Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Tom Lüdde

Einfluss der interzellulären Kommunikation von Hepatozyten und Makrophagen auf die Reaktion von Makrophagen gegenüber Cytomegalieviren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Björn Wieland 2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. med. Johannes G. Bode Zweitgutachterin: PD Dr. med. Julia Reifenberger Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen eines Kongressbeitrags veröffentlicht:

"Impact of intercellular communication between macrophages and hepatocytes on their responses towards CMV or LPS" B. Wieland, C. Bartels, SD. Wolf, T. Luedde, C. Ehlting, JG. Bode, Z Gastroenterol 2021; 59(01): e52

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob Hepatozyten die Reaktion von Makrophagen auf eine Stimulation beeinflussen und inwieweit hier Unterschiede zwischen viralen und bakteriellen Pathogenen bestehen. Hierfür wurde in einem in vitro System der Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) und abgetötetem murinem Cytomegalievirus (MCMV) auf monokultivierte Makrophagen und Makrophagen im Ko-Kultursystem mit primären Hepatozyten verglichen. Des Weiteren wurde überprüft, ob der VLDL Rezeptor der Makrophagen an der interzellulären Kommunikation zwischen beiden Zelltypen entscheidend beteiligt ist. Die Analysen erfolgten mittels eines in der Arbeitsgruppe validierten Ko-Kultur Systems, welches die Untersuchung der Interaktion mittels löslicher Faktoren zwischen primären Hepatozyten und Bone-marrow derived macrophages (BMDMs) ermöglicht, eine direkte Zell-Zellinteraktion jedoch nicht. Um eine mögliche funktionelle Veränderung der Makrophagen infolge der Ko-Kultivierung zu analysieren wurden dem System LPS, ein bakterielles Endotoxin bzw. abgetötete Cytomegalieviren zugefügt. Dafür wurden mehrere Versuche durchgeführt, die zum einen Expressionsunterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation verglichen und zum anderen Expressionsunterschiede nach verschiedenen Kulturzeiten bei gleicher Stimulationsdauer untersuchten.

Eine Reaktionsänderung trat zwischen 2-24 Stunden Kulturdauer ein. Im Vergleich zwischen Mono- und Ko-Kultur reagierten die kokultivierten BMDMs sowohl nach LPS als auch nach CMV Stimulation mit einer reduzierten Expression von TNFα, IL-6 bei zugleich erhöhter Expression von IL-10 mRNA. Die Daten legen somit nahe, dass die Präsenz von Hepatozyten die Reaktion von BMDMs sowohl auf virale wie auch auf bakterielle Pathogene und somit Pathogen-unabhängig dahingehend beeinflusst, dass die Expression pro-inflammatorischer Zytokine eher supprimiert wird, während anti-inflammatorische Mechanismen und hierbei insbesondere die Expression von IL-10 verstärkt wird. Soweit vergleichbar, war jedoch auffällig, dass die Reaktion von BMDM auf die verschiedenen Pathogene substanziell voneinander differierte, wobei bakterielle Pathogene wie LPS führend die Expression von TNFα und IL-6 mRNA induzierten, während die Reaktion auf virale Pathogene durch Expression von insbesondere IL-10, IFNβ, iNOS, CXCL9 und CXCL10 mRNA charakterisiert war. Dabei legen die Untersuchungen an VLDL-Rezeptor defizienten BMDMs nahe, dass diesem keine entscheidende Rolle für den Einfluss von Hepatozyten auf die Reaktion bzw. den Aktivierungszustand von Makrophagen zukommt.

Abstract

The present study addresses the question of how hepatocytes influence macrophage differentiation and thus their response in the context of infection. For this purpose, the influence of lipopolysaccharide (LPS) and murine cytomegalovirus (MCMV) on monocultured macrophages and macrophages in a co-culture system with primary hepatocytes was compared in an in vitro system. Furthermore, it was examined whether the VLDL receptor of macrophages is decisively involved in the intercellular communication between both cell types. The analyses were performed using a co-culture system validated in the research group, which allows the investigation of the interaction by means of soluble factors between primary hepatocytes and bone marrow derived macrophages (BMDMs).

In order to analyse a possible functional change of the macrophages as a result of co-cultivation, LPS, a bacterial endotoxin or killed cytomegaloviruses were added to the system. For this purpose, several experiments were carried out, comparing expression differences at different times after stimulation on the one hand, and examining expression differences after different culture times with the same stimulation duration on the other hand.

A change in response occurred between 2-24 hours of culture. In the comparison between monoand co-culture, the co-cultured BMDMs reacted with decreased TNF α , IL-6 and increased IL-10 mRNA levels after both LPS and CMV stimulation. Thus, the co-cultured BMDMs showed similar anti-inflammatory responses to the different stimulants. This results in a pathogen- and viruspermissive situation due to the influence of the macrophages on the hepatocytes.

In contrast, the basic response of BMDMs to the different stimulants differed greatly. After LPS stimulation, mono- and co-cultured BMDMs reacted with particularly strongly increased TNF α and IL-6 mRNA production, whereas after MCMV stimulation BMDMs produced increased IL-10, IFN β , iNOS, CXCL9 and CXCL10 mRNA.

The experiments with VLDL receptor-depleted BMDMs showed no significant differences from the wild type in both flow cytometry and mRNA expression measurements. Based on current data, it can therefore be assumed that the VLDL receptor does not have a decisive influence on hepatocyte-macrophage communication.

Abkürzungsverzeichnis

Arg1	Arginase 1
AIM2	absent in melanoma 2 receptor
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BMDM	bone marrow-derived macrophages
BSA	bovine serum albumin
CaCL ₂	Kalciumchlorid
CD	cluster of differentiation number
cDNA	complementary DNA
CMV	Zytomegalievirus
CMVamP	CMV associated pattern
CRP	C-Reaktives Protein
DAI	DNA-dependent activator of interferon regulatory factors
DAMP	damage-associated molecular pattern
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	fluoreszence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
gp	Glykoproteine
НС	Hepatozyten
HCMV	humanes Zytomegalie Virus
HLA	human leukocyte antigen
HSCs	Hepatic stellate cells
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon

IL	Interleukin
IL-1 ra	IL-1 Rezeptor Antagonist
iNOS	induzierbare NO Synthase
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
IRF	Interferone regulatory factor
kb	Kilobasen
КС	Kupffer Zellen
LBP	LPS-bindende Protein
LPS	Lipoplysaccharid
MACS	magnetic cell separation
MCMV	murines Cytomegalievirus
M-CSF	Makrophagen koloniestimulierender Faktor
МНС	Major Histocompatibility Complex
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MR	Mannose Rezeptor
NaCl	Natriumclorid
NaOH	Natriumhydroxid
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PLC	peptin loading complex
PRR	pattern recognition receptor
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNI	reactive nitrogen intermediates
ROI	reactive oxygen intermediates

SDHA	Succinate Dehydrogenase subunit A
SMOC	Supramolekularen Organisationszentrum
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	toll-like-receptor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain containing adapter inducing interferon β
UV	Ultraviolett
VLDL	Very low density lipoprotein
wt	Wildtyp
ZBP1	Z-DNA binding protein 1
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1		Einleitu	ng	1
	1.1	Die	Leber	1
	1.2	Der	Immunologische Stellenwert der Leber	3
		1.2.1	Die Zellen der Leber	3
	1.3	Mak	rophagen	6
	1.4	Inte	rzelluläre Kommunikation zwischen Makrophagen und Hepatozyten	8
		1.4.1	VLDL Rezeptor-abhängige Hepatozyten-Makrophagen Interaktion	9
	1.5	Einf	luss von Pathogenen auf Makrophagen	9
		1.5.1	Bakterien	9
		1.5.2	Viren	10
	1.6	Zyto	kine und Chemokine	12
		1.6.1	Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)	12
		1.6.2	Interleukin 6 (IL-6):	13
		1.6.3	Interleukin 10 (IL-10):	13
		1.6.4	Interferon β (IF-β):	13
		1.6.5	Induzierte NO-Sythase (iNOS):	13
		1.6.6	Arginase 1 (Arg1):	13
		1.6.7	CXCL 9:	14
		1.6.8	CXCL10:	14
	1.7	Ziel	der Arbeit	14
2		Materia	l und Methoden	16
	2.1	Mat	erial	16
		2.1.1	Versuchstiere	16
		2.1.2	Zellpräparation:	16
		2.1.2.1	Leberzellpräparation	16
		2.1.2.2	Knochenmarkspräparation	17

		2.1.3	Zellkultur
		2.1.3.1	Leberzellkultur
		2.1.3.2	Sanwichkultur
		2.1.3.3	Kultur von Knochenmarkszellen: 19
		2.1.4	Stimulanzien19
		2.1.5	Kits
		2.1.6	Quantitative PCR 20
		2.1.7	Durchflusszytometrie 21
		2.1.8	Geräte 21
	2.2	Met	hoden 22
		2.2.1	Präperation primärer Leberzellen 22
		2.2.2	Aufreinigung zu Hepatozyten
		2.2.2.1	Sandwichkultur
		2.2.3	Knochenmarkspräparation und Differenzierung zu BMDM 24
		2.2.4	Ko-Kultur
		2.2.5	UV-Inaktivierung von CMV
		2.2.6	Stimulation
		2.2.7	RNA-Isolierung
		2.2.8	C-DNA Synthese
		2.2.9	Quantitative real time Polymerase-Kettenreaktion
		2.2.10	Durchflusszytometrie
		2.2.11	ELISA
3		Ergebni	sse 30
	3.1	Einf	luss von Hepatozyten auf die Reaktion von Makrophagen nach LPS Stimulation 30
	3.2	Einf	luss von Hepatozyten auf die Reaktion von Makrophagen nach CMVamP Stimulation
		37	
	3.3	Ver	gleich der BMDM Reaktion nach CMVamP MOS2 und LPS 10ng/ml Stimulation 45
	3.4	Einf	luss der Hepatozyten auf die Oberflächenexpression von Markerproteinen die auf
	ein	e Veränd	lerung des Aktivierungszustandes von BMDM hinweisen 47

	3.5	Auswirkung der Dauer des Einflusses von Hepatozyten auf die Funktion wie auch den
	Aktiv	vierungszustand von BMDMs 49
	3.6	Einfluss des VLDL Rezeptor Knock-Outs auf die Reaktion und Differenzierung der
	BMD	DMs
4	I	Diskussion
	4.1 Stim	Einfluss der Hepatozyten auf die Reaktion von BMDMs nach CMVamP und LPS
	4.2	Vergleich der BMDM Reaktion nach CMVamP und LPS Stimulation
	4.3	Einfluss der Hepatozyten auf die Oberflächenrezeptor-Differenzierung von BMDMs 65
	4.4	Auswirkung der Kulturzeit auf die Reaktion und Differenzierung von BMDMs nach
	CIVIN	7amP oder LPS Stimulation
	4.5	Einfluss des VLDL Rezeptor Knock-Out auf die Reaktion und Differenzierung der BMDMs
		66
	4.6	Fazit und Ausblick:
5	l	Literatur- und Quellenverzeichnis
6		Anhang74

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Organisationseinheit der Leber 2
Abb. 2: Einfluss von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten BMDM infolge der
Stimulation mit LPS
Abb. 3: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten
BMDM infolge der Stimulation mit LPS
Abb. 4: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Proteinexpression von
kokultivierten BMDM infolge der Stimulation mit LPS
Abb. 5: Einfluss von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten BMDM infolge der
Stimulation mit CMVamP
Abb. 6: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten
BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP 41
Abb. 7: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten
WT BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP 42
Abb. 8: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Proteinexpression von
kokultivierten BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP
Abb. 9: Gegenüberstellung der mRNA Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach CMVamP
und LPS Stimulation
Abb. 10: Expression der Oberflächenmarker nach verschiedenen Kulturzeiten ohne Stimulation.
Abb. 11: mRNA Expressionsmuster von monokultivierten vs. kokultivierten BMDMs, sechs
Stunden nach CMVamP Stimulation zu jeweils verschiedenen Ko-/Kulturdauern (2, 24, 48, 72
Stunden)
Abb. 12: mRNA Expressionsmuster von monokultivierten vs. kokultivierten BMDMs, sechs
Stunden nach LPS Stimulation zu jeweils verschiedenen Ko-/Kulturdauern (2h, 24h, 48h, 72h) 53
Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von
kokultivierten WT und VLDL-Rezeptor knock out BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP 55
Abb. 14: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von
kokultivierten WT und VLDL-Rezeptor knock out BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP 56
Abb. 15: Expression der Oberflächenmarker nach verschiedenen Kulturzeiten ohne Stimulation. 58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2: Primerauflistung für qPCR	. 20
Tabelle 3: Antikörperauflistung für durchflusszytometrische Analyse	. 21
Tabelle 4: Detaillierte Antikörpervorbereitung zur Applikation pro FACS Röhrchen	. 29
Tabelle 5: Kulturzeiten	. 49

1 <u>Einleitung</u>

1.1 <u>Die Leber</u>

Die Leber ist das größte Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers. Zu ihren vielfältigen Aufgaben gehören Prozesse im Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel. Zusätzlich ist die Leber Ort der Gallensäurenproduktion und beteiligt sich als exokrine Drüse an der effizienten Fettsäureresorption und der Ausscheidung von Stoffwechselabbauprodukten. Sie dient der Aufrechterhaltung der Homöostase, produziert den Großteil der Plasmaproteine und speichert Eisen sowie Vitamine. Des Weiteren baut die Leber Blutzellen, Ammoniak zu Harnstoff, Hormone, Medikamente und Alkohol ab. Eine weitere wichtige und oft übersehene Funktion stellt ihre zentrale Bedeutung sowohl in der angeborenen als auch erworbenen Immunabwehr dar. So ist die Leber Ort der Akutphase-Proteinsynthese und damit elementar wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Zusätzlich sind zahlreiche Immunzellen, wie die Makrophagen in der Leber beheimatet und können durch den langsamen Blutstrom in den Sinusoiden ideal an der Elimination von Pathogenen aus dem Blut teilnehmen.

Makroskopisch wird das Organ beim Menschen in vier Leberlappen (*Lobus dexter, Lobus sinister, Lobus quadratus und Lobus caudatus*) und acht Lebersegmente unterteilt. In der Maus besteht die Leber aus fünf Leberlappen. Anstelle des *Lobus quadratus* gibt es einen *Lobus medialis dexter* und *sinister* (Salomon, 2008, Bosma et al., 2006). Die Aufteilung in die Leberlappen folgt der Blutversorgung, die als Besonderheit zu 75-80% aus nährstoffreichem Blut der Portalvene (*V. portae*) und zu 20-25% aus dem sauerstoffreichem Blut der Leberarterie (*A. hepatica*) erfolgt (R. Klinke, 2005). Die *V. portae* führt nährstoff- und pathogenreiches Blut aus der *V. mesenterica superior* und *inferior*, die den Magen-Darm-Trakt drainieren sowie Blutabbauprodukte aus der Milzvene (*V. splenica*). Diese Stoffe werden in der Leber weiterverarbeitet oder eliminiert. Nach Balmer fungiert die Leber als "Firewall", die den Körper vor einer Pathogenflut und damit vor einer generalisierten Entzündungsreaktion schützt (Balmer et al., 2014).

Die Leberlappen sind in Leberläppchen und diese weiter in Leberbalken organisiert. Ein Leberläppchen besteht aus einer hexagonalen Anordnung der parallellaufenden Strukturen: Ast der Pfortader, Ast der Leberarterie und Gallengang, auch Glisson-Trias genannt (siehe Abb. 1), die wiederum das Blut durch die Sinusoide in Richtung der zentral gelegenen *V. centralis* abgeben. Die *Venae centrales* drainieren in die untere Hohlvene.

Das Blut unterliegt auf seinem Weg von der Glisson-Trias zur *V. centralis* zahlreichen Stoffwechselvorgängen. Betrachtet man die Organisationseinheit der Leberbalken, erkennt man,

dass die Sinusoide durch die Endothelzellen begrenzt werden. Dieses fenestrierte Endothel beschränkt die freie Diffusion, sodass größere Partikel nicht in den Raum zwischen Endothelzellen und Hepatozyten (Disse-Raum) diffundieren können. Im Gefäßsinus sind die Pit-Zellen lokalisiert. Makrophagen der Leber sind unter homöostatischen Bedingungen auf der luminalen Seite des Endothels lokalisiert. Eine direkte Zell-Zellkommunikation der Lebermakrophagen findet somit führend mit den Endothelien statt, während Fortsätze der Makrophagen auch bis in den Disse-Raum ragen, der über vergleichsweise große Fenestrierungen des Endothels auch mit dem Lumen der Sinusoide direkt verbunden ist und somit eine Kommunikation luminaler Zellen mit Hepatozyten und auch Sternzellen über lösliche Transmitter zulässt. Diese anatomischen Gegebenheiten bilden die Grundlage des Ko-Kultur Systems, welches in dieser Arbeit eingesetzt wurde, um den Einfluss der Kommunikation zwischen Hepatozyten und Makrophagen auf die Reaktion auf über den Blutstrom die Leber erreichende Pathogene zu untersuchen. Im Disse-Raum selbst befinden sich die hepatischen Sternzellen, die wiederum einen direkten Zell-Zell Kontakt mit Hepatozyten und auch den Endothelien aufweisen können.

Die Hepatozyten besitzen eine Polariät. Der basolaterale Pol grenzt an den Disse-Raum und der apikale/peribiliäre Zellpol bildet die Wand der Gallenkapillaren.



Abb. 1: Organisationseinheit der Leber : Bildquelle der Leberläppchen und Leberbalken mit Sinusoiden: Dissertation Stephanie Wolf 2015; Bildquelle der Leber: <u>https://pixabay.com/de/illustrations/leber-orgel-anatomie-brown-3332302/</u> Zugriffsdatum 23.05.23 um 21:38

1.2 Der Immunologische Stellenwert der Leber

Die Leber ist ein zentrales Organ der Immunabwehr. Sie nimmt wichtige Aufgaben in der angeborenen und erworbenen Immunität ein. Die Leber besitzt ein großes immuntolerantes Potential (Calne et al., 1969), sodass in der Regel das pathogenreiche Blut aus der V. portae nicht zu einer Inflammation führt. Kommt es jedoch zu einer Durchbrechung dieser Toleranz, können in der Leber auch stark pro-inflammatorische Prozesse induziert werden, welche sich auf den gesamten Organismus auswirken, hierzu zählt neben der Einleitung der Akut-Phase Reaktion ebenfalls die Fähigkeit, das erworbenen Immunsystem gezielt zu aktivieren und diese Aktivierung zu steuern. Wie die Leber auf die entsprechenden Stimuli reagiert, wird führend durch die Interaktion ihrer verschiedenen Zelltypen reguliert und in den folgenden Abschnitten erläutert.

1.2.1 Die Zellen der Leber

Die Funktionsvielfalt der Leber entsteht durch die Wechselwirkung und spezielle räumliche Anordnung der fünf führenden Zelltypen der Leber. Das Parenchym besteht aus den Hepatozyten, die anteilig 65% der Zellen und 94% des Zellvolumens ausmachen (Van Bossuyt and Wisse, 1988). Die vier anderen nichtparenchymalen Zellen sind zu 24,5% Endothelzellen, 7% Makrophagen der Leber), 3,5% Sternzellen und 0,4% Pit-Zellen (Bouwens et al., 1992).

Die Endothelzellen in den Sinusoiden bilden ein fenestriertes Endothel und trennen den Disse-Raum vom Blutstrom. Da es jedoch keine Basalmembran gibt, können Zellen, Zellausläufer und Plasmakomponenten durch die 100 nm - 2 µm großen Lücken im Endothel in den Disse-Raum gelangen und dort mit den Sternzellen und Hepatozyten interagieren. Die Kupfferzellen sind auf den Endothelzellen im Lumen der Sinusoide lokalisiert und sind zu groß, um durch die Poren zu gelangen. Sie können via lösliche Mediatoren mit den Hepatozyten und Sternzellen kommunizieren. Die Sinusendothelzellen besitzen die Besonderheit, dass sie Antigene ohne kostimulatorisches Signal für CD4+ Zellen präsentieren können, so dass diese zu regulatorischen T-Zellen differenzieren, welche an der Aufrechterhaltung der Toleranz in der Leber beteiligt sind (Limmer et al., 2000). Diese Funktion wird durch die direkte Lage am Sinus, der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Expression sogenannter Todesrezeptoren unterstützt. Über diese Abläufe sind sinusoidale Endothelzellen auch an der Induktion der Immuntoleranz beteiligt. Zusätzlich halten sinusoidale Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen die hepatischen Sternzellen in einem inaktivierten Zustand und verhindern somit eine verstärkte Fibrogenese (Poisson et al., 2017). Wobei die genaue Rolle der hepatischen Sternzellen noch nicht abschließend geklärt ist, da zunehmend Hinweise bestehen, dass diese mesenchymale Stammzellen der Leber darstellen, für die der Dissésche Raum eine Stammzellnische darstellt

((Kordes et al., 2013, Häussinger and Kordes, 2020)). Ein Sachverhalt, der auch mit erklären könnte warum die Leber physiologischer Weise als Standort der Blutbildung in der Fetalphase fungiert wie auch pathophysiologisch im Zuge von Erkrankungen, die mit einer eingeschränkten Knochenmarksfunktion einhergehen.

Ebenfalls immunologische Bedeutung haben die Dendritischen Zellen, welche zu den antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems gehören und damit die Aktivierung von B- und T-Zellen steuern können. Nach Aufnahme eines Antigens prozessieren die dendritischen Zellen dieses, wandern zu den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten und Milz) und reifen auf diesem Weg. Die Reifung beinhaltet eine Zunahme der T-Zellstimulationskapazität durch eine vermehrte Expression von CD80- und CD86-Rezeptoren (Banchereau and Steinman, 1998). In der Leber liegen die dendritischen Zellen überwiegend in den peripheren Portalvenenästen und nur in geringer Anzahl im Leberparenchym selbst (Thomson and Knolle, 2010). Hepatische Sternzellen sind ebenfalls über parakrine Signale durch die Kommunikation mit den diversen Immunzellen in ihrer Differenzierung und Aktivierung beeinflussbar (Cai et al., 2020).

Die Hauptzellen der Leber, die Hepatozyten (HC) besitzen neben ihren metabolischen Aufgaben auch immunregulatorische Funktionen. Dazu zählt die führende Synthese von Akute-Phase-Proteinen, wie das C-Reaktive Protein (CRP) (Tillett and Francis, 1930), Komplementfaktoren oder das mannose binding lectin, infolge von Infektionen, Stress oder Traumata. Die große Gruppe der Akut-Phase Proteine weist sehr diverse Funktionen auf, wie z.B. die Opsonierung von Antigenen, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine. Akut-Phase Proteine sind an der Regulation der Eisenhomöstase beteiligt und können die Aktivierung neutrophiler Granulozyten hemmen. Ziel der Akut-Phase Reaktion ist neben der Eliminierung von Pathogenen auch die Reduktion der Gewebsschädigung durch die Aktivierung von Reparationsprozessen (Bode et al., 2012a, Gabay and Kushner, 1999, Ehlting et al., 2021).

Die Hepatozyten selbst können Antigene präsentieren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass es über MHC-I (Major histocompatibility Complex) und ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) Rezeptoren zu einer Interaktion zwischen naiven T-Zellen und Hepatozyten kommt (Warren et al., 2006). Da in der Regel die Ko-Stimulation über MHC-II oder CD86- Rezeptoren fehlt, sind die naiven T-Zellen jedoch nicht überlebensfähig und es wird eine Immuntoleranz induziert (Bertolino et al., 1998). Kommt es unter einer Inflammation zu einer Hochregulation der MHC-II Rezeptoren führt dies hingegen zu einer T-Zell Aktivierung (Herkel 2003). et al., Weitere Mechanismen, über die die Hepatozyten die Immuntoleranz der Leber unterstützen, sind

die B7-H1- Rezeptor- Expression (Wahl et al., 2008), die Expression von Autoantigenen (Lüth et al., 2008) und die natürlichen Killer-T-Zellen (NKT) Ko-Aktivierung (Wahl et al., 2007).

Eine weitere wichtige Zellgruppe der Leber sind die Kupffer Zellen (KC). Kupffer Zellen sind die gewebsständigen Makrophagen der Leber. Sie erneuern sich aus einem eigenen Stammzellpool, der sich ursprünglich aus dem Dotter Sack und der fetalen Leber absiedelte und besetzen die sogenannte Stammzellnische (Epelman et al., 2014). Kommt es zum Absterben der Kupffer Zellen und somit zu freiem Platz in der Stammzellnische, können aus dem Blutstrom migrierte und durch das Mikroenvironment polarisierte Monozyten die Kupffer Zellen funktional ersetzen. Dies geht so weit, dass die migrierten Monozyten eine eigene Regenerations- und Replikationsfähigkeit annehmen (Scott et al., 2016). Die Kupffer Zellen machen mit 80-90% den größten Anteil aller gewebsständigen Makrophagen im menschlichen Körper aus (Ishibashi et al., 2009). In der Leber kommen die Kupffer Zellen mit dem pathogenreichen Blut aus dem Darm in Berührung. Durch ihre vorteilhafte Lage auf den Endothelzellen, also in den Sinusoiden, können Sie aus dem dort langsam fließenden Blut unter anderem Pathogene und Endotoxine aus dem Darm und Blutabbauprodukte aus der Milz eliminieren. Ein Mechanismus, der dafür hauptsächlich mitverantwortlich ist, sind die sogenannte Pattern-Recognition Receptors (PRRs). Diese binden pathogen-spezifische Antigene, auch pathogen associated molecular patterns (PAMPs) genannt und können bei ausreichender Stimulation zur Induktion einer Immunantwort des angeborenen Immunsystems führen. PRRs können membrangebundene, lösliche oder zytoplasmatische Rezeptoren sein. PAMPs sind überlebenswichtige Strukturen der Pathogene. Die Immunantwort ist abhängig von den aktivierten PRRs.

Zu den PRRs gehören Oberflächenrezeptoren wie ein Großteil der Toll-like Rezeptoren (TLR), die über NFκB die Expression von pro-inflammatorische Transkriptionssignale induzieren. Scavenger oder C-Typ Lektin Rezeptoren gehören ebenfalls zu den PRR und sind relevant für die Phagozytose, wodurch das Pathogen aus der Zellumgebung entfernt und in der Zelle in seine Einzelteile abgebaut wird. Lösliche Rezeptoren wie das Mannose-bindende Lektin erleichtern dabei die Phagozytose durch die Opsonierung der Pathogene.

Unter physiologischen Bedingungen erreichen wenige Pathogene die Leber und die Kupffer-Zellen reagieren immuntolerant (You et al., 2008, Knolle et al., 1995). Kupffer Zellen besitzen eine hohe Phagozytose Leistung und eliminieren damit einen Großteil der aus dem Darm kommenden Pathogene, ohne eine Immunreaktion zu induzieren. Sie können ebenfalls, wie Dendritische Zellen Pathogenbestandteile via MHC-II Rezeptoren für Th1 Zellen präsentieren, jedoch haben die Kupffer Zellen eine signifikant niedrigere MHC-II, B7-1, B7-2 und CD40 Rezeptordichte und sind somit weniger potente antigenpräsentierende Zellen (APC) (You et al., 2008). Damit tragen sie

unter physiologischen Bedingungen maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz der Leber bei. Ebenfalls können Kupffer Zellen große Mengen an IL-10 ausschütten und somit entzündliche Reaktionen unterdrücken (Knolle et al., 1995).

Sollte es jedoch zu einer Durchbrechung der Toleranz kommen, beteiligen Kupffer Zellen sich wiederum an der Generierung von entzündlichen Prozessen und tragen somit zur Induktion von Gewebeschäden bei. Sie können T-Zellen und im Rahmen der Akutphase Reaktion über die Sekretion von unter anderem IL-1, IL-6-Typ Zytokinen und TNFα die Akut-Phase Protein Synthese der Hepatozyten aktivieren. Des Weiteren schütten sie Chemokine aus, die Granulozyten und Makrophagen an den Ort der Entzündung locken.

Über eine Freisetzung von IL-12 wird die Aktivität natürlicher Killerzellen gesteigert. Durch die vermehrte Produktion von TNFα, proteolytischen Enzymen und Radikalen kommt es, über die Bekämpfung des Pathogens hinaus, zu einem kollateralen Gewebeschaden, den es schnellstmöglich zu begrenzen gilt.

Diese Aufgabe übernimmt das während der Inflammation freigesetzte Typ I-Interferon, welches autokrin die IL-10 Expression erhöht. IL-10 wirkt anti-inflammatorisch durch die Hemmung der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (Bode et al., 2012b). Die Rückführung in den immuntoleranten Zustand verdeutlicht die außerordentliche Plastizität der Kupffer Zellen bzw. Makrophagen.

1.3 Makrophagen

Elie Metchnikoff erhielt 1908 für seine systematische Beschreibung der Makrophagen und seiner Phagozytose-Theorie den Nobelpreis. Die bereits unter 1.2 beschriebenen Kupffer Zellen bilden den größten Pool gewebeständiger Makrophagen im Körper. Makrophagen können bereits während der Embryogenese in die entsprechenden Gewebe wie Leber, Herz, Milz, Muskel etc. einwandern und hier jeweils ortsständig proliferieren oder, wie es aktuell noch diskutiert wird, durch Monozyten ersetzt werden, die aus dem Blut rekrutiert werden und im Gewebe unter dem Einfluss des spezifischen Mikromilieus in gewebsständige Makrophagen differenzieren.

Ursprung der zirkulierenden Monozyten sind Knochenmarkszellen, die sich über diverse Vorstufen zu Monozyten entwickeln. Im Gegensatz zu den ortsgebunden Makrophagen, werden die Monozyten nach Bedarf in das jeweilige Gewebe rekrutiert und erfassen im Zuge ihrer Transformation in Makrophagen über eine Vielzahl von Rezeptoren und mittels Phagozytose die Zusammensetzung des sie umgebenden Mikromilieus. Aufgrund der außerordentlichen Plastizität dieser Zellen reagieren sie entsprechend der Signale des sie umgebenden Mikromilieus, um sich z.B. an der Beseitigung von Erregern zu beteiligen oder um das Gewebe vor weiterem Schaden zu schützen und Reparaturmechanismen zu unterstützen. Neben ihrer Rolle in der angeborenen Immunregulation können Makrophagen phagozytierte Antigene den T- und B-Zellen präsentieren und somit eine Brücke zur erworbenen Immunität bilden.

Abhängig von ihren Umgebungssignalen reagieren Makrophagen verschieden. Nach der neusten Forschungslage haben die Makrophagen vielfältige Differenzierungszustände, die fließend ineinander übergehen (Mosser and Edwards, 2008). In der ursprünglichen Unterteilung wurden diese vielfältigen Differenzierungszustände vereinfacht angelehnt an die Th1 und Th2-Helferzellen-Nomenklatur in entweder klassisch M1 oder alternativ M2 aktivierte Makrophagen unterteilt (Mills et al., 2000, Stein et al., 1992). Die unter dem Einfluss von IFN- γ , TNF- α oder LPS differenzierten Makrophagen werden als M1 oder klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet und sezernieren pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. TNFα, IL-6, IL-12, IL-23 und IL-1β oder Chemokine wie CXCL9 oder CXCL10 (Mantovani et al., 2002, Sica et al., 2015). Zusätzlich produzieren M1 Makrophagen Sauerstoff- und Stickstoffradikale, die antibakteriell wirken und haben eine erhöhte Phagozytoseleistung. Insgesamt wird durch diese Effekte die Immunabwehr aktiviert und gestärkt (Mosser and Edwards, 2008).

Unter dem Einfluss von Signalen, die bei der Gewebsverletzung freigesetzt werden, z.B. IL-4 und/oder IL-13, differenzieren Makrophagen zu M2 polarisierten Makrophagen. Die M2 Makrophagen nennt man auch die Regulatorischen-, Wundheilungs- und anti-inflammatorischen Makrophagen. Sie schütten anti-inflammatorisch wirksame Zytokine wie z.B. IL-10 und Chemokine wie CCL17, CCL22 und CCL24 aus (Mantovani et al., 2002, Sica et al., 2015) und übernehmen Aufgaben in der Wundheilung und Homöosthase. Die Einteilung in M1 und M2 Makrophagen ist jedoch unzureichend, um die komplexe Realität der Makrophagenpolarisierung widerzuspiegeln.

Im Consentpaper der Arbeitsgruppe um Murray (Murray et al., 2014) wurde deshalb eine einheitliche, genauere Bezeichnung der Aktivierungszustände der Makrophagen vorgeschlagen, um die bis dato wachsende Verwirrung um deren korrekte Bezeichnung und eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Diese Nomenklatur orientiert sich an den Wachstums-/Differenzierungsfaktoren, der Zellherkunft sowie dem Stimulator (Murray et al., 2014). Die Makrophagen der vorliegenden Arbeit werden dem entsprechend als *Bone-marrow derived macrophages M-CSF differentiated and (LPS) stimulated* oder (*inactivated CMV*) stimulated bezeichnet.

1.4 Interzelluläre Kommunikation zwischen Makrophagen und Hepatozyten

Die Hepatozyten-Makrophagen-Kommunikation ist seit langem Bestandteil intensiver Forschung. West et. al erkannten, dass die Proteinsynthese der Hepatozyten abhängig von der Hepatozyten-Makrophagen Kommunikation ist (West et al., 1986). Aus diesem Grund führten Sie Mitte der achtziger Jahre diverse *in vitro* Ko-Kultur Experimente mit Makrophagen und Hepatozyten durch (West et al., 1985). Sie wiesen nach, dass infolge der direkten Ko-Kultivierung beider Zelltypen der Leucineinbau der Hepatozyten nach Stimulation mit LPS reduziert wurde. Eine Veränderung der Hepatozytenreaktion allein auf eine Lipopolysaccharidstimulation wurde nicht nachgewiesen (West et al., 1985). Effekte der Ko-Kultivierung auf die Proteinsynthese konnten durch die Gabe von Glucocorticoiden aufgehoben werden (Keller et al., 1986). Anschließende Experimente mit Überständen legten die Vermutung nahe, dass die Kommunikation auf löslichen hitzestabilen Mediatoren der Makrophagen basiert (Keller et al., 1985).

In einer neuen Versuchsanordnung untersuchten Hoebe et al. (2001) den Unterschied zwischen einer Hepatozyten-Makrophagen Ko-Kultur mit direktem Zell-Zell-Kontakt und einer Trennung der Zellen über eine semipermeable Membran. Der direkte Zell-Zell Kontakt in der Ko-Kultur führte zu einer stark erhöhten TNFα- und IL-6 Produktion, während die Ko-Kultur getrennt durch die semipermeable Membran ungefähr gleich viele Zytokine produzierte, wie die Kupffer Zellen allein. Im Gegensatz dazu war eine Kokultivierung der Hepatozyten mit Kupffer Zellen über die semipermeable Membran ausreichend, um eine Abnahme der Biotransformationskapazität der Hepatozyten zu erreichen (Hoebe et al., 2001). Die Ko-Kulturen mit direkten Zell-Zell Kontakt reagieren stärker pro-inflammatorisch und wirken damit schädigend auf die Hepatozyten (Hoebe et al., 2001, Wu et al., 2006). Im Vergleich dazu konnte eine hepatoprotektive Kultivierungsform durch die Verwendung sogenannter Transwells etabliert werden (Petrasek et al., 2011). Durch die Nutzung dieser Ko-Kultureinsätze ist kein direkter Zell-Zell Kontakt möglich, jedoch eine Kommunikation über lösliche Mediatoren, welches der Anatomie der Leber, mit der Trennung der Kupffer Zellen von den Hepatozyten durch die Endothelzellen am nächsten kommt.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe legen nahe, dass unter Verwendung eines *Transwell Systems* Hepatozyten den Aktivierungszustand kultivierter Makrophagen auf spezifische Weise beeinflussen. Dieser definiert sich durch die erhöhte Expression von CD163, CD206, Gr1, CD11c, MHCII und TLR4 aber auch von iNOS und Arg1. Zusätzlich reagieren die kokultivierten Zellen mit einer verstärkten Expression anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10 und IFNβ) und einer verminderten Expression pro-inflammatorischer Zytokinexpression (IL-6, IL-12 und TNFα) infolge der Stimulation mit LPS (Wolf, 2015).

1.4.1 VLDL Rezeptor-abhängige Hepatozyten-Makrophagen Interaktion

Makrophagen sind Fresszellen, die durch Phagozytose sterbender Zellen unter anderem Fett aufnehmen und weiterverarbeiten. Betrachtet man die Fate-mapping Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Charlotte L. Scott, sind Kupffer Zellen auf die Interaktion mit Fetten spezialisiert (Remmerie 2018). and Scott, Makrophagen nehmen LDL, VLDL, und Lipoproteine sowohl über Rezeptor-abhängige als auch Rezeptor-unabhängige Mechanismen in die Zelle auf. Einer dieser Rezeptoren ist der Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDL-Rezeptor). Dieser wird ebenfalls in den Makrophagen exprimiert und dient als Lipoprotein-Rest Rezeptor. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass Apolipoprotein E (ApoE) anti-inflammatorisch auf Makrophagen wirkt und eine M2-ähnliche Polarisierung auslöst (May et al., 2013). Rezeptor Knock-Out Versuche ergaben, dass ein Teil dieser Wirkung VLDL-Rezeptor und ApoE2 Rezeptor abhängig ist (Baitsch et al., 2011). Ob der VLDL Rezeptor auch in der Hepatozyten-Makrophagen-Kommunikation eine entscheidende Rolle spielt, wurde bisher nicht überprüft.

1.5 Einfluss von Pathogenen auf Makrophagen

1.5.1 Bakterien

Bakterien gehören zu den Prokaryoten, einer Gruppe von Lebewesen, deren Zellaufbau ohne Zellkerne auskommt. In ihnen liegt die DNA frei im Zytosol vor. Es gibt eine Vielzahl an Bakterien, die uns alltäglich umgeben und mit denen der menschliche Körper in Kontakt kommt. Bakterien können nach dem Vorhandensein einer Mureinhülle in gramnegativ und grampositiv unterschieden werden. Dabei bezieht sich Gram auf die Färbung der Mureinhülle, einer Peptidoglykanschicht. Die Zellwand der gramnegativen Bakterien ist unter anderem aus Lipopolysachariden (LPS) zusammengesetzt, welche durch diese Färbung unbeeinflusst bleibt.

Lipopolysaccharide bestehen aus einem Lipid- und einem Zuckerteil. Im Detail enthalten sie Lipid A, eine Kernregion und variable Polysaccharidketten. Das Lipid A ist in der äußeren Membran TLR4 verankert und wirkt über die Bindung an den als Endotoxin. Für die Entdeckung der Toll like-Rezeptoren auf der Drosophila melanogaster Fliege und der Entdeckung, dass LPS via TLR 4 eine Entzündungsreaktion vermittelt (Poltorak et al., 1998, Poltorak et al., 2000, Lemaitre et al., 1996), erhielten Bruce Beutler und Jules Hoffman 2011 den Nobelpreis.

Heute weiß man, dass das LPS-bindende Protein (LBP) an LPS Aggregate oder ganze Bakterien bindet und LPS-Monomere durch das extrazelluläre Protein CD14 (Schumann, 2011) extrahiert. CD14 überträgt das LPS auf TLR4 und seinen assoziierten Faktor MD-2 (Gioannini et al., 2004). Die LPS-Bindung fördert die TLR4/MD-2-Dimerisierung, was einen notwendigen Schritt für die Signalweiterleitung darstellt. CD14 vermittelt zusätzlich die Endozytose der TLR4-Dimere.

Nach Bindung an den TLR4 Rezeptor können zwei Signalkaskaden aktiviert werden. Wird die MYD88-abhängige Singalkaskade aktiviert, folgt eine Zusammenstellung des Supramolekularen Organisationszentrum (SMOC) auch *"Myddosome"* genannt (Bonham et al., 2014, Lin et al., 2010, Motshwene et al., 2009). Das SMOC besteht mindestens aus den Adapterproteinen MyD88, TIRAP und Serin/Threoninkinasen aus der IRAK Familie. Über diesen Komplex aktivieren die TLR4 Signale NF-κB und AP-1. Hierauf folgt die Expression überwiegend proinflammatorischer Gene. In der zweiten Signalkaskade führt die Internalisierung von TLR4 ins Endosom zu einer *Interferon regulatory factor* 3 (IRF3) abhängigen Typ-I Interferon Produktion (Fitzgerald et al., 2003, Yamamoto et al., 2003). Dieser MYD88-unabhängige Weg aktiviert das Adapterprotein *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) welches über TRAF3 die IRF3, IRF7 und NF-κB aktiviert, wodurch ebenfalls Typ-I Interferone produziert werden (Jiménez-Dalmaroni et al., 2016)

Alleine anhand des Beispiels für LPS wird deutlich, welches komplexe Netzwerk von Signalkaskaden in Immunzellen und hier insbesondere in den Antigenpräsentierenden Zellen induziert werden kann. Dabei handelt es sich hier um ein isoliertes Signal, während im Organismus ständig eine Vielzahl von verschiedenen Liganden über diverse Rezeptoren ganz verschiedene Signalkaskaden aktivieren oder inhibieren. All diese Informationen werden von den Zellen integriert und insbesondere die Makrophagen können sich dabei in ihrer Reaktion dem sie umgebenden Milieu anpassen.

1.5.2 <u>Viren</u>

Viren sind infektiöse biologische Einheiten. Sie besitzen keine eigene Zellstruktur und können ohne eine geeignete Wirtszelle nicht wachsen oder sich fortpflanzen. Ihr Aufbau besteht aus der DNA- oder RNA-Säure, welche durch einen Proteinmantel, dem Kapsid, umschlossen ist. Dieser als Nukleokapsid bezeichneter Komplex wird bei komplexeren Viren zusätzlich durch eine Hülle aus Lipoproteinen und Polysacchariden umschlossen. Gegen diese Hüllbestandteile können bei der Wirtszelle Antikörper gebildet werden. Jedoch sind einige Viren durch eine stetige Ko-Evolution perfekt an ihren Wirt angepasst. Zu diesen Viren gehört auch die Gattung der Humanen Herpes Viren, die aufgrund ihrer meist harmlosen Infektionsverläufen und hohen Übertragbarkeit sehr hohe Durchseuchungsraten und damit Überlebensraten erreicht haben. Im Speziellen besteht das Cytomegalievirus (CMV) aus einer Doppelstrang-DNA (230 Kilobasen (kb)), einem aus verschiedenen Kapsomeren aufgebauten ikosaedrischen Kapsid und zusätzlich einer Virushülle bestehend aus sechs Glykoproteinen. Es gehört zu der Familie der humanen Herpesviren (Humanes Herpesvirus 5) (Rawlinson et al., 1996). Die humane CMV (HCMV) Infektion verläuft bei immunkompetenten Personen asymptomatisch oder mit leichten Symptomen (ähnlich einer Mononukleose) und geht anschließend in eine latente Infektion über (Crough and Khanna, 2009). Bei immundefizienten Patienten, z.B. nach Transplantation, bei HIV-Erkrankung oder postnataler Infektion kann es zu einer generalisierten, lebensbedrohlichen Infektion kommen (Gesundheit, 2018). Das Cytomegalievirus ist weltweit verbreitet mit einer Seroprävalenz von 45 bis > 90% unter Frauen im gebärfähigen Alter (Cannon et al., 2010). Durch die Koevolution des CMV und seinem Wirt hat das Virus diverse Strategien erworben, um einer Immunantwort zu entgehen. Es existieren Spezies-abhängige Formen des Cytomegalievirus. murines CMV (mausspezifisches CMV, MCMV) und humanes CMV (HCMV) teilen 45% ihres Genpools (Rawlinson et al., 1996), deshalb bestehen Ähnlichkeiten in der Immunmodulation des Virus (Baasch et al., 2020) . Die am besten erforschten Prozesse einer Immunevasion bestehen überwiegend aus Eingriffen in die adaptive Immunität. Die T-Zell-Aktivierung und -Rekrutierung wird über diverse Strategien abgeschwächt. Dazu gehören die verminderte Expression von Major Histocompatibility Complex (MHC) Molekülen (del Val et al., 1992, Hengel et al., 1996), bei gleichzeitiger Nachahmung und Präsentation von MHC I Mimikry, um eine NK Zell Aktivierung zu umgehen (Reyburn et al., 1997). Ebenfalls kodieren HCMV und MCMV Proteine, die die Aktivierung von NK Zellen hemmen, indem sie zelluläre Liganden für den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D herunterregulieren (Hasan et al., 2005, Krmpotic et al., 2005). Zusätzlich löst CMV eine gezielte Expression von bestimmten wirtsähnlichen Epitopen und die Nachahmung antiinflammatorischer Interleukine und Chemokine aus (Manandhar et al., 2019). Das Virus übernimmt nach Infektion in der *immediate-early phase* die Proteinproduktion und greift dadurch in relevante Regelkreisläufe des Immunsystems der Zelle ein. So wird die Expression einiger Chemokine wie RANTES, MIP-1 α und IL-9 durch die NF- κ B Inhibierung gehemmt, was wiederum zu einer verminderten Expression von Interferon- β führt. Interferon- β wirkt anti-viral, indem es die benachbarten Zellen vor einer Infektion schützt. Darüber hinaus wird durch die Senkung des Jak-Kinase-Levels die IFNy modulierte MHC II Expression gesenkt. (Vandevenne et al., 2010, Miller et al., 2002).

Ebenfalls findet eine, von der Virusinfektion unabhängige Reaktion statt. Hierfür sind die auf der Virusoberfläche befindlichen Hüllproteine des CMV, im speziellen die *envelope glycoproteins* B und H (gB und gH) verantwortlich. Diese PAMPs können durch den TLR 2 mit CD14 erkannt werden und leiten eine antivirale Antwort unabhängig von einer Infektion der Wirtszelle ein. Im

Detail kommt über eine Aktivierung des NF-κB Signalweges zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone (Compton et al., 2003, Boehme et al., 2004). Nach Phagozytose wird das Virus über den endosomalen TLR-9-Rezeptor erkannt. TLR-9 aktiviert über Myd88 NF-KB und aktiviert damit ebenfalls die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Weiterhin wird IRF7 phosphoryliert, wodurch nach Dimerisierung vermehrt IFN Typ I produziert wird. Interferone (IFN) Typ I wirken antiviral und schützen vor Infektion benachbarter Zellen. Diesen Abwehrmechanismus kann das vitale MCMV und HCMV hemmen (Le et al., 2008a). Weitere Rezeptoren sind im Zytosol zu finden. Ein Beispiel hierfür ist das DNA-dependent activator of interferon regulatory factors/Z-DNA binding protein 1 (DAI/ZBP1) und der dsDNA absent in melanoma 2 (AIM2) Rezeptor. Hierüber wird zum einen eine Nekrose ausgelöst, welche durch HCMV inhibiert werden kann (Upton et al., 2010) und zum anderen wird die Produktion von IL-1β aktiviert (Vandevenne et al., 2010). Die IL-1β Produktionsaktivierung konnte nur bei UVinaktivierten HCMV nachgewiesen werden. Ein lebendes HCMV scheint dies zu inhibieren (Botto et al., 2019). Ein UV-inaktiviertes Cytomegalievirus wurde durch die UV-Bestrahlung in seiner räumlichen und funktionalen Struktur zerstört und kann somit keine Wirtszelle infizieren, jedoch durch Erkennung an Oberflächenrezeptoren oder durch Endozytose Signalwege aktivieren.

Weiterhin wirkt das HCMV auch direkt im Nucleus auf die Genexpression und inhibiert z.B. die IFNβ Produktion (Vandevenne et al., 2010). Zusammenfassend wirkt vitales HCMV einer Immunantwort entgegen und versucht somit ein für sich permissives Milieu zu schaffen. Ein Teil dieser immunregulativen Wirkung wird bereits durch UV-inaktivierte Viren ausgelöst, d.h. eine Infektion der Zelle ist nicht erforderlich. Allerdings reagieren die mit abgetötetem Virus stimulierten Zellen stärker anti-viral als die infizierten Zellen, was die Relevanz der oben beschriebenen *immunescape mechanisms* unterstreicht (Ehlting et al., 2016, Doring et al., 2014). Wie sich die interzelluläre Kommunikation zwischen Hepatozyten und Makrophagen auf die antivirale Antwort der Makrophagen auswirkt, ist bislang nur unzureichend verstanden.

1.6 Zytokine und Chemokine

1.6.1 <u>Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)</u>

TNF α ist ein Zytokin, welches als wichtigste Funktion die Aktivität verschiedener Immunzellen reguliert. So kann TNF α die Apoptose, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine anregen(Beutler and Cerami, 1987) (Zelová and Hošek, 2013). Ebenfalls wirkt TNF α antiviral durch eine selektive Eliminierung infizierter Zellen (Wong and Goeddel, 1986, Pavić et al., 1993). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass TNF α in der latenten Phase synergistisch und in Kombination mit IFN γ die Immunevasion des Cytomegalievirus schwächt (Lucin et al., 1994, Hengel et al., 1995). TNF α wird in hohem Maße von Makrophagen ausgeschüttet und im Rahmen dieser Arbeit vereinfacht als pro-inflammatorisches und antivirales Zytokin gewertet.

1.6.2 Interleukin 6 (IL-6):

Interleukine sind Botenstoffe des Immunsystems. Interleukin 6 besitzt vielfältige Funktionen. Es werden IL-6 neben der proinflammatorischen Wirkung z.B. über die vermehrte Synthese der Akut-Phase-Proteine in der Leber (Gauldie et al., 1987) und der Beeinflussung des Immunsystems (Wolvekamp and Marquet, 1990) auch homöostatische Effekte zugeschrieben. Dementsprechend kann man Interleukin 6 nicht auf eine Funktion begrenzt betrachten.

1.6.3 Interleukin 10 (IL-10):

Interleukin 10 wird als anti-inflammatorisches Zytokin angesehen. Es hemmt überschießende Immunreaktionen z.B. durch Hemmung von TNF α , Interleukin 1 und Interleukin 6 Produktion (Knolle et al., 1995, Tang-Feldman et al., 2011) und kann die Differenzierung und Aktivität von T-Zellen beeinflussen. Im Rahmen von Interleukin 10 Knock-Out Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei IL-10 defiziente Mäuse eine höhere Krankheitslast, bei gleichzeitig verminderter Virusreplikation bestand (Oakley et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wird IL-10 als antiinflammatorisches und provirales Zytokin gewertet.

1.6.4 Interferon β (IF-β):

Interferon β ist ein Zytokin, welche eine Reihe von Wirkungen besitzt. Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist die Induktion eines viralen Schutzes von benachbarten, noch nicht infizierten Zellen sowie die Aktivierung einer antiviralen Immunantwort über den JAK/STAT Signalweg (Miller et al., 2002). Ebenfalls wird Interferon β im Gegensatz zu Interferon γ eher antiinflammatorische Effekte zugeschrieben. In dieser Arbeit ist vor allem diese antivirale Aktivität von Bedeutung (Gresser, 1990, Boehme et al., 2004).

1.6.5 Induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS):

Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) nutzt der Makrophage, um Stickstoffmonoxid (NO) zu produzieren. Mit dem in großen Mengen toxischen NO kann der Makrophage direkt Bakterien und Zellen abtöten. Ebenfalls hat die iNOS eine antivirale Eigenschaft in der akuten Infektionsphase des Cytomegalievirus. So verstarben iNOS Knock Out Mäuse früher und es wurden erhöhte CMV Titer in den Organen gemessen. (Tanaka and Noda, 2001). Dementsprechend wird die iNOS als pro-inflammatorischer und antiviraler Marker gewertet.

1.6.6 <u>Arginase 1 (Arg1):</u>

Die Arginase 1 ist ein Enzym, welche mit der iNOS um das Arginin konkurriert. Die Zellen nutzen Sie als Gegenspieler zur iNOS und exprimieren die Arginase zur verminderten Wirkung der iNOS

(Bansal and Ochoa, 2003). Dem Enzym Arginase werden damit eher gewebeprotektive und reperaturmechanismen auslösende Effekte zugeschrieben. Ebenfalls soll durch die verminderte Argininverfügbarkeit die T-Zellantwort herabreguliert werden (Munder, 2009). Dementsprechend wird die Arginase in dieser Arbeit als antiinflammatorisches und gewebeprotektives Zytokin gewertet. Jedoch ergaben neuere Arbeiten, dass ein Zusammenhang mit einer Arginase Überexpression und kardiovaskulären sowie neuronalen Erkrankungen existiert (Caldwell et al., 2018)., die am ehesten durch die reduzierte NO Synthese erklärt werden können.

1.6.7 <u>CXCL 9:</u>

CXCL9 ist ein Chemokin. Es wird von Makrophagen nach Stimulation mit IFN y verstärkt ausgeschüttet und bindet an den CXCR3 Rezeptor. Dieser Komplex bindet Lymphozyten und vermehrt dadurch die Anzahl von Immunzellen in dem entzündeten Gewebe. Hierdurch nimmt CXCL9 entscheidenden Anteil an der Entzündungsreaktion vor Ort (Groom and Luster, 2011).

1.6.8 <u>CXCL10:</u>

CXCL10 ist ebenfalls ein Chemokin, welches nach INF y Aktivierung ausgeschüttet wird. Es bindet gleichsam CXCL9 an den CXCR3 Rezeptor. Damit führt eine vermehrte CXCL10 Ausschüttung ebenfalls zu einer erhöhten Anzahl von Immunzellen im entzündeten Gewebe und wirkt damit primär entzündungsfördernd (Liu et al., 2011).

1.7 Ziel der Arbeit

Ausgehend von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, die belegen, dass Hepatozyten die Funktion von Makrophagen beeinflussen, war die Untersuchung des Einflusses von Hepatozyten auf die Reaktion von Makrophagen auf Stimulation mit viralen Pathogenen Ziel der Arbeit. Dies sollte im Vergleich zur Reaktion auf Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), einer Komponente der Wand gram-negativer Bakterien, untersucht werden. Hierfür wurde ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Ko-Kultur System verwendet, in welchem hoch-aufgereinigte Hepatozyten und aus Knochenmark generierte Makrophagen durch eine Membran getrennt ko-kultiviert werden, die eine Kommunikation über lösliche Mediatoren zulässt, jedoch nicht über Zell-Zellkontakte. Um den Einfluss der Hepatozyten auf die Reaktion der Makrophagen auf virale Pathogene zu analysieren wurden die Zellen mit abgetöteten murinen Cytomegalieviren in Kontakt gebracht.

Ergänzend sollte der Einfluss von Hepatozyten auf den Aktivierungszustand von Makrophagen überprüft werden und inwieweit die Dauer der Ko-Kultur hierauf Einfluss hat. Darüber hinaus sollte unter Verwendung von aus VLDL Rezeptor defizienten Tieren isolierten Hepatozyten und

Makrophagen eine mögliche Relevanz des VLDL-Rezeptors für den Einfluss von Hepatozyten auf die Funktion von Makrophagen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

- -C57BL/6J Wildtyp-Mäuse, männlich 8-12 Wochen (Janvier Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich)
- -B6;129S7-Vldlr^{tm1Her} Deletion des Very low density lipoprotein (Vldl) Rezeptors, männlich, 8-12 Wochen (zur Verfügung gestellt von Prof. Hans Bock, Universitätsklinikum Düsseldorf)

Die Versuchstiere wurden in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf unter spezifisch-pathogen freien Bedingungen (SPF) gehalten und gezüchtet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter. Die Haltungsbedingungen der Tiere bestanden aus einem 12h Tag-Nacht Zyklus, einer Temperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter den Aktenzeichen 81-02.04.2017.A406 und 84-02.04.2016.A462 genehmigt und entsprechend des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.1.2 Zellpräparation:

2.1.2.1 Leberzellpräparation	
Abbocath	Venisystems Hospira, München, Dtld.
Ketavet 100 mg/ml	Pfizer, New York, USA
Rompun 2%	Bayer Healthcare, Leverkusen, Dtld.
Kollagenase CLS2	Biochrom, Berlin, Dtld.
Zellsieb (70qm)	BD Falcon [™] , Heidelberg, Dtld.
autoMACS Rinsing Soltution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtld.
OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtld.
CD11b MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtld.

Large Cell Separationssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtld.			
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Darmstadt	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Dtld.			
HANKS-Puffer:	NaCl	8 g			
	KCL	0,4 g			
	Hepes	3,57 g			
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,06 g			
	KH ₂ PO ₄	0,06 g			
	Ad a. bidest	auf 1 l			
	pH 7,4, autoklavieren				
HANKS-Puffer 1:	HANKS-Puffer	200 ml			
	2 mMol/l EGTA	800 µl			
	0,1% Glucose	2 ml			
HANKS-Puffer 2:	HANKS-Puffer	100 ml			
	0,1% Glucose	1 ml			
	5 mMol/l CaCL ₂	1 ml			
	Collagenase (240 U/mg) 61mg (in 10 ml				
	HANKS-Puffer lösen u	nd anschließend steril			
	filtrieren)				

2.1.2.2 <u>Knochenmarkspräparation</u>	
Dulbecco's MEM (1.0 g/l Glucose)	Biochrom, Berlin, Dtld.
BMDM Waschmedium	Dulbecco's MEM (1.0 g/l Glucose)
	1% Penicillin/Streptomycin
70% Ethanol	Ethanol absolute
	VE Wasser
DPBS (w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺)	Biofroxx, Einhausen, Dtld.
Ethanol absolute	VWR Chemicals, Radnor, USA
Penicillin/Streptomycin (100X)	Cytogen, Sinn, Dtld.
Sterican-Kanüle 23G	B.Braun, Melsungen, Dtld.

Penicillin/Streptomycin (100X)	Cytogen, Sinn, Dtld.
Sterican-Kanüle 23G	B.Braun, Melsungen, Dtld.

2.1.3 Zellkultur

2.1.3.1 <u>Leberzellkultur</u>	
William's Medium E	Biochrom, Berlin, Dtld.
(w 2.2 g/l NaHCO₃; w/o L-Glutamin)	
Attachment-Medium	William's Medium E
	10% FCS (hitzeinaktiviert, steril filtriert)
	1% Penicillin/Streptomycin
	2 mM L-Glutamin
Starvation-Medium	William's Medium E
	1% Penicillin/Streptomycin
	2 mM L-Glutamin
Fetal Bovine Serum (FCS)	Thermo Fisher, Waltham. USA
Sterilfilter Filtropur S (0,2μm)	Sarstedt, Nürnbrecht, Dtld.

2.1.3.2 <u>Sanwichkultur</u>

Kollagen (<i>rat tail</i>)	Roche Diagnostics, Mannheim, Dtld.
Dulbecco's Modified Eagle's Medium 10x	Sigma-Aldrich, Darmstadt Dtdl.
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Dtld.
Injetkionswasser Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Dtld.
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Dtld.
Gelöstes Kollagen (1 mg/ml)	Kollagen (rat tail)
	9 ml 0,2% Essigsäure
	1 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium 10x
	1 M NaOH Lösung zur pH-Wert Einstellung
	(Farbumschlag bei pH 7,4)

2.1.3.3 <u>Kultur von Knochenmarkszellen:</u>					
Murine M-CSF	PeproTech	lnc,	New	Jersey,	USA
Penicillin/Streptomycin(100X)	Cytogen, Sinn	, Dtld.			
BMDM Kultur-Medium	Dulbecco's MI	EM (1.0 §	g/l Glucos	e)	
	10% FCS, Ther	mo Fishe	er, Waltha	am. USA	
	10 mg/ml Pen	icillin/St	reptomyci	in	
	10 ng/ml Mur	ine M-CS	6F		
Zellkulturflaschen 550ml, 175 cm ²	Greiner Bio-O	ne, Frick	enhausen	, Dtld.	
Zellkulturplatten 145/20 mm	Greiner Bio-O	ne, Frick	enhausen	, Dtld.	
Trypsin/EDTA (1x)	CytoGen Gmb	h,Wetzla	ar, Dtld.		
Zellschaber	BD Falcon [™] , H	Heidelbe	rg, Dtld.		
Kompanion-Platten	Greiner Bio-O	ne, Frick	enhausen,	, Dtld.	
Ko-Kultur Einsätze (0,4 μm Porengröße)	Greiner Bio-O	ne, Frick	enhausen	, Dtld.	

2.1.4 <u>Stimulanzien</u>

LPS (L-3012 O111:B4) von E. coli Sigma-Aldrich, Darmstadt, Dtld. UV-behandeltes murines Zytomegalievirus (MCMV) (MCMVΔm157 tdT), hergestellt nach (Ehlting et al., 2016).

2.1.5 <u>Kits</u>

Qiashredder Säulen	Quiagen, Hilden, Dtld.
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, Dtld.
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Quiagen, Hilden, Dtld.
Mouse TNFα ELISA Ready-Set-Go!®	eBioscience, USA
Mouse IL-10 ELISA Ready-Set-Go! (2 nd Generation)	eBioscience, USA
Quantikine [®] Mouse TNFa Immunoassay	R&D Systems [®] , USA
Quantikine [®] Mouse IL-6 Immunoassay	R&D Systems [®] , USA

2.1.6 Quantitative PCR

FrameStar [®] 96-Lochplatte	4titude Ltd. Surrey, UK
qPCR Seal Folie	4titude Ltd. Surrey, UK
GoTaq qPCR Master Mix	Promega, Walldorf, Dtld

Tabelle 1: Primerauflistung für qPCR

Murine Gene	Orientierung	Primer Sequenzen
Succinate Dehydrogenase subunit A	Forward	5'-TGGGGAGTGCCGTGGTGTCA-3'
(SDHA)	Reverse	5'-GTGCCGTCCCCTGTGCTGGT-3'
Tumornekrosefaktor-α	Forward	5'-GCTGAGCTCAAACCCTGGTA-3'
TNF-α	Reverse	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
Interleukin-6 (IL-6)	Forward	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'
	Reverse	5'GATTGTTTTCTGCAAGTGCATC-3'
Interleukin-10 (IL10)	Forward	5'-CCAAGCCTTATCGGAAATGA-3'
	Reverse	5'-TCCTGAGGGTCTTCAGCTTC-3'
Interferon-β (IFN-β)	Forward	5'-CCCTATGGAGATGACGGAGA-3'
	Reverse	5'-ACCCAGTGCTGGAGAAATTG-3'
Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	Forward	5'-AGAGATTGGAGGCCTTGTGT-3'
	Reverse	5'-ACATGCAAGGAAGGGAACTC-3'
Arginase 1 (Arg1)	Forward	5'-GTGAAGAACCCACGGTCTGT-3'
	Reverse	5'-CTGGTTGTCAGGGGAGTGTT-3'
CXCL 9	Forward	5'-TCATCTTCCTGGAGCAGTGTG-3'
	Reverse	5'-GATTTGTAGTGGATCGTGCCT-3'
CXCL 10	Forward	5'-GTGCTGCCGTCATTTTCTGC-3'
	Reverse	5'-CATTCTCACTGGCCCGTCATC-3'

2.1.7 Durchflusszytometrie

5 ml Polystrene Round-Bottom	BD Falcon [™] , Heidelberg, Dtld
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Dtld.
FACS-Puffer:	500 ml DPBS w/o Calcium und Magnesium
	10 g BSA
	500 μl Natriumazid (10% Stammlösung)
Leucoperm [®] REAGENT A	BIO RAD, Düsseldorf, Dtld.
Leucoperm [®] REAGENT B	BIO RAD, Düsseldorf, Dtld.

Tabelle 2: Antikörperauflistung für durchflusszytometrische Analyse

Antikörper	Klon	Markierung	Hersteller
Anti-Maus Ly 6G	1A8-Ly6g	APC	Thermo Fisher, Waltham, USA
Anti-Maus CD11c	N418	PE	Thermo Fisher, Waltham, USA
Anti-Maus MHCII	M5/114.15.2	PE	Thermo Fisher, Waltham, USA
Anti-Maus CD206	MR5D3	FITC	BIO RAD, Düsseldorf, Dtld.
Anti-Maus TLR4	MTS510	FITC	BIO RAD, Düsseldorf, Dtld
Anti-Maus CD163	2F8	unmarkiert	Biomedicals
Sekundärantikörper	polyklonal	СуЗ	Dianova

2.1.8 <u>Geräte</u>

Brutschrank HERACELL 150i	Thermo Fisher, Waltham. USA
FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg, Dtld.
ViiA7 real time-PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Dtld.
Centrifuge 5424	Eppendorf, Köln, Dtld.
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Köln, Dtld.
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Köln, Dtld.
Autoclave Systec VX-65	Systec, Linden, Dtld.

Sterilbank HERASAFE KS	Thermo Fisher, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Brand GMBH+CO KG, Wartheim, Dtld.
UV Lampe Vilber Lourmat BLX-254 80W	Eberhardzell, Dtld.
Nanodrop	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, Dtld.
Mikroskop	Olympus Model IMT2, Hamburg, Dtld.
Multiskan Spectrum	Thermo Scientific, Waltham, USA
Schlauchpumpe	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH,
	Werthheim-Monfeld, Dtld.
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
440-47N Waage	KERN, Balingen, Dtld.
Wasserbad/Thermometer E5	Medingen, Dresden, Dtld.
Magnetrührer mit Heizung RCT basic	IKA [®] Werke, Staufen, Dtld.

2.2 <u>Methoden</u>

2.2.1 Präperation primärer Leberzellen

Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer (i.p.) Injektionsnarkose mit 10 mg/100 g Körpergewicht Ketavet und 0,5 mg/100 g Körpergewicht Rompun narkotisiert. Nach Eintritt des Toleranzstadiums (Reflexe erloschen) wurde der Bauchraum über einen abdominalen und zwei laterale Schnitte eröffnet. Über einen Abbocath, der in der *Vena portae* platziert wurde, erfolgte die Perfusion der Leber. Um eine Druckentlastung der Leber nach Anschluss des Pumpensystems zu gewährleisten, wurde ein Entlastungsschnitt an der *Vena cava inferior* gesetzt. Die Durchführung der Zwei-Phasen-Perfusion bestand aus der Perfusion mit HANKS-Puffer I, der mit einer Flussrate von 8 ml pro Minute das Blut aus der Leber spülte, gleichzeitig durch den Zusatz EGTA Ca-Ionen band und damit eine Lockerung des Zellverbandes bewirkte. In der zweiten Phase wurde bei gleicher Flussrate HANKS-Puffer II perfundiert, der Kollagenase und Calcium enthielt. Die Applikation von Calcium normalisiert die Ionenverteilung, was zu einer Aktivitätssteigerung der Kollagenase führt. Durch die Applikation der Kollagenase lösen sich Peptidbrücken in der extrazellulären Matrix des Zellverbandes auf, wodurch die hepatischen Zellen in einen lockeren Zellverband überführt werden. Dieser Prozess war anhand des Anschwellens der Leber sichtbar und signalisierte das Ende der Perfusion.

Die Leber wurde anschließend entnommen und in ein Falcon mit 10 ml Attachment-Medium platziert. Unter der Sterilbank wurde die Leberkapsel eröffnet und vorsichtig die Leberzellen herausgeschwemmt. Die Zellsuspension wurde über ein Sieb (Porengröße 70 μ m) filtriert, um größere Leberbestandteile, wie zum Beispiel Leberkapselreste von den einzelnen Zellen zu trennen. Die vorliegende Leberzellsuspension wurde wie in 2.2.2 beschrieben weiter aufbereitet.

2.2.2 <u>Aufreinigung zu Hepatozyten</u>

Um eine hohe Hepatozyten Reinheit der Zellsuspension zu erreichen, hat sich die zusätzliche negative Selektion CD11b positiver Zellen nach erfolgter Hepatozytenisolation bewährt. Hierfür binden Antikörper gegen CD11b an CD11b positive Zellen. Diese Antikörper sind mit magnetischen *beads* gekoppelt, sodass unter Verwendung eines magnetischen Feldes diese Zellen zurückgehalten werden können.

Die aus Schritt 2.2.1 gewonnene Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur 3 Minuten bei 50 g, Beschleunigung/Bremse 3 zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das vorhandene Zellpellet wurde in 10 ml *Attachment*-Medium resuspendiert und erneut 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in MACS-Puffer gelöst und ein letztes Mal zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer und 100 µl CD11b MicroBeads resuspendiert. Diese Lösung inkubierte 15 Minuten bei 4°C. Anschließend wurde das Volumen mit MACS-Puffer auf 10 ml erhöht. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Schritten auf die mit MACS-Puffer äquilibrierten *Large Cell* Separationssäulen gegeben, die im magnetischen Feld des Octo MACS Separator eingespannt waren. Durch die Markierung CD11b positiver Zellen mit magnetischen Beads wurden diese Zellen, durch das magnetische Feld, in der Säule zurückgehalten. Der Durchfluss wurde aufgefangen und wie oben beschrieben zentrifugiert und anschließend in *Attachment*-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Lichtmikroskop bei 10-fach Vergrößerung und Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.2.1 <u>Sandwichkultur</u>

Um eine Parenchym zu Mesenchym-Transition der Hepatozyten zu verhindern, wurde die Zellkultivierung nach der Sandwichmethode verwendet (Dunn et al., 1989). In dieser werden isolierte Hepatozyten, die durch zusätzliche Schritte von kontaminierenden Monozyten und Makrophagen aufgereinigt wurden, in Kollagen eingebettet.
Hierzu wurde das lyophilisierte Kollagen in 9 ml 0,2%iger Essigsäure über Nacht gelöst. Unter Hinzugabe von 1 ml des 10-fach konzentriertem DMEM inklusive pH-Indikator sowie der Zugabe von 1 M NaOH wurde ein neutraler pH-Wert der Lösung eingestellt. Die Endkonzentration des Kollagens betrug 1 mg/ml.

Pro Kavität der Companion-Platte wurden 350 μl gelöstes Kollagen appliziert und unter Zuhilfenahme eines Spatels gleichmäßig verteilt. Nach einer h Inkubation im Brutschrank wurden 800.000 Hepatozyten pro Kavität ausgesät. Wiederum nach 3 Stunden Inkubation im Inkubator (37°C, 5% CO₂) wurden die ausgesäten Hepatozyten unter sterilen Bedingungen zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen, um nicht haftende Zellen zu entfernen. Danach wurde die zweite 350 μl Kollagenschicht hinzugegeben und durch Schwenken der Companion-Platte das Kollagen gleichmäßig verteilt. Nach einer weiteren h im Brutschrank, wurden 2 ml *Starvation*-Medium hinzugegeben und die Zellen inkubiert.

2.2.3 Knochenmarkspräparation und Differenzierung zu BMDM

Zur Generierung von aus Knochenmark stammenden Makrophagen, *bone-marrow derived macrophages* (BMDM), wurden in unserer Arbeitsgruppe etablierte Protokolle, siehe Wolf (2015), angewendet, wobei unter dem Einfluss des murinen Monozyten-koloniestimulierenden Faktors (mM-CSF) naive Knochenmarkszellen in 7-9 Tagen zu Makrophagen differenzieren. Vorteil hierbei ist die Generierung einer großen Anzahl homogener BMDMs (Manzanero, 2012, Weischenfeldt and Porse, 2008, Zhang et al., 2008, Stanley, 1985, Zanoni et al., 2009), welche F4/80⁺ und CD11b⁺ sind (Ehlting et al., 2011).

Für die Präparation von Knochenmark wurden die Hinterläufe der Maus mit einer Schere aus dem Hüftgelenk getrennt und bis auf den Knochen frei präpariert. Anschließend wurden die Knochen in 70%igem Ethanol für 5 Minuten gewaschen, dann kurz in PBS inkubiert und zum Schluss in BMDM-Waschmedium (Pen/Strep-haltiges DMEM inkl. 1g/l Glucose) überführt.

Zur Entnahme des Knochenmarks wurden die Knochenenden unter sterilen Bedingungen mit einer Präparierschere abgeschnitten und das Knochenmark mit einer 10-ml-Spritze plus Kanüle (23G) und BMDM-Waschmedium ausgespült.

Die ausgespülte Knochenmarkszellensuspension wurde 10 Minuten bei 4°C und 300 g (Beschleunigung/Bremse 4) zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde anschließend in 20 ml BMDM-Kulturmedium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche (175 cm²) über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

24

Am nächsten Tag, Tag 1 nach Präparation, wurde das Zellkulturmedium inkl. nicht adhärenter myeloider Zellen aus der Flasche entnommen, zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 300 g, Bremse/Beschleunigung 4), der Überstand verworfen, das Pellet in BMDM-Kulturmedium resuspendiert und auf fünf 145 cm²/20 mm Zellkulturplatten verteilt. Das Gesamtvolumen pro Platte betrug 20 ml BMDM-Kulturmedium mit jeweils 10 ng/ml mM-CSF.

Eine Volumenerhöhung fand an Tag 3 um 20 ml DMEM Kulturmedium mit 10 ng/ml mM-CSF und an Tag 6 um 10 ml DMEM Kulturmedium mit 10 ng/ml mM-CSF nach Präparation statt. An Tag 7 nach Präparation wurden die Makrophagen geerntet. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Makrophagen zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen. Nach Zugabe von 3,5 ml Trypsin und einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Brutschrank, konnten die Makrophagen vorsichtig mit einem Spatel von der Platte geschabt werden. Die resultierende Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 300 g, Bremse/Beschleunigung 4), das Zellpellet in BMDM-Kulturmedium resuspendiert und die vitale Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung und einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Zielverdünnung waren 100.000 Makrophagen pro ml BMDM-Kulturmedium, mit jeweils 10 ng/ml mM-CSF. 200.000 Makrophagen wurden pro Ko-Kultureinsatz verwendet und über Nacht kultiviert.

2.2.4 Ko-Kultur

Die Ko-Kultur wurde unter dem Vorbild der anatomischen Verhältnisse zwischen Kupfferzellen und Hepatozyten zueinander erstellt. Die Ko-Kultur ist ein zellkulturbasierter *in vitro* Ansatz, um die wechselseitigen Einflüsse zweier Zellpopulationen, hier der Makrophagen und Hepatozyten aufeinander, zu untersuchen. Das vorliegende Ko-Kultursystem mit den genutzten Companion-Platten und den Ko-Kultur Einsätzen (*Transwells*) ermöglicht eine Kommunikation der beiden Zelltypen. Die Porengröße von 0,4 µm verhindert dabei einen direkten Zell-Zell Kontakt, erlaubt jedoch den Austausch löslicher Mediatoren, ähnlich dem des fenestrierten Endothels der Lebersinusoide.

Für die Ko-Kultur wurden die primären, aufgereinigten Hepatozyten 2.2.2 in der Sandwichkultur 2.2.2.1 an Tag 1 nach der Hepatozytenpräparation mit den differenzierten BMDMs 2.2.3 an Tag 8 nach Knochenmarkspräparation zusammengesetzt.

Im Detail wurde das Medium unter Erhalt der Sandwich-Kollagenstruktur aus der Companion-Platte abgesaugt und erneut 2 ml Starvation-Medium pro Kavität hinzugegeben. Danach folgte eine zweistündige Ruhezeit. Nach zwei Stunden wurde das Medium in den Ko-Kultureinsätzen abgesaugt, die Einsätze in die Companion-Platte mit den Hepatozyten überführt und 2 ml Starvation-Medium mit 10 ng/ml mM-CSF in die Einsätze hinzugegeben. Der Einfluss der Hepatozyten auf die Differenzierung der BMDMs wurde anhand durchflusszytometrischer Messungen an Tag 2, 3, 4 und 6 der Ko-Kultivierung erhoben. Der Einfluss auf die Reaktionsweise der Makrophagen wurde nach unterschiedlichen Kulturzeitpunkten sowie nach unterschiedlichen Stimulationen und Stimulationszeitpunkten anhand von mRNA- und Proteinexpressionanalysen bestimmt.

2.2.5 UV-Inaktivierung von CMV

Die UV-inaktivierung wurde bei 120 Joules je cm² Well-Fläche und einer Wellenlänge von 254 nm nach einem bestehenden Protokoll der Arbeitsgruppe durchgeführt (Ehlting et al., 2016).

2.2.6 Stimulation

Die Stimulation der Mono- und Ko-Kulturen von BMDMs und Hepatozyten erfolgte mit 10 ng/ml LPS oder mit UV-inaktivierten murinen Zytomegalieviren (CMV), die durch die UV-Inaktivierung in variable Einzelteile zerstört wurden. Deshalb werden diese im folgenden CMV dependente Pathogene (CMVamP) genannt. In Anlehnung an die Terminologie MOI (Multiplicity of Infection) wird im Folgenden der Begriff MOS (Multiplicity of Stimulation) verwendet, hierbei bezieht sich die Viruspartikelanzahl auf das initiale theoretische Verhältnis von lebendigen Viruspartikel pro Zielzelle (MOI), bevor das Virus UV-inaktiviert und eine Infektion somit ausgeschlossen wurde. Eine MOS-Dosis von zwei entspricht dem Ergebnis von initial zwei lebendigen infektiösen Zytomegalieviren, die mittels UV-inaktiviert und dadurch in diverse Einzelteile zerstört wurden Diese zerstörten Einzelteile wurden im nächsten Schritt zu den Zielzellen zugegeben, um diese zu stimulieren. Eine Infektion der Zielzellen war somit nicht möglich. Die Stimulationsdauer begann ab der einmaligen Applikation von jeweils 500 µl Stimulationslösung in und unter die Ko-Kultureinsätze. Die Stimulationsdauer, also die Zeit bis zur Überstand- und mRNA-Gewinnung, betrug je nach Versuch 3-40 h.

2.2.7 <u>RNA-Isolierung</u>

Es wurde das QIAGEN RNeasy Mini Kit verwendet und dessen Anleitungsschritte befolgt.

Zur Gewinnung der mRNA der Makrophagen wurden die Makrophageneinsätze zum Erntezeitpunkt in frische Companion-Platten auf Eis gesetzt und zweimal im und unter dem Einsatz mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 μ l RLT-Puffer lysiert und mit einem Spatel von der Einsatzoberfläche gekratzt. Um eine ausreichende Menge mRNA zu generieren, wurden die BMDM-Lysate aus je 3 Einsätzen zusammengeführt. Die Zellsuspension wurde auf die Qiagen Shredder Säulen pipettiert, bei 17.115 g, 1,5 Minuten

zentrifugiert und nach Anleitung des QIAGEN RNeasy Mini Kit die mRNA aus dem Durchfluss isoliert.

Zur Gewinnung der mRNA aus Hepatozyten wurden die Companion-Platten auf Eis gesetzt, die Ko-Kultureinsätze in neue leere Companion-Platten, zur späteren Bearbeitung umgesetzt und das Medium der Companion-Platten mit den Hepatozyten abgesaugt. Es wurde einmal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend die Kollagen-Zellschicht mit Hilfe eines Spatels abgekratzt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Kollagen-Zellgemisch wurde bei 4°C und 7.600 g für 3 Minuten zentrifugiert und das überständige Medium abgesaugt. Nach Wiederholung dieses Schrittes wurde das Pellet in 700 µl RLT Lyse Puffer resuspendiert und so die darin enthaltenen Zellen lysiert. Das Zelllysat wurde auf die Qiagen Shredder Säulen pipettiert, bei 17.115 g, 4°C, 1,5 Minuten zentrifugiert und aus dem Durchfluss entsprechend der Anleitung des QIAGEN RNeasy Mini Kits die RNA isoliert.

Mittels Nano-Drop (Spektralphotometrie bei einer Extinktion von 260nm/280nm) wurde die Reinheit und Konzentration der mRNA bestimmt.

2.2.8 C-DNA Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das QIAGEN Quantitect Reverse Transcription Kit verwendet und die Anleitungsschritte entsprechend den Herstellerangaben befolgt.

Für die *real time* PCR-Analyse wurde die cDNA auf eine Konzentration von 10 ng/ μ l mit Nukleasefreiem Wasser verdünnt. Mittels Kontrollen ohne mRNA bzw. ohne Reverse Transkriptase wurde die Reinheit der Synthesereaktion überprüft.

2.2.9 Quantitative real time Polymerase-Kettenreaktion

Die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geht auf die Arbeit von Mullís und Kollegen zurück (Mullís et al., 1986). Die quantitative *real time* PCR (qPCR) vervielfältigt die als Template vorliegenden Nukleinsäuren, hier die cDNA. Diese Vervielfältigung der cDNA wird mittels Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green in *real time*, also pro Zyklus, gemessen.

Der für die quantitative PCR verwendete Ansatz beinhaltete 1,2 µl cDNA (10ng/µl), 12,5 µl SYBR Green und 9,3 µl Nuklease-freies Wasser. Dazu wurden jeweils 1 µl des *Forward-/Reverse-Primer* (Endkonzentration 10 pmol/µl) pipettiert (vgl. Tabelle 3), so dass ein Gesamtansatz von 25 µl Endvolumen entstand. Jede Probe wurde in der qPCR doppelt gemessen. Jeweils 25 µl wurden pro Kavität der 96-Kavitätenplatte pipettiert, die zum Schluss mit einer qPCR *Seal* Folie luftdicht

verschlossen wurde. Vor der Analyse wurde die 96 Kavitätenplatte eine Minute bei 410 g zentrifugiert.

Die Analyse erfolgte mittels ViiA7 Real Time System.

Der Ablauf einer vollständigen qPCR bestand zunächst aus dem einmaligen Schritt von 2 Minuten bei 50°C und der anschließenden Denaturierung von 10 Minuten bei 95°C. Die 40-mal wiederholten Zyklen zur Amplifizierung der PCR Produkte umfassten jeweils 15 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung der cDNA und 1 Minute bei 60°C für das *Primer-Annealing* und der Polymerasevermittelten Elongation. Nach den 40 Zyklen erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse zur Qualitätskontrolle des Messergebnisses, 15 Sekunden bei 95°C, 1 Minute bei 60°C und nochmals 15 Sekunden bei 95°C. Die durch die qPCR ermittelten C_T-Werte wurden für die weitere quantitative Auswertung verwendet. Hierfür wurde die ΔC_T -Methode genutzt. Bei dieser Methode gibt der C_T-Wert die erste Zyklenzahl an, bei der der Fluoreszenzwert signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Um etwaige Konzentrationsunterschiede in der cDNA mathematisch korrigieren zu können, wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt. Dafür wurde der C_T-Wert des zu analysierenden Genprodukts durch Subtraktion vom C_T-Wert des *Housekeeping* Gens SDHA (*murines* Succinat-Dehydrogenase-Komplex Untereinheit A) normalisiert (Lang and Heeg, 1998, Heid et al., 1996).

2.2.10 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des Einflusses der Hepatozyten auf die Differenzierungsmarker von BMDMs wurde nach zwei, drei, vier und sechs Tagen Kulturzeit, mono- und ko-kultivierte, nicht stimulierte BMDMs mittels Durchflusszytometrie analysiert. Diese Technik geht auf Arbeiten (Dittrich and Göhde, 1969) von Wolfgang Göhde zurück, die er patentieren ließ (Goehde, 1972).

Anhand der durchflusszytometrischen Analyse mittels des FACS Canto II Geräts wurden die Zellpopulation durch die Parameter Vorwärtslichtstreuung (Zellgröße) und Seitwärtslichtstreuung (Zellgranularität) definiert. Die zu untersuchenden Rezeptoren wurden mittels spezifischer Antikörper, die mit den Fluorochromen PE, APC, FITC oder CY3 gekoppelt waren, markiert. Jeweils 10.000 Zellen wurden pro Probe gemessen. Die Untersuchung erfolgte für folgende Marker: Ly6GC, CD11c, CD206, CD163, TLR4 und MHC II. Die statistische Auswertung erfolgte mittels FlowJo-Software.

Zur Vorbereitung der Zellen wurden die Ko-Kultureinsätze nach entsprechender Kultivierungszeit in frische Companion-Platten umgesetzt, zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen und je Einsatz mit 250 μl Trypsin 4 Minuten im Brutschrank inkubiert.

28

Um die Trypsinwirkung zu stoppen, wurden die Companion-Platten anschließend auf Eis gesetzt, 1 ml kalter FACS-Puffer hinzugegeben und die Makrophagen von den Einsätzen gespült. Die Zellsuspension wurde auf die mit 1 ml FACS-Puffer gefüllten 5ml großen FACS-Röhrchen verteilt und diese im Anschluss 5 Minuten bei 405 g und 4°C (Bremse/Beschleunigung 5) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Röhrchen ausgeklopft. Die Zellen wurden in 100 µl Antikörperlösung resuspendiert (siehe Tabelle 3: Detaillierte Antikörpervorbereitung zur Applikation pro FACS RöhrchenTabelle 3) und auf Eis im Dunkeln für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden, die nicht gebundenen Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS und Zentrifugieren (5 Minuten, 405g, 4°C, Bremse/Beschleunigung 5) mit jeweils 2 ml FACS-Puffer entfernt. Zum Schluss wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Für die Färbung der Antikörper gegen CD163 und CD206 waren besondere Schritte notwendig.

Da der gegen CD163 gerichtete Antikörper unmarkiert ist, benötigte man zur Detektion einen Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper, der nach den gleichen Inkubations- und Waschschritten wie oben beschrieben, an den gegen CD163 gerichteten Antikörper bindet, wodurch dieser detektierbar wurde.

Für die Detektion des sowohl extra- als auch intrazelluär exprimierten CD206-Proteins mussten die Zellen zuerst fixiert und permeabilisiert werden. Dafür wurden die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer und 100 µl Leucoperm® REAGENT A für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und 5 Minuten bei 405 g und 4°C (Bremse/Beschleunigung 5) zentrifugiert. Danach wurde der Antikörper gegen CD206 gelöst in Leucoperm® REAGENT B hinzugegeben. Nach dem Durchmischen wurde der Antikörper für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert und anschließend wie oben beschrieben 2-mal gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert. In den vorliegenden Versuchen wurde jedoch eine unspezifische Bindung der Primer an den Fc-Receptor nicht durch einen Fc Block verhindert, sodass dies eine Ungenauigkeit gegenüber der wirklichen Oberflächenrezeptorexpression darstellt.

Antikörper	Markierung	μl Antikörper	Verdünnungsmedium
Ly 6G (Gr-1)	APC	0,5	100μl FACS Puffer
CD11c	PE	0,5	100µl FACS Puffer
МНСІІ	PE	1	100μl FACS Puffer

Tabelle 3: Detaillierte Antikörpervorbereitung zur Applikation pro FACS Röhrchen

CD206	FITC	0,4	Leucoperm [®] REAGENT B
TLR4	FITC	4	100μl FACS Puffer
CD163	unmarkiert	0,2	100µl FACS Puffer
Sekundärantikörper	СуЗ	0,3	100μl FACS Puffer

2.2.11 ELISA

Die *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) Experimente zur Detektion von löslichen Proteinen im Zellkulturüberstand sowie die Auswertungen der Messergebnisse wurden nach den vorliegenden Anleitungen der Hersteller der ELISA Kits durchgeführt (Siehe 2.1.5).

3 Ergebnisse

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Hepatozyten auf die durch virale und bakterielle Pathogene induzierte Aktivierung von Makrophagen.

3.1 <u>Einfluss von Hepatozyten auf die Reaktion von Makrophagen nach LPS</u> Stimulation

Um einen möglichen Einfluss von Hepatozyten auf die Reaktion von Makrophagen auf virale und bakterielle Pathogene zu untersuchen, wurden zunächst BMDM alleine bzw. in Kokultur mit Hepatozyten zwei Tage kultiviert und anschließend für 6 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Expression verschiedener Gene, die zum einen den Verlauf des Stimulationsgeschehens widerspiegeln, zum anderen einen Marker für die Polarisierung der Makrophagen darstellen, analysiert (Abb. 2).

Primäre Hepatozyten wurden nach Isolierung mittels CD11b-Beads aufgereinigt, um kontaminierende Makrophagen zu entfernen und anschließend im Kollagen-Sandwich kultiviert (2.2.1; 2.2.2; 2.2.2.1). BMDMs wurden wie in (2.2.3) beschrieben generiert. Die Ko-Kulturzeit betrug zwei Tage. Als Kontrolle wurden BMDMs ohne Hepatozyten kultiviert (2.2.32.1.5). Stimuliert wurde mit LPS (10 ng/ml) oder CMVamP (Multiplicity of Stimulation: MOS1= Ergebnis von einem UV-inaktivierten Infektionspartikel zu einem BMDMs; MOS2 = Ergebnis von zwei UV-inaktivierten Infektionspartikel zu einem BMDM). Die mRNA-Konzentration wurde mittels

quantitativer RT-PCR (2.2.92.1.6) in Relation zu dem internen Kontrollgen SDHA quantifiziert und ist in Relation zur unstimulierten Kontrollgruppe (BMDM Monokultur) in Prozent dargestellt.

Die Ergebnisse der in Abb. 2 zusammengefassten Untersuchungen legen nahe, dass die Anwesenheit von Hepatozyten die LPS-induzierte IL-10 Expression von Makrophagen im Vergleich zu monokultivierten Makrophagen signifikant verstärkt. Durch Hepatozyten zu den gewählten experimentellen Bedingungen ebenfalls signifikant verstärkt war die Transkriptexpression von IL-6 und iNOS, während die Expression von TNFα mRNA deutlich reduziert wurde. Für Arg1 und IFNβ ergaben sich zu den untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Veränderungen zwischen Mono- und Ko-Kultur.



Messreihe Mono- vs. Kokultur nach LPS Stimulation

BMDM Monokultur

BMDM Ko-Kultur

Abb. 2: Einfluss von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten BMDM infolge der Stimulation mit LPS. Unterschiede in der mRNA Expression von TNFα, IL-6, IL-10, iNOS, IFN6 und Arg1 in mono- und mit Hepatozyten kokultivierten BMDM nach Stimulation mit 10 ng/ml LPS für 6 Stunden in Relation zur unstimulierten Kontrolle monokultivierter BMDM. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet.

Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Genexpression infolge der Stimulation von mono- und mit Hepatozyten kokultivierten BMDM mit LPS (Abb. 3) wurde die Expression verschiedener Parameter nach 0, 6, 16, 40 Stunden detektiert.

In Abb. 3 sind die mRNA-Expressionsdaten nach LPS-Stimulation in Abhängigkeit von der Zeit abgebildet. Übereinstimmend mit den vorangehend ausgeführten Befunden führte die Präsenz von Hepatozyten zu einer signifikanten Reduktion der LPS induzierten Transkriptexpression von insbesondere TNFα sowie zu einer ebenfalls signifikant verstärkten Transkriptexpression von IL-10. Anders als in Abb. 2 wurde die LPS-induzierte Expression der IL-6 mRNA in der in Abb. 3 zusammengefassten Zeitserie tendenziell durch die Anwesenheit von Hepatozyten eher unterdrückt. Dieser suppressive Effekt von Hepatozyten auf die LPS induzierte Expression von TNFα und IL-6 ließ sich auch nach einer Kulturdauer von 16 und zumindest im Fall von IL-6 angedeutet auch nach 40 Stunden noch beobachten. Dabei erreichte, mit Ausnahme von Arg1 und iNOS, die Transkriptexpression bei den übrigen der hier analysierten Transkripte, inklusive der Transkripte für TNFα, IL-6 und IL-10 zum Zeitpunkt von 6 Stunden ihr Maximum und nahm im weiteren Verlauf wieder ab.

Für die Zytokine INFβ, CXCL9 und CXCL10 ließ sich zu den gewählten experimentellen Bedingungen tendenziell ein suppressiver Effekt von Hepatozyten auf die LPS-induzierte Transkriptexpression nachweisen, der zum Teil auch nach 16h noch nachweisbar war. Im Gegensatz hierzu verstärkt die Gegenwart von Hepatozyten im Vergleich zu monokultivierten Makrophagen die LPS-induzierte Expression von iNOS und Arg1 tendenziell, wobei der Anstieg von vor allem Arg1 erst deutlich verzögert einsetzt.



Messreihe zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS 10ng/ml Stimulation

BMDM Monokultur

BMDM Ko-Kultur

Abb. 3: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten BMDM infolge der Stimulation mit LPS. Unterschiede in der mRNA Expression von TNFα, IL-6, IL-10, IFN8, iNOS, Arg1, CXCL9 und CXCL10 in mono- und mit Hepatozyten kokultivierten BMDM nach Stimulation mit LPS für 6, 16 oder 40 Stunden in Relation zur unstimulierten Kontrolle monokultivierter BMDM. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet

Zusammenfassend legen diese Untersuchungen nahe, dass Hepatozyten die LPS-induzierte Transkriptexpression der hier untersuchten Zytokine zu einem wesentlichen Teil in Abhängigkeit von der Zeit signifikant beeinflusst. Dabei wird die Expression von IL-10 signifikant verstärkt, während die LPS-induzierte Expression der übrigen Zytokine in Makrophagen eher unterdrückt wird. Dieser suppressive Effekt von Hepatozyten auf die Expression und Produktion inflammatorischer Zytokine in Reaktion auf LPS wird am Beispiel von TNFα auch auf Proteinebene eindrucksvoll deutlich Abb. 4. Während die Produktion von TNFα durch Makrophagen in Gegenwart von Hepatozyten signifikant reduziert wird, belegt die Bestimmung von IL-10 im Überstand, dass ebenso wie auf Transkriptebene die Produktion von IL-10 unter diesen Bedingungen signifikant verstärkt wird. Anzumerken ist, dass, auch wenn zu den gewählten Zeitpunkten die Ko-Kultur mit Hepatozyten die Expression des IFNβ-Transkriptes in Makrophagen eher zu unterdrücken scheint, die durch LPS getriggerte Produktion von IFNβ auf Proteinebene in Gegenwart von Hepatozyten signifikant verstärkt ist.

Messreihe Proteinüberstand nach LPS 10ng/ml Stimulation



BMDM Monokultur

BMDM Ko-Kultur

Abb. 4: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Proteinexpression von kokultivierten BMDM infolge der Stimulation mit LPS. Überstandsmessung mittels ELISA und Multiplexmessung. Zeitpunkte 0,6,12,24 Stunden nach LPS Stimulation. Stimuliert wurde mit 10 ng/ml LPS. Die Messergebnisse sind in Bezug auf die Protein Expression einer unstimulierten Kontrollgruppe monokultivierter BMDMs in Prozent gesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe und Zeitpunkt. Signifikante Unterschiede sind mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet.

3.2 <u>Einfluss von Hepatozyten auf die Reaktion von Makrophagen nach</u> <u>CMVamP Stimulation</u>

Aus Abb. 5 sind die CMVamP Reaktionen in Mono- und Ko-Kultur nach verschiedenen MOS Dosen CMV »associated molecular pattern» (CMVamP) Stimulation zu entnehmen. Auffällig ist die signifikante IL-10 mRNA Expressionserhöhung nach CMVamP Stimulation in der Ko-Kultur im Vergleich zur Monokultur. Ebenfalls stark erhöht scheint die iNOS mRNA Expression zu sein. Signifikant erniedrigte mRNA Spiegel wurden in der Ko-Kultur bei einer Stimulationsdosis mit MOS2 für TNFα, IL-6 und IFNβ nachgewiesen.

Messreihe Mono- vs. Kokultur nach verschiedenen CMVamP Stimulationsdosen



Abb. 5: Einfluss von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP Unterschiede in der mRNA Expression von TNFα, IL-6, IL-10, iNOS, IFNβ und Arg1 in mono- und mit Hepatozyten kokultivierten BMDM nach Stimulation mit CMVamP (MOS1 bzw. MOS2) in Relation zur unstimulierten Kontrolle monokultivierter BMDM. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet.

Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Genexpression infolge der Stimulation von mono- und mit Hepatozyten kokultivierten BMDM mit CMVamP (CMV MOS2) wurde die Expression verschiedener Parameter nach 0, 6, 16, 40 Stunden analysiert (siehe Abb. 6).

In Abb. 6 sind die Ergebnisse nach Stimulation mit CMVamP MOS 2 zusammengefasst. Diese bestätigen die oben genannten CMVamP Stimulationsergebnisse für TNF α , IL-6 und IL-10. So waren im Intervall 0, 6, 16, 40h die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6, nach 6h in Mono-und Kokultur mit der höchsten mRNA Expression nachweisbar. Zum Zeitpunkt 6h war die mRNA Expression dieser beiden Zytokine in der Kokultur signifikant gegenüber der Monokultur erniedrigt. Dieses Verhältnis war als Trend zusätzlich nach 16h und 40h sichtbar, jedoch bei sinkender mRNA Expression beider Kulturansätze.

Die Expression von IL-10-mRNA war nach CMVamP-Stimulation in der Ko-Kultur leicht erhöht, allerdings nicht mehr auf einem signifikanten Niveau wie im Vorversuch. Der Verlauf der mRNA Expression weißt einen Expression Peak in der Messung nach 6h auf. Nach 16h und 40h wird in beiden Kulturansätzen weniger IL-10 mRNA exprimiert, wobei in der Kokultur weiterhin mehr mRNA nachweisbar war.

Der Verlauf der mRNA Expression für IFN- β ergab in der Messung nach 6h die höchste mRNA Expression für beide Kulturansätze und nach 16h eine deutliche mRNA Expressionserniedrigung. Im Vergleich war in der Kokultur weniger IFN- β mRNA nach 6h und 16h nachweisbar.

Die mRNA Expression der iNOS war im Vergleich zu den bisher genannten Markern langfristig deutlich erhöht. So war nach 40h eine ähnlich hohe mRNA Expression im Vergleich zur 6h Messung, und ein mRNA Expressionspeak in der Messung nach 16h nachweisbar. Im Vergleich waren tendenziell höhere mRNA Konzentrationen in der Kokultur messbar.

Die Chemokine CXCL9 und CXLC10, die eine proinflammatorische Situation durch Lymphozyteneinwanderung unterstützen, waren in der Messung nach 6h am stärksten nachweisbar. In der Messung nach 16h war nur noch eine Konzentration von 20-50% zur 6h Messung detektierbar. Im Vergleich war die mRNA Expression dieser Marker in der Kokultur leicht gegenüber der Monokultur erniedrigt. Die Arg1-mRNA-Expression war nicht signifikant unterschiedlich. Hier wies der mRNA Expressionsverlauf eine Steigerung nach 6h mit sehr niedrigen Konzentrationen bis zur deutlichen mRNA Expression nach 40h auf.

39

Messreihe zu verschiedenen Zeitpunkten nach CMV MOS2 Stimulation



Stunden nach CMV Stimulation

BMDM Monokultur

BMDM Ko-Kultur

Abb. 6: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP. Unterschiede in der mRNA Expression von TNFα, IL-6, IL-10, IFN6, iNOS, Arg1, CXCL9 und CXCL10 in mono- und mit Hepatozyten kokultivierten BMDM nach Stimulation mit CMVamP (MOS2) für 6, 16 oder 40 Stunden in Relation zur unstimulierten Kontrolle monokultivierter BMDM. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet

Die vorangehend ausgeführten Experimente wurden im weiteren Verlauf mit veränderten Zeitpunkten durchgeführt (siehe Abb. 7), um in der Zusammenschau ein besser zeitaufgelöstes Bild zum Einfluss der interzellulären Kommunikation von Hepatozyten mit BMDM auf die CMVamP induzierte Zytokinexpression zu erhalten. Untersucht wurde die Expression verschiedener Parameter 0, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Stimulation mit CMVamP (MOS 2).

Die Ergebnisse dieser experimentellen Serie konnten mit etwas Varianz im Wesentlichen, die bereits in Abbildung 6 zusammengefasste Beobachtung bestätigen, dass insbesondere die CMV induzierte Expression der Transkripte für IL-6, IFNβ und CXCL10 unter Bedingungen der Kokultur reduziert waren. Hingegen waren die TNFα Werte nur leicht erniedrigt. Zusätzlich war die mRNA-Expression für CXCL9 in der Ko-Kultur verringert.

Die IL-10 mRNA-Expression war 3 und 6 Stunden nach Stimulation leicht erhöht. Auch in dieser Zeitreihe ergab sich in Übereinstimmung mit den vorangehend für LPS ausgeführten Befunden, dass unter den gewählten Bedingungen die durch CMVamP induzierte mRNA-Expression von TNF α , IL-10, IFN β , CXCL9 und CXCL10 nach sechs Stunden ihr Maximum erreicht und im weiteren Verlauf dann wieder abnimmt. Interessant ist, dass die durch CMVamP induzierte Expression des IL-6 Transkriptes in BMDM zwar, wie unter Stimulation mit LPS, ihr Maximum nach etwa 6 h erreicht, dann jedoch im gesamten Beobachtungszeitraum nur in Gegenwart von Hepatozyten wieder abnimmt, während die Transkriptkonzentrationen in monokultivierten BMDM annähernd unverändert erhöht bleiben.

Dagegen kam es, wie auch weiter oben schon in den Untersuchungen zum Einfluss von Hepatozyten auf die LPS-induzierte Genexpression in Makrophagen beschrieben, erst zu einem deutlich späteren Anstieg der Transkripte für iNOS und vor allem von Arg1. Dabei hatte die Gegenwart von Hepatozyten im Vergleich zu monokultivierten BMDM auf die durch CMVamP induzierte Transkriptexpression beider Transkripte in BMDM einen verstärkenden Einfluss. Für die Induktion der Expression von Arg1 war die Gegenwart von Hepatozyten sogar eine Voraussetzung für einen nachweisbaren Anstieg.

41



Abb. 7: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten WT BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP. Unterschiede in der mRNA Expression von TNFα, IL-6, IL-10, IFNβ, iNOS, Arg1, CXLC9 und CXCL10 in mono- und mit Hepatozyten kokultivierten BMDM nach Stimulation mit CMV (MOS2) für 3, 6, 12 oder 24 Stunden in Relation zur unstimulierten Kontrolle monokultivierter BMDM. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 5-7 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden

mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet.

In Abb. 8 sind die Ergebnisse der Zytokinbestimmungen auf Proteinebene im Überstand nach CMVamP MOS 2 Stimulation dargestellt. Auffällig waren die erhöhten Proteinspiegel von TNFα und IL-6 in der Ko-Kultur 24h nach Stimulation, welche für IL-6 nach 24h signifikant erhöht waren. Die Differenz zwischen RNA- und Proteinverlauf ist hier wahrscheinlich auf kumulative Effekte in der Zellkultur zurückzuführen. Die Beobachtung, dass insbesondere die IL-6 Konzentration unter Bedingungen der Kokultur im Verlauf höher war als in der Monokultur mag auch auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Hepatozyten eine Reihe von Proteinen sezernieren, die als Protease-Inhibitoren oder Zytokin-stabilisierende Proteine fungieren, welche das sezernierte Protein stärker vor einer Degradierung schützen. Passend zu den Vorergebnissen sind die erhöhten IL-10 Proteinlevel in der Ko-Kultur, sowie der signifikant erniedrigte IFNβ-Spiegel 24 Stunden nach Stimulation.

Messreihe Proteinüberstand nach CMV MOS 2 Stimulation



Stunden nach CMV MOS2 Stimulation

BMDM Monokultur

BMDM Ko-Kultur

Abb. 8: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Proteinexpression von kokultivierten BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP. Überstandsmessung mittels ELISA und Multiplexmessung. Zeitpunkte 0,6,12,24 Stunden nach CMV-Stimulation. Stimuliert wurde mit CMVamP (Multiplicity of Stimulation: MOS2 = Ergebnis von zwei UV-inaktivierten Infektionspartikel zu einem BMDM).. Die Messergebnisse sind in Bezug auf die Protein Expression einer unstimulierten Kontrollgruppe monokultivierter BMDMs in Prozent gesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe und Zeitpunkt. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet, die Berechnung erfolgte per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test.

3.3 <u>Vergleich der BMDM Reaktion nach CMVamP MOS2 und LPS 10ng/ml</u> Stimulation

In der Versuchsreihe mit verschiedenen Stimulanzien und Stimulationsdosen, veranschaulicht in Abb. 2 und Abb. 5, sind deutliche Unterschiede in der mRNA IL-10 Expression im Vergleich zwischen CMVamP und LPS Stimulation zu erkennen.

Um eine Vorstellung zu den Unterschieden zu gewinnen, die sich unter den gewählten Untersuchungsbedingungen zwischen dem bakteriellen Pathogen LPS und einer Stimulation mit CMVamP herausstellen lassen, sollen die vorangehend ausgeführten Ergebnisse im Folgenden vergleichend gegenübergestellt werden. Dabei ist zu berücksichtigen und bewusst, dass hier ein isoliertes bakterielles Pathogen mit einem ganzen viralen Pathogenmuster verglichen wird und dass für eine bessere Vergleichbarkeit, auch weitergehende Zeit- sowie Konzentrationsreihen erforderlich wären.

Besonders fällt im Vergleich der beiden Stimuli auf, dass unter den gewählten Bedingungen die Stimulation von Makrophagen mit CMVamP eine im Vergleich zu LPS deutlich höhere Expression von Genen wie IL-10, IFN β , iNOS, CXCL9 und CXCL10 hervorruft Im Gegensatz hierzu induziert die Stimulation mit LPS vor allem die Expression von Genen wie TNF α und IL-6 sowie Arg1 während diese durch CMVamP ungleich schwächer induziert werden. Interessant in diesem Kontext ist auch, dass Hepatozyten auf die Reaktion von Makrophagen auf Stimulation mit viralen Pathogenen wie CMVamP einen vergleichsweise geringen Einfluss haben, während Hepatozyten die Reaktion von Makrophagen auf LPS in den gewählten Konzentrationen sehr viel ausgeprägter beeinflussen. Dies kann an der bereits antiinflammatorischen Beeinflussung der Pathogene des Cytomegalievirus liegen. So verstärkt die Gegenwart von Hepatozyten die LPS induzierte Expression von Genen wie IL-10, Arg1 oder iNOS, während die Induktion der Expression von IL-6 oder TNF α in Makrophagen durch Hepatozyten auf die CMVamP induzierte Expression von IL-10 und iNOS zwar in Teilen signifikant, fällt jedoch im Hinblick auf die Amplitude deutlich schwächer aus. Vergleichbares gilt für die reduzierte Expression der Gene CXCL9 und 10.





Abb. 9: Gegenüberstellung der mRNA Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach CMVamP und LPS Stimulation. Infektion mit CMVamP MOS 2 (blau/hellblau) oder LPS 10ng/ml (rot/gelb). Die Messergebnisse sind in Bezug auf die mRNA Expression einer unstimulierten Kontrollgruppe monokultivierter BMDMs in Prozent gesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet, die Berechnung erfolgte per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test. Es wurden nur Signifikanzen zwischen CMVamP und LPS

Stimulation gleicher Kulturen bei unterschiedlicher Stimulation (beide Mono- bzw. Kokultur) dargestellt. Weitere Signifikanzen zwischen Mono- und Kokultur der gleichen Stimulanz sind den Vorabbildungen zu entnehmen.

3.4 <u>Einfluss der Hepatozyten auf die Oberflächenexpression von</u> <u>Markerproteinen die auf eine Veränderung des Aktivierungszustandes von</u> <u>BMDM hinweisen.</u>

Abb. 10 beinhaltet die mittlere Fluoreszenzintensität für verschiedene Oberflächenmarker der BMDMs. Hierfür wurden BMDMs über verschiedene Zeiträume 2, 3, 4 und 6 Tage mono- oder kokultiviert und ohne Stimulation das Oberflächenmarkerprofil analysiert. Aufgrund des fehlenden FC-Rezeptor Blocks sind die Aussagen bedingt aussagekräftig.

Um die Hypothese, dass eine Kokultivierung der Makrophagen mit primären Hepatozyten das Oberflächenrezeptorenprofil verändert, zu untersuchen, sind die Wildtypdaten von Interesse. Man erkennt signifikant erhöhte LY6GC- und CD11c-Oberflächenrezeptoren nach zwei Tagen Ko-Kultur. Keine signifikanten Rezeptorexpressionsänderungen waren unter den gewählten experimentellen Bedingungen sowie unter den oben beschriebenen Analyseverfahren für folgende Rezeptoren: CD163, CD206, TLR4 und MHCII nachweisbar.



Messreihe Expression Oberflächenrezeptoren nach verschiedenen Kulturzeiten ohne

Abb. 10: Expression der Oberflächenmarker nach verschiedenen Kulturzeiten ohne Stimulation. Die Messung der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) erfolgt mittels FACS Analyse (2.2.102.1.5). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 5-7 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet

Wildtyp BMDM Co-Kultur mit Hepatozyten

3.5 <u>Auswirkung der Dauer des Einflusses von Hepatozyten auf die Funktion wie</u> <u>auch den Aktivierungszustand von BMDMs</u>

Die Ergebnisse der vorangehend ausgeführten Untersuchungen legen nahe, dass Hepatozyten Pathogen-abhängig die Funktion von BMDM beeinflussen. In weiterführenden Versuchen sollte nun überprüft werden, ob die Dauer der interzellulären Kommunikation von Hepatozyten mit BMDM Auswirkung auf die Änderung der Makrophagenfunktion auf Stimulation mit Pathogenen hat.

In Abb. 11 und Abb. 12 sind die mRNA-Expressionslevel der Mono- und Ko-Kultur sechs Stunden nach Stimulation mit CMVamP MOS2 oder LPS (10ng/ml) nach verschieden Kulturzeiten von 2, 24, 48 und 72 Stunden vor Stimulation abgebildet. Die Kulturzeiten beziehen sich auf den Zeitraum über den die Zellen vor der Stimulation kultiviert wurden. Die Stimulation mit entweder CMVamP oder LPS erfolgte dann für weitere 6 Stunden. Dementsprechend ist die kumulative Kulturzeit sechs Stunden länger als die Kulturzeit prä-stimulationem, Siehe Tabelle 4.

Kulturzeit prä-	+ 6 Stunden post-	Kulturzeit insgesamt: (Kulturzeit prä-
stimulationem	stimulationem	stimulationem + 6 Stunden post-
		stimulationem)
2 Stunden	+ 6 Stunden	= 8 Stunden
24 Stunden	+ 6 Stunden	= 30 Stunden
48 Stunden	+ 6 Stunden	= 54 Stunden
72 Stunden	+ 6 Stunden	= 78 Stunden

Tabelle 4: Kulturzeiten

Im Folgenden wurden die Kulturzeiten prä-stimulationem abgebildet

Abb. 11 fasst die Ergebnisse für die mRNA-Expressionslevel nach CMVamP Stimulation zusammen. Insgesamt machen die Ergebnisse dieser Untersuchungen deutlich, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Kokultur mit Hepatozyten die Reaktion von BMDM auf CMV assoziierte Pathogenmuster vergleichsweise wenig zu beeinflussen scheint. Auch kommt es unter verlängerter Kokultur von 48 und 72 Stunden überwiegend zu einem Verlust eines nach 24 Stunden noch darstellbaren signifikanten Einflusses der Kokultur auf die Reaktion von BMDM auf CMVamP. Entsprechend ist der bereits oben beschriebene, verstärkende Einfluss von Hepatozyten auf die CMVamP induzierte IL-10 Expression ebenso wie die Heraufregulation der Expression von für die iNOS kodierenden Transkripten nur nach 24 h Kokultur so zu beobachten, dass gemessene Unterschiede signifikant sind. Für alle anderen untersuchten Transkripte gilt, dass gemessene Unterschiede allenfalls tendenziell sind, jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichen. Bei den TNFα, IL-6 und Il-10 Messungen ist auffällig, dass nach zwei Stunden Kokultur Zeit keine signifikante Veränderung der mRNA Expression zwischen Mono- und Kokultur nachweisbar ist.





Kulturzeit vor Stimulation mit CMV in Stunden

BMDM Monokultur

BMDM Ko-Kultur

Abb. 11: mRNA Expressionsmuster von monokultivierten vs. kokultivierten BMDMs, sechs Stunden nach CMVamP Stimulation zu jeweils verschiedenen Ko-/Kulturdauern (2, 24, 48, 72 Stunden). Stimuliert wurde mit CMVamP (Multiplicity of Stimulation: MOS2 = Ergebnis von zwei UV-inaktivierten Infektionspartikel zu einem BMDM). BMDMs. Die Messergebnisse sind in Bezug auf die mRNA Expression einer unstimulierten Kontrollgruppe monokultivierter BMDMs in Prozent gesetzt.

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit einem Standardfehler aus je 3-5 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet. Abb. 12 stellt die mRNA-Expression sechs Stunden nach LPS-Stimulation zu verschiedenen Kulturzeiten prä-stimulationem dar.

Im Kontext der LPS Stimulation ändert sich das Bild nachhaltig. So haben Hepatozyten einen deutlich und signifikant verstärkenden Einfluss auf die Expression von IL-10, iNOS, CXCL10 und IFNβ während der Expression von TNFα signifikant reduziert wird. Dieser Einfluss scheint für TNFα, iNOS sowie CXCL10 auch annähernd nach 72 Stunden Kokulturzeit zu gelten. Hingegen nimmt die LPS induzierte IL-10 mRNA Expressionssteigerung in der Kokultur mit der Dauer der Kokulturzeit wieder ab.

Ebenfalls war auch nach LPS Stimulation bei einer Kokulturzeit von 2h keine signifikanten mRNA Expressionsunterschiede für die Marker TNFα, IL-6 und IL-10 nachweisbar.

Auch wenn, wie bereits oben ausgeführt, die hier ausgeführten Experimente keinen belastbaren Vergleich zulassen legen diese Ergebnisse nahe, dass die Reaktion auf von CMV abstammende Pathogene im Vergleich zu LPS wenig durch die Präsenz von Hepatozyten beeinflusst wird. So wird nur die durch CMV hervorgerufene IL-10 Expression im gesamten Verlauf durch die Präsenz von Hepatozyten zumindest tendenziell und zu frühen Zeitpunkten auch Signifikant durch die Anwesenheit von Hepatozyten verstärkend beeinflusst. Hingegen führt eine LPS Stimulation zumindest im Hinblick auf IL-10, INOS aber auch TNFa, IFNβ und CXCL10 zu signifikant verschiedenen Reaktionen, welche ebenfalls auch bei längeren Kokulturzeiten nachweisbar sind.



Messreihe für verschiedene Kulturzeiten vor Stimulation mit LPS 10ng/ml

Kulturzeit vor Stimulation mit LPS in Stunden

BMDM Monokultur

BMDM Ko-Kultur

Abb. 12: mRNA Expressionsmuster von monokultivierten vs. kokultivierten BMDMs, sechs Stunden nach LPS Stimulation zu jeweils verschiedenen Ko-/Kulturdauern (2h, 24h, 48h, 72h). Stimuliert wurde mit 10 ng/ml LPS. Die Messergebnisse sind in Bezug auf die mRNA Expression einer unstimulierten Kontrollgruppe monokultivierter BMDMs in Prozent gesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit einem Standardfehler aus je 3-5 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet.

3.6 <u>Einfluss des VLDL Rezeptor Knock-Outs auf die Reaktion und</u> Differenzierung der BMDMs

Die Hypothese, dass der VLDL-Rezeptor eine wichtige Funktion für die Kommunikation und damit für die Beeinflussung der Makrophagen darstellt, wurde anhand von zwei Versuchen überprüft. Dies erfolgte zum einen über die Abb. 13 und Abb. 14 in dargestellten Stimulationsversuche und zum anderen über die in Abb. 15 dargestellte Oberflächenanalyse.

Die Stimulationsergebnisse sind in Abb. 13 und Abb. 14 abgebildet, in grün die Wildtyp- und in blau die VLDL-Rezeptor-Knock-Out BMDM mRNA Expressionswerte. Betrachtet man die VLDL Rezeptor Knock-Out BMDMs erkennt man deutliche Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen der Mono- und Ko-Kultur. Signifikant erniedrigt ist die mRNA Expression in der Ko-Kultur von IL-6, IFNβ, CXCL9 und CXCL10. Signifikant erhöht ist die mRNA Expression in der Ko-Kultur für iNOS und Arg1.

Vergleicht man die Wildtyp-Reaktionen mit den VLDL-Rezeptor Knock-Out Reaktionen waren nach 2 Tagen Kulturdauer und CMVamP MOS2 Stimulation keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression nachweisbar.



Messreihe zu verschiedenen Zeitpunkten nach CMV MOS 2 Stimulation in WT und VLDL Rez. KO BMDMs

Wildtyp BMDM Monokultur
Wildtyp BMDM Ko-Kultur

Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten WT und VLDL-

Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von Kokultivierten W1 und VLDL-Rezeptor knock out BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP. Unterschiede in der mRNA Expression von TNFa, IL-6, IL-10 und IFN6 in mono- und mit Hepatozyten kokultivierten BMDM nach Stimulation mit CMVamP (MOS2) für 3, 6, 12 oder 24 Stunden in Relation zur unstimulierten Kontrolle monokultivierter BMDM. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 5-7 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet.



Messreihe zu verschiedenen Zeitpunkten nach CMV MOS 2 Stimulation in WT und VLDL Rez. KO BMDMs

Abb. 14: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Hepatozyten auf die Genexpression von kokultivierten WT und VLDL-Rezeptor knock out BMDM infolge der Stimulation mit CMVamP. Unterschiede in der mRNA Expression von iNOS, Arg1, CXCL9 und CXCL10 in mono- und mit Hepatozyten kokultivierten BMDM nach Stimulation mit CMV (MOS2) für 3, 6, 12 oder 24 Stunden in Relation zur unstimulierten Kontrolle monokultivierter BMDM. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 5-7 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet. Die Oberflächenrezeptoranalyse in Abb. 15 präsentiert in grün die Wildtyp und in blau die VLDL Rezeptor Knock-Out BMDM Ergebnisse. Auch hier wurden die Experimente ohne Fc Block durchgeführt und sind damit nur bedingt verwertbar. Man erkennt deutliche Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen Mono- und Kokultivierten VLDL Rezeptor Knock-Out BMDMs. Signifikant erhöht ist die Rezeptorexpression des LY6G, CD11c und CD163.

Vergleicht man die Wildtyp Rezeptorexpression mit der VLDL Rezeptor Knock-Out Expression nach verschiedenen Kulturzeiten ohne Stimulation, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Mono- oder Ko-Kulturen zu ermitteln.



Messreihe Expression Oberflächenrezeptoren nach verschiedenen Kulturzeiten ohne Stimulation, WT und VLDL Rez. KO BMDMs

Kulturzeit in Tagen

- Wildtyp BMDM Monokultur
- Wildtyp BMDM Co-Kultur mit Hepatozyten
- VLDL Rezeptor Knock-Out BMDM Monokultur
- SVLDL Rezeptor Knock-Out BMDM Co-Kultur mit Hepatozyten

Abb. 15: Expression der Oberflächenmarker nach verschiedenen Kulturzeiten ohne Stimulation. Die Messung der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) erfolgt mittels FACS Analyse (2.2.102.1.5). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler aus je 5-7 unabhängigen Messungen pro Gruppe. Signifikante Unterschiede wurden mittels * gekennzeichnet und per two way Anova Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von p<0,05 und Bonferroni post-Test berechnet

4 **Diskussion**

Um den Einfluss der Ko-Kultur zwischen Hepatozyten und BMDMs zu untersuchen, wurde das in der Arbeitsgruppe validierte Ko-Kultursystem genutzt.

Das in-vitro Ko-Kultur System erlaubt die vereinfachte Untersuchung der interzellulären Kommunikation von Hepatozyten mit Makrophagen über lösliche Mediatoren. Eine direkte Zell-Zell Interaktion wird durch die Ko-Kultureinsätze verhindert. In diesem Modellsystem lassen sich relevante Prozesse demaskieren und mit hoher Vergleichbarkeit untersuchen. Diese Vereinfachung und das in vitro System sind Näherungen an die sehr viel komplexere in vivo Situation. Ein Vorteil der Untersuchung am Mausmodell ist das Vorhandensein von gentechnisch veränderten Modellen. Hierdurch ist es möglich, den Einfluss einzelner Moleküle oder Rezeptoren zu untersuchen. Inwieweit die hier untersuchten Mechanismen auf den Menschen übertragbar sind, muss im Rahmen weiterführender Untersuchungen geklärt werden. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass unter anderem im Bereich der angeborenen Immunität eine Reihe von Signalwegen sowie zelluläre Funktionen und regulatorische Prinzipien über Speziesgrenzen hinweg, bemerkenswert hochgradig konserviert sind. Dies gilt für eine Reihe an Zytokinen wie beispielsweise die IL-6 Typ Zytokine aber auch TNF α , IL-1b oder IL-10 genauso wie für die Funktion verschiedener Immunzellpopulationen. Auf Ebene der intrazellulären Signalübertragung gilt dies möglicherweise in noch viel höheren Umfang. So ist zum Beispiel die p38 Mitogen-aktivierte Protein Kinase und die durch sie vermittelte Signalübertragung evolutionär hochgradig konserviert.

4.1 <u>Einfluss der Hepatozyten auf die Reaktion von BMDMs nach CMVamP und</u> LPS Stimulation

Wie Eingangs bereits beschrieben, übernehmen Makrophagen nicht nur Aufgaben in der Abwehr gegen eindringende Pathogene, sondern spielen auch eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöstase sowie in Reparatur- und Regenerationsprozessen. Im Kontext der Immunantwort sind sie nicht nur als Komponente des angeborenen Immunsystems zentral für die Abtötung und Elimination von Pathogenen, sondern spielen auch eine relevante Rolle als Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Noch unveröffentlichte Arbeiten der Arbeitsgruppe legen nahe, dass bestimmte Makrophagenpopulationen durch Hepatozyten in ihrem Aktivierungszustand signifikant beeinflusst werden und das sich dies auch in einer veränderten Reaktion auf Pathogene niederschlägt. So wird insbesondere die durch LPS induzierte Expression
und Produktion von Genen wie IL-10 oder IFNβ aber auch von solchen wie Arg1 durch Hepatozyten signifikant verstärkt, während die Expression anderer Gene wie TNFα gehemmt wird (Wolf, 2015 sowie Wolf und Bode, noch unveröffentlichte Daten).

Die erhobenen Daten dieser Arbeit nach LPS Stimulation basieren auf einer höheren Makrophagendichte. Die damaligen Versuche basierten auf einer 50% niedrigeren BMDM Dichte von 100.000 BMDM pro Ko-Kultureinsatz bzw. einem Makrophagen-Hepatozyten Verhältnis von 1/8, welches sich in etwa an den Verhältnissen in der Leber unter physiologischen Bedingungen orientiert. Auch mit der doppelten Dichte bzw. dem doppelten Makrophagen-Hepatozyten Verhältnis reagierten die kokultivierten BMDMs vorwiegend anti-inflammatorisch und weniger pro-inflammatorisch. Dies belegt vor allem die signifikant erhöhte IL-10 mRNA sowie Proteinspiegel, sowie die signifikant reduzierten TNFα mRNA und Proteinspiegel. Auch nach LPS Stimulation kommt es zu einer erhöhten iNOS mRNA Produktion, die primär als inflammatorisch zu werten ist. Die ebenfalls verzögert erhöhte Arginase in der Kokultur im Verlauf, die man als direkten Gegenspieler der iNOS sehen kann, könnte nach einer gewissen Zeit die initiale proinflammatorische Reaktion der iNOS durch Verbrauch des gemeinsamen Substrats des Arginins reduzieren. Weniger leicht zu interpretieren sind die Verläufe des IL-6 Zytokins sowie der Chemokine CXCL9 und CXCL10. Insgesamt bestätigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten die bekannten Vordaten und weisen eine insgesamt antiinflammatorische Reaktion auf mRNA und teilweise Proteinebene nach LPS Stimulation im Rahmen einer Makrophagen-Hepatozyten Kokultur nach.

Da Daten aus einem viralen Stimulationskontext im Rahmen dieser Ko-Kultur bisher fehlten, wurden Stimulationsversuche mit abgetötetem CMV durchgeführt. Auch im viralen Stimulationskontext ist eine Veränderung der Zytokin Reaktion von TNF α , IL-6, CXCL9, CXCL10, IFNB und IL-10 der BMDMs in Anwesenheit der Hepatozyten auf mRNA-Ebene und teilweise Proteinebene zu erkennen. Im Detail war das anti-inflammatorisch wirksame Zytokin IL-10 in der Kokultur auf mRNA- und Proteinebene erhöht und die mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNFα und IL-6 sowie des Chemokines CXCL 10 waren jeweils in der Ko-Kultur signifikant erniedrigt. Ebenfalls war IFNB als antivirales Zytokin signifikant in der Ko-Kultur auf mRNA und Proteinebene erniedrigt. Insgesamt war die Stärke der Änderung zwischen der Mono- und der Kokultur im Vergleich zu LPS stimulierten Versuchen jedoch geringer nachweisbar. Aus den vorliegenden Daten lässt sich auf einen eher anti-inflammatorischen und proviralen Aktivierungszustand der BMDMs in der Kokultur interpretieren. Im Kontext der Literatur führt die verringerte Abwehrreaktion zu weniger Kollateralschaden (Tang-Feldman et al., 2011). Dies verhindert eine überschießende Immunreaktion und damit einhergehende

Leberschäden. Die zugrundeliegende Reaktionsbeeinflussungen deuten im Rahmen der wissenschaftlichen Erkenntnisse zusätzlich auf eine pro-virale Reaktion hin. Zwar konnten Feldmann et al. in kurzer zeitlicher Auflösung keine Reduktion der Viruslast bei IL-10 Knock-Out Mäusen feststellen, jedoch legen andere Arbeiten nahe, das IL-10 ein wichtiges Zytokin in der Beeinflussung des Cytomegalievirus darstellt. In vitro Versuche wiesen nach, dass ein durch Cytomegalievirus erhöhter IL-10 Spiegel die Antigenpräsentation über eine Herunterregulation der MHC-II Rezeptoren auf Makrophagen hemmt (Redpath et al., 1999). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass IL-10 relevant die Quantitative Produktion der Memorie-T-Zellen hemmt, und damit das Virus in der Latency Phase geschützt wird (Jones et al., 2010). Ebenfalls konnte in in vivo Versuchen herausgestellt werden, dass IL-10 Knock-Out Mäuse stärkere Krankheitssymptome haben, bei gleichzeitig reduzierter Viruslast (Oakley et al., 2007). Dies verdeutlicht im Kontext einer Cytomegalieinfektion die zweifache Funktion des IL-10, welches zum einen antiinflammatorisch und zum anderen proviral wirkt. Dementsprechend wirkt der Einfluss der Makrophagen, auch im Cytomegalievirus Stimulationssetting Hepatozyten auf die antiinflammatorisch und proviral.

Die Ergebnisse der Arbeit ergaben zusätzlich eine signifikante Reduktion der IFNβ mRNA Konzentration in der Ko-Kultur. Diese Ergebnisse waren auch auf Proteinebene nachweisbar. IFNβ spielt als eines der wesentlichen antiviralen Zytokine eine bedeutsame Rolle in der Reaktion auf eine virale Infektion. Im Einklang mit der Literatur kann man bei den vorliegenden erniedrigten IFNβ mRNA und Proteinkonzentration nach CMVamP Stimulation in der Kokultur von einer verringerten antiviralen Reaktion ausgehen (Gresser, 1990, Boehme et al., 2004). Daraus kann man auf eine durch die Hepatozyten entstandene permissivere Situation für das Cytomegalovirus schließen.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Reduktion der TNF α mRNA Produktion in der Kokultur nach CMVamP Stimulation bekräftigt die These, das unter Anwesenheit der Hepatozyten die Makrophagen weniger inflammatorisch reagieren (Beutler and Cerami, 1987). Frühe Daten wiesen einen antiviralen Effekt von TNF α nach, welcher durch eine direkte selektive Eliminierung infizierter Zellen entstand (Wong and Goeddel, 1986). Vorhandene Arbeiten legen nahe, dass TNF α in der Immunreaktion speziell auf das Cytomegalievirus eine wichtige Rolle spielt und ein Verlust des endogenen TNF α eine provirale Situation bedingt (Pavić et al., 1993) . Auf Proteinebene konnte in dieser Arbeit jedoch kein signifikanter Unterschied zwische Mono- und Kokultivierten Makrophagen in der TNF α Produktion nachgewiesen werden. Dementsprechend ist eine endgültige Einordnung, in welche Richtung die Beeinflussung der Makrophagen geht, aufgrund des TNF α Zytokins nicht möglich.

IL-6 ist ein pleiotropes Interleukin. In der Kokultur wurde die mRNA signifikant vermindert produziert. Vorarbeiten konnten den Akut-Phase aktivierenden Effekt des Interleukins nachweisen (Gauldie et al., 1987). Auf Proteinebene ergab sich in unseren Versuchsreihen nach 24 Stunden ein signifikante IL-6 Protein Erhöhung, die im Gegensatz zu der signifikant erniedrigten mRNA Spiegeln nach sechs Stunden steht. Hierfür könnte posttranskriptionelle Einflüsse verantwortlich sein, weshalb keine klare Aussage zum Einfluss der Kokultur auf die IL-6 Spiegel nach CMVamP gemacht werden kann.

CXCL9 und CXCL10 dienen als Chemokine, welche Lymphozyten an den Ort der Entzündung leiten. Sollten die signifikant erniedrigten CXCL10 mRNA Spiegel in der Kokultur eine verringerte T-Zell Rekrutierung an den Ort der Entzündung bzw. der stimulierten Zellen bedingen, führt dies zu einer verringerten antiviralen und antiinflammatorischen Kapazität und einem eher proviralen Zustand der durch die Hepatozyten-Makrophagen Kokultur ausgelöst wird. Vorangegangene Versuche konnten jedoch keine Unterschiede der Virusbeseitigung bzw. des Überlebens von CXCL10 bzw. CXCL9 bzw. CXCR3-Rezeptor depletierten Mäusen feststellen (Hokeness et al., 2007).

Die iNOS wurde früh als wichtiger Bestanteil der Abwehr der MCM Viren in der frühen Phase der Infektion identifiziert. INOS Knock Out Mäuse verstarben häufiger und es wurden höhere MCMV Titer in den Organen nachgewiesen. Ebenfalls konnte in Versuchen herausgearbeitet werden, dass bei iNOS Knock Out Mäusen die Viruspersistenz weniger gestört ist (Tanaka and Noda, 2001). Neuere Arbeiten schreiben der iNOS zusätzlich modulierende Effekte von Immunzellen zu, welche sekundär die Immunreaktion über Beeinträchtigung der T-Zellpopulation abschwächend beeinflussen (Daley-Bauer et al., 2012, Mao et al., 2013). In der vorliegenden Kokultur war die iNOS mRNA vor allem zu späteren Zeitpunkten post-stimulationem signifikant erhöht. Im Kontext der oben aufgeführten Arbeiten ist dies eine antivirale und eher proinflammatorische Komponente.

Zusammenfassend reagieren die Makrophagen im Kontext der Ko-Kultur nach CMVamP Stimulation in Richtung einer antiinflammatorischen und virus-permissiven Situation. Das anti-viral wirksame IFNβ ist signifikant erniedrigt. Gleichsam abnehmend ist die CXCL10 mRNA Expression. Die pro-inflammatorische TNFα mRNA Expression ist in der Ko-Kultur im Vergleich zur Monokultur erniedrigt, wobei weitere Überstandsanalysen auf Proteinebene benötigt werden zur weiteren Einordnung. Das anti-inflammatorisch und pro-viral wirksame IL-10 ist, trotz erniedrigter IFNβ Expression, erhöht. Damit ist im Kontext der Ko-Kultur nach CMVamP Stimulation die antivirale Antwort der BMDMs geschwächt und eine inflammatorische Reaktion gedämpft (Tang-Feldman et al., 2011, Jones et al., 2010, Oakley et al., 2007). Hier wirken Hepatozyten und Cytomegalievirus gleichsam. Der Hepatozyt sowie das Cytomegalievirus wird durch eine erhöhte

IL-10 und erniedrigte IFNβ Produktion laut Literatur geschützt. Weitere Versuche in einem Infektionssetting sind notwendig, um die neue These zu bekräftigen, dass die Hepatozyten und das Cytomegalievirus gleichsam die Makrophagenreaktion in Richtung einer Viruspermission und antiinflammatorischen Reaktion beeinflussen.

4.2 Vergleich der BMDM Reaktion nach CMVamP und LPS Stimulation

Die unterschiedlichen mRNA-Expressionen in Reaktion von Makrophagen auf die verschiedenen Stimulanzien gelten nur für die vorliegenden Konzentrationen, den Virusstamm und das verwendete LPS. Damit ist die Aussagekraft und Vergleichbarkeit durch die gewählten experimentellen Bedingungen begrenzt. Die im Vergleich (zu den CMVamP Ergebnissen) konstanter zu reproduzierenden LPS-Versuchsergebnisse, lassen sich möglicherweise durch eine homogenere Stimulation erklären. LPS ist ein definiertes kleines Molekül, welches über gut untersuchte Rezeptoren in den Zellen, die alle erforderlichen Rezeptoren und Ko-Rezeptoren exprimieren eine ebenfalls weitestgehend gut verstandene intrazelluläre Signalübertragung hervorruft. Im Gegensatz dazu liegt mit dem UVinaktivierten Cytomegalievirus ein nur begrenzt standardisierter Stimulus vor, dessen Pathogenmuster sich aus variablen Bestandteilen zusammensetzt, und entsprechend die verschiedenen an der Erkennung beteiligten Rezeptorstrukturen unterschiedlich stark aktiviert. Dadurch kann eine höhere Varianz der Reaktionen bedingt sein.

Ebenfalls wird es im direkten Vergleich deutlich, dass die Stimulation mit CMVamP zu einer deutlich verschiedenen Zytokinreaktion führt. So waren speziell die IL-10, IFNβ, iNOS, CXCL9 und CXCL10 mRNA Spiegel erhöht. Im Vergleich dazu waren nach LPS Stimulation unabhängig von Mono-oder Kokultur die TNFα und IL-6 sowie Arginase 1 mRNA Spiegel deutlich erhöht. Aufgrund der vorliegenden Daten kann man argumentieren, dass das Cytomegalievirus auch ohne Infektion des Makrophagen, diesen antiviral reagieren lässt. Die Reaktion nach CMVamP Stimulation könnte bei dem stark erhöhten IL-10 und stark erniedrigten TNFα Spiegel, im Vergleich zur LPS Stimulation zusätzlich eher als antiinflammatorisch angesehen werden. Dementsprechend könnte die durch den Hepatozyten verfügbare antiinflammatorischen Grundzustand noch signifikant stärker antiinflammatorisch reagieren zu lassen. Diese These würde ebenfalls die inkonstanteren Kokulturversuche erklären, in denen bei manchen das Signifikanzniveau erreicht wurde und in manchen nicht. Wie wir in der Kokultur jedoch nachweisen konnten, hat der Hepatozyt weiterhin

einen signifikanten Einfluss auf die Reaktion. Dieser ist im Vergleich mit der LPS Stimulation aber deutlich schwächer ausgeprägt.

Unterschiedliche Ausprägung der Zytokin- und Chemokinreaktion sind teilweise durch die Literatur in Kontext zu setzen. So konnte für das menschliche Cytomegalie Virus gezeigt werden, dass das envelop glykoprotein B (gB) ausreichend ist, um eine IRF3 abhängige Interferon Typ I Produktion zu aktivieren (Boehme et al., 2004). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass im Murinen System, dass UV-inaktiviertes MCMV ebenfalls die Expression von IFNB mRNA induziert (Ehlting et al., 2016, Le et al., 2008b). Überträgt man dies auf die vorliegenden Ergebnisse mit MCMV, ist die signifikant erhöhte Expression von IFNB mRNA nach CMVamP Stimulation gegenüber LPS-Stimulation nachzuvollziehen. IFNβ wird in hohem Maße zusätzlich von den Hepatozyten produziert und spielt als verstärkender Regulator für die IL-10 Produktion eine wichtige Rolle (Ehlting et al., 2011, Petrasek et al., 2011). Im Einklang mit den erhöhten IFNB mRNA Expressionswerten nach CMVamP Stimulation stehen die erhöhten IL-10 mRNA Expressionswerte nach CMVamP Stimulation im Vergleich zu den IL-10 mRNA Expressionswerten nach LPS Stimulation. Zusätzlich ist in der Literatur eine gezielte Hochregulation des IL-10 und damit der Ausnutzung des IL-10 immunmodulatorischen Effekts durch das Cytomegalievirus beschrieben (Spencer et al., 2002, Slobedman et al., 2009, Avdic et al., 2016). IL-10 hat entscheidenden Einfluss auf die Viruspersistenz und Ausmaß der virusbedingten Krankheitslast (Brooks et al., 2006, Oakley et al., 2007, Jones et al., 2010). Die generell erhöhten IL-10 Zytokinwerte nach CMVamP Stimulation im Gegensatz zur LPS-Stimulation können die erniedrigten TNF α - und IL-6 Konzentrationen im Vergleich erklären. Laut Literatur hemmt IL-10 die pro-inflammatorische Reaktionen, unter anderem die TNFα, IL-6, CXCL9 und CXCL10 Produktion (Knolle et al., 1995, Tang-Feldman et al., 2011). Allerdings sind die Chemokine CXCL9 und CXCL10, trotz des potentiell hemmenden Einflusses des stark erhöhten IL-10, nach CMVamP Stimulation im Vergleich zur LPS Stimulation erhöht. Dies lässt eine starke Aktivierung der Chemokine durch die CMVamP Stimulation vermuten.

Die Erhöhung der Chemokin mRNA auf die CMVamP Stimulation bedingt eine vermehrte Lymphozytenmigration und damit potentiell verstärkte Entzündungsreaktion bzw. antivirale Situation. Sekundär profitiert das Cytomegalievirus durch die erhöhte Lymphozytenmigration, indem es die einwandernden Immunzellen zur Dissemination nutzt (Saederup et al., 1999, Jackson and Sparer, 2018).

Mit der Literatur im Einklang (Ehlting et al., 2016) scheint es ausreichend, dass UV-inaktivierter Virus die BMDMs und Hepatozyten stimuliert, um eine Vielzahl von Reaktionen zu aktivieren. Diese Reaktionen sind vorwiegend anti-viral und antiinflammatorisch. Anti-viral ist die, über beide

Kulturansätze hinaus, signifikant erhöhte IFNβ Antwort, die nicht infizierte benachbarte Zellen in einen protektiven Zustand versetzt. Zusätzlich kann das Virus über Stickstoffradikale, durch die aktivierte iNOS, bekämpft werden. Die Chemokine CXCL9 und CXCL10 locken weitere Immunzellen an den Ort der CMV-Erkennung, um die Immunantwort zu unterstützen. Pro-viral bzw. gewebeprotektiv wirkt hingegen das stark erhöhte anti-inflammatorische IL-10 sowie die niedrigen pro-inflammatorischen TNF α und IL-6 Spiegel im Vergleich zur LPS Stimulation. Zusammenfassend liegen für die beiden Stimulanzien und der speziellen Stimulanzdosen deutlich unterschiedliche Reaktionen vor. Insgesamt kann man die Reaktion nach LPS Stimulation im Vergleich zur CMV Stimulation als proinflammatorisch beschreiben. Hingegen besteht die Reaktion nach CMVamP Stimulation aus einer differenzierten Zytokinproduktion die auf eine antivirale und antiinflammatorische Reaktion hinweist. Die Reaktion auf beide Stimulanzien werden in der Kokultur durch den Einfluss der Hepatozyten deutlich verändert und weisen beide insgesamt einen eher antiinflammatorischen und im Kontext der CMVamP Stimulation proviralen Reaktionstyp auf.

4.3 <u>Einfluss der Hepatozyten auf die Oberflächenrezeptor-Differenzierung von</u> BMDMs

Die FACS Versuche in dieser Arbeit wurden ohne den FC-Rezeptor Block durchgeführt. Dieser Rezeptor bindet die Heavy Chain von Antikörpern und kann in unserem Versuchsaufbau die eingesetzten Antikörper zur Markierung spezifischer Oberflächenmarker wahllos binden. Damit sind die Ergebnisse als solche nicht sicher zu verwerten und werden daher auch nicht weiter in der Diskussion aufgeführt.

Diese unspezifische Bindung könnte auch die abweichenden Versuchsergebnisse zu vorliegenden Versuchen der Arbeitsgruppe erklären. Ein weiterer Unterschied in diesem Versuchsaufbau war die Makrophagendichte die mit 200.000 BMDMs pro Einsatz doppelt so hoch gewählt wurde wie in den Vorversuchen.

Diese Versuche müssen mit entsprechenden Fc-Rezeptorblock wiederholt werden, um aussagekräftige Vergleiche zwischen verschiedenen Makrophagendichten zu treffen.

4.4 <u>Auswirkung der Kulturzeit auf die Reaktion und Differenzierung von</u> <u>BMDMs nach CMVamP oder LPS Stimulation</u>

Die vorliegenden Versuchsergebnisse sollen Aussagen bezüglich einer möglichen Kokulturdauer ermöglichen. So ist eine signifikante Beeinflussung der Expression für Zyto- und Chemokine kodierender mRNA durch die Hepatozyten-Makrophagen Kommunikation erst nach mehr als zwei Stunden und weniger als 24 Stunden Kulturzeit entstanden. Zur weiteren Eingrenzung ist eine detailliertere Zeitreihe der mRNA Expressionswerte 2-24h zur Bestimmung der Zeit, bis die mRNA Expression zwischen Mono- und Ko-Kultur signifikant verschieden ist, für kommende Arbeiten sinnvoll. Dies würde weitere Informationen über die Dynamik und Dauer der Beeinflussung hervorbringen, die wiederum mögliche Rückschlüsse auf die interzellulären Kommunikationsfaktoren zulassen könnte. So kann man die Frage stellen, ob Faktoren, deren Freisetzung (Produktion) länger als 24h dauert, an der initialen interzellulären Kommunikation entscheidend beteiligt sein können.

4.5 <u>Einfluss des VLDL Rezeptor Knock-Out auf die Reaktion und Differenzierung</u> der BMDMs

Anders als die Ergebnisse um Baitsch und Bock et al. vermuten lassen (Baitsch et al., 2011), hat der VLDL-Rezeptor der Makrophagen keinen entscheidenden Einfluss auf die Reaktion der Makrophagen Monokultur sowie der Kokultur nach CMVdamP Stimulation. So ergaben sich messbare Unterschiede zwischen VLDL Rezeptor Knock-Out Mono- und Ko-Kultur, was auf eine weiterhin bestehende interzelluläre Kommunikation hinweist. Zusätzlich waren keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Mono- und Ko-Kulturen zwischen den Wildtyp-BMDMs und VLDL-Rezeptor Knock-Out BMDMs nachweisbar. Dies veranschaulicht, dass die Knock-Out BMDMs nicht verschieden zu den Wildtyp BMDMs reagieren.

4.6 Fazit und Ausblick:

Die vorliegende Arbeit konnte nach Vorversuchen auf diesem Gebiet einen weiteren Teil der Hepatozyten-Makrophagen-Reaktion nach CMVamP und LPS Stimulation untersuchen. Hierdurch verstärken sich die Hinweise, dass Hepatozyten die Makrophagenreaktion im Setting einer Kokultur hin zu einem anti-inflammtatorischen und viruspermissiven Zustand beeinflussen.

Für diese Beeinflussung benötigen die Zellen je nach Zyotkin unterschiedlich viel Kokulturzeit, jedoch mindestens zwei Stunden und für manche Zytokine weniger als 24 Stunden.

Die Arbeit erbrachte ebenfalls den Nachweis, dass der VLDL Rezeptor allein keinen entscheidenden Anteil an der Makrophagen-Hepatozyten-Kommunikation besitzt.

Als nächste Schritte sind weitere Experimente notwendig, um ein besseres Verständnis für die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Zell-Zell-Kommunikation über lösliche Mediatoren zu erlangen. Zum einen wären weitere Proteinanalysen hilfreich, um den tatsächlichen zellulären Output nach Stimulation zwischen Mono- und Kokultur genauer zu untersuchen.

Um die Expositionszeit/benötigte Kulturzeit weiter zu untersuchen, wären weitere Versuche mit neuen Zeitreihen und Kokulturzeiten zwischen zwei und 24 Stunden notwendig.

Zur Eingrenzung der Kommunikationsmöglichkeiten sollte des Weiteren eine Sekretomanalyse des Hepatozyten- und Makrophagenüberstandes durchgeführt werden. Anschließend könnte man mit Rezeptor Knock-Out oder Antidot Experimenten einzelne Rezeptoren und Liganden und dadurch deren singulären Wirkungseinfluss auf die Hepatozyten-Makrophagen Differenzierung und Reaktion überprüfen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- AVDIC, S., MCSHARRY, B. P., STEAIN, M., POOLE, E., SINCLAIR, J., ABENDROTH, A. & SLOBEDMAN,
 B. 2016. Human Cytomegalovirus-Encoded Human Interleukin-10 (IL-10) Homolog
 Amplifies Its Immunomodulatory Potential by Upregulating Human IL-10 in Monocytes.
 Journal of Virology, 90, 3819-3827.
- BAASCH, S., RUZSICS, Z. & HENNEKE, P. 2020. Cytomegaloviruses and Macrophages-Friends and Foes From Early on? *Front Immunol*, **11**, 793.
- BAITSCH, D., BOCK, H. H., ENGEL, T., TELGMANN, R., MÜLLER-TIDOW, C., VARGA, G., BOT, M., HERZ, J., ROBENEK, H. & VON ECKARDSTEIN, A. 2011. Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31, 1160-1168.
- BALMER, M. L., SLACK, E., DE GOTTARDI, A., LAWSON, M. A., HAPFELMEIER, S., MIELE, L., GRIECO, A., VAN VLIERBERGHE, H., FAHRNER, R., PATUTO, N., BERNSMEIER, C., RONCHI, F., WYSS, M., STROKA, D., DICKGREBER, N., HEIM, M. H., MCCOY, K. D. & MACPHERSON, A. J. 2014. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med*, *6*, 237ra66.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52.
- BANSAL, V. & OCHOA, J. B. 2003. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 6, 223-228.

- BERTOLINO, P., TRESCOL-BIEMONT, M. C. & RABOURDIN-COMBE, C. 1998. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol*, 28, 221-36.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A. 1987. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *New England Journal of Medicine*, 316, 379-385.
- BODE, J. G., ALBRECHT, U., HÄUSSINGER, D., HEINRICH, P. C. & SCHAPER, F. 2012a. Hepatic acute phase proteins–regulation by IL-6-and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. *European journal of cell biology*, 91, 496-505.
- BODE, J. G., EHLTING, C. & HAUSSINGER, D. 2012b. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal*.
- BOEHME, K. W., SINGH, J., PERRY, S. T. & COMPTON, T. 2004. Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *Journal of virology*, 78, 1202-1211.
- BONHAM, K. S., ORZALLI, M. H., HAYASHI, K., WOLF, A. I., GLANEMANN, C., WENINGER, W.,
 IWASAKI, A., KNIPE, D. M. & KAGAN, J. C. 2014. A promiscuous lipid-binding protein
 diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell*, 156, 705-716.
- BOSMA, B. M., METSELAAR, H. J., MANCHAM, S., BOOR, P. P., KUSTERS, J. G., KAZEMIER, G., TILANUS, H. W., KUIPERS, E. J. & KWEKKEBOOM, J. 2006. Characterization of human liver dendritic cells in liver grafts and perfusates. *Liver Transpl*, **12**, 384-93.
- BOTTO, S., ABRAHAM, J., MIZUNO, N., PRYKE, K., GALL, B., LANDAIS, I., STREBLOW, D. N., FRUH, K. J. & DEFILIPPIS, V. R. 2019. Human cytomegalovirus immediate early 86-kDa protein blocks transcription and induces degradation of the immature interleukin-1β protein during virion-mediated activation of the AIM2 inflammasome. *MBio*, 10.
- BOUWENS, L., DE BLESER, P., VANDERKERKEN, K., GEERTS, B. & WISSE, E. 1992. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme*, 46, 155-68.
- BROOKS, D. G., TRIFILO, M. J., EDELMANN, K. H., TEYTON, L., MCGAVERN, D. B. & OLDSTONE, M.
 B. 2006. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature medicine*, 12, 1301-1309.
- CAI, X., WANG, J., WANG, J., ZHOU, Q., YANG, B., HE, Q. & WENG, Q. 2020. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: new insights into therapy. *Pharmacological Research*, 104720.
- CALDWELL, R. W., RODRIGUEZ, P. C., TOQUE, H. A., NARAYANAN, S. P. & CALDWELL, R. B. 2018. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiological reviews*, 98, 641-665.
- CALNE, R., SELLS, R., PENA, J., DAVIS, D., MILLARD, P., HERBERTSON, B., BINNS, R. & DAVIES, D. 1969. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature*, 223, 472-476.
- CANNON, M. J., SCHMID, D. S. & HYDE, T. B. 2010. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*, 20, 202-13.
- COMPTON, T., KURT-JONES, E. A., BOEHME, K. W., BELKO, J., LATZ, E., GOLENBOCK, D. T. & FINBERG, R. W. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *Journal of virology*, **77**, 4588-4596.
- CROUGH, T. & KHANNA, R. 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*, 22, 76-98, Table of Contents.
- DALEY-BAUER, L. P., WYNN, G. M. & MOCARSKI, E. S. 2012. Cytomegalovirus impairs antiviral CD8+ T cell immunity by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity*, 37, 122-133.
- DEL VAL, M., HENGEL, H., HACKER, H., HARTLAUB, U., RUPPERT, T., LUCIN, P. & KOSZINOWSKI, U.
 H. 1992. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. J Exp Med, 176, 729-38.
- DITTRICH, W. & GÖHDE, W. 1969. Impulsfluorometrie bei einzelzellen in suspensionen. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 24, 360-361.

- DORING, M., LESSIN, I., FRENZ, T., SPANIER, J., KESSLER, A., TEGTMEYER, P., DAG, F., THIEL, N., TRILLING, M., LIENENKLAUS, S., WEISS, S., SCHEU, S., MESSERLE, M., CICIN-SAIN, L., HENGEL, H. & KALINKE, U. 2014. M27 expressed by cytomegalovirus counteracts effective type I interferon induction of myeloid cells but not of plasmacytoid dendritic cells. *J Virol*, 88, 13638-50.
- DUNN, J. C., YARMUSH, M. L., KOEBE, H. G. & TOMPKINS, R. G. 1989. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *Faseb j*, 3, 174-7.
- EHLTING, C., RONKINA, N., BOHMER, O., ALBRECHT, U., BODE, K. A., LANG, K. S., KOTLYAROV, A., RADZIOCH, D., GAESTEL, M., HAUSSINGER, D. & BODE, J. G. 2011. Distinct functions of the mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinases MK2 and MK3: MK2 mediates lipopolysaccharide-induced signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation by preventing negative regulatory effects of MK3. J Biol Chem, 286, 24113-24.
- EHLTING, C., TRILLING, M., TIEDJE, C., LE-TRILLING, V. T., ALBRECHT, U., KLUGE, S., ZIMMERMANN, A., GRAF, D., GAESTEL, M., HENGEL, H., HAUSSINGER, D. & BODE, J. G. 2016. MAPKAP kinase 2 regulates IL-10 expression and prevents formation of intrahepatic myeloid cell aggregates during cytomegalovirus infections. J Hepatol, 64, 380-9.
- EHLTING, C., WOLF, S. D. & BODE, J. G. 2021. Acute-phase protein synthesis: a key feature of innate immune functions of the liver. *Biol Chem*, 402, 1129-1145.
- EPELMAN, S., LAVINE, K. J. & RANDOLPH, G. J. 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41, 21-35.
- FITZGERALD, K. A., ROWE, D. C., BARNES, B. J., CAFFREY, D. R., VISINTIN, A., LATZ, E., MONKS, B., PITHA, P. M. & GOLENBOCK, D. T. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-κB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of experimental medicine*, 198, 1043-1055.
- GABAY, C. & KUSHNER, I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England journal of medicine*, 340, 448-454.
- GAULDIE, J., RICHARDS, C., HARNISH, D., LANSDORP, P. & BAUMANN, H. 1987. Interferon β2/BSF-2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte stimulating factor (HSF) and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 7251-7255.
- GESUNDHEIT, M. D. A. B. D. B. F. 2018. Humanes Cytomegalievirus (HCMV). Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 1, 116.
- GIOANNINI, T. L., TEGHANEMT, A., ZHANG, D., COUSSENS, N. P., DOCKSTADER, W., RAMASWAMY, S. & WEISS, J. P. 2004. Isolation of an endotoxin–MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 4186-4191.
- GOEHDE, W. D. 1972. Durchflusskammer an einem automatischen Mess-und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion. Google Patents.
- GRESSER, I. 1990. Biologic effects of interferons. Journal of Investigative Dermatology, 95, 66-71.
- GROOM, J. R. & LUSTER, A. D. 2011. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunology & Cell Biology*, 89, 207-215.
- HASAN, M., KRMPOTIC, A., RUZSICS, Z., BUBIC, I., LENAC, T., HALENIUS, A., LOEWENDORF, A., MESSERLE, M., HENGEL, H., JONJIC, S. & KOSZINOWSKI, U. H. 2005. Selective downregulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. *J Virol*, 79, 2920-30.
- HÄUSSINGER, D. & KORDES, C. 2020. Space of Disse: a stem cell niche in the liver. *Biological Chemistry*, 401, 81-95.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-94.

- HENGEL, H., ESSLINGER, C., POOL, J., GOULMY, E. & KOSZINOWSKI, U. H. 1995. Cytokines restore MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells. *J Gen Virol*, 76 (Pt 12), 2987-97.
- HENGEL, H., FLOHR, T., HAMMERLING, G. J., KOSZINOWSKI, U. H. & MOMBURG, F. 1996. Human cytomegalovirus inhibits peptide translocation into the endoplasmic reticulum for MHC class I assembly. *J Gen Virol*, 77 (Pt 9), 2287-96.
- HERKEL, J., JAGEMANN, B., WIEGARD, C., LAZARO, J. F. G., LUETH, S., KANZLER, S., BLESSING, M., SCHMITT, E. & LOHSE, A. W. 2003. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocyutes. *Hepatology*, 37, 1079-1085.
- HOEBE, K. H., WITKAMP, R. F., FINK-GREMMELS, J., VAN MIERT, A. S. & MONSHOUWER, M. 2001. Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxininduced hepatic injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280, G720-G728.
- HOKENESS, K. L., DEWEERD, E. S., MUNKS, M. W., LEWIS, C. A., GLADUE, R. P. & SALAZAR-MATHER, T. P. 2007. CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *Journal of virology*, 81, 1241-1250.
- ISHIBASHI, H., NAKAMURA, M., KOMORI, A., MIGITA, K. & SHIMODA, S. Liver architecture, cell function, and disease. Seminars in immunopathology, 2009. Springer, 399.
- JACKSON, J. W. & SPARER, T. 2018. There is always another way! cytomegalovirus' multifaceted dissemination schemes. *Viruses*, 10, 383.
- JIMÉNEZ-DALMARONI, M. J., GERSWHIN, M. E. & ADAMOPOULOS, I. E. 2016. The critical role of toll-like receptors—from microbial recognition to autoimmunity: a comprehensive review. *Autoimmunity reviews*, 15, 1-8.
- JONES, M., LADELL, K., WYNN, K. K., STACEY, M. A., QUIGLEY, M. F., GOSTICK, E., PRICE, D. A. & HUMPHREYS, I. R. 2010. IL-10 restricts memory T cell inflation during cytomegalovirus infection. *J Immunol*, 185, 3583-92.
- KELLER, G. A., WEST, M. A., CERRA, F. B. & SIMMONS, R. L. 1986. Macrophage-mediated modulation of hepatocyte protein synthesis: effect of dexamethasone. Archives of Surgery, 121, 1199-1205.
- KELLER, G. A., WEST, M. A., WILKES, L. A., CERRA, F. B. & SIMMONS, R. L. 1985. Modulation of hepatocyte protein synthesis by endotoxin-activated Kupffer cells. II. Mediation by soluble transferrable factors. *Annals of surgery*, 201, 429.
- KNOLLE, P., SCHLAAK, J., UHRIG, A., KEMPF, P., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. & GERKEN, G.
 1995. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge.
 J Hepatol, 22, 226-9.
- KORDES, C., SAWITZA, I., GÖTZE, S. & HÄUSSINGER, D. 2013. Hepatic Stellate Cells Support Hematopoiesis and are Liver-Resident Mesenchymal Stem Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31, 290-304.
- KRMPOTIC, A., HASAN, M., LOEWENDORF, A., SAULIG, T., HALENIUS, A., LENAC, T., POLIC, B.,
 BUBIC, I., KRIEGESKORTE, A., PERNJAK-PUGEL, E., MESSERLE, M., HENGEL, H., BUSCH, D.
 H., KOSZINOWSKI, U. H. & JONJIC, S. 2005. NK cell activation through the NKG2D ligand
 MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. J Exp Med, 201, 211-20.
- LANG, R. & HEEG, K. 1998. Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR. *Inflammopharmacology*, 6, 297-309.
- LE, V. T., TRILLING, M., WILBORN, M., HENGEL, H. & ZIMMERMANN, A. 2008a. Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation. *J Gen Virol*, 89, 2416-26.
- LE, V. T., TRILLING, M., ZIMMERMANN, A. & HENGEL, H. 2008b. Mouse cytomegalovirus inhibits beta interferon (IFN-beta) gene expression and controls activation pathways of the IFN-beta enhanceosome. *J Gen Virol*, 89, 1131-41.

- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J.-M. & HOFFMANN, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, 86, 973-983.
- LIMMER, A., OHL, J., KURTS, C., LJUNGGREN, H.-G., REISS, Y., GROETTRUP, M., MOMBURG, F., ARNOLD, B. & KNOLLE, P. A. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature Medicine*, 6, 1348-1354.
- LIN, S.-C., LO, Y.-C. & WU, H. 2010. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*, 465, 885-890.
- LIU, M., GUO, S. & STILES, J. K. 2011. The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncol Lett*, 2, 583-589.
- LUCIN, P., JONJIC, S., MESSERLE, M., POLIC, B., HENGEL, H. & KOSZINOWSKI, U. H. 1994. Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferongamma and tumour necrosis factor. *J Gen Virol*, 75 (Pt 1), 101-10.
- LÜTH, S., HUBER, S., SCHRAMM, C., BUCH, T., ZANDER, S., STADELMANN, C., BRÜCK, W., WRAITH, D. C., HERKEL, J. & LOHSE, A. W. 2008. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigenspecific Tregs. *The Journal of clinical investigation*, 118, 3403-3410.
- MANANDHAR, T., HÒ, G.-G. T., PUMP, W. C., BLASCZYK, R. & BADE-DOEDING, C. 2019. Battle between host immune cellular responses and HCMV immune evasion. *International journal of molecular sciences*, 20, 3626.
- MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P. & SICA, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23, 549-55.
- MANZANERO, S. 2012. Generation of mouse bone marrow-derived macrophages. *Methods Mol Biol*, 844, 177-81.
- MAO, K., CHEN, S., CHEN, M., MA, Y., WANG, Y., HUANG, B., HE, Z., ZENG, Y., HU, Y., SUN, S., LI, J., WU, X., WANG, X., STROBER, W., CHEN, C., MENG, G. & SUN, B. 2013. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Research*, 23, 201-212.
- MAY, P., BOCK, H. H. & NOFER, J. R. 2013. Low density receptor-related protein 1 (LRP1) promotes anti-inflammatory phenotype in murine macrophages. *Cell Tissue Res*, 354, 887-9.
- MILLER, D. M., CEBULLA, C. M. & SEDMAK, D. D. 2002. Human cytomegalovirus inhibition of major histocompatibility complex transcription and interferon signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol*, 269, 153-70.
- MILLS, C. D., KINCAID, K., ALT, J. M., HEILMAN, M. J. & HILL, A. M. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, 164, 6166-73.
- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol,* 8, 958-69.
- MOTSHWENE, P. G., MONCRIEFFE, M. C., GROSSMANN, J. G., KAO, C., AYALURU, M., SANDERCOCK, A. M., ROBINSON, C. V., LATZ, E. & GAY, N. J. 2009. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 25404-25411.
- MULLÍS, K., FAL-OONA, F., SCHARF, S., SAIKI, I., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction.
- MUNDER, M. 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British journal of pharmacology*, 158, 638-651.
- MURRAY, P. J., ALLEN, J. E., BISWAS, S. K., FISHER, E. A., GILROY, D. W., GOERDT, S., GORDON, S., HAMILTON, J. A., IVASHKIV, L. B., LAWRENCE, T., LOCATI, M., MANTOVANI, A., MARTINEZ, F. O., MEGE, J. L., MOSSER, D. M., NATOLI, G., SAEIJ, J. P., SCHULTZE, J. L., SHIREY, K. A., SICA, A., SUTTLES, J., UDALOVA, I., VAN GINDERACHTER, J. A., VOGEL, S. N. & WYNN, T. A.

2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41, 14-20.

- OAKLEY, O. R., GARVY, B. A., HUMPHREYS, S., QURESHI, M. H. & POMEROY, C. 2007. Increased weight loss with reduced viral replication in interleukin-10 knock-out mice infected with murine cytomegalovirus. *Clinical and Experimental Immunology*, 151, 155-164.
- PAVIĆ, I., POLIĆ, B., CRNKOVIĆ, I., LUČIN, P., JONJIĆ, S. & KOSZINOWSKI, U. H. 1993. Participation of endogenous tumour necrosis factor α in host resistance to cytomegalovirus infection. *Journal of General Virology*, 74, 2215-2223.
- 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.
- POISSON, J., LEMOINNE, S., BOULANGER, C., DURAND, F., MOREAU, R., VALLA, D. & RAUTOU, P.-E. 2017. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of hepatology*, 66, 212-227.
- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M.-Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M. & GALANOS, C. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-2088.
- POLTORAK, A., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., CITTERIO, S. & BEUTLER, B. 2000. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 2163-2167.
- R. KLINKE, H.-C. P., ST. SILBERNAGEL 2005. Physiologie. *Thieme Verlag Stuttgart*.
- RAWLINSON, W. D., FARRELL, H. E. & BARRELL, B. G. 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *Journal of virology*, 70, 8833-8849.
- REDPATH, S., ANGULO, A., GASCOIGNE, N. R. & GHAZAL, P. 1999. Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *The Journal of Immunology*, 162, 6701-6707.
- REMMERIE, A. & SCOTT, C. L. 2018. Macrophages and lipid metabolism. *Cellular immunology*, 330, 27-42.
- REYBURN, H. T., MANDELBOIM, O., VALÉS-GÓMEZ, M., DAVIS, D. M., PAZMANY, L. & STROMINGER, J. L. 1997. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature*, 386, 514-517.
- SAEDERUP, N., LIN, Y. C., DAIRAGHI, D. J., SCHALL, T. J. & MOCARSKI, E. S. 1999. Cytomegalovirusencoded β chemokine promotes monocyte-associated viremia in the host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 10881-10886.
- SALOMON, F.-V., GEYER, H., AND GILLE, U. 2008. Anatomie für die Tiermedizin, Vol.2. Enke Verlag Stuttgart.
- SCHUMANN, R. R. 2011. Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule. *Biochemical Society Transactions*, 39, 989-993.
- SCOTT, C. L., ZHENG, F., DE BAETSELIER, P., MARTENS, L., SAEYS, Y., DE PRIJCK, S., LIPPENS, S., ABELS, C., SCHOONOOGHE, S., RAES, G., DEVOOGDT, N., LAMBRECHT, B. N., BESCHIN, A. & GUILLIAMS, M. 2016. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun*, 7, 10321.
- SICA, A., ERRENI, M., ALLAVENA, P. & PORTA, C. 2015. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci*, 72, 4111-26.
- SLOBEDMAN, B., BARRY, P. A., SPENCER, J. V., AVDIC, S. & ABENDROTH, A. 2009. Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *J Virol*, 83, 9618-29.
- SPENCER, J. V., LOCKRIDGE, K. M., BARRY, P. A., LIN, G., TSANG, M., PENFOLD, M. E. & SCHALL, T. J. 2002. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *Journal of virology*, 76, 1285-1292.

- STANLEY, E. R. 1985. [42] The macrophage colony-stimulating factor, CSF-1. *Methods in enzymology*. Elsevier.
- 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, 287-92.
- TANAKA, K. & NODA, S. 2001. Role of nitric oxide in murine cytomegalovirus (MCMV) infection. *Histology and histopathology*, 16, 937-944.
- TANG-FELDMAN, Y. J., LOCHHEAD, G. R., LOCHHEAD, S. R., YU, C. & POMEROY, C. 2011. Interleukin-10 repletion suppresses pro-inflammatory cytokines and decreases liver pathology without altering viral replication in murine cytomegalovirus (MCMV)-infected IL-10 knockout mice. *Inflamm Res,* 60, 233-43.
- THOMSON, A. W. & KNOLLE, P. A. 2010. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature Reviews Immunology*, 10, 753-766.
- TILLETT, W. S. & FRANCIS, T. 1930. SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *J Exp Med*, 52, 561-71.
- UPTON, J. W., KAISER, W. J. & MOCARSKI, E. S. 2010. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell host & microbe*, **7**, 302-313.
- VAN BOSSUYT, H. & WISSE, E. 1988. Endotoxin injection affects the Kupffer cell morphology in the rat liver. *Prog Clin Biol Res*, 272, 161-71.
- VANDEVENNE, P., SADZOT-DELVAUX, C. & PIETTE, J. 2010. Innate immune response and viral interference strategies developed by human herpesviruses. *Biochem Pharmacol*, 80, 1955-72.
- WAHL, C., BOCHTLER, P., CHEN, L., SCHIRMBECK, R. & REIMANN, J. 2008. B7-H1 on hepatocytes facilitates priming of specific CD8 T cells but limits the specific recall of primed responses. *Gastroenterology*, 135, 980-988.
- WAHL, C., BOCHTLER, P., SCHIRMBECK, R. & REIMANN, J. 2007. Type I IFN-producing CD4 Valpha14i NKT cells facilitate priming of IL-10-producing CD8 T cells by hepatocytes. J Immunol, 178, 2083-93.
- WARREN, A., LE COUTEUR, D. G., FRASER, R., BOWEN, D. G., MCCAUGHAN, G. W. & BERTOLINO, P.
 2006. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 44, 1182-90.
- WEISCHENFELDT, J. & PORSE, B. 2008. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc*, 2008, pdb.prot5080.
- WEST, M., KELLER, G., HYLAND, B., CERRA, F. & SIMMONS, R. 1986. Further characterization of Kupffer cell/macrophage-mediated alterations in hepatocyte protein synthesis. *Surgery*, 100, 416-423.
- WEST, M. A., KELLER, G. A., CERRA, F. B. & SIMMONS, R. L. 1985. Killed Escherichia coli stimulates macrophage-mediated alterations in hepatocellular function during in vitro coculture: a mechanism of altered liver function in sepsis. *Infect Immun*, 49, 563-70.
- WOLF, D. S. B., G. J.; ET AL 2015. Identifikation differenziell regulierter Mediatoren im Rahmen der Leberregeneration und reziproke Beeinflussung der Zellfunktion von Makrophagen und Hepatozyten durch interzelluläre Kommunikationsprozesse.
- WOLVEKAMP, M. C. & MARQUET, R. L. 1990. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunology letters*, 24, 1-9.
- WONG, G. H. W. & GOEDDEL, D. V. 1986. Tumour necrosis factors α and β inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature*, 323, 819-822.
- WU, R., CUI, X., DONG, W., ZHOU, M., SIMMS, H. H. & WANG, P. 2006. Suppression of hepatocyte CYP1A2 expression by Kupffer cells via AhR pathway: the central role of proinflammatory cytokines. *International journal of molecular medicine*, **18**, 339-346.
- YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., HOSHINO, K., KAISHO, T., SANJO, H., TAKEUCHI, O., SUGIYAMA, M., OKABE, M. & TAKEDA, K. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301, 640-643.

- YOU, Q., CHENG, L., KEDL, R. M. & JU, C. 2008. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology*, 48, 978-990.
- ZANONI, I., OSTUNI, R. & GRANUCCI, F. 2009. Generation of mouse bone marrow-derived macrophages (BM-MFs). *Protoc Exch*, 10.
- ZELOVÁ, H. & HOŠEK, J. 2013. TNF-α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62, 641-651.
- ZHANG, X., GONCALVES, R. & MOSSER, D. M. 2008. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current protocols in immunology*, 83, 14.1. 1-14.1. 14.

6 Anhang

_

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt allen beteiligten Personen, die mich in der Umsetzung dieses Forschungsprojektes unterstützt haben. Besonders möchte ich hierbei Prof. Johannes Bode für die Bereitstellung des Themas sowie für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit danken.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Christian Ehlting, Dr. Stephanie Wolf, Marijana Suzanj und Theresa Ohly, die mich jederzeit auf verschiedenen Ebenen tatkräftig unterstützt und damit die Umsetzung dieses Projekt ermöglicht haben. Ich bedanke mich für eure Zeit, Eure Hilfsbereitschaft und eure Geduld.

Ein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe um Prof. Bock für die Bereitstellung der VLDL-Rez. Knock-Out Mäuse.

Zusätzlich danke ich allen weiteren Personen, die mich auf diesem Wege begleitet haben, meinen Freunden und meiner Familie.