



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Identifikation differenziell regulierter Mediatoren im
Rahmen der Leberregeneration und
reziproke Beeinflussung der Zellfunktion von
Makrophagen und Hepatozyten durch interzelluläre
Kommunikationsprozesse**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Stephanie Wolf

aus Limburg

Düsseldorf, Mai 2015

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Dieter Häussinger

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

Referent: Prof. Dr. Johannes G. Bode
Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2015

Veröffentlichungen von Auszügen aus dieser Arbeit:

in Originalarbeiten

Wolf S, Hahnel MJ, Missing L, Knievel J, Albrecht U, Ehlting C, Zanger U, Thomas M, Hengstler JG, Häussinger D, Bode JG. **Hepatocytes determine differentiation and activation of macrophages through intercellular communication** [Manuskript in Bearbeitung]

Braun S, Raue A, Huang X, Vanlier J, Bohl S, Hahnel MJ, **Wolf S**, Albrecht U, Mueller NS, D'Alessandro LA, Müller S, Böhm ME, Lucarelli P, Bonefas S, Harder N, Rohr K, Lehmann WD, Rose-John S, van der Hoeven F, Gretz N, Theis FJ, Bode JG, Timmer J, Schilling M, Klingmüller U. **Quantitative prediction of the targeted inhibition in the IL-6 signaling network** [Manuskript in Bearbeitung]

Knievel J, Missing L, **Wolf S**, Hahnel MJ, Böhmer O, Häussinger D, Bode JG. **Combined stimulation with HGF and TNF α is required to enable chemokine-mediated recruitment of neutrophils by hepatocytes** [Manuskript in Bearbeitung]

Missing L, Knievel J, **Wolf S**, Hahnel MJ, Häussinger D, Bode JG. **Inhibition of bile-acid induced expression of the bile salt export pump BSEP by IL-1 β involves chemokine driven autocrine circuits** [Manuskript in Bearbeitung]

als Posterbeiträge

Wolf S*, Missing L*, Hahnel MJ, Knievel J, Kulawik A, Böhmer O, Albrecht U, Meyer C, Drasdo D, Klingmüller U, Raue A, Timmer J, Seddik H, Hengstler J, Häussinger D, Bode J. **Reconstitution of macrophage population and impact of their differential activation on cytokine signaling and FXR-dependent bile acid transporter expression in hepatocytes during liver regeneration.** 4th Conference on System Biology of Mammalian Cells (SBMC), Juli 2012, Leipzig (* gleichberechtigte Erstautoren)

Wolf S*, Knievel J*, Häussinger D, Bode JG. **Interactive influence of macrophages and hepatocytes in co-culture.** 43rd Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI), September 2013, Mainz (* gleichberechtigte Erstautoren)

Wolf S, Häussinger D, Bode JG. **Intercellular communication of macrophages and hepatocytes and its impact on macrophage differentiation and activation.** 30th Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver (GASL), Januar 2014, Tübingen

Wolf S, Häussinger D, Bode JG. Hepatocytes induce a macrophage phenotype that is characterized by expression of a marker profile indicating M2 macrophages and functional properties of regulatory macrophages. 49th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), April 2014, London

Wolf S, Häussinger D, Bode JG. Hepatocytes secrete a mediator pattern that induces macrophage phenotype with properties of wound healing type and regulatory macrophages. 31th Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver (GASL), Januar 2015, München

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 5 |
| Abbildungsverzeichnis..... | 8 |
| Abkürzungsverzeichnis | 11 |
| 1. Einleitung..... | 15 |
| 1.1 Die Leber | 15 |
| 1.2 Immunologische Bedeutung der Leber..... | 17 |
| 1.2.1 Endothelzellen | 17 |
| 1.2.2 Sternzellen | 17 |
| 1.2.3 Hepatozyten..... | 17 |
| 1.2.4 Kupffer-Zellen | 18 |
| 1.3 Die Akut-Phase-Reaktion | 23 |
| 1.4 Leberregeneration | 24 |
| 1.5 Modell-Systeme | 27 |
| 1.6 Interzelluläre Kommunikation zwischen Hepatozyten und Makrophagen | 30 |
| 1.7 Zielsetzung | 32 |
| 2. Material und Methoden | 33 |
| 2.1. Material..... | 33 |
| 2.1.1 Versuchstiere | 33 |
| 2.1.2 Zellpräparation und Leberresektion | 34 |
| 2.1.3 Zellkultur | 35 |
| 2.1.4 Primer..... | 36 |
| 2.1.5 Kits..... | 38 |
| 2.1.6 Antikörper / Immunhistochemie | 39 |
| 2.1.7 Geräte | 40 |
| 2.2 Methoden | 40 |
| 2.2.1 Leberresektion | 40 |
| 2.2.2 Immunhistochemie | 42 |
| 2.2.3 Präparation primärer Maushepatozyten | 42 |
| 2.2.4 Zellseparation mittels MACS-Technologie | 44 |
| 2.2.4.1 Aufreinigung primärer Hepatozyten..... | 44 |
| 2.2.4.2 Gewinnung von Lebermakrophagen..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.5 Sandwich-Kultur | 45 |
| 2.2.6 Gewinnung von knochenmarksgenerierten murinen Makrophagen (BMDM) ... | 45 |
| 2.2.7 Ko-Kultur | 46 |
| 2.2.8 Durchflusszytometrie..... | 47 |
| 2.2.9 RNA-Isolierung | 48 |
| 2.2.10 c-DNA Synthese..... | 49 |
| 2.2.11 Quantitative PCR..... | 49 |
| 2.2.12 Proteinbestimmung | 50 |
| 2.2.12.1 Multiplex-Analyse | 50 |
| 2.2.12.2 ELISA..... | 51 |
| 3. Ergebnisse..... | 52 |
| 3.1 Differenzielle Regulation der Leberregeneration in wt Mäusen | 52 |
| 3.1.1 Rekonstitution des Körper- und Lebergewichts nach PHx..... | 52 |
| 3.1.2 Serumanalyse..... | 53 |
| 3.1.3 Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Akut-Phase-Proteinen | 56 |
| 3.2 Relevanz der MK2 für die Leberregeneration..... | 64 |
| 3.3 Ko-Kultur | 68 |
| 3.3.1 Etablierung eines Ko-Kultursystems | 68 |
| 3.3.2 Einfluss von Hepatozyten auf die Differenzierung von BMDMs..... | 73 |
| 3.3.3 Vergleich Kupffer-Zellen und BMDMs nach Ko-Kultur | 76 |
| 3.3.4 Einfluss der Ko-Kultur auf die LPS-induzierte Zytokinexpression | 78 |
| 3.3.5 Einfluss von konditioniertem Medium auf die Funktionalität von BMDMs | 81 |
| 3.3.6 Einfluss von BMDMs auf Hepatozyten..... | 84 |
| 3.3.7 Einfluss verschiedener Gen- <i>Knockouts</i> auf die interzelluläre Kommunikation zwischen BMDMs und Hepatozyten..... | 88 |
| 3.3.8 Auswirkung des TGF- β Rezeptor-Inhibitors SB431542 auf die Differenzierung von BMDMs in der Ko-Kultur | 94 |
| 4. Diskussion | 99 |
| 4.1 Leberregeneration | 99 |
| 4.1.1 Rekonstitution der Leber bei wt und $mk2^{-/-}$ Mäusen..... | 99 |
| 4.1.2 Identifizierung möglicher relevanter Faktoren für die Leberregeneration | 100 |
| 4.2 Ko-Kultur | 105 |
| 4.2.1 Etablierung des Ko-Kultursystems | 105 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.2 Hepatozyten induzieren einen M2-ähnlichen Phänotyp in BMDMs durch direkte Ko-Kultivierung..... | 106 |
| 4.2.3 BMDMs beeinflussen die Expression von Chemokinen und APP in Hepatozyten | 107 |
| 4.2.4 Einfluss verschiedener Gen- <i>knockouts</i> auf die Differenzierung von BMDMs ... | 108 |
| 4.2.5 TGF- β hemmt die Expression von M2-typischen Markern | 109 |
| 5. Zusammenfassung..... | 112 |
| 6. Summary..... | 114 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 116 |
| 8. Danksagung..... | 132 |
| 9. Lebenslauf..... | 134 |
| Eidesstattliche Erklärung | 135 |

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Leber und ihrer Zelltypen | 16 |
| Abbildung 2: Differenzierung von Makrophagen | 22 |

2. Material und Methoden

| | |
|--|----|
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anatomie der Mausleber | 42 |
|--|----|

3. Ergebnisse

| | |
|--|-------|
| Abbildung 4: Rekonstitution des Körper- bzw. Lebergewichts nach Resektion bei wt Mäusen | 53 |
| Abbildung 5: Die Hepatektomien führen zu einer Erhöhung der Bilirubin Gesamtkonzentration sowie der Aktivitäten von GPT, LDH, GPT und AP | 55 |
| Abbildung 6: Einfluss der PHx- und Sham-Operationen auf die Genexpression von CCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, IL-33 und LTB | 57 |
| Abbildung 7: Die Leberresektion führt zu einer erhöhten Serumkonzentration der Zytokine CCL2, CCL4, IL-6 und IL-10 | 58 |
| Abbildung 8: Einfluss der PHx- bzw. Sham-Operation auf die Expression von VEGF-A, NRG1, CSF1 und den CSF1-Rezeptor | 59 |
| Abbildung 9: Einfluss von PHx- bzw. Sham-Operationen auf die Genexpression diverser APP | 61-62 |
| Abbildung 10: Einfluss von PHx- bzw. Sham-Operationen auf die Serumkonzentration von α 2M, CRP, Adipsin, ORM und HP | 63 |
| Abbildung 11: Rekonstitution des Körper- bzw. Lebergewichts nach Resektion bei bzw. mk2 defizienten Mäusen | 64 |
| Abbildung 12: Einfluss der MK2 auf die Aktivität von AP nach PHx- bzw. Sham-Operation | 65 |
| Abbildung 13: MK2-Defizienz führt zu einer verminderten Zellproliferation 2 Tage nach PHx | 66 |
| Abbildung 14: Die Depletion CD11b positiver Zellen führt zu einem deutlichen Abfall der LPS-induzierten Expression von IL-6 und IL-10 | 68 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 15: Die Sandwichkultivierung von primären Hepatozyten stabilisiert die Morphologie der Zellen | 70 |
| Abbildung 16: Die Differenzierung von Knochenmarkszellen mit M-CSF führt zur Generierung von Zellen mit typischen Makrophagenmarkern..... | 72 |
| Abbildung 17: Erhöhte Zelldichten von BMDMs führen zu verminderten Expression von IL-6, TNF- α , IL-12 und IFN- β | 72 |
| Abbildung 18: Durch direkte Ko-Kultivierung induzieren Hepatozyten einen M2-ähnlichen Phänotyp in BMDMs | 74 |
| Abbildung 19: Der Transfer von durch Hepatozyten konditioniertem Medium führt nicht zur Ausbildung des gleichen Phänotyps von BMDMs wie die direkte Ko-Kultivierung | 75 |
| Abbildung 20: Der durch die Ko-Kultivierung in BMDMs erzeugte Phänotyp entspricht in wesentlichen Aspekten dem von Kupffer-Zellen | 77 |
| Abbildung 21: Mit Hepatozyten kokultivierte BMDMs weisen nach LPS-Stimulation in der Zytokinexpression Merkmale regulatorischer Makrophagen auf | 79 |
| Abbildung 22: Die Ko-Kultivierung induziert eine verstärkte Expression der Chemokine CCL2, CCL3 und CCL4 in BMDMs nach LPS-Stimulation | 80 |
| Abbildung 23: Die Ko-Kultivierung induziert eine erhöhte IL-10 und verminderte TNF- α Konzentration im Zellüberstand nach LPS-Stimulation | 81 |
| Abbildung 24: Der konditionierte Überstand von Hepatozyten verstärkt die RNA-Expression von IL-10 nach LPS-Stimulation in BMDMs | 83 |
| Abbildung 25: Hepatozyten exprimieren nach LPS-Stimulation verstärkt die Chemokine CCL2-4 und CXCL1-3 | 85 |
| Abbildung 26: Hepatozyten in Ko-Kultur mit BMDMs exprimieren nach LPS-Stimulation verstärkt die APP α 2M, SAA1, CRP, SAA3, SAP und C3 | 86 |
| Abbildung 27: Die Ko-Kultivierung führt im Zellüberstand zu einer erhöhten Konzentration von ORM und CRP, während die Konzentration von HP und α 2M vermindert ist | 87 |
| Abbildung 28: Einfluss von MK2 auf die Differenzierung von BMDMs | 89 |
| Abbildung 29: IFN- α -Rezeptor1 defiziente BMDMs exprimieren vermindert Gr1, CD11c und CD163 nach Ko-Kultivierung mit Hepatozyten | 90 |
| Abbildung 30: Die IL-10 Defizienz führt bei kokultivierten BMDMs zu einer verminderten IFN- β und gesteigerten TNF- α RNA-Expression | 91 |

- Abbildung 31: Die IL-10 Defizienz führt bei Ko-Kultivierung zu einer verstärkten RNA-Expression der Chemokine CCL3, CCL4 und CXCL1-3 in wt Hepatozyten92
- Abbildung 32: IL-10 bedingt einen verminderten Anstieg der RNA-Expression von C3, C4, ORM, CRP, HP, HPx und FG- α nach LPS-Stimulation in mit wt BMDMs kokultivierten Hepatozyten93
- Abbildung 33: TGF- β Rezeptor-Signale führen zu einer Inhibition der Expression von CD11c, CD163 und CD206 in BMDMs.....95
- Abbildung 34: Die Hemmung des TGF- β Rezeptors Typ I hebt die Unterschiede in der Expression zwischen mono- und kokultivierten BMDMs nach LPS-Stimulation auf96
- Abbildung 35: Die Ko-Kultivierung von BMDMs mit Hepatozyten führt zu einem geringen Unterschied in der TGF- β 1 RNA-Expression in BMDMs und beeinflusst die Proteinkonzentration von TGF- β gesamt im Zellkulturüberstand nicht98

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| α 2M | α -2-Makroglobulin |
| AGP | α -1-saures Glykoprotein |
| AP | alkalische Phosphatase |
| APC | Antigenpräsentierende Zellen |
| APP | Acute Phase Protein |
| BMDM | <i>bone marrow-derived macrophages</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> |
| C | Komplementfaktor |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid |
| CCL | Chemokin der CC-Familie |
| CD | <i>cluster of differentiation number</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CXCL | Chemokin der CXC-Familie |
| CYP | Cytochrom |
| DAMP | <i>damage-associated molecular pattern</i> |
| DC | Dendritische Zellen |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| ELISA | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> |

| | |
|--------|---|
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| FG | Fibrinogen |
| FITC | Fluorescein |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase |
| GM-CSF | <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> |
| GOT | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase |
| GPT | Glutamat-Pyruvat-Transaminase |
| HAMP | <i>hepcidin antimicrobial peptide</i> |
| HC | Hepatozyten |
| Hepes | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HGF | <i>hepatocyte growth factor</i> |
| HP | Haptoglobin |
| HPx | Hemopexin |
| HSC | hepatische Sternzellen |
| ICAM-1 | Intercellular Adhesion Molecule-1 |
| IFN | Interferon |
| IGF | <i>insulin-like growth factor</i> |
| IgG | ImmunglobulinG |
| IHC | Immunhistochemie |
| IL | Interleukin |
| IP-10 | <i>interferon gamma-induced protein 10 (CXCL10)</i> |
| KC | Kupffer-Zellen |
| KCl | Kaliumchlorid |
| LAP | <i>latency-associated peptide</i> |
| LBP | <i>lipopolysaccharide-binding protein</i> |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LIF | Leukämieinhibierender Faktor |

| | |
|----------------|---|
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LT | Lymphotoxin |
| LTBP | <i>latent TGF-β binding protein</i> |
| M1 | klassisch aktivierte Makrophagen |
| M2 | alternativ aktivierte Makrophagen |
| MACS | <i>magnetic cell separation</i> |
| MAPK | mitogenaktivierte Proteinkinase |
| MCP1 | <i>monocyte chemotactic protein 1</i> |
| M-CSF | Makrophagen koloniestimulierender Faktor |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| MIP | <i>macrophage inflammatory protein</i> |
| MK2 | MAP Kinase aktivierte Proteinkinase 2 |
| MMP | Matrix-Metalloproteasen |
| MyD88 | <i>myeloid differentiation primary-response gene 88</i> |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NF- κ B | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> |
| NK | natürliche Killerzellen |
| NO | Stickstoffoxide |
| ORM | Orosomuroid |
| OSM | Oncostatin-M |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCNA | <i>proliferating-cell-nuclear-antigen</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| PHx | partielle Hepatektomie |
| PLG | Plasminogen |

| | |
|----------------|--|
| PRR | <i>pattern recognition receptor</i> |
| R | Rezeptor |
| RANTES | <i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| -RT | ohne Reverse Transcriptase |
| SAA | Serum-Amyloid-A |
| SAP | Serum-Amyloid-P |
| SDHA | Succinate Dehydrogenase subunit A |
| SEC | Sinusendothelzellen |
| SERPINA | <i>serpin peptidase inhibitor, clade A</i> |
| TGF | <i>transforming growth factor</i> |
| T _H | T-Helfer-Zellen |
| TLR | <i>toll-like-receptor</i> |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Treg | regulatorische T-Zellen |
| TSP | Thrombospondin |
| uPA | Urokinase Plasminogen Aktivator |
| WP | Westernblot |
| wt | Wildtyp |

1. Einleitung

1.1 Die Leber

Die Leber ist das größte Stoffwechselorgan des Menschen, sie wiegt etwa 1,5 kg und kann, basierend auf ihrer Gefäßstruktur, in 4 Lappen unterteilt werden (*Lobus dexter*, *Lobus sinister*, *Lobus caudatus* und *Lobus quadratus*). Bei der Maus spricht man anstelle des *Lobus quadratus* vom *Lobus medialis dexter* und *sinister*, so dass hier 5 Leberlappen unterschieden werden können (vgl. Abb. 3). Die Blutversorgung der Leber erfolgt zu 20-25 % mit sauerstoffreichem Blut über die Leberarterie (*A. hepatica*) und zu 75-80 % über die Pfortader (*V. portae*) (Thews et al. 1999). Mit dem venösen Pfortaderblut gelangen Resorptionsprodukte aus dem Darm, aber auch Substanzen aus der Milz und dem Pankreas in die Leber. Das Blut gelangt über die Kapillaren (*Sinusoide*), in denen niedermolekulare Bestandteile herausgefiltert werden, in die Zentralvenen (*Venae centralis*) und wird schließlich über die Lebervenen (*Venae hepaticae*) in die untere Hohlvene drainiert.

Die Funktion der Leber bestand ursprünglich in der Absonderung von Sekreten für die Verdauung (exokrine Drüse). Im Laufe der Evolution kamen jedoch noch eine Reihe von weiteren Aufgaben hinzu, zu denen die Verwertung und teilweise Speicherung der aus dem Darm resorbierten Nährstoffe gehören. Ebenfalls zu diesen Aufgaben zählen die Aufrechterhaltung der Glucose-, Aminosäure-, Ammoniak- und Hydrogencarbonat-Homöostase sowie die Synthese der meisten Plasmaproteine, die Synthese der Gallensäuren und die Gallenbildung. Zudem ist die Leber an der Bildung, Speicherung und Prozessierung von Signalmolekülen beteiligt, spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunabwehr und ist maßgeblich für die Metabolisierung von Endo- und Xenobiotika verantwortlich.

Die enorme Vielfalt der von der Leber erbrachten Funktionen beruht im Wesentlichen auf der Wechselwirkung der hier führenden fünf verschiedenen Zelltypen. Die Leber besteht zu etwa 65 % aus Hepatozyten (Zellvolumen etwa 94 %) (Van Bosuyt et al. 1988). Die nichtparenchymalen Zellen der Leber umfassen 24,5 % Endothelzellen, 7 % leberspezifische Makrophagen (Kupffer-Zellen, KC), 3,5 % Sternzellen und etwa 0,4 % Pit-Zellen (Bouwens und Wisse 1992, Friedman 2000).

Die morphologisch kleinste Einheit der Leber stellt das Leberläppchen (*Lobulus*) mit einem Durchmesser von 1-2 mm dar (vgl. Abb. 1). Zwischen den Leberläppchen befinden

sich die periportalen Felder. Hier verlaufen die Äste der Pfortader (*Vv. interlobulares*), der Leberarterie (*Aa. interlobulares*) und der intrahepatischen Gallengänge (*Ductuli interlobulares*). Diesen Bereich bezeichnet man auch als Glisson'sche Trias. Durch die beiden Blutgefäße gelangt sauerstoff- und nährstoffreiches Blut in die Sinusoide der Leberläppchen. Die Sinusoide sind mit Endothelzellen (Sinusendothelzellen, SEC) ausgekleidet, die eine starke Fenestrierung aufweisen. Zudem fehlt hier eine Basalmembran, so dass niedermolekulare Bestandteile des Blutes das Endothel passieren können und in den sogenannten Disse-Raum (oder auch Perisinusoidalraum) eintreten können. Hier werden diese von den Hepatozyten aufgenommen und verarbeitet. Im Disse-Raum befinden sich außerdem die Ito-Zellen (hepatische Sternzellen, HSC) und im Lumen der Sinusoide die Kupffer-Zellen.

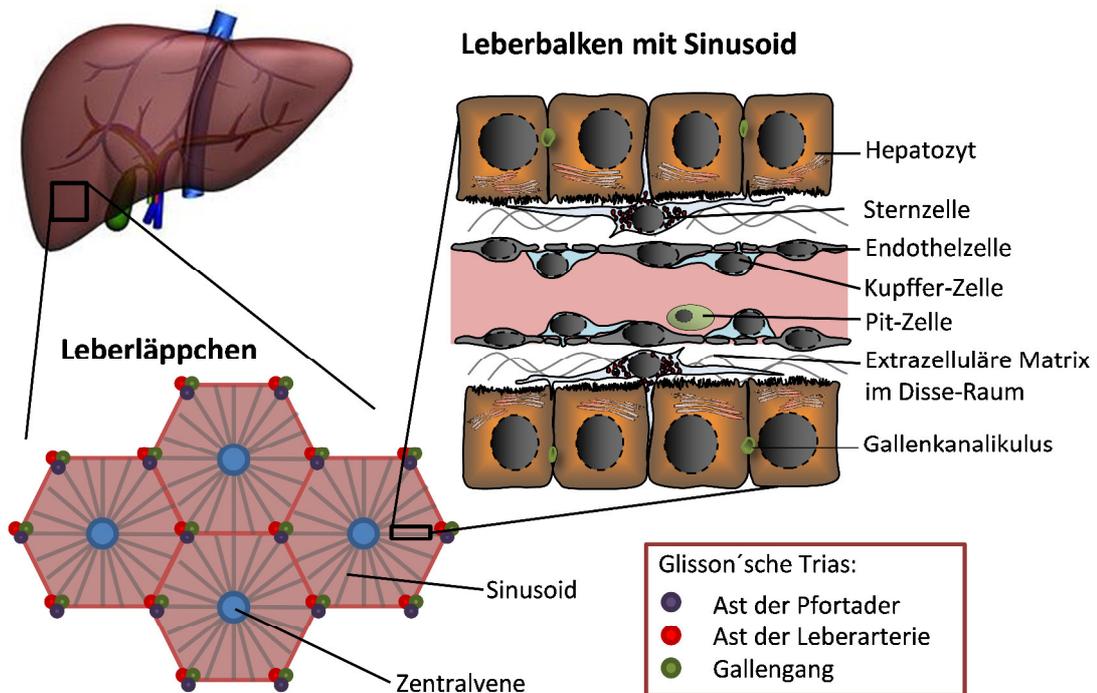


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Leber und ihrer Zelltypen. Die kleinste morphologische Einheit der Leber sind die Leberläppchen. An ihren Ecken befinden sich Äste der Pfortader, der Leberarterie und Gallengänge. Von hier aus laufen die Sinusoide radiär auf die Zentralvene zu und die Hepatozyten sind entsprechend balkenförmig angeordnet. In den Sinusoiden bzw. im Disse-Raum befinden sich die Kupffer-Zellen, Pit-Zellen und die Sternzellen. Bild der Leber aus: <http://docmed.tv.vitanet.de/lebererkrankungen>

1.2 Immunologische Bedeutung der Leber

Die Leber spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von angeborener und adaptiver Immunität und ist das zentrale Organ für die Akut-Phase-Antwort (Bode und Heinrich 2001, Häussinger *et al.* 2004, Crispe 2009). Um die immunologischen Leistungen der Leber verstehen zu können, ist eine genauere Betrachtung ihrer einzelnen Zelltypen notwendig.

1.2.1 Endothelzellen

Die SECs kontrollieren nicht nur den Austausch niedermolekularer Substanzen zwischen Blut und Leberparenchym, sondern sind an der Eliminierung von Endotoxinen und Bakterien sowie der Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt. Sie rekrutieren Leukozyten und besitzen die Fähigkeit der Antigen-Präsentation für T-Zellen, in deren Folge T-Zell-Toleranz induziert wird (Limmer und Knolle 2001, Sørensen *et al.* 2012).

1.2.2 Sternzellen

Die HSCs speichern Fett und Vitamin A, synthetisieren Kollagen, Proteoglykane, Wachstumsfaktoren und Zytokine (Sato *et al.* 2003). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Leberentwicklung und Differenzierung, der Regeneration, der Kontrolle des hepatischen Blutflusses sowie der Immunoregulation (Atzori *et al.* 2009). Sie zeigen nicht nur neuronale und neuroendokrine Marker sondern weisen auch verschiedene Charakteristika mesenchymaler Stammzellen auf (Kordes *et al.* 2007, 2008, 2009, 2013).

1.2.3 Hepatozyten

Neben ihren metabolischen Funktionen sind HCs auch an der Immunoregulation beteiligt. Sie präsentieren Antigene über MHC-I (*Major Histocompatibility Complex*) und über ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule*) für T-Zellen, die aufgrund der fehlenden Kostimulation über MHC-II oder CD86 (*Cluster of Differentiation* Nummer 86) jedoch nicht überleben (Bertolino *et al.* 1998, 2001). Unter inflammatorischen Bedingungen exprimieren Hepatozyten auch MHC-II (zum Beispiel bei einer viralen Hepatitis),

wodurch es zur T-Zell-Aktivierung kommt (Herkel 2003). Der für die Antigenpräsentation notwendige Zell-Zell-Kontakt erfolgt dabei über zytoplasmatische Ausläufer, die durch das fenestrierte Endothel in den Disse-Raum reichen (Warren 2006). Auch bei der Regulation der angeborenen Immunität sind HCs von zentraler Bedeutung (Baumann und Gauldie 1994, Bode und Heinrich 2001, Bode *et al.* 2012b). Die Synthese von Akut-Phase-Proteinen (APP), zu denen auch Komponenten des Komplementsystems und lösliche *Pattern Recognition Receptors* (PRR) gehören, erfolgt durch HCs (Gao *et al.* 2008, Crispe 2009) unter Einfluss von Zytokinen und anderen Mediatoren, die u.a. durch Kupffer-Zellen nach Gewebsverletzungen, Infektionen oder Entzündungen freigesetzt werden (Häussinger *et al.* 2004). Ziel ist hierbei die Isolierung und Neutralisierung von Pathogenen und das Vermeiden von neuen Infektionen unter Umgehung größerer Gewebsschäden sowie die Initiierung und Unterstützung von Reparaturprozessen (Bode *et al.* 2012b).

1.2.4 Kupffer-Zellen

Aus Knochenmarkszellen generieren über verschiedene Vorläuferstufen die Monozyten, die beim Übertritt vom Blut ins Gewebe entsprechend dem jeweiligen Mikromilieu zu gewebsspezifischen Makrophagen differenzieren. 80-90 % aller gewebständigen Makrophagen des Körpers befinden sich in der Leber (Arii und Imamura 2000, Ishibashi *et al.* 2009). Aufgrund ihrer strategisch günstigen Lage in den Sinusoiden können sie neben alternden Erythrozyten und degenerierten Zellen auch bakterielle Produkte, Umwelttoxine und Nahrungsmittelantigene, welche die Leber vom Darm über die Pfortader erreichen, aus dem Blut eliminieren. Gleichzeitig reichen ihre Zellfortsätze durch das fenestrierte Endothel in den Disse-Raum, so dass eine interzelluläre Kommunikation mit HCs und HSCs über die Freisetzung von Mediatoren stattfinden kann. Die KCs sind in der Leber maßgeblich verantwortlich für die Balance zwischen Toleranz und Inflammation. Zur Aufrechterhaltung der Toleranz setzen KCs, SECs und Dendritische Zellen (DC) das anti-inflammatorisch wirksame Interleukin-10 (IL-10) frei, welches T-Zell-Toleranz induziert und die Aktivierung der KCs hemmt (Erhardt *et al.* 2007, You *et al.* 2008). Durch „physiologische“ Endotoxinkonzentrationen aus dem Darm wird die Freisetzung geringer Konzentrationen von TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) induziert, welche die Hepatozyten vor der Induktion von Apoptose schützen (Sass *et al.* 2007, Haimerl *et al.* 2009) und somit zur Aufrechterhaltung der Toleranz beitragen. Wird

die Toleranz durch die Phagozytose von nekrotischen Zellen oder Pathogenen durchbrochen, kommt es jedoch zu physiologischen Veränderungen, welche eine Modifikation in der Expression von Oberflächenproteinen sowie die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren bedingen. Nun schütten die KCs pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 und TNF- α , Chemokine, proteolytische Enzyme, reaktive Sauerstoffmoleküle und Stickstoffoxide (NO) aus, wodurch auch Hepatozyten und nichtparenchymale Zellen in den Entzündungsprozess involviert werden. Die Chemokine bewirken u.a. die Infiltration von neutrophilen Granulozyten, welche Bakterien eliminieren, und IL-12 steigert die Aktivität natürlicher Killerzellen (NKs). Zudem erfolgt unter anderem durch IL-1, IL-6 oder TNF- α die Induktion der Akut-Phase-Antwort durch Hepatozyten (siehe 1.3). Da TNF- α , proteolytische Enzyme und Radikale zytotoxisch wirken und Schäden nicht nur in den Pathogenen, sondern auch im umliegenden Gewebe induzieren (Schümann und Tiegs 1999), ist es wichtig, die Inflammationsreaktion schnell zu terminieren, um das umliegende Gewebe zu schützen. Hierbei spielt das während der Inflammation ebenfalls freigesetzte IFN- β (Interferon- β) eine wichtige Rolle. IFN- β bewirkt autokrin die Expression des anti-inflammatorisch wirkenden IL-10, welches die Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine hemmt (vgl. Abb.2) (Bode *et al.* 2012a), wodurch der Zustand der Toleranz wieder hergestellt wird. Der hier dargestellte Vorgang macht deutlich, wie Makrophagen auf Komponenten des sie umgebenden Milieus reagieren. Tatsächlich besitzen sie eine bemerkenswerte Plastizität, die sie entsprechend der auf sie einwirkenden Faktoren (z.B. Signale des angeborenen oder erworbenen Immunsystems oder Endotoxine) mit einer Veränderung ihrer Physiologie und ihres Phänotyps antworten lässt. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem Zytokine wie IFN- γ , IL-10 und/oder bakterielle Bestandteile wie zum Beispiel das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS). In Anlehnung an das T_H1/T_H2-System der T-Lymphozyten unterteilt man die Makrophagen in klassisch aktivierte (M1) und alternativ aktivierte (M2) Makrophagen, die sich unter anderem durch die Freisetzung von IL-10 und IL-12 unterscheiden (Mosser und Edwards 2008). Während zu Beginn einer Entzündungsreaktion M1-Makrophagen überwiegen, kommt es im Verlauf der Inflammation zu einem stetigen Anstieg von Makrophagen, welche an der Terminierung der Entzündungsreaktion beteiligt sind und die Reparatur der entstandenen Gewebsschäden initiieren. Die M2-Makrophagen können dabei aus dem Blut rekrutiert werden (Nahrendorf *et al.* 2007) und/oder aus den M1-Makrophagen durch Konvertierung zu einem anti-inflammatorischen Phänotyp entstehen (Arnold *et al.* 2007). Die prinzipielle Möglichkeit der Reversibilität der Makrophagen konnte *in vitro*

durch die Re-Stimulation von Makrophagen mit LPS gezeigt werden, die von einem pro-inflammatorischen (M1) zu einem anti-inflammatorischen (M2) Phänotyp wechseln (Foster *et al.* 2007, Biswas und Lopez-Collazo 2009). Zwischen diesen beiden Extremen gibt es jedoch viele Zwischenstufen. Besonders im Bereich der M2-Makrophagen findet man Zellen, die sich in ihrer Biochemie und Physiologie so stark unterscheiden (Edwards *et al.* 2006), dass man diese weiter in Wundheilungs- und Regulatorische-Makrophagen differenzieren kann. Trotz aller Bemühungen Makrophagen in verschiedene Kategorien zu unterteilen sind die Übergänge zwischen diesen fließend und die Differenzierungen der Zellen reversibel (Mosser und Edwards 2008, Italiani und Boraschi 2014).

Unter dem Einfluss von IFN- γ , TNF- α und/oder LPS differenzieren Gewebsmakrophagen zu klassisch aktivierten Makrophagen. Dieser Makrophagentyp besitzt eine erhöhte Phagozytosekapazität gegen Pathogene oder auch Tumorzellen und setzt hohe Level pro-inflammatorische Zytokine und Mediatoren frei (Mackaness 1977, O'Shea und Murray 2008). Die Freisetzung von IFN- γ durch NK-Zellen infolge von Stress und Infektionen ist nur transient und führt nicht zur Bildung einer Population aktivierter Makrophagen (Mosser und Edwards 2008). Dies erfolgt jedoch im Rahmen einer adaptiven Immunantwort durch T-Helfer-1-Zellen (T_H1-Zellen), die nach Antigenkontakt anhaltend IFN- γ sezernieren. Auch durch das von Antigenpräsentierenden-Zellen (APC) infolge von Ligandenbindung am Toll-Like-Rezeptor (TLR) sezernierte TNF- α erfolgt eine Differenzierung zu klassisch aktivierten Makrophagen.

Die Freisetzung von IL-4 durch basophile Granulozyten und Mastzellen ist eines der ersten Signale bei Gewebsverletzungen (Loke *et al.* 2007, Brandt *et al.* 2000). Unter dem Einfluss von IL-4 und/oder IL-13 differenzieren Makrophagen und fördern nun die Wundheilung durch z.B. eine erhöhte Arginase Aktivität. Durch die Umwandlung von Arginin in Ornithin sinkt zum einen die Bioverfügbarkeit von Arginin und damit die NO-Synthese, zum anderen kann Ornithin in Prolin konvertiert werden, welches für die Kollagensynthese benötigt wird (Kreider *et al.* 2007). Zudem findet keine Antigenpräsentation für T-Zellen statt. Ein Differenzierungsmarker für Wundheilungsmakrophagen stellt der Mannoserezeptor CD206 dar, dessen Expression durch IL-4 erhöht wird (Stein *et al.* 1992).

Regulatorische Makrophagen dämpfen eine Immunantwort und limitieren Inflammationen (Mosser 2003). Die Differenzierung erfolgt u.a. unter dem Einfluss von Glukokortikoiden (Sternberg 2006), Prostaglandinen (Strassmann *et al.* 1994) oder IL-10 (Martinez *et al.* 2008). Für die Induktion der anti-inflammatorischen Aktivität werden jedoch oft zwei Stimuli benötigt. So reicht ein erstes Signal durch zum Beispiel

Prostaglandine oder die Phagozytose apoptotischer Zellen nicht aus, erst durch einen zweiten Stimulus wie zum Beispiel die Bindung eines TLR-Liganden wird die Freisetzung von hohen Konzentrationen des immunsuppressiven IL-10 (kennzeichnend für regulatorische Makrophagen) initiiert (Edward *et al.* 2006). Infolge der Differenzierung sinkt die RNA-Stabilität (Sternberg 2006) und durch die Phagozytose von apoptotischen Zellen wird vermehrt TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) sezerniert, welches die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine hemmt (Erwig und Henson 2007, Fadok *et al.* 1998). Die regulatorischen Makrophagen sind nicht an der Produktion der extrazellulären Matrix beteiligt, viele exprimieren jedoch hohe Level kostimulatorischer Moleküle (CD80 und CD86), die für die Antigenpräsentation für T-Zellen benötigt werden (Edwards 2006). Zudem erhöhen z.B. IL-10 und Glukokortikoide die Expression des Scavenger-Rezeptors CD163 (ED2), der neben der Entfernung von Hämoglobin aus dem Blut an der Toleranzinduktion und Gewebsregeneration beteiligt ist. Da u.a. TNF- α , IL-1, IL-4 und IL-13 die Expression von CD163 hemmen, stellt dieser einen selektiven Marker für die regulatorischen Makrophagen dar (Onofre *et al.* 2009, Kowal *et al.* 2011).

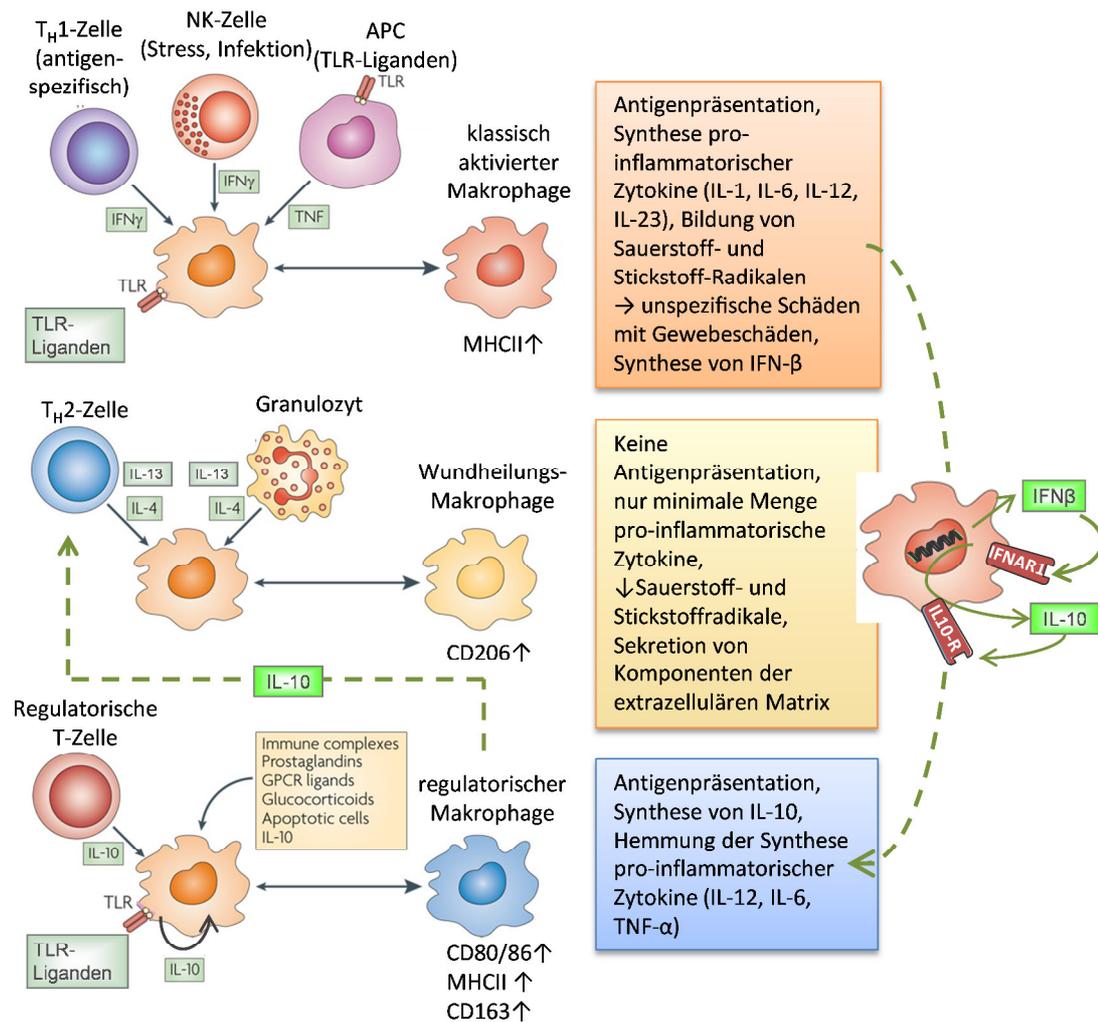


Abb. 2: Differenzierung von Makrophagen. Durch die Freisetzung von IFN- γ oder TNF- α durch T_H1-Zellen, NKs oder APCs sowie unter Einfluss von LPS differenzieren Gewebsmakrophagen zu sogenannten klassisch aktivierten Makrophagen. Wundheilungs- oder alternativ aktivierte Makrophagen entstehen unter dem Einfluss von IL-4 und/oder IL-13 während die Differenzierung zu regulatorischen Makrophagen aufgrund verschiedener Stimuli erfolgen kann. Hierzu gehören neben IL-10 auch Immunkomplexe, Prostaglandine und Glukokortikoide. Mit grünen Pfeilen angedeutet sind die Mechanismen, die zum Wechsel zwischen den einzelnen Typen könnten (Modifiziert nach Mosser und Edwards 2008).

Neuere Arbeiten unterteilen die M2-Makrophagen in M2a, M2b und M2c. Die M2a-Makrophagen entsprechen Wundheilungsmakrophagen, die unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 entstehen. Die regulatorischen Makrophagen werden weiter unterteilt in M2b- und M2c-Makrophagen. Die M2b-Makrophagen differenzieren unter dem Einfluss von Immunkomplexen, LPS oder Agonisten des IL-1 Rezeptors, während Makrophagen durch IL-10, TGF- β oder Glukokortikoide in Richtung M2c differenzieren (Arango Duque und Descoteaux 2014).

1.3 Die Akut-Phase-Reaktion

Die Akut-Phase-Antwort ist eine komplexe systemische Reaktion der angeborenen Immunantwort, die durch Traumata, Infektionen, Neoplasmen oder Stress induziert wird. Infolge der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF- α durch vor allem Monozyten und Makrophagen wird dabei die Synthese der sogenannten APP in Hepatozyten modifiziert. Davon betroffen sind mehr als 200 Proteine, die man in positive APP, deren Konzentration während der Akut-Phase-Antwort steigt, und negative APP, deren Konzentration während der Akut-Phase-Antwort sinkt, unterteilen kann (Cray *et al.* 2009). Ziel der Akut-Phase-Reaktion ist die möglichst schnelle Wiederherstellung der Homöostase durch Minimierung der Gewebsschäden, Initiierung und Unterstützung von Reparaturprozessen sowie Isolierung und Neutralisierung von Pathogenen. Zusätzlich soll eine zukünftige Infektion vermieden werden (Bode *et al.* 2012b). Die biologischen Funktionen der APP sind entsprechend der Anforderungen sehr vielfältig. Das C-reaktive Protein (CRP) vermittelt zum Beispiel Komplementaktivierung und Phagozytose. Außerdem induziert es die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und Zytokinen aus Makrophagen. Das α_2 -Makroglobulin (α_2M) hingegen inhibiert Serin-, Cystein- und Metalloproteasen und kann Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone binden. Die Komplementfaktoren C3 und C4 dienen der Opsonierung der Pathogene, während die Gerinnungsfaktoren Fibrinogen- α (FG- α) und - β (FG- β) wichtige Parameter der Koagulation und der Gewebereparatur darstellen. Hecidin (HAMP1) reguliert die Eisenhomöostase und wirkt durch die Limitierung des Eisens antimikrobiell. Das α_1 -saure Glycoprotein (AGP oder ORM) hemmt die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten sowie die Extravasation von Leukozyten und bindet Proteaseinhibitoren (Colombo *et al.* 2006, Bode *et al.* 2012b). So vielfältig wie die Funktionen der APP, so variabel ist auch die Regulation ihrer Expression. Neben den Hauptregulatoren, den IL-1 ähnlichen Zytokinen (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α und TNF- β) und den Zytokinen der IL-6 Familie (z.B. IL-6, LIF (Leukämieinhibierender Faktor), OSM (Oncostatin-M), IL-11) spielen auch Glykokortikoide, Wachstumsfaktoren, TGF- β , IFN- γ und IL-8 eine modulierende Rolle (Heinrich *et al.* 1998, Koj *et al.* 1991, Kordula *et al.* 1991, Wang *et al.* 1999). Entsprechend der Regulation der Expression lassen sich die APP in zwei Klassen unterteilen. Bei APP der ersten Klasse (z.B. CRP, C3, Serumamyloid A, HAMP1, AGP) wirken IL-1 und IL-6 synergistisch auf die Expression, während APP der Klasse zwei (z.B. Fibrinogen, α_2M) nur durch Zytokine der IL-6 Familie stimuliert werden können (Moshage 1997, Bode *et al.* 2012b), wobei IL-1 β sogar die IL-6 induzierte

Expression von γ -Fibrinogen und α_2 M inhibiert (Albrecht *et al.* 2007, Bode *et al.* 2001). Der Verlauf der Akut-Phase-Antwort wird folglich durch die Konzentration und die Zusammensetzung der freigesetzten Zytokine bestimmt.

Eine Akut-Phase-Antwort wird auch während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx) generiert. Die APP sind dabei möglicherweise in die Regulation der Regeneration involviert und wirken protektiv auf die Leber (Fulop *et al.* 2001). Das Muster der APP entspricht hier dem einer systemischen Akut-Phase-Antwort (Milland *et al.* 1990, Princen *et al.* 1982).

1.4 Leberregeneration

Die Leber besitzt die besondere Fähigkeit der Regeneration, bei der es sich um eine kompensatorische Hyperplasie im verbleibenden Lebergewebe handelt (Fausto 2000, Taub 2004). Die finale Größe der Leber richtet sich dabei nach der Ratio zwischen Leber- und Körpergewicht, das heißt, dass Lebern kleiner Spender, die in größere Empfänger transplantiert werden (*small-for-size*), zu der dem Körpergewicht entsprechenden Größe heranwachsen und umgekehrt (Francavilla *et al.* 1994).

Beim Menschen erreicht die Leber nach einer 70 %igen Resektion bereits nach 2-3 Wochen ihre normale Funktionsfähigkeit, die vollständige Regeneration ist nach 3-6 Monaten abgeschlossen (Chen *et al.* 1991). In Nagetieren dauert die Regeneration 7-15 Tage (Pistoi und Morello 1996, Michalopoulos und DeFrances 1997), wobei bereits nach 3 Tagen 70 % des präoperativen Lebergewichts erreicht werden (Abshagen *et al.* 2006).

Die Regenerationsfähigkeit der Leber ist von verschiedenen Faktoren abhängig, zu denen unter anderem auch das Alter, das Geschlecht sowie das Ausmaß und die Art der Leberschädigung gehören (Steer 1995, Fausto 2001, Yokoyama *et al.* 2005, 2007). So braucht eine kranke Leber im Vergleich zu einer gesunden doppelt so lange zur Regeneration (Yamanaka *et al.* 1993).

Die Regeneration der Leber erfolgt über Proliferation der vorhandenen Hepatozyten (Michalopoulos und DeFrances 1997). Liegt jedoch eine Leberzellschädigung vor, die zu einer ungenügenden Proliferation der Hepatozyten führt, so erfolgt die Aktivierung von hepatischen Stammzellen (Ovalzellen) (Dabeva und Shafritz 1993, Fausto 2000, 2001, 2004, Libbrecht und Roskams 2002), deren Tochterzellen zu Hepatozyten differenzieren (Michalopoulos 1994, Thorgeirsson 1996). Die Nichtparenchymzellen werden hingegen

während der Regeneration bis zu 20 % aus Knochenmark-Vorläuferzellen generiert (Fujii *et al.* 2002).

Es existieren verschiedene Hypothesen, welche Mechanismen die Regeneration steuern. Eine Hypothese geht davon aus, dass es aufgrund des Parenchymverlustes zu einer verminderten Funktion kommt, was zu einer sequenziellen Aktivierung intra- und extrahepatischer Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone führt. Eine Rolle hierbei spielt möglicherweise das im Darm von gram-negativen Bakterien produzierte LPS, das als möglicher Trigger für die initiale Erhöhung der TNF- α -Konzentration nach partieller Hepatektomie diskutiert wird. Hierfür spricht, dass sowohl in keimfreien Mäusen als auch in MyD88- (*myeloid differentiation primary-response gene 88* - intrazelluläres Signalmolekül für LPS/TLR) defizienten Mäusen die Leberregeneration nur eingeschränkt erfolgt und assoziiert ist mit einer verminderten TNF- α und IL-6 Konzentration (Cornell 1985, Seki *et al.* 2005, Fausto *et al.* 2006, Hata *et al.* 2007).

Eine andere Hypothese stützt sich auf die Triggerung durch hämodynamische Faktoren. Durch die partielle Hepatektomie kommt es zu einem erhöhten Pfortaderdruck, was einen erhöhten Scherstress bedingt und unmittelbar zur Aktivierung von SECs und KCs sowie zur Freisetzung pro-proliferativer Mediatoren führt (Fausto 2001, Black *et al.* 2004). Außerdem kommt es zu einer frühzeitigen Aktivierung von uPA (Urokinase Plasminogen Aktivator), was u.a. den Abbau der extrazellulären Matrix und somit die Freisetzung hier gebundener Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel HGF bewirkt.

Während der Regenerationsphase wird eine kontrollierte Zellproliferation durch das Zusammenspiel von pro-regenerativen Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*) oder TGF- α (Webber *et al.* 1994) und inhibitorischen Wachstumsfaktoren wie TGF- β oder Activin A (Bissell *et al.* 1995; Fausto 2001) gewährleistet (Court *et al.* 2002).

Der Verlauf der Regeneration der Leber lässt sich in drei Phasen unterteilen. In der **Priming-Phase** erfolgt die Stimulation der KCs u.a. durch aktivierte SECs, woraufhin diese Priming-Faktoren wie IL-6 oder TNF- α freisetzen. Ein Signalweg, der unter anderem zur Expression von TNF- α und IL-6 führt, verläuft über die Aktivierung von p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38^{MAPK}), zum Beispiel durch Stress oder der Stimulation von TLR und der daraus resultierenden Aktivierung von MK2 (MAP Kinase aktivierte Proteinkinase 2) (Bode *et al.* 2012a). 30 Minuten nach partieller Hepatektomie wird die p38^{MAPK} inaktiviert und liegt erst nach 12 Stunden wieder in aktiver Form vor. Dies beeinflusst *in vivo* überraschenderweise jedoch nicht die MK2-Aktivierung (Campbell

et al. 2012). Durch die Priming-Faktoren werden die Hepatozyten gegenüber den Einflüssen von Wachstumsfaktoren (z.B. HGF, EGF, TGF- α) sensibilisiert (Koniaris *et al.* 2003). Die ruhenden Hepatozyten treten wieder in den Zellzyklus ein (Übertritt von der G0-Phase in die G1-Phase). Während der **Proliferationsphase**, die unter dem Einfluss von HGF, EGF und TGF- α steht, wird die Zellpopulation vergrößert, wobei nach einer oder zwei Replikationsrunden die Hepatozyten wieder in den Ruhezustand (G0-Phase) übergehen (Taub 2004, Fausto *et al.* 2006). Unter dem Einfluss von TGF- β und IL-1 β erfolgt schließlich die **Terminierung** durch Inhibierung der Proliferation und die Rekonstitution der zellulären und extrazellulären Strukturen (Malik *et al.* 2002, Boulton *et al.* 1997, Scotte *et al.* 1997). Dass es sich hierbei nur um eine vereinfachte Darstellung handelt wird deutlich, wenn man die Genexpressionsanalyse von Su *et al.* (2002) betrachtet, in der etwa 185 frühe Gene identifiziert wurden, die an der Induktion der Leberregeneration beteiligt sind. Hierzu gehören Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusgene sowie Gene, welche die Signaltransduktion, die Inflammation und die Remodellierung der extrazellulären Matrix beeinflussen. Zudem spielen bei der Leberregeneration auch extrahepatische Prozesse eine Rolle. So wird zum Beispiel infolge einer Teilresektion der Leber die Konzentration von Insulin im Blut erhöht, welches über den portalen Blutfluss zur Leber gelangt und hier als Ko-Mitogen die Funktion von Wachstumsfaktoren verstärkt (Michalopoulos 2007).

Für eine ungestörte Leberregeneration ist die Interaktion zwischen Parenchym- und Nichtparenchymzellen essentiell, was allein dadurch deutlich wird, dass mit Ausnahme von TNF- α alle Wachstumsfaktoren von Nichtparenchymzellen freigesetzt werden (Meijer *et al.* 2000, Abshagen *et al.* 2007). Hierbei scheinen die KCs von besonderer Bedeutung zu sein, da in Kupffer-Zellen-depletierten Mäusen nach partieller Hepatektomie eine verminderte HGF Produktion (Takeishi *et al.* 1999), eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) und keine Erhöhung der TNF- α und IL-6 Konzentration nachzuweisen ist. Die Depletierung der KC führt zu einer eingeschränkten Zellproliferation und einer signifikant verzögerten Restauration des Lebergewichtes (Abshagen *et al.* 2007). Im Gegensatz zu den Parenchymzellen weiß man jedoch noch wenig über die Regeneration der Nichtparenchymzellen. Bekannt ist jedoch, dass in diesen Zellen die Proliferation einen Tag später einsetzt als bei den Hepatozyten (Ogawa *et al.* 1979) und dass sie mit der Vermehrung der Gallengangsepithelzellen beginnt, gefolgt von den Kupffer- und Sternzellen. Zuletzt erfolgt die Replikation der sinusoidalen Endothelzellen (Michalopoulos und DeFrances 1997, Markus *et al.* 2000). Die

Repopulation der KC erfolgt dabei nicht nur durch lokale Proliferation, sondern auch durch Infiltration ins Lebergewebe (Baier *et al.* 2005).

1.5 Modell-Systeme

Es existieren verschiedene Modelle für die Untersuchung der Leberregeneration. Da klinische Studien am Menschen ethisch nicht vertretbar sind und *in vitro* Versuche die komplexen Interaktionen zwischen Parenchym- und Nichtparenchymzellen nur ungenügend repräsentieren, werden *in vivo* Modelle der Maus oder Ratte verwendet. Man unterscheidet dabei zwischen hepatotoxischen und chirurgischen Modellen. Bei den hepatotoxischen Modellen werden Toxine, wie zum Beispiel Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) oder Ethanol verwendet, um damit verschiedene Lebererkrankungen zu simulieren (akutes Leberversagen, Leberfibrose und –zirrhose) und die Interaktion zwischen Zellschädigung und Zellregeneration zu untersuchen. Ein Modell für die chirurgische Untersuchung ist die 2/3 Hepatektomie, das bereits in den 30er Jahren an der Ratte entwickelt wurde (Higgins und Anderson 1931). Vorteil dieser Methode ist ein großes Maß an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Die Regeneration setzt zu einem Zeitpunkt ein, in dem sich die HCs im Ruhestadium befinden und die KCs nicht aktiviert sind. Zudem erfolgt ein zeitgleicher Eintritt der HCs in den Zellzyklus.

Bei der Leberregeneration handelt es sich wie oben bereits beschrieben um einen multifaktoriellen Prozess. Um die Komplexität der hier ablaufenden Prozesse besser verstehen zu können, ist es von Bedeutung, die interzelluläre Kommunikation zwischen den einzelnen Zelltypen näher zu untersuchen. Von besonderem Interesse ist dabei die Interaktion zwischen Hepatozyten und Makrophagen, da die Makrophagen zum Beispiel die metabolische Kapazität der Hepatozyten beeinflussen, Mediatoren freisetzen, welche die Akut-Phase-Antwort triggern und an der Regulation der Regeneration der Leber beteiligt sind. Da das Verständnis für die Integration der von Makrophagen generierten Signale in Hepatozyten von hoher klinischer und wissenschaftlicher Relevanz ist, wurden hierfür verschiedene *in vivo* und *in vitro* Systeme entwickelt.

Die Relevanz der Makrophagen kann *in vivo* durch die Entfernung der selbigen näher untersucht werden. Hierfür können Gadoliniumchloride, Eisencarbonat oder Dichloromethylen-Diphosphonat in Liposomkapseln verwendet werden, wobei letzteres eine nicht toxische Möglichkeit darstellt KC selektiv und ohne Aktivierung zu entfernen (Van Rooijen 1989, Van Rooijen und Sanders 1994).

Die Untersuchung der interzellulären Kommunikation zwischen Makrophagen und Hepatozyten *in vitro* setzt die Isolierung beider Zelltypen voraus. Es existieren verschiedene Protokolle für die Isolierung von KCs aus der Leber. Die meisten basieren auf dem Verdau der Leber mittels Kollagenase oder Pronase und anschließender Separierung der KCs mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (Olynyk und Clarke 1998, Van Bossuyt und Wisser 1988). Es ist aber auch möglich KCs mittels FACS-basierter Zellsortierung oder mittels Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Makrophagen, die mit magnetischen Beads gekoppelt sind, zu isolieren (He *et al.* 2009). Wichtig bei allen diesen Methoden ist eine 24-48 stündige Kultivierung der Zellen vor Versuchsbeginn, um stressbedingte Aktivierungen (*damage response*) zu regulieren.

Isolierte KCs wurden verwendet, um die Interaktion zwischen Hepatozyten und Lebermakrophagen zu untersuchen. In Überstands-Transfer-Experimenten wurde konditioniertes Medium verwendet (Keller *et al.* 1985a, Mackiewicz *et al.* 1988), direkte Ko-Kultur Experimente (Keller *et al.* 1985a, b, Mackiewicz *et al.* 1988, West *et al.* 1985, 1986) und 3D Modelle mit Trennung der beiden Zelltypen durch eine Matrix, zum Beispiel Kollagen (Bader *et al.* 1996, Yagi *et al.* 1998) wurden durchgeführt. Um eine separate Analyse beider Zelltypen durchführen zu können eignet sich ein Zwei-Kammer-System, bei dem beide Bereiche durch eine Membran mit der Porengröße 0,4 µm getrennt sind. Die Poren ermöglichen dabei einen Austausch von löslichen Mediatoren, verhindern aber eine Migration der Zellen von einer Kammer in die andere. Zudem imitiert dieses System den räumlichen Abstand, den KCs und HCs unter physiologischen Bedingungen zueinander haben, da sie in der Leber durch die SECs und den Disse-Raum voneinander getrennt sind.

Das Problem bei der Verwendung primärer KCs liegt neben der geringen Ausbeute in der Aktivierung. Bei der Isolierung primärer KCs werden durch den Verdau der Leber sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMP) generiert, die eine DAMP-induzierte Aktivierung der Makrophagen bedingen (Chen und Nunez 2010). Zudem können Spaltungsprodukte oder mögliche Kontaminationen durch den Verdau der Leber die Aktivierung und Differenzierung der KCs beeinflussen.

Jüngere Arbeiten unterteilen die Lebermakrophagen in zwei Populationen. Bei der größeren Population handelt es sich dabei um aus dem Knochenmark generierte KCs, die nach Bestrahlung rasch durch hämatopoetische Vorläuferzellen ersetzt werden, während die KCs der zweiten Population relativ resistent gegenüber der Bestrahlung sind und eine lange Lebensdauer aufweisen. Obwohl sich beide Populationen in ihren morphologischen Eigenschaften sowie ihrer phagozytären Kapazität nicht

unterscheiden, sind nur die aus dem Knochenmark generierten KCs an inflammatorischen Reaktionen beteiligt (Klein *et al.* 2007). Aufgrund dieser Beobachtung bietet sich für *in vitro* Experimente die Verwendung von sogenannten *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs) an. Diese werden aus Knochenmarkszellen unter Einfluss des Wachstumsfaktors M-CSF generiert, sind gut charakterisiert und hoch standardisiert (Manzanero 2012, Weischenfeldt und Porse 2008, Zanoni *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2008). Zudem kann durch die Verwendung der BMDMs die Problematik der Aktivierung von KCs bei der Isolierung umgangen werden.

Für die *in vitro* Untersuchung der interzellulären Kommunikation benötigt man neben den Makrophagen auch die Hepatozyten. Zu beachten ist hierbei, dass nach dem Verdau der Leber diese nicht in Reinkultur vorliegen, sondern sich vereinzelt zum Beispiel KCs und SECs in der Zellsuspension befinden. Eine Möglichkeit zur weiteren Aufreinigung der Zellkultur stellt die Verwendung der sogenannten MACS-Technologie dar, bei der mit magnetischen Beads gekoppelte Antikörper die entsprechenden Zellen binden und im magnetischen Feld zurückhalten. Außerdem ist die Wahl des Kultivierungssystems für die Hepatozyten von enormer Bedeutung. In der Leber sind die Hepatozyten in eine dreidimensionale Struktur eingebunden und weisen eine polygonale Form auf. Es konnte gezeigt werden, dass sie hier sowohl zwei basolaterale als auch zwei apikale Oberflächen besitzen (Braiterman und Hubbard 2009).

In der Vergangenheit wurden primäre Hepatozyten oft auf Kollagen, Proteoglykanderivaten oder Matrigel als sogenannte Monolayer kultiviert (Spray *et al.* 1987, Mitaka 1998). Dies führt jedoch bereits nach wenigen Tagen zu einer schnellen Dedifferenzierung der Zellen, was sich in veränderten Zellformen, reduzierten Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen, dem Verlust der Polarisierung und einer verminderten Bildung von Kanalikuli sowie dem Verlust wichtiger Signalwege und damit verbunden der normalen Hepatozytenfunktion zeigt (Gomez-Lechón *et al.* 1998). Die Produktion diverser Plasmaproteine und die Eigenschaft der Hepatozyten zur Detoxifikation sind zum Beispiel deutlich vermindert (Bissell *et al.* 1987, Clayton und Darnell 1983, Godoy *et al.* 2009, Clayton *et al.* 1985, Koide *et al.* 1989, Tong *et al.* 1992). Für Versuchsansätze, die über einen größeren Zeitraum erfolgen, verwendet man daher häufig die sogenannte Sandwich-Kultur. Hierbei werden die Hepatozyten zwischen zwei dickeren Schichten Kollagen eingeschlossen, wodurch ihre Morphologie und Funktion stabilisiert wird (Dunn *et al.* 1989, 1991). Dies zeigt sich in der unveränderten Struktur des Zytoskeletts, der Aufrechterhaltung der Zellpolarisation mit Ausbildung von Kanalikuli,

einer im Vergleich zur Monokultur erhöhten Überlebensrate und einer erhöhten Aktivität des Cytochroms P450 (Dunn *et al.* 1991, Le Cluyse *et al.* 1994, Kern *et al.* 1997).

1.6 Interzelluläre Kommunikation zwischen Hepatozyten und Makrophagen

In der Vergangenheit konnten diverse Interaktionen zwischen Hepatozyten und Makrophagen nachgewiesen werden. Durch Depletion von Makrophagen vor PHx konnte *in vivo* zum Beispiel gezeigt werden, dass die Hepatozyten auf die Behandlung mit LPS mit einer signifikant verringerten Akut-Phase-Antwort reagieren (Prins *et al.* 2004) und die Regeneration der Leber deutlich beeinträchtigt ist (siehe oben). Bereits 1985 zeigten West *et al.* mittels *in vitro* Experimenten, dass durch die Behandlung von KCs mit mikrobiellen Produkten diese die Proteinproduktion von kokultivierten Hepatozyten im Vergleich zu monokultivierten Hepatozyten signifikant verändern. Keller *et al.* konnten im gleichen Jahr durch den Transfer von Zellüberstand zeigen, dass dieser Effekt durch lösliche, hitzeinstabile Mediatoren induziert wird, die von Monozyten und Makrophagen nach LPS-Stimulation sezerniert werden. Die direkte Behandlung isolierter Hepatozyten mit LPS führt hingegen nicht zu einer veränderten Proteinsynthese (West *et al.* 1988). Die durch die Makrophagen induzierte veränderte Proteinsynthese ist durch die Gabe von Glukokortikoiden weitestgehend neutralisierbar (Keller *et al.* 1986). Diese Effekte werden unabhängig von IL-1 induziert, während IL-2 geprimte Makrophagen die Proteinsynthese von Hepatozyten sogar negativ beeinflussen (West *et al.* 1988, Curran *et al.* 1988). Weiterhin konnte man zeigen, dass während der Ko-Kultur durch Präinkubation mit IL-6, nicht aber mit TNF- α , vor LPS-Stimulation der Einfluss von Makrophagen auf die mitochondriale Dysfunktion der Hepatozyten verstärkt wird und die Albuminsynthese sinkt (Bankey *et al.* 1994). TNF- α und IL-1 β wurden als wichtige Mediatoren identifiziert, die für die suppressiven Effekte von LPS-aktivierten Makrophagen auf die CYP-Proteinexpression in kokultivierten Hepatozyten verantwortlich sind (Milosevic *et al.* 1999, Wu *et al.* 2006). Das nach LPS-Stimulation aus Makrophagen freigesetzte IL-6 ist einerseits ein wichtiger Aktivator der APP-Synthese (s.o.), andererseits unterdrückt es die Biosynthese des *Insulin-like growth factor* (IGF) 1 (Priego *et al.* 2006, Lelbach *et al.* 2001) und hemmt die interzelluläre Kommunikation zwischen Hepatozyten während der Inflammation (Gonzalez *et al.* 2002). Die durch Makrophagen freigesetzten Prostaglandine erhöhen die Glykogenolyse (Casteleijn *et al.* 1988).

In Versuchsanordnungen mit direkter Zell-Zell-Interaktion zwischen Makrophagen und Hepatozyten zeigt sich eine verminderte Biotransformation der Hepatozyten und eine verstärkte Freisetzung von NO, TNF- α und IL-6 (Hoebe *et al.* 2001) sowie eine veränderte LPS induzierte Freisetzung von Prostaglandinen (Billiar *et al.* 1990b, Lysz *et al.* 1990). Die erhöhte NO-Freisetzung führt zu mitochondrialen Dysfunktionen sowie oxidativen DNA Schäden und TNF- α ist in die Aktivierung der Caspase 3 involviert. Daher führen diese Faktoren zu einer erhöhten Letalität der HCs (Kurose *et al.* 1996, Watanabe *et al.* 2001, Hamada *et al.* 1999). Während die LPS-Stimulation in Experimenten mit direktem Zell-Zell-Kontakt zur Expression von Faktoren führt, die eher schädigend auf die Hepatozyten wirken (Wu *et al.* 2006, Hoebe *et al.* 2001, Sauer *et al.* 1996), zeigen sich bei der Verwendung von sogenannten *Transwells*, die zwar einen Austausch von Mediatoren ermöglichen, aber den direkten Zell-Zell-Kontakt verhindern, eher hepatoprotektive Effekte (Petrasek *et al.* 2011). Zudem demonstrierten Zichenko *et al.* 2006, dass unter definierten Bedingungen unter Verwendung von *Transwells* KCs die Hepatozytenfunktion sogar signifikant verbessern.

Das Zusammenspiel der Signale (u.a. Zytokine und Chemokine) und mögliche *Feedback-Loops* zwischen Makrophagen und Hepatozyten sind jedoch immer noch weitestgehend unbekannt und müssen weiter untersucht werden.

1.7 Zielsetzung

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit Untersuchungen zur Leberregeneration. Basierend auf einer umfangreichen Transkriptanalyse im Lebergewebe sowie der Untersuchung von sekretierten Mediatoren im Serum sollen zeitaufgelöst differenziell regulierte Faktoren nach PHx- bzw. Sham-Operationen an Mäusen identifiziert werden. Vor dem Hintergrund, dass die Proteinkinase MK2 für die LPS-induzierte Synthese von Mediatoren wie unter anderem IL-6 und TNF- α essenziell ist und IL-6 wie auch TNF- α wichtige Priming-Faktoren für die Leberregeneration darstellen, soll im Rahmen dieser Arbeit, als Vorarbeit für weiterführende Arbeiten, außerdem ein möglicher Einfluss von MK2 auf die Zellproliferation in der Leber nach Resektion untersucht werden.

Zentrale Anliegen des zweiten, umfassenden Teils dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses der interzellulären Kommunikation von Hepatozyten und Makrophagen auf die Differenzierung und Funktion dieser Zellen. Ausgehend von der Annahme, dass ein wesentlicher Teil der Lebermakrophagen aus dem Knochenmark in die Leber rekrutiert wird, soll ein *in vitro* Testsystem entwickelt werden, das die Kommunikation zwischen aus dem Knochenmark generierten Makrophagen und Hepatozyten erlaubt. Mit Hilfe dieses Testsystems wird der Frage nachgegangen, ob infolge der Ko-Kultivierung ein ähnliches Differenzierungsmuster entsprechend der Kupffer-Zellen in den BMDMs induziert wird. Ein möglicher Einfluss der Hepatozyten auf die Stimulus-abhängige Expression von Zytokinen und Chemokine auf kokultivierte BMDMs bzw. von BMDMs auf die Expression von APP und Chemokinen auf kokultivierte Hepatozyten soll ebenfalls mittels dieses Testsystems untersucht werden. Ziel ist dabei die Identifizierung möglicher Faktoren, welche für die wechselseitige Beeinflussung beider Zelltypen relevant sind.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Versuchstiere

| | |
|--|---|
| wt C57BL/6J | Wildtyp-Mäuse, männlich, 8-12 Wochen (Janvier Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich) |
| mk2 ^{-/-} C57BL/6J | MK2-defiziente Mäuse, männlich, 8-12 Wochen (zur Verfügung gestellt von Prof. Gaestel, Medizinische Hochschule Hannover) |
| ifn α 1 ^{-/-} C57BL/6J | IFN- α Rezeptor 1-defiziente Mäuse, männlich, 8-12 Wochen (zur Verfügung gestellt von Prof. Phillip Lang, Universitätsklinikum Düsseldorf) |
| il-10 ^{-/-} C57BL/6J | IL-10-defiziente Mäuse, männlich, 8-12 Wochen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) |

Die Haltung und Zucht der Versuchstiere erfolgte unter spezifisch-pathogen freien Bedingungen in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Universität Düsseldorf (ZETT). Die Mäuse hatten freien Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug 12h/12h, die Temperatur 22°C und die relative Luftfeuchtigkeit 50 %. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt und entsprechend des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Narkotisierung erfolgte den Genehmigungen entsprechend wie folgt:

| | |
|--------------------------|--|
| Inhalationsnarkose | Isofluran |
| Injektionsnarkose (i.p.) | 10 mg/100 g Körpergewicht Ketavet 0,5 mg/100 g Körpergewicht Rompun |

2.1.2 Zellpräparation und Leberresektion

| | |
|---------------------------|--|
| 0,9 % NaCl-Lösung | Braun, Melsungen, Dtlid. |
| Abbocath | Venisystems Hospira, München, Dtlid. |
| Anti-CD11b-Bead | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtlid. |
| autoMACS Rinsing Solution | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtlid. |
| Carprofen (Rimadyl®) | Pfizer, New York, USA |
| Isofluran | Abott Laboratories, North Chicago, USA |
| Ketavet 100 mg/ml | Pfizer, New York, USA |
| Kollagen | Roche, Mannheim, Dtlid. |
| Kollagen Typ I | BD Biosciences, San Diego, USA |
| Kollagenase CLSII | Biochrom, Berlin, Dtlid. |
| Ligatur | Ethicon Mersilene EH6732, Johnson & Johnson, New Brunswick, USA |
| Nahtmaterial | Ethicon Vicryl Polyglactin 910 V391 FS-2 5-0, Johnson & Johnson, New Brunswick, USA |
| Regepithel® Augensalbe | Alcon Pharma GmbH Freiburg, Dtlid. |
| Ringer-Lactatlösung | B. Braun Melsungen, Dtlid. |
| Rompun 2 % | Bayer Healthcare, Leverkusen, Dtlid. |
| Schlauchpumpe | Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Dtlid. |
| HANKS-Puffer | 137 mM NaCl 5 mM KCl 15 mM Hepes 0,34 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,44 mM KH ₂ PO ₄ <i>Ad a. bideest</i> auf 1 L pH-Wert auf 7,4 einstellen, autoklavieren |
| MACS-Puffer | autoMACS Rinsing Solution 0,5 % BSA (steril filtriert) |
| Perfusionspuffer I | HANKS-Puffer 2 mM EGTA 0,1 % (w/v) Glucose |

| | |
|---------------------|------------------------|
| Perfusionspuffer II | HANKS-Puffer |
| | 0,1 % (w/v) Glucose |
| | 0,3 mg/ml Kollagenase |
| | 5 mM CaCl ₂ |

2.1.3 Zellkultur

| | |
|--|---|
| Attachment-Medium | William´s Medium E |
| | 10 % FCS |
| | 1 % Penicillin/Streptomycin |
| | 2 mM L-Glutamin |
| Dexamethason | Sigma-Aldrich, München, Dtld. |
| DMEM mit stabilem Glutamin | Biochrom, Berlin, Dtld. |
| DMEM 10x | Sigma-Aldrich, München, Dtld. |
| DMSO | Sigma Aldrich Chemie, München, Dtld. |
| FACS-Puffer | 500 ml PBS (w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺) |
| | 10 g BSA |
| | 500 µl Natriumazid (10 %ige Stammlösung) |
| FCS (für BMDMs) | Gibco Life Technology, Karlsruhe, Dtld. |
| FCS (für Hepatozyten) | Biochrom, Berlin, Dtld. |
| Ko-Kultur Einsätze | BD Falcon™ Heidelberg, Dtld. |
| Kompanion-Platten | BD Falcon™, Heidelberg, Dtld. |
| Large Cell Separationssäulen | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtld. |
| <i>murines</i> M-CSF | Peptotech, Hamburg, Dtld. |
| OctoMACS Separator | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtld. |
| PBS (w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺) | Biochrom, Berlin, Dtld. |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco, Invitrogen, Carlsbad, Dtld. |
| SB431542 | Adooq Bioscience, Irvine, USA |
| Starvation-Medium | William´s Medium E |
| | 1 % Penicillin/Streptomycin |
| | 2 mM L-Glutamin |
| Sterican-Kanüle 23G | B. Braun, Melsungen, Dtld. |
| Sterilfilter (0,2 µm) | Millipore, Eschborn, Dtld. |
| Trypsin | CytoGen, Sinn, Dtld. |

| | |
|--------------------|------------------------------|
| William's Medium E | Biochrom, Berlin, Dtl. |
| Zell-Schaber | BD Falcon™ Heidelberg, Dtl. |
| Zellsieb (70 µm) | Greiner, Frickenhausen, Dtl. |

2.1.4 Primer

Die unten aufgeführten Oligonukleotide zur Expressionsanalyse mittels quantitativer *real time*-PCR wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Dtl.) generiert.

| | Murine Gene | Orientierung | Primer-Sequenzen |
|----------------------|---|----------------------------|-----------------------------|
| Zytokine | Succinate Dehydrogenase subunit A (SDHA) | <i>Forward</i> | 5'-TGGGGAGTGCCGTGGTGTC-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-GTGCCGTCCCCTGTGCTGGT-3' |
| | Interleukin-1β (IL-1β) | <i>Forward</i> | 5'-TCACAGCAGCACATCAACAA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TGTCCTCATCCTGGAAGGTC-3' |
| | Interleukin-4 (IL-4) | <i>Forward</i> | 5'-GGCATTGTTGAACGAGGTCAC-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-CGAGCTCACTCTCTGTGGTG-3' |
| | Interleukin-6 (IL-6) | <i>Forward</i> | 5'-GTTGCCTTCTGGGACTGAT-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-CAGGTCTGTTGGGAGTGGTA-3' |
| | Interleukin-10 (IL-10) | <i>Forward</i> | 5'-CCAAGCCTTATCGGAAATGA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TCCTGAGGGTCTTCAGCTTC-3' |
| | Interleukin-12 Untereinheit p35 (IL12p35) | <i>Forward</i> | 5'-GACCAAACCAGCACATTGAA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-AGCTCCCTCTGTGTGGAA-3' |
| | Interleukin-13 (IL-13) | <i>Forward</i> | 5'-AGCATGGTATGGAGTGTGGA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-CCTCTGGGTCCTGTAGATGG-3' |
| | Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) | <i>Forward</i> | 5'-GCTGAGCTCAAACCCTGGTA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3' |
| | Transforming Growth Factor-β (TGF-β) | <i>Forward</i> | 5'-GCCTGGACACACAGTACAGC-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TAGTAGACGATGGGCAGTGG-3' |
| | Interferon-β (IFN-β) | <i>Forward</i> | 5'-CCCTATGGAGATGACGGAGA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-ACCCAGTGCTGGAGAAATTG-3' |
| Interferon-γ (IFN-γ) | <i>Forward</i> | 5'-CATGGCTGTTTCTGGCTGTT-3' | |
| | <i>Reverse</i> | 5'-CCACATCTATGCCACTTGAG-3' | |

| | | | |
|---------------------|--|----------------|-----------------------------|
| Chemokine | CXCL1 | <i>Forward</i> | 5'-ACCCAAACCGAAGTCATAGC-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TGGGGACACCTTTTAGCATC-3' |
| | CXCL2 (MIP-2 α) | <i>Forward</i> | 5'-GCCAAGGGTTGACTTCAAGA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-GCCCTTGAGAGTGGCTATGA-3' |
| | CXCL3 (MIP-2 β) | <i>Forward</i> | 5'-AACACCCTACCAAGGGTTGA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-GGGTTGAGGCAAACCTTCTTG-3' |
| | CCL2 (MCP-1) | <i>Forward</i> | 5'-GGCTGGAGAGCTACAAGAGG-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-ATGTCTGGACCCATTCCTC-3' |
| | CCL3 (MIP-1 α) | <i>Forward</i> | 5'-ACCATGACACTCTGCAACCA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-GATGAATTGGCGTGGAATCT-3' |
| | CCL4 (MIP-1 β) | <i>Forward</i> | 5'-GCCCTCTCTCTCTTGTCT-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-CCGGGAGGTGTAAGAGAAAC-3' |
| Akut-Phase-Proteine | Lymphotoxin- α (LT- α) | <i>Forward</i> | 5'-CCTGCTCAGTAAGGGAGACC-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-CTACAGTGCAAAGGCTCCAA-3' |
| | Lymphotoxin- β (LT- β) | <i>Forward</i> | 5'-CATGGATGACCATCCTGTCT-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-AGCTCAGGGTTGAGGTCAGT-3' |
| | Oncostatin-M (OSM) | <i>Forward</i> | 5'-AAGCCACAGCTGCCTATCTT-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-GAGATACCTGAGCCACACA-3' |
| | Alpha-2-Makroglobulin (α 2M) | <i>Forward</i> | 5'-CCTCGGCTGAGGTAGAGATG-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TGAGCCACTTCACAATGAGC-3' |
| | Orosomuroid oder alpha-1-acid glycoprotein (ORM) | <i>Forward</i> | 5'-AAGGATGAGAAGAAACGGGG-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-CACGTGTGTGACAGCCTTCT-3' |
| | Komplement C3 | <i>Forward</i> | 5'-CTGTGTGGGTGGATGTGAAG-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TCCTGAGTGTGTTTTGTTGC-3' |
| | Komplement C4 | <i>Forward</i> | 5'-GATTCCTCACCATCACAGT-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TGTCTGGAATGGTGAAGGCA-3' |
| | C-reaktives Protein (CRP) | <i>Forward</i> | 5'-GGGTGGTGCTGAAGTACGAT-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-GGTTCCCATCAATCCAGAA-3' |
| | Fibrinogen- α (FG- α) | <i>Forward</i> | 5'-CTCTGAAAGGCATCCTGACC-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TTGTGAGGATGTCGGAATCA-3' |
| | Fibrinogen- β (FG- β) | <i>Forward</i> | 5'-TCTTCAGCACGTACGACAGG-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TGTTATACCACCAGCCACCA-3' |

| | | | |
|--|---------------------------|----------------|----------------------------|
| | Hepcidin Antimikrobielles | <i>Forward</i> | 5'-TCTCTGCTTCTCCTCCTTG-3' |
| | Peptid-1 (Hamp1) | <i>Reverse</i> | 5'-ATGTCTGCCCTGCTTCTTC-3' |
| | Haptoglobin (HP) | <i>Forward</i> | 5'-CCAGCCTATCTTGAACGAGC-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TGTCATGAATGGCAAAGGCA-3' |
| | Hemopexin (HPx) | <i>Forward</i> | 5'-CTCAGCGAGGTGGAAGAATC-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TCAGGAGGGTACACCCAGAC-3' |
| | Serum-Amyloid-A1 (SAA1) | <i>Forward</i> | 5'-CCGCAGTGGCAAAGACCCCA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TCAGGCCCCAGCACAACTA-3' |
| | Serum-Amyloid-A3 (SAA3) | <i>Forward</i> | 5'-CCTTCCATTGCCATCATTCT-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-AGTAGGCTCGCCACATGTCT-3' |
| | Serum-Amyloid-P (SAP) | <i>Forward</i> | 5'-CAATGGAAAGCCTTGGGTAA-3' |
| | | <i>Reverse</i> | 5'-TGTGACCTTTGAAACCTCC-3' |

2.1.5 Kits

| | |
|--------------------------------------|--|
| Leucoperm (BUF09) | AbDSerotec, Puchheim, Dtl. |
| Free Active TGF-β1 ELISA Kit | Biologend, Fell, Dtl. |
| MAP2MAG-76K | Mouse Acute Phase Magnetic Beat Panel 2, Merck Millipore, Darmstadt, Dtl. |
| MCYTOMAG-70K | Mouse Cytokine Magnetic Panel, Merck Millipore, Darmstadt, Dtl. |
| Power Sybr Green PCR Master Mix | Applied Biosystems Life Technologies, Foster City, USA |
| QIASHredder Säulen | Qiagen, Hilden, Dtl. |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit | Qiagen, Hilden, Dtl. |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden, Dtl. |
| Total TGF-β1 ELISA Kit | Biologend, Fell, Dtl. |

2.1.6 Antikörper / Immunhistochemie

| Antigen (Methode*) | Markierung | Klon | Hersteller |
|--------------------------|-----------------|-------------|-------------------|
| CD11b (FACS) | PE | M1/70 | eBioscience |
| CD11c (FACS) | PE | N418 | eBioscience |
| CD14 (FACS) | PE | Sa2-8 | eBioscience |
| CD163 (FACS, IHC) | unmarkiert | 2F8 | Dianova |
| CD206 (FACS) | FITC | MR5D3 | AbD Serotec |
| CD206 (IHC) | Alexa Fluor 594 | C068C2 | BioLegend |
| CD68 (FACS) | FITC | FA-11 | Thermo Scientific |
| F4-80 (FACS) | APC | BM8 | eBioscience |
| F4-80 (IHC) | Alexa Fluor 488 | BM8 | BioLegend |
| IgG Isotyp Kontrolle | PE | eBio299Arm | eBioscience |
| IgG2a Isotyp Kontrolle | FITC | eBR2a | eBioscience |
| IgG2b K Isotyp Kontrolle | APC | eB149/10H5 | eBioscience |
| IgG2b K Isotyp Kontrolle | PE | eB149/10H5 | eBioscience |
| Ly6G (FACS) | APC | RB6-8C5 | eBioscience |
| MAPKAPK-2 (WP) | | polyklonal | Cell Signaling |
| MHCII (FACS) | PE | M5/114.15.2 | eBioscience |
| PCNA (FL-261) (WP) | | polyklonal | Santa Cruz |
| Sek AK Cy3 | Cy3 | polyklonal | Dianova |
| TLR4 (FACS) | FITC | 76B357.1 | Abcam |

* WP: Westernblot

FACS: Durchflusszytometrie

IHC: Immunhistochemie

Einbettmedium: 6 g Glycerol (Merck, Darmstadt, Dtl.)
 2,4 g Mowiol (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.)
 6 ml destilliertes Wasser
 12 ml 0,2 M Tris/HCl (CARL-ROTH, Karlsruhe, Dtl.)
 30 Minuten bei 50°C inkubieren
 30 Minuten bei 4000 rpm zentrifugieren
 Überstand verwenden

Hoechst 34580 Invitrogen, Carlsbad, Dtl.

2.1.7 Geräte

| | |
|------------------------------------|---|
| Brutschrank | Thermo Scientific, Schwerte, Dtlid. |
| FACS Canto II | BD Bioscience, San Diego, USA |
| Kryotom | Cryostat Leica CM 3050S, Wetzlar, Dtlid. |
| Mikroskope | Laser Scanning Mikroskop 510, Carl Zeiss, Dtlid. Cell Observer, Carl Zeiss, Dtlid. |
| Multiplex | Luminex 200, USA |
| Nanodrop | NanoDrop Technologies, Wilmington, USA |
| pH-Meter | WTW, Weilheim |
| Sterilbank | Thermo Scientific, Schwerte, Dtlid. |
| Thermoblock | Eppendorf, Hamburg, Dtlid. |
| ViiA7 <i>real time</i> -PCR System | Applied Biosystems, Darmstadt, Dtlid. |
| Zentrifugen | Eppendorf, Hamburg, Dtlid. |

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt, Dtlid.) oder Sigma (München, Dtlid.) bezogen und wiesen den Reinheitsgrad *pro analysis* auf.

2.2 Methoden

2.2.1 Leberresektion

Als *in vivo* Modell für die Leberregeneration diente die partielle Hepatektomie, welche erstmals durch Higgins und Anderson 1931 an Ratten beschrieben wurde.

Männliche wt und mk2^{-/-} C57BL/6J Mäuse wurden inhalativ mit Isofluran betäubt und nach Erreichen des Toleranzstadiums (Reflexe sind erloschen) auf einer Wärmeplatte auf dem Rücken liegend fixiert. Das Fell wurde im Bauchbereich entfernt und die Haut desinfiziert. Die Laparotomie erfolgte über einen etwa 3 cm langen Schnitt durch die Haut sowie einem anschließenden Schnitt durch die Bauchmuskelschicht und das Peritoneum. Nach Mobilisierung der Leberlappen *Lobus medialis dexter/sinister* und *Lobus lateralis sinisters* erfolgte das Setzen der Ligaturen. Zuerst wurde der linke Leberlappen an der Wurzel abgebunden und entfernt, anschließend wurde die Ligatur um den medianen Lappen so gesetzt, dass sie die Gallenblase mit einschließt, aber nicht

zu dicht an der *Vena cava suprahepatica* liegt (vgl. Abb. 3). Nach der Entfernung des medianen Lappens wurde das Abdomen mit einer sterilen Ringerlactatlösung gespült. Die Bauchmuskelschicht und die Hautschicht wurden separat mit Einzelkopfnähten verschlossen.

Zur Schmerzlinderung und zur Vermeidung von Infektionen wurde den Mäusen Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht), Vancomycin (20 mg/kg Körpergewicht) und Enorofloxacin (10 mg/kg Körpergewicht) *subcutan* appliziert. Zur Vermeidung von Wundschmerzen erfolgte die Carprofengabe in oben beschriebener Dosierung auch am 1. und 2. postoperativen Tag. Nach Beendigung der Narkose erwachten die Tiere innerhalb von 5 bis 10 Minuten.

Die Leberregeneration wurde über einen Zeitraum von 1 Stunde bis zu 3 Wochen untersucht. Die Nähte sowie die Gewichtszunahme wurden täglich überprüft.

Am Versuchsende wurden die Tiere mit Rompun und Ketavet narkotisiert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurde der Bauchraum eröffnet und aus der *Aorta descendens* Blut zur Serumgewinnung entnommen. Anschließend wurde die Leber mit kaltem PBS mit Natriumvanadat (0,1 mM) über die *Vena portae* perfundiert. Die blutleere Leber wurde entnommen, ihr Gewicht ermittelt und die Leber anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C kryokonserviert. Zusätzlich wurden die Nieren, die Milz, das Herz, das Gehirn, der Magen und ein Teil des Dünndarms kryokonserviert.

Nach 30 Minuten Inkubation des entnommenen Blutes bei Raumtemperatur wurden die Proben 10 Minuten bei 9300 g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand in ein neues Probenröhrchen überführt und der Vorgang wiederholt. Mit Hilfe der Serumproben wurden Leberschädigungen anhand der serologischen Parameter Laktatdehydrogenase (LDH), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und alkalische Phosphatase (AP) im Zentrallabor der Universitätsklinik ermittelt.

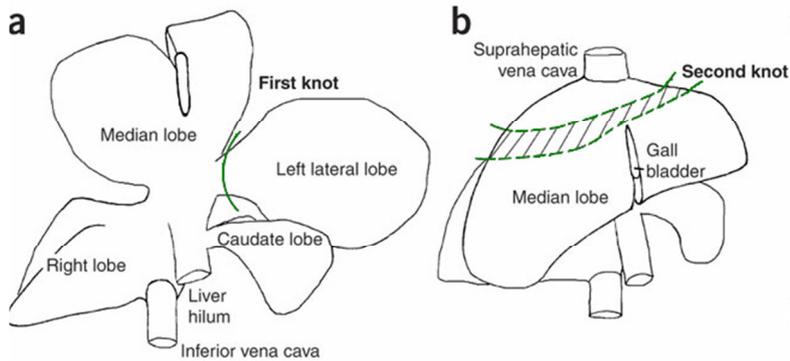


Abb 3. Schematische Darstellung der Anatomie der Mausleber. (a) Setzen der ersten Ligatur um die Wurzel des linkslateralen Leberlappens. (b) Setzen der zweiten Ligatur über der Gallenblase mit Abstand zur *vena cava suprahepatica* (Mitchell und Willenbring 2008).

2.2.2 Immunhistochemie

Von kryokonservierten Lebern wurden mittels Kryotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Vor dem Färben wurden die Schnitte 3 Minuten mittels eiskalten Methanols (-20°C) fixiert und anschließend 3-mal mit 1x PBS gewaschen. Die Blockierung freier Bindungsstellen erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 4 %igem FCS. Die verwendeten Antikörper wurden mit 4 %igem FCS verdünnt. Die Leberschnitte wurden über Nacht bei 4°C mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte für die Nukleus-Färbung die Inkubation mit Hoechst (1:20.000) bzw. für die Detektion von CD163 die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Schnitte mit Einbettmedium verschlossen.

2.2.3 Präparation primärer Maushepatozyten

Die Narkotisierung der Mäuse erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben. Nach dem Erreichen des Toleranzstadiums wurde der Bauchraum der Maus durch eine abdominale und zwei laterale Inzisionen eröffnet. Die Perfusion der Leber erfolgte über die *Vena portae* mittels eines Abbocaths. Nach dem Anschließen des Pumpensystems wurde ein Entlastungsschnitt an der *Vena cava inferior* durchgeführt, um ein Anschwellen der Leber zu vermeiden.

Die hier verwendete Methode basiert auf einer Zwei-Phasen-Perfusion der Leber. Während der ersten Phase wurde das Blut für etwa 3 Minuten mit einer Flussrate von 8 ml/min aus der Leber gespült und gleichzeitig durch den Zusatz von EGTA in dem Perfusionspuffer I der Zellverband in der Leber durch Ca^{2+} -Depletion gelockert. Anschließend wurde die Leber mit dem Perfusionspuffer II mit gleicher Flussrate perfundiert. Dieser Puffer enthielt Kollagenase und Calcium. Durch das Calcium wurde die normale Ionenverteilung der Zellen wiederhergestellt und so die Aktivität der Kollagenase gesteigert. Die Kollagenase selbst bewirkte die Auflösung von Peptidbrücken in der extrazellulären Matrix, so dass die hepatischen Zellen in einem losen Verband vorlagen. Dieser Zustand ist makroskopisch durch ein Anschwellen der Leber sichtbar und markiert das Ende der Perfusion.

Die Leber wurde vorsichtig aus der Maus entfernt und in ein Falcon mit etwa 10 ml Attachment-Medium überführt. Unter der Sterilbank wurde die Leberkapsel eröffnet und die hepatischen Zellen ausgeschwemmt. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (Porengröße 70 μm) gegeben und anschließend 3 Minuten bei 50 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Attachment-Medium resuspendiert. Nach insgesamt dreimaligem Waschen des Zellpellets wurde dieses in 10 ml Medium resuspendiert und die Anzahl der vitalen Zellen mittels Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Die so gewonnenen vitalen Zellen wurden entweder direkt auf mit Kollagen-I beschichtete 6-Loch-Platten (2 Mio Zellen pro Platte) kultiviert oder es wurden, um eine höhere Reinheit der Hepatozyten zu erzielen, in einem weiteren Aufreinigungsschritt CD11b-positive Zellen aus der Zellsuspension entfernt und diese anschließend im sogenannten Kollagensandwich kultiviert (2.2.5). Die hier beschriebene Methode diente ebenfalls der Gewinnung von primären Lebermakrophagen (Kupferzellen, 2.2.4.2).

2.2.4 Zellseparation mittels MACS-Technologie

2.2.4.1 Aufreinigung primärer Hepatozyten

Ein weiterer Schritt zur Aufreinigung der primären Hepatozyten (Gewinnung siehe 2.2.3) diente der Entfernung CD11b-positiver Zellen (z.B. Lebermakrophagen) und erfolgte mittels CD11b bindender Antikörper, die an magnetische Beads gekoppelt sind. Hierzu wurden die Zellen zur Entfernung des Mediums 3 Minuten bei 50 g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen im Restvolumen resuspendiert und 100 µl der CD11b-Beads zugefügt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C wurde das Volumen mittels MACS-Puffer auf 10 ml erhöht und die Zellsuspension auf äquilibrierte *Large Cell* Separationssäulen im magnetischen Feld (Octo MACS Separator) gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen, die Zellen zentrifugiert und in Attachment-Medium resuspendiert. Die vitale Zellzahl wurde erneut mittels Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.4.2 Gewinnung von Lebermakrophagen

Zur Gewinnung von primären Lebermakrophagen wurde der Überstand der drei Waschschriffe bei der Präparation von primären Hepatozyten (2.2.3) gesammelt. Um noch enthaltene Hepatozyten aus diesem Überstand zu entfernen wurde er 3 Minuten bei 50 g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in ein neues Falcon überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 g und 4°C (Bremse/Beschleunigung 4). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer mit 100 µl CD11b-Beads resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C wurde die Zellsuspension mit MACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und die Zellsuspension auf äquilibrierte *Large Cell* Separationssäulen im magnetischen Feld (Octo MACS Separator) gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen mit MACS-Puffer gespült. Zur Elution der CD11b-positiven Zellen wurden die Säulen aus dem magnetischen Feld genommen, auf jede Säule 1 ml MACS-Puffer gegeben und dieser mittels sterilem Säulenstempel durch die Säulen gepresst. Die Zellen wurden aufgefangen und für weitere Experimente verwendet.

2.2.5 Sandwich-Kultur

Die Kultivierungsform des Sandwichs verwendet man um der Dedifferenzierung, welche primäre Hepatozyten in der *Monolayer*-Kultur bereits nach drei Tagen aufweisen (vgl. Abb. 15), entgegenzuwirken. Hierfür wurde Kollagen der Firma Roche verwendet, welches in 0,2 %iger Essigsäure gelöst wurde. Als pH-Indikator diente 10x DMEM mit einem Farbumschlag im neutralen Bereich. Der pH-Wert wurde mittels 1 M NaOH eingestellt. Die Endkonzentration des Kollagens betrug 1 mg/ml.

Die primären Hepatozyten wurden nach Aufreinigung mittels MACS-Technologie in 6-Loch-Kompanionplatten kultiviert. Hierzu wurde zunächst eine aus 350 µl Kollagen pro Loch bestehende Schicht aufgebracht, die nach etwa 1 h Inkubationszeit im Brutschrank die nötige Festigkeit aufwies, so dass 0,8 Mio Hepatozyten pro Loch ausgesät werden konnten. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurden die Hepatozyten zweimal mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Die vitalen Hepatozyten wurden nun mit einer zweiten Schicht von 350 µl Kollagen bedeckt und nach 1 h Inkubation je Loch 2 ml Starvation-Medium zugegeben.

2.2.6 Gewinnung von knochenmarksgenerierten murinen Makrophagen (BMDM)

Unter dem Einfluss des Monozyten-koloniestimulierenden Faktors (M-CSF) differenzieren Knochenmarkszellen zu Monozyten und Makrophagen (Manzanero 2012, Weischenfeldt und Porse 2008, Zaroni *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2008). Diese Methode wurde hier u.a. verwendet, um eine ausreichende Zahl von Makrophagen zu gewinnen und gleichzeitig die Aktivierung der Zellen bei der Isolierung von primären Lebermakrophagen zu umgehen (Chen und Nunez 2010).

Zur Generierung von BMDMs wurden Femur und Tibia der beiden Hinterläufe der Maus freipräpariert. Die Knochen wurden in PBS, dann in 70 %igem Ethanol, erneut in PBS und anschließend in DMEM (1 g/l Glukose) gewaschen. Unter sterilen Bedingungen wurden die Enden der Knochen abgeschnitten und das Knochenmark mit einer Spritze (23G-Kanüle) mit DMEM herausgespült. Die so gewonnenen Knochenmarkszellen wurden resuspendiert und anschließend 10 Minuten bei 300 g und 4°C (Bremse/Beschleunigung 4) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit DMEM (10 % FCS, 1 % Pen/Strep) resuspendiert und die Zellen über Nacht in 75 cm² Zellkulturflaschen inkubiert. Die Zellen wurden nun

erneut wie beschrieben zentrifugiert, das Zellpellet in DMEM (10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 10 ng/ml *murines* M-CSF) resuspendiert und die Zellen auf drei Zellkulturschalen (Durchmesser je 15 cm) mit je 20 ml Medium verteilt. Nach zwei Tagen Kultivierung wurden jeder Schale 20 ml und nach weiteren drei Tagen 10 ml frisches Medium zugegeben. Am Tag sieben nach der Präparation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit Trypsin/EDTA inkubiert. Die Zellen wurden von der Platte gespült und evtl. noch adhärenente Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Die Zellsuspension wurde wie oben beschrieben zentrifugiert und das Zellpellet in DMEM (10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 10 ng/ml *murines* M-CSF) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau ermittelt und die Zellen entsprechend den Experimenten (0,1 Mio BMDMs pro *Transwell*, 0,2 Mio BMDMs pro Loch) ausgesät.

2.2.7 Ko-Kultur

Die Verwendung von Ko-Kulturen ermöglicht die Untersuchung des wechselseitigen Einflusses verschiedener Zelltypen aufeinander. Zur Untersuchung des Einflusses von Hepatozyten auf die Differenzierung und Funktion von Makrophagen wurden diese beiden Zelltypen kokultiviert. Hierfür wurden primäre Hepatozyten als Monolayer oder in der Sandwich-Kultur verwendet (2.2.5), die mit BMDMs in *Transwells* (Porengröße 0,4 µm) kokultiviert wurden. Die Subkultivierung der BMDMs in die *Transwells* erfolgte nach sieben Tagen Differenzierung mit M-CSF wie unter 2.2.5 beschrieben. Am gleichen Tag erfolgte die Präparation der primären Hepatozyten (vgl. 2.2.2). Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Medium der Hepatozyten entfernt und durch frisches Starvation-Medium ersetzt. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation wurde das Medium aus den *Transwells* der BMDMs entfernt, diese zu den Hepatozyten bzw. auf Kontrollplatten übertragen und anschließend je *Transwell* 2 ml Starvation-Medium mit 10 ng/ml M-CSF zugesetzt. Zur Bestimmung des Einflusses der Hepatozyten auf die Differenzierung der BMDMs wurden diese am Tag 1 bis 4 nach Kokultivierung auf die Expression typischer Makrophagendifferenzierungsmarker untersucht. Zur Untersuchung des Einflusses der Hepatozyten auf die Funktion der BMDMs wurden die Zellen nach zwei Tagen Kokultivierung mit 10 ng/ml LPS stimuliert und für 1 bis 72 Stunden inkubiert.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Differenzierung von kokultivierten BMDMs bzw. dem Vergleich zwischen Lebermakrophagen und kokultivierten BMDMs wurde die durchflusszytometrische Analyse mittels FACS gewählt. Die Zellpopulation wurde durch die Parameter Vorwärtslichtstreuung (Zellgröße) und Seitwärtslichtstreuung (Zellgranularität) definiert. Die Identifizierung der Expression verschiedener Differenzierungsmarker erfolgte durch die Verwendung entsprechender Antikörper, die mit den Fluorophoren PE, APC oder FITC gekoppelt waren. Es wurden jeweils 10.000 Zellen gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels FlowJo-Software.

Zur Bestimmung des Einflusses der Ko-Kultivierung auf die Differenzierung der BMDMs wurden diese nach 1–4 Tagen Ko-Kultur und im Vergleich hierzu BMDMs aus der Monokultur bzw. BMDMs mit durch Hepatozyten konditioniertem Medium (durch 2 Tage Kultivierung) und mit Kontrollmedium, analysiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen. Je *Transwell* wurden 250 µl und je *Well* 500 µl Trypsin/EDTA zugegeben und die Zellen 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Trypsin-Wirkung wurde durch Zugabe von kaltem FACS-Puffer (1 ml je *Transwell*, 2 ml je Loch) gestoppt und die Zellen mit einer Pipette ab gespült. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer überführt und 5 Minuten bei 405 g und 4°C (Bremse/Beschleunigung 5) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Röhrchen ausgeklopft. Für die Antikörperfärbung mit CD68 und CD206 wurden die Zellen mittels Leucoperm zuvor nach Herstellerangaben fixiert und permeabilisiert. Je Röhrchen wurden 100 µl FACS-Puffer bzw. Reagenz B (permeabilisierte Zellen) mit dem entsprechenden Antikörper gegeben (vgl. Tab. 2.1.6) und die Zellen 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit je 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in je 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und im FACS gemessen.

Zum Vergleich von Lebermakrophagen und kokultivierten BMDMs wurden die Lebermakrophagen wie unter 2.2.3.2 beschrieben gewonnen und die Expression verschiedener Differenzierungsmarker mit denen von für 4 Tage kokultivierten BMDMs verglichen. Da nach der Isolierung von Lebermakrophagen keine reine Makrophagenkultur vorliegt, wurden Kofärbungen mit dem Makrophagenmarker F4-80 vorgenommen, um die Makrophagen eindeutig identifizieren zu können. Hierfür wurden zunächst alle Zellen mit F4-80 wie oben beschrieben gefärbt, anschließend erfolgte ggf. die Permeabilisierung der Zellen und die Färbung mit dem Zweitantikörper. Untersucht

wurde die Expression der Marker CD11c, CD14, MHCII, CD68, CD206, TLR4 und CD163 in F4-80-positiven Zellen.

2.2.9 RNA-Isolierung

Die Präparation der RNA erfolgte nach Herstellerangaben mittels QIAGEN RNeasy Mini Kit.

Zur Isolierung der RNA aus der Leber wurde je ein kleines Stück des rechten Leberlappens verwendet. Dieses wurde vorbereitend in einem 1 ml Reaktionsgefäß in RLT-Puffer mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol zerstoßen.

Zur Isolierung der RNA aus BMDMs wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µl pro *Transwell* RLT-Puffer mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst. Um eine ausreichende Menge RNA zu erzielen, wurden die BMDMs aus je 3 *Transwells* vereinigt.

Zur Präparation der RNA aus Hepatozyten, die im Sandwich kultiviert wurden, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen samt Kollagen mittels Zellschaber gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden dreimal 3 Minuten bei 5400 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Anschließend wurde das Kollagen mit dem Zellpellet in 600 µl RLT-Puffer mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol resuspendiert.

Die Homogenisierung aller Proben erfolgte den Herstellerangaben entsprechend mittels QIAshredder Kit. Die weitere Isolierung der RNA entsprach den Herstellerangaben des RNeasy Mini Kits, wobei die Leberproben zusätzlich mit DNase behandelt wurden. Die Bestimmung von Reinheit und Konzentration erfolgte mittels Nano-Drop spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 260 nm/280 nm.

Die Qualität der RNA aus den Leberproben wurde außerdem mittels chip-basierter Kapillar-Elektrophorese (Agilent) bestimmt. Die Durchführung erfolgte durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

2.2.10 c-DNA Synthese

Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des Quantitect Reverse Transcription Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die so gewonnene cDNA aus primären Hepatozyten und BMDMs wurde mit Nuklease freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/ μ l für die *real time* PCR-Reaktionen verdünnt. Die Reinheit der Synthesereaktion wurde mittels Kontrollen ohne DNA bzw. ohne Reverse Transkriptase überprüft.

2.2.11 Quantitative PCR

Die *real time*-PCR ermöglicht die quantitative Erfassung der gebildeten PCR-Produkte während der Synthese, z.B. mittels DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoffe wie das hier verwendete SYBR Green. Dabei korreliert die Zunahme der Fluoreszenz mit der Zunahme des PCR-Produkts. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt zu Beginn der exponentiellen Phase und wird mit dem C_t -Wert angegeben. Der C_t -Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Zur Normalisierung des C_t -Wertes des Zieltranskripts wird der C_t -Wert eines Referenztranskripts (hier SDHA – *murines* Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A) bestimmt und die Differenz zwischen beiden gebildet (ΔC_t -Methode nach Lang und Heeg, 1998). Die Messungen erfolgten am ViiA7 Real Time System in 96-Well Mikrotiterplatten unter Verwendung der unter 2.1.4 beschriebenen Primer. Ein Reaktionsansatz bestand dabei aus 1,2 μ l cDNA (10 ng/ μ l), 12,5 μ l SYBR Green PCR Mastermix, 9,3 μ l nuklease freiem Wasser und je 1 μ l des entsprechenden *Forward*- und *Reverse*-Primers (10 pmol/ μ l). Das PCR-Programm bestand aus einem einmaligen Schritt von 2 Minuten bei 50°C und der initialen Denaturierung von 10 Minuten bei 95°C. Dem schlossen sich 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung) und 1 Minute bei 60°C (Annealing und Elongation) zur Amplifikation der entsprechenden PCR-Produkte an. Terminal erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse zur Qualitätskontrolle (15 Sekunden bei 95°C, 1 Minute bei 60°C und nochmals 15 Sekunden bei 95°C).

Die relativen RNA-Konzentrationen der unten genannten Gene (Chip) in den Leberproben wurden mittels Microarray-Technologie (Fluidigm) bestimmt. Die Messungen erfolgten durch Dr. Maria Thomas im Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut der Klinischen Pharmakologie in Stuttgart.

Chip:

| | | | | | | | |
|-------|-------|------------|-----------|-----------|----------|--------|-------|
| A2m | Apcs | Beta Actin | C3 | C4b | Ccl11 | Ccl9 | Crp |
| Csf1 | Csf1r | Csf2 | Cx3cl1 | Cxcl10 | Cxcl11 | Cxcl12 | Fga |
| Fgb | Fgg | Gapdh | Hamp | Hp | Hpx | Il11 | Il12a |
| Il12b | Il19 | Il1a | Il20ra | Il20rb | Il33 | Lbp | Lif |
| Lta | Ltb | Nrg1 | Orm1 | Pf4 | Pglyrp1 | Plat | Plg |
| Saa1 | Saa2 | Saa3 | Serpina11 | Serpina3g | Serpina5 | Stmn4 | Vegfa |

2.2.12 Proteinbestimmung

2.2.12.1 Multiplex-Analyse

Die Multiplex-Analyse ermöglicht die Identifizierung von bis zu 100 verschiedenen Proteinen in einem Ansatz. Als Probenmaterial kann Serum, Zelllysat oder Zellüberstand verwendet werden. Die hierfür notwendige Technologie basiert auf Polystyrol-Kügelchen (Beads), die mit zwei verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen in verschiedenen Mischungsverhältnissen gefüllt sind, so dass 100 distinkte Beadsorten vorliegen, die basierend auf der Durchflusszytometrie mit Hilfe von Lasern eindeutig identifiziert werden können.

Die Beads sind mit Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine gekoppelt (je Beadfarbe Antikörper gegen ein Protein) und werden der zu untersuchenden Lösung beigesetzt. Nach der Antigen-Antikörperbindung werden die Ansätze gewaschen und dadurch ungebundene Proteine entfernt. Nun werden biotinylierte Detektionsantikörper zugegeben, welche die gebundenen Antikörper binden und mittels Zugabe von Streptavidin-SE detektiert werden können.

Verwendet wurden das Maus-Akut-Phase Panel 2 [Alpha-1 Saures Glycoprotein, Alpha-2 Macroglobulin, CRP, Haptoglobin und Serum Amyloid Protein] und das Maus Zytokin Panel [IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, M-CSF, LIF, MCP1 (CCL2), MIP1 α (CCL3), MIP1 β (CCL4), RANTES (CCL5), Eotaxin (CCL11), MIP2 (CXCL2), IP10 (CXCL10)] jeweils mit magnetischen Beads von Merck Millipore. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben zur Ermittlung der jeweiligen Proteinkonzentrationen im Serum bzw. im Zellkulturüberstand.

2.2.12.2 ELISA

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von TGF- β 1 (aktiv und gesamt) wurden ELISA-Kits von Biolegend nach Angaben des Herstellers verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Differenzielle Regulation der Leberregeneration in wt Mäusen

3.1.1 Rekonstitution des Körper- und Lebergewichts nach PHx

Wie in der Zielsetzung formuliert befasst sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Identifizierung von Chemokinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und APP, die während der Leberregeneration nach PHx differenziell reguliert werden. Hierfür wurde eine Zeitreihe von Sham- und 2/3 PHx-operierten wt C57BL/6J-Mäusen generiert. Diese umfasste die Zeitpunkte 1, 2, 3, 4 und 8 Stunden sowie 1, 2, 3, 4, 6, 8, 14 und 21 Tage mit mindestens 3 Tieren pro Zeitpunkt und Gruppe. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Tiere. Um den Grad der Regeneration bzw. der durch die Operation verursachten Schädigung bestimmen zu können, wurde bei der Organentnahme das Gewicht der Leber bestimmt und für die Serumgewinnung Blut entnommen. Das Serum wurde für die Bestimmung der Serumparameter GOT, GPT, LDH, AP und Bilirubin verwendet, die als Indikatoren für Gewebs- und Zellschädigung dienen.

Das durchschnittliche Gewicht der entnommenen Lebern von wt Mäusen während der Resektion betrug rund 2,3 % des Körpergewichts. Betrachtet man die prozentuale Gewichtsveränderung (Abb. 4A) nach Hepatektomie im Vergleich zu Sham-operierten Tieren, so konnte einen Tag nach der Operation einen Gewichtsverlust von etwa 10 % detektiert werden, während die Sham-operierten Mäuse nur ca. 2 % verloren. Rund 7 Tage nach Resektion erreichten die Mäuse wieder das Ausgangsgewicht. Das Gewicht beider Gruppen stieg über den Zeitraum von 21 Tagen relativ kontinuierlich an, die PHx-operierten Tiere erreichten jedoch bis zum Schluss nicht das durchschnittliche Gewichtsniveau der Sham-behandelten Tiere.

Die Rekonstitution des Lebergewichts ist in Abbildung 4B dargestellt. Ab 8 Stunden nach Hepatektomie war ein Anstieg des Lebergewichts erkennbar, wobei die deutlichste Gewichtszunahme zwischen 2 und 4 Tagen erfolgte. Nach 21 Tagen hatten die Lebern rund 96 % des Ausgangsgewichts erreicht.

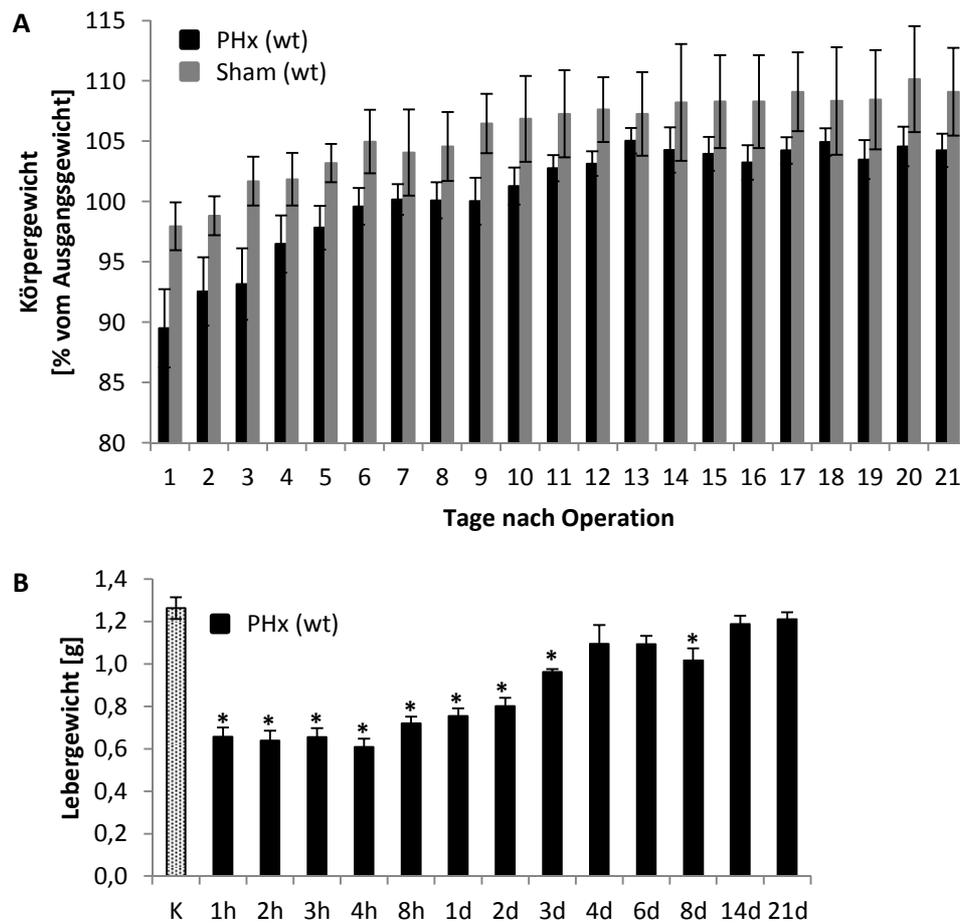


Abb. 4: Rekonstitution des Körper- bzw. Lebergewichts nach Resektion bei wt Mäusen. PHx- bzw. Sham-Operationen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Vor und im Zeitraum von bis zu 21 Tagen nach OP wurde das Körpergewicht der Tiere bestimmt und das prozentuale Körpergewicht nach Organentnahme vom Ausgangsgewicht berechnet. An den jeweiligen Versuchsenden wurden die Mäuse getötet und die Lebern entnommen. Das Gewicht der Lebern wurde ermittelt. Dargestellt sind die jeweiligen arithmetischen Mittel mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Messungen je Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (K) wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung abgebildet (*).

3.1.2 Serumanalyse

Aus dem entnommenen Blut wurde die Konzentration des Bilirubins sowie die Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), der zytoplasmatischen Laktatdehydrogenase (LDH) und der alkalischen Phosphatasen (AP) bestimmt (Abb. 5). Als Kontrolle zu den PHx- und Sham-operierten Mäusen dienten unbehandelte Tiere.

Für die Ausscheidung von Bilirubin aus dem Körper ist die Konjugation an Glukuronsäure in der Leber notwendig. Nach einer partiellen Hepatektomie ist der Leberstoffwechsel

jedoch stark eingeschränkt, wodurch die Bilirubinkonzentration ansteigt. Bei den hier generierten Mäusen stieg die Bilirubinkonzentration in den ersten acht Stunden signifikant, während sie bei den Sham-Tieren unterhalb der Detektionsgrenze lag.

Als Indikatoren für die Zellschädigung dienten die zytoplasmatischen Enzyme GOT, LDH und GPT. Diese gelangen beim Verlust der Membranintegrität ins Blut, wo ihre Konzentration durch die Oxidation von NADH photometrisch bestimmt werden kann. Die Aktivität aller drei Parameter stieg infolge der Hepatektomie kontinuierlich an und erreichte ihr Maximum nach 8 Stunden. Nach 2 bis 3 Tagen erlangten die Parameter wieder ihr jeweiliges Kontrollniveau.

Bei den Alkalischen Phosphatasen handelt es sich um membranständige Enzyme, die in großer Menge im Skelettsystem, im Leberparenchym und in den Gallenwegsepithelien lokalisiert sind. Nach partieller Hepatektomie, aber auch nach Sham-Operationen stieg die AP-Aktivität signifikant. Einen Tag nach PHx erreichte sie das Maximum, während die Aktivität im Serum der Sham-behandelten Tiere hier bereits wieder das Kontrollniveau erlangte.

Die hier untersuchten Serumparameter erreichten folglich 8 Stunden bis 1 Tag nach PHx ihr Maximum und weisen auf eine deutliche Leberschädigung hin.

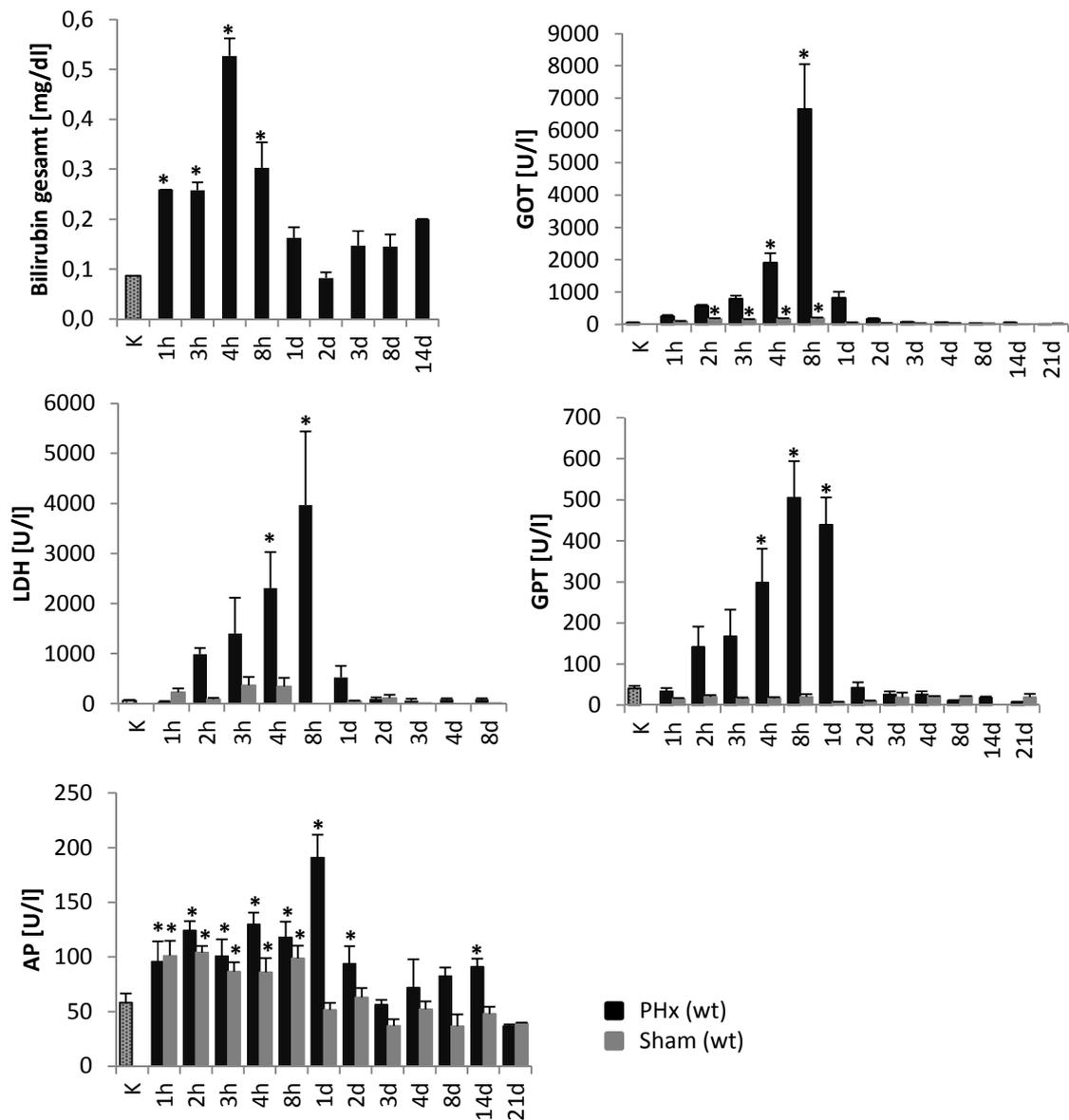


Abb. 5: Die Hepatektomien führen zu einer Erhöhung der Bilirubin Gesamt-Konzentration sowie der Aktivitäten von GPT, LDH, GPT und AP. PHx- bzw. Sham-Operationen, Serumgewinnung und Bestimmung der Serumparameter wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle (K) dienen unbehandelte Mäuse. In einem Zeitraum von einer Stunde bis zu 21 Tagen nach OP wurden die Tiere getötet und das Serum entnommen. Die Konzentration des Gesamtbilirubins in Sham-Tieren lag überwiegend unterhalb der Detektionsgrenze und konnte daher nicht dargestellt werden. Gezeigt werden die jeweiligen arithmetischen Mittel mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Messungen je Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (K) wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

3.1.3 Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Akut-Phase-Proteinen

Für die differenzielle Analyse möglicher relevanter Faktoren für die Leberregeneration wurde aus den entnommenen Lebern die Gesamt-RNA isoliert und diese in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Zanger (IPM Stuttgart) auf die Expression verschiedener Gene mittels Fluidigm-Chip-Technologie untersucht. Bestimmt wurde die Expression verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren und Akut-Phase-Proteine. Zudem konnten mittels Multiplex-Analyse die Proteinkonzentrationen einiger dieser Faktoren im Serum ermittelt werden.

Die Analyse der Zytokine (Abb. 6) ergab für CCL9 und IL-33 zwei Tage nach partieller Hepatektomie eine gegenüber den Sham-operierten Tieren erhöhte Genexpression. Die Expressionen der Chemokine CXCL10, 11 und 12 sowie LTB waren gegenüber den Sham-operierten Tieren vermindert.

Der Verlauf der Expression der Zytokine bzw. Zytokinrezeptoren CCL11, CX3CL1, IL-11, IL-12a, IL-12b, IL-1a, IL-20ra, IL-20rb, LIF, LTA und PF4 ist hier nicht dargestellt, er entsprach aber dem Verlauf von CXCL10 und LTB. Auffallend war dabei der starke Anstieg der Expression zwischen 3 und 6 Tagen. Die Genexpression von IL-19 und STMN4 lag unterhalb der Detektionsgrenze.

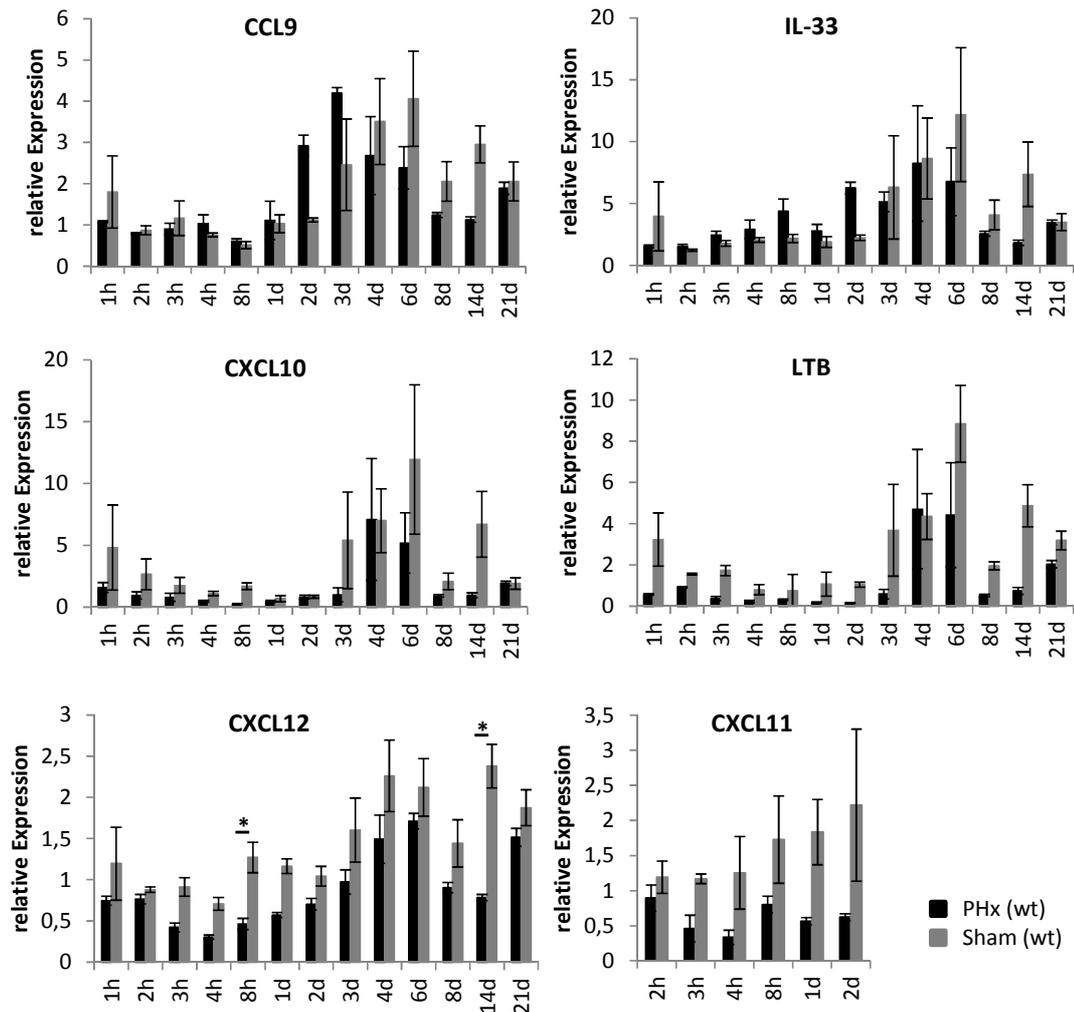


Abb. 6: Einfluss der PHx- und Sham-Operationen auf die Genexpression von CCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, IL-33 und LTB. PHx- bzw. Sham-Operationen und Organentnahmen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt und die RNA aus den Lebern wie unter 2.2.9 beschrieben isoliert. Als Kontrolle diente die RNA unbehandelter Tiere. Die Messung der RNA-Expression erfolgte mittels Fluidigm-Chip-Technologie. Zur Auswertung wurde die ΔCt -Methode mit GAPDH als Referenz verwendet. Die arithmetischen Mittelwerte wurden auf die Kontrolle normalisiert (Kontrolle = 1). Gezeigt werden die normalisierten Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Messungen je Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

Die Proteinkonzentrationen im Serum nach PHx waren für die Zytokine CCL2, CCL4, IL-6 und IL-10 2-4 Stunden nach OP gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. CCL2 und IL-6 wiesen dabei auch signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Sham-behandelten Tieren auf (Abb. 7).

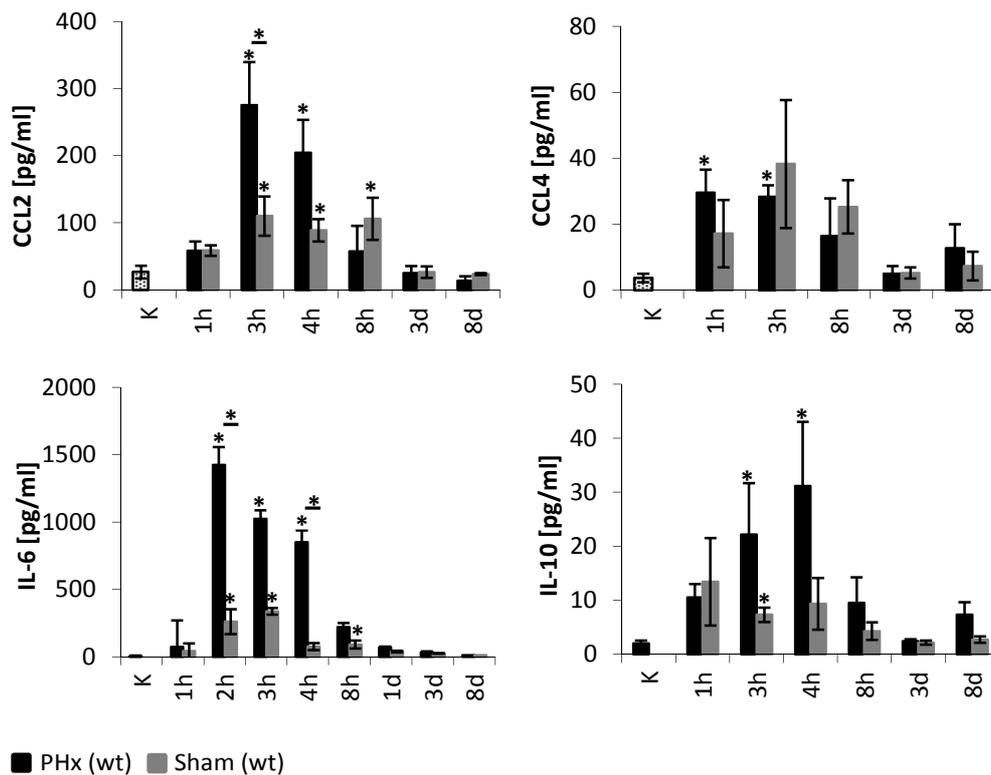


Abb. 7: Die Leberresektion führt zu einer erhöhten Serumkonzentration der Chemokine bzw. Zytokine CCL2, CCL4, IL-6 und IL-10. PHx- bzw. Sham-Operationen und Serumbewinnung wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle diente das Serum unbehandelter Tiere. Die Mäuse wurden im Zeitraum von einer Stunde bis zu 8 Tagen nach OP getötet. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Multiplex-Technologie wie unter 2.2.12.1 beschrieben bestimmt. Gezeigt werden die jeweiligen arithmetischen Mittel mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Messungen je Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (K) und untereinander wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

Eine wichtige Rolle bei der Leberregeneration spielen neben den Zytokinen auch die Wachstumsfaktoren (vgl. Einleitung). Während die Bedeutung von HGF und EGF hierbei sehr gut untersucht ist, existieren eine Reihe von weiteren Faktoren wie zum Beispiel Neuregulin1 (NRG1), *Vascular endothelial growth factor –A* (VEGF-A), *Colony-stimulating factor-1* (CSF1) und sein Rezeptor CSF1R, die möglicherweise an einem reibungslosen Verlauf der Regeneration beteiligt sind. Eine potenzielle Relevanz dieser Faktoren ergibt sich, da NRG1 am Wachstum und der Differenzierung von Endothelzellen beteiligt ist (Zhao *et al.* 1998, Odiete *et al.* 2012) und VEGF-A neben Angiogenese und Mitogenese auch die Migration von Endothelzellen, Monozyten sowie Makrophagen induziert (Ferrara 2004). CSF1 und sein Rezeptor sind an der Differenzierung myeloider Vorläuferzellen u.a. zu Monozyten und Makrophagen, sowie an der Regulation der

Migration, Proliferation, Funktion und dem Überleben von Makrophagen beteiligt (Fixe und Praloran 1998).

Die in Abb. 8 dargestellte Genexpression hepatektomierter Mäuse von VEGF-A, CSF1 und CSF1R war gegenüber Sham-operierten Tieren z.T. vermindert. NRG1 wies hingegen besonders 2 bis 4 Tage nach PHx eine erhöhte Expression gegenüber den Sham-behandelten Mäusen auf.

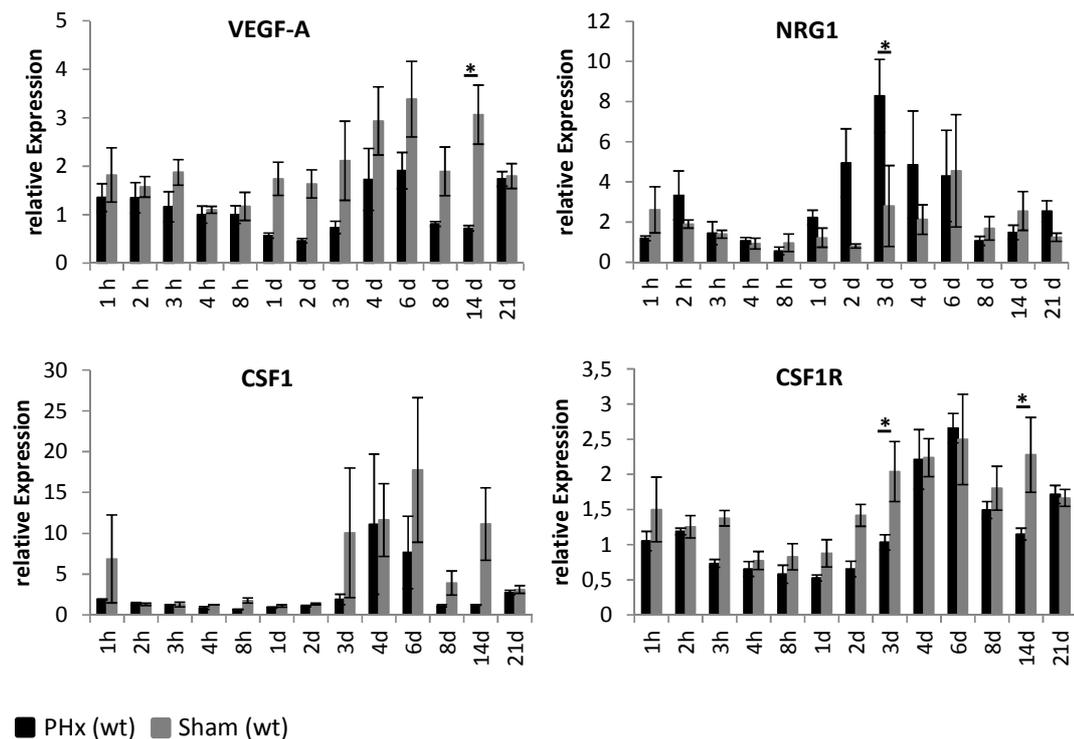


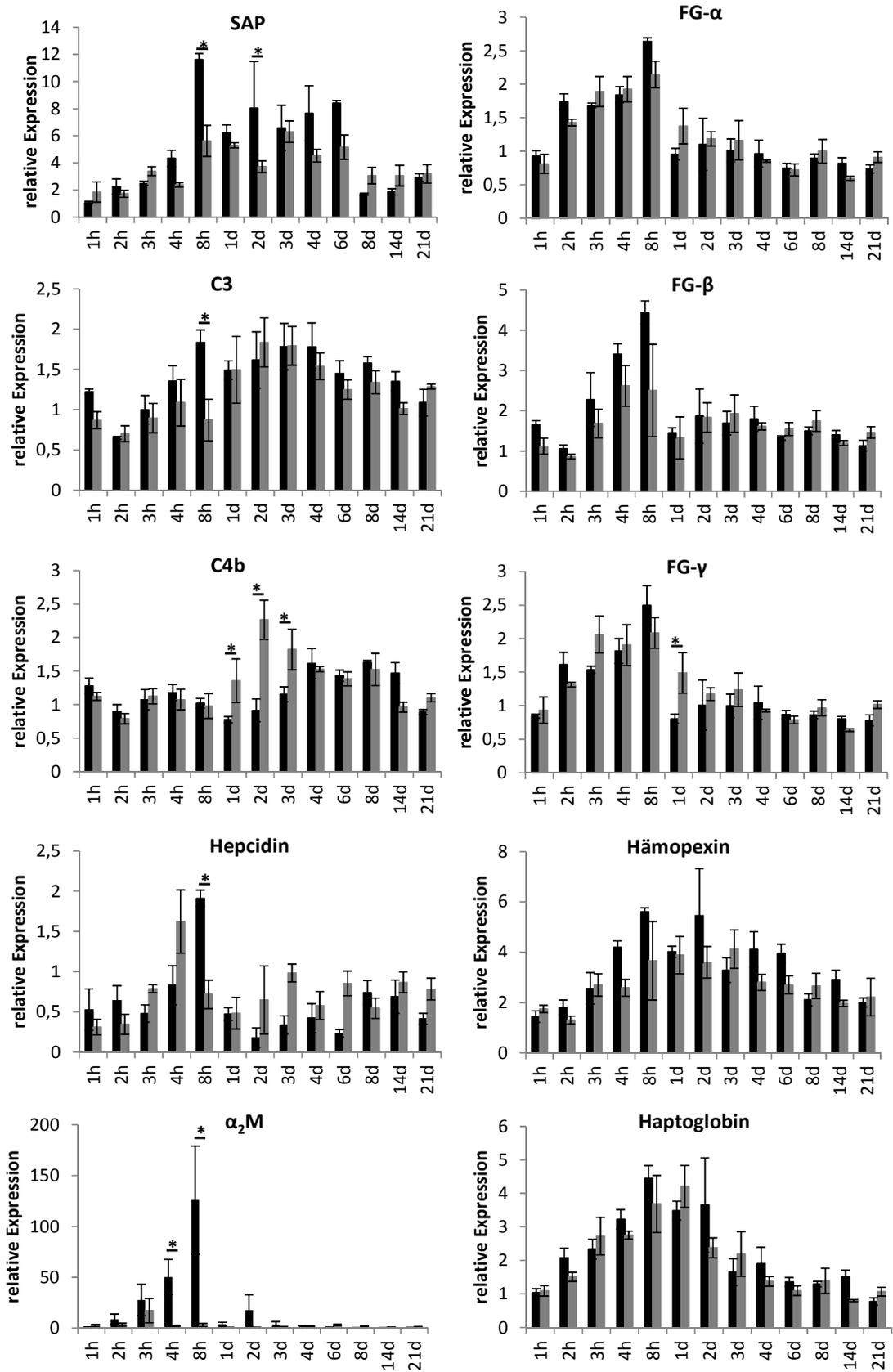
Abb. 8: Einfluss der PHx- bzw. Sham-Operation auf die Expression von VEGF-A, NRG1, CSF1 und den CSF1-Rezeptor. PHx- bzw. Sham-Operationen und Organentnahmen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt und die RNA aus den Lebern wie unter 2.2.9 beschrieben isoliert. Als Kontrolle diente die RNA un behandelter Tiere. Die Messung der RNA-Expression erfolgte mittels Fluidigm-Chip-Technologie. Zur Auswertung wurde die ΔCt -Methode mit GAPDH als Referenz verwendet. Die arithmetischen Mittelwerte wurden auf die Kontrolle normalisiert (Kontrolle = 1). Gezeigt werden die normalisierten Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Messungen je Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

Nach PHx wird eine Akut-Phase-Antwort generiert. Ausgehend von der Hypothese, dass APP in die Regulation der Regeneration der Leber involviert sind, wurde die Expression diverser APP über einen Zeitraum von 21 Tagen nach PHx untersucht (Abb. 9). Betrachtet man das Ergebnis, so fällt auf, dass die RNA-Expression der meisten APP

rasch anstieg und bereits 8 Stunden nach PHx ihr Maximum erreichte. Ausnahmen stellten hier C4b, LBP, CRP, PLG, SERPINA3G und SERPINA11 dar. Die Expression von SAP, C3, Heparin und besonders α_2 M war 8 Stunden nach PHx gegenüber den Sham-behandelten Tieren signifikant erhöht. Eine ebenfalls erhöhte Expression im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren konnte für SAP, α_2 M, SAA2, SAA3 und ORM1 zwei Tage nach PHx beobachtet werden.

Die Proteinkonzentration von α_2 M im Serum war im Vergleich zur Genexpression gegenüber der Kontrolle bzw. den Sham-behandelten Mäusen kaum verändert, ebenso CRP und Adipsin. Im Vergleich hierzu war ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle für ORM nach 1 bis 8 Tagen nachweisbar. Signifikante Unterschiede zwischen PHx- und Sham-behandelten Tieren waren für HP nach 1 bis 2 Tagen feststellbar. Hier konnte ein deutlicher Anstieg der HP-Konzentrationen im Serum der Sham-operierten Mäuse ermittelt werden (Abb. 10).

Die hier erhobenen Befunde verdeutlichen, dass nach PHx Faktoren, die an Differenzierungs- und Heilungsprozessen bzw. an Leberwachstum beteiligt sind, verstärkt exprimiert werden, wobei auch entzündungshemmende Mechanismen eine wichtige Rolle spielen.



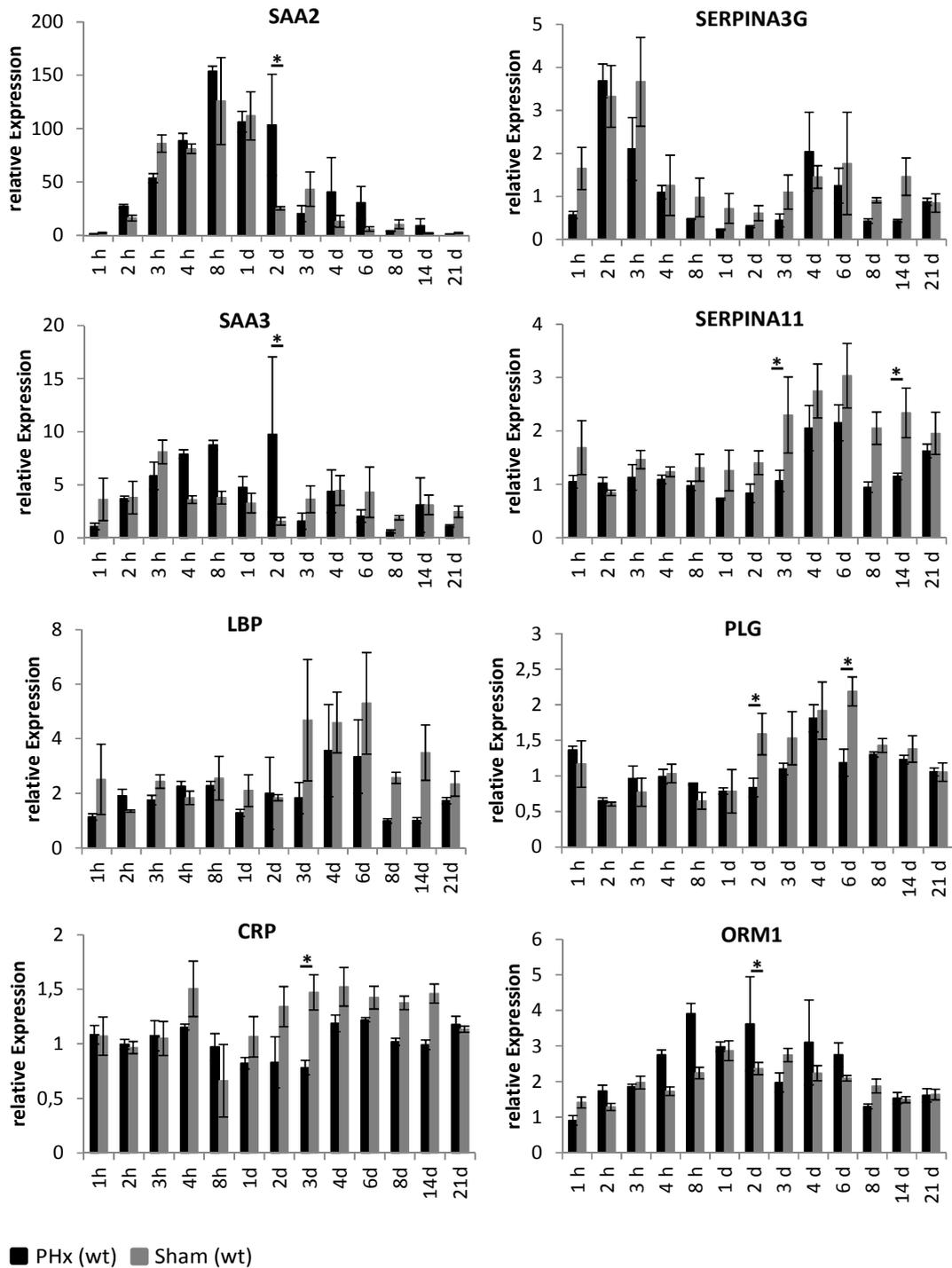


Abb. 9: Einfluss von PHx- bzw. Sham-Operationen auf die Genexpression diverser APP. PHx- bzw. Sham-Operationen und Organentnahmen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt und die RNA aus den Lebern wie unter 2.2.9 beschrieben isoliert. Als Kontrolle diente die RNA unbehandelte Tiere. Die Messung der RNA-Expression von SAP, FG- α , C3, FG- β , C4b, FG- γ , Haptoglobin, Hämopexin, α 2M, Haptoglobin, SAA2, SERPINA3G, SAA3, SERPINA11, LBP, PLG, CRP und ORM1 erfolgte mittels Fluidigm-Chip-Technologie. Zur Auswertung wurde die Δ Ct-Methode mit GAPDH als Referenz verwendet. Die arithmetischen Mittelwerte wurden auf die Kontrolle normalisiert (Kontrolle = 1). Gezeigt werden die normalisierten Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Messungen je Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$)

zwischen den Gruppen wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

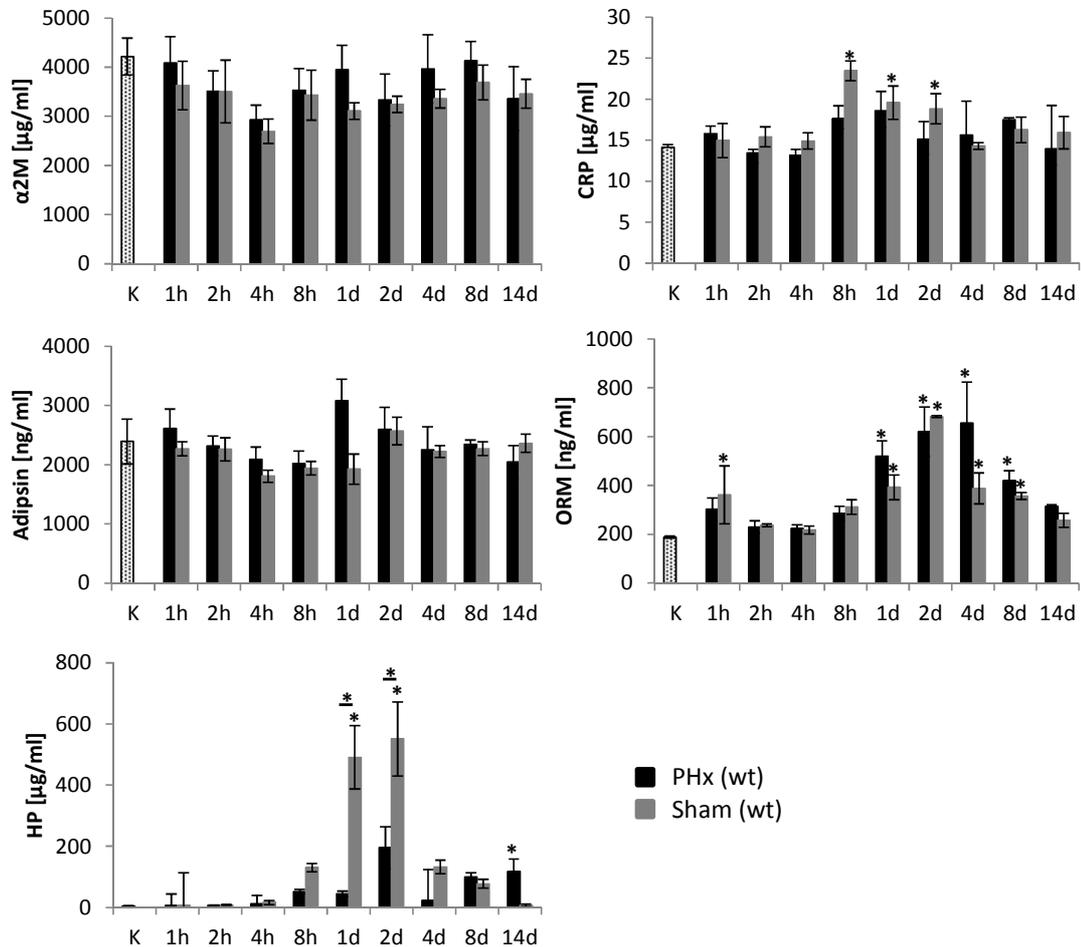


Abb. 10: Einfluss von PHx- bzw. Sham-Operation auf die Serumkonzentration von $\alpha 2M$, CRP, Adipsin, ORM und HP. PHx- bzw. Sham-Operationen und Serumbewinnung wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle diente das Serum unbehandelter Tiere. Die Mäuse wurden im Zeitraum von einer Stunde bis zu 8 Tagen nach OP getötet. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Multiplex-Technologie wie unter 2.2.12.1 beschrieben bestimmt. Gezeigt werden die jeweiligen arithmetischen Mittel mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Messungen je Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (K) und untereinander wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

3.2 Relevanz der MK2 für die Leberregeneration

Wie einleitend beschrieben stellt MK2 einen wichtigen Mediator in der Signalkaskade des p38-Signalwegs dar und ist für die Regulation einer Reihe von Mediatoren und Zytokinrezeptoren essentiell. Zu den Mediatoren gehört unter anderem das Zytokin IL-6, welches eine zentrale Rolle in der Priming-Phase der Leberregeneration sowie der Generierung der Akut-Phase-Antwort spielt. Für weiterführende Analysen zum Einfluss der MK2 auf die Leberregeneration wurde vorbereitend die Rekonstitution des Lebergewichts sowie der Einfluss des *Knockouts* auf die Zellproliferation nach PHx untersucht. Dazu wurden Sham- und PHx-operierte C57BL/6J *mk2^{-/-}* und wt Mäuse für die Zeitpunkte 2 und 6 Tage generiert. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Tiere. Im Vergleich zu den wt Mäusen war der Gewichtsverlust von *mk2^{-/-}* Mäusen geringer (Abb. 11A) und die Zunahme des Körpergewichts stieg über einen Zeitraum von sechs Tagen im Vergleich zu den wt Mäusen nicht kontinuierlich an. Betrachtet man das Lebergewicht (Abb. 11B), so bestand ein signifikanter Unterschied im Ausgangsgewicht der Lebern zwischen den Kontrolltieren beider Gruppen. Nach 2 bzw. 6 Tagen war dies jedoch nicht mehr zu beobachten.

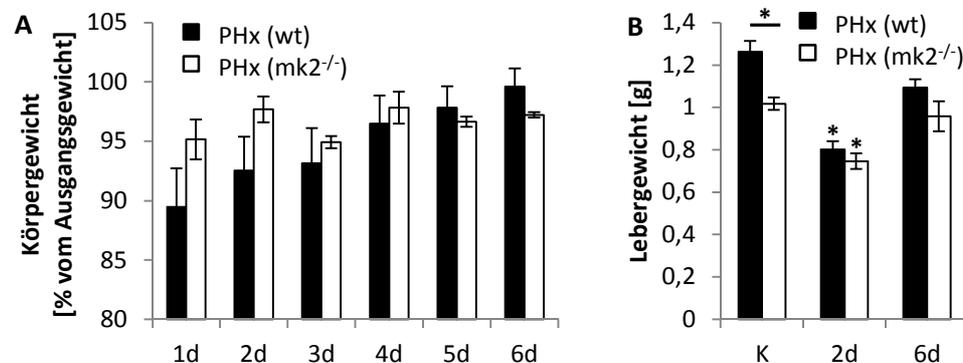


Abb. 11: Rekonstitution des Körper- bzw. Lebergewichts nach Resektion bei wt bzw. *mk2*-defizienten Mäusen. PHx- bzw. Sham-Operationen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Vor und im Zeitraum von bis zu 6 Tagen nach OP wurde das Körpergewicht der Tiere bestimmt und das prozentuale Körpergewicht nach Organentnahme vom Ausgangsgewicht berechnet. An den jeweiligen Versuchenden wurden die Mäuse getötet und die Lebern entnommen. Das Gewicht der Lebern wurde ermittelt. Dargestellt sind die jeweiligen arithmetischen Mittel mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Messungen je Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (K) wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung abgebildet (*).

Ein deutlicher Unterschied konnte in der Serumanalyse der Aktivität von AP im Serum von *mk2*-defizienten Mäusen 2 Tage nach PHx- bzw. Sham-Operation gegenüber der von *wt* Mäusen detektiert werden. Die Aktivität der AP in *mk2*^{-/-} Mäusen war signifikant erniedrigt (Abb. 12), wobei die Ursache hierfür noch unklar ist.

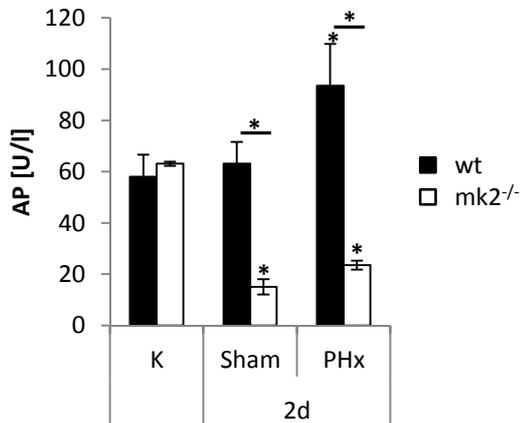


Abb. 12: Einfluss der MK2 auf die Aktivität von AP nach PHx- bzw. Sham-Operation. PHx- bzw. Sham-Operationen, Serumgewinnung und Bestimmung der AP wurden wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle (K) dienten unbehandelte Mäuse. 2 Tage nach OP wurden die Tiere getötet. Gezeigt werden die jeweiligen arithmetischen Mittel mit Standardfehler von mindestens 3 unabhängigen Messungen je Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (K) bzw. zwischen *wt* und *mk2*^{-/-} wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

Da das Fehlen von MK2-regulierten Komponenten in der Signalkaskade zu Störungen im Verlauf der Regeneration führen könnte, wurde ein möglicher Einfluss auf die Zellproliferation nach PHx mittels *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) Detektion im Western Blot untersucht (Abb. 13A). Im Ergebnis wurde deutlich, dass besonders 2 Tage nach PHx in *mk2*^{-/-} Mäusen weniger PCNA als in den entsprechenden *wt* Tieren nachweisbar war. In Abb. 13B sind die proliferierenden Zellkerne in Leberschnitten nach PHx dargestellt. Das Antigen Ki67, welches für die zelluläre Proliferation notwendig ist, war nach 2 Tagen in *wt* Mäusen deutlich häufiger vertreten als in *mk2*^{-/-} Tieren. Die statistische Auswertung der Immunhistochemie (Abb. 13C) ergab eine signifikant verminderte Anzahl proliferierender Zellkerne bei *mk2*^{-/-} Mäusen 2 Tage nach PHx, was auf eine verminderte Proliferationsrate hindeutet (unveröffentlichte Daten, Ehling, Bode *et al.*).

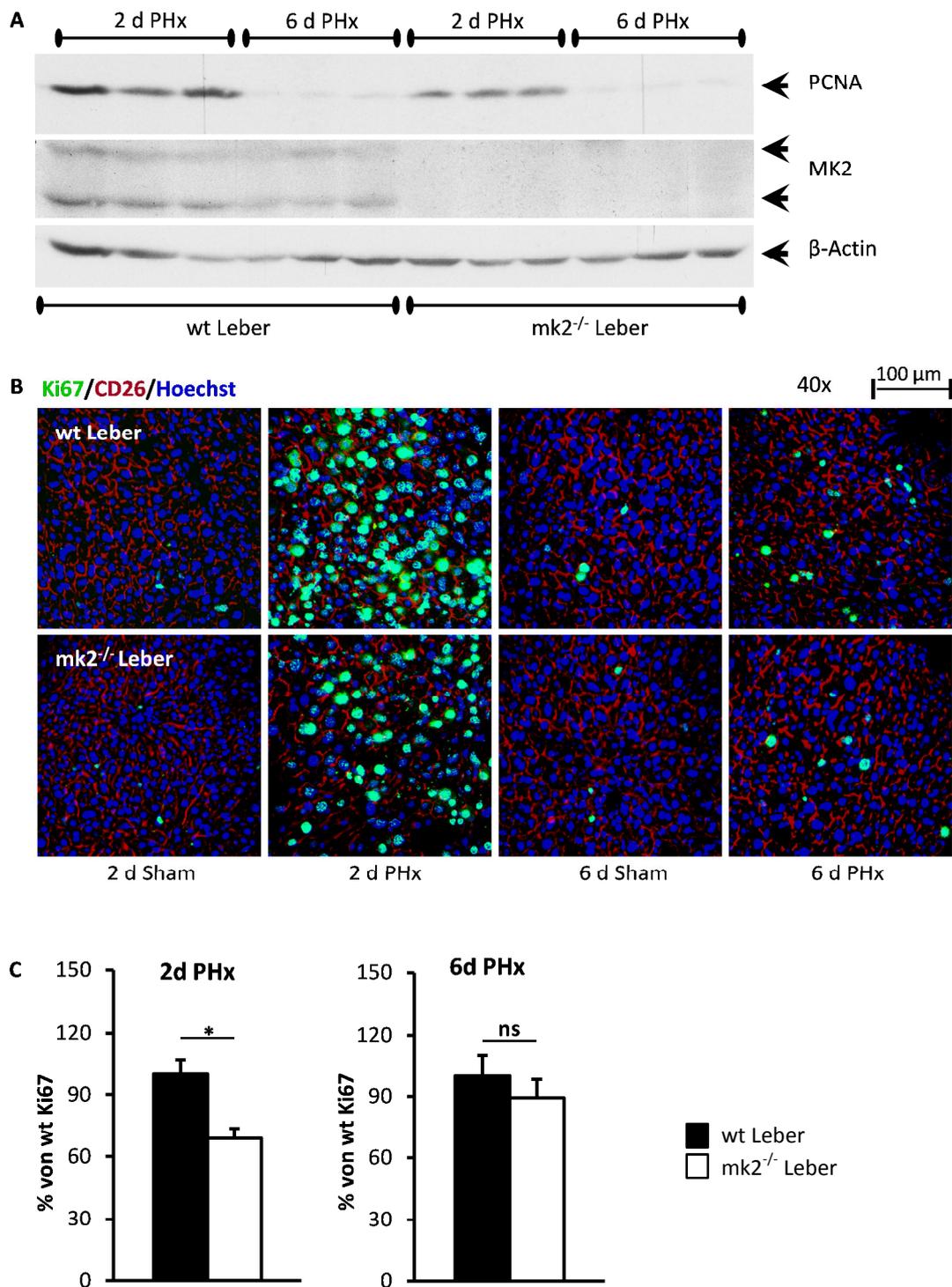


Abb. 13: MK2-Defizienz führt zu einer verminderten Zellproliferation 2 Tage nach PHx. PHx- bzw. Sham-Operationen und Organentnahmen wurden wie unter 2.2.1 und die immunhistochemische Färbung wie unter 2.2.2 beschrieben durchgeführt. 2 bzw. 6 Tage nach PHx bzw. Sham-Operation wurden die Tiere getötet. (A) Vergleichende Western Blot Analyse der PCNA-Expression 2 bzw. 6 Tage nach PHx zwischen wt und mk2^{-/-} Mäusen. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin. (B) Immunhistochemie von Leberschnitten. Die Zelloberflächen wurden mit Antikörpern gegen CD26, die Zellkerne mit Höchst und die proliferierenden Zellkerne mit Antikörpern gegen Ki67 visualisiert. Die Aufnahmen erfolgten mittels Laser Scanning Mikroskop. (C) Statistische Auswertung (automatische densitometrische Fluoreszenzanalyse nach Domanova

et al. 2011) der proliferierenden Zellkerne nach PHx von je 12 Aufnahmen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mittels zweiseitigem Student t-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

3.3 Ko-Kultur

3.3.1 Etablierung eines Ko-Kultursystems

Während der Leberregeneration spielen sich multifaktorielle Prozesse ab, an denen wie im ersten Teil der Arbeit demonstriert Zytokine, Wachstumsfaktoren und APP beteiligt sind. Die APP werden dabei durch Hepatozyten sezerniert, während die in der Leber vorhandenen Immunzellen (z.B. Kupffer-Zellen) nach PHx vor allem Zytokinen freisetzen. Um die Komplexität der hier ablaufenden Prozesse verstehen zu können, ist die Betrachtung der interzellulären Kommunikation zwischen Hepatozyten und Makrophagen von großem Interesse. Um eben dies zu untersuchen wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ein *in vitro* Modell etabliert, mit dessen Hilfe interzelluläre Aktionen analysiert wurden.

Die Etablierung des Ko-Kultur Test-Systems ermöglichte die Untersuchung des Einflusses von Hepatozyten auf Makrophagen und umgekehrt. Hierfür wurden primäre Hepatozyten aus der Maus isoliert. Nach der Hepatozyten-Präparation wurde die gewonnene Zellsuspension mittels CD11b-Beads und der MACS-Technologie gereinigt, um CD11b positive Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, zu entfernen. In Abb. 14 wird deutlich, dass die Depletion von CD11b-positiven Zellen zu einer verminderten RNA-Expression von IL-6 und IL-10 nach LPS-Stimulation führt (unveröffentlichte Daten Franek, Bode *et al.*).

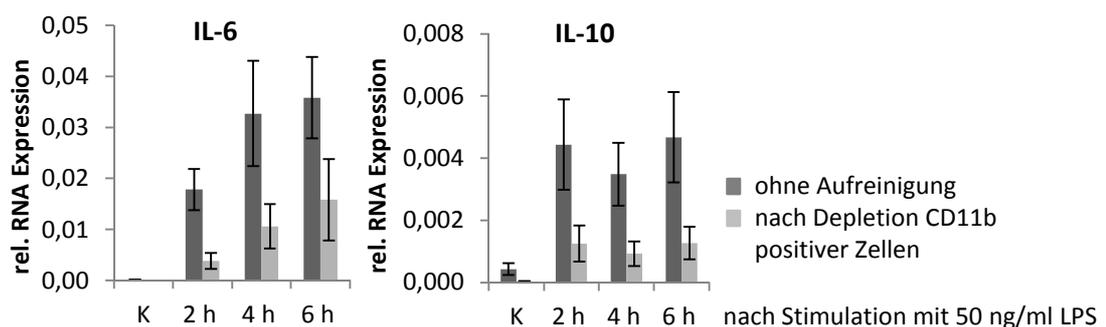


Abb. 14: Die Depletion CD11b-positiver Zellen führt zu einem deutlichen Abfall der LPS-induzierten Expression von IL-6 und IL-10. Die Isolierung der primären Hepatozyten und die anschließende Depletierung CD11b-positiver Zellen erfolgten wie unter 2.2.3 und 2.2.4.1 beschrieben. Die CD11b depletierte Zellsuspension und Zellen ohne diese Aufreinigung wurden auf kollagenbeschichteten Zellkulturplatten (2 Millionen Hepatozyten pro 6-Loch-Platte) 24 Stunden kultiviert und anschließend mit 50 ng/ml LPS stimuliert. Nach 2, 4 bzw. 6 Stunden wurde die RNA aus den Zellen isoliert. Als Kontrollen dienten jeweils Zellen ohne LPS-Behandlung. Die Messung der RNA-Expression erfolgte mittels quantitativer PCR. Für die Auswertung wurde die

Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe.

Da Hepatozyten in der Leber in eine dreidimensionale Struktur eingebunden sind und bei Kultivierung auf einer einfachen Schicht Kollagen (*Monolayer*) bereits nach wenigen Tagen ihre Differenzierung verlieren, wurde hier die sogenannte Sandwich-Kultur verwendet. Dabei erfolgte die Einschließung der Hepatozyten zwischen zwei dickeren Schichten Kollagen, wodurch Morphologie und Funktion der Zellen stabilisiert wurden. Hepatozyten in beiden Kultivierungsformen sind in Abb. 15 über einen Zeitraum von 5 Tagen dargestellt, wobei Tag 1 dem Tag der Zellpräparation entspricht.

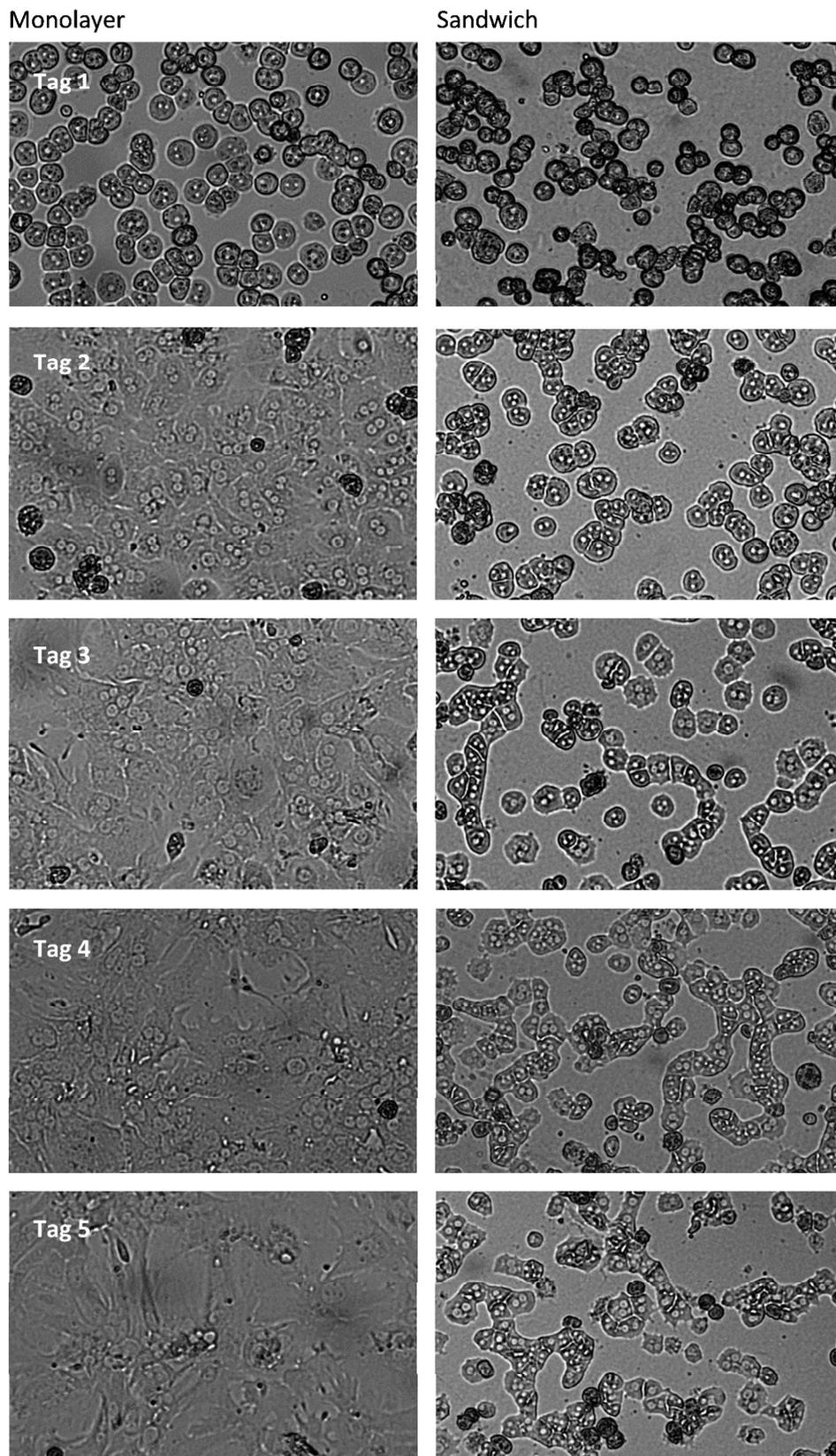


Abb. 15: Die Sandwichkultivierung von primären Hepatozyten stabilisiert die Morphologie der Zellen. Primäre Hepatozyten wurden wie unter 2.2.3 beschrieben isoliert und vergleichend auf mit Kollagen beschichteten Platten (*Monolayer*) und zwischen zwei dickeren Kollagenschichten (Sandwich) (vgl. 2.2.5) kultiviert. Die Aufnahmen erfolgten über einen Zeitraum von 5 Tagen

mittels Cell-Observer bei 5facher Vergrößerung, wobei Tag 1 dem Tag der Zellpräparation entspricht.

Da es sich bei der größeren Population von KCs vermutlich um aus dem Knochenmark stammende Zellen handelt (Klein *et al.* 2007) und diese an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, wurden für das Ko-Kultursystem BMDMs anstelle von primären KCs verwendet. Zusätzliche Vorteile lagen hier bei einer deutlich höheren Zellausbeute sowie der Umgehung der Zellaktivierung (*damage response*) durch den Leberverdau. Die BMDMs wurden aus isolierten Knochenmarkszellen unter Zugabe des *murinen* Wachstumsfaktors M-CSF über einen Zeitraum von 7 Tagen generiert. Als Kontrolle für die Differenzierung zu Makrophagen dienten die Monozyten- bzw. Makrophagenmarker CD14, F4-80, CD68 sowie CD11b (Holness und Simmons 1993, Schmid *et al.* 2012, Tobias und Ulevitch 1993), deren Expression mittels FACS-Analyse überprüft wurde. Nach 7 Tagen Differenzierung exprimierten mehr als 98 % der Zellen jeden dieser Marker (vgl. Abb. 16).

Die Kultivierung der BMDMs nach der Differenzierung erfolgte in sogenannten *Transwells*. Diese besaßen eine Wachstumsfläche von 4,2 cm² bestehend aus einer Membran mit Poren der Größe 0,4 µm, so dass die Zellen nicht durch die Membran migrieren konnten, aber ein Austausch niedermolekularer Substanzen mit dem das *Transwell* umgebenden Milieu möglich war. Um in etwa das Verhältnis HC zu KC in der Leber zu simulieren (vgl. Einleitung) wurden 0,1 Millionen BMDMs in den *Transwells* und 0,8 Millionen HCs im *Well* kultiviert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Zelldichte von BMDMs im *Transwell* auf die Expression verschiedener Zytokine untersucht. Dazu wurden 0,1, 0,25 und 0,5 Millionen BMDMs je *Transwell* einen Tag kultiviert und anschließend mit LPS stimuliert. Die RNA-Expressionsanalyse verschiedener Zytokine (vgl. Abb. 17) implizierte, dass bei 0,25 und 0,5 Millionen BMDMs pro *Transwell* die Zytokinexpression infolge zu hoher Zelldichten und damit möglicherweise veränderter *auto-* und *parakriner* Interaktionen beeinflusst wurde.

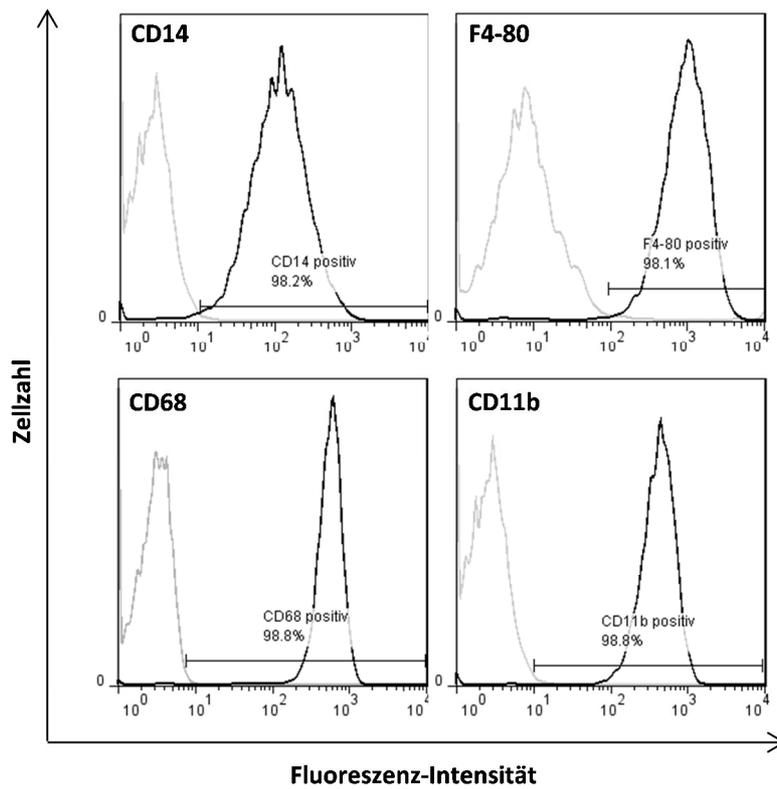


Abb. 16: Die Differenzierung von Knochenmarkszellen mit M-CSF führt zur Generierung von Zellen mit typischen Makrophagenmarkern. Wie unter 2.2.6 beschrieben wurden Knochenmarkszellen isoliert und über einen Zeitraum von 7 Tagen unter Zusatz von *murinem* M-CSF zu BMDMs differenziert. Mittels durchflusszytometrischer Analyse (vgl. 2.2.8) wurde die Expression von CD14, F4-80, CD68 und CD11b (schwarz) im Vergleich zur jeweiligen Isotypkontrolle (grau) untersucht. Der prozentuale Anteil der Zellen, die den entsprechenden Marker exprimieren, ist in der Abbildung dargestellt.

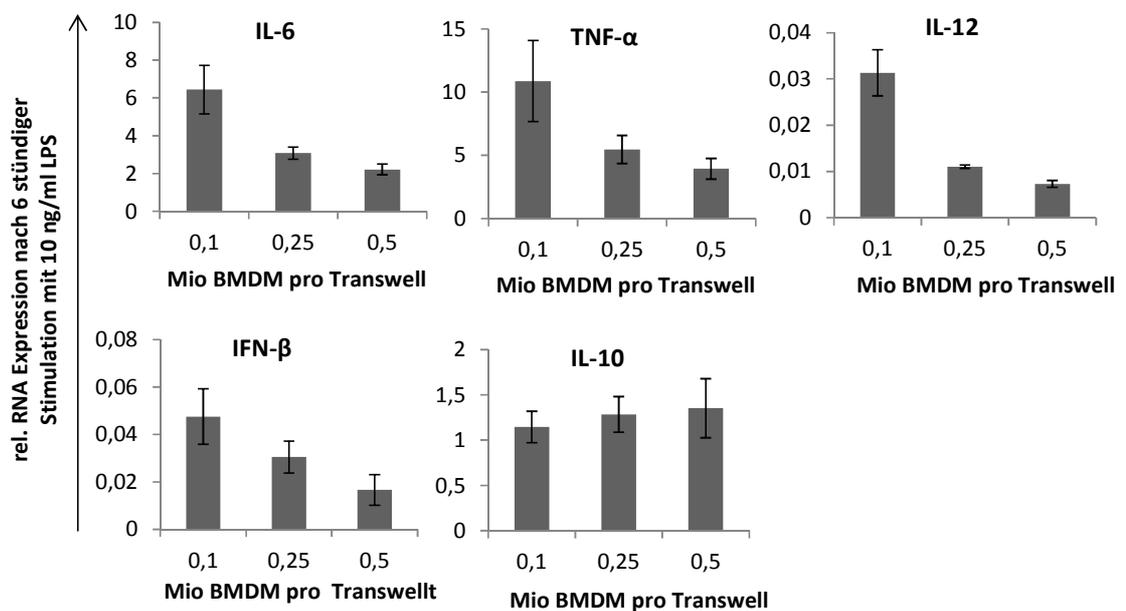


Abb. 17: Erhöhte Zelldichten von BMDMs führen zu verminderten Expression von IL-6, TNF- α , IL-12 und IFN- β nach Stimulation mit LPS. BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Pro *Transwell* wurden 0,1, 0,25 oder 0,5 Millionen BMDMs für 24 Stunden kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach 6 Stunden wurde die RNA isoliert und die RNA-Expression mittels quantitativer PCR für IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- β und IL-10 ermittelt. Für die Auswertung wurde die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe.

3.3.2 Einfluss von Hepatozyten auf die Differenzierung von BMDMs

Für die Überprüfung des Einflusses von Hepatozyten auf die Differenzierung der BMDMs wurden diese mit primären Hepatozyten kokultiviert. Eingesetzt wurden dabei 0,1 Millionen BMDMs pro *Transwell* und 0,8 Millionen Hepatozyten je *Well*, was in etwa dem Verhältnis Hepatozyten zu Makrophagen in der Leber entspricht. Die Verwendung von *Transwells* erlaubte beide Zelltypen gemeinsam zu kultivieren und durch die Poren über Mediatoren miteinander zu kommunizieren. Nach Versuchsende konnten BMDMs und HCs getrennt voneinander analysiert werden.

Mittels FACS-Analyse wurden die BMDMs nach Ko-Kultivierung über einen Zeitraum von 4 Tagen auf die Expression von Makrophagen-Differenzierungsmarkern überprüft. Die Fluoreszenz-Intensität typischer Marker für Makrophagen (CD14, F4-80 und CD68) wurde nicht durch die Anwesenheit von Hepatozyten beeinflusst. CD11b, CD163, CD206, Gr1, CD11c, MHCII und TLR4 ließen spätestens nach 4 Tagen im Vergleich zu monokultivierten BMDMs einen deutlichen Anstieg in der Fluoreszenz-Intensität erkennen (vgl. Abb. 18).

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen in den BMDMs durch lösliche Faktoren induziert wurden, welche Hepatozyten unabhängig von den BMDMs sezernieren, wurde der Überstand von Hepatozyten nach 2 Tagen Inkubation gesammelt. Der Überstand wurde auf BMDMs gegeben und diese für 1, 2, 3 oder 4 Tage kultiviert. Im Vergleich zu BMDMs, die direkt mit Hepatozyten kultiviert wurden, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und BMDMs mit durch HCs konditioniertem Medium festgestellt werden (vgl. Abb. 19). Für die beobachtete Differenzierung der BMDMs ist folglich die interzelluläre Kommunikation beider Zelltypen essentiell.

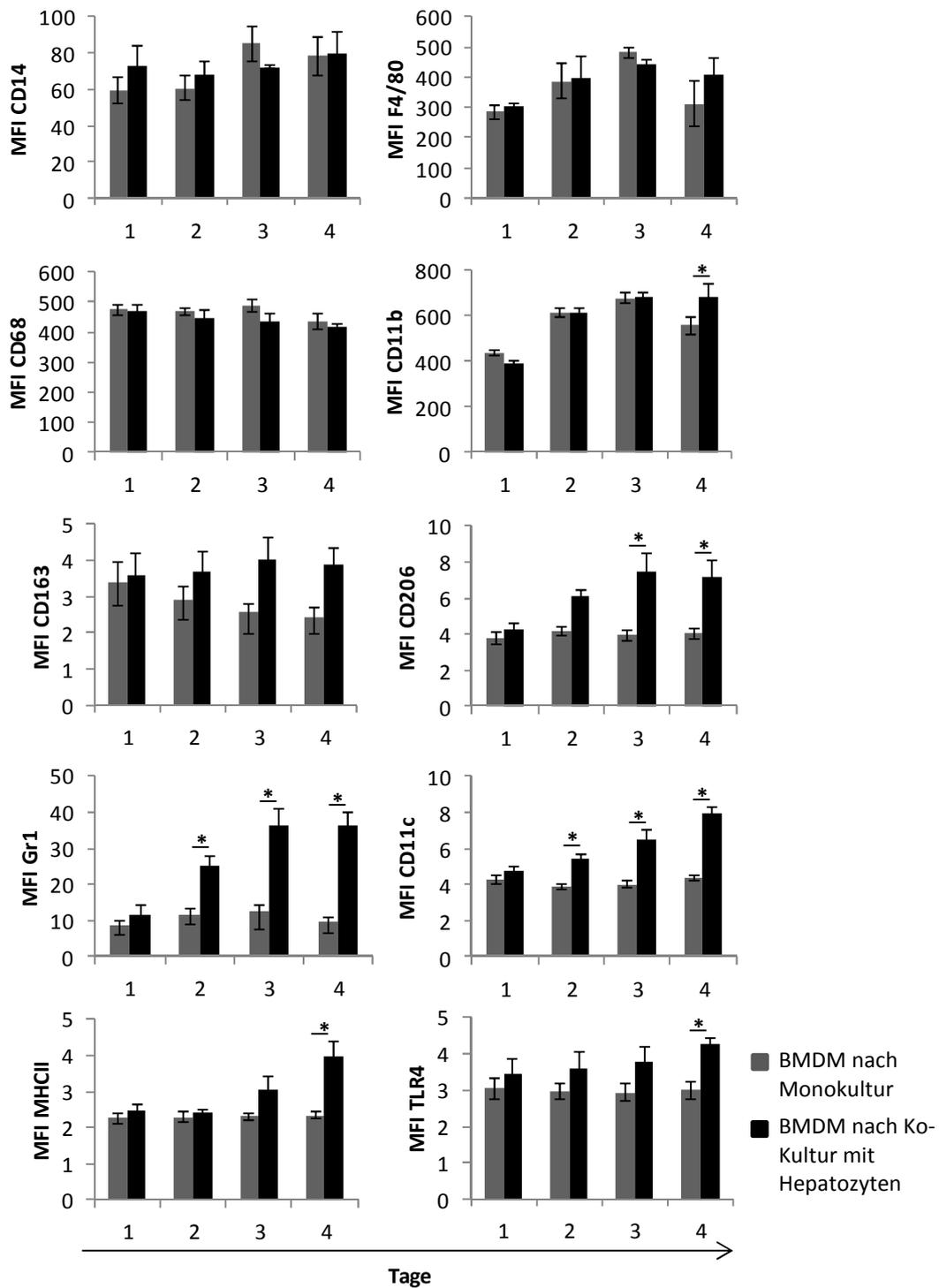


Abb. 18: Durch direkte Ko-Kultivierung induzieren Hepatozyten einen M2-ähnlichen Phänotyp in BMDMs. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben für bis zu 4 Tage kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden BMDMs ohne Hepatozyten kultiviert. Die Messung der mittleren Fluoreszenz-Intensität erfolgte mittels FACS-Analyse wie unter 2.2.8 beschrieben. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe für CD14, F4-80, CD68 und CD11b sowie je 6 unabhängigen Messungen pro Gruppe für CD163, CD206, Gr1, CD11c, MHCII und TLR4.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test zwischen den Gruppen ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

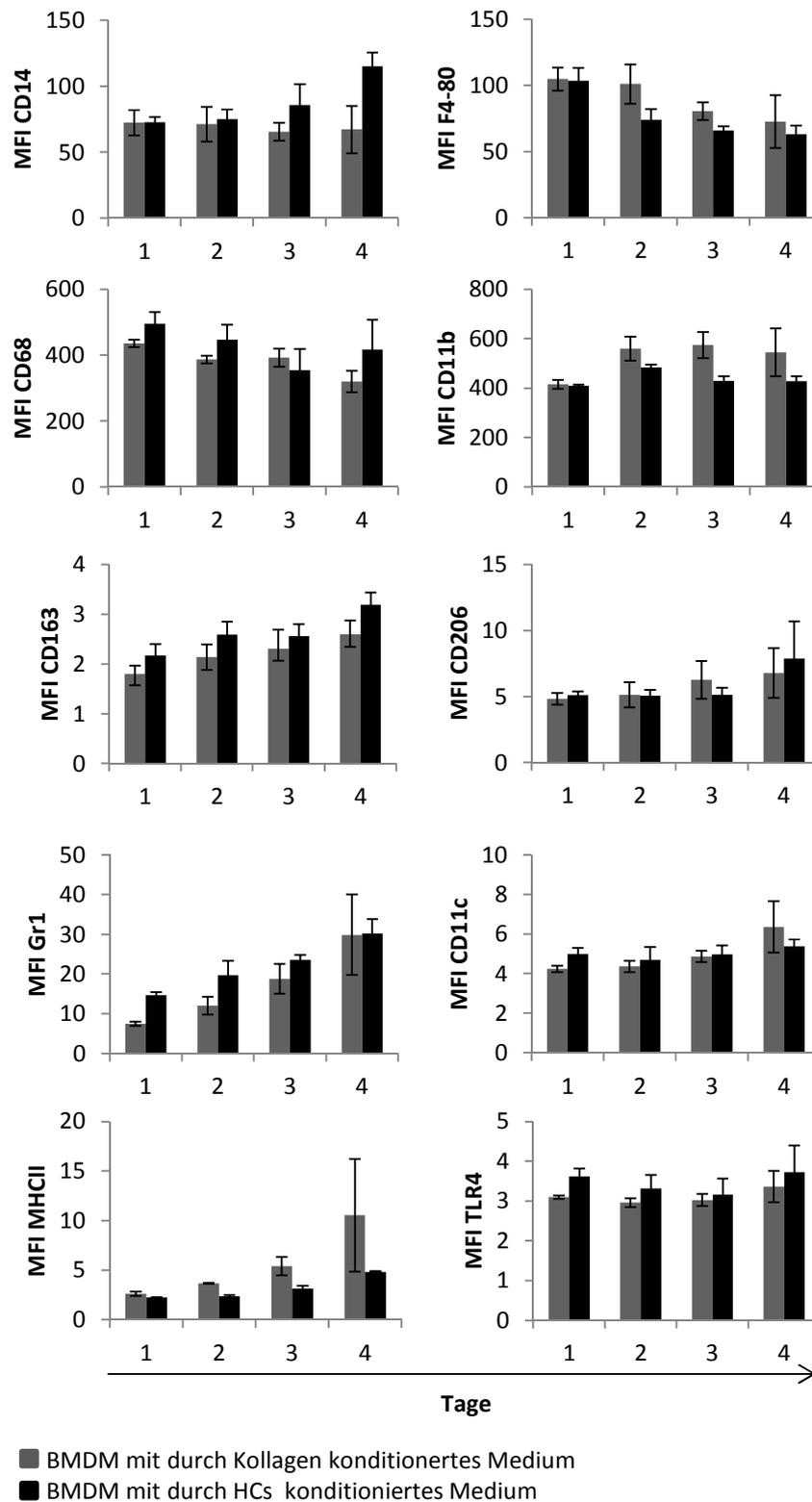


Abb. 19: Der Transfer von durch Hepatozyten konditioniertem Medium führt nicht zur Ausbildung des gleichen Phänotyps von BMDMs wie die direkte Ko-Kultivierung. Primäre Hepatozyten wurden wie unter 2.2.5 beschrieben im Kollagen-Sandwich kultiviert und der Überstand nach 48 Stunden entnommen. BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert und über einen Zeitraum von 1, 2, 3 oder 4 Tagen mit dem konditionierten Medium der Hepatozyten bzw. mit Medium, welches 2 Tage auf kollagenisierten Platten inkubiert wurde, kultiviert. Die Bestimmung der mittleren Fluoreszenz-Intensität erfolgte mittels FACS-Analyse. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3-4 unabhängigen Messungen pro Gruppe.

3.3.3 Vergleich Kupffer-Zellen und BMDMs nach Ko-Kultur

Durch die Ko-Kultivierung wurde ein M2-ähnlicher Phänotyp in den BMDMs induziert (CD163 \uparrow , CD206 \uparrow). Ob dieser in wesentlichen Punkten dem der Kupffer-Zellen entspricht, wurde mittels FACS-Analyse überprüft. Nach der Hepatozyten-Präparation wurden die CD11b-positiven Zellen aus der Zellsuspension isoliert. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den Zellen um Makrophagen handelte, wurden nur F4-80 positive Zellen untersucht. Etwa 50 % der so isolierten Zellen konnten als Kupffer-Zellen (F4-80 positiv) identifiziert werden (Abb. 20B). Die F4-80 positiven BMDMs und Kupffer-Zellen wurden auf die Expression von Makrophagen-Differenzierungsmarkern untersucht. Im Ergebnis waren signifikante Unterschiede zwischen BMDMs nach 4 Tagen Ko-Kultur und primären Kupffer-Zellen nur für CD14 und MHCII nachweisbar (Abb. 20C). Die Expressionen von CD11c, CD163, CD206 und TLR4 variierten nur geringfügig.

Ein selektiver Marker für regulatorische Makrophagen ist der Scavenger-Rezeptor CD163, der neben der Entfernung von Hämoglobin aus dem Blut an der Toleranzinduktion und Gewebsregeneration beteiligt ist. Der Mannose-Rezeptor CD206 diente als Marker für gewebständige (sessile) Makrophagen. Die Expression beider Marker in BMDMs stieg infolge der Ko-Kultivierung mit primären Hepatozyten im Vergleich zu monokultivierten BMDMs (Abb. 18). Nach 4 Tagen waren keine signifikanten Unterschiede zu den primären Kupffer-Zellen für CD163 und CD206 detektierbar (Abb. 20C). Dass diese Marker auch in der Leber von Kupffer-Zellen exprimiert werden, konnte zusätzlich durch die immunhistochemische Färbung von Leberschnitten mit entsprechenden Antikörpern dargestellt werden. Die Ko-Lokalisation von CD163 bzw. CD206 mit F4-80 ist in Abb. 20D-E deutlich erkennbar.

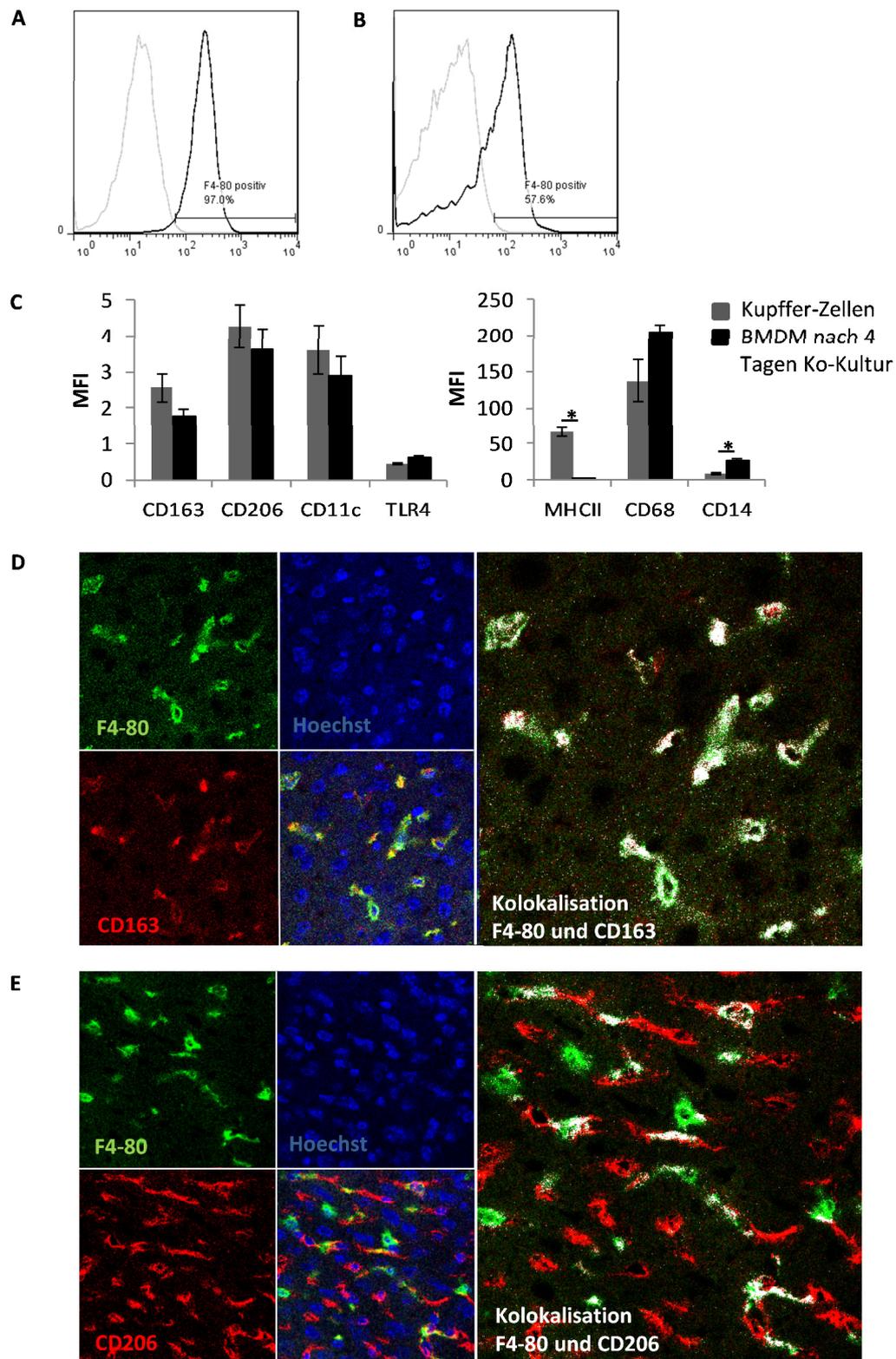


Abb. 20: Der durch die Ko-Kultivierung in BMDMs erzeugte Phänotyp entspricht in wesentlichen Aspekten dem von Kupffer-Zellen. (A) F4-80-positive BMDMs nach 7 Tagen Differenzierung und 4 Tagen Ko-Kultivierung mit primären Hepatozyten (vgl. 2.2.6 und 2.2.7) und (B) F4-80-positive Zellen nach Isolierung von CD11b-positiven Zellen aus der Leber (vgl. 2.2.4.2). Die F4-80 positiven Zellen (schwarz) wurden mittels FACS-Analyse im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau) ermittelt. (C) Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von CD163, CD206, CD11c, TLR4, MHCII, CD68 und CD14 der F4-80-positiven Zellen nach 4 Tagen Ko-Kultur im

Vergleich zu primären Kupffer-Zellen. Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte mittels Durchflusszytometrie (vgl. 2.2.8). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 6 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mittels zweiseitigem Student t-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*). (D-E) Immunhistochemische Färbung der Ko-Lokalisation von CD163 und F4-80 bzw. CD206 und F4-80 in Leberschnitten (vgl. 2.2.2). Die Aufnahmen erfolgten mit einem Laser Scanning Mikroskop bei 40facher Vergrößerung.

3.3.4 Einfluss der Ko-Kultur auf die LPS-induzierte Zytokinexpression

Neben der veränderten Expression der Differenzierungsmarker hatte die Ko-Kultivierung mit primären Hepatozyten auch einen deutlichen Einfluss auf die Funktionalität der BMDMs. Infolge der Stimulation mit LPS reagierten kokultivierte im Vergleich zu monokultivierten BMDMs mit einer erhöhten RNA-Expression der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IFN- β , während die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-12 bereits nach 12 Stunden deutlich unter das Niveau der monokultivierten BMDMs sank. Die Expression von IL-1 β wies keine Unterschiede auf (vgl. Abb. 21). Die Expressionen von IL-4, IL-13 und IFN- γ überstiegen nicht die der Kontrollen (-RT) und waren daher nicht auswertbar.

Auch die RNA-Expressionen diverser Chemokine wiesen deutliche Unterschiede auf. Die Expression von CCL2, CCL3 und CCL4 war 6 Stunden nach Stimulation in den kokultivierten BMDMs signifikant erhöht. Dem gegenüber war die Expression von CXCL1 signifikant niedriger als bei monokultivierten BMDMs. In der Expression von CXCL2 und 3 waren keine signifikanten Unterschiede messbar (vgl. Abb. 22).

Auf Proteinebene spiegelten sich diese Ergebnisse nur bedingt wieder. Wie in Abb. 23 dargestellt kam es zu einer erhöhten Konzentration von IL-10 im Überstand kokultivierter BMDMs und die Konzentration von TNF- α sank nach 24 Stunden unter die der monokultivierten BMDMs. IL-6 hingegen wies zunächst eine höhere Konzentration im Überstand von kokultivierten BMDMs auf, nach 24 Stunden konnte jedoch kein Unterschied zwischen beiden Kultivierungsformen mehr festgestellt werden. Als Kontrolle wurde die Konzentration der Zytokine auch im Überstand von monokultivierten Hepatozyten bestimmt. Hier war kein Anstieg detektierbar.

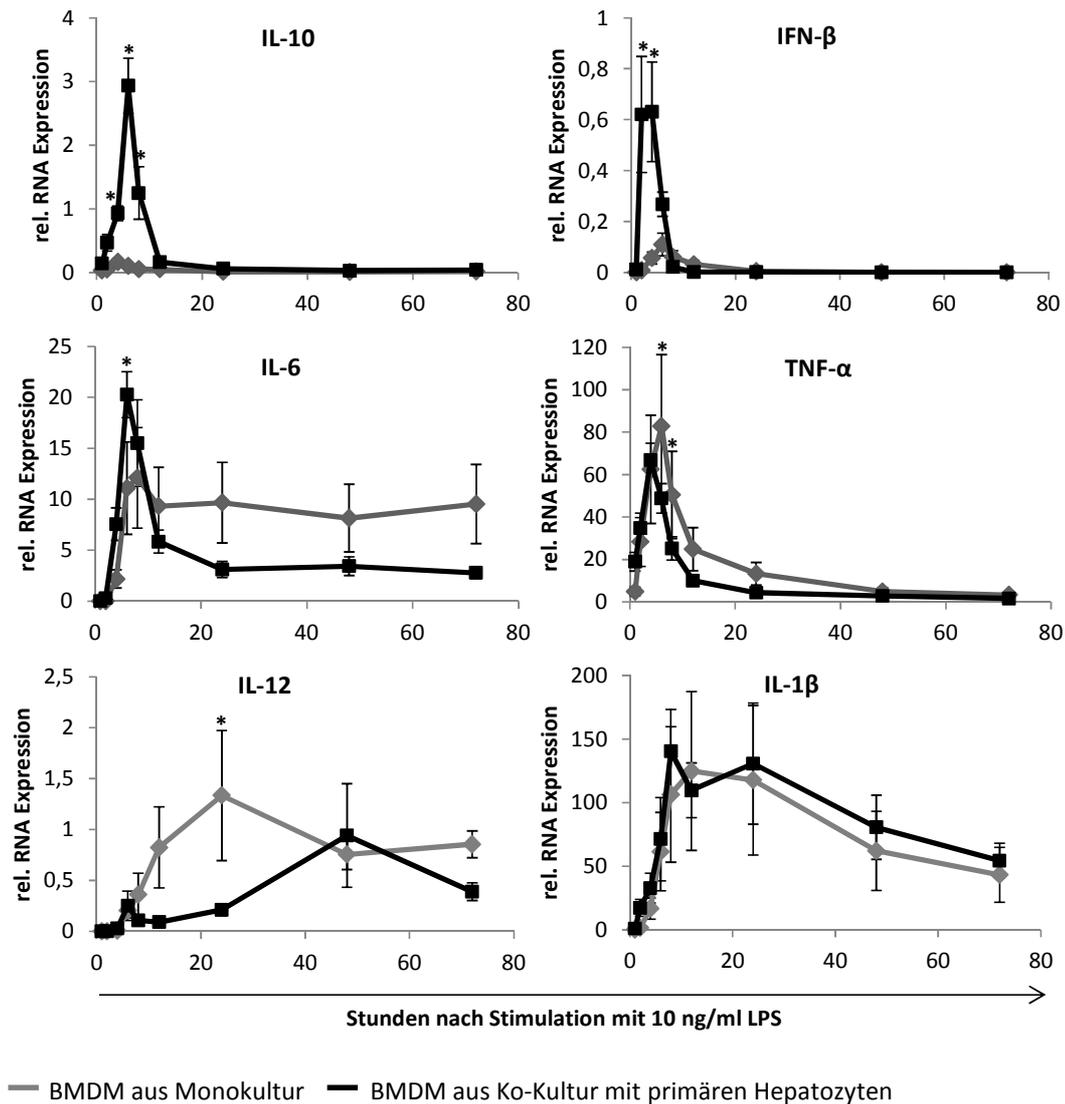


Abb. 21: Mit Hepatozyten kokultivierte BMDMs weisen nach LPS-Stimulation in der Zytokinexpression Merkmale regulatorischer Makrophagen auf. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben 2 Tage kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden BMDMs ohne Hepatozyten kultiviert. Nach 2 Tagen Kultivierung erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Nach 1-72 Stunden wurde die RNA der BMDMs isoliert und die Expression von IL-10, IFN-β, IL-6, TNF-α, IL-12 und IL-1β mittels quantitativer PCR ermittelt. Für die Auswertung wurde die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe für IL-1β und aus 4-6 unabhängigen Messungen pro Gruppe für IL-10, IFN-β, IL-6, TNF-α und IL-12. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test zwischen den Gruppen ermittelt (*).

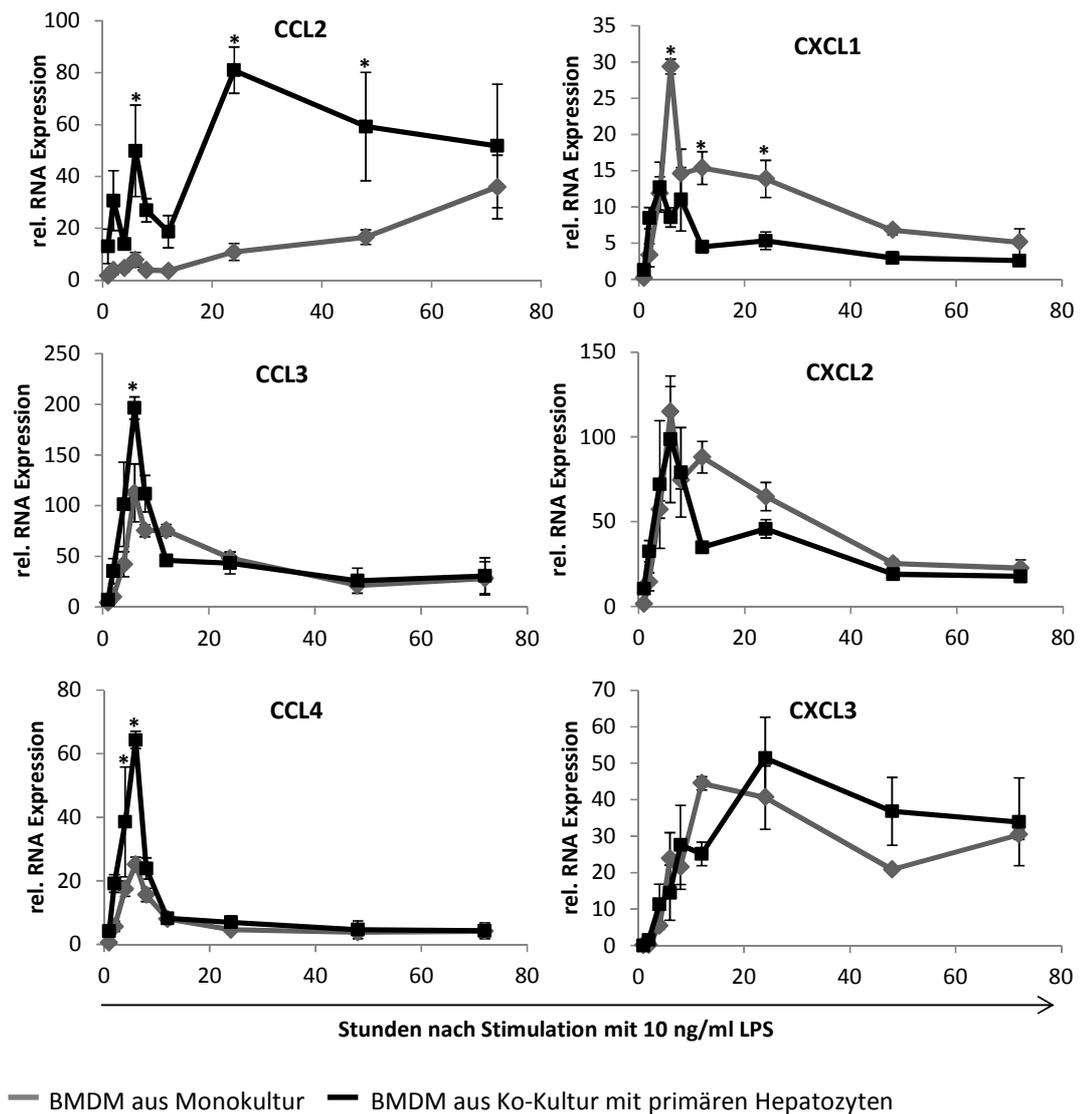


Abb. 22: Die Ko-Kultivierung induziert eine verstärkte Expression der Chemokine CCL2, CCL3 und CCL4 in BMDMs nach LPS-Stimulation. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben 2 Tage kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden BMDMs ohne Hepatozyten kultiviert. Nach 2 Tagen Kultivierung erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Nach 1-72 Stunden wurde die RNA aus den BMDMs isoliert und die Expression von CCL2-4 sowie CXCL1-3 mittels quantitativer PCR ermittelt. Für die Auswertung wurde die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden durch zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test zwischen den Gruppen ermittelt (*).

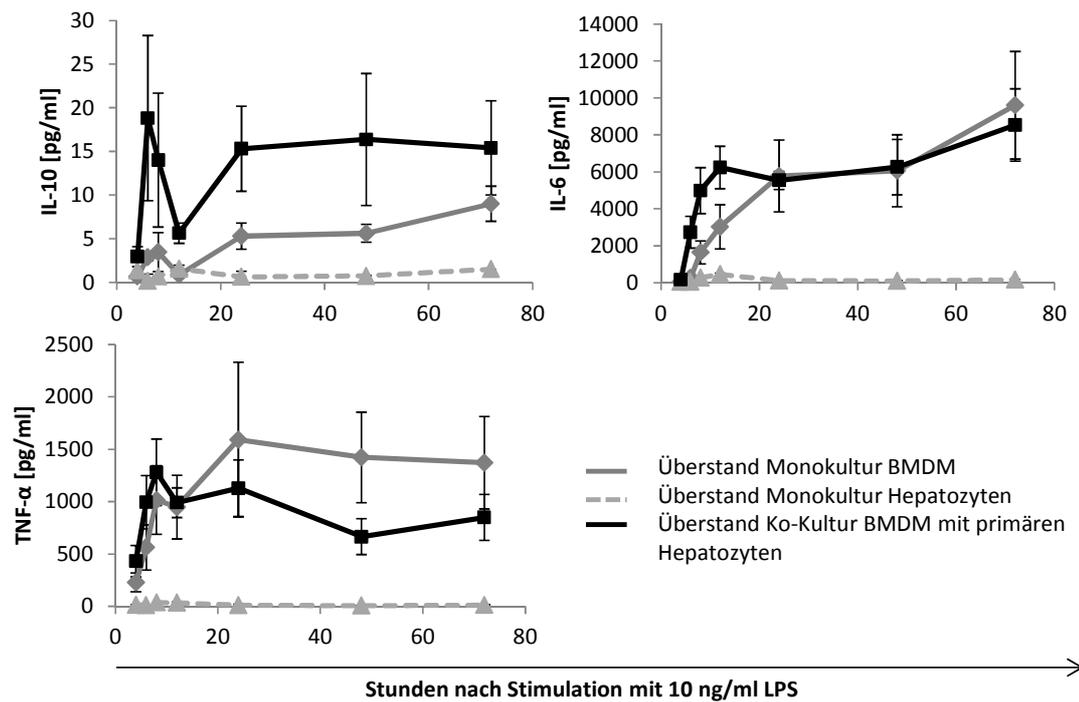


Abb. 23: Die Ko-Kultivierung induziert eine erhöhte IL-10 und verminderte TNF- α Konzentration im Zellüberstand nach LPS-Stimulation. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben 2 Tage kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden BMDMs ohne Hepatozyten bzw. Hepatozyten ohne BMDMs kultiviert. Nach 2 Tagen Kultivierung erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Nach 4, 6, 8, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurde der Überstand entnommen und die Konzentration von IL-10, IL-6 und TNF- α hierin mittels Multiplex-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler von 4 Wiederholungen für die Ko-Kultur und die Monokultur BMDMs. Um zu belegen, dass die Hepatozyten die hier gemessenen Zytokinkonzentrationen nicht direkt beeinflussen, wurde jeweils einmal die Konzentration im Zellüberstand monokultivierter Hepatozyten ermittelt.

3.3.5 Einfluss von konditioniertem Medium auf die Funktionalität von BMDMs

Wie bereits in Abb. 18 und 19 demonstriert, führte der Transfer von konditioniertem Medium nicht zum gleichen Differenzierungsmuster der BMDMs wie die direkte Ko-Kultivierung. Ob der konditionierte Überstand von Hepatozyten einen Einfluss auf die funktionelle Differenzierung hat, wurde auf Ebene der RNA-Expression verschiedener Zytokine untersucht (Abb. 24). Hierzu wurden BMDMs wie bereits beschrieben zwei Tage mit oder ohne Hepatozyten kultiviert, anschließend wurde das Medium entfernt und die *Transwells* in neue Kultivierungsschalen überführt. Diese Schalen waren mit Kollagen ausgekleidet, enthielten jedoch keine Hepatozyten. Zu den BMDMs aus Mono- bzw. Ko-Kultivierung wurde Medium gegeben, welches über einen Zeitraum

von 2 Tagen durch Hepatozyten konditioniert wurde. Im Vergleich hierzu erfolgte die Zugabe von frischem Medium bzw. durch Ko-Kultur konditioniertem Medium. Nach einer Stunde Inkubation erfolgte die Stimulation mit LPS und eine 6 stündige Inkubation. Die detektierte RNA-Expression wurde mit der von BMDMs ohne Medium- und Kulturschalenwechsel verglichen. Für IL-10 konnte eine signifikant erhöhte Expression infolge der Zugabe von durch Hepatozyten konditioniertem Medium detektiert werden. Die Zugabe von durch Ko-Kultur konditioniertem Medium zu zuvor monokultivierten BMDMs führte im Vergleich hierzu zu einer deutlich niedrigeren Expression von IL-10. Zudem ist sowohl für den Zusatz von konditioniertem wie auch frischem Medium ein deutlicher Unterschied in der IL-10 Expression zwischen zuvor mono- bzw. kokultivierten BMDMs zu erkennen.

Für die RNA-Expression von IL-6 und IFN- β spielte die direkte Ko-Kultivierung eine entscheidende Rolle. Der Transfer von konditioniertem Medium bzw. Medium von kokultivierten Zellen bewirkte keine deutliche Veränderung der Expression dieser Zytokine. Durch den Zusatz von frischem Medium sank die Expression der Zytokine gegenüber den Kontrollen signifikant, wies besonders für IL-6 jedoch immer noch einen Unterschied zwischen zuvor mono- bzw. kokultivierten BMDMs auf.

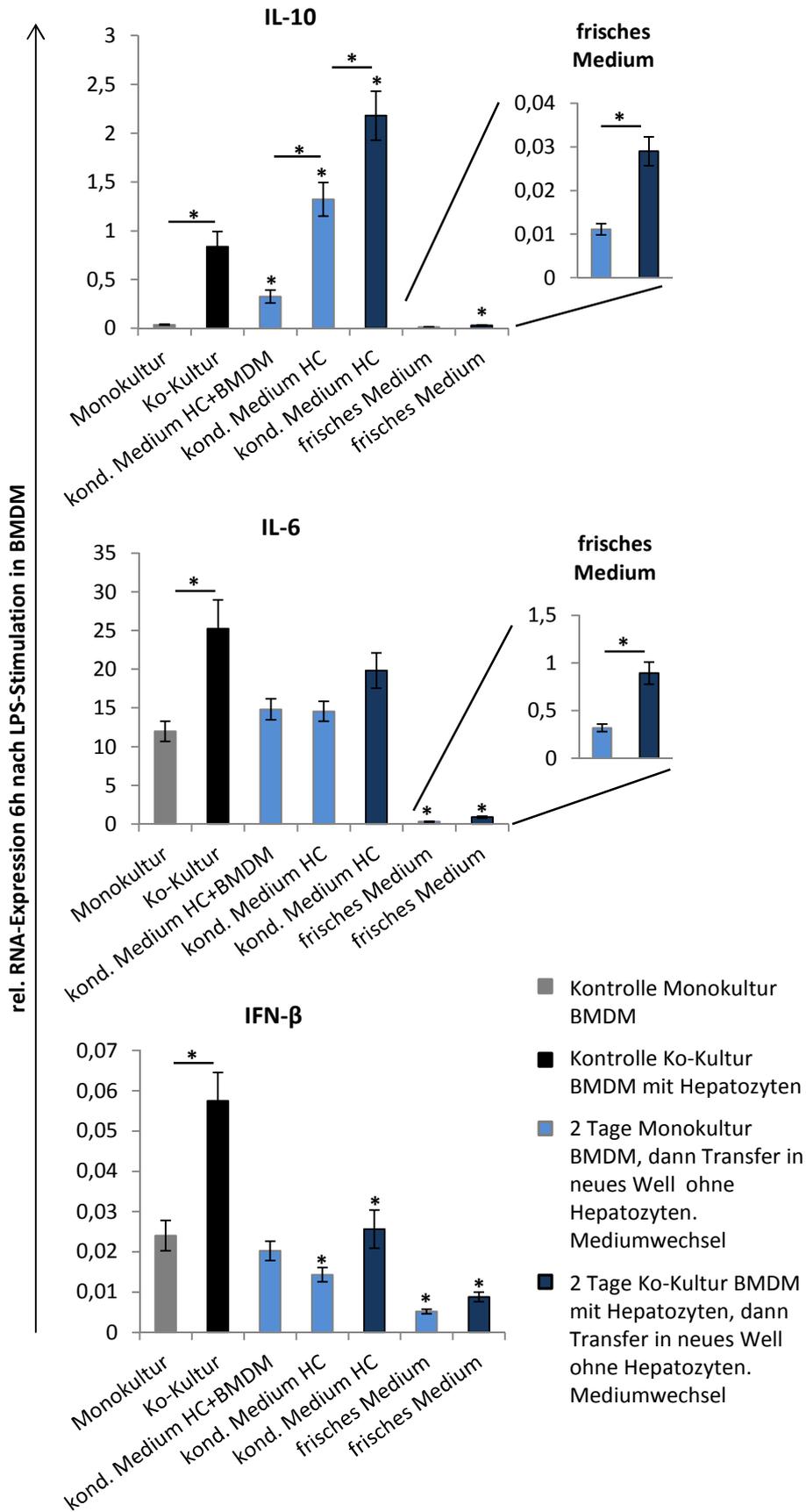


Abb. 24: Der konditionierte Überstand von Hepatozyten verstärkt die RNA-Expression von IL-10 nach LPS-Stimulation in BMDMs. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben 2 Tage kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden BMDMs ohne Hepatozyten bzw. Hepatozyten ohne BMDMs kultiviert. Nach 2 Tagen Kultivierung wurden die hier in blau dargestellten BMDMs mit dem *Transwell* in neue Kulturschalen überführt, die mit einer Kollagenschicht ausgekleidet waren, aber keine Hepatozyten enthielten. Diesen BMDMs wurde entweder durch Ko-Kultur oder monokultivierten Hepatozyten konditioniertes Medium bzw. frisches Medium zugesetzt. Die in grau und schwarz dargestellten BMDMs verblieben nach 2 Tagen Kultivierung in der jeweiligen Zellkulturschale und es erfolgte kein Mediumwechsel. Sie dienten als jeweilige Kontrolle. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert und die RNA nach 6 Stunden Inkubation aus den Zellen isoliert. Die Bestimmung der relativen RNA-Expression erfolgte mittels quantitativer PCR. Für die Auswertung wurde die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 7 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen bzw. zu den jeweiligen Kontrollen wurden mittels zweiseitigem Student t-Test ermittelt (*).

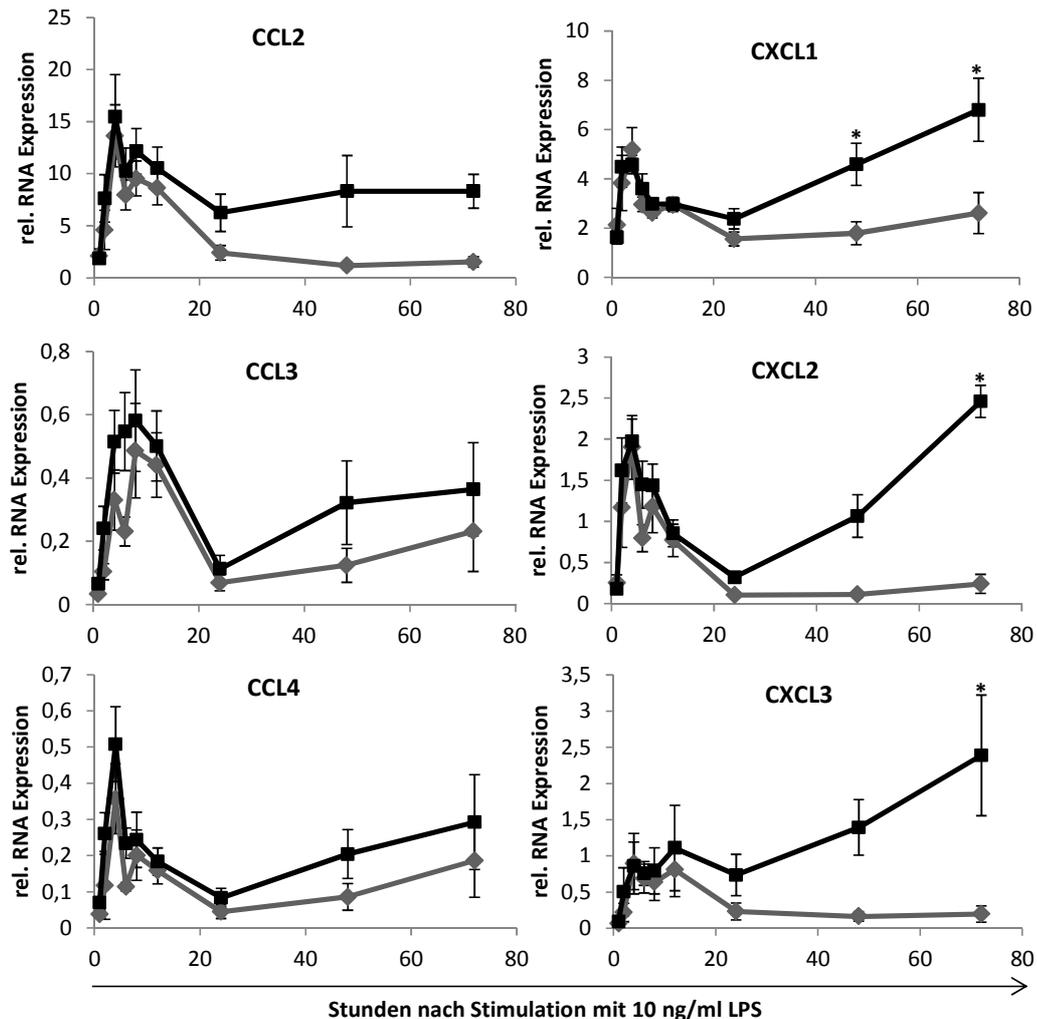
3.3.6 Einfluss von BMDMs auf Hepatozyten

Neben dem Einfluss der Hepatozyten auf die BMDMs konnte auch eine Wirkung der BMDMs auf die Hepatozyten beobachtet werden. Die RNA-Expression der Chemokine CCL2-4 und CXCL1-3 war in kokultivierten Hepatozyten erhöht (vgl. Abb. 25). Auffällig ist zudem, dass CD11b-depletierte monokultivierte Hepatozyten auf die Stimulation mit LPS mit einer Chemokinexpression reagieren, obwohl in der Literatur bisher davon ausgegangen wurde, dass dies nur indirekt durch die Freisetzung von Mediatoren durch z.B. Makrophagen möglich ist.

Die RNA-Expression verschiedener APP wurde infolge der Ko-Kultivierung ebenfalls beeinflusst. Dabei wurden die Expressionen von α 2M, SAA1, SAA3, CRP, C3 und SAP nach LPS-Stimulation in kokultivierten Hepatozyten erhöht und erreichten nach 48 bzw. 72 Stunden signifikante Unterschiede zu monokultivierten Hepatozyten (vgl. Abb. 26). Die Expression von ORM, HAMP1, C4, FG- α , FG- β , Haptoglobin und Hämopexin wurde hingegen nicht signifikant beeinflusst (nicht gezeigte Daten). Entgegen der RNA-Expression lag die Proteinkonzentration von α 2M im Überstand kokultivierter Hepatozyten unter der von monokultivierten. Während in der RNA-Expression von Haptoglobin und ORM keine Unterschiede feststellbar waren, war die Haptoglobin-Proteinkonzentration der monokultivierten Hepatozyten signifikant erhöht und die von ORM deutlich niedriger als bei kokultivierten Hepatozyten. SAP und CRP wiesen

entsprechend der RNA-Daten eine erhöhte Konzentration bei kokultivierten Hepatozyten auf (vgl. Abb. 27).

Die Ko-Kultivierung von Hepatozyten mit BMDMs führte folglich sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene zu zum Teil signifikant veränderten Chemokin- und APP-Reaktionen nach LPS-Stimulation in Hepatozyten.



— primäre Hepatozyten aus Monokultur — primäre Hepatozyten aus Ko-Kultur mit BMDM

Abb. 25: Hepatozyten exprimieren nach LPS-Stimulation verstärkt die Chemokine CCL2-4 und CXCL1-3. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben 2 Tage kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden Hepatozyten ohne BMDMs kultiviert. Nach 2 Tagen Kultivierung erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Nach 1-72 Stunden wurde die RNA aus den Hepatozyten isoliert und die Expression verschiedener Chemokine mittels quantitativer PCR ermittelt. Für die Auswertung wurde die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mittels zweifacher

Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

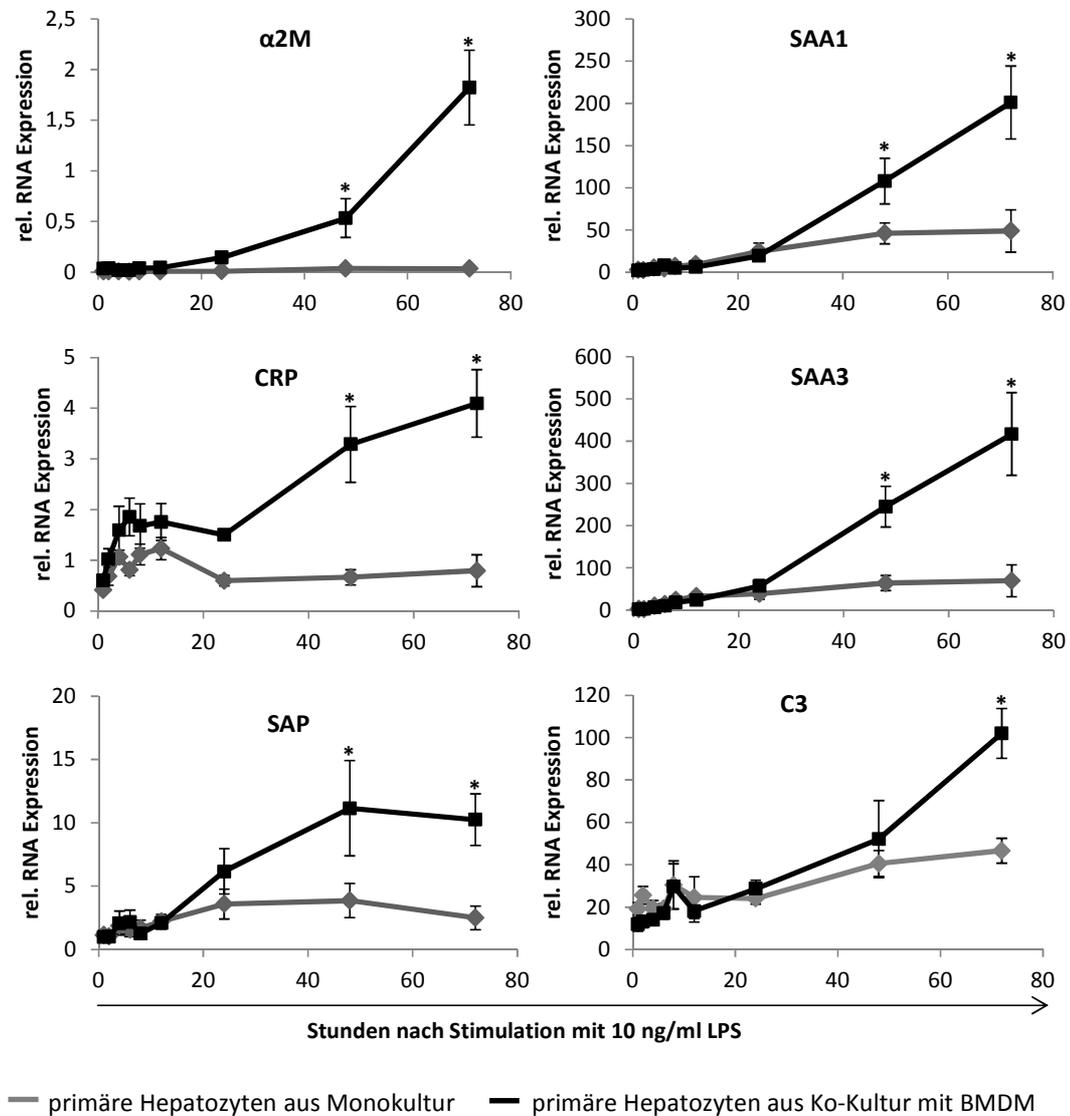


Abb. 26: Hepatozyten in Ko-Kultur mit BMDMs exprimieren nach LPS-Stimulation verstärkt die APP $\alpha 2M$, SAA1, CRP, SAA3, SAP und C3. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben 2 Tage kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden Hepatozyten ohne BMDMs kultiviert. Nach 2 Tagen Kultivierung erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Nach 1-72 Stunden wurde die RNA aus den Hepatozyten isoliert und die Expression verschiedener APP mittels quantitativer PCR ermittelt. Für die Auswertung wurde die ΔC_t -Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je mindestens 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mittels zweifacher Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

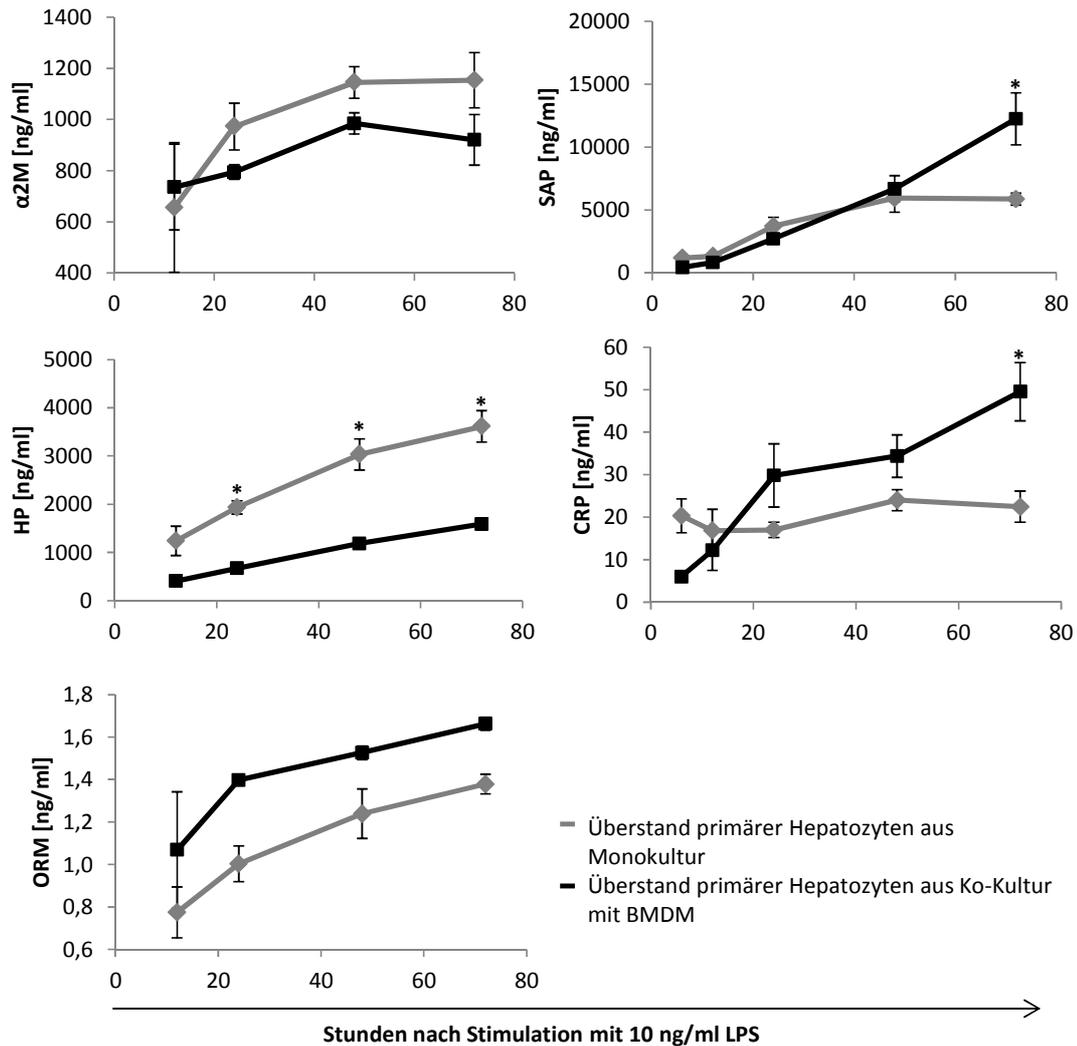


Abb. 27: Die Ko-Kultivierung führt im Zellüberstand zu einer erhöhten Konzentration von ORM und CRP, während die Konzentration von HP und $\alpha 2M$ vermindert ist. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben 2 Tage kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden Hepatozyten ohne BMDMs kultiviert. Nach 2 Tagen Kultivierung erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurde der Überstand entnommen und die Konzentration verschiedener APP darin mittels Multiplex-Analyse ermittelt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte ($n = 3-4$) mit Standardfehler. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mittels zweifacher Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferroni post-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

3.3.7 Einfluss verschiedener Gen-Knockouts auf die interzelluläre Kommunikation zwischen BMDMs und Hepatozyten

MK2 ist an der Regulation verschiedener Mediatoren und Zytokinrezeptoren beteiligt. In Makrophagen wird zum Beispiel die IL-6 Expression durch MK2 kontrolliert, während die MK2-Aktivierung in Hepatozyten zur Herabregulation der signalübertragenden Rezeptoruntereinheit gp130 des IL-6 Rezeptors führt (Radtke *et al.* 2010). Ob die zellspezifische Regulation von Mediatoren und Rezeptoren durch MK2 eine Rolle bei der interzelluläre Kommunikation zwischen BMDMs und Hepatozyten spielt, wurde durch die Ko-Kultivierung von Zellen mit entsprechendem Gen-Knockout untersucht. $Mk2^{-/-}$ BMDMs wiesen nach 3 Tagen Kultivierung in Mono- bzw. Ko-Kultur mit wt Hepatozyten keine signifikanten Unterschiede zu wt BMDMs in der Expression diverser Differenzierungsmarker auf (Abb. 28A). Die Ergebnisse legten jedoch eine verminderte RNA-Expression nach Ko-Kultivierung von $mk2$ -defizienten BMDMs mit wt Hepatozyten von IFN- β und IL-10 6 Stunden nach LPS-Stimulation nahe (vgl. Abb. 28C). Ein ähnliches Bild zeichnete sich für die Verwendung von $mk2^{-/-}$ Hepatozyten ab, welche mit wt BMDMs kokultiviert wurden. In der Expression von Differenzierungsmarkern waren nur geringfügige Veränderungen (Abb. 28B) detektierbar, während die RNA-Expression von IL-6, IL-10 und IFN- β reduziert wurde (Abb. 29D).

Die Produktion von Typ I IFN ist assoziiert mit der Suppression der angeborenen Immunantwort auf bakterielle Infektionen (Trinchieri 2010). Ob IFN möglicherweise die Differenzierung von Makrophagen beeinflusst, wurde durch die Verwendung von $ifn\alpha^{-/-}$ Zellen für die Ko-Kultivierung überprüft. Eine verminderte Expression der Marker Gr1, CD11c und CD163 wurde für die Ko-Kultivierung von $ifn\alpha^{-/-}$ BMDMs mit wt Hepatozyten detektiert (Abb. 29A). Umgekehrt wies die Ko-Kultivierung von wt BMDMs mit $ifn\alpha^{-/-}$ Hepatozyten keine Veränderung in der Expression dieser Marker auf (Abb. 29B). Die RNA-Expression von IL-6, IL-10 und IFN- β nach LPS-Stimulation in wt BMDMs, die mit $ifn\alpha^{-/-}$ Hepatozyten kokultiviert wurden, wurde nicht beeinflusst (Abb. 29C). Der Vergleich zwischen $mk2^{-/-}$ und $ifn\alpha^{-/-}$ belegt, dass MK2 in diesem Zusammenhang eine größere Rolle spielt als IFN α R-abhängige Signale.

Um der Frage nachzugehen, welche Relevanz der Immunmodulator IL-10 für die interzelluläre Kommunikation hat, wurden $il-10^{-/-}$ BMDMs mit wt Hepatozyten kultiviert. Da Hepatozyten kein IL-10 exprimieren, wurde das Experiment nicht mit $il-10^{-/-}$ Hepatozyten verifiziert. Im Ergebnis konnten keine signifikanten Unterschiede in

der Expression von Differenzierungsmarkern bzw. der RNA-Expression der Zytokine ermittelt werden (Abb. 30). Dennoch zeichnen sich für die Expression von IFN- β und TGF- α Unterschiede ab, die in weiterführenden Experimenten näher untersucht werden müssen.

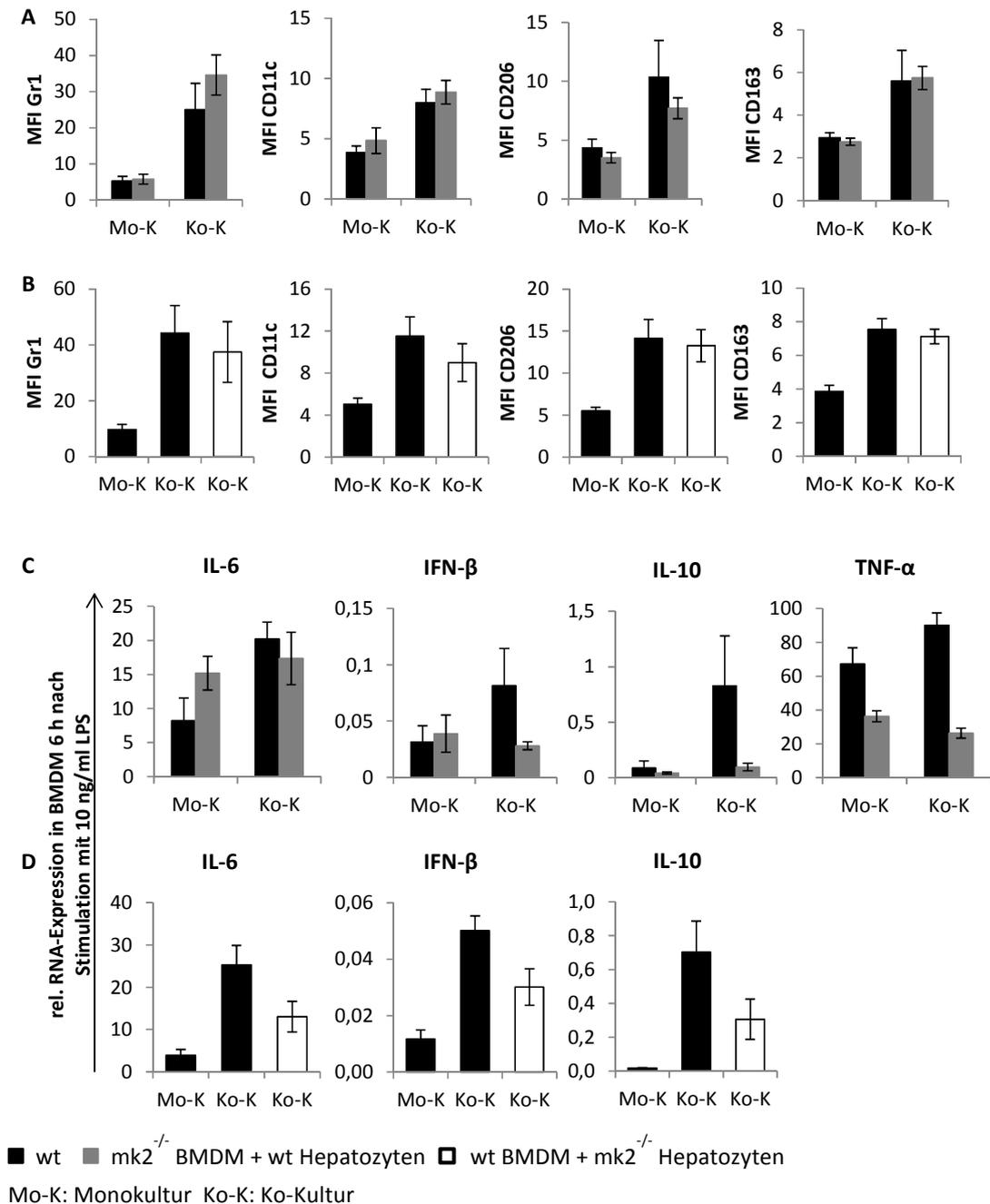


Abb. 28: Einfluss von MK2 auf die Differenzierung von BMDMs. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben kokultiviert. (A) Mk2^{-/-} BMDMs wurden für 3 Tage mit wt Hepatozyten bzw. (B) wt BMDMs mit mk2^{-/-} Hepatozyten kokultiviert. Die

mittlere Fluoreszenz-Intensität von Gr1, CD11c, CD206 und CD163 der BMDMs wurde anschließend mittels FACS-Analyse ermittelt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. (C) Der Einfluss der Ko-Kultivierung von *mk2*^{-/-} BMDMs mit wt Hepatozyten bzw. (D) wt BMDMs mit *mk2*^{-/-} Hepatozyten auf die Funktionalität wurde nach 2 Tagen Ko-Kultivierung durch 6 stündige Stimulation mit 10 ng/ml LPS analysiert. Die RNA-Expression von IL-6, IFN- β , IL-10 und TNF- α wurde in den BMDMs mittels quantitativer PCR bestimmt und die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus je 4 unabhängigen Messungen pro Gruppe in C sowie die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 6 unabhängigen Messungen pro Gruppe in D.

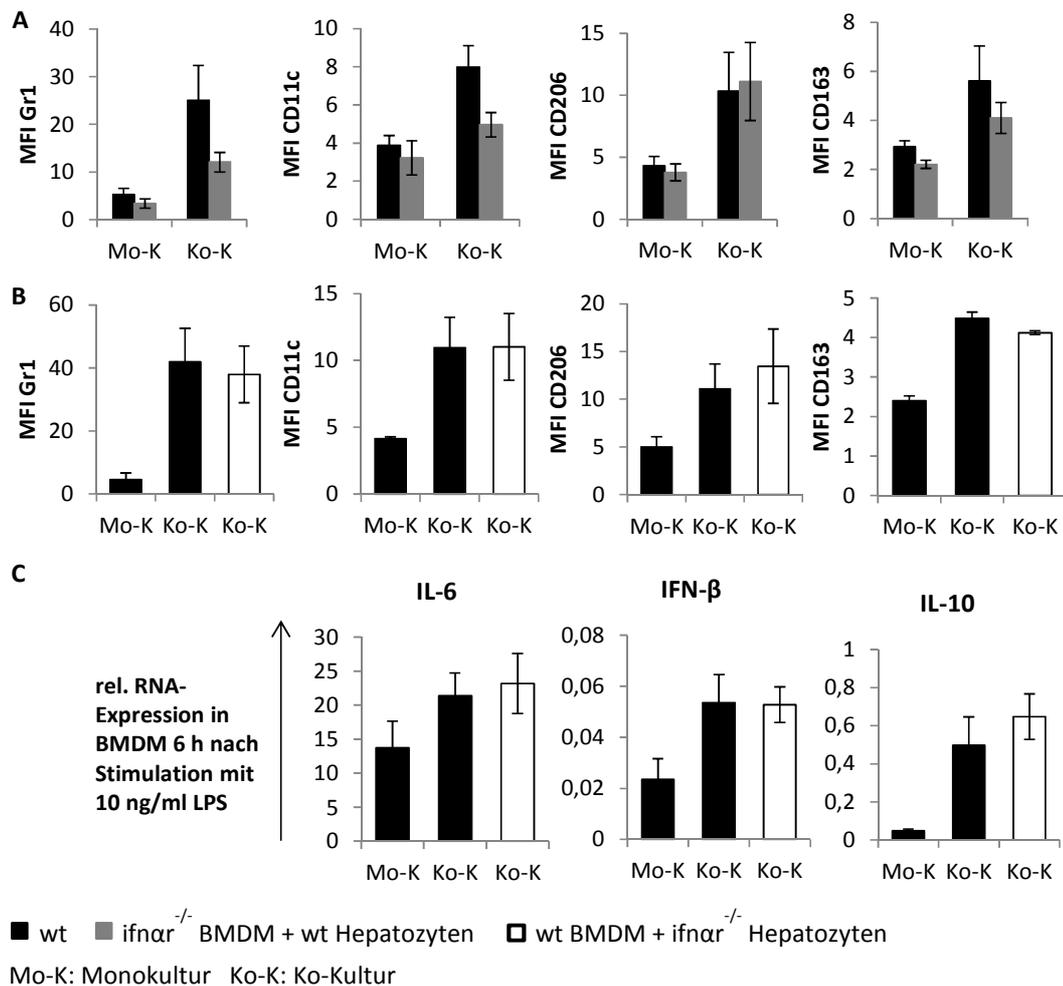


Abb. 29: IFN- α -Rezeptor1-defiziente BMDMs exprimieren vermindert Gr1, CD11c und CD163 nach Ko-Kultivierung mit wt Hepatozyten. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben kokultiviert. (A) *ifnar*^{-/-} BMDMs wurden für 3 Tage mit wt Hepatozyten bzw. (B) wt BMDMs mit *ifnar*^{-/-} Hepatozyten kokultiviert. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität von Gr1, CD11c, CD206 und CD163 der BMDMs wurde anschließend mittels FACS-Analyse ermittelt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. (C) Der Einfluss der Ko-Kultivierung von wt BMDMs mit *ifnar*^{-/-} Hepatozyten auf die Funktionalität wurde durch Stimulation mit 10 ng/ml LPS nach 2

Tagen Ko-Kultivierung analysiert. Die RNA-Expression von IL-6, IFN- β und IL-10 in BMDMs wurde nach 6 Stunden Inkubation mittels quantitativer PCR bestimmt und die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 4 unabhängigen Messungen pro Gruppe.

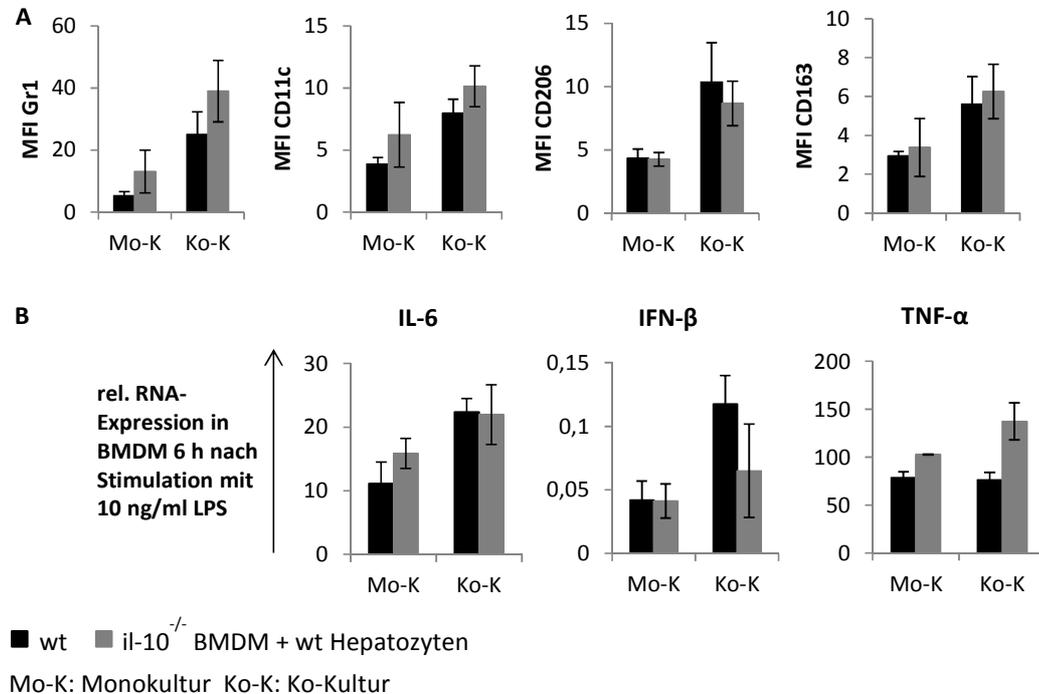


Abb. 30: Die IL-10 Defizienz führt bei kokultivierten BMDMs zu einer verminderten IFN- β und gesteigerten TNF- α RNA-Expression. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben kokultiviert. (A) IL-10^{-/-} BMDMs wurden für 3 Tage mit wt Hepatozyten kokultiviert. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität von Gr1, CD11c, CD206 und CD163 der BMDMs wurde anschließend mittels FACS-Analyse ermittelt. (B) Der Einfluss der Ko-Kultivierung von il-10^{-/-} BMDMs mit wt Hepatozyten auf die Funktionalität wurde durch Stimulation mit 10 ng/ml LPS nach 2 Tagen Ko-Kultivierung analysiert. Die RNA-Expression nach 6 Stunden Inkubation wurde für IL-6, IFN- β und TNF- α der BMDMs mittels quantitativer PCR bestimmt und die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe.

Der Einfluss von IL-10 auf die interzelluläre Kommunikation wurde auch anhand der RNA-Expression verschiedener Chemokine und APP in Hepatozyten untersucht. Eine signifikant modifizierte RNA-Expression konnte 6 Stunden nach LPS-Stimulation in Hepatozyten für CXCL2 und 24 Stunden nach Stimulation für CXCL1 ermittelt werden (vgl. Abb. 31). Die Expression der APP war durch das Fehlen von IL-10 tendenziell erhöht. Signifikante Unterschiede wiesen die Expressionen von CRP und FG- α auf (Abb.

32). Keine Unterschiede konnten in den Expressionen von α 2M, C4, FG- β , SAA1 und SAA3 festgestellt werden, sie sind hier nicht dargestellt.

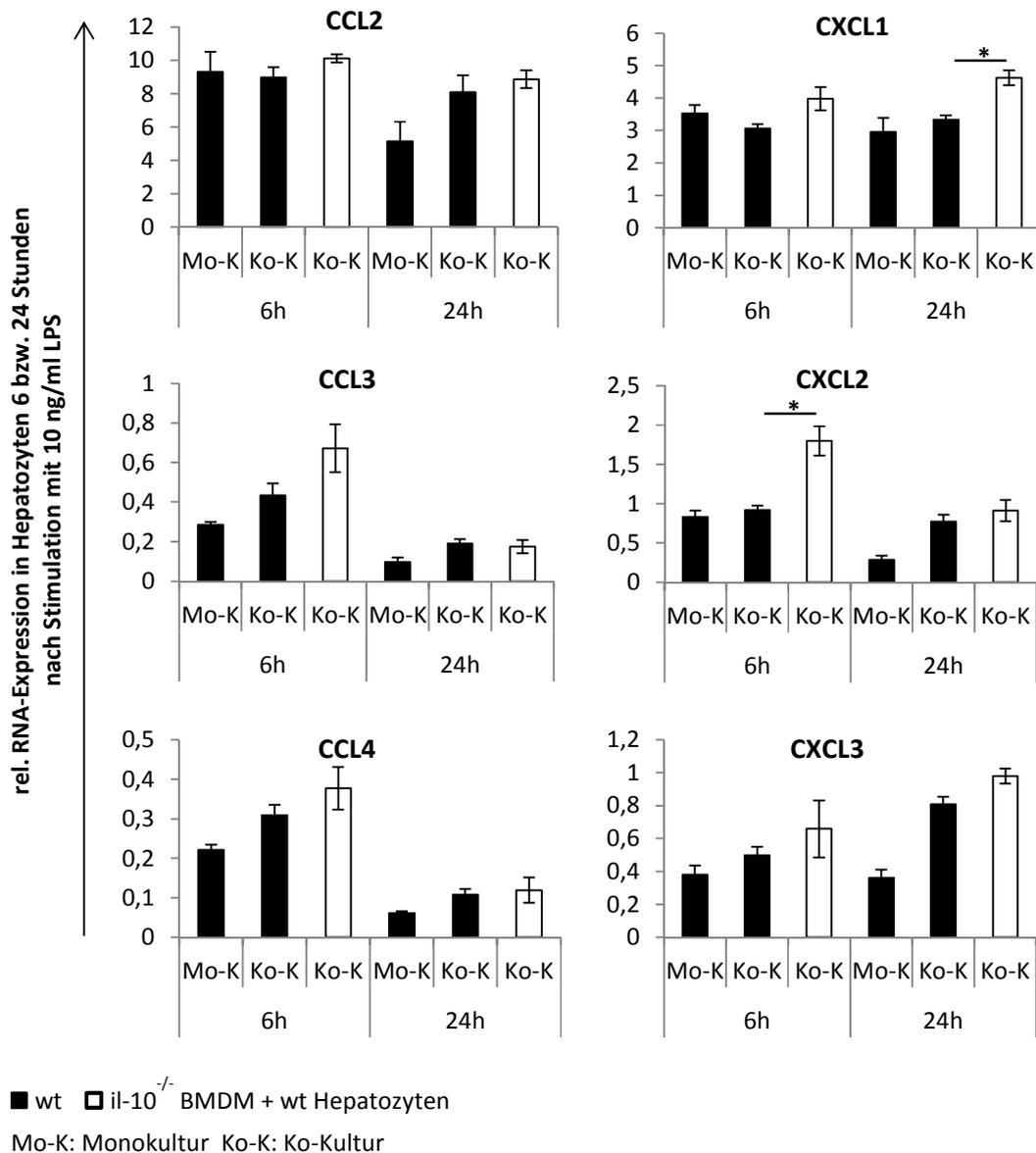


Abb. 31: Die IL-10 Defizienz führt bei Ko-Kultivierung zu einer verstärkten RNA-Expression der Chemokine CCL3, CCL4 und CXCL1-3 in wt Hepatozyten. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden Hepatozyten monokultiviert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach 6 und 24 Stunden erfolgte die Isolierung der RNA aus den Hepatozyten. Die RNA-Expression von CCL2-4 und CXCL1-3 wurde mittels quantitativer PCR ermittelt. Es wurde die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mittels zweiseitigem Student t-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

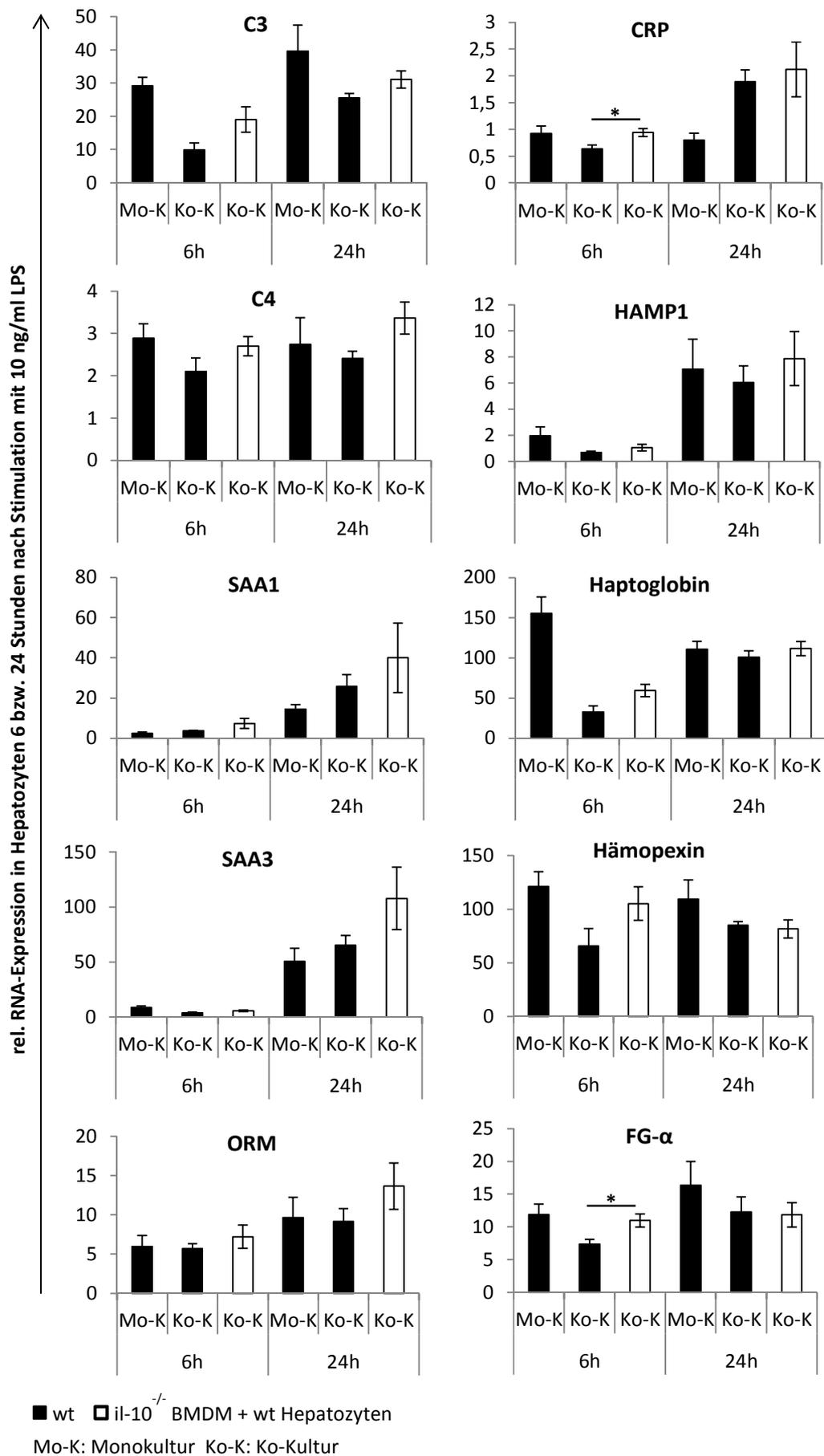


Abb. 32: IL-10 bedingt einen verminderten Anstieg der RNA-Expression von C3, C4, ORM, CRP, HP, HPx und FG- α nach LPS-Stimulation in mit wt BMDMs kokultivierten Hepatozyten. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden Hepatozyten monokultiviert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach 6 und 24 Stunden erfolgte die Isolierung der RNA aus den Hepatozyten. Die Expression von C3, C4, SAA1, SAA3, ORM, CRP, HAMP1, Haptoglobin, Hämopexin und FG- α wurde mittels quantitativer PCR ermittelt. Es wurde die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mittels zweiseitigem Student t-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

3.3.8 Auswirkung des TGF- β Rezeptor-Inhibitors SB431542 auf die Differenzierung von BMDMs in der Ko-Kultur

SB431542 stellt einen potenten und selektiven Inhibitor der TGF- β Superfamilie Typ I Activin Rezeptor ähnlichen Kinase (ALK) Rezeptoren dar. An diesen Rezeptoren binden Mitglieder einer großen Superfamilie von etwa 30 pleiotropen Zytokinen, die in viele biologische Prozesse involviert sind. Sie spielen u. a. eine Rolle bei der Wundheilung durch die Induktion der Synthese von extrazellulärer Matrix und sind an der Wachstumskontrolle und der Differenzierung beteiligt (Inman *et al.* 2002, Laping *et al.* 2002). Durch den Einsatz des Inhibitors während der Ko-Kultivierung von BMDMs und Hepatozyten kam es zu signifikant erhöhten Expressionen der Marker CD11c, CD163 und CD206 sowohl in mono- als auch in kokultivierten BMDMs (Abb. 33). Die Expression von GR1 wurde nicht beeinflusst. Des Weiteren führte die Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor für 2 Tage und anschließender Stimulation mit LPS nach 6 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der IL-10 und IL-12 RNA-Expression in kokultivierten sowie einer erhöhten Expression von IL-6 in monokultivierten BMDMs. Die Expression von IFN- β wurde hingegen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 34). Ein möglicher Ligand für den TGF- β Rezeptor ist TGF- β 1. Um zu überprüfen, ob die Ko-Kultivierung die Expression dieses Zytokins beeinflusst, wurde die RNA-Expression nach 2 Tagen Kultivierung und anschließender Stimulation mit LPS bestimmt. Im Ergebnis war ein leicht erhöhter Wert für monokultivierte im Vergleich zu kokultivierten BMDMs detektierbar. Deutlicher war dieser Unterschied nach Verwendung des Inhibitors (Abb. 35A). Da wie bereits in Abb. 33 dargestellt die Inhibition des Rezeptors

zu einer erhöhten Expression der Differenzierungsmarker CD163 und CD206 führte, entspricht dies der Beobachtung, dass in monokultivierten BMDMs vermehrt TGF- β exprimiert wurde und die Expression der Differenzierungsmarker hier folglich geringer ausfiel.

Bei TGF- β handelt es sich um Dimere, die in latenter Form von diversen Zellen freigesetzt werden. Dabei bildet TGF- β einen Komplex mit zwei Polypeptiden, dem *latent TGF- β binding protein* (LTBP) und dem *latency-associated peptide* (LAP). Die Freisetzung und damit Aktivierung von TGF- β kann durch eine Vielzahl verschiedener Moleküle wie Proteasen, Integrine und Thrombospondin (TSP) z.B. infolge inflammatorischer Stimuli, Angiogenese oder Wundheilung erfolgen (Annes *et al.* 2003). Die Analyse der Proteinkonzentration von TGF- β gesamt (aktiv und inaktiv) im Zellüberstand ergab nach 2-4 Tagen keine Unterschiede zwischen monokultivierten BMDMs und monokultivierten Hepatozyten. Die Konzentration im Überstand der Ko-Kulturen entsprach in etwa der Summe der jeweiligen Monokulturen (Abb. 35B). Die hier relevante Konzentration des aktiven TGF- β konnte nicht ermittelt werden, da sie unterhalb der Detektionsgrenze von 7,8 pg/ml lag.

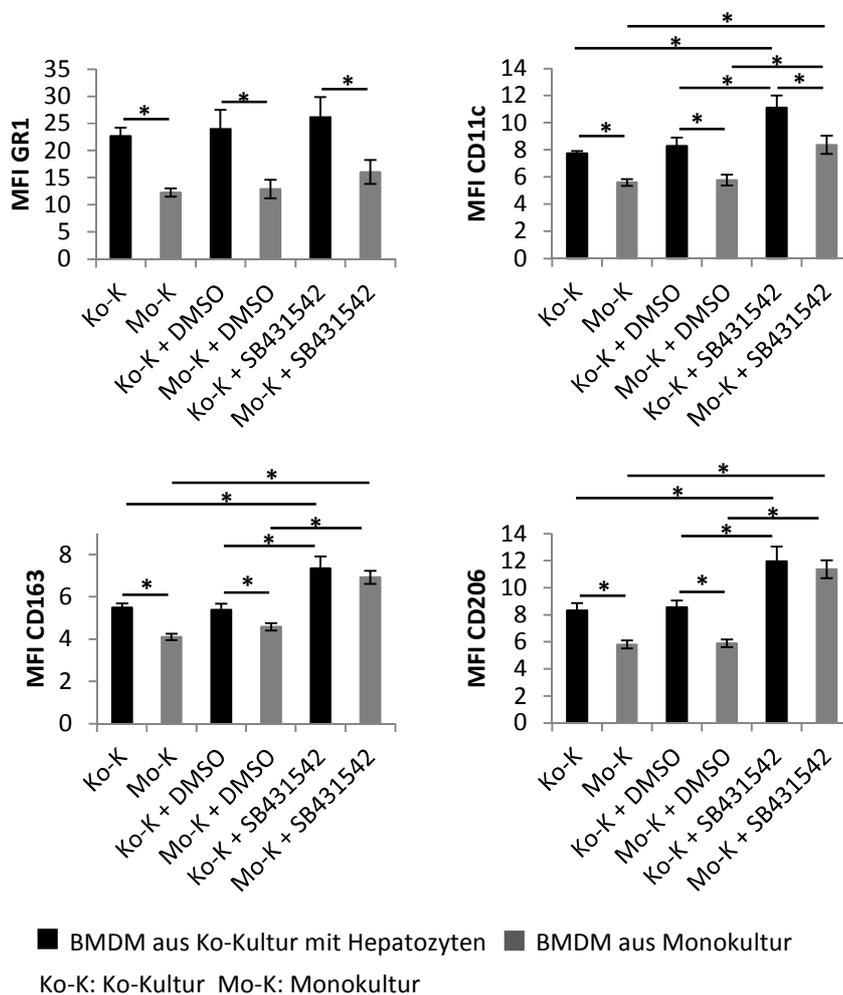


Abb. 33: TGF- β Rezeptor-Signale führen zu einer Inhibition der Expression von CD11c, CD163 und CD206 in BMDMs. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden BMDMs monokultiviert. Dem Kulturmedium wurde ab dem Zeitpunkt der Ko-Kultivierung 10 μ M SB431542 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle zugesetzt. Nach 3 Tagen Kulivierung wurde die Expression der Differenzierungsmarker Gr1, CD11c, CD163 und CD206 mittels FACS-Analyse untersucht. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der mittleren Fluoreszenz-Intensitäten mit Standardfehler aus je 6 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mittels zweiseitigem Student t-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

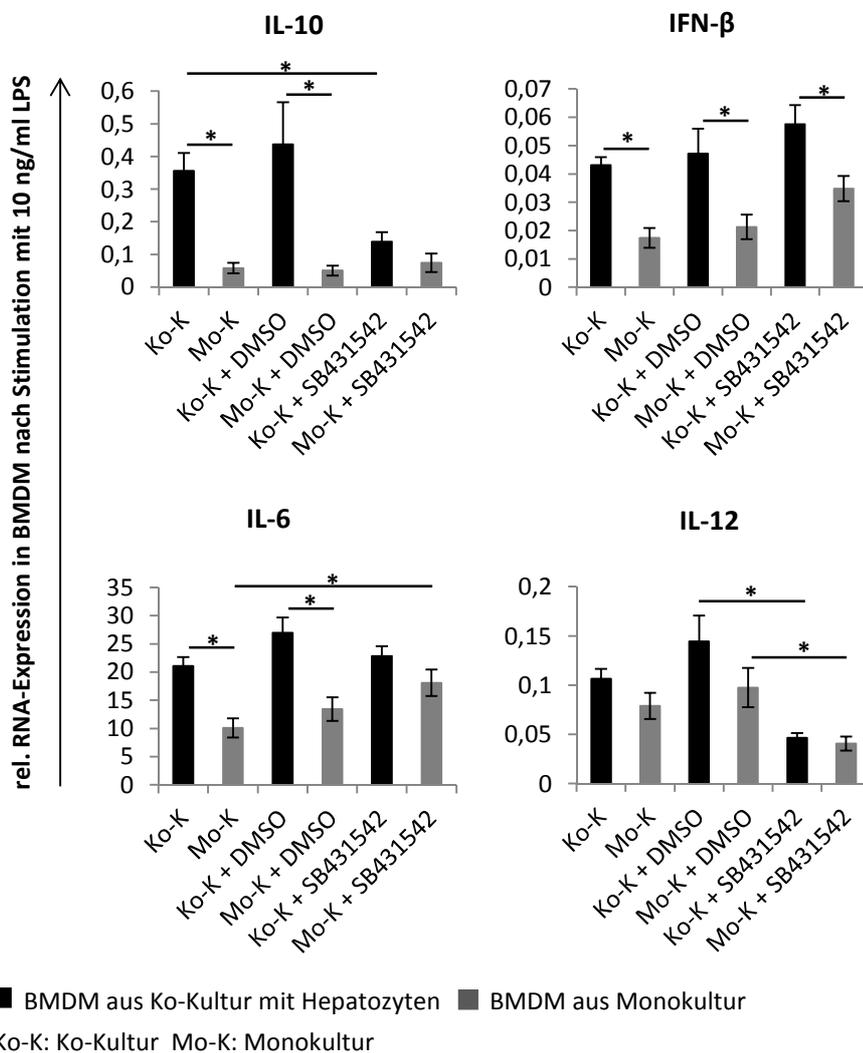


Abb. 34: Die Hemmung des TGF- β Rezeptors Typ I hebt die Unterschiede in der IL-10, IL-6 und IL-12 Expression zwischen mono- und kokultivierten BMDMs nach LPS-Stimulation auf. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden BMDMs monokultiviert. Dem Kulturmedium wurde ab dem Zeitpunkt der Ko-Kultivierung 10 μ M SB431542 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle

zugesezt. Nach 2 Tagen Kultivierung erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Nach 6 Stunden Inkubation wurde die RNA aus den BMDMs isoliert und die RNA-Expression von IL-10, IFN- β , IL-6 und IL-12 mittels quantitativer PCR ermittelt. Es wurde die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 6 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mittels zweiseitigem Student t-Test ermittelt und sind in der Abbildung dargestellt (*).

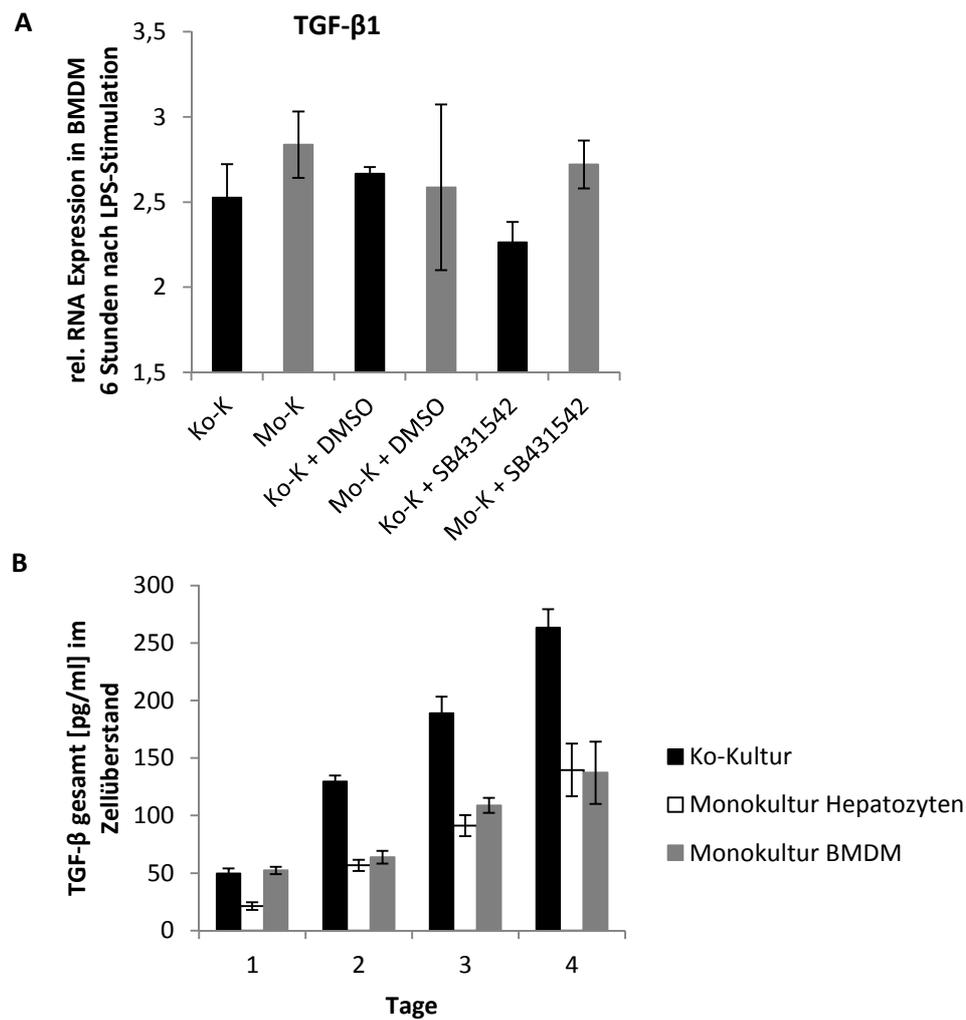


Abb. 35: Die Ko-Kultivierung von BMDMs mit Hepatozyten führt zu einem geringen Unterschied in der TGF- β 1 RNA-Expression in BMDMs und beeinflusst die Proteinkonzentration von TGF- β gesamt im Zellüberstand nicht. Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (vgl. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). BMDMs wurden wie unter 2.2.6 beschrieben generiert. Beide Zelltypen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben kokultiviert. Im Vergleich hierzu wurden BMDMs und Hepatozyten monokultiviert. Dem Kulturmedium wurde ab dem Zeitpunkt der Ko-Kultivierung 10 μ M SB431542 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle zugesetzt. (A) Nach 2 Tagen Kultivierung erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Nach 6 Stunden Inkubation wurde die RNA aus den BMDMs isoliert und die RNA-Expression von TGF- β 1 mittels quantitativer PCR ermittelt. Es wurde die Δ Ct-Methode mit SDHA als Referenz verwendet. (B) Im Zellüberstand mono- und kokultivierter Zellen wurde über einen Zeitraum von 1 bis 4 Tagen die Konzentration des gesamt TGF- β mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe.

4. Diskussion

4.1 Leberregeneration

4.1.1 Rekonstitution der Leber bei wt und mk2^{-/-} Mäusen

Während der Leberregeneration werden multiple Signalwege aktiviert um die synchronisierte Proliferation der Leberzellen, den Schutz der Zellen vor apoptotischen Signalen, den Umbau der extrazellulären Matrix und den Wiederaufbau der lobulären Architektur zu ermöglichen (Fausto 2001b). Die Resektion führt auch zu einer Reihe von metabolischen Veränderungen. Bereits wenige Stunden nach der PHx schwellen die verbliebenen Hepatozyten infolge der Aufnahme von Aminosäuren an (Hypertrophie) und akkumulieren Triglyceride. Die Induktion der Proliferation durch den Übertritt der Hepatozyten in den Zellzyklus resultiert in einer Hyperplasie, das Volumen der verbleibenden Leberlappen nimmt zu und das Ausgangsgewicht der Leber wird wieder hergestellt (Minuk 2003).

Die Rekonstitution des Lebergewichtes nach PHx wies in dieser Arbeit den deutlichsten Anstieg nach 2 bis 4 Tagen auf, was der Beobachtung entspricht, dass 2 bis 4 Tage nach PHx ein deutlicher Anstieg proliferierender Zellen in der Leber nachweisbar ist (Delgado *et al.* 2011). Bereits nach 4 Tagen war kein signifikanter Unterschied zwischen dem Gewicht der regenerierenden und den Kontrollebern mehr erkennbar.

Zu Beginn der Regeneration werden die Hepatozyten durch sogenannte *Priming*-Faktoren (z.B. TNF- α oder IL-6) gegenüber den Einflüssen von Wachstumsfaktoren sensibilisiert (Koniaris *et al.* 2003). Ein Signalweg, der unter anderem zur Expression von TNF- α und IL-6 infolge der Stimulation von BMDMs mit LPS führt, verläuft über die Aktivierung von p38^{MAPK} und der daraus resultierenden Aktivierung von MK2 (Review in Bode *et al.* 2012a). Einen weiteren Hinweis darauf, dass MK2 eine besondere Rolle für einen reibungslosen Ablauf der Regeneration spielen könnte, liefert die anhaltende Aktivierung von MK2 nach PHx, während die p38^{MAPK} bereits 30 Minuten nach der Hepatektomie wieder inaktiviert wird (Campbell *et al.* 2012). Zur Überprüfung des Einflusses von MK2 auf die Zellproliferation nach PHx wurde die partielle Hepatektomie vergleichend an wt und mk2^{-/-} Mäusen durchgeführt. In der Rekonstitution des

Lebergewichts 2 bzw. 6 Tage nach PHx wies jedoch die prozentual zur Kontrolle erhöhte Gewichtszunahme der Leber in *mk2^{-/-}* Tieren nicht auf eine negative Beeinflussung der Regeneration hin. Das Fehlen des *mk2*-Gens wird möglicherweise durch intrazelluläre Redundanzen kompensiert, wie es bereits auch für andere an der Regeneration beteiligte Gene gezeigt wurde (Fausto *et al.* 2006). Dass es durch das Fehlen des *mk2*-Gens trotzdem zu einer Beeinflussung der Regeneration kommt, legen immunhistologische Untersuchungen der proliferierenden Zellen zwei Tage nach PHx in den Lebern nahe. Hier konnten in den *mk2*-defizienten Tieren signifikant weniger proliferierende Zellkerne als in den *wt* Tieren ermittelt werden und die Detektion von PCNA im Westernblot fiel geringer aus. Das prozentual erhöhte Lebergewicht im Vergleich zu den *wt* Tieren und die verminderte Anzahl proliferierender Zellkerne erklärt sich möglicherweise durch eine verstärkte Hypertrophie nach PHx in *mk2*-defizienten Mäusen und muss in folgenden Experimenten weiter untersucht werden.

Deutliche Unterschiede in den Serumparametern wurden zwischen PHx und Sham Tieren detektiert. Die Bilirubin-gesamt-Konzentration sowie die Aktivitäten von GOT, LDH, GPT und AP waren bei PHx-behandelten Mäusen stark erhöht, sanken jedoch nach 1 bis 2 Tagen wieder auf das Kontrollniveau. Dieser Anstieg ist vermutlich auf den operativ gesetzten Leberschaden, möglicherweise auch auf nekrotische Leberreste zurückzuführen. Vergleichbare Beobachtungen wurden bereits in der Literatur beschrieben (Mitchell und Willenbring 2008).

4.1.2 Identifizierung möglicher relevanter Faktoren für die Leberregeneration

Infolge der Leberresektion sinkt die Filterleistung für Toxine, welche die Leber vom Darm über die Pfortader erreichen, Lebermakrophagen werden aktiviert, Zytokine werden freigesetzt und die Konzentration der APP im Serum steigt. Da ein Anstieg der Zytokine und APP auch nach sogenannten Sham-Operationen zu beobachten ist, wurde für jeden in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkt nach PHx eine Sham-Kontrolle durchgeführt. Dieses Vorgehen ermöglichte die Bestimmung von Ereignissen, die spezifisch für die Leberregeneration sind.

Für die Identifizierung differenziell regulierter Gene wurde RNA aus den Lebern PHx- und Sham-behandelter Tiere isoliert und diese auf die Expression von 48 verschiedenen Genen untersucht. Dabei ist zu beachten, dass sich die untersuchte RNA aus den verschiedenen in der Leber vorkommenden Zelltypen, entsprechend ihrem jeweiligen

Anteil, zusammensetzt. Der überwiegende Teil der hier untersuchten Gene wies keine differenzielle Regulation auf. Auffällige Unterschiede zeigten sich jedoch in der Expression von CCL9, IL-33, NRG1, SAP, C3, Hcpidin, α 2M, SAA2, SAA3 und ORM1 nach PHx im Vergleich zu Sham-operierten Tieren. Die Relevanz dieser Faktoren für die Leberregeneration muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Chemokine sind kleine Signalproteine, die eine Vielzahl von Funktionen aufweisen. Neben der Chemotaxis können sie an der Regulation der Angiogenese, Fibrose, Proliferation und Apoptose beteiligt sein (Mantovani *et al.* 2006, Charo und Ransohoff 2006). Die Bedeutung von CXC-Chemokinen für Reparatur- und Regenerationsprozesse in der Leber ist bereits mehrfach beschrieben (Colletti *et al.* 1998, Hogaboam *et al.* 1999, Ren *et al.* 2003, Van Sweringen *et al.* 2011, Wilson *et al.* 2015). Die Rolle des Chemokins CCL9 bei der Leberregeneration ist hingegen bisher noch unbekannt. Beschrieben ist, dass CCL9 oder MIP-1 γ (*macrophage inflammatory protein*) in verschiedenen Geweben konstitutiv exprimiert (Poltorak *et al.* 1995) und durch Langerhans-Zellen, Dendritische Zellen und Makrophagen sekretiert wird (Mohamadzadeh *et al.* 1996, Youn *et al.* 1995). Zudem induziert es Chemotaxis (Hara *et al.* 1995). Beschrieben ist auch die Induktion der CCL9 Expression in Makrophagen infolge der Ligandenbindung (unmethylierte CpG Oligodeoxynukleotide, wie sie in bakterieller DNA vermehrt auftreten) an den TLR9 (Ravindran *et al.* 2010). Dieser Befund legt zusammen mit der Beobachtung, dass die Leberregeneration in keimfreien und MyD88-defizienten Mäusen nur eingeschränkt erfolgt (Cornell 1985, Seki *et al.* 2005, Fausto *et al.* 2006, Hata *et al.* 2007) und der erhöhten Expression der mRNA von CCL9 nach PHx, eine mögliche Beteiligung von CCL9 an der Regeneration nahe. Ein weiteres interessantes Chemokin der CC-Familie ist das CCL2. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine signifikant erhöhte CCL2-Konzentration im Serum 3 Stunden nach PHx im Vergleich zu Sham-behandelten Tieren detektiert. Neben der Rekrutierung von Monozyten und DCs zum Entzündungsort konnten für CCL2 auch angiogenetische Effekte auf Endothelzellen im Menschen nachgewiesen werden (Salcedo *et al.* 2000). Für beide Chemokine sind bisher keine Untersuchungen im Kontext der Leberregeneration bekannt, ihre Rolle hierbei muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

IL-33 beeinflusst eine Reihe verschiedener Immunzellen während der Differenzierung, der Immunantwort und unter homöostatischen Bedingungen. So ist die Stimulation mit IL-33 zum Beispiel wichtig für die Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen in T_H2-Zellen sowie die Induktion von Treg-Zellen (Lu *et al.* 2015) und führt in Maus-Makrophagen zu einer verstärkten Expression von M2-Differenzierungsmarkern (Kurowska-Stolarska *et al.*

2009). Zudem wurde eine durch IL-33 induzierte verstärkte Expression der LPS-Rezeptor-Komponenten MD2, TLR4, sCD14 und MyD88 in Makrophagen beschrieben (Espinassous *et al.* 2009). Ob IL-33 auch an der Regulation der Leberregeneration beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt und muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete erhöhte IL-10 Konzentration im Serum nach PHx im Vergleich zu Sham-behandelten Tieren spielt vermutlich eine Rolle bei der Limitierung der inflammatorischen Immunantwort nach Resektion. Es wurde beschrieben, dass IL-10 in Abhängigkeit vom TLR4 exprimiert wird und es infolge eines IL-10 *knockouts* nach PHx zur verstärkten RNA-Expression von IL-6, TNF- α , IFN- γ , CCL2, CCR2 und F4-80 in der Leber kommt und die Konzentrationen von IL-6, TNF- α , IFN- γ und CCL2 im Serum erhöht sind (Yin *et al.* 2011). Neben einer erhöhten Anzahl von Neutrophilen und Makrophagen in der Leber war auch die Anzahl der proliferierenden Zellen erhöht. Diese Beobachtungen weisen auch darauf hin, dass IL-10 die Leberregeneration möglicherweise negativ reguliert.

Das nrg1-Gen gehört zu der egf-Gen-Familie und wie bei EGF handelt es sich auch bei NRG1 um einen Wachstumsfaktor. NRG1 bindet und aktiviert Tyrosinkinase-Rezeptoren (ErbB3 bzw. 4), welche zur EGF-Rezeptor-Familie gehören (Fuller *et al.* 2008, Odiete *et al.* 2012). Da EGF eine wichtige Rolle in der Leberregeneration spielt (Taub 2004, Fausto *et al.* 2006), liegt die Vermutung nahe, dass auch NRG1 den Verlauf der Regeneration beeinflussen könnte. Eine entscheidende Rolle spielt NRG1 während der Embryogenese. Defekte in der Expression von NRG1, ErbB2 oder ErbB4 führen hier bereits nach 9-10 Tagen zum Tod des Embryos (Meyer und Birchmeier 1995, Gassmann *et al.* 1995, Lee *et al.* 1995). Die Funktionen von Neuregulin in adulten Organismen sind für das kardiovaskuläre-System, das periphere und zentrale Nervensystem sowie die Skelettmuskulatur weitreichend untersucht. Infolge von Ischämien oder Gewebsverletzungen erfolgt die Aktivierung von NRG1. Über den NRG1/ErbB-Signalweg werden Proliferation und Differenzierung von zum Beispiel Endothelzellen (Angiogenese), Myoblasten, neuronalen Zellen und/oder Skelettmuskelzellen induziert und somit Reparaturprozesse unterstützt (Zhao *et al.* 1998, Odiete *et al.* 2012). Infolge der Stimulation von Hepatozyten mit dem rekombinanten Peptid NRG1 β und der Aktivierung des ErbB3-Rezeptors konnte zudem eine erhöhte DNA-Synthese in Hepatozyten *in vitro* induziert werden (Carver *et al.* 1996). Die Stimulation mittels TNF- α induzierte im Vergleich hierzu jedoch eine sehr viel stärkere Synthese. Ausgehend von diesen Befunden und der eigenen Beobachtung, dass die NRG1-Expression 2 Stunden und 2-4 Tage nach PHx gegenüber den Sham-Tieren erhöht war, ist eine mögliche

Relevanz von NRG1 für die Regeneration naheliegend. Da bisher noch keine Publikationen zu diesem Thema erschienen sind, sind weiterführenden Experimenten hierzu notwendig.

Durch Schädigungen infolge von z.B. Traumata oder Infektionen erfolgt die Aktivierung von Monozyten im Blut und/oder Gewebsmakrophagen. Diese sekretieren daraufhin pro-inflammatorische Mediatoren, wie IL-1, IL-6 und TNF- α , die u.a. für die Induktion der Akut-Phase-Antwort verantwortlich sind (Bode *et al.* 2012b). Es konnte auch eine signifikant erhöhte RNA-Expression von IL-6 und IL-1 β infolge einer 70 %igen Resektion in der Leber von Ratten nachgewiesen werden, wobei die IL-6 Expression die von IL-1 β um ein vielfaches überstieg (Sheikh *et al.* 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine gegenüber der Kontrolle und den Sham-operierten Tieren signifikant erhöhte IL-6 Konzentration im Serum nach PHx detektiert werden. Der hier gemessene Unterschied zu den Sham-behandelten Tieren sowie der enorme Verlust von Leberparenchym legen einen anderen Verlauf der Akut-Phase-Antwort nach PHx nahe. Für die Überprüfung dieser Hypothese wurde die RNA-Expression diverser APP im Zeitraum von einer Stunde bis 21 Tagen nach PHx- und Sham-Operation bestimmt. Besonders 8 Stunden und/oder 2 Tage nach PHx konnten signifikant erhöhte Expressionen für SAP, C3, Hcpidin, α 2M, SAA2, SAA3 und ORM1 gegenüber den Sham operierten Tieren detektiert werden. Diese erhöhte Expression trotz vermindertem Leberparenchym und der besonders 2 Tage nach PHx verstärkten Proliferation der Hepatozyten betont die Bedeutung der APP für die Leberregeneration.

Infolge von Traumata, Infektionen oder Gewebsverletzungen kommt es zur Aktivierung der C3-Konvertase, die C3 in C3a und C3b spaltet. Die kombinierte Stimulation von PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) mit C3a und LPS führt zu einer erhöhten Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Takabayashi *et al.* 1996, Fischer *et al.* 1999), das heißt, C3a führt hier zu einer verstärkten Entzündungsreaktion. Partielle Hepatektomien an C3-defizienten Mäusen führten zu einer beeinträchtigten Regeneration und gesteigerten Mortalität (Strey *et al.* 2003). Diese Befunde legen eine bedeutende Rolle von C3 bei der Induktion der Regeneration (*Priming-Phase*) und der Expression der APP nahe.

Während die RNA-Expression von α 2M gegenüber der Kontrolle und den Sham-operierten Tieren nach PHx drastisch erhöht war, konnten auf Proteinebene nur Konzentrationen im Kontrollbereich oder sogar darunter detektiert werden, so dass hier möglicherweise ein verstärkter Umsatz diskutiert werden muss. Bereits beschrieben ist, dass das Protease aktivierte α 2M zur Wiederherstellung der Homöostase und dem

damit verbundenen Schutz des gesunden Gewebes Zytokine wie TGF- β , TNF- α und IL-1 β bindet, wodurch deren Aktivität sinkt und die α 2M-Zytokinkomplexe über den α 2M-Rezeptor endozytiert werden. Die Plasmakonzentration von α 2M sinkt folglich. Die α 2M-Expression wird durch Zytokine der IL-6-Familie induziert. IL-6 selbst bindet vor allem an die naive Form von α 2M und behält dadurch seine biologische Aktivität weitgehend (La Marre *et al.* 1991, Moshage 1997). α 2M bindet und inaktiviert auch Proteasen, z.B. Plasmin. In der frühen Phase der Leberregeneration wird die Matrix degradiert, woran möglicherweise die Matrix-Metalloproteine (MMP) 2 und 9 beteiligt sind, die nach PHx-, nicht aber nach Sham-Operationen in Ratten verstärkt exprimiert und aktiviert werden (Kim *et al.* 2000). Die Aktivierung dieser MMP erfolgt über Plasmin und wird durch sogenannte TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) gehemmt. Die Synthese der TIMPs sowie die Synthese von diversen Matrixproteinen wird durch TGF- β verstärkt, während es die Synthese von MMP hemmt (Moshage 1997). TGF- β unterstützt somit den Aufbau der extrazellulären Matrix. Zudem konnte ein inhibierender Effekt von TGF- β auf die Zellproliferation in Hepatozytenkulturen demonstriert werden (Michalopoulos 1997, Carr *et al.* 1986). Aufgrund der Beobachtung, dass α 2M pro-inflammatorische Zytokine bindet und inaktiviert und aktive Proteinasen inaktiviert, für die jeweils eine Beteiligung an der Regulation der Leberregeneration gezeigt wurde bzw. nahe liegt, scheint auch α 2M für den reibungslosen Verlauf der Regeneration eine Rolle zu spielen. Obwohl die erhöhte Expression von α 2M nach PHx bereits mehrfach beschrieben wurde (Fulop *et al.* 2001, Trautwein *et al.* 1996, Hau *et al.* 1995, Milland *et al.* 1990), wurde die Relevanz von α 2M für die Regeneration jedoch noch nicht belegt.

Die RNA-Expression von α 2M in Abhängigkeit vom induzierten Schaden verdeutlicht die feine Regulation der Akut-Phase-Antwort. Während die Sham-behandelten Tiere in dieser Arbeit keinen signifikanten Anstieg der α 2M-Expression im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen, zeigten Ratten infolge einer 2/3 Hepatektomie gegenüber einer durch die Injektion von Terpentin induzierten Inflammation eine verminderte Expression von α 2M (Milland *et al.* 1990). Die RNA-Expression von IL-6 und α 2M war nach 80 %iger Resektion bei Ratten höher ist als nach einer 30 %igen Resektion (Scotte *et al.* 1997).

Obwohl bereits zahlreiche Arbeiten durchgeführt wurden um die Regulation der Leberregeneration aufzuklären, konnten im Rahmen dieser Arbeit differenziell regulierte Faktoren identifiziert werden, deren Relevanz für die Regeneration noch unbekannt ist. Bei MK2, CCL2, CCL9, IL-33 und Nrg1 handelt es sich um Faktoren, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Leberregeneration untersucht wurden.

4.2 Ko-Kultur

4.2.1 Etablierung des Ko-Kultursystems

Eine wichtige Rolle in der Leber spielen die Kupffer-Zellen. Sie sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung eines anti-inflammatorischen Milieus trotz permanenter Toxinbelastung über die Pfortader beteiligt und ihre Depletion führt während der Leberregeneration zu einer verminderten IL-6 Expression, einer eingeschränkten Zellproliferation sowie einer signifikant verzögerten Restauration des Lebergewichtes (Meijer *et al.* 2000, Erhardt *et al.* 2007, You *et al.* 2008, Abshagen *et al.* 2007). Zudem konnte eine verminderte Akut-Phase-Antwort infolge von Makrophagen-Depletion vor PHx nach LPS-Stimulation demonstriert werden (Pins *et al.* 2004). Die Kupffer-Zellen besitzen eine strategisch günstige Lage in den Sinusoiden. Sie eliminieren Abfallprodukte und Toxine aus dem Blut und reichen über Zellfortsätze in den Disse-Raum, so dass sie über die Freisetzung von Mediatoren mit HCs und HSCs kommunizieren können. Für die Untersuchung der Interaktion von KCs und HCs wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Ko-Kultursystem für primäre Hepatozyten und BMDMs etabliert, welches die Analyse der interzellulären Kommunikation beider Zelltypen erlaubt. In Anlehnung an den physiologischen Aufbau der Leber wurden die HCs im sogenannten Kollagen-Sandwich kultiviert, welches die extrazelluläre Matrix simuliert und die Polarisierung der Zellen stabilisiert. In früheren Versuchsanordnungen mit direktem Zell-Zell-Kontakt zwischen Makrophagen und Hepatozyten wurde eine verstärkte Freisetzung von NO, TNF- α und IL-6 beobachtet (Hoebe *et al.* 2001). NO und TNF- α führten dabei über mitochondriale Dysfunktionen und oxidative DNA-Schäden bzw. die Aktivierung der Caspase 3 zu einer erhöhten Letalität der HCs (Kurose *et al.* 1996, Watanabe *et al.* 2001, Hamada *et al.* 1999). Im Vergleich hierzu überwogen die hepatoprotektiven Effekte in Ko-Kulturexperimenten ohne direkten Zell-Zell-Kontakt (Petrasek *et al.* 2011). Die Kultivierung der BMDMs erfolgte daher in Anlehnung an den physiologischen Aufbau der Sinusoide, wo HCs und KCs durch Endothelzellen und den Disse-Raum getrennt sind, in *Transwells* mit porösen Membranen. Die gewählte Porengröße von 0,4 μ m verhinderte die Migration der BMDMs durch die Membran, ein Austausch von Mediatoren konnte jedoch stattfinden. Die eingesetzte Zellzahl (0,8 Mio HCs + 0,1 Mio BMDMs) entsprach dabei in etwa dem Verhältnis von HCs zu KCs in der Leber (vgl. Einleitung). Dabei ist zu bedenken, dass *in vivo* die interzelluläre Kommunikation in den

Sinusoiden neben den HCs und KCs auch von weiteren Zelltypen wie den HSCs und SECs beeinflusst wird. Dieser Einfluss muss in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

4.2.2 Hepatozyten induzieren einen M2-ähnlichen Phänotyp in BMDMs durch direkte Ko-Kultivierung

Mit Hilfe des Ko-Kultursystems konnte ein Einfluss der Hepatozyten auf die Differenzierung der BMDMs demonstriert werden. Ein Anstieg der typischen M2-Marker CD163 und CD206 sowie der Marker Gr1, CD11c, MHCII und TLR4 wurde in kokultivierten BMDMs detektiert, was auf eine Differenzierung zu gewebständigen, alternativ aktivierten Makrophagen hindeutet. Dieser Effekt konnte durch den Transfer von durch Hepatozyten konditioniertem Medium nicht erzeugt werden, die Interaktion beider Zelltypen scheint hierfür notwendig zu sein.

Dass die mittels Hepatozyten induzierte Differenzierung der BMDMs zu einem den Kupffer-Zellen ähnlichen Phänotyp führt, wurde durch die Isolierung der KCs und deren Untersuchung auf die entsprechenden Marker belegt. Zudem wurde die Expression von CD163 und CD206 durch KCs mittels Kofärbung mit F4-80 in Leberschnitten demonstriert.

Ein möglicher Einfluss der Hepatozyten auf die Funktionalität der BMDMs wurde mittels LPS-Stimulation untersucht. Durch die Ko-Kultivierung reagierten die BMDMs mit einer verstärkten RNA-Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10, IFN- β), die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wurde schneller inhibiert (IL-6, IL-12, TNF- α) und die Transkription der Chemokine CCL2-4 erhöht. Auch auf Proteinebene wurde eine erhöhte IL-10 und nach 24 Stunden eine verminderte TNF- α Konzentration im Überstand kokultivierter BMDMs detektiert. Besonders die Freisetzung von hohen Konzentrationen IL-10 sowie die verstärkte Expression von CD163 sind dabei kennzeichnend für regulatorische Makrophagen (Edward *et al.* 2006, Kowal *et al.* 2011). Der Einfluss von konditioniertem Medium auf die Funktionalität von zuvor 2 Tage mono- bzw. kokultivierten BMDMs wurde ebenfalls untersucht. Der Transfer von durch Hepatozyten konditioniertem Medium führte dabei sowohl in zuvor mono- als auch in zuvor kokultivierten BMDMs zu einer signifikant erhöhten IL-10 Expression. Folglich sezernieren Hepatozyten lösliche Faktoren, welche die RNA-Expression erhöhen. Da die IL-10 Expression in der Ko-Kultur-Kontrolle signifikant niedriger ausfiel, wird die Expressionshöhe vermutlich durch die interzelluläre Kommunikation zwischen den HCs

und BMDMs reguliert. Hierfür spricht auch die reduzierte IL-10 Expression nach LPS-Stimulation in zuvor monokultivierten BMDMs infolge des Zusatzes von durch Ko-Kultur konditioniertem Medium im Vergleich zu zuvor monokultivierten BMDMs mit durch Hepatozyten konditioniertem Medium. Die Verwendung von frischem Medium führt zu einer stark reduzierten IL-10 Expression. Neben dem Einfluss des Mediums führte auch die 2-tägige Ko-Kultivierung vor LPS-Stimulation zu einer anhaltenden Differenzierung der BMDMs, da sowohl nach Zugabe von konditioniertem Medium, als auch frischem Medium signifikante Unterschiede zwischen zuvor mono- und kokultivierten BMDMs in der IL-10 Expression detektiert werden konnten.

Die RNA-Expression von IL-6 und IFN- β sank ebenfalls infolge der Zugabe von frischem Medium signifikant. Im Überstand der Zellen befanden sich möglicherweise Faktoren, die für die Zytokinexpression in BMDMs relevant sind. Im Gegensatz zu IL-10 führte hier der Zusatz von konditioniertem Medium jedoch nicht zu einer erhöhten Expression der Gene. Die Expression von IFN- β war sogar signifikant reduziert, so dass auch hier die interzelluläre Kommunikation eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

4.2.3 BMDMs beeinflussen die Expression von Chemokinen und APP in Hepatozyten

Infolge der Ko-Kultivierung wird jedoch nicht nur die Differenzierung und Funktion der BMDMs verändert, auch das Expressionsprofil der Hepatozyten wird durch die BMDMs beeinflusst. Dabei erfolgt die Reaktion der Hepatozyten auf LPS eher indirekt, insbesondere durch Makrophagen freigesetzte Mediatoren (Bode *et al.* 2012b, Seki *et al.* 2007). Es wurde auch eine direkte IL-6 Expression infolge der LPS-Stimulation von Hepatozyten beschrieben, der Nachweis der Reinheit der hier verwendeten primären Hepatozyten-Kulturen wurde scheinbar jedoch vernachlässigt (Norris *et al.* 2014).

Nach Stimulation mit LPS wurde eine verstärkte RNA-Expression der Chemokine CCL2-4 und CXCL1-3 in kokultivierten HCs detektiert und die Expressionen der APP α 2M, CRP, SAP, SAA1, SAA3 und C3 stieg signifikant im Vergleich zu monokultivierten HCs. Die Proteinkonzentration von SAP und CRP im Zellkulturüberstand kokultivierter Zellen war nach 72 Stunden signifikant erhöht, während die von α 2M entgegen der RNA-Expressionsdaten unterhalb der von monokultivierten HCs lag. α 2M hemmt Proteinase verschiedener katalytischer Klassen (z.B. Thrombin, Plasmin, Kallikrein, Kollagenase) und bindet und moduliert die Aktivität verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B.

IL-6, TNF- α , TGF- β , PDGF). Die α 2M-Protease- bzw. α 2M-Zytokin-Komplexe werden endozytiert, wodurch der α 2M-Plasmaspiegel sinkt (Moshage 1997, Boer *et al.* 1993). Eine ebenfalls erniedrigte Proteinkonzentration im Überstand kokultivierter Hepatozyten wurde für Haptoglobin detektiert, während die RNA-Expression keine Unterschiede aufwies. Haptoglobin (Hp) bindet Hämoglobin (Hb) und reduziert so den Eisenverlust und schützt die Nieren während der Hämolyse. Der Hp-Hb Komplex bindet an den Scavenger-Rezeptor CD163 und wird endozytiert, wodurch die Hp-Konzentration im Plasma sinkt (Abdullah *et al.* 2012). Gezeigt wurde auch ein signifikante Anstieg der Oberflächenexpression von CD163 bei humanen Monozyten und Makrophagen infolge der Stimulation mit Hp-Hb (Ugocsai *et al.* 2006). Die hier verwendete Konzentration (100 μ g/ml Hp-Hb) lag jedoch weit über der in dieser Arbeit detektierten Hp-Konzentration im Zellkulturüberstand. Zudem wurde die Induktion der CD163 Expression bisher nur für den Hp-Hb-Komplex beschrieben, während das hier verwendete Test-System kein Hämoglobin aufweist. Haptoglobin wurde auch als ein alternativer Ligand für das Integrin CD11b/CD18 beschrieben (Ghmati *et al.* 1996). Durch eine mögliche Bindung an dieses Integrin, wäre die erniedrigte Hp-Konzentration im Überstand kokultivierter Hepatozyten ebenfalls erklärbar.

Trotz signifikanter Unterschiede in der RNA-Expression diverser Chemokine in ko- bzw. monokultivierten Hepatozyten nach LPS-Stimulation, demonstrierten die Proteinkonzentrationen derselben im Überstand, dass die Hepatozyten hier neben den BMDMs nur eine untergeordnete Rolle spielen. Dies belegen auch *in vivo* Daten, die nach KC-Depletion und LPS-Stimulation eine > 80 %ige Reduktion der CCL3 und CCL4 Konzentration im Serum zeigen (Kopydlowski *et al.* 1999).

4.2.4 Einfluss verschiedener Gen-*knockouts* auf die Differenzierung von BMDMs

Für die Identifizierung möglicher relevanter Faktoren für die Differenzierung wurden mk2-, il-10- und ifn α -Rezeptor-defiziente BMDMs bzw. Hepatozyten für die Ko-Kultur verwendet. Infolge der LPS-Stimulation erfolgt die Aktivierung der p38^{MAPK} und daraus resultierend die Aktivierung von MK2. Dieser Signalweg spielt eine Schlüsselrolle der initialen Ausschüttung inflammatorischer Zytokine durch aktivierte Makrophagen, aber auch bei der IL-10 vermittelten Dämpfung der Inflammation (Bode *et al.* 2012a). Durch die Verwendung von mk2-defizienten Hepatozyten bzw. BMDMs im Ko-Kultursystem

konnten jedoch keine deutlichen Veränderungen in der Differenzierung der BMDMs im Vergleich zu den wt-Zellen festgestellt werden. Nach LPS-Stimulation wurde eine verminderte IFN- β RNA-Expression in kokultivierten mk2^{-/-} BMDMs detektiert. Dies wird durch die fehlende MK3-Inhibition infolge der MK2-Defizienz bedingt, wodurch der *Interferon regulatory factor 3* (IRF3) gehemmt wird. Da IFN- β auto- bzw. parakrin die IL-10 Expression induzieren kann, ist hier die verminderte IL-10 Expression folgerichtig (Chang *et al.* 2007, Bode *et al.* 2012a). Die durch die Verwendung von mk2^{-/-} Hepatozyten in den BMDMs induzierte verminderte Expression von IL-6, IFN- β und IL-10 weist darauf hin, dass in den Hepatozyten mk2-abhängig ein Signal für die RNA-Expression dieser Zytokine in BMDMs generiert wird. Um welches Signal es sich dabei handelt, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Durch die Verwendung von ifn α -Rezeptor- bzw. il-10-defizienten Zellen für die Ko-Kultivierung wurde das oben beobachtete Ergebnis verifiziert. Entsprechend der MK2 wies auch IL-10 keinen deutlichen Einfluss auf die Expression der Differenzierungsmarker auf. Der fehlende IFN α -Rezeptor in BMDMs führte hingegen zu einer etwas reduzierten Expression von Gr1, CD11c und CD163. Umgekehrt war kein Unterschied detektierbar.

Da für die Expression von Chemokinen als auch APP pro-inflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle spielen, wurde der Einfluss des anti-inflammatorisch wirksamen IL-10 hierauf durch die Verwendung von il-10-defizienten BMDMs untersucht. Nach entsprechender Ko-Kultivierung und Stimulation mit LPS wurden für CXCL1 und -2 sowie CRP und FG- α signifikant erhöhte RNA-Expressionen im Vergleich zur Ko-Kultur mit wt-Zellen detektiert. Dies entspricht der Beobachtung, dass IL-10 die Chemokinsynthese hemmt (Kim *et al.* 1998, Hamilton *et al.* 2002). Die Hemmung der Expression von APP durch IL-10 wurde hingegen bisher nicht näher beschrieben.

4.2.5 TGF- β hemmt die Expression von M2-typischen Markern

Es ist bekannt, dass TGF- β die Expression von CD163 inhibiert (Pioli *et al.* 2004). Durch den Zusatz von TGF- β zu humanen Monozyten sanken sowohl dessen RNA- als auch die Proteinexpression. Die Rolle von TGF- β in der Kontrolle der Genexpression für alternativ aktivierte Makrophagen wurde durch die Verwendung von TGF- β II Rezeptor-defizienten Mäusen untersucht. Der Rezeptor-Knockout führte dabei zu einem verminderten M2-Phänotyp bei Alveolar-Makrophagen (Gong *et al.* 2012). In dieser Arbeit wurde ein

Inhibitor für den TGF- β Rezeptor verwendet um mögliche Einflüsse von TGF- β auf die Differenzierung der BMDMs zu untersuchen. Tatsächlich stieg die Expression der Differenzierungsmarker CD163 und CD206 durch den Inhibitor sowohl in mono- als auch in kokultivierten BMDMs signifikant gegenüber der jeweiligen Kontrolle und die Differenz zwischen mono- und kokultivierten Zellen sank erheblich. Diese Daten lieferten einen ersten Hinweis auf die hemmende Wirkung von TGF- β auf die Differenzierung von Makrophagen Richtung M2. Auf funktioneller Ebene führte der Inhibitor nach LPS-Stimulation zu einer verminderten RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-12 in kokultivierten BMDMs, während die Expression von IL-6 in monokultivierten BMDMs stieg. Die verminderte IL-10 Expression in kokultivierten bzw. die unveränderte IL-10 Expression in monokultivierten BMDMs nach Inhibition des TGF- β Rezeptors stehen einer M2-Differenzierung entgegen. Entsprechend der Unterscheidung von M1- und M2-Makrophagen anhand des Verhältnisses der Expression von IL-10 zu IL-12 (Mosser und Edwards 2008) wäre hier eine verstärkte IL-10 Expression zu erwarten gewesen. Ein inhibitorischer Effekt von TGF- β 1 auf die RNA- und Proteinexpression von IL-10 wurde bereits in PBMC beschrieben (Reinhold *et al.* 1995). Diesen erzielten sie jedoch durch eine Konzentration von 10 ng/ml TGF- β 1, was deutlich über der in diesen Testsystemen detektierten Konzentration liegt. Hingegen konnte gezeigt werden, dass TGF- β in T_H1- aber nicht in T_H2-Zellen zu einer erhöhten IL-10 Synthese führt (Kapitein *et al.* 2007). Diese Beobachtungen lassen eine komplexe Regulation der IL-10 Expression in Abhängigkeit von TGF- β und der jeweiligen Zelldifferenzierung vermuten.

Für TGF- β sind vielfältige Funktionen bekannt. Neben Proliferation, Differenzierung und Migration ist es auch an der Modulation von inflammatorischen Prozessen, Wundheilung (Kollagensynthese, Angiogenese) sowie der immunologischen Homöostase und Toleranz beteiligt (Wan und Flavell 2007, Ignatz und Massague 1986, Mustoe *et al.* 1987, Roberts *et al.* 1986). Der Versuch TGF- β 1 knockout Mäuse zu generieren führte zu extremen immunologischen Dysregulationen und frühem Tod der Tiere (Kulkarni *et al.* 1993). Heute weiß man, dass potenziell alle Zellen in der Lage sind TGF- β zu produzieren und auf TGF- β zu reagieren (Li *et al.* 2006). Die Freisetzung erfolgt dabei in einer inaktiven Form, dem sogenannten *latency* oder *latent* TGF- β . Dabei ist TGF- β über das *latency-associated peptide* (LAP) an das sogenannte *latent* TGF- β *binding protein* (LTBP) gebunden. Zusammen bezeichnet man dies als *large latent complex* (LLC). Nach der Sekretion bindet LLC meist an Kollagen oder andere Matrixproteine (Taylor 2009). Die Aktivierung von TGF- β kann über Proteasen, Rezeptoren, Thrombospondin-1, durch

Integrine, reaktive Sauerstoffspezies oder einen veränderten pH-Wert erfolgen (Taylor 2009, Annes *et al.* 2003).

Untersuchungen der TGF- β RNA-Expression ergaben in monokultivierten BMDMs eine gegenüber kokultivierten BMDMs etwas erhöhte Expression. Betrachtet man jedoch die Proteinkonzentration von TGF- β gesamt, so sind ab Tag 2 keine Unterschiede mehr erkennbar, bezieht man die Proteinkonzentration auf die jeweilige Zellzahl. Die Konzentration des aktiven TGF- β lag unterhalb der Detektionsgrenze und konnte nicht ermittelt werden. Ein Grund hierfür ist möglicherweise die Bindung des aktiven TGF- β an α 2M und der anschließenden Internalisierung (Moshage 1997).

5. Zusammenfassung

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit Untersuchungen zur Leberregeneration. Basierend auf einer Transkriptanalyse von 48 Genen im Lebergewebe sowie der Untersuchung von sekretierten Mediatoren im Serum wurden zeitaufgelöst differenziell regulierte Faktoren nach 2/3 partieller Hepatektomie (PHx) bzw. Sham-Operationen an Mäusen identifiziert. Dabei wurden signifikant erhöhte RNA-Expressionen besonders nach 8 Stunden und/oder 2 Tagen von CCL9, IL-33, Nrg1, Hepcidin, α 2M, SAP, C3, SAA2, SAA3 und ORM1 nach PHx im Vergleich zu Sham-behandelten Mäusen detektiert. Auf Proteinebene wiesen CCL2, IL-6 und IL-10 signifikant erhöhte Konzentrationen auf. Während bereits Funktionen für Hepcidin, IL-6 und IL-10 während der Regeneration beschrieben wurden, ist die Relevanz der übrigen Faktoren für die Leberregeneration bisher ungeklärt. Die Faktoren CCL2, CCL9, IL-33 und Nrg1 wurden im Zusammenhang mit Hepatektomien bisher noch nicht beschrieben. Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, dass das Fehlen des *mk2*-Gens die Proliferation der Hepatozyten nach PHx negativ beeinflusst.

Etwa 80 % aller sessilen Gewebsmakrophagen des Körpers befinden sich in der Leber. Diese können neueren Untersuchungen zufolge in zwei Populationen unterteilt werden, wobei die größere Population, welche auf entzündliche Stimuli reagiert, ihren Ursprung im Knochenmark hat (Klein *et al.* 2007). Um ein besseres Verständnis der komplexen Vorgänge in der Leber zu erhalten wurde im zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss der interzellulären Kommunikation von Hepatozyten und Makrophagen auf die Differenzierung und Funktion dieser Zellen untersucht. Hierfür wurde in Anlehnung an den physiologischen Aufbau der Sinusoide, dem Verhältnis der Zellzahl zueinander und dem Ursprung der größeren Kupffer-Zell-Population ein *in vitro* Testsystem etabliert. In diesem wurden Hepatozyten im Kollagen-Sandwich kultiviert, welches die zelluläre Polarisation der Zellen stabilisiert und *Bone-marrow derived macrophages* (BMDMs) wurden in *Transwells* mit Poren der Größe 0,4 μ m eingesetzt. Dieses Testsystem erlaubte die bidirektionale Kommunikation beider Zelltypen und eine separate Analyse der Zellen. Mit Hilfe dieses Ansatzes wurde ein zeitabhängig verändertes Profil von Differenzierungsmarkern der BMDMs demonstriert, welches eine verstärkte Expression von CD163, CD206, Gr-1, MHCII und TLR4 beinhaltet. Dieses Profil entspricht in wesentlichen Punkten dem von primären Kupffer-Zellen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass

Hepatozyten in der Lage sind Differenzierungsprozesse in Makrophagen zu induzieren. Diese Differenzierungen gehen mit deutlichen funktionellen Veränderungen einher, die sich insbesondere in der verstärkten Expression von IL-10 und IFN- β nach LPS-Stimulation niederschlagen. In Übereinstimmung mit der bisher bekannten Literatur konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass die Präsenz von Makrophagen essentiell ist für die Induktion einer Akut-Phase-Antwort in Hepatozyten. Darüber hinaus konnte ein verändertes Chemokinprofil nach LPS-Stimulation in beiden Zelltypen infolge der Ko-Kultivierung demonstriert werden. Überraschend war, dass LPS in aufgereinigten Hepatozyten (ohne Gegenwart von Makrophagen) die Expression von Chemokinen (CCL2-4, CXCL1-3) zu induzieren vermark. Ergebnisse aus Studien mit Inhibitoren legen ferner nahe, dass die Induktion von TGF- β für den Einfluss der interzellulären Kommunikation mit Hepatozyten auf die Makrophagendifferenzierung von Bedeutung ist. Die resultierende Hypothese geht davon aus, dass Hepatozyten Faktoren freisetzen, welche die Aktivierung von TGF- β verhindern.

6. Summary

The first part of this work focuses on studies on liver regeneration. Based on a transcript analysis of 48 genes in liver tissue and the study of secreted mediators in serum after 2/3 partial hepatectomy or sham treated mice time-resolved differentially regulated factors were identified. Thereby significantly increased RNA expressions were detected particularly after 8 hours and/or 2 days for CCL9, IL-33, Nrg1, Hepcidin, α 2M, SAP, C3, SAA2, SAA3 and ORM1 after PHx compared to Sham-treated mice. On the level of proteins CCL2, IL-6 and IL-10 showed significantly enhanced concentrations. While already functions for hepcidin, IL-6 and IL 10 were described during regeneration, the relevance of the other factors for liver regeneration is still unclear. The factors CCL2, CCL9, IL-33 and Nrg1 in connection with hepatectomy have not been described yet. Furthermore, it was the first time to show that the lack of mk2 gene negatively affects the proliferation of hepatocytes after PHx.

Approximately 80 % of all sessile tissue macrophages of the body are located in the liver. According to recent studies the Kupffer cells can be divided into two populations, in which the larger population, which responds to inflammatory stimuli, has its origin in the bone marrow (Klein *et al.* 2007). In the second part of this work the influence of the intercellular communication between hepatocytes and macrophages was tested to obtain a better understanding of the complex processes in the liver. The aim was to analyze the mutual influence on the differentiation and function of these cells. In line with the physiological structure of the sinusoid, the ratio of the cell number and the origin of the larger Kupffer cell population, an *in vitro* test system was established. In this hepatocytes were cultured in collagen sandwich, which stabilizes the cellular polarization, together with bone-marrow derived macrophages (BMDMs), which were cultured in transwells with a pore size of 0.4 μ m. This test system allows bi-directional communication of both cell types and a separate analysis of the cells. Using this approach, a time-dependent changing profile of differentiation markers of BMDMs was demonstrated, which includes enhanced expression of CD163, CD206, Gr-1, MHCII and TLR4. This profile corresponds substantially with the primary Kupffer cells. This result suggests that hepatocytes are able to induce differentiation processes in macrophages. These differences are associated with significant functional changes, which are reflected in particular in the increased expression of IL-10 and IFN- β by LPS stimulation. In

accordance with known literature this work shows that the presence of macrophages is essential for the induction of an acute phase response in hepatocytes. In addition, a modified chemokine profile could be demonstrated after LPS stimulation in both cell types as a result of co-culture. It was surprising that LPS was also able to induce the expression of chemokines (CCL2-4, CXCL1-3) in highly purified hepatocytes (without the presence of macrophages).

Results from studies with inhibitors suggest that the induction of TGF- β is important for the influence of intercellular communication, especially for the macrophage differentiation. The resulting hypothesis assumes that hepatocytes release factors preventing the activation of TGF- β .

7. Literaturverzeichnis

Abdullah M, Kähler D, Vock C, Reiling N, Kugler C, Drömann D, Rupp J, Hauber HP, Fehrenbach H, Zabel P, Vollmer E, Dalhoff K, Goldmann T. 2012. Pulmonary haptoglobin and CD163 are functional immunoregulatory elements in the human lung. *Respiration*. 83:61-73

Abshagen K, Eipel C, Kalff JC, Menger MD, Vollmar B. 2007. Loss of NF-kappaB activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:1570-1577

Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. 2006. Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res* 134:354-362

Albrecht U, Yan X, Asselta R, Keitel V, Tenchini ML, Ludwig S, Heinrich PC, Häussinger D, Schaper F, Bode JG. 2007. Activation of NF-kappaB by IL-1beta blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human gamma-fibrinogen gene. *Cell. Signal.* 19:1866-1878

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 116:217-24

Arango Duque G, Descoteaux A. 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 5:491

Arii S, Imamura M. 2000. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 7:40-8

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204: 1057-1068

Bader A, Knop E, Kern A, Boker K, Fruhauf N, Crome O, Esselmann H, Pape C, Kempka G, Sewing KF. 1996. 3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes-design of an organotypical model. *Exp Cell Res.* 226:223-33

Baier PK, Baumgartner U, Hempel S, Wolff-Vorbeck G, von Dobschuetz E, Hopt UT. 2005. Kupffer cells infiltrate liver tissue early after ischemia-reperfusion and partial hepatectomy. *Eur Surg Res* 37:290-297

Bankey PE, Hill S, Geldon D. 1994. Sequential insult enhances liver macrophage-signaled hepatocyte dysfunction. *J Surg Res.* 57:185-91

Baumann H, Gauldie J. 1994. The acute phase response. *Immunol. Today* 15: 74-80

- Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, St Groth BF. 2001. Antigen-specific primary activation of CD8(+) T cells within the liver. *J. Immunol.* 166: 5430–5438
- Bertolino P, Trescol-Biémont MC, Rabourdin-Combe C. 1998. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol.* 28: 221-36
- Billiar TR, Lysz TW, Curran RD, Bentz BG, Machiedo GW, Simmons RL. 1990. Hepatocyte modulation of Kupffer cell prostaglandin E2 production in vitro. *J Leukoc Biol.* 47:305–11
- Bissell DM, Arenson DM, Maher JJ, Roll FJ. 1987. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest.* 79:801–12
- Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. 1995. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 96:447-455
- Biswas SK, Lopez-Collazo E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 30: 475-487
- Black D, Lyman S, Heider TR, Behrns KE. 2004. Molecular and cellular features of hepatic regeneration. *J Surg Res* 117:306-315
Blood. 110:4077-4085
- Bode JG, Albrecht U, Häussinger D, Heinrich PC, Schaper F. 2012b. Hepatic acute phase proteins – Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. *Eur. J. Cell. Biol.* 91: 496-505
- Bode JG, Ehrling C, Häussinger D. 2012a. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal.* 24(6):1185-94
- Bode JG, Fischer R, Häussinger D, Graeve L, Heinrich PC, Schaper F. 2001. The inhibitory effect of IL-1 beta on IL-6-induced alpha 2-macroglobulin expression is due to activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* 167: 1469-1481
- Bode JG, Heinrich PC. 2001. Interleukin-6 signaling during the acute-phase response of the liver. In *the Liver: Biology and Pathobiology.* 4 ed. 565-580
- Boulton R, Woodman A, Calnan D, Selden C, Tam F, Hodgson H. 1997. Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1alpha and -1beta: a mechanism of negative regulation of hepatocyte proliferation. *Hepatology* 26: 49-58
- Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. 1986. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology.* 6: 718-722
- Bouwens L, Wisse E. 1992. Pit cells in the liver. *Liver* 12:3-9
- Braiterman LT, Hubbard AL. 2009. Hepatocyte surface polarity: its dynamic maintenance and establishment. In: *The liver.* Wiley, New York, pp 73–105
- Brandt E, Woerly G, Younes AB, Loiseau S, Capron M. 2000. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 68: 125-130

Campbell JS, Argast GM, Yuen SY, Hayes B, Fausto N. 2011. Inactivation of p38 MAPK during liver regeneration. *Int J Biochem Cell Biol.*43:180-8

Carr BI, Hayashi I, Branum EL, Moses HL. 1986. Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type β -transforming growth factor. *Cancer Res.* 46:2330–2334

Casteleijn E, Kuiper J, van Rooij HC, Kamps JA, Koster JF, van Berkel TJ. 1988. Endotoxin stimulates glycogenolysis in the liver by means of intercellular communication. *J Biol Chem.* 263:6953–5

Chang EY, Guo B, Doyle SE, Cheng G. 2007. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J Immunol.* 178:6705-9

Charo IF, Ransohoff RM. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 354:610-21

Chen GY, Nunez G. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 10:826–37

Chen MF, Hwang TL, Hung CF. 1991. Human liver regeneration after major hepatectomy. A study of liver volume by computed tomography. *Ann Surg* 213:227-229

Clayton DF, Darnell JE., Jr 1983. Changes in liver-specific compared to common gene transcription during primary culture of mouse hepatocytes. *Mol Cell Biol.* 3:1552–61

Clayton DF, Harrelson AL, Darnell JE., Jr. 1985. Dependence of liver-specific transcription on tissue organization. *Mol Cell Biol.* 5:2623–32

Colletti LM, Green M, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM. 1998. Proliferative effects of CXC chemokines in rat hepatocytes in vitro and in vivo. *Shock* . 10:248-257

Colombo S, Buclin T, Décosterd LA, Telenti A, Furrer H, Lee BL, Biollaz J, Eap CB. 2006. Orosomucoid (alpha1-acid glycoprotein) plasma concentration and genetic variants: effects on human immunodeficiency virus protease inhibitor clearance and cellular accumulation. *Clin Pharmacol Ther.* 80:307-18

Cornell RP. 1985. Restriction of gut-derived endotoxin impairs DNA synthesis for liver regeneration. *Am J Physiol* 249:563-569

Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. 2002. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 89:1089-1095

Cray C, Zaias J, Altman NH. 2009. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med.* 59:517-26

Crispe IN.2009. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 27: 147-163

Dabeva MD, Shafritz DA. 1993. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 143:1606-1620

De Boer JP, Creasey AA, Chang A, Abbink JJ, Roem D, Eerenberg AJ, Hack CE, Taylor FB Jr. 1993. Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infect Immun.* 61:5035-43

Domanova O, Borbe S, Mühlfeld S, Becker M, Kubitz R, Häussinger D, Berlage T. 2011. Toponomics method for the automated quantification of membrane protein translocation. *BMC Bioinformatics.* 12:370

Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML. 1991. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog.* 7:237-45

Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG. 1989. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *Faseb J.* 3:174-7

Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* 80: 1298-1307

El Ghmati SM, Van Hoeyveld EM, Van Strijp JG, Ceuppens JL, Stevens EA. 1996. Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *J Immunol.* 156:2542-52

Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. 2007. IL-10, regulatory T cells and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology.* 45: 475-85

Erwik LP, Henson PM. 2007. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am. J. Pathol.* 171:2-8

Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, Synguelakis M, von Aulock S, Sallenave JM, McKenzie AN, Kanellopoulos J. 2009. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J Immunol.* 183:1446-55

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF β , PGE2 and PAF. *J. Clin. Invest.* 101: 890-898

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. 2006. Liver regeneration. *Hepatology* 43:45-53

Fausto N. 2000. Liver regeneration. *J Hepatol* 32:19-31

Fausto N. 2001. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transplantation* 7:835-844

Fausto N. 2001b. Liver regeneration, in: *The liver: biology and pathobiology.*, edited by I.M. Arias, J.L. Boyer, F.V. Chisari, N. Fausto, D. Schachter, and D.A. Shafritz (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001), pp. 591-610

Fausto N. 2004. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology*. 39:1477-1487

Ferrara N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 25:581-611

Fischer WH, Jagels MA, Hugli TE. 1999. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg). *J Immunol*. 162:453-9

Fixe P, Praloran V. 1998. M-CSF: haematopoietic growth factor or inflammatory cytokine? *Cytokine*. 10:32-7

Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. 2007. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447: 972-978

Francavilla A, Zeng Q, Polimeno L, Carr BI, Sun D, Porter KA, Van Thiel DH, Starzl TE. 1994. Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model of hepatic regeneration. *Hepatology* 19:210-216

Friedman SL. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275:2247-2250

Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y. 2002. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 36:653-659

Fuller SJ, Sivarajah K, Sugden PH. 2008. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 44:831-54

Fulop AK, Pocsik E, Brozik M, Karabelyos C, Kiss A, Novak I, Szalai C, Dobozy O, Falus A. 2001. Hepatic regeneration induces transient acute phase reaction: systemic elevation of acute phase reactants and soluble cytokine receptors. *Cell Biol Int*. 25:585-92.

Fulop AK, Pocsik E, Brozik M, Karabelyos C, Kiss A, Novak I, Szalai C, Dobozy O, Falus A. 2001. Hepatic regeneration induces transient acute phase reaction: systemic elevation of acute phase reactants and soluble cytokine receptors. *Cell Biol Int*. 25:585-92

Gao B, Jeong WI, Tian Z. 2008. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47:729-736

Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G. 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*. 378:390-394

Godoy P, Hengstler JG, Ilkavets I, Meyer C, Bachmann A, Muller A, Tuschl G, Mueller SO, Dooley S. 2009. Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology*. 49:2031-43

Gomez-Lechón MJ, Jover R, Donato T, Ponsoda X, Rodriguez C, Stenzel KG, Klocke R, Paul D, Guillen I, Bort R, Castell JV. 1998. Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *J Cell Physiol*. 177:553-62

Gong D, Shi W, Yi SJ, Chen H, Groffen J, Heisterkamp N. 2012. TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol.* 13:31

Gonzalez HE, Eugenin EA, Garces G, Solis N, Pizarro M, Accatino L, Saez JC. 2002. Regulation of hepatic connexins in cholestasis: possible involvement of Kupffer cells and inflammatory mediators. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282:G991–G1001

Haimerl F, Erhardt A, Sass G, Tiegs G. 2009. Down-regulation of the de-ubiquitinating enzyme ubiquitin-specific-protease(USP)2 contributes to TNF α -induced hepatocyte survival. *J Biol Chem.* 284:495–540

Hamada E, Nishida T, Uchiyama Y, Nakamura J, Isahara K, Kazuo H, Huang TP, Momoi T, Ito T, Matsuda H. 1999. Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin. *J Hepatol.* 30:807–18

Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. 2002. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunol Res.* 25:229-45

Hara T, Bacon KB, Cho LC, Yoshimura A, Morikawa Y, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Schall TJ, Miyajima A. 1995. Molecular cloning and functional characterization of a novel member of the C-C chemokine family. *J Immunol.* 155:5352-8

Hata S, Namae M, Nishina H. 2007. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ* 49:163-170

Hau J, Cervinková Z, O'Brien D, Stodulski G, Simek J. 1995. Serum levels of selected liver proteins following partial hepatectomy in the female rat. *Lab Anim.* 29:185-91

Häussinger D, Kubiz R, Reinehr R, Bode JG, Schliess F. 2004. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol Aspects Med* 25: 221-360

He Y, Sadahiro T, Noh SI, Wang H, Todo T, Chai NN, Klein AS, Wu GD. 2009. Flow cytometric isolation and phenotypic characterization of two subsets of ED2(+) (CD163) hepatic macrophages in rats. *Hepatol Res.* 39:1208–18

Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334:297–314

Herkel J, Jagemann B, Wiegand C, Lazaro JF, Lueth S, Kanzler S, et al. 2003. MHC classII-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 β T lymphocytes. *Hepatology.* 37:1079–85

Higgins GM, and Anderson RM. 1931. Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol* 12:186-202

Hoebe KH, Witkamp RF, Fink-Gremmels J, van Miert AS, Monshouwer M. 2001. Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280:G720–8

Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhauser ML, Lukacs NW, Colletti LM, Simpson KJ, et al. 1999. Novel CXCR2-dependent liver regenerative qualities of ELR-containing CXC chemokines. *FASEB J.* 13:1565-1574

Holness CL, Simmons DL. 1993. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 81:1607-13

Ignatz RA, Massagué J. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 261:4337-45

Igotz D, Olatz F, Ainhoa I, Yuri R, Wing-Kin S, Ana M. Z, Begoña O. 2011. A role for transcription factor E2F2 in hepatocyte proliferation and timely liver regeneration. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiol*. 301:G20-31

Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS. 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*. 62:65-74

Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S. 2009. Liver architecture, cell function, and disease. *Semin. Immunopathol*. 31:399-409

Italiani P, Boraschi D. 2014. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 5:514

Kapitein B, Tiemessen MM, Liu WM, van Ieperen-van Dijk AG, Hoekstra MO, van Hoffen E, Knol EF. 2007. The interleukin-10 inducing effect of transforming growth factor-beta on human naive CD4+ T cells from cord blood is restricted to the TH1 subset. *Clin Exp Immunol*. 147:352-8

Keller GA, West MA, Cerra FB, Simmons RL. 1985. Multiple systems organ failure. Modulation of hepatocyte protein synthesis by endotoxin activated Kupffer cells. *Ann Surg*. 201:87-95

Keller GA, West MA, Cerra FB, Simmons RL. 1986. Macrophage-mediated modulation of hepatocyte protein synthesis. Effect of dexamethasone. *Arch Surg*. 121:1199-205

Keller GA, West MA, Harty JT, Wilkes LA, Cerra FB, Simmons RL. 1985. Modulation of hepatocyte protein synthesis by endotoxin-activated Kupffer cells. III. Evidence for the role of a monokine similar to but not identical with interleukin-1. *Ann Surg*. 201:436-43

Keller GA, West MA, Wilkes LA, Cerra FB, Simmons RL. 1985. Modulation of hepatocyte protein synthesis by endotoxin-activated Kupffer cells. II. Mediation by soluble transferrable factors. *Ann Surg*. 201:429-35

Kern A, Bader A, Pichlmayr R, Sewing KF. 1997. Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol*. 54:761-72

Kim HS, Armstrong D, Hamilton TA, Tebo JM. 1998. IL-10 suppresses LPS-induced KC mRNA expression via a translation-dependent decrease in mRNA stability. *J. Leukocyte Biol*. 64:33

Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. 2000. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology*. 31:75-82

Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John B, Wuensch SA, Topham DJ, Pierce RH, et al. 2007. Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood*. 110:4077-85

Knolle P, Löhr H, Treichel U, Dienes HP, Lohse A, Schlaack J, Gerken G. 1995. Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Z Gastroenterol* 33:613-620

Koide N, Shinji T, Tanabe T, Asano K, Kawaguchi M, Sakaguchi K, Koide Y, Mori M, Tsuji T. 1989. Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun*. 161:385-91

Koj A, Rokita H, Kordula T, Kurdowska A, Travis J. 1991. Role of cytokines and growth factors in the induced synthesis of proteinase inhibitors belonging to acute phase proteins. *Biomed. Biochim. Acta* 50:421-425

Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. 2003. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 197:634-659

Kono H, Rock KL. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Rev. Immunol.* 8:279-289

Kordes C, Sawitza I, Götze S, Häussinger D. 2013. Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*. 31:290-304

Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. 2008. Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367:116-123

Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. 2009. Hepatic and pancreatic stellate cells in focus. *Biol. Chem.* 390:1003-1012

Kordes C, Sawitza I, Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Häussinger D. 2007. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352:410-417

Kordula T, Rokita H, Koj A, Fiers W, Gauldie J, Baumann H. 1991. Effects of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor on the acute phase response and DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* 10:23-26

Kowal K, Silver R, Sławińska E, Bielecki M, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O. 2011. CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochem Cytobiol.* 49:365-74

Kreider T, Anthony RM, Jr, Urvan JF, Gause WC. 2007. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* 19:448-453

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:770-4

- Kurose I, Miura S, Higuchi H, Watanabe N, Kamegaya Y, Takaishi M, Tomita K, Fukumura D, Kato S, Ishii H. 1996. Increased nitric oxide synthase activity as a cause of mitochondrial dysfunction in rat hepatocytes: roles for tumor necrosis factor alpha. *Hepatology*. 24:1185–92
- Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol*. 183:6469-77
- LaMarre J, Wollenberg GK, Gonias SL, Hayes MA. 1991. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated alpha 2-macroglobulins. *Lab Invest*. 65:3-14
- Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C, Martin W, Fornwald J, Lehr R, Harling J, Gaster L, Callahan JF, Olson BA. 2002. Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol*. 62:58-64
- Lecluyse EL, Audus KL, Hochman JH. 1994. Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol*. 266:C1764–74
- Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. 1995. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature*. 1995 378:394-8
- Lelbach A, Scharf JG, Ramadori G. 2001. Regulation of insulin-like growth factor-I and of insulin-like growth factor binding protein-1, -3 and -4 in cocultures of rat hepatocytes and Kupffer cells by interleukin-6. *J Hepatol*. 35:558–67
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 24:99-146
- Libbrecht L, Roskams T. 2002. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 13:389-396
- Limmer A, Knolle PA. 2001. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 49 Suppl 1:S7-11
- Loke P, Gallagher I, Nair MG, Zang X, Brombacher F, Mohrs M, Allison JP, Allen JE. 2007. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *J. Immunol*. 179:3926-3936
- Lu J, Kang J, Zhang C, Zhang X. 2015. The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells. *Immunol Lett*. 164:11-17
- Lysz TW, Billiar TR, Curran RD, Simmons RL, Machiedo GW. 1990. Kupffer cell-hepatocyte interactions and the changes in 1–14C-arachidonate incorporation in response to endotoxin in vitro. *Prostaglandins*. 39:497–514
- Mackanness GB. 1977. Cellular immunity and the parasite. *Adv. Exp. Med. Biol*. 93:65-73
- Mackiewicz A, Ganapathi MK, Schultz D, Samols D, Reese J, Kushner I. 1988. Regulation of rabbit acute phase protein biosynthesis by monokines. *Biochem J*. 253:851–7

Malik R, Selden C, Hodgson H. 2002. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol* 13:425-431

Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. 2006. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol.* 6:907-18

Manzanero S. 2012. Generation of mouse bone marrow-derived macrophages. In *Methods in Molecular Biology*. 844th edition. Edited by Anonymous. p177–181

Markus PM, König S, Liersch T, Becker H. 2000. Die Leberregeneration. *Onkologe* 6:348-355

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front. Bioscl.* 13:65-73

Meijer C, Wiezer MJ, Diehl AM, Yang SQ, Schouten HJ, Meijer S, van Rooijen N, van Lambalgen AA, Dijkstra CD, van Leeuwen PA. 2000. Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 20:66-77

Meyer D, Birchmeier C. 1995. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature.* 378:386-90

Michalopoulos GK and DeFrances MC. 1997. Liver regeneration. *Science* 276:60-66

Michalopoulos GK. 1994. Control mechanisms of liver regeneration. *J Gastroenterol* 29:23-29

Michalopoulos GK. 2007. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213:286-300

Milland J, Tsykin A, Thomas T, Aldred AR, Cole T, Schreiber G. 1990. Gene expression in regenerating and acute-phase rat liver. *Am J Physiol* 259: G340–G347

Milosevic N, Schawalder H, Maier P. 1999. Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 368:75–87

Minuk GY. 2003. Hepatic regeneration: If it ain't broke, don't fix it. *Can J Gastroenterol.* 17:418-24

Mitaka T. 1998. The current status of primary hepatocyte culture. *Int J Exp Pathol.* 79:393–409

Mitchell C, Willenbring H. 2008. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc.* 3:1167-70

Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Risler T, Erley CM, Bader BD, Berger ED, Lauchart W, Peszynski P, Freytag J, Hickstein H, Loock J, Löhr JM, Liebe S, Emmrich J, Korten G, Schmidt R. 2000. Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transpl* 6:277-286

- Mohamadzadeh M, Poltorak AN, Bergstressor PR, Beutler B, Takashima A. 1996. Dendritic cells produce macrophage inflammatory protein-1 gamma, a new member of the CC chemokine family. *J Immunol.* 156:3102-6
- Moshage H. 1997. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J. Pathol.* 181:257-266
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8:958-969
- Mosser DM. 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73:209-212
- Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. 1987. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science.* 23:1333-6
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204:3037-3047
- Norris CA, He M, Kang LI, Ding MQ, Radder JE, Haynes MM, Yang Y, Paranjpe S, Bowen WC, Orr A, Michalopoulos GK, Stolz DB, Mars WM. 2014. Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli. *PLoS One.* 9:e96053
- O'Shea JJ, Murray PJ. 2008. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity.* 28:477-487
- Odiote O, Hill MF, Sawyer DB. 2012. Neuregulin in cardiovascular development and disease. *Circ Res.* 111:1376-85
- Ogawa K, Medline A, Farber E. 1979. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: the comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. *Br J Cancer* 40:782-790
- Olynyk JK, Clarke SL. 1998. Isolation and primary culture of rat Kupffer cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 13:842-5
- Onofre G, Kolácková M, Jankovicová K, Krejsek J. 2009. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 52:57-61
- Parker GA, Picut CA. 2005. Liver immunobiology. *Toxicol Pathol* 33:52-62
- Petrasek J, Dolganiuc A, Csak T, Nath B, Hritz I, Kodys K, Catalano D, Kurt-Jones E, Mandrekar P, Szabo G. 2011. Interferon regulatory factor 3 and type I interferons are protective in alcoholic liver injury in mice by way of crosstalk of parenchymal and myeloid cells. *Hepatology.* 53:649-60
- Pioli PA, Goonan KE, Wardwell K, Guyre PM. 2004. TGF-beta regulation of human macrophage scavenger receptor CD163 is Smad3-dependent. *J Leukoc Biol.* 76:500-8
- Pistoi S, Morello D. 1996. Liver regeneration 7: Prometheus' myth revisited: transgenic mice as a powerful tool to study liver regeneration. *FASEB J* 10:819-828

Poltorak AN, Bazzoni F, Smirnova II, Alejos E, Thompson P, Luheshi G, Rothwell N, Beutler B. 1995. MIP-1 gamma: molecular cloning, expression, and biological activities of a novel CC chemokine that is constitutively secreted in vivo. *J Inflamm.* 45:207-19

Priego T, Granado M, Castellero E, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. 2006. Nitric oxide production by hepatocytes contributes to the inhibitory effect of endotoxin on insulin-like growth factor I gene expression. *J Endocrinol.* 190:847–56

Princen HMG, Selten GCM, Selten-Versteegen AME, Mol-Backx GPBM, Nieuwenhuizen W, Yap SH. 1982. Distribution of mRNAs of fibrinogen poly-peptides and albumin in free and membrane-bound polyribosomes and induction of α -fetoprotei mRNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochim Biophys Acta* 699:121–130

Prins HA, Meijer C, Boelens PG, Diks J, Holtz R, Masson S, Daveau M, Meijer S, Scotté M, van Leeuwen PA. 2004. Kupffer cell-depleted rats have a diminished acute-phase response following major liver resection. *Shock.* 21:561-5

Radtke S, Wüller S, Yang XP, Lippok BE, Mütze B, Mais C, de Leur HS, Bode JG, Gaestel M, Heinrich PC, Behrmann I, Schaper F, Hermanns HM. 2010. Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation. *J Cell Sci.* 123:947-59

Reinhold D, Bank U, Bühling F, Lendeckel U, Ansorge S. 1995. Transforming growth factor beta 1 inhibits interleukin-10 mRNA expression and production in pokeweed mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells and T cells. *J Interferon Cytokine Res.* 15:685-90

Ren X, Carpenter A, Hogaboam C, Colletti L. 2003. Mitogenic properties of endogenous and pharmacological doses of macrophage inflammatory protein-2 after 70% hepatectomy in the mouse. *Am J Pathol.* 163:563-570

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4167-71

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. 2000. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood.* 96:34–40

Sass G, Shembade ND, Haimerl F, Lamoureux N, Hashemolhosseini S, Tannapfel A, et al. 2007. TNF-induced inhibition of mitochondrial apoptosis is mediated by A20-dependent down-modulation of Bax. *J Immunol.* 179:7042–9

Sato M, Suzuki S, Senoo H. 2003. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 28:105-112

Sauer A, Hartung T, Aigner J, Wendel A. 1996. Endotoxin-inducibile granulocyte-mediated hepatocytotoxicity requires adhesion and serine protease release. *J Leukoc Biol.* 60:633–43

Schmid M, Wege AK, Ritter U. 2012. Characteristics of "Tip-DCs and MDSCs" and Their Potential Role in Leishmaniasis. *Front Microbiol.* 3:74

Schümann J, Tiegs G. 1999. Pathophysiological mechanisms of TNF during intoxication with natural or man-made toxins. *Toxicology.* 138:103-26

Scote M, Masson S, Lyoumi S, Hiron M, Teniere P, Lebreton JP, Daveau M. 1997. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat. *Cytokine* 9:859-867

Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. 2007. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 13:1324-32

Seki E, Tsutsui H, Iimuro Y, Naka T, Son G, Akira S, Kishimoto T, Nakanishi K, Fujimoto J. 2005. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology* 41:443-450

Sheikh N, Batusic DS, Dudas J, Tron K, Neubauer K, Saile B, Ramadori G. 2006. Hepcidin and hemojuvelin gene expression in rat liver damage: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 291:G482-90

Sørensen KK, McCourt P, Berg T, Crossley C, Le Couteur D, Wake K, Smedsrød B. 2012. The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 303:R1217-30

Spray DC, Fujita M, Saez JC, Choi H, Watanabe T, Hertzberg E, Rosenberg LC, Reid LM. 1987. Proteoglycans and glycosaminoglycans induce gap junction synthesis and function in primary liver cultures. *J Cell Biol.* 105:541-51

Steer CJ. 1995. Liver regeneration. *FASEB J* 9:1396-1400

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176:287-292

Sternberg EM. 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Rev. Immunol.* 6:318-328

Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. 1994. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J. Exp. Med.* 180:2365-2370

Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, Lambris JD. 2003. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med.* 198:913-23

Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. 2002. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:11181-11186

Takabayashi T, Vannier E, Clark BD, Margolis NH, Dinarello CA, Burke JF, Gelfand JA. 1996. A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. *J Immunol.* 156:3455-60

- Takeishi T, Hirano K, Kobayashi T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Naito M. 1999. The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 62:413-422
- Taub R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:836-847
- Taylor AW. 2009. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol.* 85:29-33
- Thews G, Mutschler E, Vaupel P. 1999. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 5. Auflage. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- Thorgeirsson SS. 1996. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 10:1249-1256
- Tobias PS, Ulevitch RJ. 1993. Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. *Immunobiology.* 187:227-32
- Tong JZ, de Lagausie P, Furlan V, Cresteil T, Bernard O, Alvarez F. 1992. Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res.* 200:326-32
- Trautwein C, Rakemann T, Niehof M, Rose-John S, Manns MP. 1996. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology.* 110:1854-62
- Trinchieri G. 2010. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med.* 207:2053-63
- Ugocsai P, Barlage S, Dada A, Schmitz G. 2006. Regulation of surface CD163 expression and cellular effects of receptor mediated hemoglobin-haptoglobin uptake on human monocytes and macrophages. *Cytometry A.* 69:203-5
- Van Bossuyt H, Bouwens L, Wisse E. 1988. Isolation, purification and culture of sinusoidal liver cells. In: von Bioulac-Sage P, Balabaud C (eds.). *Sinusoids in human liver: health and disease*. Rijswijk, Netherlands. The Kupffer Cell Foundation, Leiden pp1-16
- Van Bossuyt H, Wisse E. 1988. Cultured Kupffer cells, isolated from human and rat liver biopsies, ingest endotoxin. *J Hepatol.* 7:45-56
- Van Rooijen N, Sanders A. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods.* 174:83-93
- Van Rooijen N. 1989. The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods.* 124:1-6
- Van Sweringen HL, Sakai N, Tevar AD, Burns JM, Edwards MJ, Lentsch AB. 2011. CXC chemokine signaling in the liver: impact on repair and regeneration. *Hepatology.* 54:1445-53
- Wan YY, Flavell RA. 2007. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev.* 220:199-213

Wang Y, Ripperger J, Fey GH, Samols D, Kordula T, Wetzler M, Van Etten RA, Baumann H. 1999. Modulation of hepatic acute phase gene expression by epidermal growth factor and Src protein tyrosine kinases in murine and human hepatic cells. *Hepatology* 30:682-697

Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. T. 2006. Lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 44:1182-90

Watanabe N, Miura S, Zeki S, Ishii H. 2001. Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 30:1019–28

Webber EM, Godowski PJ, Fausto N. 1994. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology* 19:489-497

Weischenfeldt J, Porse B. 2008. Bone marrow-derived macrophages (BMM): Isolation and applications. *Cold Spring Harb Protoc*. 3:1–6

West MA, Keller GA, Hyland BJ, Cerra FB, Simmons RL. 1985. Hepatocyte function in sepsis: Kupffer cells mediate a biphasic protein synthesis response in hepatocytes after exposure to endotoxin or killed *Escherichia coli*. *Surgery*. 98:388–95

West MA, Keller GA, Hyland BJ, Cerra FB, Simmons RL. 1986. Further characterization of Kupffer cell/macrophage-mediated alterations in hepatocyte protein synthesis. *Surgery*. 100:416-23

Wilson GC, Kuboki S, Freeman CM, Nojima H, Schuster RM, Edwards MJ, et al. 2015. CXC chemokines function as a rheostat for hepatocyte proliferation and liver regeneration. *PLoS One*. 10:e0120092

Wu R, Cui X, Dong W, Zhou M, Simms HH, Wang P. 2006. Suppression of hepatocyte CYP1A2 expression by Kupffer cells via AhR pathway: the central role of proinflammatory cytokines. *Int J Mol Med*. 18:339–46

Yagi K, Sumiyoshi N, Nakashima Y, Michibayashi N, Kawase M, Miura Y, Mizoguchi T. 1998. Stimulation of liver functions in hierarchical co-culture of bone marrow cells and hepatocytes. *Cytotechnology*. 26:5–12

Yamanaka N, Okamoto E, Kawamura E, Kato T, Oriyama T, Fujimoto J, Furukawa K, Tanaka T, Tomoda F, Tanaka W. 1993. Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology* 18:79-85

Yin S, Wang H, Park O, Wei W, Shen J, Gao B. 2011. Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3. *Am J Pathol*. 178:1614-21

Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. 2007. Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg* 31:367-374

Yokoyama Y, Nimura Y, Nagino M, Bland KI, Chaudry IH. 2005. Current understanding of gender dimorphism in hepatic pathophysiology. *J Surg Res* 128:147-156

You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. 2008. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology*. 48: 978-90

Youn BS, Jang IK, Broxmeyer HE, Cooper S, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Elick TA, Fraser MJ Jr, Kwon BS. 1995. A novel chemokine, macrophage inflammatory protein-related protein-2, inhibits colony formation of bone marrow myeloid progenitors. *J Immunol*. 155:2661-7

Zanoni I, Ostuni R, Granucci F. 2009. Generation of mouse bone marrow-derived macrophages (BM-MFs). *Nature*. 460:264-8

Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. 2008. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 14:Unit 14.1

Zhao YY, Sawyer DR, Baliga RR, Opel DJ, Han X, Marchionni MA, Kelly RA. 1998. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 273:10261-9

Zinchenko YS, Schrum LW, Clemens M, Coger RN. 2006. Hepatocyte and Kupffer cells co-cultured on micropatterned surfaces to optimize hepatocyte function. *Tissue Eng*. 12:751-61

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Johannes Bode für die Bereitstellung des Themas der Doktorarbeit und dessen ständige Unterstützung und Bereitschaft zur Diskussion sowie seine wertvollen Anregungen und sein Vertrauen in meine Arbeit.

Herrn Professor Dr. Dieter Willbold danke ich besonders für die sofortige Bereitschaft, meine Promotion als Gutachter und Mentor in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen, trotz seiner enormen zeitlichen Auslastung.

Mein Dank gilt außerdem Professor Dr. Dieter Häussinger, dessen stetige Bemühungen im Bereich der Forschung zum Aufbau der Arbeitsgruppe Experimentelle Hepatologie führten. Er ermöglichte mir neben anderen die Durchführung der experimentellen Arbeiten in seiner Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Hierbei besonders zu erwähnen sind Judith Knievel, Leah Missing und Maximilian Hahnel, ohne deren praktische Unterstützung bei der Gewinnung von primären Zellen die Nächte im Labor sehr lange geworden wären. Judith Knievel und Carina Franek danke ich zudem für die tolle Einarbeitung in diverse Methoden und ihre stetige außerordentliche Hilfsbereitschaft. Ebenso möchte ich Maria Reich danken, die mir mit ihrem reichen Wissen im Bereich der Fluoreszenzfärbungen stets unterstützend zur Seite stand.

Christian Ehling danke ich zudem für Untersuchung der von mir generierten PHx Lebern auf proliferative Unterschiede zwischen $mk2^{-/-}$ und wt Mäusen und Carina Franek für ihre Vorarbeit zur Aufreinigung von primären Hepatozytenkulturen mittels MACS-Technologie.

Ich danke außerdem Dr. Maria Thomas aus dem Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut in Stuttgart für die Microarray-Analyse der Genexpression nach PHx, die im Rahmen der virtuellen Leber stattfand. Jan Hengstler und Patricio Godoy aus dem Leibniz Research

Centre Dortmund danke ich für Demonstration und Überlassung ihres in Protokolls zur Generierung von immunhistologischen Färbungen von Leberschnitten für Aufnahme von 3 dimensionalen Darstellungen. Zudem möchte ich auch Sara Zafarnia, Svantje Braun, Christoph Metzendorf und Joep Vanlier für die stets gute Zusammenarbeit im VLN danken.

Ein ganz dickes Dankeschön möchte ich an dieser Stelle Judith, Leah, Max, Sanaz, Carina und Uschi für ihre Freundschaft, die gute Stimmung während der Arbeit und in so manchen Stunden danach aussprechen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich stets unterstützt hat und bei der ich so manchen Frust abladen konnte. Danke, dass ihr immer für mich da wart.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keinem anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 21.05.2015

Stephanie Wolf