGA), FCE im frühen Krankheitsstadium (fFCE) und FCE im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (sFCE). Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 6 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels einfaktorieller ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet.

3.1.1.2 Die hBD1-Expression steigt signifikant in der Krankheitsprogression und korreliert mit dem profibrotischen Zytokin TGF β

TGF β ist ein profibrotisches Zytokin und ein wichtiger früher Aktivitätsmarker der Fibrose bei cholestatischen Lebererkrankungen wie der GGA (Dewidar et al., 2019; Iordanskaia et al., 2013). Unter anderem durch Aktivierung hepatischer Sternzellen wird durch vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix eine epithelial-mesenchymale Umwandlung induziert und die Bildung einer Leberfibrose initiiert (Harada et al., 2009; Iordanskaia et al., 2013; Li et al., 2016). Um sich einem profibrotischen Effekt von hBD1 zu nähern und zu prüfen, ob die deutliche Induktion der hBD1-Expression mit der des profibrotischen Zytokin TGF β korreliert, wurde die hBD1-Expression mit der TGF β -Expression nach Alter bei Biopsie und damit Stadium der pädiatrischen Lebererkrankung verglichen und lineare Regressionsanalysen durchgeführt.

Mit steigendem Alter bei Biopsie zeigt sich bei GGA eine tendenziell höhere TGF β -Expression simultan zu einer signifikant höheren hBD1-Expression (Abb. 4A und B). Die hBD1-Expression im Lebergewebe der GGA ist bei Biopsie nach dem 90. Lebensjahr signifikant erhöht (Abb. 4A). Die Regressionsanalysen zeigen bei GGA (Abb. 4A) und FCEs (Abb. 4B) eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des hBD1 und der Expression des TGF β .

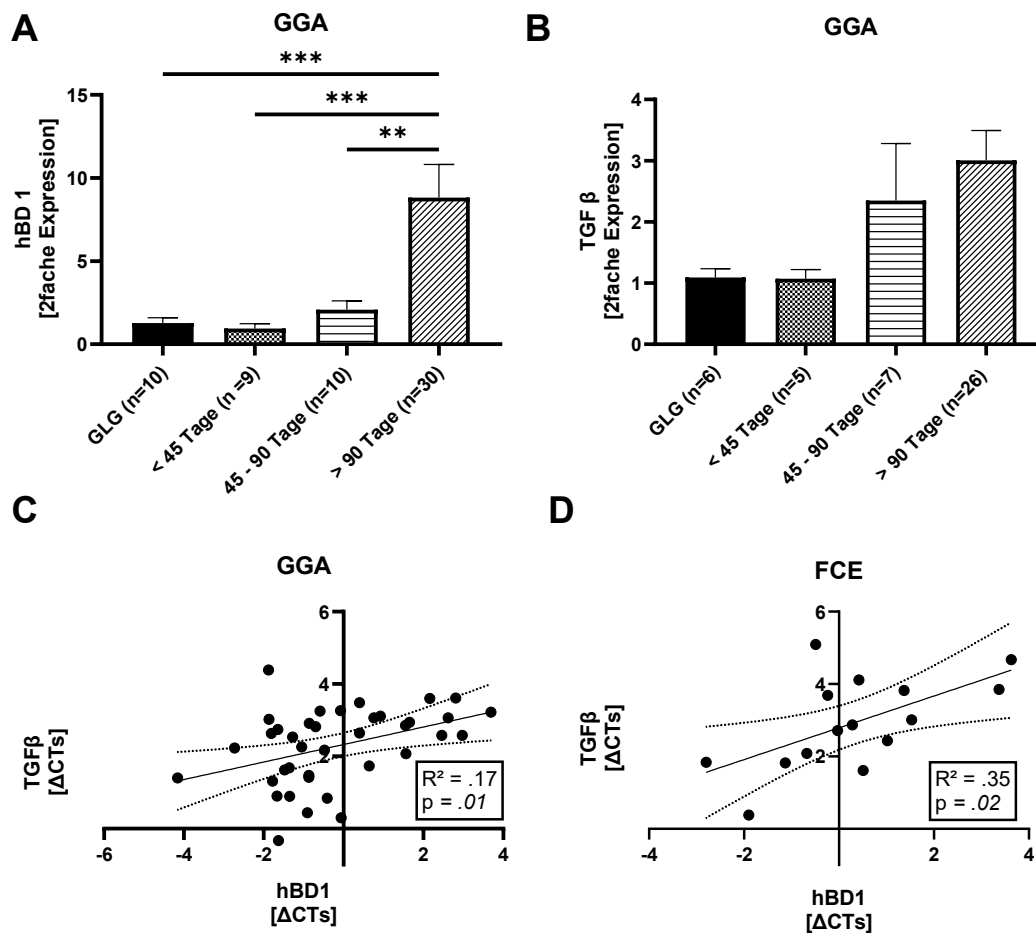


Abbildung 4. HBD1- und TGFβ-Expression aufgeteilt nach Alter bei Biopsie sowie lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor hBD1 und TGFβ als abhängige Variable. Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von (A) hBD1 und (B) TGFβ bei GGA im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), im Alter von < 45 Lebenstagen, zwischen 45 und 90 Lebenstagen und > 90 Lebenstagen. Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 5 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet; * = $p \leq ,05$; *** = $p \leq ,001$; ΔCTs des hBD1 aus Leberbiopsien korreliert mit TGFβ-ΔCT-Werten bei (C) GGA und (D) FCE. R^2 = Determinationskoeffizient. Interpretation der Varianzaufklärung nach Cohen: $R^2 = 0,02$ = schwache, $R^2 = 0,13$ = moderate, $R^2 = 0,26$ = starke Korrelation. $p \leq ,05$ = signifikant.

3.1.1.3 Die Expression von hBD1 korreliert mit der Leberzellintegrität, jedoch nicht mit dem Serumbilirubin in pädiatrischen cholestatischen Lebererkrankungen

In der Routinediagnostik für cholestatische Lebererkrankungen erlauben die Serum-Transaminasen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) eine Beurteilung der Hepatozytenschädigung, während die Gamma-Glutamyl-Transferase (γGT) einen laborchemisch

etablierten Cholestasemarker darstellt und auf eine Schädigung der Cholangiozyten hinweist (Fawaz et al., 2017; Lu et al., 2014). Mithilfe der Spearman Korrelation wurde untersucht, ob ein potenzieller Zusammenhang der Expression von hBD1 in der GGA und den Serumwerten von GOT, GPT und γ GT besteht.

Die Leberexpression von hBD1 bei GGA korreliert signifikant mit den untersuchten Parametern. γ GT und hBD1 zeigen eine positive Korrelation (Abb. 5C). GOT und GPT korrelieren invers mit der Leberexpression von hBD1 (Abb. 5A und B).

Als antimikrobielles Peptid wird hBD1 in Abhängigkeit eines Entzündungsgeschehens hochreguliert (Ryan, 2017). Um zu überprüfen, ob es sich bei der nachgewiesenen Dysregulation der hBD1-Expression um ein primär lokales Geschehen handelt oder auch systemisch Veränderungen des Entzündungsparameters C-reaktives Protein (CRP) zu messen sind, wurde auch dieser Laborparameter aus der Routinediagnostik zum Zeitpunkt der Biopsie analysiert.

Die Leberexpression von hBD1 in der GGA korreliert signifikant negativ mit CRP im Serum zum Zeitpunkt der Biopsie (Abb. 5D).

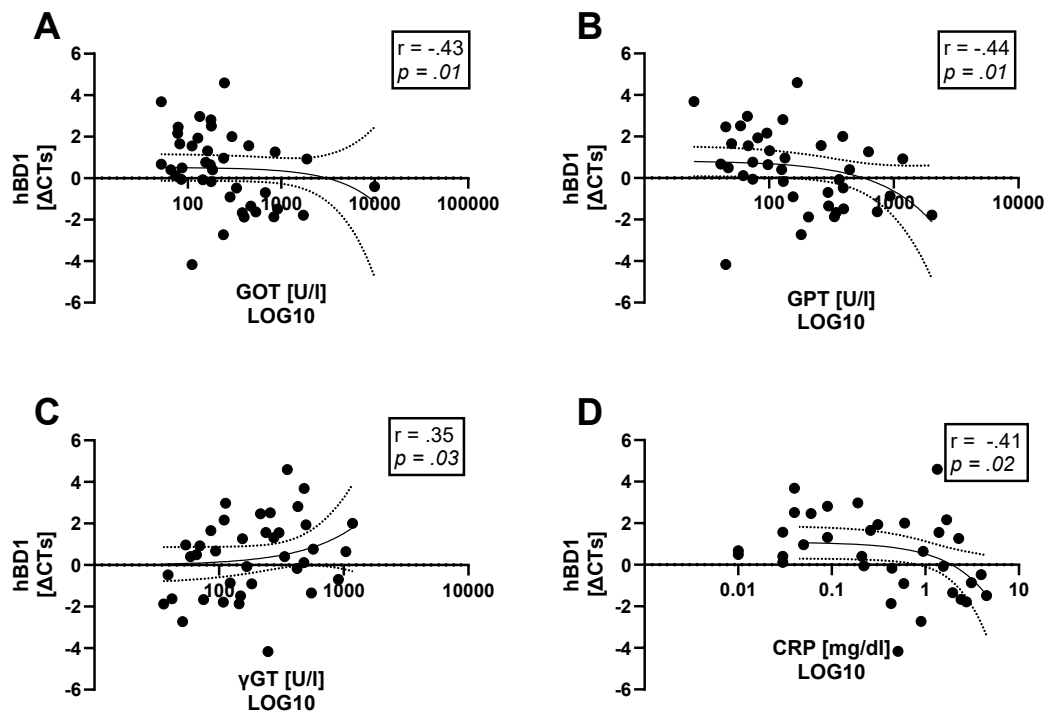


Abbildung 5. Korrelationsanalyse der Leberexpression von hBD1 bei GGA mit GOT, GPT, γ GT und CRP. Spearman Korrelation für hBD1 bei GGA korreliert mit Serumwerten des (A) GOT, (B) GPT, (C) γ GT und (D) CRP. r = Korrelationskoeffizient: $r = 1$ = perfekte positive Korrelation; $r = 1$ bis 0 = positive Korrelation; $r = 0$ = keine Korrelation; $r = 0$ bis -1 = negative Korrelation; $r = -1$ = perfekte negative oder inverse Korrelation. $p \leq .05$ = signifikant.

Serumbilirubin konnte als ein potenzieller Induktor von hBD1 bei Erwachsenen beschrieben werden (Klag et al., 2018). Um dies für unsere Kohorte der pädiatrischen Cholestaseerkrankungen zu untersuchen, wurden lineare Regressionsanalysen mit den Werten des gesamten Serumbilirubins als Prädiktor und den Expressionsprofilen von hBD1 als abhängige Variable durchgeführt.

Es zeigt sich weder bei den Kindern mit GGA (Abb. 6A und D) noch bei den Kindern mit einer transienten neonatalen Cholestase (Abb. 6C) oder FCE (Abb. 6B und E) eine signifikante Korrelation zwischen Serumbilirubin und der Leberexpression von hBD1.

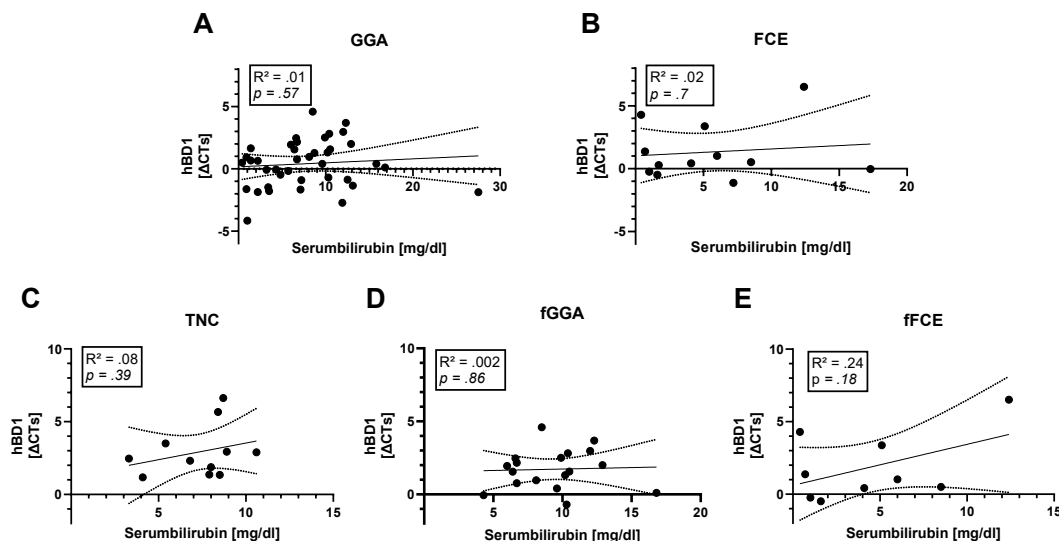


Abbildung 6. Lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor Serumbilirubin gesamt und hBD1 als abhängige Variable. Δ CTs des hBD1 aus Leberbiopsien bei (A) Gallengangsatriese (GGA), (B) familiären cholestatischen Erkrankungen (FCE), (C) transients neonataler Cholestase (TNC), (D) GGA zum Diagnosezeitpunkt (fGGA) und (E) FCE im frühen Krankheitsstadium (ffCE) korreliert mit der Konzentration des gesamten Serumbilirubins zum Zeitpunkt der Biopsie. R^2 = Determinationskoeffizient. Interpretation der Varianzaufklärung nach Cohen: $R^2 = 0,02$ = schwache, $R^2 = 0,13$ = moderate, $R^2 = 0,26$ = starke Korrelation. $p \leq ,05$ = signifikant.

3.1.1.4 Eine niedrige Leberexpression von hBD1 bei GGA ist mit längerem Überleben mit nativer Leber assoziiert

Um zu überprüfen, ob eine veränderte Leberexpression von hBD1 mit dem Überleben mit nativer Leber bei GGA assoziiert ist, wurde mittels Kaplan-Meier-Schätzer die Wahrscheinlichkeit des Überlebens mit nativer Leber bei niedriger Leberexpression von hBD1 (Expression $\leq 0,5$) verglichen mit der Wahrscheinlichkeit bei höheren Expressionswerten (Expression $> 0,5$).

Eine höhere Expression von hBD1 in der Leber bei GGA zum Zeitpunkt der Diagnose ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine frühere LTx und somit ein kürzeres Überleben mit nativer Leber assoziiert (Abb. 7A). Bei FCE-Biopsien im frühen Krankheitsstadium zeigt sich insgesamt eine spätere Notwendigkeit einer LTx sowie bei hBD1-Expressionswerten $> 0,5$ ein Überleben mit nativer Leber bis zum 20. Lebensjahr (Abb. 7B).

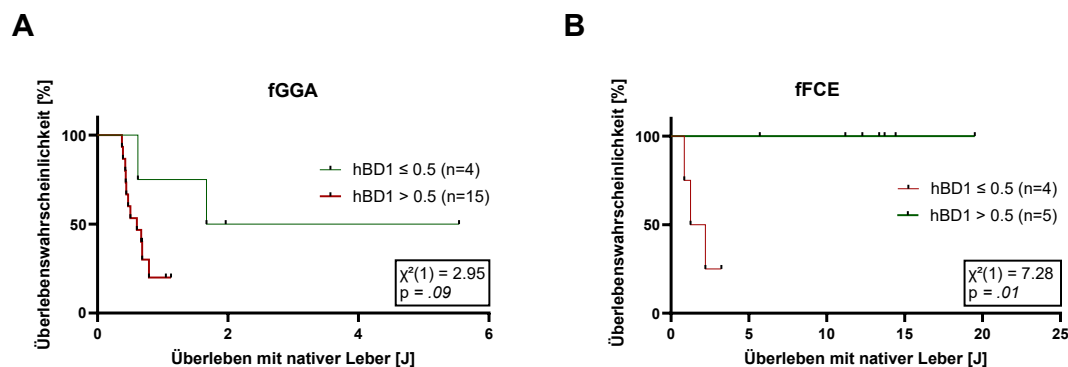


Abbildung 7. Kaplan-Meier-Schätzer zu erniedrigten hBD1-Expressionen und dem Alter bei Transplantation. Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von hBD1 bei (A) fGGA und (B) fFCE. χ^2 = Wert der Teststatistik in der Chi-Quadrat-Verteilung zur Berechnung des p-Wertes anhand des Logrank-Tests; $p \leq ,05$ = signifikant.

3.1.2 LL-37 ist signifikant erhöht exprimiert in der Frühphase der GGA und korreliert mit der Expression des TGF β

LL-37 wurde sowohl als direkt antimikrobiell wirkendes Peptid beschrieben als auch als Modulator der erworbenen Immunantwort durch spezifische Aktivierung von Rezeptoren der Immunzellen und Beeinflussung der Genexpression (B. Yang et al., 2020). Um zusätzlich zu den Unterschiedsanalysen einen potenzielle profibrotische Korrelation des LL-37 zu erörtern, wurden Regressionsanalysen der jeweils gleichen Biopsie durchgeführt.

Die Leberexpression von LL-37 ist im Frühstadium der GGA im Vergleich zu normalem Lebergewebe und zum Spätstadium der GGA signifikant erhöht (Abb. 8A). Im Krankheitsverlauf von 7 Patient*innen mit GGA verbleibt die LL-37-Expression im Lebergewebe entweder auf gleichem Niveau oder fällt ab (Abb. 8B). Die Regressionsanalysen zeigen sowohl bei der GGA als auch bei FCEs in den Frühstadien der Erkrankungen (fGGA und fFCE) eine signifikant positive Korrelation zwischen der Leberexpression von LL-37 und der Expression des profibrotischen Markers TGF β (Abb. 8C und D). Bei einer Betrachtung aller Proben zeigt sich eine signifikante Korrelation ebenfalls bei der gesamten Gruppe der FCE (Abb. 8E), jedoch keine Signifikanz bei TNC und der gesamten Gruppe der GGA (Daten nicht gezeigt).

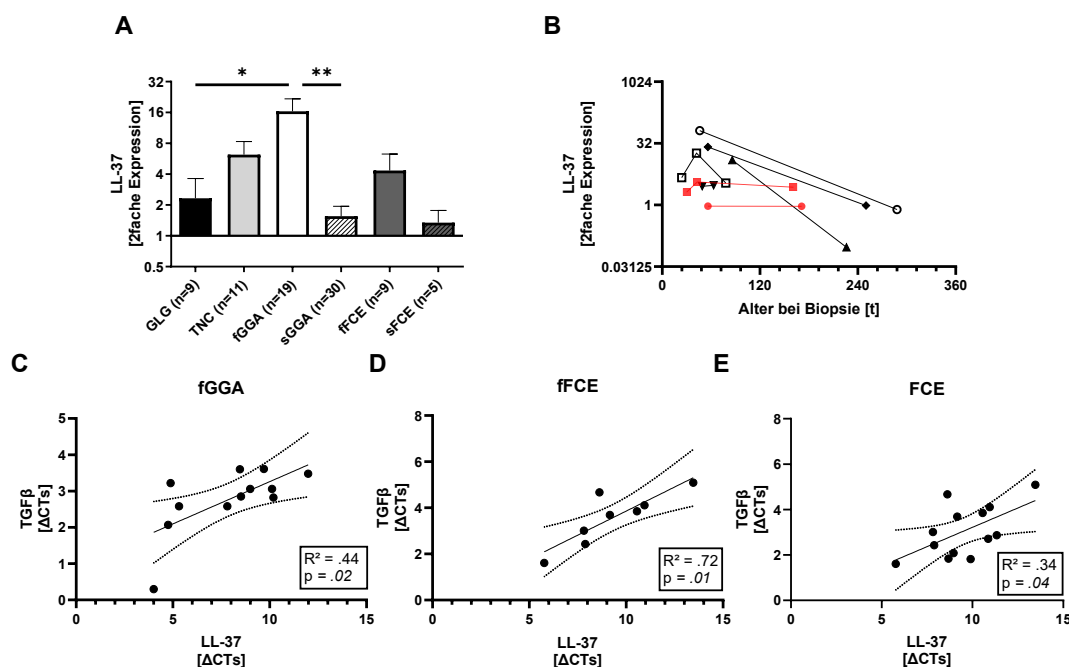


Abbildung 8. LL-37-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen sowie lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor LL-37 und TGFβ als abhängige Variable. Zweifache Expression, normalisiert zu GAPDH, von (A) LL-37 im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei transientser neonataler Cholestase (TNC), GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA), GGA zum Zeitpunkt der LTx (sGGA), FCE im frühen Krankheitsstadium (fFCE) und FCE im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (sFCE); (B) LL-37-Expression im Krankheitsverlauf einzelner Patient*innen mit GGA mit seriellen Biopsien; ■/● = LTx im 6. Lebensmonat; ▲ = LTx im 8. Lebensmonat; ▼/◆ = LTx im 9. Lebensmonat; ○ = LTx im 10. Lebensmonat; □ = LTx im 20. Lebensmonat. Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 5 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels Welch-ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet; * = $p \leq ,05$; ** = $p \leq ,01$; ΔCTs des LL-37 aus Leberbiopsien korreliert mit TGFβ-ΔCT-Werten bei (C) fGGA, (D) fFCE und (E) FCE. R^2 = Determinationskoeffizient. Interpretation der Varianzaufklärung nach Cohen: $R^2 = 0,02$ = schwache, $R^2 = 0,13$ = moderate, $R^2 = 0,26$ = starke Korrelation; $p \leq ,05$ = signifikant; relevante Signifikanzen sind aufgezeigt, alle Weiteren sind im Anhang in Abb. 18 zu finden.

Ein Zusammenhang der LL-37-Expression mit erhöhten Bilirubin-Serumwerten wurde bislang nicht untersucht. Mittels linearer Regressionsanalysen mit den Werten des gesamten Serumbilirubins als Prädiktor und den Expressionsprofilen des LL-37 als abhängige Variable zeigt sich weder bei Kindern mit GGA im Frühstadium oder allen GGA Patient*innen, noch bei den Kindern mit einer transienten Cholestase, fFCE oder FCE eine signifikante Korrelation zwischen Serumbilirubin und der Leberexpression von LL-37 (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Die Leberexpression des LEAP-1 ist vermindert im Verlauf pädiatrischer Cholestaseerkrankungen mit Auswirkung auf das Überleben mit nativer Leber

Dem Protein LEAP-1, auch als Hecpudin bekannt, kommt durch seine führende Rolle im Eisenmetabolismus und seiner immunregulatorischen Funktionen eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunabwehr zu (Cherayil et al., 2011).

Unsere Untersuchungen zeigen eine signifikant verminderte Expression des LEAP-1 im Lebergewebe bei fortgeschrittenem Stadium der GGA (Abb. 9A). Im Krankheitsverlauf von 6 Patient*innen mit GGA fällt die LEAP-1-Expression im Lebergewebe im Verlauf der Erkrankung deutlich ab (Abb. 9B).

Zudem wurde berechnet, ob sich Gruppenunterschiede der LEAP-1-Expressionen aufzeigen, wenn die Gruppen nach klinischem Verlauf eingeteilt wurden. Der objektivierbare Zeitpunkt der LTx wurde als Kriterium genutzt, um Gruppen zu bilden und Kinder, die innerhalb (fLTx) oder nach (ILTx) dem ersten Lebensjahr eine LTx erhielten, zu differenzieren. Für weitere Analysen eines Einflusses einer erniedrigten LEAP-1 Expression auf den Zeitraum bis zum festgesetzten Endpunkt LTx, wurden Leberbiopsien der Kinder im Frühstadium der GGA in die Gruppen mit $LEAP-1 \leq 0.5$ - und > 0.5 unterteilt und mittels Kaplan-Meier-Schätzer verglichen.

Es zeigt sich eine signifikant niedrigere Leberexpression von LEAP-1 bei den Kindern mit GGA, welche innerhalb des 1. Lebensjahres eine LTx erhielten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Abb. 9C). Des Weiteren zeigt sich bei fGGA die Tendenz eines kürzeren Überlebens mit nativer Leber bei niedriger LEAP-1-Expression (Abb. 9D).

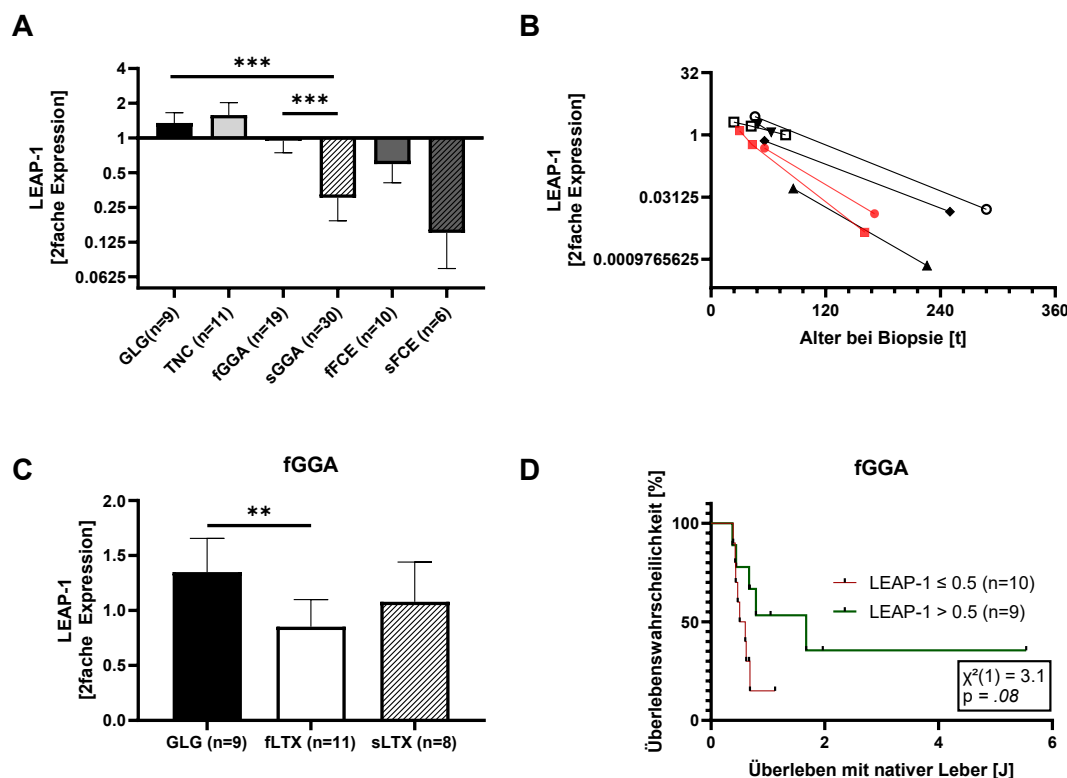


Abbildung 9. LEAP-1-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen. Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von LEAP-1 **(A)** im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei transienter neonataler Cholestase (TNC), GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA), GGA zum Zeitpunkt der LTx (sGGA), FCE im frühen Krankheitsstadium (fFCE) und FCE im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (sFCE); **(B)** im Krankheitsverlauf einzelner Patient*innen mit GGA mit seriellen Biopsien; **■/●**= LTx im 6. Lebensmonat; **▲**= LTx im 8. Lebensmonat; **▼/◆**= LTx im 9. Lebensmonat; **○**= LTx im 10. Lebensmonat; **□**= LTx im 20. Lebensmonat; **(C)** im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei einer LTx innerhalb des 1. Lebensjahres (fLTx) oder nach dem 1. Lebensjahr (sLTx); **(D)** Kaplan-Meier-Schätzer, zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von LEAP-1 ≤ 0.5 und LEAP-1 ≥ 0.5 bei GGA im Frühstadium. Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 6 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels Welch-ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet; *** = $p \leq 0.001$; ** = $p \leq .01$; χ^2 = Wert der Teststatistik in der Chi-Quadrat-Verteilung zur Berechnung des p-Wertes anhand des Logrank-Tests; *relevante Signifikanzen sind aufgezeigt, alle Weiteren sind im Anhang in Abb. 18 zu finden.*

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen erhöhten Bilirubinwerten bei Cholestase und der LEAP-1-Expression wurden lineare Regressionsanalysen mit den Werten des gesamten Serumbilirubins als Prädiktor und den Expressionsprofilen des LEAP-1 als abhängige Variable durchgeführt.

Es zeigt sich weder bei den Kindern mit GGA im Frühstadium (Abb. 10B) noch bei den Kindern mit einer transienten Cholestase (Abb. 14A) oder FCE im

Frühstadium (Abb. 10C) eine signifikante Korrelation zwischen Serumbilirubin und der Leberexpression von LEAP-1.

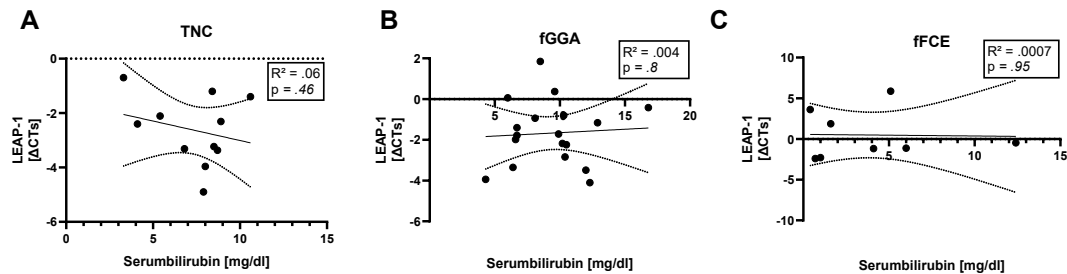


Abbildung 10. Lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor Serumbilirubin gesamt und LEAP-1 als abhängige Variable. Δ CTs des LEAP-1 aus Leberbiopsien bei (A) transienter neonataler Cholestase (TNC), (B) GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA) und (C) FCE im frühen Krankheitsstadium (fFCE) korreliert mit der Konzentration des gesamten Serumbilirubins zum Zeitpunkt der Biopsie. R^2 = Determinationskoeffizient. Interpretation der Varianzaufklärung nach Cohen: $R^2 = 0,02$ = schwache, $R^2 = 0,13$ = moderate, $R^2 = 0,26$ = starke Korrelation. $p \leq ,05$ = signifikant.

3.1.4 Die Leberexpression von Lysozym variiert zwischen den untersuchten pädiatrischen Cholestaseerkrankungen und Krankheitsstadien

In immunhistochemischen Untersuchungen chronischer gastrointestinaler Entzündungsgeschehen, welche bei der Zöliakie, der kollagenen Kolitis, der lymphozytären Kolitis und beim Morbus Crohn auftreten können, wurden erhöhte Lysozym-Expressionswerte gemessen (Rubio, 2014). Vor dem Hintergrund der Bedeutung der Barrierefunktion bei GGA und FCE wurde die Expression von Lysozym untersucht.

Bei GGA ist im Vergleich zu gesundem, altersgerechtem Lebergewebe kein signifikanter Unterschied in der Expression von Lysozym zu erkennen (Abb. 11A). Jedoch zeigt sich im Verlauf bei FCE ein signifikanter Anstieg der Expression von Lysozym im Lebergewebe sowie ein signifikanter Unterschied der Expression bei GGA bei Diagnosestellung und FCE im frühen Krankheitsstadium (Abb. 11A). Ein Anstieg der Lysozym-Expression korreliert zudem bei FCE mit der Expression des profibrotischen Aktivitätsmarker TGF β (Abb. 11B), nicht jedoch bei der GGA (Daten nicht gezeigt).

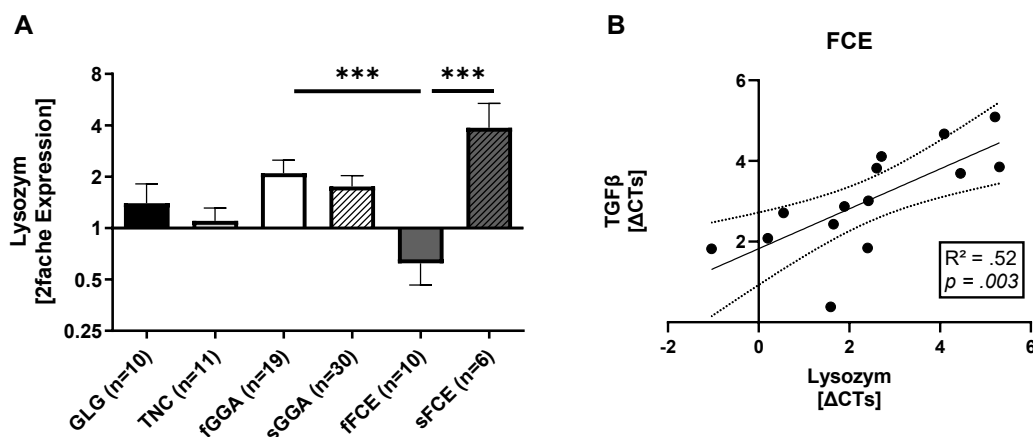


Abbildung 11. Lysozym-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen und lineare Regressionsanalysen mit dem Prädiktor Lysozym und TGFβ als abhängige Variable. (A) Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von Lysozym im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei transienter neonataler Cholestase (TNC), GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA), GGA zum Zeitpunkt der LTx (sGGA), FCE im frühen Krankheitsstadium (fFCE) und FCE im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (sFCE); **(B)** ΔCTs des Lysozyms aus Leberbiopsien korreliert mit TGFβ-ΔCT-Werten bei FCE. Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 6 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet; *** = $p \leq ,001$. R^2 = Determinationskoeffizient. Interpretation der Varianzaufklärung nach Cohen: $R^2 = 0,02$ = schwache, $R^2 = 0,13$ = moderate, $R^2 = 0,26$ = starke Korrelation; $p \leq ,05$ = signifikant; relevante Signifikanzen sind aufgezeigt, alle Weiteren sind im Anhang in Abb. 19 zu finden.

3.1.5 Die Leberexpression der Komplementfaktoren MBL und C5 zeigt sich unverändert bei GGA, korreliert aber mit dem Outcome nach Kasai-Operation

Eine MBL-Defizienz, charakterisiert durch MBL2-Genotypisierung und MBL-Plasmalevel, geht mit einem erhöhten Risiko für eine Sepsis oder eine Pneumonie in den ersten Lebensmonaten einher (Frakking et al., 2007). Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte signifikant erhöhte Serumspiegel des Komplementfaktors C3, einem weiteren Schlüsselbestandteil der Kaskade, bei GGA im Vergleich zu vergleichbaren cholestatischen Erkrankungen (Liang et al., 2022). Mit der Intention, MBL und C5 als aktive Bestandteile des Komplementsystems an Gewebegrenzflächen für die GGA zu untersuchen, wurden die Expressionen für MBL und C5 bestimmt.

Es zeigt sich weder für MBL noch für C5 ein signifikanter Unterschied der Expression bei GGA verglichen mit gesunden und erkrankten Kontrollpersonen (Abb. 12A und B).

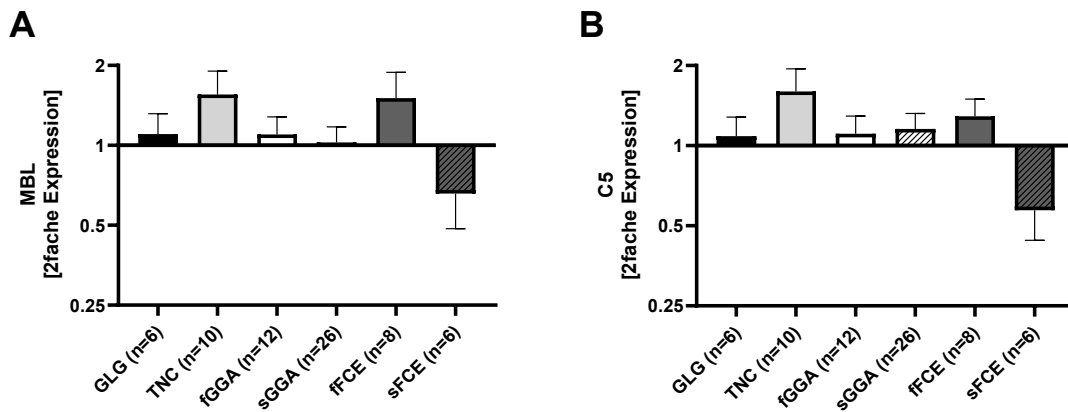


Abbildung 12. MBL- und C5-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen. Zweifache Expression, normalisiert zu GAPDH, von (A) MBL und (B) C5 im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei transienter neonataler Cholestase (TNC), GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA), GGA zum Zeitpunkt der LTx (sGGA), FCE im frühen Krankheitsstadium (fFCE) und FCE im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (sFCE). Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 6 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet.

Zur Einbettung der Expressionsdaten in den klinischen Kontext erfolgte die Einteilung in zwei Gruppen: Patient*innen mit GGA, welche innerhalb des ersten Lebensjahres eine LTx erhielten, wurden als fLTx eingestuft, solche, welche länger als 1 Jahr mit der nativen Leber überlebten als sLTx.

Eine verminderte MBL-Expression geht vermehrt mit einer frühen LTx für die Patient*innen einher (Abb. 13A). Bei der Expression des Effektormoleküls C5 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der fLTx und sLTx der Patient*innen mit GGA, wobei Kinder mit einer niedrigeren C5-Expression früher transplantiert werden mussten (Abb. 13B).

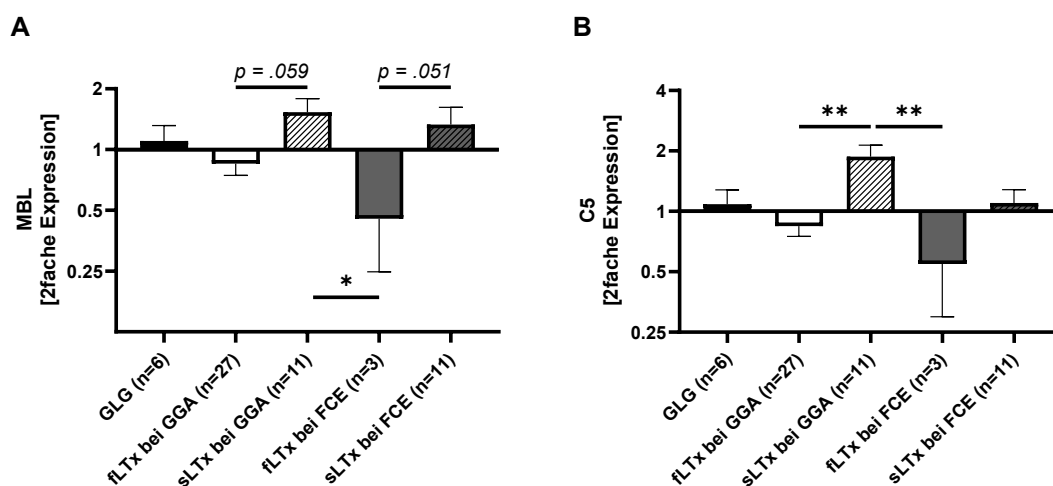


Abbildung 13. MBL- und C5-Expression korrelieren mit dem Outcome nach HPE. Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von (A) MBL und (B) C5 im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei GGA mit LTx vor dem ersten Lebensjahr (fLTx), bei GGA mit mit LTx nach dem ersten Lebensjahr (sLTx), bei FCE mit LTx vor dem ersten Lebensjahr (fLTx), bei FCE mit mit LTx nach dem ersten Lebensjahr (sLTx). Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 3 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet; **= $p \leq ,01$.

3.1.6 Eine erfolgreiche Bilirubin-Clearance drei Monate nach Kasai-Operation ist assoziiert mit einer niedrigen Leberexpression von MBL

Die sogenannte „Clearance of Jaundice“, ein Absinken des Serumbilirubins drei respektive sechs Monate nach HPE, ist ein etablierter Marker für das Outcome nach dieser Operation, womit sich die Prognose von GGA-Patient*innen einschätzen lässt (Hukkinen et al., 2022; Tamgal et al., 2019). Es wurde untersucht, ob auch bei der in dieser Arbeit gemessenen Studienpopulation das Bilirubin drei Monate nach Kasai-Operation als prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf verwendet werden kann. Die Gruppen wurden unterteilt in Kinder, welche zu einem Zeitpunkt um den dritten Monat nach Kasai-Operation einen Bilirubinwert von ≤ 2 mg/dl aufwiesen und solchen, bei welchen höhere Werte gemessen wurden. Ein Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der LTx, welcher ein objektives Maß für die Prognose darstellt, wurde überprüft.

Der Fischer-Freemant-Halton-Test verdeutlicht einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden Parametern mit einer Number needed to

treat (NNT) von 1,42 und einem geringeren Risiko für eine LTx innerhalb des ersten Lebensjahres bei Bilirubinwerten ≤ 2 mg/dl (Abb. 14A).

Um zu überprüfen, ob dieses Ergebnis mit einer der gemessenen Dysregulationen der antimikrobiellen Peptide und Proteine oder des Komplementsystems in Zusammenhang gesetzt werden kann, wurden deren Expressionswerte in die o.g. Gruppen eingeteilt.

Hierbei zeigen sich nur bei MBL signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen des Serumbilirubins ≤ 2 mg/dl drei Monate nach Kasai-HPE. Eine niedrigere MBL-Expression geht mit niedrigeren Bilirubin-Serumwerten einher (Abb. 14B). Eine erfolgreiche Bilirubin-Clearance drei Monate nach Kasai-Operation ist assoziiert mit niedriger Leberexpression von MBL (Abb. 14B).

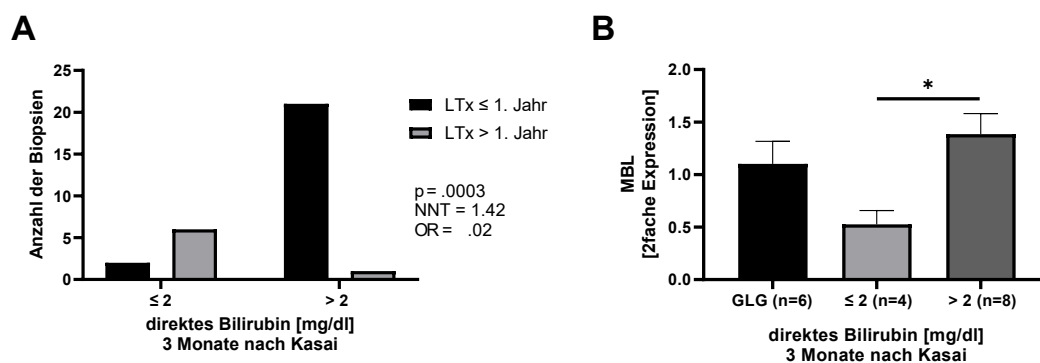


Abbildung 14. Eine erfolgreiche Bilirubin-Clearance drei Monate nach Kasai-Operation ist assoziiert mit einem niedrigeren Risiko für eine frühe LTx und einer niedrigen MBL-Expression. **(A)** Darstellung der Gruppenzusammenhänge des direkten Bilirubins $\leq / > 2$ mg/dl gemessen drei Monate nach der Kasai-Operation und dem Zeitpunkt der LTx innerhalb oder nach dem ersten Lebensjahr anhand des Fischer-Freemann-Halton-Tests. $p \leq .05 = \text{signifikant}$; NNT = number needed to treat; OR = Odds Ratio. **(B)** Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von MBL im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA) mit direktem Bilirubinwerten < 2 mg/dl oder > 2 mg/dl gemessen drei Monate nach Kasai-Operation. Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 4 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels einfaktorieller ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet; * = $p \leq .05$.

3.2 Die Immunbarriere der Leber nach pädiatrischer Lebertransplantation

3.2.1 Die Leberexpression von hBD1 ist erhöht im pädiatrischen Lebertransplantat und korreliert mit dem Serumbilirubin

Biopsien aus Lebertransplantaten zeigen in der Pathologie häufig Zeichen einer chronischen Fibrose und teils auch einer Inflammation. Als Ursache kommen eine Alloimmunreaktion (Abstoßung), Folgen eines Infektes oder auch Perfusionsstörungen infrage (Vij et al., 2022). Um die Rolle des hBD1 als Schlüsselenzym der Immunmodulation und -abwehr der Leber genauer zu ergründen, wurden die Expressionen von hBD1 und dessen Aktivator TXN in Leberbiopsien gemessen, welche zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation durchgeführt wurden. Hierbei handelt es sich um geplante Protokollbiopsien (normales Lebergewebe) oder Indikationsbiopsien (Leberfunktion gestört), die im Rahmen einer vermuteten Abstoßung oder sonstigen Veränderung der laborchemischen Leberparameter erfolgten.

HBD1 ist im Lebertransplantat signifikant erhöht exprimiert im Vergleich zu gesundem Lebergewebe (15A). Es ist kein signifikanter Unterschied der Expression von hBD1 zwischen Protokollbiopsien und Indikationsbiopsien zu messen (Abb. 15A). Die Expression des TXN unterscheidet sich signifikant zwischen diesen beiden Gruppen, was durch eine starke Streuung der Werte nicht in dem Graphen zu erkennen ist (Abb. 15B). Eine signifikant erhöhte hBD1-Expression ist zu allen Zeitpunkten nach LTx zu erkennen, welche tendenziell mit dem Transplantatalter weiter ansteigt (Abb. 15C). Der hBD1-Aktivator TXN ist im pädiatrischen Lebertransplantat ebenfalls erhöht exprimiert, zeigt jedoch einen deutlich geringeren progressiven Anstieg im zeitlichen Verlauf nach LTx (Abb. 15D).

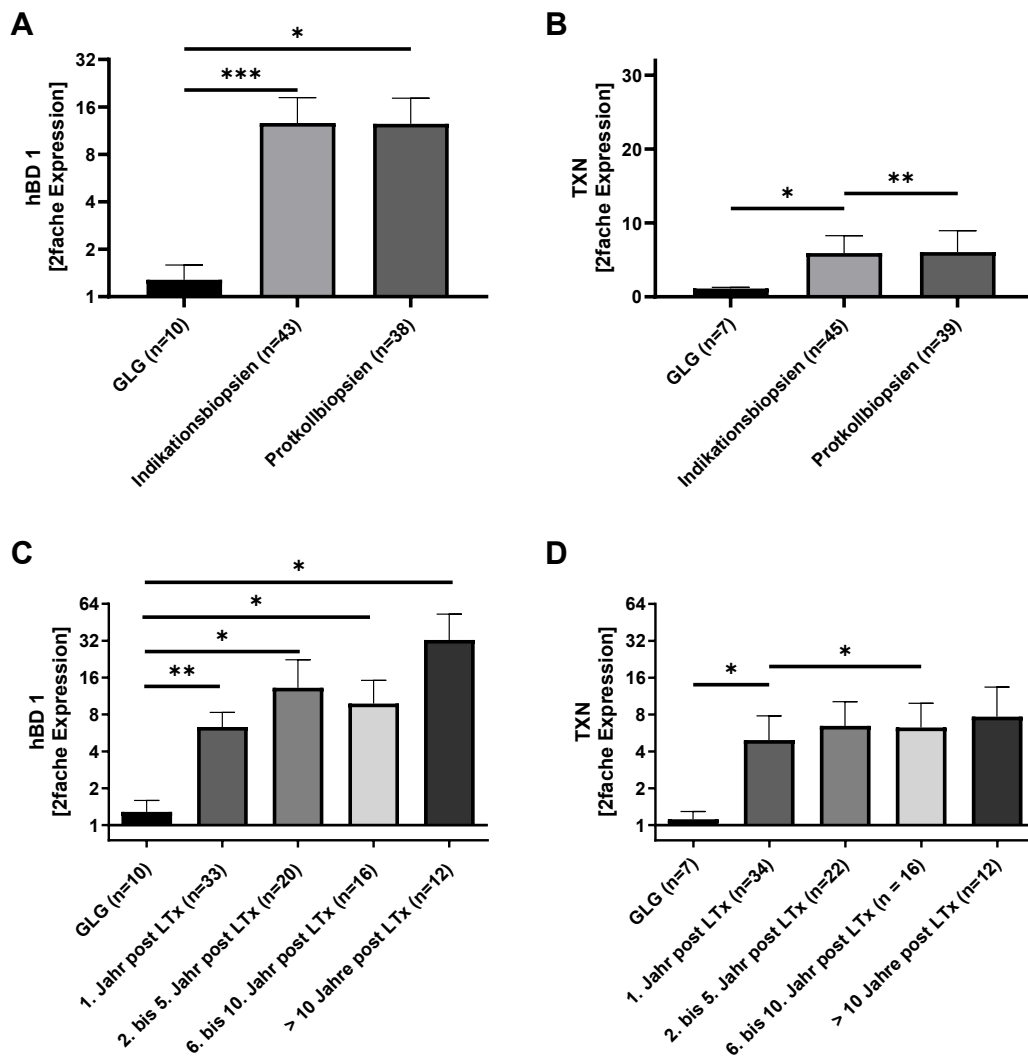


Abbildung 15. hBD1- und TXN-Expression im pädiatrischen Lebertransplantat. Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von (A) hBD1 und (B) TXN im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), im Lebertransplantat bei Indikations- und Protokollbiopsien; von (C) hBD1 und (D) TXN im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), im ersten Jahr nach LTx, im Zeitraum von 1.-5. Jahren nach LTx, im Zeitraum von 6.-10. Jahren nach LTx und über 10 Jahre nach LTx. Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 7 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet; * = $p \leq ,05$; ** = $p \leq ,01$; *** = $p \leq ,001$

Da eine Induktion der hBD1-Expression durch Serumbilirubin bei Erwachsenen bereits beschrieben wurde (Klag et al., 2018), wurden auch für die Expressionen nach LTx lineare Regressionsanalysen durchgeführt.

Die Korrelation zwischen der hBD1-Leberexpression und den Bilirubin Serumwerten zum Zeitpunkt der Biopsie ist signifikant positiv (Abb. 16). Diese

Korrelation kann jedoch keiner Untergruppe oder Aufteilung zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt).

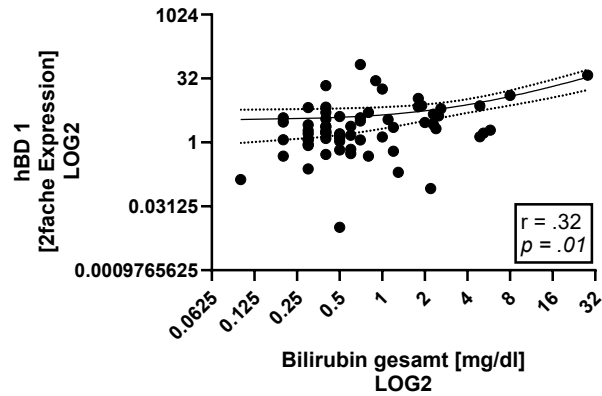


Abbildung 16. Korrelationsanalyse der Leberexpression von hBD1 mit dem Serumwert des gesamten Bilirubins. Spearman Korrelation für hBD1 im pädiatrischen Lebertransplantat korreliert mit dem Bilirubin gesamt im Serum. r = Korrelationskoeffizient: $r = 1$ = perfekte positive Korrelation; $r = 1$ bis 0 = positive Korrelation; $r = 0$ = keine Korrelation; $r = 0$ bis -1 = negative Korrelation; $r = -1$ = perfekte negative oder inverse Korrelation. $p \leq ,05$ = *signifikant*.

4 Diskussion

Die GGA ist eine lebensbedrohliche cholestatische Lebererkrankung mit Manifestation im Neugeborenenalter. Trotz zahlreicher neuer Ansätze und Hypothesen verbleibt die genaue Pathogenese unklar und es existieren keine etablierten Biomarker zur eindeutigen Diagnosestellung und Prognoseabschätzung. In aktuellen Studien werden Serumlevel der Matrixmetalloproteinase-7 (MMP-7), des IL-8, and der γ GT als vielversprechende Marker diskutiert (Wu et al., 2022), keiner dieser Faktoren konnte sich jedoch als etablierter und verbreitet genutzter Biomarker bisher durchsetzen. Als führende Hypothese der Pathogenese gilt eine unbekannte, wahrscheinlich pränatale Schädigung der Gallengänge, welche durch eine postnatal dysregulierte Immunantwort verstärkt und aufrechterhalten wird (Tam et al., 2024). Neueste Studien beschreiben zudem eine hypoxie-assoziierte überschießende fetale Wundheilung basierend auf erhöhten Konzentrationen von Hyaluronsäuren in den Gallengängen (de Jong et al., 2023). Eine bereits bei chronisch inflammatorischen Darmerkrankungen beschriebene Störung der Barrierefunktion, welche auf einer Dysregulation des komplexen Netzwerkes antimikrobieller und immunmodulatorischer Eigenschaften der AMPs basiert (Xavier and Podolsky, 2007), legt die Hypothese nahe, dass auch die entzündlich-sklerosierenden Veränderungen bei der GGA mit veränderten Expressionen der AMPs einhergehen. Da die Erkrankung sich klinisch sehr variabel präsentieren kann und die Prognose nach HPE bedeutend von einer frühzeitigen Operation abhängt (Bezerra et al., 2018), ist die Identifikation neuer spezifischer und prädiktiver Biomarker zur Diagnosestellung und Einschätzung des individuellen Krankheitsstadiums von großer Bedeutung.

Das antimikrobielle Peptid LL-37 zeigte sich im frühen, von Inflammation geprägten Krankheitsstadium signifikant erhöht exprimiert, während hBD1 eine deutlich erhöhte Expression in fortgeschrittenen Stadien pädiatrischer cholestatischer Lebererkrankungen aufzeigte. Beide Peptide korrelierten mit dem profibrotischen Zytokin TGF β . Da LL-37 bereits bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als erhöht exprimiert (Kusaka et al., 2018) und eine Überexpression bereits als Induktor einer Autoimmunität und eines zytotoxischen Geschehens auf

körpereigenes Gewebe *in vitro* beschrieben wurde (Chernov et al., 2022; B. Yang et al., 2020), könnte die deutlich erhöhte Expression im frühen Krankheitsstadium einen Induktor des Entzündungsgeschehens, der Gewebsschädigung und der Fibrosierung der Leber bei GGA darstellen. Da im Mausmodell die Gabe eines humanen LL-37 im Gegensatz zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion und einer verminderten enterischen Dysbiose führte, ist in zukünftigen Studien zum Beispiel eine konzentrationsabhängige Wirkung zu prüfen (Fang et al., 2023). Dies hat Relevanz für eine mögliche Verwendung des LL-37 als spezifischer Biomarker für das frühe Stadium der GGA, da sich weder bei GGA im fortgeschrittenen Stadium noch bei den FCEs im frühen Krankheitsstadium eine vergleichsweise induzierte Expression darstellte. Lysozym, welchem eine Schlüsselrolle in der Erstlinienverteidigung des Immunsystems zukommt (Ragland and Criss, 2017), zeigte ausschließlich im frühen Krankheitsstadium der FCEs verminderte Expressionslevel und wäre als ergänzender diagnostischer Marker zu untersuchen. Die Krankheitsprogression der GGA wie auch der FCE ist geprägt von epithelial-mesenchyalem Umbau und folglich einer Fibrosierung der pädiatrischen Leber (Shen et al., 2019). Die 10-fach erhöhte Expression des hBD1 sowie die nachgewiesene Korrelation zu dem profibrotischen Zytokin TGF β werfen die Frage auf, ob hBD1 einen Marker für den fibrotisch-zirrhotischen Umbau im Krankheitsverlauf darstellen könnte. Während im Erwachsenenalter bereits eine erhöhte Expression des hBD1 beschrieben wurde (Klag et al., 2018; Mani et al., 2019), verliert die Rolle des hBD1 in der Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen unklar und bislang wurden dem AMP hBD1 keine profibrotische Aktivität zugeschrieben. Jedoch beeinflusste hBD1 in *in-vitro*- und *ex-vivo*-Modellen die Wundheilung via Induktion der Sekretion eines potenten angiogenen Faktors durch Fibroblasten über multiple Signalwege (Umehara et al., 2022). Sinnvoll wären weitere funktionelle Analysen, um einen potenziellen Einfluss der erhöhten hBD1-Expression auf die Progression der Leberfibrose zu prüfen. Da erhöhte hBD1-Serumlevel bei erwachsenen Patienten mit akut-auf-chronischen Leberversagen bereits als akkurater Prädiktor eines schlechteren Outcomes der kurzfristigen Sterblichkeit beschrieben wurden (Mani et al., 2019), ist zu untersuchen, ob hBD1 auch zur Risikostratifizierung bei der GGA herangezogen werden kann.

Die Assoziation einer höheren hBD1-Expression zur früheren Notwendigkeit einer LTx stützt diese These. In Kombination mit dem etablierten prädiktiven Parameter des Alters bei HPE könnte hBD1 als weiterer Biomarker fungieren und helfen, Kinder zu identifizieren, bei welchen früher eine Vorbereitung auf eine Lebertransplantation notwendig sein wird. Zur Identifikation eines nicht-invasiven Outcome Parameters, bedarf es Untersuchungen zur Verwendung der hBD1-Konzentration im Serum. Basierend auf der in dieser Arbeit gemessenen positiven Korrelation der hBD1-Expression zu den Serumwerten des γ GT, welcher bereits als vielversprechender nicht-invasiver Marker identifiziert wurde (Wu et al., 2022), ist der Nutzen einer gegebenenfalls kombinierten Anwendung als Biomarker zu prüfen. Die fehlende positive Korrelation zwischen der Überexpression und den Bilirubinserumwerten bzw. der systemischen Inflammation, welcher kürzlich bei Erwachsenen mit Lebererkrankungen beschrieben wurde (Klag et al., 2018), könnte auf einen bisher unbekanntem und eher intrahepatischen Prozess hindeuten. Unbeantwortet bleibt, welche Rolle die geringere Induktion des TXNs für die Aktivität des hBD1 einnimmt und ob andere unerforschte Signal- und Aktivierungswege bestehen. Einen potenziellen therapeutischen Ansatz könnte die signifikant verminderte Expression des LEAP-1 im fortgeschrittenen Stadium bei GGA und FCE eröffnen. Ein Mangel könnte aufgrund der beschriebenen direkt antimikrobiellen Aktivitäten in der Erstlinienverteidigung der Leber (Deicher and Hörl, 2004) eine dysfunktionale Immunabwehr und somit eine unzureichende Abwehr gegen bakterielle Translokationen in die Leber zur Folge haben. Diese wurde bereits als wichtiger Risikofaktor im Krankheitsprogress pädiatrischer cholestatischer Lebererkrankungen beschrieben (Blesl and Stadlbauer, 2021). Erste Erfolge einer therapeutischen Nutzung konnten in der Forschung zu einer Therapie gegen Hepatitis C durch Induktion von LEAP-1-Serumwerten mithilfe der Gabe des pegyliertes Interferons erreicht werden (Ryan et al., 2012). Einen weiteren potenziell therapeutisch relevanten Effekt stellt die hemmende Wirkung einer erhaltenen LEAP-1-Expression auf die Entwicklung einer Leberfibrose dar, welche in einem Mausmodell via Blockade der TGF β 1-induzierten Smad3-Phosphorylierung induziert werden konnte (Han et al., 2016). Die fehlende Signifikanz der Gruppenunterschiede der Komplementfaktoren MBL und C5 ließen zunächst

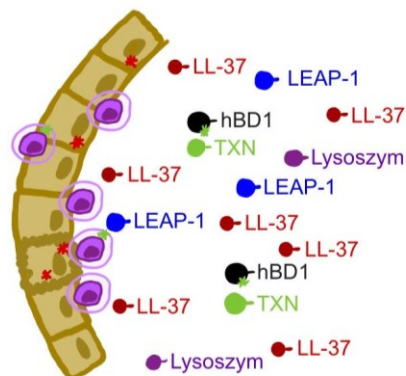
darauf schließen, dass dem Komplementsystem keine Bedeutung bei pädiatrischen cholestatischen Lebererkrankungen zukommt. Da eine verminderte Expression des MBL sich jedoch assoziiert zeigte mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer LTx im ersten Lebensjahr, scheint diesem Komplementfaktor eventuell eine komplexere Rolle zuzukommen. Die vielfach beschriebene Funktion des MBLs als protektiver Immunfaktor bei Neugeborenen würde diese Hypothese stützen (Israëls et al., 2010). Der gemessene negative Effekt niedriger C5-Expressionslevel auf die Prognose hingegen steht konträr zu bisherigen Studienergebnissen, da im Mausmodell ein C5-Mangel zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion und Reduktion der Fibrose führte (Schmitt et al., 2012). Diese scheinbar gegenläufigen Ergebnisse bedürfen weiterer Untersuchungen. Die erfolgreiche Bilirubin-Clearance drei Monate nach Kasai-Operation, ein bereits etabliertes Erfolgskriterium dieser Operation (Tamgal et al., 2019), ist auch in der hier beobachteten Studienpopulation signifikant assoziiert mit der Prognose der Kinder mit GGA, gemessen am Zeitpunkt der LTx. Eine erfolgreiche Bilirubin-Clearance geht mit einem signifikant verminderten MBL-Expressionslevel im Vergleich zu einer nicht erfolgreichen Clearance einher. Die Zusammenschau der Ergebnisse aller Analysen der MBL-Expression lassen vermuten, dass dem MBL neben der direkten Immunantwort und dem Schutz vor Infektionen in der Neugeborenenperiode ebenfalls weitere immunmodulierende Funktionen zukommen, welche zukünftig funktioneller Analysen bedürfen. Die großen Schwankungen der Expressionen des antimikrobiellen Peptids hBD2 ließen sich dadurch erklären, dass manche Biopsien größere Teile eines oder mehrerer Gallengänge enthielten, während andere vor allem aus Leberzellen bestanden, da beschrieben wurde, dass hBD2 vor allem in den großen Gallengängen exprimiert wird (Harada et al., 2004). Eine Analyse einzelner Zellreihen könnte hierüber Aufschluss bringen.

Um zu untersuchen, ob die chronische Entzündungsreaktion und die Fibrosierung nach LTx, deren Ursachen bisher nicht hinreichend geklärt sind (Vij et al., 2022), ebenfalls mit einer dysregulierten Zusammensetzung der antimikrobiellen Barriere assoziiert sind, wurde die Expression des hBD1 nach LTx zum Zeitpunkt von Protokoll- sowie bei Indikationsbiopsien gemessen. Im pädiatrischen

Lebertransplantat zeigte sich eine erhöhte hBD1-Expression, sowohl bei Kontroll- als auch bei Indikationsbiopsien, welche tendenziell mit dem Transplantatalter anstieg und signifikant mit den Werten des Serumbilirubins korrelierte. Dies wirft die Frage auf, ob die veränderte Expression des hBD1 einen Einfluss auf die akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen hat, welche bei über der Hälfte der Transplantierten innerhalb des ersten Jahres auftreten (Cuenca et al., 2017). Aufgrund der fehlenden Korrelation des Bilirubins mit der hBD1-Expression bei nativem Lebergewebe und der nachgewiesenen Korrelation bei Transplantatlebergewebe, ist zu untersuchen, ob eine mögliche Induktion durch das Molekül Bilirubin konzentrationsabhängig stattfindet. Unklar verbleibt, warum es bei Indikationsbiopsien nach Transplantation im Gegensatz zu den bei geplanten Kontrollterminen entnommenen Biopsien nicht zu einer verstärkten Induktion der hBD1-Expression kommt. Zur Klärung bedarf es Moderationsanalysen mit größeren Studienpopulationen und weiteren einbezogenen Parametern. Die hBD1-Erhöhung nach LTx wie auch die Beeinflussung der hBD1-Expression durch Bilirubin lassen einen bisher unbekanntem systemischen Einfluss der Expression vermuten.

Eine Dysregulation der antimikrobiellen Peptide, die eine wichtige Rolle für Chemoattraktion und Aktivierung zahlreicher Leukozyten erfüllen, könnte die in Biopsien von Kindern mit cholestatischen Lebererkrankungen gemessene Dysregulation einzelner Leukozytenpopulationen und deren Wirkung im Gewebe der Gallengänge erklären (Yang et al., 2022). Die folgende Graphik soll anhand eines postulierten pathophysiologischen Modells des Gallenganguntergangs im Lebergewebe diesen beschriebenen Mechanismus verdeutlichen (Abb. 17). Zur Überprüfung des postulierten Modells wäre es sinnvoll, die Interaktion der antimikrobiellen Peptide mit den Immunzellen durch Zellkulturexperimente und in-vitro-Modellen wie z.B. mittels Organoiden detaillierter zu erforschen.

Progressive Inflammation



Entzündliche Degeneration

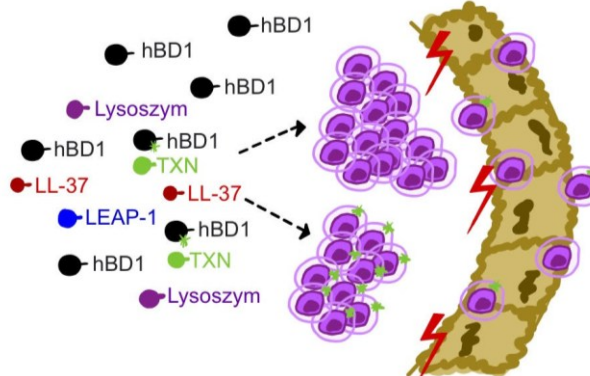


Abbildung 17. Postuliertes pathophysiologisches Modell der gemessenen Dysregulation der Expression antimikrobieller Peptide und ihrer potenziellen Rolle im Rahmen der irreversiblen Obstruktion im Krankheitsverlauf.

Trotz der signifikanten Ergebnisse ist als Limitation zu nennen, dass alle verwendeten Daten aus einem einzigen Universitätsklinikum in Europa stammten und somit die globale Heterogenität der Erkrankungen nicht dargestellt werden konnte.

Diese Arbeit identifiziert ein sich signifikant unterscheidendes Expressionsprofil der Peptide und Proteine hBD1, LL-37, LEAP-1 und Lysozym bei GGA in den verschiedenen Krankheitsstadien sowie im Vergleich zu gesundem Lebergewebe, TNC sowie anderen pädiatrischen cholestatischen Lebererkrankungen. Zudem scheint die erhöhte Expression des hBD1 einen potenziell prädiktiven Parameter für ein schlechtes Outcome bei GGA darzustellen, welches möglicherweise durch eine Beeinflussung der Progression der Leberfibrose zu erklären wäre. Die veränderten Expressionsprofile bieten die Basis zur Validierung neuer Diagnoseparameter sowie Ansätze zur Risikostratifizierung im Krankheitsprogress und haben das Potenzial neue innovative Therapiemöglichkeiten aufzuzeigen (Holly et al., 2017). Angesichts der bisher mangelnden Biomarker und zielgerichteten Therapien für die GGA und die FCEs stellt dies ein wichtiges Forschungsgebiet dar. Langfristig könnte die Regulation des Immunsystems durch antimikrobielle Peptide, Proteine und Komplementfaktoren auch bei vielen

weiteren immunologischen oder autoimmunen Erkrankungen im Kindesalter eine diagnostische oder auch therapeutische Rolle spielen.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Die Gallengangatresie (GGA) ist eine lebensbedrohliche cholestatische Lebererkrankung Neugeborener und die häufigste Ursache einer LTx im Kindesalter. Eine fortschreitende entzündlich-fibrotische Obstruktion der Gallengänge mit unklarer Pathogenese führt im Verlauf zu einer Leberfibrose. Eine frühzeitige Diagnosestellung ist daher für die Prognose der Kinder entscheidend. Aktuelle Studien legen eine durch perinatale Toxine und/oder durch Mikroben induzierte immunologische Dysregulation in den Gallenwegen und im Lebergewebe nahe. Antimikrobielle Peptide (AMPs), Moleküle der Erstlinienverteidigung des angeborenen Immunsystems, schützen das Gewebe gegen eindringende Mikroben und besitzen modulierende Wirkung auf Entzündungs- und Immunreaktionen (z.B. durch Chemoattraktion). Während gezeigt werden konnte, dass die Dysregulation von AMPs eine zentrale Rolle in der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen spielt, ist die Rolle bei pädiatrischen cholestatischen Lebererkrankungen bisher nicht ausreichend erforscht. Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression antimikrobieller Peptide und Proteine bei Kindern mit GGA und nach LTx zu untersuchen, mit gesundem Lebergewebe und Gewebe anderer pädiatrischer cholestatischer Lebererkrankungen zu vergleichen und die Ergebnisse mit den klinischen Verläufen in Beziehung zu setzen.

Material und Methoden: Die Expression relevanter antimikrobieller Peptide und Proteine (humane β -Defensine (hBD) 1 & 2, TXN, LL-37, LEAP-1, Lysozym, MBL und C5) wurde im Lebergewebe von Patient*innen mit GGA bei Diagnosestellung (fGGA) und im Krankheitsverlauf (sGGA) analysiert und mit altersentsprechendem normalem Lebergewebe von Krebspatient*innen (GLG), Patient*innen mit transienter neonataler Cholestase (TNC) und familiären Cholestaseerkrankungen (FCE) im frühen (fFCE) und späten Krankheitsstadium (sFCE) verglichen. Gruppenunterschiede wurden via ANOVA oder Kruskal-Wallis-Test mit anschließenden paarweisen Vergleichen analysiert (* = $p \leq ,05$; ** = $p \leq ,01$; *** = $p \leq ,001$; ns, nicht signifikant). Klinische Auswirkungen wurden anhand des Kaplan-Meier-Schätzers sowie anhand von Korrelationsanalysen mit dem profibrotischen Zytokin TGF β und Cholestasemarkern wie Serumbilirubin untersucht.

Ergebnisse: LL-37 zeigt sich im frühen Krankheitsstadium im Vergleich zur späten GGA und normalem Lebergewebe signifikant erhöht exprimiert (Abb. 8A). Die Expression des hBD1 ist in der späten GGA im Vergleich zum frühen Krankheitsstadium und zu normalem Lebergewebe signifikant hochreguliert (Abb. 2B). Beide Peptide korrelieren mit dem profibrotischen Zytokin TGF β (Abb. 4C und 8C), wobei diese Korrelation bei LL-37 nur für das frühe Stadium signifikant ausfällt (hBD1_GGA: $R^2 = ,17$, $p = ,01$; LL-37_eGGA: $R^2 = ,44$, $p = ,02$), jedoch nicht mit dem Serumbilirubin (Abb. 6A). Höhere hBD1-Expressionslevel sind bei fGGA assoziiert mit einem kürzeren Überleben mit nativer Leber (hBD1: $p = ,09$), (Abb. 7A). Auch im pädiatrischen Lebertransplantat ist die Expression von hBD1 signifikant erhöht, unabhängig von Indikation der Biopsie (Abb. 15A) und steigt tendenziell mit dem Transplantatalter weiter an (Abb. 15C). Hier besteht im Gegensatz zu den nativen Leberbiopsien eine signifikant positive Korrelation zu Serumbilirubin ($r = ,32$, $p = ,01$), (Abb. 16). LEAP-1 ist bei fortgeschrittener Lebererkrankung signifikant vermindert exprimiert (Abb. 9A), wobei eine niedrigere Expression mit einem kürzeren Überleben mit nativer Leber einhergeht (Abb. 9D). Die Expression des Lysozyms variiert zwischen den untersuchten pädiatrischen Cholestaseerkrankungen und ist bei fFCE signifikant niedriger als bei fGGA (Abb. 11A). Eine niedrige Expression der Komplementfaktoren MBL und C5 ist bei GGA assoziiert mit einer früher notwendigen LTx (Abb. 13). Eine erfolgreiche Bilirubin-Clearance drei Monate nach Kasai-Operation ist assoziiert mit einem niedrigeren Risiko für eine frühe LTx und einer niedrigeren MBL-Expression (Abb. 14).

Fazit: Während die frühe Induktion der LL-37-Expression bei GGA als Antwort auf die Inflammation zu Beginn der Erkrankung zu erklären wäre, könnte die deutlich erhöhte hBD1-Expression im Spätstadium einen Marker für den fibrotischen Umbau im Krankheitsverlauf darstellen. Basierend auf der Korrelation des hBD1 mit dem Fibrosemarker TGF β und dem schlechteren Outcome bei höheren hBD1-Expressionswerten ist eine Eignung des hBD1 als prädiktiver Biomarker zur Risikostratifizierung zu prüfen. Angesichts der bisher mangelnden Biomarker und der aufgrund der individuellen Krankheitsverläufe herausfordernden Therapieplanung bieten die in dieser Arbeit gemessenen veränderten Expressionsprofile der AMPs neue wichtige Ansätze, welche weiterer Forschung bedürfen.

6 Summary

Objectives and Study: Biliary atresia (BA) is a life-threatening cholestatic liver disease in newborns and the leading cause of liver transplantation in childhood. A progressive inflammatory-fibrotic obstruction of the bile ducts with an unclear pathogenesis leads to liver fibrosis. Early diagnosis is therefore crucial for the children's prognosis. Recent studies have highlighted an aetiology due to a dysregulated immune response in liver tissue and bile ducts induced by perinatal toxins and/or by microbes. Antimicrobial peptides (AMPs), as first-line defence molecules of the innate immune system, defend the tissue against invading microbes and possess modulating effects on inflammation and immune responses (e.g. through chemoattraction). While the dysregulation of AMPs has been shown to play a central role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, its role in paediatric cholestatic liver disease remains unclear. The aim of this research is to analyse expression patterns of antimicrobial peptides and proteins in children with BA and after LTx, to compare them with healthy liver tissue and other paediatric cholestatic liver diseases and to correlate them with the clinical course and outcome.

Methods: The expression of potentially relevant antimicrobial peptides and proteins (human β -defensins (hBD) 1 & 2, TXN, LL-37, LEAP-1, lysozyme, MBL and C5) was analysed in liver tissue from patients with BA at early liver disease stages (eBA) and during disease progression (IBA), both compared with age-matched normal liver tissue derived from cancer patients (HL), patients with transient neonatal cholestasis (TNC) and familial cholestasis disease (FCD) in early (eFCD) and late stages of disease (IFCD). Group differences were analysed via ANOVA or Kruskal-Wallis test with subsequent pairwise comparisons (* = $p \leq .05$; ** = $p \leq .01$; *** = $p \leq .001$; ns, not significant). Clinical effects were analysed using the Kaplan-Meier estimator and correlation analyses with the profibrotic cytokine TGF β and cholestasis markers such as serum bilirubin.

Results: While LL-37 shows significantly increased expression in eBA compared to IBA and normal liver tissue (Fig.8A), the expression of hBD1 is significantly upregulated in IBA compared to eBA and normal liver tissue (Fig. 2B). Both

peptides correlate with the profibrotic cytokine TGF β (Fig. 4C und 8C), whereby the correlation for LL-37 is only significant for the early stage (hBD1_BA: $R^2 = .17$, $p = .01$; LL-37_eBA: $R^2 = .44$, $p = .02$), but not with serum bilirubin (Fig. 6A). Higher hBD1 expression levels in BA are associated with shorter survival with native liver (hBD1: $p = .09$), (Fig. 7A). In paediatric liver transplants liver expression of hBD1 is also increased, independent of infection or rejection (Fig. 15A) and tends to increase further with age of transplant (Fig. 15C). In contrast to the native liver biopsies, there is a significant positive correlation to serum bilirubin ($r = .32$, $p = .01$), (Abb. 16). LEAP-1 expression is significantly reduced in advanced cholestatic liver disease (Fig. 9A), whereby lower expression is associated with shorter survival with native liver (Fig. 9D). The expression of Lysozyme varies between the paediatric cholestasis diseases studied with significant lower values for eFCD than eBA (Fig. 11A). A low expression of the complement factors MBL und C5 is associated with an earlier necessary LTx in BA (Fig. 13). A successful bilirubin clearance three month after Kasai operation could lead to a lower risk for an early LTx and correlates with a lower MBL expression (Fig. 14).

Conclusion: While the early induction of the LL-37 expression in BA could be explained as a response to inflammation at the beginning of the disease, the significantly increased hBD1 expression in the late stage could represent a marker for fibrotic remodeling in the course of the disease. Based on the correlation of the hBD1 expression with the fibrosis marker TGF β and the negative effect of higher hBD1 expression levels on the native liver survival, the suitability of hBD1 as a predictive biomarker for risk stratification should be examined. In view of the lack of biomarkers to date and the challenges of therapy planning due to the individual course of the disease, the altered expression profiles of AMPs measured in this study offer new important approaches that require further research.

7 Literaturverzeichnis

- Absalon, M. J., Khoury, R. A., & Phillips, C. L. (2017). Post-transplant lymphoproliferative disorder after solid-organ transplant in children. *Semin Pediatr Surg*, 26(4), 257-266.
- Albillos, A., de Gottardi, A., & Rescigno, M. (2020). The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol*, 72(3), 558-577.
- Allen, S. R., Jafri, M., Donnelly, B., McNeal, M., Witte, D., Bezerra, J., Ward, R., & Tiao, G. M. (2007). Effect of rotavirus strain on the murine model of biliary atresia. *J Virol*, 81(4), 1671-1679.
- Amer, S., & Hajira, A. (2014). A Comprehensive Review of Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis (PFIC): Genetic Disorders of Hepatocanicular Transporters. *Gastroenterology Res*, 7(2), 39-43.
- Amirneni, S., Haep, N., Gad, M. A., Soto-Gutierrez, A., Squires, J. E., & Florentino, R. M. (2020). Molecular overview of progressive familial intrahepatic cholestasis. *World J Gastroenterol*, 26(47), 7470-7484.
- Arnon, R., Annunziato, R. A., D'Amelio, G., Chu, J., & Shneider, B. L. (2016). Liver Transplantation for Biliary Atresia: Is There a Difference in Outcome for Infants? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 62(2), 220-225.
- Bajaj, J. S., Heuman, D. M., Hylemon, P. B., Sanyal, A. J., White, M. B., Monteith, P., Noble, N. A., Unser, A. B., Daita, K., Fisher, A. R., Sikaroodi, M., & Gillevet, P. M. (2014). Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol*, 60(5), 940-947.
- Bals, R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, 1(3), 141-150.
- Bavia, L., Cogliati, B., Dettoni, J. B., Ferreira Alves, V. A., & Isaac, L. (2016). The complement component C5 promotes liver steatosis and inflammation in murine non-alcoholic liver disease model. *Immunol Lett*, 177, 53-61.
- Bergamo, A., Gerdol, M., Pallavicini, A., Greco, S., Schepens, I., Hamelin, R., Armand, F., Dyson, P. J., & Sava, G. (2019). Lysozyme-Induced Transcriptional Regulation of TNF- α Pathway Genes in Cells of the Monocyte Lineage. *Int J Mol Sci*, 20(21).
- Bezerra, J. A. (2006). Biliary atresia--translational research on key molecular processes regulating biliary injury and obstruction. *Chang Gung Med J*, 29(3), 222-230.
- Bezerra, J. A., Wells, R. G., Mack, C. L., Karpen, S. J., Hoofnagle, J. H., Doo, E., & Sokol, R. J. (2018). Biliary Atresia: Clinical and Research Challenges for the Twenty-First Century. *Hepatology*, 68(3), 1163-1173.
- Blanca, M. J., Alarcón, R., Arnau, J., Bono, R., & Bendayan, R. (2017). Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*, 29(4), 552-557.
- Blesl, A., & Stadlbauer, V. (2021). The Gut-Liver Axis in Cholestatic Liver Diseases. *Nutrients*, 13(3).
- Caruso, R., Lo, B. C., & Núñez, G. (2020). Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 20(7), 411-426.
- Chardot, C. (2006). Biliary atresia. *Orphanet J Rare Dis*, 1, 28.

- Cherayil, B. J., Ellenbogen, S., & Shanmugam, N. N. (2011). Iron and intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol*, 27(6), 523-528.
- Chernov, A. N., Tsapieva, A., Alaverdian, D. A., Filatenkova, T. A., Galimova, E. S., Suvorova, M., Shamova, O. V., & Suvorov, A. N. (2022). In Vitro Evaluation of the Cytotoxic Effect of Streptococcus pyogenes Strains, Protegrin PG-1, Cathelicidin LL-37, Nerve Growth Factor and Chemotherapy on the C6 Glioma Cell Line. *Molecules*, 27(2).
- Clemente, M. G., Patton, J. T., Yolken, R., Whittington, P. F., Parashar, U. D., Jiang, B., Raghunathan, T., & Schwarz, K. B. (2015). Prevalence of groups A and C rotavirus antibodies in infants with biliary atresia and cholestatic controls. *J Pediatr*, 166(1), 79-84.
- Conigliaro, P., Triggianese, P., Ballanti, E., Perricone, C., Perricone, R., & Chimenti, M. S. (2019). Complement, infection, and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol*, 31(5), 532-541.
- Coots, A., Donnelly, B., Mohanty, S. K., McNeal, M., Sestak, K., & Tiao, G. (2012). Rotavirus infection of human cholangiocytes parallels the murine model of biliary atresia. *J Surg Res*, 177(2), 275-281.
- Cuenca, A. G., Kim, H. B., & Vakili, K. (2017). Pediatric liver transplantation. *Semin Pediatr Surg*, 26(4), 217-223.
- Cunliffe, R. N. (2003). Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. *Mol Immunol*, 40(7), 463-467.
- Davenport, M., Tizzard, S. A., Underhill, J., Mieli-Vergani, G., Portmann, B., & Hadzić, N. (2006). The biliary atresia splenic malformation syndrome: a 28-year single-center retrospective study. *J Pediatr*, 149(3), 393-400.
- Davit-Spraul, A., Gonzales, E., Baussan, C., & Jacquemin, E. (2009). Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 1.
- de Jong, I. E. M., Hunt, M. L., Chen, D., Du, Y., Llewellyn, J., Gupta, K., Li, D., Erxleben, D., Rivas, F., Hall, A. R., Furth, E. E., Najj, A., Liu, C., Dhand, A., Burdick, J. A., Davey, M. G., Flake, A. W., Porte, R. J., Russo, P. A., . . . Wells, R. G. (2023). A fetal wound healing program after intrauterine bile duct injury may contribute to biliary atresia. *J Hepatol*, 79(6), 1396-1407.
- Deicher, R., & Hörl, W. H. (2004). Hepcidin: a molecular link between inflammation and anaemia. *Nephrol Dial Transplant*, 19(3), 521-524.
- Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., & Meindl-Beinker, A. N. (2019). TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells*, 8(11).
- Fairfield, C., Penninga, L., Powell, J., Harrison, E. M., & Wigmore, S. J. (2018). Glucocorticosteroid-free versus glucocorticosteroid-containing immunosuppression for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev*, 4(4), Cd007606.
- Fang, X., Nong, K., Wang, Z., Jin, Y., Gao, F., Zeng, Q., Wang, X., & Zhang, H. (2023). Human cathelicidin LL-37 exerts amelioration effects against EHEC O157:H7 infection regarding inflammation, enteric dysbacteriosis, and impairment of gut barrier function. *Peptides*, 159, 170903.
- Fawaz, R., Baumann, U., Ekong, U., Fischler, B., Hadzic, N., Mack, C. L., McLin, V. A., Molleston, J. P., Neimark, E., Ng, V. L., & Karpen, S. J. (2017). Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Joint Recommendations of the

- North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 64(1), 154-168.
- Feldman, A. G., & Mack, C. L. (2012). Biliary atresia: cellular dynamics and immune dysregulation. *Semin Pediatr Surg*, 21(3), 192-200.
- Feldman, A. G., & Sokol, R. J. (2019). Neonatal cholestasis: emerging molecular diagnostics and potential novel therapeutics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(6), 346-360.
- Feldman, A. G., & Sokol, R. J. (2021). Neonatal Cholestasis: Updates on Diagnostics, Therapeutics, and Prevention. *Neoreviews*, 22(12), e819-e836.
- Feuer, R., Vlaic, S., Arlt, J., Sawodny, O., Dahmen, U., Zanger, U. M., & Thomas, M. (2015). LEMming: A Linear Error Model to Normalize Parallel Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Data as an Alternative to Reference Gene Based Methods. *PLoS One*, 10(9), e0135852.
- Fischler, B., & Lamireau, T. (2014). Cholestasis in the newborn and infant. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 38(3), 263-267.
- Fligor, S. C., Hirsch, T. I., Tsikis, S. T., Adeola, A., & Puder, M. (2022). Current and emerging adjuvant therapies in biliary atresia. *Front Pediatr*, 10, 1007813.
- Frakking, F. N., Brouwer, N., van Eijkelenburg, N. K., Merkus, M. P., Kuijpers, T. W., Offringa, M., & Dolman, K. M. (2007). Low mannose-binding lectin (MBL) levels in neonates with pneumonia and sepsis. *Clin Exp Immunol*, 150(2), 255-262.
- Gilbert, M. A., Bauer, R. C., Rajagopalan, R., Grochowski, C. M., Chao, G., McEldrew, D., Nassur, J. A., Rand, E. B., Krock, B. L., Kamath, B. M., Krantz, I. D., Piccoli, D. A., Loomes, K. M., & Spinner, N. B. (2019). Alagille syndrome mutation update: Comprehensive overview of JAG1 and NOTCH2 mutation frequencies and insight into missense variant classification. *Hum Mutat*, 40(12), 2197-2220.
- Gilbert, M. A., & Loomes, K. M. (2021). Alagille syndrome and non-syndromic paucity of the intrahepatic bile ducts. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 6, 22.
- Gros, P., Milder, F. J., & Janssen, B. J. (2008). Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol*, 8(1), 48-58.
- Han, C. Y., Koo, J. H., Kim, S. H., Gardenghi, S., Rivella, S., Strnad, P., Hwang, S. J., & Kim, S. G. (2016). Hepcidin inhibits Smad3 phosphorylation in hepatic stellate cells by impeding ferroportin-mediated regulation of Akt. *Nat Commun*, 7, 13817.
- Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 24(12), 1551-1557.
- Harada, K., Ohba, K., Ozaki, S., Isse, K., Hirayama, T., Wada, A., & Nakanuma, Y. (2004). Peptide antibiotic human beta-defensin-1 and -2 contribute to antimicrobial defense of the intrahepatic biliary tree. *Hepatology*, 40(4), 925-932.
- Harada, K., Sato, Y., Ikeda, H., Isse, K., Ozaki, S., Enomae, M., Ohama, K., Katayanagi, K., Kurumaya, H., Matsui, A., & Nakanuma, Y. (2009). Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia. *J Pathol*, 217(5), 654-664.
- Hazlett, L., & Wu, M. (2011). Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res*, 343(1), 175-188.

- Hoerning, A., Raub, S., Dechêne, A., Brosch, M. N., Kathemann, S., Hoyer, P. F., & Gerner, P. (2014). Diversity of disorders causing neonatal cholestasis - the experience of a tertiary pediatric center in Germany. *Front Pediatr*, 2, 65.
- Holly, M. K., Diaz, K., & Smith, J. G. (2017). Defensins in Viral Infection and Pathogenesis. *Annu Rev Virol*, 4(1), 369-391.
- Hu, J., Zhang, Q., Ren, X., Sun, Z., & Quan, Q. (2015). Efficacy and safety of acetylcysteine in "non-acetaminophen" acute liver failure: A meta-analysis of prospective clinical trials. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 39(5), 594-599.
- Huang, Y. H., Chuang, J. H., Yang, Y. L., Huang, C. C., Wu, C. L., & Chen, C. L. (2009). Cholestasis downregulate hepcidin expression through inhibiting IL-6-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Lab Invest*, 89(10), 1128-1139.
- Huang, Y. H., Yu-Hsieh, H., Huang, C. C., Shin-Mu, V. T., Tai, M. H., Chen, C. L., & Chuang, J. H. (2006). Liver hepcidin and stainable iron expression in biliary atresia. *Pediatr Res*, 59(5), 662-666.
- Hukkinen, M., Pihlajoki, M., & Pakarinen, M. P. (2020). Predicting native liver injury and survival in biliary atresia. *Semin Pediatr Surg*, 29(4), 150943.
- Hukkinen, M., Ruuska, S., Pihlajoki, M., Kyrölahti, A., & Pakarinen, M. P. (2022). Long-term outcomes of biliary atresia patients surviving with their native livers. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 56-57, 101764.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., & Kroczek, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 397(6716), 263-266.
- Iordanskaia, T., Hubal, M. J., Koeck, E., Rossi, C., Schwarz, K., & Nadler, E. P. (2013). Dysregulation of upstream and downstream transforming growth factor- β transcripts in livers of children with biliary atresia and fibrogenic gene signatures. *J Pediatr Surg*, 48(10), 2047-2053.
- Israëls, J., Frakking, F. N., Kremer, L. C., Offringa, M., Kuijpers, T. W., & van de Wetering, M. D. (2010). Mannose-binding lectin and infection risk in newborns: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 95(6), F452-461.
- Jadlowiec, C. C., & Taner, T. (2016). Liver transplantation: Current status and challenges. *World J Gastroenterol*, 22(18), 4438-4445.
- Jaeger, S. U., Schroeder, B. O., Meyer-Hoffert, U., Courth, L., Fehr, S. N., Gersemann, M., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2013). Cell-mediated reduction of human β -defensin 1: a major role for mucosal thioredoxin. *Mucosal Immunol*, 6(6), 1179-1190.
- Kaltsa, G., Bamias, G., Siakavellas, S. I., Goukos, D., Karagiannakis, D., Zampeli, E., Vlachogiannakos, J., Michopoulos, S., Vafiadi, I., Daikos, G. L., & Ladas, S. D. (2016). Systemic levels of human β -defensin 1 are elevated in patients with cirrhosis. *Ann Gastroenterol*, 29(1), 63-70.
- Kasahara, M., Umeshita, K., Sakamoto, S., Fukuda, A., Furukawa, H., & Uemoto, S. (2017). Liver transplantation for biliary atresia: a systematic review. *Pediatr Surg Int*, 33(12), 1289-1295.
- Keizer, M. P., Wouters, D., Schlapbach, L. J., & Kuijpers, T. W. (2014). Restoration of MBL-deficiency: redefining the safety, efficacy and viability of MBL-substitution therapy. *Mol Immunol*, 61(2), 174-184.

- Kho, Z. Y., & Lal, S. K. (2018). The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Front Microbiol*, 9, 1835.
- Kilgore, A., & Mack, C. L. (2017). Update on investigations pertaining to the pathogenesis of biliary atresia. *Pediatr Surg Int*, 33(12), 1233-1241.
- Kim, J., Yang, Y. L., & Jang, Y. S. (2019). Human β -defensin 2 is involved in CCR2-mediated Nod2 signal transduction, leading to activation of the innate immune response in macrophages. *Immunobiology*, 224(4), 502-510.
- Klag, T., Thomas, M., Ehmann, D., Courth, L., Mailänder-Sanchez, D., Weiss, T. S., Dayoub, R., Abshagen, K., Vollmar, B., Thasler, W. E., Stange, E. F., Berg, C. P., Malek, N. P., Zanger, U. M., & Wehkamp, J. (2018). β -Defensin 1 Is Prominent in the Liver and Induced During Cholestasis by Bilirubin and Bile Acids via Farnesoid X Receptor and Constitutive Androstane Receptor. *Front Immunol*, 9, 1735.
- Klemann, C., Schröder, A., Dreier, A., Möhn, N., Dippel, S., Winterberg, T., Wilde, A., Yu, Y., Thorenz, A., Gueler, F., Jörns, A., Tolosa, E., Leonhardt, J., Haas, J. D., Prinz, I., Vieten, G., Petersen, C., & Kuebler, J. F. (2016). Interleukin 17, Produced by $\gamma\delta$ T Cells, Contributes to Hepatic Inflammation in a Mouse Model of Biliary Atresia and Is Increased in Livers of Patients. *Gastroenterology*, 150(1), 229-241.e225.
- Kohli, R., Cortes, M., Heaton, N. D., & Dhawan, A. (2018). Liver transplantation in children: state of the art and future perspectives. *Arch Dis Child*, 103(2), 192-198.
- Kremers, W. K., Devarbhavi, H. C., Wiesner, R. H., Krom, R. A., Macon, W. R., & Habermann, T. M. (2006). Post-transplant lymphoproliferative disorders following liver transplantation: incidence, risk factors and survival. *Am J Transplant*, 6(5 Pt 1), 1017-1024.
- Kubes, P., & Jenne, C. (2018). Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol*, 36, 247-277.
- Kumar, R., Lal, B. B., Sood, V., Khanna, R., Kumar, S., Bharathy, K. G. S., & Alam, S. (2019). Predictors of Successful Kasai Portoenterostomy and Survival with Native Liver at 2 Years in Infants with Biliary Atresia. *J Clin Exp Hepatol*, 9(4), 453-459.
- Kusaka, S., Nishida, A., Takahashi, K., Bamba, S., Yasui, H., Kawahara, M., Inatomi, O., Sugimoto, M., & Andoh, A. (2018). Expression of human cathelicidin peptide LL-37 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 191(1), 96-106.
- Kuwabara, T., Ishikawa, F., Kondo, M., & Kakiuchi, T. (2017). The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm*, 2017, 3908061.
- Lages, C. S., Simmons, J., Chougnet, C. A., & Miethke, A. G. (2012). Regulatory T cells control the CD8 adaptive immune response at the time of ductal obstruction in experimental biliary atresia. *Hepatology*, 56(1), 219-227.
- Lam, W. Y., Tang, C. S., So, M. T., Yue, H., Hsu, J. S., Chung, P. H., Nicholls, J. M., Yeung, F., Lee, C. D., Ngo, D. N., Nguyen, P. A. H., Mitchison, H. M., Jenkins, D., O'Callaghan, C., Garcia-Barceló, M. M., Lee, S. L., Sham, P. C., Lui, V. C., & Tam, P. K. (2021). Identification of a wide spectrum of ciliary gene mutations in nonsyndromic biliary atresia patients implicates ciliary dysfunction as a novel disease mechanism. *EBioMedicine*, 71, 103530.

- Lee, M., Kovacs-Nolan, J., Yang, C., Archbold, T., Fan, M. Z., & Mine, Y. (2009). Hen egg lysozyme attenuates inflammation and modulates local gene expression in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *J Agric Food Chem*, 57(6), 2233-2240.
- Lee, T. C., Savoldo, B., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Gee, A. P., Caldwell, Y., Barshes, N. R., Scott, J. D., Bristow, L. J., O'Mahony, C. A., & Goss, J. A. (2005). Quantitative EBV viral loads and immunosuppression alterations can decrease PTLTD incidence in pediatric liver transplant recipients. *Am J Transplant*, 5(9), 2222-2228.
- Lehrer, R. I. (2004). Primate defensins. *Nat Rev Microbiol*, 2(9), 727-738.
- Leiskau, C., Samuel, S., Pfister, E. D., Junge, N., Beneke, J., Stupak, J., Richter, N., Vondran, F., Schrem, H., & Baumann, U. (2021). Low-dose steroids do make a difference: Independent risk factors for impaired linear growth after pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant*, 25(4), e13989.
- Lendahl, U., Lui, V. C. H., Chung, P. H. Y., & Tam, P. K. H. (2021). Biliary Atresia - emerging diagnostic and therapy opportunities. *EBioMedicine*, 74, 103689.
- Li, F. B., Zhao, H., Peng, K. R., Gao, Z. G., Huang, S. J., Tou, J. F., Shu, X. L., & Gu, W. Z. (2016). Expression of transforming growth factor- β 1 and connective tissue growth factor in congenital biliary atresia and neonatal hepatitis liver tissue. *Genet Mol Res*, 15(1).
- Li, K., Zhang, X., Tang, S. T., Yang, L., Cao, G. Q., Li, S., & Yang, D. H. (2015). $\gamma\delta$ T cells and Foxp3(+) Treg cells infiltration in children with biliary atresia and its significance. *Int J Clin Exp Med*, 8(10), 18512-18517.
- Liang, J., Li, H., Fu, J., Liang, Q., Liu, T., Yang, F., Zhang, B., Bai, X., & Wen, Z. (2022). A model incorporating serum C3 complement levels may be useful for diagnosing biliary atresia in infants. *Gastroenterol Hepatol*, 45(1), 47-58.
- Lien, T. H., Chang, M. H., Wu, J. F., Chen, H. L., Lee, H. C., Chen, A. C., Tiao, M. M., Wu, T. C., Yang, Y. J., Lin, C. C., Lai, M. W., Hsu, H. Y., & Ni, Y. H. (2011). Effects of the infant stool color card screening program on 5-year outcome of biliary atresia in Taiwan. *Hepatology*, 53(1), 202-208.
- Liu, F., & Mao, J. H. (2018). Calcineurin inhibitors and nephrotoxicity in children. *World J Pediatr*, 14(2), 121-126.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lu, F. T., Wu, J. F., Hsu, H. Y., Ni, Y. H., Chang, M. H., Chao, C. I., & Chen, H. L. (2014). γ -Glutamyl transpeptidase level as a screening marker among diverse etiologies of infantile intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 59(6), 695-701.
- Mack, C. L. (2007). The pathogenesis of biliary atresia: evidence for a virus-induced autoimmune disease. *Semin Liver Dis*, 27(3), 233-242.
- Mack, C. L., Tucker, R. M., Sokol, R. J., Karrer, F. M., Kotzin, B. L., Whittington, P. F., & Miller, S. D. (2004). Biliary atresia is associated with CD4+ Th1 cell-mediated portal tract inflammation. *Pediatr Res*, 56(1), 79-87.
- Mangoni, M. L., McDermott, A. M., & Zasloff, M. (2016). Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Exp Dermatol*, 25(3), 167-173.

- Mani, I., Alexopoulou, A., Vasilieva, L., Hadziyannis, E., Agiasotelli, D., Bei, M., Alexopoulos, T., & Dourakis, S. P. (2019). Human beta-defensin-1 is a highly predictive marker of mortality in patients with acute-on-chronic liver failure. *Liver Int*, 39(2), 299-306.
- Mannes, M., Dopler, A., Zolk, O., Lang, S. J., Halbgebauer, R., Höchsmann, B., Skerra, A., Braun, C. K., Huber-Lang, M., Schrezenmeier, H., & Schmidt, C. Q. (2021). Complement inhibition at the level of C3 or C5: mechanistic reasons for ongoing terminal pathway activity. *Blood*, 137(4), 443-455.
- Meade, K. G., & O'Farrelly, C. (2018). β -Defensins: Farming the Microbiome for Homeostasis and Health. *Front Immunol*, 9, 3072.
- Milosevic, I., Vujovic, A., Barac, A., Djelic, M., Korac, M., Radovanovic Spurnic, A., Gmizic, I., Stevanovic, O., Djordjevic, V., Lekic, N., Russo, E., & Amedei, A. (2019). Gut-Liver Axis, Gut Microbiota, and Its Modulation in the Management of Liver Diseases: A Review of the Literature. *Int J Mol Sci*, 20(2).
- Min, J., Ningappa, M., So, J., Shin, D., Sindhi, R., & Subramaniam, S. (2020). Systems Analysis of Biliary Atresia Through Integration of High-Throughput Biological Data. *Front Physiol*, 11, 966.
- Mohamed, S. O. O., Elhassan, A. B. E., Elkhidir, I. H. E., Ali, A. H. M., Elbathani, M. E. H., Abdallah, O. O. A., Ahmed, A. A. M., Ibrahim, A. A. H., Salman, M. S. T., Elnil, M., Elhassan, M. A. M., & Abuzied, A. I. H. (2022). Detection of Cytomegalovirus Infection in Infants with Biliary Atresia: A Meta-analysis. *Avicenna J Med*, 12(1), 3-9.
- Nalle, S. C., & Turner, J. R. (2015). Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease. *Mucosal Immunol*, 8(4), 720-730.
- Neth, O., Jack, D. L., Dodds, A. W., Holzel, H., Klein, N. J., & Turner, M. W. (2000). Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun*, 68(2), 688-693.
- Noorulla, F., Dedon, R., & Maisels, M. J. (2019). Association of Early Direct Bilirubin Levels and Biliary Atresia Among Neonates. *JAMA Netw Open*, 2(10), e1913321.
- O'Neil, D. A., Porter, E. M., Elewaut, D., Anderson, G. M., Eckmann, L., Ganz, T., & Kagnoff, M. F. (1999). Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*, 163(12), 6718-6724.
- Omenetti, A., Bass, L. M., Anders, R. A., Clemente, M. G., Francis, H., Guy, C. D., McCall, S., Choi, S. S., Alpini, G., Schwarz, K. B., Diehl, A. M., & Whittington, P. F. (2011). Hedgehog activity, epithelial-mesenchymal transitions, and biliary dysmorphogenesis in biliary atresia. *Hepatology*, 53(4), 1246-1258.
- Ozdemir, O. (2013). New developments in transplant-acquired allergies. *World J Transplant*, 3(3), 30-35.
- Pahar, B., Madonna, S., Das, A., Albanesi, C., & Girolomoni, G. (2020). Immunomodulatory Role of the Antimicrobial LL-37 Peptide in Autoimmune Diseases and Viral Infections. *Vaccines (Basel)*, 8(3).
- Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., & Ganz, T. (2001). Hecpidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, 276(11), 7806-7810.
- Porritt, R. A., Binek, A., Paschold, L., Rivas, M. N., McArdle, A., Yonker, L. M., Alter, G., Chandnani, H. K., Lopez, M., Fasano, A., Van Eyk, J. E., Binder, M., & Arditi, M.

- (2021). The autoimmune signature of hyperinflammatory multisystem inflammatory syndrome in children. *J Clin Invest*, 131(20).
- Quelhas, P., Breton, M. C., Oliveira, R. C., Cipriano, M. A., Teixeira, P., Cerski, C. T., Shivakumar, P., Vieira, S. M. G., Kieling, C. O., Verde, I., & Santos, J. L. D. (2023). HIF-1 α -pathway activation in cholangiocytes of patients with biliary atresia: An immunohistochemical/molecular exploratory study. *J Pediatr Surg*, 58(3), 587-594.
- Ragland, S. A., & Criss, A. K. (2017). From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog*, 13(9), e1006512.
- Rasch, D., Kubinger, K. D., & Moder, K. (2011). The two-sample t test: pre-testing its assumptions does not pay off. *Statistical papers*, 52(1), 219-231.
- Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics*, 2(1), 21-33.
- Rezende, R. M., da Cunha, A. P., Kuhn, C., Rubino, S., M'Hamdi, H., Gabriely, G., Vandeventer, T., Liu, S., Cialic, R., Pinheiro-Rosa, N., Oliveira, R. P., Gaublot, J. T., Obholzer, N., Kozubek, J., Pochet, N., Faria, A. M. C., & Weiner, H. L. (2015). Identification and characterization of latency-associated peptide-expressing $\gamma\delta$ T cells. *Nat Commun*, 6, 8726.
- Riepenhoff-Talty, M., Schaekel, K., Clark, H. F., Mueller, W., Uhnoo, I., Rossi, T., Fisher, J., & Ogra, P. L. (1993). Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice. *Pediatr Res*, 33(4 Pt 1), 394-399.
- Rubio, C. A. (2014). The Natural Antimicrobial Enzyme Lysozyme is Up-Regulated in Gastrointestinal Inflammatory Conditions. *Pathogens*, 3(1), 73-92.
- Ryan, J. D., Altamura, S., Devitt, E., Mullins, S., Lawless, M. W., Muckenthaler, M. U., & Crowe, J. (2012). Pegylated interferon- α induced hypoferrremia is associated with the immediate response to treatment in hepatitis C. *Hepatology*, 56(2), 492-500.
- Sampaziotis, F., Muraro, D., Tysoe, O. C., Sawiak, S., Beach, T. E., Godfrey, E. M., Upponi, S. S., Brevini, T., Wesley, B. T., Garcia-Bernardo, J., Mahbubani, K., Canu, G., Gieseck, R., 3rd, Berntsen, N. L., Mulcahy, V. L., Crick, K., Fear, C., Robinson, S., Swift, L., . . . Vallier, L. (2021). Cholangiocyte organoids can repair bile ducts after transplantation in the human liver. *Science*, 371(6531), 839-846.
- Santos Silva, E., Moreira Silva, H., Catarino, C., Dias, C. C., Santos-Silva, A., & Lopes, A. I. (2021). Neonatal cholestasis: development of a diagnostic decision algorithm from multivariate predictive models. *Eur J Pediatr*, 180(5), 1477-1486.
- Schmitt, J., Roderfeld, M., Sabrane, K., Zhang, P., Tian, Y., Mertens, J. C., Frei, P., Stieger, B., Weber, A., Müllhaupt, B., Roeb, E., & Geier, A. (2012). Complement factor C5 deficiency significantly delays the progression of biliary fibrosis in bile duct-ligated mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 418(3), 445-450.
- Schreiber, R. A., Barker, C. C., Roberts, E. A., Martin, S. R., Alvarez, F., Smith, L., Butzner, J. D., Wrobel, I., Mack, D., Moroz, S., Rashid, M., Persad, R., Levesque, D., Brill, H., Bruce, G., Critch, J., & Canadian Pediatric Hepatology Research, G. (2007). Biliary atresia: the Canadian experience. *J Pediatr*, 151(6), 659-665, 665 e651.
- Schroeder, B. O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2011). Reduction of

- disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature*, 469(7330), 419-423.
- Segev, D. L., Sozio, S. M., Shin, E. J., Nazarian, S. M., Nathan, H., Thuluvath, P. J., Montgomery, R. A., Cameron, A. M., & Maley, W. R. (2008). Steroid avoidance in liver transplantation: meta-analysis and meta-regression of randomized trials. *Liver Transpl*, 14(4), 512-525.
- Semple, F., & Dorin, J. R. (2012). β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immun*, 4(4), 337-348.
- Serinet, M. O., Wildhaber, B. E., Broué, P., Lachaux, A., Sarles, J., Jacquemin, E., Gauthier, F., & Chardot, C. (2009). Impact of age at Kasai operation on its results in late childhood and adolescence: a rational basis for biliary atresia screening. *Pediatrics*, 123(5), 1280-1286.
- Shen, W. J., Chen, G., Wang, M., & Zheng, S. (2019). Liver fibrosis in biliary atresia. *World J Pediatr*, 15(2), 117-123.
- Si, X., Chen, J., & Huang, L. (2021). RRV-induced biliary atresia in neonatal mice involves CD8 + T lymphocyte killer cells and the Notch signaling pathway. *Genes Genomics*, 43(11), 1289-1299.
- Sinal, C. J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J. M., Lambert, G., & Gonzalez, F. J. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*, 102(6), 731-744.
- Son, G., Kremer, M., & Hines, I. N. (2010). Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterol Res Pract*, 2010.
- Sørensen, O., Arnljots, K., Cowland, J. B., Bainton, D. F., & Borregaard, N. (1997). The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*, 90(7), 2796-2803.
- Srivastava, A. (2014). Progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Clin Exp Hepatol*, 4(1), 25-36.
- Sun, X., Cai, Y., Dai, W., Jiang, W., & Tang, W. (2022). The difference of gut microbiome in different biliary diseases in infant before operation and the changes after operation. *BMC Pediatr*, 22(1), 502.
- Super, M., Thiel, S., Lu, J., Levinsky, R. J., & Turner, M. W. (1989). Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet*, 2(8674), 1236-1239.
- Tagashira, A., Nishi, K., & Sugahara, T. (2019). Lysozyme from hen egg white ameliorates lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in mice. *Cytotechnology*, 71(2), 497-506.
- Takahashi, K., & Ezekowitz, R. A. (2005). The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 7, S440-444.
- Tam, P. K. H., Wells, R. G., Tang, C. S. M., Lui, V. C. H., Hukkinen, M., Luque, C. D., De Coppi, P., Mack, C. L., Pakarinen, M., & Davenport, M. (2024). Biliary atresia. *Nat Rev Dis Primers*, 10(1), 47.
- Tamgal, J., Damrongmanee, A., Khorana, J., Tepmalai, K., & Ukarapol, N. (2019). Clearance of jaundice after the modified Kasai's operation predicts survival outcomes in patients with biliary atresia. *Turk J Pediatr*, 61(1), 7-12.

- Tan, T. C., Crawford, D. H., Franklin, M. E., Jaskowski, L. A., Macdonald, G. A., Jonsson, J. R., Watson, M. J., Taylor, P. J., & Fletcher, L. M. (2012). The serum hepcidin:ferritin ratio is a potential biomarker for cirrhosis. *Liver Int*, *32*(9), 1391-1399.
- Tanwar, S., Rhodes, F., Srivastava, A., Trembling, P. M., & Rosenberg, W. M. (2020). Inflammation and fibrosis in chronic liver diseases including non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *World J Gastroenterol*, *26*(2), 109-133.
- Umehara, Y., Takahashi, M., Yue, H., Trujillo-Paez, J. V., Peng, G., Nguyen, H. L. T., Okumura, K., Ogawa, H., & Niyonsaba, F. (2022). The Antimicrobial Peptides Human β -Defensins Induce the Secretion of Angiogenin in Human Dermal Fibroblasts. *Int J Mol Sci*, *23*(15).
- Vandriel, S. M., Li, L. T., She, H., Wang, J. S., Gilbert, M. A., Jankowska, I., Czubkowski, P., Gliwicz-Miedzińska, D., Gonzales, E. M., Jacquemin, E., Bouligand, J., Spinner, N. B., Loomes, K. M., Piccoli, D. A., D'Antiga, L., Nicastro, E., Sokal, É., Demaret, T., Ebel, N. H., . . . Kamath, B. M. (2023). Natural history of liver disease in a large international cohort of children with Alagille syndrome: Results from the GALA study. *Hepatology*, *77*(2), 512-529.
- Vignesh, P., Rawat, A., Sharma, M., & Singh, S. (2017). Complement in autoimmune diseases. *Clin Chim Acta*, *465*, 123-130.
- Vij, M., Rammohan, A., & Rela, M. (2022). Long-term liver allograft fibrosis: A review with emphasis on idiopathic post-transplant hepatitis and chronic antibody mediated rejection. *World J Hepatol*, *14*(8), 1541-1549.
- Vij, M., & Rela, M. (2020). Biliary atresia: pathology, etiology and pathogenesis. *Future Sci OA*, *6*(5), Fso466.
- Walport, M. J. (2001). Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, *344*(14), 1058-1066.
- Wang, J., Xu, Y., Chen, Z., Liang, J., Lin, Z., Liang, H., Xu, Y., Wu, Q., Guo, X., Nie, J., Lu, B., Huang, B., Xian, H., Wang, X., Wu, Q., Zeng, J., Chai, C., Zhang, M., Lin, Y., . . . Zhang, Y. (2020). Liver Immune Profiling Reveals Pathogenesis and Therapeutics for Biliary Atresia. *Cell*, *183*(7), 1867-1883.e1826.
- Wang, W., Donnelly, B., Bondoc, A., Mohanty, S. K., McNeal, M., Ward, R., Sestak, K., Zheng, S., & Tiao, G. (2011). The rhesus rotavirus gene encoding VP4 is a major determinant in the pathogenesis of biliary atresia in newborn mice. *J Virol*, *85*(17), 9069-9077.
- Worthley, D. L., Bardy, P. G., & Mullighan, C. G. (2005). Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Intern Med J*, *35*(9), 548-555.
- Wu, B., Zhou, Y., Tian, X., Cai, W., & Xiao, Y. (2022). Diagnostic values of plasma matrix metalloproteinase-7, interleukin-8, and gamma-glutamyl transferase in biliary atresia. *Eur J Pediatr*, *181*(11), 3945-3953.
- Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, *448*(7152), 427-434.
- Yang, B., Good, D., Mosaiab, T., Liu, W., Ni, G., Kaur, J., Liu, X., Jessop, C., Yang, L., Fadhil, R., Yi, Z., & Wei, M. Q. (2020). Significance of LL-37 on Immunomodulation and Disease Outcome. *Biomed Res Int*, *2020*, 8349712.
- Yang, C., Xing, H., Tan, B., & Zhang, M. (2022). Immune Characteristics in Biliary Atresia Based on Immune Genes and Immune Cell Infiltration. *Front Pediatr*, *10*, 902571.

- Yang, Y., Zeng, C., Yang, S., Zhang, Y., Song, S., Liu, S., Shu, Q., Fang, X., & Chen, Q. (2020). Airway Epithelial Hecpidin Coordinates Lung Macrophages and Immunity Against Bacterial Pneumonia. *Shock*, *54*(3), 402-412.
- Yap, B. W., & Sim, C. H. (2011). Comparisons of various types of normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, *81*(12), 2141-2155.
- Yazigi, N. A. (2013). Long term outcomes after pediatric liver transplantation. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, *16*(4), 207-218.
- Yu, S., Balasubramanian, I., Laubitz, D., Tong, K., Bandyopadhyay, S., Lin, X., Flores, J., Singh, R., Liu, Y., Macazana, C., Zhao, Y., Béguet-Crespel, F., Patil, K., Midura-Kiela, M. T., Wang, D., Yap, G. S., Ferraris, R. P., Wei, Z., Bonder, E. M., . . . Gao, N. (2020). Paneth Cell-Derived Lysozyme Defines the Composition of Mucolytic Microbiota and the Inflammatory Tone of the Intestine. *Immunity*, *53*(2), 398-416.e398.
- Zagory, J. A., Dietz, W., Park, A., Fenlon, M., Xu, J., Utley, S., Mavila, N., & Wang, K. S. (2017). Notch signaling promotes ductular reactions in biliary atresia. *J Surg Res*, *215*, 250-256.
- Zanetti, M. (2005). The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol*, *7*(2), 179-196.
- Zhang, J., Luo, Y., Feng, M., & Xia, Q. (2021). Identification of Liver Immune Microenvironment-Related Hub Genes in Liver of Biliary Atresia. *Front Pediatr*, *9*, 786422.
- Zhang, L. J., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Curr Biol*, *26*(1), R14-19.
- Zhang, Q., Pan, Y., Yan, R., Zeng, B., Wang, H., Zhang, X., Li, W., Wei, H., & Liu, Z. (2015). Commensal bacteria direct selective cargo sorting to promote symbiosis. *Nat Immunol*, *16*(9), 918-926.
- Zhang, S., Goswami, S., Ma, J., Meng, L., Wang, Y., Zhu, F., Zhang, D., Zheng, S., Dong, R., Xiao, X., Zhang, X., & Chen, G. (2019). CD4(+)T Cell Subset Profiling in Biliary Atresia Reveals ICOS(-) Regulatory T Cells as a Favorable Prognostic Factor. *Front Pediatr*, *7*, 279.
- Zhao, L., & Lu, W. (2014). Defensins in innate immunity. *Curr Opin Hematol*, *21*(1), 37-42.

8 Anhang

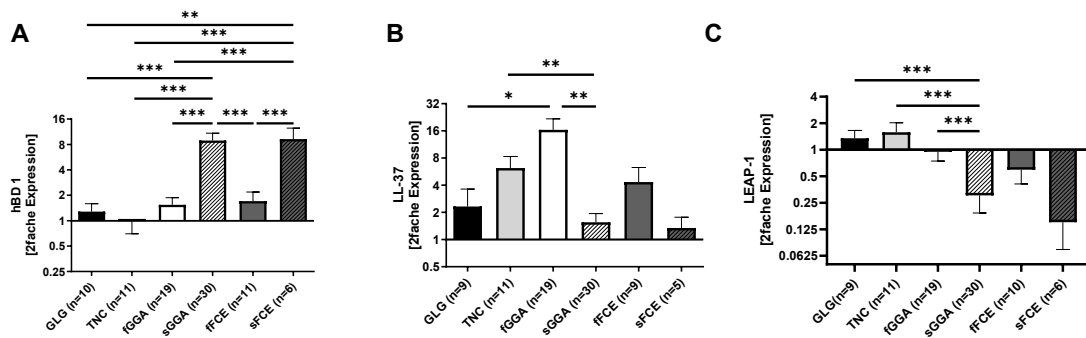


Abbildung 18. Signifikante Gruppenunterschiede der hBD1, LL-37 und LEAP-1-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen. Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von (A) hBD1, (B) LL-37 und (C) LEAP-1 im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei transientser neonataler Cholestase (TNC), GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA), GGA zum Zeitpunkt der LTx (sGGA), FCE im frühen Krankheitsstadium (fFCE) und FCE im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (sFCE). Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 6 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet; * = $p \leq ,05$; ** = $p \leq ,01$; *** = $p \leq ,001$.

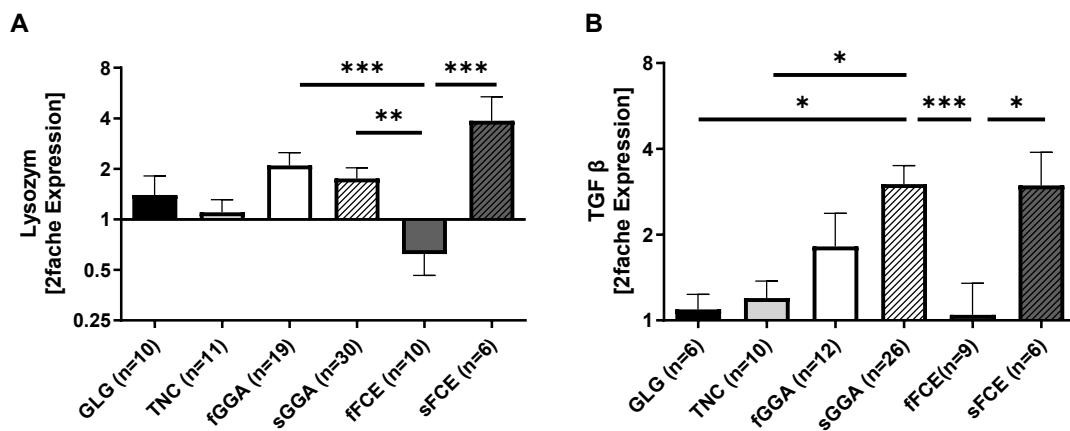


Abbildung 19. Signifikante Gruppenunterschiede der Lysozym- und TGFβ-Expression in der nativen Leber pädiatrischer Cholestaseerkrankungen. Zweifache Expression, normalisiert zu GADPH, von (A) Lysozym und (B) TGFβ im gesunden pädiatrischen Lebergewebe (GLG), bei transientser neonataler Cholestase (TNC), GGA zum Zeitpunkt der Diagnose (fGGA), GGA zum Zeitpunkt der LTx (sGGA), FCE im frühen Krankheitsstadium (fFCE) und FCE im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (sFCE). Der Mittelwert und der SEM wurden von mindestens 6 biologischen Replikaten gebildet. Gruppenunterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA und anschließenden paarweisen Vergleichen berechnet; * = $p \leq ,05$; ** = $p \leq ,01$; *** = $p \leq ,001$.

9 Eigenanteilserklärung

Die Arbeit wurde in der Fachabteilung für Kindergastroenterologie und -hepatologie der Kinderklinik des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von PD Dr. Dr. Ekkehard Sturm und Dr. Dr. med. Christoph Slavetinsky durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit von PD Dr. Dr. Ekkehard Sturm und Dr. Dr. med. Christoph Slavetinsky. Die Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Anleitung und Unterstützung erhielt ich von meinem Betreuer und Laborkolleg*innen. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Dr. med. Christoph Slavetinsky und Dr. Anette Stauch der Statistik-Beratung der Kinderklinik. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Zu den Daten in Kapitel 3.1.1. ist ein Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht.

10 Danksagung

An erster Stelle möchte mich bei Christoph Slavetinsky bedanken. Du hast mir mit viel Geduld den Einstieg in die wissenschaftliche Arbeit gezeigt und mir die Faszination für die Forschung gelehrt. Ich bin dankbar für die Unterstützung wie auch für den Freiraum, in dem ich meine eigenen Fragen und Forschungsideen entwickeln und ausdiskutieren konnte. Du hast es ermöglicht, in der teils sehr abstrakten Arbeit mit den Peptiden die Einbettung in den klinischen Kontext und die aktuelle Relevanz der Ergebnisse präsent zu halten. Bei Herrn PD Dr. Dr. Ekkehard Sturm möchte ich mich herzlichst bedanken für die Ermöglichung eines spannenden und vielfältigen Dissertationsthemas, für die konstruktiven Korrekturen und das Vertrauen, welches mir entgegengebracht wurde. Ein großes Dankeschön möchte ich auch an die gesamte AG Peschel in der Infektionsbiologie und die IGIM richten, welche mir eine spannende und schöne Laborzeit sowie eine lehrreiche Arbeitsumgebung ermöglicht und mich stets wie ein Teil der Forschungsgruppe behandelt haben. Ich bin sehr dankbar für die unzähligen kleinen Momente, in denen ich Erklärungen und Unterstützung annehmen durfte. Ein besonderes Dankeschön darf hier an Jana Hauser gehen. Du hast einen großen Teil dazu beigetragen, dass ich jeden Tag gerne ins Labor gekommen bin und mir sehr geholfen bei kleinen und auch größeren Fragen, die auftauchten. Auch bei dem Labor der Kinderklinik möchte ich mich herzlichst bedanken, von dem ich die Proben zur Verfügung gestellt bekommen habe und meine weiteren Versuche im Verlauf durchführen durfte. Hier ein besonderes Dankeschön an Annie. Danke für die gemeinsamen Zeiten im Labor, das gemeinsame Lernen und für die sorgfältige Aufbewahrung und Sortierung der Proben. Danke für die Offenheit, auch wenn ich nicht selten unangekündigt ins Labor geschneit bin und für deine Unterstützung. Auch Dr. Anette Stauch aus der Statistikberatung der Kinderklinik möchte ich herzlichst danken für die Beratung.

Und zu guter Letzt geht ein unfassbar großes Dankeschön an meine Familie und meine Freund*innen. Danke, Mona, Hannes, Caren, Julia, Emy dafür, dass ihr immer ein offenes Ohr hattet und mir durch unsere Freundschaft ganz viel Kraft und Freude bereitet habt. Danke für die vielen wunderbaren Jahre in Tübingen

mit euch, für die Unterstützung und die so vielen wertvollen Momente, die wir in dieser Zeit gemeinsam erlebt haben. Danke, Nina, dass ich dich immer anrufen durfte, wenn es etwas gab, für die wohltuenden Wanderurlaube und Gespräche. Danke, Yul, ohne den besten Eiskaffee der Welt, die Schokokekse und die täglichen Schreibverabredungen wäre das wohl deutlich anstrengender geworden. Danke, Jascha und Henni, für die endlosen motivierenden Waffelfrühstücke. Ein Dankeschön von ganzem Herzen geht an Lara und Elena für den vielen emotionalen Rückhalt, die Unterstützung und die mehrfachen liebevollen Korrekturen, an Tim und Aaron, die mich Gelassenheit und Durchhaltevermögen gelehrt haben. Und natürlich auch ein besonders großes Dankeschön an meine Eltern, die mich mit so viel Energie und Fürsorge auf jedem Schritt meines Weges unterstützt haben und ohne die ich es nie bis hierhergeschafft hätte.