

**Optimierung der Isolation humaner nicht-parenchymaler Zellen der Leber und  
Charakterisierung ihrer immunregulatorischen Bedeutung**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Melanie Werner  
aus Hamm

Essen, Juni 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden an der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Jörg F. Schlaak

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Ulf Dittmer

**Vorsitzender des Prüfungsausschusses:** Prof. Dr. Markus Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2015

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Leber .....	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der Leber .....	1
1.2	Die Zelltypen der Leber .....	4
1.2.1	Hepatozyten .....	4
1.2.2	Nicht-parenchymale Zellen der Leber.....	4
1.2.3	Kupffer Zellen .....	5
1.2.4	Lebersinusoidale Endothelzellen.....	5
1.2.5	Hepatische Sternzellen.....	6
1.3	Immunantwort der Leber .....	8
1.3.1.1	Toll- <i>like</i> Rezeptoren.....	9
1.3.1.2	Interferone .....	13
1.4	Hepatitis C Virus Infektion .....	14
1.5	Zielsetzung.....	19
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1	Material .....	20
2.1.1	Geräte .....	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3	Chemikalien und Substanzen.....	23
2.1.4	Kommerzielle Kits.....	25
2.1.5	Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe und Seren .....	26
2.1.5.1	Primärantikörper .....	26
2.1.5.2	Sekundärantikörper .....	27
2.1.6	Fluoreszenzfarbstoffe .....	27
2.1.7	Neutralisierende Antikörper .....	28
2.1.8	Seren für Immunzytochemische Färbungen .....	28

2.1.9	<i>MicroBeads</i> .....	28
2.1.10	Proteingrößenstandards .....	29
2.1.11	Toll- <i>like</i> Rezeptor Liganden .....	29
2.1.12	Rekombinante Interferone .....	29
2.1.13	Hergestellte Puffer und Lösungen .....	30
2.1.13.1	Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen .....	30
2.1.13.2	Puffer und Lösungen für Leberzellpräparationen .....	31
2.1.13.3	Puffer und Lösungen für immunozytochemische Färbungen .....	32
2.1.13.4	Puffer und Lösungen für durchflusszytometrische Analysen .....	33
2.1.14	Oligonukleotide .....	33
2.1.15	QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen .....	33
2.1.16	Zelllinien .....	35
2.1.17	Zellkulturmedien .....	36
2.1.17.1	Hepatozyten .....	36
2.1.17.2	KC und HSC Kulturmedium .....	36
2.1.17.3	LSEC Wachstums- und Kulturmedium .....	36
2.1.17.4	HSC Wachstumsmedium .....	36
2.1.17.5	Con1 Kulturmedium .....	37
2.1.18	Software .....	37
2.2	Methoden .....	38
2.2.1	Zellkulturtechniken .....	38
2.2.1.1	Lebergewebe .....	38
2.2.1.2	Isolation primärer Leberzellen .....	38
2.2.1.3	Stimulation von NPC mit TLR Liganden .....	42
2.2.1.4	Subkultivierung von Con1 Zellen .....	43
2.2.1.5	Bestimmung der Zellzahl .....	43
2.2.1.6	Antivirale Aktivität von NPC .....	44
2.2.1.7	Neutralisierungsexperimente .....	44
2.2.2	RNA Techniken .....	45
2.2.2.1	RNA Isolierung aus Primärzellen .....	45
2.2.2.2	RNA Isolation aus Con1 Zellen .....	46

2.2.2.3	<i>One-step real-time</i> quantitative reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion .....	46
2.2.3	Protein Techniken.....	47
2.2.3.1	Gewinnung von Proteinextrakten .....	47
2.2.3.2	Proteinquantifizierung.....	48
2.2.3.3	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese .....	48
2.2.3.4	Western Blot.....	49
2.2.3.5	Immunzytochemische Färbung von Zellmarkern.....	51
2.2.3.6	Durchflusszytometrie .....	52
2.2.3.7	Cytochrome P450 Aktivität .....	53
2.2.3.8	Phagozytotische Aktivität.....	54
2.2.3.9	Aufnahme von acetyliertem <i>low-density</i> Lipoprotein .....	54
2.2.3.10	Detektion von Autofluoreszenz.....	54
2.2.3.11	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> .....	55
2.2.4	Analytische Methoden .....	56
2.2.4.1	Mikroskopie .....	56
2.2.5	Statistik.....	56
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
3.1	Charakterisierung und Qualität primärer Hepatozyten und NPC.....	57
3.1.1	Zellausbeuten .....	57
3.1.2	Identifikation und Qualität humaner Hepatozyten.....	57
3.1.3	Identifikation und Qualität humaner KC .....	62
3.1.4	Identifikation und Qualität humaner LSEC.....	66
3.1.5	Identifikation und Qualität humaner HSC .....	71
3.2	TLR Signaltransduktion in NPC .....	76
3.2.1	Genexpression der TLR in primären NPC .....	76
3.2.2	Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine in NPC.....	78
3.2.3	Signaltransduktion in TLR stimulierten NPC.....	84
3.3	Antivirale Immunantwort primärer NPC.....	86
3.3.1	Antivirale Aktivität von NPC nach TLR Stimulation.....	86

3.3.2	Expression antiviraler Mediatoren in NPC .....	87
3.3.3	Poly I:C induzierte ISG Genexpression in NPC .....	89
3.3.4	Neutralisation der Poly I:C vermittelten antiviralen Aktivität.....	92
3.3.5	Expression unterschiedlicher IFN- $\alpha$ Subtypen in humanen NPC .....	95
3.4	Vergleich der Immunantwort von NPC aus HCV positiven und HCV negativen Patienten.....	99
3.4.1	HCV induzierte Genexpression inflammatorischer Zytokine.....	99
3.4.2	HCV induzierte Genexpression von Typ I und Typ III Interferonen ...	105
3.4.3	Einfluss des Gewebeansprungs auf die Zytokin Genexpression.....	108
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>110</b>
4.1	Isolierte PHH, KC, LSEC und HSC aus humanem Lebergewebe weisen charakteristische Eigenschaften auf.....	110
4.2	Die TLR Signaltransduktion in primären NPC ist zelltypspezifisch.....	117
4.3	Die antivirale Aktivität humaner NPC ist auf den TLR3 begrenzt und verläuft über Typ I Interferone.....	120
4.4	LSEC von HCV positiven Patienten besitzen eine höhere Sensitivität gegenüber Poly I:C .....	122
4.5	Ausblick.....	124
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>143</b>
7.1	Danksagung.....	143
7.2	Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	145
7.3	Lebenslauf .....	151

## Abkürzungsverzeichnis

xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
α-SMA	Alpha- <i>smooth muscle actin</i>
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
AcLDL	Acetyliertes <i>low-density</i> Lipoprotein
AKT	Serin/Threonin Kinase Akt (auch Proteinkinase B)
ALB	Albumin
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	Aktivator Protein-1
APC	Allophycocyanin
APOB	Apolipoprotein B
ASGR1	<i>Asialoglycoprotein receptor 1</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
BrightR	<i>Brightness reinforcement</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
Ca <sup>2+</sup>	Calcium Ionen
CaCl	Kalziumchlorid
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col1A1	Collagen Typ I alpha I
CYGB	Cytoglobin
CYP2C9	Cytochrom P450 Isoform 2C9
CYP3A4	Cytochrom P450 Isoform 3A4
DAA	<i>Direct-acting antiviral drugs</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DES	Desmin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

---

dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dsRNA	Doppelsträngige ( <i>double-stranded</i> ) RNA
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix ( <i>extracellular matrix</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i>
EMCV	<i>Encephalomyocarditis Virus</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
FBS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FC	<i>Fold change</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreuung)
FSL-1	Synthetisches diacyliertes Lipoprotein (TLR2/TLR6 Ligand)
g	Gramm
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBSS	<i>Gey's balanced salt solution</i>
Gdq	Gardiquimod (TLR7 Ligand)
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, früherer Name: AST
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase, früherer Name: ALT
h	Stunden
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKLM	<i>Heat killed listeria monocytogenes</i> (TLR2 Ligand)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSC	Hepatische Sternzellen ( <i>hepatic stellate cells</i> )



IFN	Interferon
IFNAR	Interferon alpha/beta Rezeptor
IFNLR1	Interferon-lambda Rezeptor 1
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>Inhibitor of NF-κB kinase</i>
IL	Interleukin
IL-10R2	Interleukin-10 Rezeptor β Untereinheit
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IRAK	IL-1R assoziierte Kinase
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISG	IFN sensitives Gen
ISRE	<i>Interferon stimulated response element</i>
JAK	Januskinasen
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
KC	Kupffer Zellen ( <i>kupffer cells</i> )
LOX	Lysyl-Oxidase ( <i>lysyl oxidase</i> )
LOXL2	<i>Lysyl oxidase-like enzyme</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i>
LSEC	Lebersinusoidale Endothelzellen ( <i>liver sinusoidal endothelial cells</i> )
L-SIGN	<i>Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin</i>
LSM	Laser scanning Mikroskop
LYVE-1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>
M	Molar
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium Ionen
Min	Minuten
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
MX1	<i>Myxovirus resistance 1</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
n	Gruppen Größe
n.d.	Nicht detektierbar
n.s.	Nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
nAK	Neutralisierender Antikörper
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NEMO	<i>Nuclear factor-kappaB essential modulator</i>
Neo	Neomycin-Phosphotransferase
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappaB</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	<i>NOD-like</i> Rezeptor
NOD	<i>Nucleotid oligomerization domain</i>
NPC	Nicht-parenchymale Zellen ( <i>non-parenchymal cells</i> )
NS	Nichtstrukturproteine
NTR	Nicht translatierte Region
OAS	Oligoadenylatsynthetase
ODN2216	Oligodesoxynucleotide 2216 (TLR9 Ligand)
ORF	<i>Open reading frame</i>
p38	p38 mitogenaktivierte Proteinkinase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pam3CSK4	Synthetisches triacyliertes Lipoprotein (TLR1/2 Ligand)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PDGFRB	<i>Platelet-derived growth factor receptor beta polypeptide</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM1	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, (auch CD31)</i>

PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PHH	Primäre humane Hepatozyten
PKR	dsRNA abhängige Proteinkinase R
Poly I:C	<i>Polyinosine-polycytidylic acid</i> , Synthetische dsRNA (TLR3 Ligand)
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RBV	Ribavirin
RdRp	RNA abhängige RNA Polymerase ( <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> )
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIP1	<i>Receptor-interacting protein 1</i>
RLR	<i>RIG-I-like</i> Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase L	Latente Ribonuklease
RSAD2	<i>Radical S-adenosyl methionine domain containing 2</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SEM	<i>Standard error of mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SRB1	<i>Scavenger receptor class B type 1</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i> (Seitwärtsstreuung)
ssRNA	Einzelsträngige ( <i>single-stranded</i> ) RNA
STAB-1	Stabilin-1
STAB-2	Stabilin-2
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SteCGS	<i>Stellate Cell Growth Supplement</i>
SteCM	<i>Stellate Cell Medium</i>
SVR	<i>Sustained virological response</i>
TAB	TAK bindendes Protein
TAK	TGF- $\beta$ aktivierte Kinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

TANK	<i>TRAF family member associated NF-<math>\kappa</math>B activator</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	TBS mit Tween 20
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF6	<i>Tumour-necrosis-factor receptor-associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-<math>\beta</math></i>
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCL	Vinculin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
w/o	Unbehandelte Kontrolle ( <i>without</i> )

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Leberstruktur.....	3
Abbildung 2. TLR vermittelte Signalweiterleitung. ....	12
Abbildung 3. Genetische Organisation des HCV.....	15
Abbildung 4. Hepatitis C Virus Replikationszyklus.....	17
Abbildung 5. Con1 bicistronisches Replikon.....	35
Abbildung 6. Schematische Darstellung der Leberzellpräparation. ....	42
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des <i>semi-dry</i> Western Blot Sandwiches.....	50
Abbildung 8. Morphologie primärer Hepatozyten in Kultur. ....	58
Abbildung 9. Identifikation kultivierter PHH.....	59
Abbildung 10. Genexpression Hepatozyten spezifischer Marker durch PHH. ....	60
Abbildung 11. Funktionelle Aktivität kultivierter PHH. ....	61
Abbildung 12. Morphologie primärer KC in Kultur.....	62
Abbildung 13. Qualität kultivierter primärer KC.....	64
Abbildung 14. Genexpression KC spezifischer Marker.....	65
Abbildung 15. Phagozytische Aktivität primärer KC.....	66
Abbildung 16. Morphologie primärer LSEC in Kultur. ....	67
Abbildung 17. Qualität kultivierter primärer LSEC .....	68
Abbildung 18. Detektion CD146 positiver LSEC mittels Durchflusszytometrie. ....	69
Abbildung 19. Genexpression LSEC spezifischer Marker. ....	69
Abbildung 20. Physiologische Aktivität primärer LSEC in Kultur.....	70
Abbildung 21. Morphologie primärer HSC in Kultur. ....	71
Abbildung 22. Qualität kultivierter primärer HSC .....	73
Abbildung 23. Genexpression HSC spezifischer Marker. ....	74
Abbildung 24. Physiologische Aktivität kultivierter HSC. ....	75
Abbildung 25. TLR induzierte Sekretion inflammatorischer Zytokine in primären humanen NPC.....	83
Abbildung 26. TLR vermittelte Signalwege in primären NPC.....	85
Abbildung 27. Antivirale Aktivität TLR stimulierter NPC.....	87
Abbildung 28. Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 nach Stimulation der TLR. .....	88
Abbildung 29. Poly I:C induzierte Sekretion von IFN in NPC.....	89

Abbildung 30. TLR vermittelte ISG Genexpression in NPC.....	91
Abbildung 31. Suppression des TLR3 vermittelten antiviralen Effektes in NPC. ....	94
Abbildung 32. Poly I:C induzierte IFN Genexpression in NPC nicht infizierter und HCV infizierter Patienten. ....	106
Abbildung 33. Vergleich der Zytokkin Genexpressionen in KC und LSEC aus Resektionsgewebe und Transplantationsgewebe. ....	109

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Toll- <i>like</i> Rezeptoren und ihre Liganden .....	10
Tabelle 2. Virale Proteine und ihre Funktionen im HCV Replikationszyklus .....	16
Tabelle 3. Geräteliste .....	20
Tabelle 4. Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	21
Tabelle 5. Chemikalienliste .....	23
Tabelle 6. Liste der verwendeten kommerziellen Kits .....	25
Tabelle 7. Primärantikörper .....	26
Tabelle 8. Konjugierte Antikörper und Isotypenkontrollen .....	27
Tabelle 9. Sekundärantikörper .....	27
Tabelle 10. Fluoreszenzfarbstoffe .....	27
Tabelle 11. Fluoreszente Moleküle .....	28
Tabelle 12. Neutralisierende Antikörper .....	28
Tabelle 13. Seren .....	28
Tabelle 14. <i>MicroBeads</i> .....	28
Tabelle 15. Proteingrößenstandards .....	29
Tabelle 16. TLR Liganden .....	29
Tabelle 17. Rekombinante Interferone .....	29
Tabelle 18. Oligonukleotide .....	33
Tabelle 19. QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen .....	33
Tabelle 20. TLR Genexpression in kultivierten NPC .....	77
Tabelle 21. Genexpression inflammatorischer Zytokine nach TLR Stimulation in KC .....	79
Tabelle 22. Genexpression inflammatorischer Zytokine nach TLR Stimulation in LSEC .....	80
Tabelle 23. Genexpression inflammatorischer Zytokine nach TLR Stimulation in HSC .....	81
Tabelle 24. Genexpression von IFN- $\alpha$ Subtypen in KC .....	96
Tabelle 25. Genexpression von IFN- $\alpha$ Subtypen in LSEC .....	97
Tabelle 26. Genexpression von IFN- $\alpha$ Subtypen in HSC .....	98
Tabelle 27. Vergleich der Genexpression inflammatorischer Zytokine in KC von HCV positiven und HCV negativen Patienten .....	101

Tabelle 28. Vergleich der Genexpression inflammatorischer Zytokine in LSEC von HCV positiven und HCV negativen Patienten.....	102
Tabelle 29. Vergleich der Genexpression inflammatorischer Zytokine in HSC von HCV positiven und HCV negativen Patienten.....	103
Tabelle 30. Patientencharakteristika.....	104
Tabelle 31. Patientencharakteristika.....	107



# 1 Einleitung

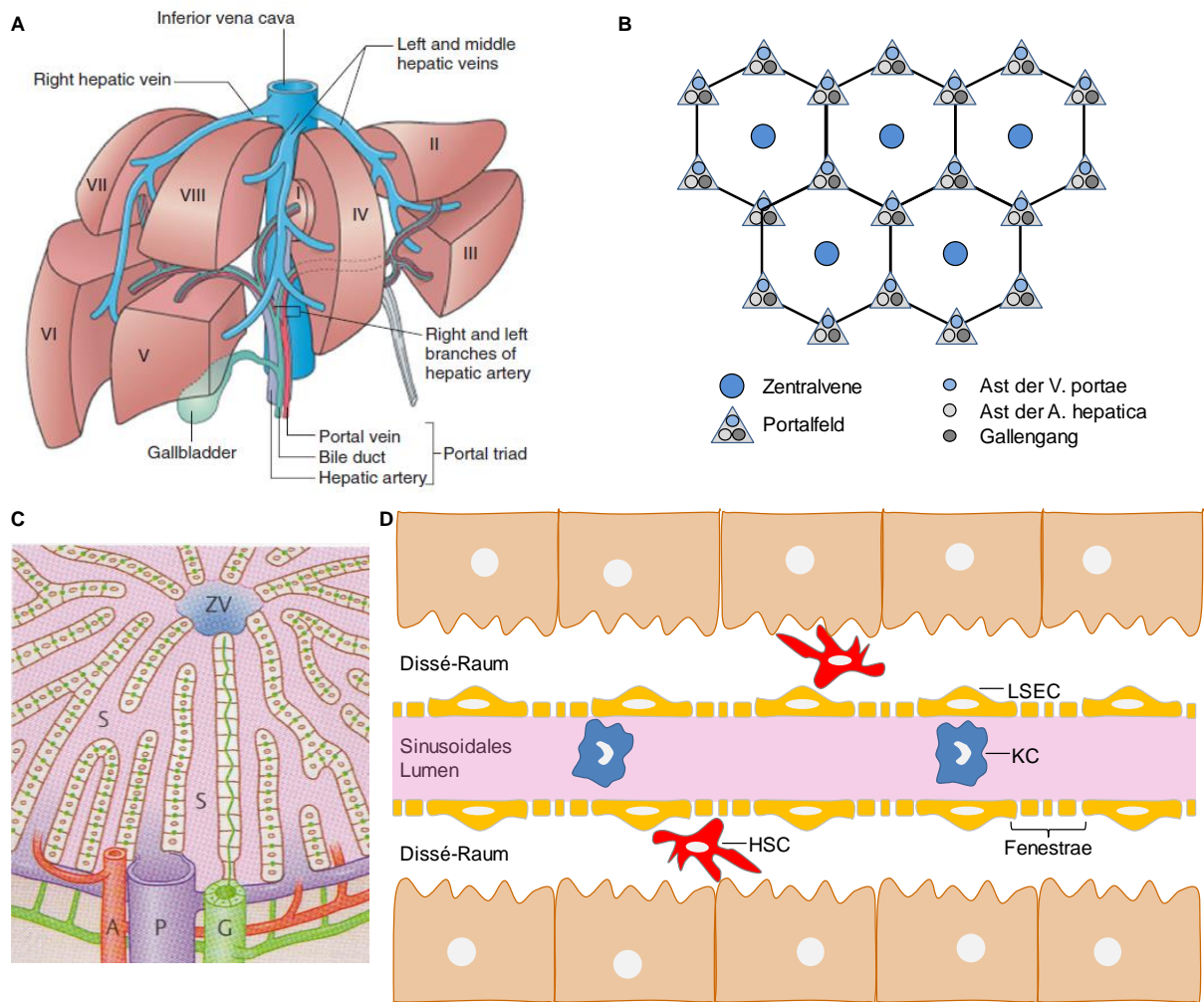
## 1.1 Die Leber

### 1.1.1 Aufbau und Funktion der Leber

Die Leber ist mit ca. 1,5kg ein bedeutendes Stoffwechselorgan des Körpers (Liaskou et al. 2012). Das Organ erfüllt eine Vielzahl an Funktionen. Unter anderem ist die Leber für den Energiestoffwechsel von zentraler Bedeutung. Hierbei spielt vor allem die *de novo* Synthese von Glukose (Glukoneogenese) und die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen eine wichtige Rolle, da hierdurch unter anderem der Blutzuckerspiegel reguliert wird. Darüber hinaus dient die Leber als Speicherort für Fettsäuren, Vitamine (z. B. Vitamin A, Vitamin B<sub>12</sub>) und Metalle (Eisen, Kupfer). Die Leber ist das zentrale Organ für die Synthese von Plasmaproteinen, Hormonen und von Keratin. Galle wird in den Parenchymzellen der Leber (Hepatozyten) synthetisiert und in der Gallenblase gespeichert. Eine weitere Funktion der Leber ist die Ausscheidung körpereigener Substanzen (Steroide, Bilirubin und Schilddrüsenhormone) oder körperfremder Substanzen (Medikamente, Alkohol und Xenobiotika) durch die sogenannte Biotransformation. Bei diesem Prozess werden Moleküle vor allem durch das Cytochrom P450 System so verändert, dass sie biologisch inaktiv und wasserlöslich werden und somit ausgeschieden werden können (Moc, Horn 2012).

Das Organ ist in den größeren rechten (*Lobus hepaticus dexter*) und den kleineren linken Leberlappen (*Lobus hepaticus sinister*) gegliedert. Die Leberlappen werden in insgesamt acht Segmente unterteilt (Abbildung 1A) (Tamm, Kurtz 2012). Die Blutversorgung der Leber erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Die Leber erhält sauerstoffreiches Blut über die Leberarterie (*Arteria hepatica propria*) und nährstoffreiches (Glukose und Aminosäuren) Blut aus dem Magen-Darm-Trakt durch die Pfortader (*Vena portae hepatis*). Die gesamte Leber ist in sechseckige Leberläppchen (*Lobuli hepatici*) strukturiert. An den Punkten, an denen die Leberläppchen aufeinandertreffen, befinden sich periportale Felder, die auch als Glisson-Trias oder Glissonsches Dreieck bezeichnet werden. Diese Felder werden

durch die Endäste der Pfortader, der Leberarterie und den interlobulären Gallengängen (*Duktus biliferus*) gebildet (Abbildung 1B). Innerhalb der Leberläppchen sind die Hepatozyten radiär in Balken um die Zentralvene (*Vena centralis*), die in der Mitte der Läppchen liegt, angeordnet. Die Leberbalken sind von Sinusoiden (Kapillaren), durch die das Blut aus den Periportalfeldern her zur Zentralvene strömt, umgeben. Darüber hinaus fließt Galle durch die Gallenkanälchen zu den interlobulären Gallengängen (Abbildung 1C) (Moc, Horn 2012). Die Wand der Sinusoide (Endothel), wird von den lebersinusoidalen Endothelzellen (*liver sinusoidal endothelial cells*; LSEC) ausgekleidet. Zwischen den LSEC und den Hepatozyten liegt der Dissé-Raum. Die LSEC weisen offene Poren eines Durchmessers von 150-175nm auf, die als Fenestrae bezeichnet werden. Die Fenestrae wirken als dynamischer Filter und ermöglichen den Transport von Blutplasma, Makromolekülen, Proteinen und Elektrolyten zwischen den sinusoidalen Lumen und dem Dissé-Raum, wodurch die Hepatozyten mit Nährstoffen versorgt werden (Braet, Wisse 2002, Moc, Horn 2012). Die Nährstoffe werden von den Hepatozyten aufgenommen, verstoffwechselt, gespeichert oder abgebaut. Zusätzlich werden die Hepatozyten durch das Blut der Leberarterie, das durch die Sinusoide zur Zentralvene fließt, mit Sauerstoff versorgt. In dem Dissé-Raum sind die hepatischen Sternzellen (*hepatic stellate cells*, HSC) lokalisiert. Im Lumen der Sinusoide befinden sich die in der Leber ansässigen Makrophagen, die Kupffer Zellen (KC) (Smedsrod et al. 1994).



**Abbildung 1. Schematische Darstellung der Leberstruktur.** (A) Die Leber wird grob in den größeren rechten und den kleineren linken Leberlappen unterteilt, die durch die Lebersegmente I bis VIII gebildet werden (McCuskey 2012). (B) Die Leber ist in sechseckige Leberläppchen strukturiert in deren Mitte die Zentralvene (ZV, *Vena centralis*) liegt. An den Ecken der Leberläppchen liegen die Periportalfelder, in denen die Endäste der Pfortader (*Vena portae hepatis*, P), der Leberarterie (*Arteria hepatica propria*, A) und die interlobulären Gallengänge (*Duktus biliferus*, G) die Glisson-Trias bilden (Dancygier 2003). (C) Innerhalb der Leberläppchen bilden die Hepatozyten die Leberbalken. Diese sind durch die Sinusoide (S) voneinander getrennt. Galle läuft in den Gallenkanälchen (grün) zwischen den Hepatozyten zu den interlobulären Gallengängen (Tamm, Kurtz 2012). (D) Die lebersinusoidale Wand wird von den fenestrierten Endothelzellen (LSEC) ausgekleidet. Zwischen den LSEC und den Hepatozyten liegt der Dissé-Raum, in dem die HSC resident sind. In dem sinusoidalen Lumen sind die KC angesiedelt.

## 1.2 Die Zelltypen der Leber

Die Leberzellpopulation setzt sich zu 60% aus Hepatozyten, den Parenchymzellen der Leber, und zu 40% aus den nicht-parenchymalen Zellen (*non-parenchymal cells*, NPC) zusammen (Kmiec 2001). Die Haupteigenschaften der einzelnen Zelltypen werden im Folgenden differenziert beschrieben.

### 1.2.1 Hepatozyten

Die Leber ist für eine Vielzahl metabolischer Prozesse verantwortlich. Für viele dieser Prozesse fungieren Hepatozyten als metabolische Einheit und führen eine Großzahl der Leberfunktionen aus. Darunter fallen Funktionen wie die Glukose Homöostase, die Bilirubin Exkretion, die Synthese von Cholesterol und Fettsäuren sowie die Synthese und Sekretion von Plasma Proteinen wie z. B. Albumin, Transferrin, Prothrombin, Fibrinogen, Lipoproteine und Komplementproteinen (McCuskey 2012). Darüber hinaus sind sie für die metabolische Transformation (Biotransformation) von Xenobiotika verantwortlich. In diesem Prozess spielt das Enzym Cytochrom P450 (CYP450) eine wichtige Rolle. Die CYP3A Subfamilie ist am stärksten in der Leber und im Dünndarm vertreten (Thummel, Wilkinson 1998). Morphologisch besitzen isolierte Hepatozyten eine polygonale Form mit einem oder mehreren runden Zellkernen (Schulze-Bergkamen et al. 2003). In der normalen Leber weisen Hepatozyten eine geringe Proliferationsrate auf. Wird jedoch ein Teil der Leber, z. B. durch eine Schädigung oder Resektion entfernt, beginnen sich die Hepatozyten zu teilen bis die Masse, und somit die Funktion des Organs wieder hergestellt ist (Michalopoulos, DeFrances 1997).

### 1.2.2 Nicht-parenchymale Zellen der Leber

Die in der Leber enthaltenen NPC Zellpopulation umfasst ca. 15% KC, ca. 19% LSEC, ca. 5% HSC, und ca. 1% Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Leukozyten (Dendritische Zellen und Neutrophile) (Blouin et al. 1977, Wisse et al. 1976, Kmiec 2001, Racanelli, Rehmann 2006). Im

Folgenden werden die Hauptcharakteristika und Funktionen von KC, LSEC und HSC dargestellt.

### **1.2.3 Kupffer Zellen**

Die KC wurden nach dem Wissenschaftler Karl Wilhelm von Kupffer benannt (1876) und stellen die leberresidente Makrophagen Population dar. Sie sind innerhalb der Lumen der Sinusoide lokalisiert und repräsentieren 80% aller gewebeständigen Makrophagen des Körpers (Bouwens et al. 1986, Kolios et al. 2006). Als Makrophagen besitzen KC eine hohe phagozytotische Aktivität. Aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb der Sinusoide können KC unter anderen Mikroorganismen, Endotoxine, degenerierte Zellen, Immunkomplexe und toxische Agentien aus dem Blut entfernen (Dini et al. 2002, Clavien et al. 1996, Kolios et al. 2006). Des Weiteren exprimieren KC unterschiedliche Oberflächenrezeptoren (z. B. Haupthistokompatibilitätskomplex, *major histo-compatibility complex*, MHC) und fungieren als antigenpräsentierende Zellen (Tiegs, Lohse 2010). KC werden durch unterschiedliche Stimuli wie z. B. der Erkennung pathogener Strukturen, aktiviert und sezernieren immunregulatorische Zytokine (z. B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6) und IL-10) (Knolle et al. 1995, Canbay et al. 2003). Darüber hinaus werden Prozesse wie der Leberentzündung, der Hepatotoxizität und der Leberschädigung durch Makrophagen reguliert (Roberts et al. 2007). Morphologisch weisen KC eine irregulärere Zellform mit einer gestreckten oder ovalen Form sowie einem bohnenförmigen Zellkern auf (Kmiec 2001, Smedsrod et al. 1994).

### **1.2.4 Lebersinusoidale Endothelzellen**

Die LSEC wurden durch den Wissenschaftler Eddie Wisse als eigenständigen Zelltyp innerhalb der Leber beschrieben (Wisse 1972). Die Zellen bilden die diskontinuierliche Endothel der Lebersinusoide. Hierbei handelt es sich um eine fenestrierte Auskleidung der Gefäße, die durch das Fehlen einer Membran innerhalb der Fenestrae sowie das Fehlen einer Basalmembran, die die Gefäße umgibt, charakterisiert ist (Wisse 1970, Wisse et al. 1985, Smedsrod et al. 1994). Die

Fenestrae filtern gelöste Substanzen und Partikel, die zwischen dem sinusoidalen Lumen und dem Dissé-Raum ausgetauscht werden (Braet, Wisse 2002). Darüber hinaus stellen die LSEC eine poröse Barriere dar, die zum einen die Sauerstoffversorgung der Hepatozyten erleichtert und zum anderen die Hepatozyten in Kontakt mit Makromolekülen (z. B. Lipoproteine) aus dem Blut bringt. Die LSEC sind durch die rezeptorvermittelte Endozytose in der Lage eine Vielzahl an Substanzen aus dem Blut zu entfernen (Smedsrod et al. 1997, Elvevold et al. 2004). Morphologisch wird dies durch die Anwesenheit von Endosomen innerhalb der Zellen deutlich (Smedsrod et al. 1994). Ferner entfernen LSEC Kolloide und gelöste Substanzen aus der Blutzirkulation und fungieren als sogenannter „*gate keeper*“ (Türhüter) für die Aktivierung von HSC (DeLeve 2011). LSEC exprimieren Oberflächenmoleküle wie MHC Klasse I und II, die für die Antigenpräsentation von Bedeutung sind (Thomson, Knolle 2010). Darüber hinaus tragen die LSEC durch die Erkennung von Pathogenen sowie durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen zur Immunregulation bei (Knolle, Limmer 2001). Morphologisch formen kultivierte LSEC eine Monoschicht mit einer Struktur, die an flaches Kopfsteinpflaster (*cobblestone*) erinnert (Daneker et al. 1998, Elvevold et al. 2008).

### 1.2.5 Hepatische Sternzellen

Die HSC wurden zum ersten Mal durch Karl von Kupffer in 1876 als ein sternförmiger Zelltyp beschrieben, der mit Goldchlorid reagiert (Kupffer 1876). Die Zellen besiedeln den subendothelialen Raum (Dissé-Raum) zwischen den LSEC und den Hepatozyten (Friedman 2008). In der gesunden Leber stellen Sternzellen die Hauptquelle für die Speicherung und den Transport von Vitamin A im Körper dar. Das Vitamin A wird im Zytosol der Zellen in Form von Lipidtröpfchen gespeichert (Wake 1971, Sato et al. 2003). In der erkrankten Leber synthetisieren HSC großen Mengen an extrazellulären Matrixproteinen (*extracellular matrix*, ECM), die zur Stabilisierung der Leberarchitektur dienen und somit den Prozess der Leberfibrogenese unterstützen (Moreira 2007, Tacke, Weiskirchen 2012). Darüber hinaus exprimieren HSC Moleküle für die Präsentation von Antigenen wie z. B. MHC Klasse I und II (Winau et al. 2007, Vinas et al. 2003). Morphologisch werden

## Einleitung

---

Sternzellen als spindelförmige Zellen mit langen Verzweigungen und einem ovalen Zellkern beschrieben (Friedman 2008).

### 1.3 Immunantwort der Leber

Das Immunsystem stellt das Abwehrsystem des Körpers zur Bekämpfung von Pathogenen wie Bakterien, Viren und Parasiten dar und wird in die angeborene und die adaptive (erlernte) Immunantwort unterteilt. Diese beiden Elemente unterscheiden sich in den Rezeptoren zur Erkennung körperfremder Strukturen und den Mechanismen der ausgelösten Immunantwort. Das angeborene Immunsystem dient als erster unspezifischer Abwehrmechanismus zur Erkennung und Beseitigung von Pathogenen, während das adaptive Immunsystem eine spezifische Abwehr mit immunologischer Erinnerung darstellt (Liaskou et al. 2012).

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen/Monozyten, insbesondere die leberresidenten KC, Mastzellen, Neutrophile und dendritische Zellen (Liaskou et al. 2012). Diese Zellen erkennen konservierte Strukturen von Mikroorganismen (Medzhitov, Janeway 2000), sogenannte Pathogen assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), die für den Lebenszyklus der Pathogene essentiell sind (Kumar et al. 2011). Beispiele für PAMP sind bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycane, Flagellin, bakterielle Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA), doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) und Glukan. Diese Strukturen werden durch keimbahncodierte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRR) des angeborenen Immunsystems erkannt. Zu den PRR zählen unter anderem Toll-like Rezeptoren (TLR), *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I)-like Rezeptoren (RLR), *nucleotid oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren (NLR) und DNA Rezeptoren (Racanelli, Rehermann 2006). Nach der Erkennung von pathogenen Strukturen werden komplexe Signalwege aktiviert, wodurch eine rapide Immunantwort des Wirts ausgelöst wird. Unter anderen produzieren die aktivierten Immunzellen inflammatorische Zytokine, Chemokine, Akute-Phase-Proteine und Proteine des Komplementsystems. Darüber hinaus werden Antigene von den Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose oder durch Phagozytose aufgenommen und durch Oberflächenrezeptoren auf der Membran präsentiert. Die Zytokinproduktion und die Antigenpräsentation aktivieren Zellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-



Lymphozyten), wodurch letztlich die Beseitigung des Pathogens sowie der infizierten Zellen oder Toleranzmechanismen ausgelöst werden (Knolle, Gerken 2000).

### 1.3.1.1 Toll-*like* Rezeptoren

Die TLR sind evolutionär konservierte Rezeptoren, die durch ihre Homologie zu dem Toll Rezeptor in *Drosophila melanogaster* benannt sind. Strukturell sind die TLR Typ I Transmembranrezeptoren und weisen eine leucinreiche extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Toll/Interleukin (IL)-1 (TIR) Domäne auf. TLR werden von Immunzellen wie Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, B-Zellen und NK-Zellen gebildet und spielen als PRR eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Im humanen System sind bisher zehn verschiedene TLR bekannt. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in der Membran von Endosomen bzw. Lysosomen lokalisiert sind (Kawasaki, Kawai 2014).

Die TLR können mit Korezeptoren assoziiert vorliegen oder bilden Homo- bzw. Heterodimere und erkennen körperfremde, molekulare Strukturen von Pathogenen wie Lipopeptide, Peptidoglycane oder Nukleinsäuren (Kumar et al. 2011). Die Ligandenbindung führt zur Aktivierung der TLR, wodurch Signalkaskaden und die Immunantwort ausgelöst werden (Takeda, Akira 2005). TLR2 bildet Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 und erkennt insbesondere Lipopolyproteine (Jin et al. 2007). TLR4 bildet Homodimere und erkennt vor allem Lipopolysaccharide (LPS), welches eine Zellwandkomponente von gramnegativen Bakterien darstellt (Hemmi et al. 2000). An der Erkennung von LPS sind weitere Moleküle beteiligt. LPS bindet zunächst an das LPS bindende Protein (*LPS-binding protein*, LBP), woraufhin dieser Komplex mit dem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten Molekül CD14 assoziiert. CD14 wird vor allem in Monozyten bzw. Makrophagen und Neutrophilen gebildet. Das Molekül MD-2 ist ein weiterer wichtiger Faktor für die LPS induzierte Signalweiterleitung (Jiang et al. 2000, Correia et al. 2001). Dieses Molekül ist für die Glykosylierung von TLR4 und somit für die Zelloberflächenexposition des Rezeptors verantwortlich (Nagai et al. 2002). TLR5 erkennt bakterielles Flagellin (Smith et al. 2004). Im Allgemeinen erkennen die endosomal exprimierten Rezeptoren virale

Komponenten. TLR3 erkennt doppelsträngige RNA, ein Zwischenprodukt, das während der Replikation der meisten Viren gebildet wird (Alexopoulou et al. 2001). Im Gegensatz dazu erkennen TLR7 und TLR8 einzelsträngige (*single-stranded*) RNA (ssRNA) (Lund et al. 2004, Heil et al. 2004). TLR9 erkennt unmethylierte CpG enthaltende DNA (Hemmi et al. 2000). Der humane TLR10 interagiert mit TLR2 und erkennt *Listeria monocytogenes* (grampositive Bakterien) sowie den Influenza A Virus (Guan et al. 2010, Regan et al. 2013, Lee et al. 2014). Die TLR, dessen Liganden und deren Ursprung sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1. Toll-*like* Rezeptoren und ihre Liganden**

TLR	Ligand	Liganden Ursprung
TLR1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triacyl-Lipopeptide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bakterien, Mykobakterien</li> </ul>
TLR2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptidoglycan</li> <li>• Lipopeptide</li> <li>• Lipoteichonsäure</li> <li>• Lipoarabinomannan</li> <li>• Glykosylphosphatidylinositol Anker</li> <li>• Phenol lösliche Moduline</li> <li>• Zymosan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grampositive Bakterien</li> <li>• Unterschiedliche Pathogene</li> <li>• Grampositive Bakterien</li> <li>• Mykobakterien</li> <li>• Parasiten</li> <li>• Bakterien</li> <li>• Pilze</li> </ul>
TLR3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dsRNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Viren</li> </ul>
TLR4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LPS</li> <li>• Taxol</li> <li>• Endogene Liganden (Hitzeschockproteine, Fibrinogen, Hyaluronsäure)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gramnegative Bakterien</li> <li>• Pflanzen</li> <li>• Wirt</li> </ul>
TLR5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flagellin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bakterien</li> </ul>
TLR6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diacyl-Lipopeptide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bakterien</li> </ul>
TLR7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ssRNA</li> <li>• Imidazoquinoline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA Virus</li> <li>• Synthetisch</li> </ul>
TLR8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ssRNA</li> <li>• Imidazoquinoline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA Virus</li> <li>• Synthetisch</li> </ul>
TLR9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CpG DNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bakterien</li> <li>• Viren</li> </ul>
TLR10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Listeria monocytogenes</i></li> <li>• Influenza A Virus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grampositive Bakterien</li> <li>• RNA Virus</li> </ul>

(Akira et al. 2006, Takeda et al. 2003, Regan et al. 2013, Lee et al. 2014)

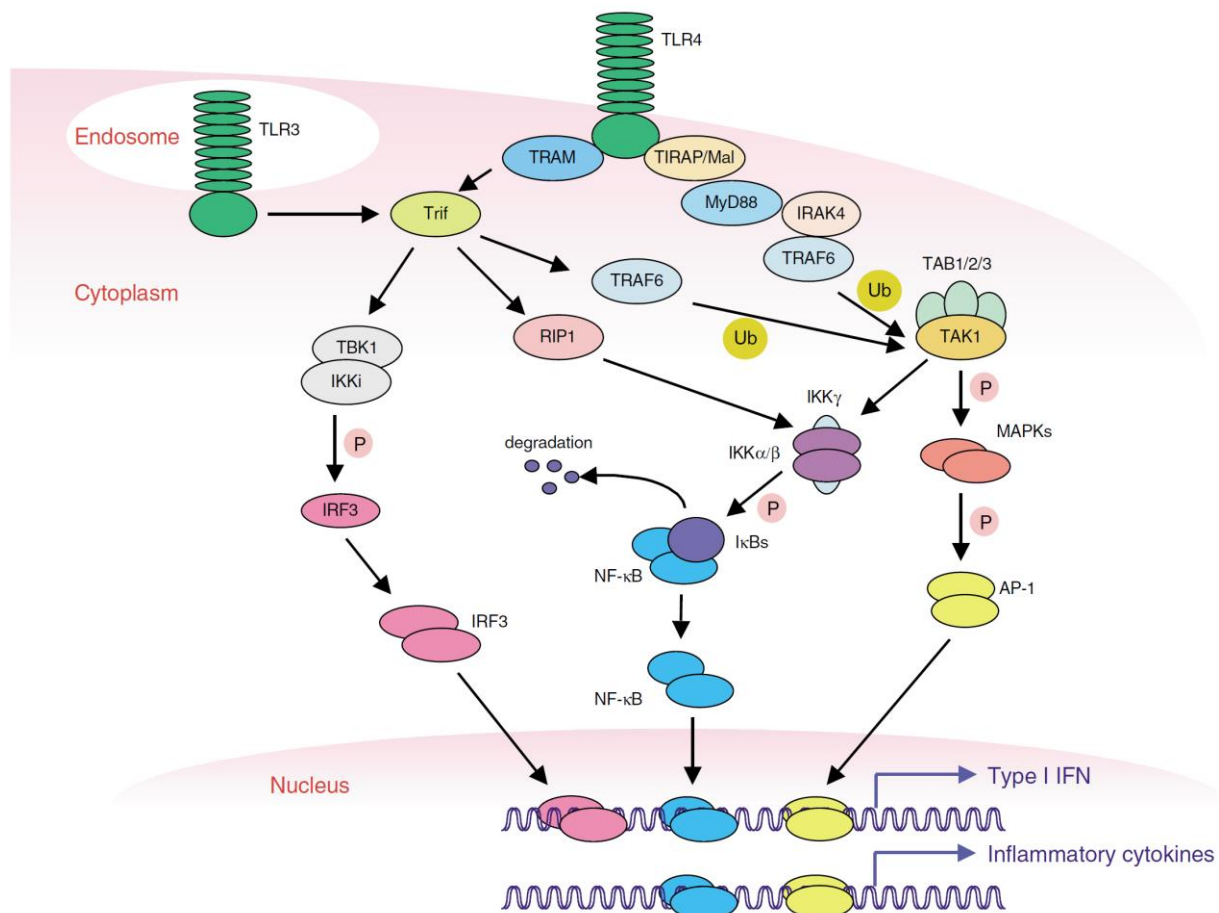
Nach der Erkennung der Liganden kommt es zur Aktivierung von Signalkaskaden. Hierunter fallen unter anderen mitogenaktivierten Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK) sowie Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*)

und IRF (*interferon regulatory factor*). Diese Prozesse führen letztlich zur Expression und Produktion von Zytokinen, Mediatoren der inflammatorischen bzw. antiviralen Immunantwort.

Die TLR vermittelte Signalweiterleitung erfolgt entweder über den MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) abhängigen oder den MyD88 unabhängigen Signalweg. MyD88 ist ein Adaptermolekül mit einer N-terminalen Todesdomäne (*death domain*) und einer C-terminalen TIR Domäne (Takeda, Akira 2005). Mit Ausnahme von TLR3 nutzen alle TLR den MyD88 abhängigen Signalweg (Abbildung 2). In diesem Signalweg kommt es nach der Aktivierung durch den Liganden zu einer Interaktion der TIR Domänen des TLR sowie MyD88, wodurch es zur Wechselwirkung beider Moleküle kommt. Daraufhin interagieren die Todesdomänen von MyD88 und IRAK-4 (IL-1R assoziierten Kinase-4), wodurch IRAK-4 zum TLR rekrutiert und phosphoryliert wird. IRAK-4 phosphoryliert daraufhin IRAK-1, wodurch letztlich TRAF6 (*tumour-necrosis-factor receptor-associated factor 6*) aktiviert wird. Anschließend werden über die Aktivierung des TAK (TGF- $\beta$  aktivierter Kinase)/TAB (TAK1 bindendes Protein) Komplexes, bestehend aus TAK1, TAB1, TAB2 und TAB3, zwei verschiedene Signalwege ausgelöst (Brown et al. 2011). Zum einen kommt es zur Aktivierung von MAPK, welche wiederum die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator Protein-1) einleiten. Zum anderen aktiviert der TAK/TAB Komplex den IKK (*inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase*) Komplex. Dieser Komplex wird aus den Proteinen IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und NEMO (*nuclear factor-kappa B essential modulator*, IKK- $\gamma$ ) gebildet. Der aktivierte IKK Komplex induziert die Phosphorylierung und Degradation des inhibitorischen Proteins I $\kappa$ B- $\alpha$ , was zu einer Freisetzung und nuklearen Translokation von NF- $\kappa$ B führt. Im Nukleus initiieren AP-1 und NF- $\kappa$ B die Transkription inflammatorischer Zytokine wie z. B. TNF- $\alpha$  (Kawai, Akira 2006).

Der MyD88 unabhängige bzw. TRIF abhängige Signalweg wird ausschließlich von TLR3 und TLR4 genutzt. Zusätzlich benötigt TLR4 das Molekül TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) für die Aktivierung des Adaptermoleküls TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ). Nach erfolgter Aktivierung assoziiert TRIF mit TRAF6. Die TRIF vermittelte Aktivierung von TRAF6 und RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) führt zur NF- $\kappa$ B Aktivierung. Darüber hinaus kommt es zur Aktivierung von

TBK1 (*TRAF family member associated NF- $\kappa$ B activator (TANK)-binding kinase 1*) und IKKi, wodurch es zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 kommt. Aktivierter IRF3 transloziert in den Nucleus und induziert die Transkription von Interferonen (*interferons*, IFN) wie z. B. IFN- $\beta$  und IFN- $\lambda$  (Takeda, Akira 2004, Brown et al. 2011, Broering et al. 2014).



**Abbildung 2. TLR vermittelte Signalweiterleitung.** TLR4 ist in der Zellmembran lokalisiert. Die Erkennung des Liganden induziert die Aktivierung des Rezeptors und führt zur Signalweiterleitung über den MyD88 abhängigen Signalweg. Die Signalkaskade verläuft über die Aktivierung von MyD88, IRAK1, IRAK4 und TRAF6. Die Aktivierung von TRAF6 führt zur Aktivierung des TAK/TAB Komplexes (TAK1/TAB1/TAB2 und TAB3). Der Komplex führt zur Aktivierung von MAPK und NF- $\kappa$ B. Beide Signalwege initiieren die Transkription von inflammatorischen Zytokinen. Darüber hinaus aktiviert TLR4 den MyD88 unabhängigen, TRIF abhängigen Signalweg. In diesem werden TRAM und TRIF aktiviert. Über den TBK1/IKKi Komplex wird der Transkriptionsfaktors IRF3 aktiviert, wodurch die Transkription von Interferonen (z. B. IFN- $\beta$ ) initiiert wird. Der TLR3 ist am Endosom lokalisiert. Dieser aktiviert ausschließlich den TRIF abhängigen Signalweg (Kawai, Akira 2006).

### 1.3.1.2 Interferone

Interferone wurden 1957 (Isaacs, Lindenmann 1987) entdeckt und sind Zytokine mit antiviraler Aktivität und immunmodulatorischen Eigenschaften. Interferone werden von virusinfizierten Zellen unter anderem nach der Aktivierung von PRR wie z. B. TLR und RIG-I synthetisiert und sezerniert (Takaoka, Yanai 2006). Die Interferone werden in drei verschiedene Typen unterteilt. Typ I Interferone umfassen die Vertreter IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\epsilon$ , - $\kappa$  und - $\omega$ , - $\delta$  und - $\tau$ . Im humanen System sind jedoch IFN- $\delta$  und IFN- $\tau$  nicht nachweisbar (Pestka et al. 2004). Alle Typ I Interferone binden an den IFN alpha/beta Rezeptor, der sich aus den Untereinheiten IFNAR1 und dem IFNAR2 zusammensetzt (de Weerd et al. 2007). IFN- $\gamma$  ist das einzige Typ II Interferon und bindet an den IFN- $\gamma$  Rezeptor, der aus den Untereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 besteht. Das Zytokin wird primär in aktivierten NK-Zellen und T-Zellen gebildet (Takaoka, Yanai 2006). Die Typ III Interferone, auch Lambda Interferone (IFN- $\lambda$ ) genannt, umfassen die Vertreter IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) und IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B). Ein neuer Vertreter dieser Gruppe ist das IFN- $\lambda$ 4 (Prokunina-Olsson et al. 2013). Alle IFN- $\lambda$  binden an denselben Rezeptorkomplex, der sich aus der Interferon-lambda Rezeptor 1 (IFNLR1) Untereinheit und der Interleukin-10 Rezeptor  $\beta$  Untereinheit (IL-10R2) zusammensetzt (Kotenko et al. 2003, Hamming et al. 2013). Typ I, Typ II und Typ III Interferone wirken nach der Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren über den Januskinasen (JAK)/ *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Signalweg. Infolge dessen werden Gene induziert, die ein *interferon stimulated response element* (ISRE) enthalten bzw. im Fall von IFN- $\gamma$  eine Interferon aktivierte Sequenz im Promotor aufweisen (Pestka et al. 2004). Daraufhin wird die Transkription von IFN sensitiven Genen (ISG) induziert. Einige der ISG besitzen eine direkte antivirale Aktivität, indem sie in den viralen Replikationszyklus eingreifen. Beispiele hierfür sind unter anderem die dsRNA abhängige Proteinkinase R (PKR) und die 2'-, 5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS). Die PKR inhibiert unter anderem die Hepatitis C Virus Replikation auf Transkriptionsebene (Kang et al. 2009). Die 2'-, 5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS) erkennt dsRNA und aktiviert die latente Ribonuklease L (RNase L), die wiederum die virale RNA spaltet (Han, Barton 2002).

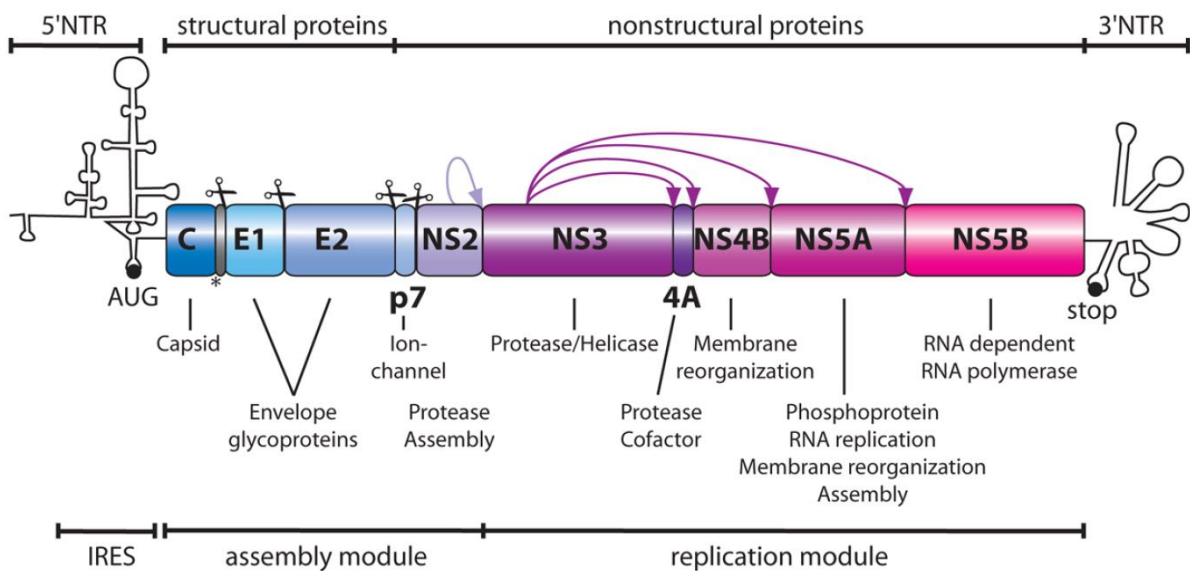
## 1.4 Hepatitis C Virus Infektion

Hepatitis C ist eine Lebererkrankung, die durch die Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) verursacht wird. Das HCV wurde erstmals 1989 identifiziert (Moradpour et al. 2007). Weltweit sind 130-150 Millionen Menschen chronisch mit dem RNA Virus infiziert. Im Verlauf der chronischen Infektion kann es zur Entstehung von Leberfibrose, Leberzirrhose oder zum hepatozellulärem Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) kommen. Jährlich sterben 350.000-500.000 infizierte Personen an der chronischen Erkrankung, wodurch diese ein globales Gesundheitsproblem darstellt (World Health Organization April 2014). Bisher existiert keine Impfung gegen das Virus. Die häufigsten Übertragungswege des HCV sind kontaminierte Bluttransfusionen und die gemeinsame Nutzung von kontaminiertem Injektionsbesteck (Drogenmissbrauch). Darüber hinaus ist die Infektion mit dem Virus durch Nadelstichverletzungen bei Krankenhauspersonal möglich. Die sexuelle Übertragung sowie die Übertragung über die Muttermilch ist sehr selten, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Die Inkubationszeit des HCV liegt bei zwei Wochen bis sechs Monaten. Des Weiteren wird bei HCV Patienten eine erhöhte Konzentration der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) festgestellt (Hoofnagle 2002). Mit Hilfe sensitiver Nachweisverfahren kann die HCV RNA innerhalb von zwei Wochen nach der Infektion bestimmt werden. Im Gegensatz dazu können HCV Antikörper acht bis zwölf Wochen nach der Infektion nachgewiesen werden (Ghany et al. 2009). Die chronische HCV Infektion verläuft häufig asymptomatisch und wird erst mit dem zunehmenden Fibrosegrad erkannt (Hoofnagle 2002, Ghany et al. 2009).

Das HCV gehört zu der Familie der *Flaviviridae* und sein Genom besteht aus einer einzelsträngigen Ribonukleinsäure mit positiver Polarität (+). Das HCV RNA Genom ist 9,6kb groß und codiert für ein mehr als 3.000 Aminosäuren großes Polyprotein (Abbildung 3) (Moradpour et al. 2007). Das HCV Genom enthält einen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der von nicht translatierten Regionen (NTR) am 5'- und am 3'-Ende flankiert wird. Die 5'-NTR enthält eine interne Ribosomenbindestelle (*internal ribosome entry site*, IRES) (Kim, Chang 2013). Das HCV Polyprotein wird durch die zelluläre und virale Prozessierung zu zehn Proteinen

## Einleitung

zerlegt. Die zehn Proteine umfassen drei Strukturproteine (Core Protein, die Hüllproteine E1 und E2) und sieben Nichtstrukturproteine (NS; p7 Ionenkanal, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Lohmann, Bartenschlager 2014). Eine Auflistung der Virusproteine und dessen Funktion im HCV Replikationszyklus sind in Tabelle 2 aufgeführt.



**Abbildung 3. Genetische Organisation des HCV.** Das HCV Genom wird von den NTR am 5'- und am 3'-Ende flankiert. Die 5'-NTR enthält eine Ribosomenbindestelle (IRES). Der ORF codiert für ein Polyprotein, das aus den Strukturproteinen (Core (C), E1 und E2) und den Nichtstrukturproteinen (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) zusammengesetzt ist. Die Spaltung des Polyproteins erfolgt durch zelluläre (Scheren) und virale Proteasen (Pfeile) (Lohmann, Bartenschlager 2014).

**Tabelle 2. Virale Proteine und ihre Funktionen im HCV Replikationszyklus**

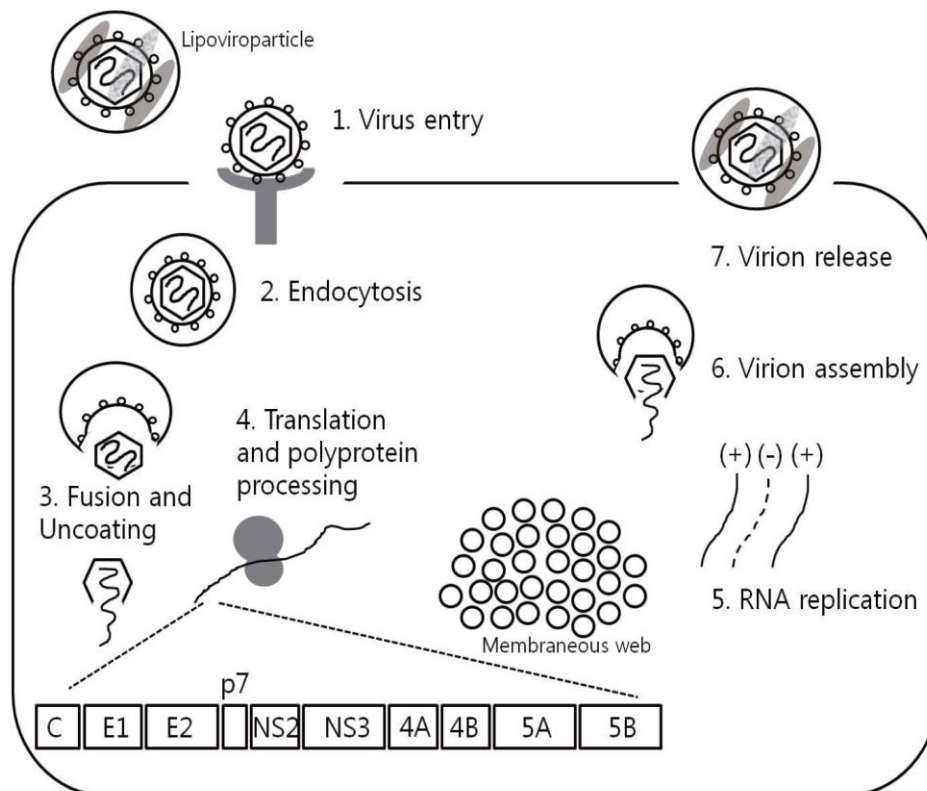
Protein	Molekulare Masse	Funktion im HCV Replikationszyklus
Core	21kDa	Nukleocapsid, Bindung viraler RNA, Immunmodulation
E1	31-35kDa	Glykosyliertes Hüllprotein, Umhüllung viraler Partikel, Bindung an Rezeptoren der Zielzelle
E2	70kDa	Glykosyliertes Hüllprotein, Umhüllung viraler Partikel, Bindung an Rezeptoren der Zielzelle
p7	7kDa	Ionenkanal, viraler Zusammenbau, Freisetzung der Viruspartikel
NS2	21kDa	Protease, viraler Zusammenbau, Spaltung zwischen NS2 und NS3
NS3	69kDa	N-terminale Serinprotease Domäne, C-terminale HCV Prozessierung (Spaltung zwischen NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A, NS5A/5B), NTPase/Helikase Domäne, Beteiligung an HCV RNA Replikation
NS4A	6kDa	Cofaktor für NS3 Protease, Komplexbildung mit der NS3 Protease
NS4B	27kDa	Cofaktor für den Replikationskomplex, induziert Membranänderungen
NS5A	56-58kDa	Metalloprotein, Bindung der viralen RNA, Membranänderungen
NS5B	68kDa	RNA abhängige RNA Polymerase ( <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> , RdRp)

(Dubuisson 2007, Kim, Chang 2013)

Der HCV Replikationszyklus beginnt mit der Infektion der Wirtszelle (Hepatozyt) durch die HCV Partikel (Abbildung 4). Das Innere der Viruspartikel besteht aus dem HCV Genom und dem Core Protein. Diese sind von einer Lipidmembran umgeben, in der die glykosylierten Hüllproteinen E1 und E2 verankert sind (Ploss, Dubuisson 2012). Die Viruspartikel binden an die zellulären Rezeptoren (Moradpour et al. 2007) der Wirtszelle. Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem CD81, Claudin-1, Occludin und der *scavenger receptor class B type I* (SR-BI) (Kim, Chang 2013). Durch die rezeptorvermittelte Endozytose werden die Viruspartikel in die Wirtszelle aufgenommen und das HCV Genom wird in das Zytoplasma freigesetzt (Kim, Chang 2013). Daraufhin wird die IRES Sequenz von den Ribosomen, die am rauhen endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle lokalisiert sind, erkannt. Anschließend findet die Synthese des HCV Polyproteins sowie dessen Prozessierung durch zelluläre und virale Proteasen statt. Die Spaltprodukte des Polyproteins verbleiben am rauhen endoplasmatischen Retikulum. Die viralen Proteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B induzieren eine komplexe Membranumformung, die zur Bildung eines Netzwerk an Vesikeln führt, das als *membranous web* bezeichnet wird



(Lohmann, Bartenschlager 2014). Das *membranous web* besteht aus Doppelmembran Vesikeln, die die HCV Nichtstrukturproteine, die HCV RNA, Membranen des endoplasmatischen Retikulums und Lipidtröpfchen enthalten (Kim, Chang 2013). Innerhalb dieser Vesikel findet die virale RNA Replikation statt, in der das RNA Genom positiver Polarität (+) als Vorlage der RNA abhängigen RNA Polymerase (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp) NS5B dient. Dabei entsteht ein RNA Intermediat mit negativer Polarität (-), was wiederum als Vorlage für (+) RNA dient (Kim, Chang 2013). Der Zusammenbau und die Freisetzung der Viruspartikel sind mit dem Lipidmetabolismus verknüpft. Die neu synthetisierten Viruspartikel enthalten Apolipoproteine (z. B. Apolipoprotein E) und werden auf dem sekretorischen Weg aus der Wirtszelle freigesetzt (Lohmann, Bartenschlager 2014).



**Abbildung 4. Hepatitis C Virus Replikationszyklus.** (1.) Die HCV Partikel (Core, HCV RNA, Lipidmembran, E1 und E2) binden an Rezeptoren der Wirtszelle (Hepatozyt) und werden (2.) durch die rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. (3.) Das HCV Genom wird in das Zytoplasma freigesetzt. (4.) Anschließend erfolgt die IRES vermittelte Translation durch die Ribosomen sowie die Prozessierung des Polyproteins durch zelluläre und virale Proteasen. (5.) Daraufhin erfolgt die Bildung des *membranous web* mit anschließender RNA Replikation. (6.) Danach findet die Verpackung und der Zusammenbau der Viruspartikel statt. (7.) Im Anschluss werden die Viruspartikel außerhalb der Zelle freigesetzt (Kim, Chang 2013).

Aufgrund der hohen replikativen Aktivität des Virus und der fehlenden *proof-reading* Funktion der viralen RdRP kommt es zu einer hohen genetischen Variabilität des HCV (Moradpour et al. 2007). Insgesamt sind sechs HCV Hauptgenotypen und weitere Subtypen bekannt. Der HCV Genotyp ist ein entscheidender Faktor sowohl für das wahrscheinliche Ansprechen auf eine Therapie als auch auf für die Dauer der Behandlung. Das Ziel der antiviralen Therapie ist eine dauerhafte Eliminierung des HCV. Diese ist erreicht, wenn die HCV RNA über eine Dauer von sechs Monaten nach Beendigung der Behandlung negativ bleibt (*sustained virological response*, SVR). Die anfängliche Therapie des HCV lag in einer IFN- $\alpha$  Monotherapie mit einer SVR Rate von 5-20%. Diese Therapie wurde durch die Kombination von IFN- $\alpha$  mit Ribavirin (RBV) als Standardtherapie abgelöst und verbesserte das Ansprechen auf 40-50%. Die Einführung einer Polyethylenglykol modifizierten IFN- $\alpha$  Variante (PEG-IFN) führte insbesondere bei Genotyp 1 Patienten zu einem Anstieg der SVR Raten. Auf Basis des wachsende Verständnisses über den Replikationszyklus und der Struktur des HCV wurde eine neue Klasse an Wirkstoffen entwickelt, die direkt auf das HCV wirken (*direct-acting antiviral drugs*, DAA). Die Angriffspunkte dieser Wirkstoffe sind die NS3/4A Protease, die NS5B Polymerase und der NS5A Replikationskomplex (Lange et al. 2014). Im Jahr 2011 wurden Boceprevir und Telaprevir als erste Generation der DAA in den USA und Europa zugelassen (Poordad et al. 2011, Jacobson et al. 2011). Hierbei handelt es sich um NS3/4 Protease Inhibitoren, die jedoch eine Reihe an Nebenwirkungen zur Folge hatten. Ein neuer vielversprechender Vertreter der DAA ist der NS5B Inhibitor Sofosbuvir. Unter Berücksichtigung des Stadiums der Lebererkrankung, des HCV Genotyps, der Präsenz von HCV Resistenzvarianten und der Vortherapie kann Sofosbuvir als Kombinationstherapie mit PEG-IFN, RBV und/oder dem NS3/4 Protease Inhibitor Simeprevir zur Therapie eingesetzt werden. Darüber hinaus ermöglicht die Zulassung weiterer Medikamente wie z. B. Faldaprevir (NS3 Protease Inhibitor), Daclatasvir (NS5A Inhibitor), Ledipasvir (NS5A Inhibitor) ein breiteres Spektrum an IFN-freien Kombinationstherapien für HCV Patienten (Sarrazin et al. 2014).

## 1.5 Zielsetzung

Die chronische Infektion mit dem HCV ist eine Hauptursache für die Entstehung der Leberfibrose, der Leberzirrhose und dem HCC. Die Parenchymzellen (Hepatozyten) und die NPC stellen die erste Barriere für Pathogene, wie das HCV, dar. Die TLR spielen als wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems eine entscheidende Rolle bei der Verteidigung gegen das HCV. Die Rolle der NPC, als Teil des angeborenen Immunsystems, bei der Abwehr hepatotroper Viren, sowie ihre Bedeutung für die Pathomechanismen während der chronischen Infektion sind nur unvollständig geklärt.

Aus diesem Grund soll im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die simultane Isolation primärer Hepatozyten, KC, LSEC und HSC aus humanem Lebergewebe optimiert werden. Die Isolationsmethode soll zum einen zu einer angemessenen Zellausbeute führen, um weitere Experimente durchführen zu können. Zum anderen sollen mit dieser Methode Zellen mit hoher Reinheit isoliert werden, um zelltypspezifische Eigenschaften der Zellpopulationen charakterisieren zu können.

Die NPC sollen im zweiten Teil dieser Arbeit zur Bearbeitung immunregulatorischer Fragestellungen verwendet werden. Zunächst sollen die kultivierten KC, LSEC und HSC im Hinblick auf die Funktionalität des TLR Systems untersucht werden. Hierbei gilt es zu klären, welche Rezeptoren von den unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert werden und ob es zu einer funktionellen Signalweiterleitung nach der Aktivierung der Rezeptoren durch die jeweiligen Liganden kommt.

Im dritten Teil dieser Arbeit soll das TLR vermittelte antivirale Potential von kultivierten NPC mit Hilfe des HCV Zellkulturmodells Con1 untersucht werden. Hierbei soll anhand von Neutralisationsexperimenten Mediatoren identifiziert werden, die den antiviralen Effekt vermitteln.

Abschließend soll die TLR Sensitivität der kultivierten KC, LSEC und HSC verglichen werden, die aus Lebern HCV infizierter Patienten und nicht infizierter Patienten isoliert wurden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 3. Geräteliste

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysewaage ABT 120-5DM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Autoklav VX-150	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Biologische Sicherheitswerkbank Hera SAFE 2020	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
BioPhotometer BioSpectrometer basic	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator HERAEUS® BB 15	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Flockeneisbereiter Scotsman, AF 100	Kälte-Berlin, Berlin, Deutschland
Fusion Imager FX advanced	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Heiz/Kühlblock CH-100	BioSan, Riga, Lettland
MACS MultiStand	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroplatten-Reader FLUOstar Omega	BMG LABTECH GmbH, Ortenburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 100M	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop EVOS™ XL Core	Advanced Microscopy Group (AMG), Bothell, WA, USA
Mikroskop Primo Vert	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop TCS SP8	Leica, Mannheim, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Multipipette® M4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipipette® Stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Navios Durchflusszytometer	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Peristaltikpumpe Masterflex® L/S® Easy-Load® II	Cole Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA
pH-Meter HI 2215	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA
Pipettierhilfe, elektrisch	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
QuadroMACS™ Separator	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

## Material und Methoden

Real-Time PCR Detektionssystem CFX96	Bio-Rad, München, Deutschland
Reinigungs- und Desinfektionsautomat G7883	Miele Professional, Gütersloh, Deutschland
Reinstwasseraufbereitungssystem Milli-Q	MERCK Millipore, Darmstadt, Deutschland
Schüttler Tiramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co KG; Schwabach, Deutschland
Stromquelle PowerPac 300 und PowerPac HD	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermo Inkubationsmischer Thriller	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermoblock Dri-Block DB-2A	Techne, Stone, Staffordshire, UK
Trans-Blot <sup>®</sup> Turbo <sup>™</sup> Blot System	Bio-Rad, München, Deutschland
Vortexer RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Waage EW	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wärmethermostat U3	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Wasserbad GLF und Julabo U3 1003	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge 5810 R, 5424, 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge HERAEUS <sup>®</sup> Megafuge 40R	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4. Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
BD Microlance <sup>™</sup> Einwegkanülen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Collagen I beschichtete Kulturschalen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Collagen I beschichtete Platten (6-Well, 24-Well, 96-Well)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Combitips advanced <sup>®</sup> Biopure (0,5ml, 5ml, 10ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläschen	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Einwegskalpelle	Servoprax <sup>®</sup> GmbH, Wesel, Deutschland
Einwegsspritze (10ml)	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland
Feindosierungsspritzen, Omnifix F (1ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Filterpipettenspitzen (0,1–10µl, 10–100µl, 100–1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Filterpipettenspitzen (200µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Kryogefäße (2ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
MACS Pre-Separations Filter	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

## Material und Methoden

MACS Separation LS Columns	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Metallsieb (230µm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Microseal `B` seal Verschlussfolie	Bio-Rad, München, Deutschland
MiniProtean TGX™ Precast Gel 4-15%, 12-Well	Bio-Rad, München, Deutschland
Parafilm™	American National Can, Greenwich, CT, USA
PCR Platten Hard-Shell® 96-Well	Bio-Rad, München, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PharmAssure Membranspritzenfilter (0,45µm)	PallMedical, Dreieich, Deutschland
Polystyren Zentrifugationstube (15ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
RNase ZapWipes	Ambion/Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml, 5ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sealing Film	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Einwegpipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs	Bio-Rad, München, Deutschland
Twin.tec Real-Time PCR Platte 96	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuum Filtrationssystem (500ml)	Tpp, Trasadingen, Schweiz
Vasofix® Safety G22 Sicherheitsvenenverweilkatheter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zellkultur Flaschen (75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur Objekträger, 4-Well	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur Platten, 24-Well, 96-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur Platten, 6-Well	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten, Flachboden, 96-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten, U-Boden, 96-Well	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
BRANDplates®, 96-Well Luminometerplatte, pureGrade™	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien und Substanzen

Tabelle 5. Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl-Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Collagenase Typ IV aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Grenzach, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser	Ambion/Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	MERCK, KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMEM ( <i>high glucose</i> )	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt, Deutschland
DMEM/Ham's F-12	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Endothelial Cell Growth Supplement	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Ethanol (99,9% p. a.)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
FBS für SteCM	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA
FcR Blocking Reagent	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	PAA, Pasching, Österreich
Fixierlösung für Durchflusszytometrie	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Fluoromount-G™	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
G418-BC	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
GBSS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Genatamycin	PAA, Pasching, Österreich
Glycin	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Pierce/ Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
HBSS	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt, Deutschland

## Material und Methoden

Histoacryl® Gewebekleber	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
MACS Separation Buffer	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Methanol (99,9%)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nagellack, Maybelline, Express Finish	L'ORÉALBio-Rad, Düsseldorf, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	GERBU Biotechnik, Heidelberg, Deutschland
Non-fat dried milk powder (Magermilchpulver)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P-40	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NuPAGE® LDS Probenpuffer	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
OptiPrep™ (Iodixanol)	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
Paraformaldehyd Lösung	Carl-Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x), ohne MgCl <sub>2</sub> , ohne CaCl <sub>2</sub> )	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin Lösung für SteCM	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA
QIAzol™ Lyse Reagenz	Qiagen, Hilden, Deutschland
Salzsäure (HCl), 37%	Carl-Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Stellate Cell Growth Supplement (SteCGS) für SteCM	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA
Stellate Cell Medium (SteCM)	ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA
Trichloressigsäure (10% p.a.)	Carl-Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
TRIS/Glycin/SDS Laufpuffer	Bio-Rad, München, Deutschland
TRIS-HCL	Carl-Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland



### 2.1.4 Kommerzielle Kits

**Tabelle 6. Liste der verwendeten kommerziellen Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
FastLane Cell SYBR® Green Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Human IFN Alpha ELISA Kit	Pbl Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ
Human IFN Beta ELISA Kit	Pbl Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ
Human IL-10 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems Europe, Abingdon, UK
Human IL-28A ELISA (IFN-λ2/3)	RayBiotech, Norcross, GA, USA
Human IL-29 (IFN-λ1) Platinum ELISA	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Human IL-6 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems Europe, Abingdon, UK
Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit	R&D Systems Europe, Abingdon, UK
P450-Glo CYP2C9 Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
P450-Glo CYP3A4 Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

## 2.1.5 Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe und Seren

### 2.1.5.1 Primärantikörper

Tabelle 7. Primärantikörper

Spezifität	Ursprung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
NF-κB	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling
P-NF-κB	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling
AKT	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
P-AKT	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
JNK	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
P-JNK	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
p38	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
P-p38	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
c-Jun	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling
P-c-Jun	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling
Erk1/2	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
P-Erk1/2	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
IRF3	Kaninchen	1:500	Abcam, Cambridge, UK
P-IRF3	Kaninchen	1:500	Abcam, Cambridge, UK
β-Aktin	Maus	1:20.000	Sigma-Aldrich
GAPDH	Kaninchen	1:3.000	Cell Signaling
Albumin	Maus	1:500	R&D Systems
CYP3A4	Kaninchen	1:500	Acris
CYGB	Kaninchen	1:500	Thermo Scientific
α-SMA	Maus	1:700	Sigma-Aldrich

**Tabelle 8. Konjugierte Antikörper und Isotypenkontrollen**

Spezifität	Konjugat	Ursprung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Maus	PE	Ratte	1:500	eBioscience
CD68 (IgG2b)	APC	Maus	1:300	MiltenyiBiotec
IgG2b	APC	Maus	1:300	MiltenyiBiotec
CD146 (IgG1)	PE	Maus	1:200	MiltenyiBiotec
IgG1	PE	Maus	1:200	MiltenyiBiotec
$\alpha$ -SMA (IgG2a)	FITC	Maus	1:500	Sigma-Aldrich
IgG2a	FITC	Maus	1:500	Sigma-Aldrich

### 2.1.5.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 9. Sekundärantikörper**

Spezifität	Konjugat	Ursprung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Kaninchen	HPR	Ziege	1:3.000	Cell Signaling
Maus	HRP	Ziege	1:20.000	Thermo Scientific
Kaninchen	DyLight650	Esel	1:2.000	Thermo Scientific
Kaninchen	DyLight488	Esel	1:2.000	Thermo Scientific
Maus	DyLight594	Ziege	1:3.000	Thermo Scientific
Maus	PE	Ratte	1:500	eBioscience
CD68 (IgG2b)	APC	Maus	1:300	MiltenyiBiotec
IgG2b	APC	Maus	1:300	MiltenyiBiotec
CD146 (IgG1)	PE	Maus	1:200	MiltenyiBiotec
IgG1	PE	Maus	1:200	MiltenyiBiotec
$\alpha$ -SMA (IgG2a)	FITC	Maus	1:500	Sigma-Aldrich
IgG2a	FITC	Maus	1:500	Sigma-Aldrich

### 2.1.6 Fluoreszenzfarbstoffe

**Tabelle 10. Fluoreszenzfarbstoffe**

Farbstoff	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
DAPI	1:10.000	Invitrogen/Life technologies
Fixable Viability Dye eFluor® 780	1:5.000	eBioscience

**Tabelle 11. Fluoreszente Moleküle**

Moleküle	Hersteller
AcLDL-Alexa 488	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Latex beads, 1µm, amine-modified polystyrene, fluorescent yellow-green	Sigma-Aldrich

### 2.1.7 Neutralisierende Antikörper

**Tabelle 12. Neutralisierende Antikörper**

nAK	Spezifität	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
human IFN-α	monoclonal	20µg/ml	eBioscience
human IFN-β	monoclonal	140µg/ml	eBioscience
human IFN-λ1, -2, -3	monoclonal	20µg/ml	R&D Systems
human IFNAR2	monoclonal	7,5µg/ml	Pbl Assay Science
Human IL-10R2	polyclonal	4µg/ml	R&D Systems

### 2.1.8 Seren für Immunzytochemische Färbungen

**Tabelle 13. Seren**

Serum	Konzentration	Hersteller
Goat Serum	5%	Thermo Scientific
Donkey Serum	5%	Sigma-Aldrich
FBS	5%	PAA, Pasching

### 2.1.9 MicroBeads

**Tabelle 14. MicroBeads**

MicroBeads	Hersteller
CD14	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD146	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

## 2.1.10 Proteingrößenstandards

Tabelle 15. Proteingrößenstandards

Größenstandard	Hersteller
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen/Life technologies, Darmstadt, Deutschland
PageRuler	Thermo Scientific Fermentas™, St. Leon-Roth, Deutschland

## 2.1.11 Toll-*like* Rezeptor Liganden der Firma Invivogen

Tabelle 16. TLR Liganden

TLR	Ligand	Abkürzung	Eingesetzte Konzentration
TLR1/2	Palmitoyl-3-cysteine-serinelysine-4	PAM3CSK4	4µg/ml
TLR2	<i>Heat-killed Listeria monocytogenes</i>	HKLM	10 <sup>8</sup> Zellen/ml
TLR3	Polyinosine-polycytidylic acid	Poly I:C	50µg/ml
TLR4	Lipopolysaccharide von <i>Escherichia coli</i> 0111:B4 Stamm	LPS	30µg/ml
TLR5	Flagellin von <i>Salmonella typhimurium</i>	Flagellin	2µg/ml
TLR2/6	Synthetic lipoprotein from <i>Mycoplasma salivarium</i> , Pam2CGDPKHPKSF	FSL-1	1µg/ml
TLR7	Gardiquimod	Gdq	20µg/ml
TLR8	Einzelsträngige Ribonukleinsäure	ssRNA40	10µg/ml
TLR9	CpG Oligonukleotide	ODN2216	31,8µg/ml

## 2.1.12 Rekombinante Interferone

Tabelle 17. Rekombinante Interferone

Interferon	Firma	Eingesetzte Konzentration
IFN-αAD	Sigma	2U/ml
IFN-β1a	Sigma	2000U/ml
IFN-λ2	eBioscience	4,5ng/ml
IFN-λ3	eBioscience	1ng/ml

## 2.1.13 Hergestellte Puffer und Lösungen

### 2.1.13.1 Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen

#### BSA Blockierungslösung

5% BSA

in TBS-T

#### Gelelektrophorese Laufpuffer

10% TRIS/Glycin/SDS Laufpuffer

in *aqua dest.*

#### Milch Blockierungslösung

5% Milchpulver

in TBS-T

#### Ponceau S Färbelösung

2% Ponceau S

In Trichloressigsäure

#### Probenpuffer

5%  $\beta$ -Mercaptoethanol

in NuPAGE<sup>®</sup> LDS Probenpuffer

#### RIPA Puffer (Stocklösung, sterilfiltriert)

50mM TRIS/HCl

150mM NaCl

0,5% Igepal (NP-40)

0,25% Dexychoic Acid

pH7,4

in *aqua dest.*

#### RIPA Puffer (Gebrauchslösung)

10ml RIPA Puffer Stocklösung

100 $\mu$ l Halt<sup>™</sup> Phosphatase Inhibitor Cocktail

1 Tablette Complete mini Protease Inhibitor

Cocktail

#### Stripping Puffer

200mM Glycin

3,5mM SDS

1% Tween 20

pH 2,2

in *aqua dest.*

TBS, 10x

907mM NaCl

100mM TRIS

pH7,4

in *aqua dest.*

TBS-T (Gebrauchslösung)

90,7mM NaCl

10mM TRIS

pH7,4

in *aqua dest.*

**2.1.13.2 Puffer und Lösungen für Leberzellpräparationen**

CaCl<sub>2</sub> (Stocklösung, sterilfiltriert)

500mM CaCl<sub>2</sub>

in *aqua dest.*

Perfusionslösung

2% HEPES

0,2% Genamycin

in HBSS

Perfusionslösung mit CaCl<sub>2</sub> und Collagenase (sterilfiltriert)

5mM CaCl<sub>2</sub>

0,6mg/ml Collagenase

in Perfusionslösung

Perfusionslösung mit EGTA

0,05mM EGTA

in Perfusionslösung

Perfusionslösung mit EGTA (Stocklösung, sterilfiltriert)

50mM

in *aqua dest.*

### **2.1.13.3 Puffer und Lösungen für immunozytochemische Färbungen**

#### PBS, 20x

2,74M NaCl

54mM KCl

200mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

40mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

in *aqua dest.*

#### PBS, 1x

137mM NaCl

2,7mM KCl

10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

in *aqua dest.*

#### Blockierungspuffer der CD68 Färbung

1% FcR

2% BSA

in PBS

#### Blockierungspuffer der CD146 Färbung

1% FcR Blocking Reagenz

in PBS

#### Blockierungspuffer der $\alpha$ -SMA Färbung

1% FcR Blocking Reagenz

in PBS

#### Blockierungspuffer der Albumin Färbung

5% Normal Goat Serum

2% BSA

0,1% Triton X-100

in PBS

#### Blockierungspuffer: Albumin/CYP3A4 Färbung und $\alpha$ -SMA/CYP3A4 Färbung

5% Normal Goat Serum

5% Normal Donkey Serum

2% BSA

0,1% Triton X-100

in PBS



Permeabilisierungslösung

0,3% Triton X-100

in PBS

PFA Fixierlösung

4% PFA

in PBS

Methanol/Aceton Fixierlösung

50% Methanol

50% Aceton

### 2.1.13.4 Puffer und Lösungen für durchflusszytometrische Analysen

Blockierungspuffer

1% FBS

in PBS

### 2.1.14 Oligonukleotide

Tabelle 18. Oligonukleotide

Spezies	Gen	Primer ( <i>forward</i> )	Primer ( <i>reverse</i> )
human	<i>β-Aktin</i>	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
human	<i>HCV</i>	5'-GCGGGTTGATCCAAGAAAGG-3'	5'-ATCACTCCCCTGTGAGGAACT-3'
human	<i>MX1</i>	5'-AGCCACTGGACTGACGACTT-3'	5'-GAGGGCTGAAAATCCCTTTC-3'

### 2.1.15 QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen

Tabelle 19. QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen

Gen	Qiagen Bestellnummer
<i>ALB</i>	QT00063693
<i>APOB</i>	QT00020139
<i>ASGR1</i>	QT00004116
<i>CD14</i>	QT00208817

## Material und Methoden

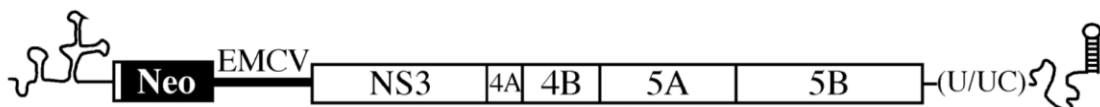
---

<i>CD68</i>	QT00037184
<i>CD146</i>	QT00079842
<i>CD163</i>	QT00074641
<i>CYGB</i>	QT00016051
<i>DES</i>	QT00071778
<i>IFN-<math>\alpha</math>1</i>	QT00201964
<i>IFN-<math>\alpha</math>2</i>	QT00212527
<i>IFN-<math>\alpha</math>4</i>	QT00199843
<i>IFN-<math>\alpha</math>5</i>	QT00201985
<i>IFN-<math>\alpha</math>6</i>	QT00242249
<i>IFN-<math>\alpha</math>7</i>	QT00210476
<i>IFN-<math>\alpha</math>8</i>	QT01530921
<i>IFN-<math>\alpha</math>10</i>	QT00216566
<i>IFN-<math>\alpha</math>13</i>	QT00240450
<i>IFN-<math>\alpha</math>16</i>	QT00202671
<i>IFN-<math>\alpha</math>17</i>	QT0021413
<i>IFN-<math>\alpha</math>21</i>	QT00205044
<i>IFN-<math>\beta</math></i>	QT00203763
<i>IFN-<math>\lambda</math>1</i>	QT01033564
<i>IFN-<math>\lambda</math>2</i>	QT01672356
<i>IFN-<math>\lambda</math>3</i>	QT00220766
<i>IL-10</i>	QT00041685
<i>IL-6</i>	QT00083720
<i>ISG15</i>	QT01761886
<i>LOXL2</i>	QT00019425
<i>LYVE-1</i>	QT00034566
<i>PECAM1</i>	QT00081172
<i>TLR1</i>	QT01009589
<i>TLR2</i>	QT00236131
<i>TLR3</i>	QT00007714
<i>TLR4</i>	QT01670123
<i>TLR5</i>	QT01682079
<i>TLR6</i>	QT00216272

<i>TLR7</i>	QT00030030
<i>TLR8</i>	QT01666420
<i>TLR9</i>	QT00015183
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	QT01079561
<i>VCL</i>	QT00078302
<i>VWF</i>	QT00051975

### 2.1.16 Zelllinien

Die Untersuchungen der antiviralen Aktivität der NPC wurden mit Hilfe der Zelllinie Con1 durchgeführt (Lohmann et al. 1999). Hierbei handelt es sich um die humane Hepatom Zelllinie Huh-7, die die Konsensus komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) trägt, die aus einem chronisch infizierten Hepatitis C Patienten des Genotyps 1b isoliert wurde (Lohmann et al. 1999). Das Con1 HCV Replikon codiert für die HCV 5'-NTR sowie für die ersten 12 Codons des Capsidproteins, das an ein Neomycin Phosphotransferase (Neo) Selektionsmarkergen fusioniert ist. Letzteres überträgt nach erfolgter Expression die Resistenz gegenüber dem zytotoxischen Medikament G418. Darüber hinaus codiert das HCV Replikon für eine IRES des Encephalomyocarditis Virus (EMCV), welches die Translation des HCV Nichtstrukturproteins dirigiert. Drittens codiert das HCV Replikon für die HCV 3'-NTR (Blight, Norgard 2006). Eine schematische Darstellung des HCV Replikons ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5. Con1 bicistronisches Replikon.** Das bicistronische Replikon in den Con1 Zellen besteht aus einer 5'-NTR, den ersten 12 Codons des Capsids, welches an ein Neomycin Resistenzgen (Neo) fusioniert ist, einer EMCV IRES Sequenz und der codierenden Region der Nichtstrukturproteine NS3-5B sowie der 3'-NTR (Blight, Norgard 2006).

### **2.1.17 Zellkulturmedien**

#### **2.1.17.1 Hepatozyten**

DMEM/Ham's F-12

10% FBS

100U/ml Penicillin

0,1mg/ml Streptomycin

2mM L-Glutamin

#### **2.1.17.2 KC und HSC Kulturmedium**

DMEM, 4,5g/l Glukose, Pyruvat, Glutamin

10% FBS

100U/ml Penicillin

0,1mg/ml Streptomycin

2mM L-Glutamin

#### **2.1.17.3 LSEC Wachstums- und Kulturmedium**

*Endothelial Growth Medium 2*

2,5% Endothelial Cell Growth Supplement

100U/ml Penicillin und

0,1mg/ml Streptomycin

#### **2.1.17.4 HSC Wachstumsmedium**

*Stellate Cell Medium*

10% FBS

1% *Stellate Cell Growth Supplement*

100U/ml Penicillin

0,1mg/ml Streptomycin

### **2.1.17.5 Con1 Kulturmedium**

DMEM

10% FBS

100U/ml Penicilin

0,1mg/ml Streptomycin

2mM L-Glutamin

300U/ml G418

### **2.1.18 Software**

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
Bio-Rad CFX Manager 2.1	Bio-Rad, München, Deutschland
MS-Office 2010	Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA
FlowJo	Tree Star Inc.
Vilber Lourmat Fusion Software	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software;Inc.;La Jolla, CA, USA
Leica LAS AF Lite 1.0.0	Leica, Mannheim, Deutschland
Zeiss LSM Image Browser	Zeiss, Jena, Deutschland
RefWorks	ProQuest LLC

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturtechniken

#### 2.2.1.1 Lebergewebe

Das verwendete Lebergewebe wurde aus Leberresektionen (n=30) oder explantiertem Lebergewebe (n=10) gewonnen. Das Gewicht der Leberproben variierte zwischen 25g und 100g. Das Gewebe wurde bis zur Verwendung in vorgekühlter Perfusionslösung (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem *Hank's balanced salt solution* (HBSS), 0,02mg/ml Gentamycin, 20mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)) aufbewahrt. Die Untersuchungen wurden durch die örtliche Ethikkommission zugelassen und die Einverständniserklärungen wurden von jedem Patienten eingeholt.

#### 2.2.1.2 Isolation primärer Leberzellen

Primäre humane Parenchymzellen (Hepatozyten, PHH) und NPC (KC, LSEC und HSC) wurden aus humanem Lebergewebe präpariert. Alle Leberzellpräparationen wurden unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Eine schematische Darstellung der Leberzellpräparation ist in Abbildung 6 dargestellt. Zur Isolation der Zellen wurde eine Zwei-Schritt Perfusionstechnik in Anlehnung an die von Seglen etablierte Methode angewendet (Seglen 1976). Das Lebergewebe wurde zunächst in einer großen Petrischale (Ø 14,5cm) platziert. Mit Hilfe einer Kanüle wurden alle hepatischen Gefäße mit Perfusionslösung gespült, um Blutaggregate zu entfernen und ein für die Perfusion geeignetes Gefäß zu finden. Die Kanüle wurde mit Histoacryl<sup>®</sup> Kleber fixiert und alle verbliebenen Gefäßöffnungen verklebt, um das Auslaufen der Perfusionslösungen zu vermeiden. Dies führte während der Perfusion zum Aufbau eines geeigneten Druckes innerhalb des Gewebes und erhöhte die Effizienz der Perfusion. Zur Entfernung des gesamten Blutes wurde das Lebergewebe für 10-20min bei einer Durchflussrate von 30-40ml/min mit Perfusionslösung (vorgewärmt auf 37°C) durchspült. Anschließend wurde das Gewebe mit 0,5mM EGTA enthaltender Perfusionslösung für 10-20min durchspült, um verbleibendes Ca<sup>2+</sup> zu entfernen und die Auflösung des Gewebes zu begünstigen. Es wurden 0,6mg/ml Collagenase

Typ IV aus *Clostridium histolyticum* in der Perfusionslösung mit 5mM CaCl<sub>2</sub> gelöst, anschließend durch einen 0,45µm Membranfilter steril filtriert und für den Verdau verwendet. Die Perfusionszeit betrug, abhängig von der Gewebegröße und Gewebequalität, maximal 20min. Die erhaltende Zellsuspension wurde durch ein grobes 230µm Netz vorgefiltert. Zum Abtrennen der Hepatozyten wurden Zentrifugationsschritte bei 30×g, 40×g und 50×g für jeweils 10min bei RT durchgeführt. Hierbei wurden die Hepatozyten sedimentiert und für eine anschließende Aufreinigung aufbewahrt. Die NPC verblieben in dem Überstand und wurden separat gesammelt. Zwischen jedem Zentrifugationsschritt wurden die PHH Zellpellets in Perfusionslösung resuspendiert. Die 50×g Zentrifugationen wurden so lange wiederholt bis der Überstand klar und somit frei von NPC war.

Primäre humane Hepatozyten, die durch die Zentrifugationen bei geringer Geschwindigkeit erhalten wurden, wurden in Hepatozyten Kulturmedium (DMEM/Ham's F-12, 10% FBS; 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin und 2mM L-Glutamin) resuspendiert. Nach erfolgter Lebendzellzahlbestimmung (2.2.1.5) wurden die PHH in einer Dichte von 1,25-2,50×10<sup>5</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> in Collagen I beschichteten Platten ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C und CO<sub>2</sub> Atmosphäre (Standardbedingungen) inkubiert und alle 10min geschwenkt. Nach ca. 30-40min wurde das Medium vorsichtig gewechselt. Darauffolgend wurde das Kulturmedium täglich erneuert. Vorwiegend dienten in dieser Arbeit isolierte PHH als Negativkontrollen.

Zur Isolation der NPC wurde die Zellsuspension auf 50ml Rörchen (Falcon) aufgeteilt und bei 800×g für 10min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in GBSS (*Gey's balanced salt solution*) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die KC und die LSEC von den HSC durch einen Drei-Phasen Iodixanol (OptiPrep™) Dichtegradienten getrennt. Zur Vorbereitung des Dichtegradienten wurde die Zellsuspension mit einer 40%igen Iodixanol/GBSS-Lösung zu einer Endkonzentration von 12,6% Iodixanol gemischt. Es wurden 5ml dieser Lösung in ein konisches 15ml Polystyren Rörchen überführt und vorsichtig mit 5ml einer 9%igen Iodixanol/GBSS Lösung sowie 2ml GBSS

überschichtet. Durch die anschließende Zentrifugation bei 1.400×g für 21min bei 4°C mit verringerter Beschleunigung und deaktivierter Bremse erfolgte die Trennung der Zellen nach ihrer Dichte. Infolgedessen wurden eine obere Schicht mit geringerer Dichte, bestehend aus den HSC, und eine untere Schicht mit höherer Dichte, die die KC und LSEC beinhaltet, gebildet. Beide Zellschichten wurden mittels einer Pipette separiert und gesammelt. Anschließend erfolgte die erneute Abtrennung von kontaminierenden Hepatozyten durch Zentrifugationsschritte für 3min bei 50×g und 4°C. Die Lebendzellzahl der KC/LSEC Fraktion wurde mittels Trypan Blau Färbung bestimmt und für 10min bei 800×g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde resuspendiert. Hierzu wurden pro 10<sup>7</sup> Zellen sowohl 60µl MACS (*magnetic activated cell sorting*) Puffer als auch 20µl FcR Blocking Reagenz und 20µl CD14 *MicroBead* Lösung verwendet. Diese Suspension wurde gemischt und für 15min bei 4°C inkubiert. In diesem Prozess werden die CD14 Rezeptoren der KC magnetisch markiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Suspension mit 10ml MACS Puffer versetzt und für 10min bei 800×g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2ml MACS Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine LS MACS<sup>®</sup> Säule gegeben, die sich in einem Magnetfeld eines MACS<sup>®</sup> Separators befand. Beim Durchfluss der Zellsuspension durch die Säule werden die *MicroBead* markierten KC durch den Magneten in der Säule zurückgehalten. Nicht markierte Zellen passieren die Säule und werden als Durchfluss aufgefangen. Die Säule wurde 3x mit 3ml MACS<sup>®</sup> Puffer gewaschen. Daraufhin wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die KC mit 5ml KC Kulturmedium, bestehend aus DMEM, versetzt mit 10% FBS, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin und 2mM L-Glutamin, eluiert. Die KC wurden mit Trypan Blau gefärbt und die Lebendzellzahl bestimmt. Es wurden 4-6x10<sup>6</sup> KC pro cm<sup>2</sup> in Plastik Kulturplatten ausgesät. KC haben die Eigenschaft, sich schnell an die Plastikoberfläche anzuheften. Das Prinzip der selektiven Anheftung (*selective adherence*) wurde genutzt, um kontaminierende Zellen zu entfernen. Hierzu wurde das Kulturmedium nach 30min Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> vorsichtig gewechselt.

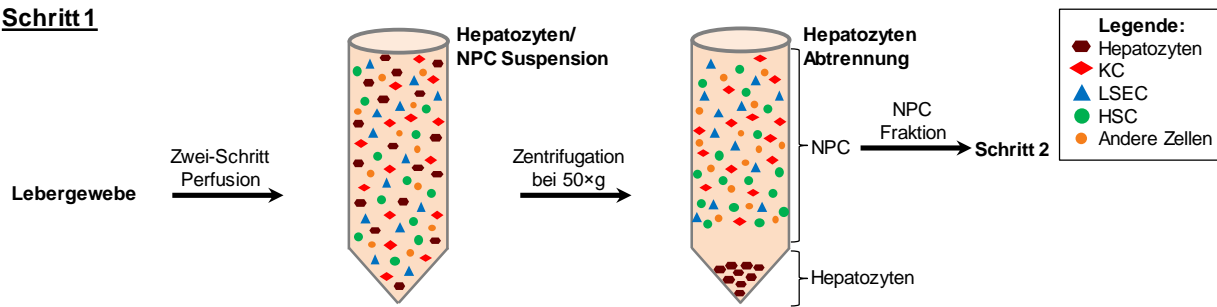
Die LSEC wurden nach dem gleichen Prinzip, unter Verwendung von CD146<sup>+</sup> *MicroBeads*, isoliert und gereinigt. Nach der Elution der LSEC in Endothelzell



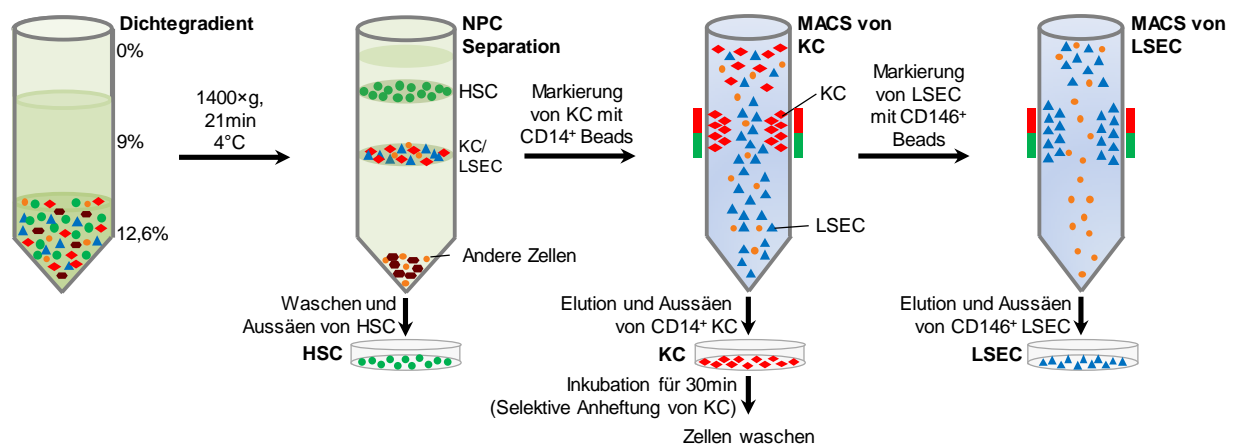
Wachstumsmedium (Endothelial Growth Medium 2, 2,5% Endothelial Cell Growth Supplement, 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin), wurde die Lebendzellzahl bestimmt und die Zellen in Collagen I beschichteten Kulturschalen in einer Dichte von  $>1 \times 10^6$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät. Nachdem eine ca. 80%ige Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst und in Collagen I beschichteten Kulturplatten ausgesät.

Die gesamte HSC Fraktion, die aus der Dichtegradientenzentrifugation erhalten wurde, wurde in Plastik Kulturfalschen unter Verwendung des Sternzell Wachstumsmediums (Stellate Cell Medium, 10% FBS, 1% Supplement, 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin) ausgesät. Nachdem eine 90%ige Konfluenz erreicht wurde, wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in Plastik Kulturplatten unter Verwendung von DMEM, versetzt mit 10% FBS, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin und 2mM L-Glutamin, ausgesät. Bei allen Zelltypen wurde das Medium einen Tag nach der Zellpräparation und daraufhin jeden zweiten Tag gewechselt.

**Schritt 1**



**Schritt 2**



**Abbildung 6. Schematische Darstellung der Leberzellpräparation.** Die Leberzellsuspension wurde mit Hilfe einer Zwei-Schritt Perfusionstechnik unter Verwendung des Enzyms Collagenase aus humanem Lebergewebe erhalten. PHH wurden durch Zentrifugationen bei geringer Geschwindigkeit (50xg) aus der Zellsuspension isoliert (Schritt 1). Die restliche Zellsuspension wurde in einer Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Folglich lagen die HSC als eine Schicht geringerer Dichte (obere Schicht) und die KC/LSEC als eine Schicht höherer Dichte (untere Schicht) vor. Die HSC wurden direkt in eine Kulturflasche unter Verwendung von HSC Wachstumsmedium ausgesät. KC wurden durch die Markierung mit CD14 *MicroBeads* und anschließender MACS von den LSEC getrennt. Nach der Elution wurden die CD14<sup>+</sup> KC in Kulturplatten ausgesät. Zur Ausnutzung der selektiven Anheftung der KC wurde das Kulturmedium nach 30min Inkubation (37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre) gewechselt. Die LSEC Fraktion (CD14<sup>-</sup> Zellsuspension) wurde mit CD146 *MicroBeads* markiert und separiert. Nach der Elution wurden die Zellen in eine Collagen I beschichtete Kulturschale ausgesät.

**2.2.1.3 Stimulation von NPC mit TLR Liganden**

Die kultivierten NPC wurden für die Dauer von 30min, 90min, 6h, 24h oder 48h mit TLR Liganden stimuliert. Alle verwendeten Liganden wurden von der Firma Invivogen bezogen. Hierbei wurden die in Tabelle 16 angegebenen Liganden und Konzentrationen verwendet.

#### **2.2.1.4 Subkultivierung von Con1 Zellen**

Zur Kultivierung der Con1 Zellen, wurden diese in 75 cm<sup>2</sup> Kultivierungsflaschen in DMEM mit 10% FBS, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin und 300U/ml G418 ausgesät (Lohmann et al. 1999). Nachdem die Zellen eine ca. 90%ige Konfluenz erreicht haben, erfolgt das sogenannte Passagieren, bei dem ein Teil der Zellen in ein neues Kultivierungsgefäß überführt wird. Das Passagieren verhindert, dass die Zellen aufgrund von Kontaktinhibierung ihr Wachstum einstellen. In dieser Arbeit wurde das Medium zunächst vollständig von der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurden 2ml einer 0,05%igen Trypsin-EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und ca. 5min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 8ml frischem Kulturmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in 50ml Röhrchen überführt und 5min bei 300xg zentrifugiert, um eine maximale Zellausbeute zu erhalten und tote Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10ml Medium resuspendiert. Zum Passagieren der Zellen wurden in einer frischen Kulturflasche 16ml Medium vorgelegt und 2ml der Zellsuspension ausgesät. Zum Ansetzen von Experimenten wurde die Zellzahl bestimmt (2.2.1.5) und eine definierte Zellzahl entsprechend der Plattenformat Größe ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre.

#### **2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Die Kammer besteht aus 4 großen Quadraten, die wiederum in 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Für die Zählung wurden die Zellen in einer geeigneten Verdünnung mit 25% Trypan Blau in PBS versetzt, um tote Zellen zu markieren. Es wurden 10µl dieser Zellsuspension auf die Zählkammer aufgetragen. Innerhalb dieser Quadrate werden die Zellen gezählt. Werden alle 4 großen Quadrate gezählt, kann die Zellzahl nach folgender Formel berechnet werden. Der Kammerfaktor 10<sup>4</sup> ergibt sich aus dem Volumen der Zählkammer.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### **2.2.1.6 Antivirale Aktivität von NPC**

Kultivierte NPC wurden mit den TLR Liganden stimuliert (2.2.1.3). Nach 24h Inkubation wurden die Überstände gesammelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Con1 Zellen wurden in einer 96-Well Platte in einer Dichte von 6.000 Zellen/Well ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre für 24h inkubiert. Die Kulturüberstände der NPC wurden langsam auf Eis aufgetaut und anschließend bei 135×g für 10min und 4°C zentrifugiert, um Zellreste abzutrennen. Anschließend wurden die Überstände in einer 1:2 Verdünnung in Con1 Kulturmedium auf die Zellen gegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach 72h erfolgte die RNA Isolation mit Hilfe des FastLane Cell SYBR<sup>®</sup> Green Kits (2.2.2.2). Zur Analyse der antiviralen Aktivität der NPC wurde die β-Aktin und die HCV Genexpression mittels qRT-PCR gemessen (2.2.2.3).

### **2.2.1.7 Neutralisierungsexperimente**

Kultivierte NPC wurden mit den TLR Liganden stimuliert (2.2.1.3). Nach 24h Inkubation wurden die Überstände gesammelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Con1 Zellen wurden in einer 96-Well Platte in einer Dichte von 6.000 Zellen/Well ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre für 24h inkubiert. Die Kulturüberstände der NPC wurden langsam auf Eis aufgetaut und anschließend bei 135×g für 10min und 4°C zentrifugiert, um Zellreste abzutrennen. Um eine geeignete Konzentration der Überstände von Poly I:C stimulierten NPC zu ermitteln, wurde eine Konzentrationsreihe als Vorversuch getestet. Hierfür wurden Con1 Zellen im 96-Well Plattenformat ausgesät und für 24h inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände Poly I:C stimulierter NPC in einer Konzentrationsreihe (1:5, 1:10, 1:15, 1:20 verdünnt in Con1 Kulturmedium) auf die Con1 Zellen gegeben. Analog wurden Vorversuche durchgeführt, in denen Con1 Zellen mit einer Konzentrationsreihe der rekombinanten Interferone (IFN-αA/D, IFN-β, IFN-λ1, IFN-λ3) stimuliert wurden. Nach erfolgter Inkubation für 72h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre wurde die RNA aus den Zellen isoliert (2.2.2.2) und die β-Aktin und die HCV Genexpression mittels qRT-PCR untersucht (2.2.2.3). Für die weiteren Versuche wurde die Konzentration an Überstand bzw. IFN gewählt, bei der ein Rückgang der HCV Replikation auf 50% erreicht wurde.

Die Überstände Poly I:C stimulierter NPC sowie die rekombinanten Interferone wurden in geeigneter Konzentration (Tabelle 17) mit den neutralisierenden Antikörpern gegen Typ I und Typ III Interferone für 3h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Con1 Zellen abgesaugt und die Zellen mit 150µl des Reaktionsansatzes versetzt. Jede Versuchsbedingung wurde im Triplikat angesetzt. Nach 72h Stunden Inkubation erfolgte die RNA Isolation mittels des FastLane Cell SYBR<sup>®</sup> Green Kits (2.2.2.2). Die Messung der Genexpression von β-Aktin und HCV erfolgte mittels qRT-PCR (2.2.2.3).

Zur Blockierung von Typ I und Typ III IFN Rezeptoren wurden die Con1 Zellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen eine Untereinheit des jeweiligen Rezeptors für 3h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Überständen Poly I:C stimulierter NPC in geeigneter Konzentration versetzt. In allen Experimenten wurden die in Tabelle 12 angegebenen Antikörper in den jeweiligen Konzentrationen verwendet.

## 2.2.2 RNA Techniken

### 2.2.2.1 RNA Isolierung aus Primärzellen

Zur Isolation der RNA aus primären humanen Zellen wurde das QIAzol<sup>™</sup> Lyse Reagenz und das RNeasy Mini Kit verwendet. Humane Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und entsprechend den Versuchsbedingungen behandelt. Zu Beginn der Isolation wurde das Kulturmedium von der Zellkultur abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen mit 500µl QIAzol<sup>™</sup> Lyse Reagenz versetzt und für mindestens 5min inkubiert. Das Zelllysate wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, mit 100µl Chloroform gemischt und für 3min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 15min bei 12.000×g und 4°C erfolgte eine Phasentrennung. Die RNA haltige Phase (obere Phase) wurde abgenommen, mit 350µl 75%igem EtOH versetzt und auf eine RNeasy Säule gegeben. Die Säule wurde für 30s bei 8.000×g und bei RT zentrifugiert, wodurch selektiv die RNA in der RNeasy Silicagel Membran innerhalb der Säule gebunden wurde. Bis zur Elution der RNA wurde das Filtrat nach jedem Waschvorgang verworfen. Zum Waschen der RNA wurden 350µl RW1 Puffer auf die

Säule aufgetragen und 30s bei 8.000xg zentrifugiert. Anschließend wurde verbliebene DNA mit Hilfe des *RNase-free* DNase Sets verdaut. Hierzu wurden pro Probe 10µl DNase I Stocklösung mit 70µl RDD Puffer gemixt, auf die Säule gegeben und für 15min bei RT inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 350µl des RW1 Puffer auf die Säule gegeben und diese erneut für 30s bei 8.000xg zentrifugiert. Zum Waschen der RNA wurden 400µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschvorgang mit dem RPE Puffer durch Zentrifugation für 2min bei 8.000xg. Zur Entfernung jeglicher Lösungen wurde die Säule für 1min bei 8.000xg trocken zentrifugiert. Durch Zugabe von 50µl RNase freiem Wasser und Zentrifugation bei 8.000xg wurde die RNA in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert. Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung der RNA Proben bei -20°C.

### **2.2.2.2 RNA Isolation aus Con1 Zellen**

Die Isolation von RNA aus der Con1 Zelllinie erfolgte mit Hilfe des FastLane Cell SYBR<sup>®</sup> Green Kits. Hierfür wurden 6.000 Con1 Zellen/Well in einer 96-Well Platte ausgesät und für 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen je nach Versuchsbedingungen behandelt. Zur RNA Isolation wurde das Kulturmedium von den Platten abgesaugt und die Zellen kurz mit 100µl FCW Puffer gewaschen. Zur Lyse wurden 50µl des vollständigen FCPL Puffers zu den Zellen gegeben und diese für 10min bei RT inkubiert. Die Zellyse Reaktion wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Das Lysat wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, gemischt und für 10min bei 75°C inkubiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20°C.

### **2.2.2.3 One-step real-time quantitative reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion**

Die *real-time* quantitative reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) dient der Quantifizierung der Genexpression. In dieser Methode wird RNA als Vorlage für die cDNA Synthese verwendet, die anschließend als Vorlage für die Vervielfältigung verwendet wird. In der *one-step* qRT-PCR findet sowohl reverse Transkription als auch die Amplifikation in demselben Reaktionsgefäß statt. Im ersten

Zyklus findet die reverse Transkription statt, wodurch die cDNA synthetisiert wird. Anschließend erfolgen die Denaturierung, die Hybridisierung der Primer und die Elongation der DNA Sequenzen. Wie bei der herkömmlichen PCR werden spezifische 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dNTP) und geeignete Puffer verwendet. Bei der Verwendung des SYBR<sup>®</sup> Green Farbstoffs interkaliert dieser mit doppelsträngiger DNA (dsDNA), wodurch das Fluoreszenzsignal generiert wird. Mit der kontinuierlichen Amplifikation und dem somit zunehmenden Gehalt an DNA nimmt auch die Fluoreszenzintensität zu. Nach dem Beenden der PCR Reaktion wird zusätzlich eine Schmelzkurve aufgenommen, in der die dsDNA wieder aufgeschmolzen wird. Durch die Auflösung der Doppelstränge wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und das Signal nimmt ab. Die erhaltene Schmelzkurve kann durch ihren Verlauf zeigen, ob Verunreinigungen vorliegen. Enthält die Schmelzkurve z. B. zwei Sattelpunkte, so liegt eine Verunreinigung vor. Die gemessenen Signale dienen im Anschluss an die Reaktion zur Quantifizierung des cDNA bzw. RNA Gehalts der Proben. Zu diesem Zweck wird für jede zu analysierende Probe eine endogene Kontrolle vermessen, die zu jeder Versuchsbedingung das gleiche Expressionslevel aufweist. Als Kontrolle werden sogenannte Haushaltsgene (*housekeeping genes*) gemessen. In diesem Fall eignet sich  $\beta$ -Aktin, da dies konstitutiv exprimiert wird. Für die Quantifizierung der jeweiligen cDNA Probe wurde der exponentielle Bereich der Reaktionszyklen verwendet. Nach der Vermessung der Proben wurden die  $C_T$  (*cycle threshold*) Werte der Proben und der endogenen Kontrolle ermittelt. Der  $C_T$  Wert beschreibt den PCR Zyklus bei dem ein festgelegter Schwellenwert (*threshold*) überschritten wird. Der hier verwendete Schwellenwert wurde manuell auf den Wert 72,69 gesetzt. Der Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert bestimmte den  $C_T$  Wert jeder einzelnen Probe.

### 2.2.3 Protein Techniken

#### 2.2.3.1 Gewinnung von Proteinextrakten

Zur Proteingewinnung wurden die Primärzellen im 6-Well Plattenformat ausgesät und den Versuchsbedingungen entsprechend behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit

von 30min bzw. 90min nach Stimulation wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Kulturplatten auf Eis gestellt und mit 60µl eiskaltem RIPA Lysepuffer mit 1% Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail und Protease Inhibitor Cocktail, lysiert. Das Ablösen der gesamten Zellen wurde durch Verwendung eines Zellschabers gewährleistet. Das gesamte Lysat wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Proteinquantifizierung erfolgte die Lagerung bei -80°C.

### **2.2.3.2 Proteinquantifizierung**

Die Proteinquantifizierung der Zelllysate (2.2.3.1) erfolgte photometrisch auf Basis eines BCA (*bicinchoninic acid*) Assays mit Hilfe des BCA Proteinassay Kits am FLUOstar Omega. Die kalorimetrische Detektion beruht auf einer Biuret Reaktion, bei der  $\text{Cu}^{2+}$ , durch die Anwesenheit von Proteinen in einem alkalischen Medium zu  $\text{Cu}^+$  reduziert wird. In diesem Vorgang wird, durch Komplexierung von zwei Molekülen BCA mit einem  $\text{Cu}^+$  Ion, ein violettees Reaktionsprodukt gebildet. Dieses Produkt ist sensitiv bei einer Absorptionswellenlänge von 562nm nachweisbar, wobei die Absorption proportional zur Proteinkonzentration ist (Smith et al. 1985). Zusätzlich wurde eine Kalibrierkurve mit einer BSA (*bovine serum albumin*) Stammlösung in den Konzentrationen von 0,5µg/µl, 1,0µg/µl, 1,5µg/µl und 2,0µg/µl gemessen. Die zu analysierenden Zelllysate wurden in einer 1:5 Verdünnung vermessen, so dass die Konzentrationen in dem Bereich der Kalibrierkurve lagen.

### **2.2.3.3 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese**

Durch die *sodium dodecyl sulfate* (SDS) Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das Gel setzt sich aus quervernetzten Polyacrylamidketten zusammen, die dadurch ein Molekularsieb bilden. Die prozentuale Polyacrylamidkonzentration ist entscheidend für die Porengröße des Gels. Durch Verwendung eines SDS und β-Mercaptoethanol enthaltenden Probenpuffers sowie dem Erhitzen der Proben auf 95°C für 10min, werden die Proteine denaturiert. Hierbei wird die Aufspaltung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten, durch die Zugabe der reduzierenden Thiolverbindung β-Mercaptoethanol, erreicht. Folglich



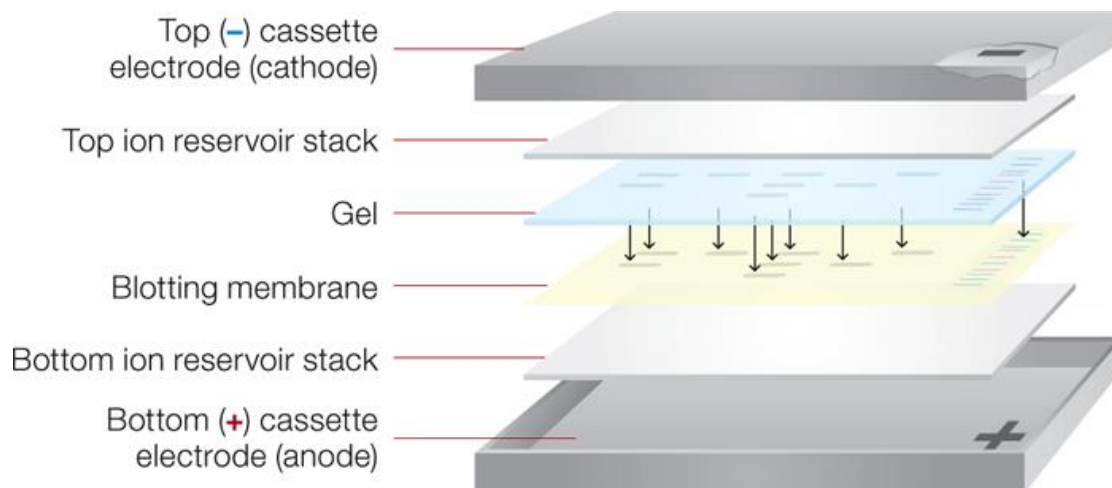
liegen keine Proteinkomplexe vor und die Größe der Moleküle entspricht der molekularen Masse der einzelnen Proteine. SDS ist ein anionisches Detergenz, das mit seinem hydrophoben Rest an hydrophobe Bereiche der Proteine bindet, wodurch negativ geladene Mizellen entstehen und die Proteine ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis erhalten. Zur Auftrennung werden die so präparierten Proben auf das Polyacrylamidgel geladen und eine elektrische Spannung angelegt. Durch den Molekularsiebeffekt des Gels erfolgt eine Trennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Proteingröße. Abhängig vom nachfolgenden Analyseverfahren wurde zusätzlich der MagicMark Größenstandard verwendet, um die Proteingrößen zuordnen zu können.

Die Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli [39], unter Verwendung eines 4-15% Mini-PROTEAN TGX™ Gels durchgeführt. Das Gel wurde in einer Mini-PROTEAN® Tetra Cell eingespannt. Die Proteinproben wurden mit 5x SDS Probenpuffer mit 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, 5min bei 95°C aufgekocht und anschließend kurz zentrifugiert. Die Gelkammern wurden mit 15-50 $\mu$ g Gesamtproteinlösung, 2 $\mu$ l des PageRuler Größenstandards oder 1 $\mu$ l des MagicMark™ XP Western Proteinstandards beladen. Zum Auftrennen der Proteine im Gel wurde eine Spannung von 150V angelegt. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte anschließend mittels Western Blot Analysen (2.2.3.4).

### **2.2.3.4 Western Blot**

Das Transferieren von Proteinen auf eine Membran mit anschließender Immundetektion wird als Western Blot bezeichnet. Hierzu werden zunächst Proteine durch eine SDS PAGE aufgetrennt (2.2.3.3). Durch das Anlegen einer Spannung zwischen zwei Elektroden werden die Proteine senkrecht aus dem Gel auf eine Membran bewegt. Als Membranen können entweder Polyvinylidenfluorid Membran (PVDF) oder Nitrocellulose Membranen verwendet werden. Der Transfer der Proteine erfolgte mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System der Firma Bio-Rad nach der *semi-dry* Methode. Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Membran ist der Zusammenbau eines sogenannten *Blot Sandwiches* erforderlich. Der Zusammenbau erfolgt luftblasenfrei unter Verwendung eines Trans-Blot®

Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs in einer des Trans-Blot® Turbo™ Kasette. Ausgehend von der Anode in Richtung der Kathode wurde das Sandwich in der folgenden Reihenfolge zusammengebaut: Puffer getränkte Filterpapiere, PVDF Membran, TGX Gel, Puffer getränkte Filterpapiere, Deckel der Blot Kasette. Die jeweiligen Puffer getränkten Filterpapiere dienen als Ionenreservoir. Der Transfer erfolgte mit einer Spannung von 1,3A und 25V. Die Transferdauer betrug 7min. Nachfolgend wurde die Immundetektion durchgeführt (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematischer Aufbau des *semi-dry* Western Blot Sandwiches.** Das *semi-dry* Western Blot Sandwich wird von der Anode aus in Richtung der Kathode zusammengebaut. Hierbei muss die Reihenfolge, Kasette der Blot Kammer, Puffer getränkte Filterpapiere, PVDF Membran, Gel, Puffer getränkte Filterpapiere, Deckel der Blot Kasette eingehalten werden (Bio-Rad 2014).

Die Immundetektion basiert auf einer spezifischen Antikörper-Antigenwechselwirkung. Nach der Immobilisierung der Proteine wurde die Membran für die weitere Behandlung in TBS-T eingelegt und anschließend mit Ponceau S Lösung für 5min inkubiert. Ponceau S färbt die Proteine an, wodurch eine schnelle optische Kontrolle des Transfers ermöglicht wird. Daraufhin wurde die Membran mit Wasser und TBS-T gewaschen, in einer 5%igen Milchpulver Blockierungslösung überführt und abhängig vom Antikörper 1h oder über Nacht inkubiert. Letzteres verhindert die unspezifischen Protein Interaktionen zwischen der Membran und dem nachfolgend hinzu gegebenen primären Antikörper. Es wurden die in Tabelle 7 angegeben Antikörper und Inkubationsbedingungen verwendet. Anschließend wurde die Membran 3x mit TBS-T für jeweils 5min gewaschen, um ungebundene Antikörper

zu entfernen. Der sekundäre Antikörper wurde in einer 5%igen Blockierungslösung (Milch oder BSA) verdünnt, daraufhin auf die Membran gegeben und 1h bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an die konstante Region des primären Antikörpers und ist zusätzlich mit einem Enzym, der Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP), konjugiert. Nach der Wiederholung des Waschvorgangs wurde die Membran mit einer 1:1 Mischung der Detektionslösungen des ECL Plus™ *Western Blotting Detection* Reagenz benetzt. Die Detektion der Lichtreaktion erfolgte mit dem Fusion FX advanced Imager. Anschließend wurden die Antikörper mit Hilfe des *Stripping* Puffers von der Membran entfernt. Nach dem erneuten Blockieren konnte eine weitere Immundetektion unter Verwendung eines Antikörpers begonnen werden. Hierbei war zu beachten, dass sich die Proteingrößen deutlich voneinander unterschieden. Durch die Detektion einer Ladungskontrolle ( $\beta$ -Aktin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GAPDH) kann die Qualität des Western Blots bewertet werden und der Proteingehalt der Zielproteine quantifiziert werden.

### **2.2.3.5 Immunzytochemische Färbung von Zellmarkern**

Immunzytochemische Färbungen wurden zur Detektion zelltypspezifischer Proteine in Kulturen humaner primärer Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 4-Well Objektträger basierten Zellkulturkammern ausgesät. Die PHH wurden für eine Dauer von einem Tag und die NPC für eine Dauer von ungefähr sieben Tagen nach der Isolation kultiviert und dann zur Färbung verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:2) für 10min bei 4°C fixiert. Der Färbeprozess erfolgte abhängig von der Lokalisation der zu detektierenden Proteine nach zwei verschiedenen Methoden.

Die erste Methode diente der Färbung intrazellulärer Proteine (Albumin, CYP3A4, *cluster of differentiation no. 68* (CD68), Cytoglobin (CYGB)). Hierbei wurden die Zellen mit 0,3% Triton X-100/PBS für 1h bei RT permeabilisiert und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden unspezifische Bindungen Blockierungspuffer für 1h bei RT blockiert. Die Zellen wurden mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die hierbei verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen 3x

für 5min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem fluorophorgekoppelten Sekundärantikörper für 3h bei 4°C. Wurden zuvor ein direkt fluorophorgekoppelter Primärantikörper verwendet entfiel dieser Schritt. Als Negativkontrolle wurden Zellen nur mit dem sekundären Antikörper oder der jeweiligen Isotypenkontrolle inkubiert.

Die zweite Methode diente der Färbung von extrazellulären Markern. Hierfür wurden unspezifische Bindungen mit 1% FcR Blocking Reagenz in PBS für 60min bei RT blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Antikörper oder der jeweiligen Isotypenkontrolle über Nacht bei 4°C inkubiert. Hierbei wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Verdünnungen gewählt.

Nach erfolgter Antikörperinkubation wurden die Proben identisch behandelt. Nach erfolgter Antikörperinkubation wurden die Proben 3x mit PBS gewaschen. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in einer 1:10.000 Verdünnung in PBS für 15min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und die Wände des Objektträgers entfernt. Nach der Verwendung des Eindeckmediums Fluoromount-G™ wurde ein Deckglas blasenfrei auf den Objektträger platziert. Zur Fixierung des Deckglases und zur Vermeidung der Austrocknung des Präparates wurde das Deckglas mit Nagellack umrandet. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte entweder am Laser *scanning* Mikroskops (LSM) Axiovert 100M von Zeiss oder am Leica TCS SP8 Mikroskop. Die Bildanalyse erfolgte mit Hilfe der Programme LSM *Image Browser* und Leica LAS AF Lite.

### **2.2.3.6 Durchflusszytometrie**

Die Qualität der LSEC wurde durch die Markierung des Oberflächenproteins CD146 mittels spezifischer Antikörper und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden die LSEC wie in 2.2.1.2 beschrieben isoliert und in Collagen I beschichtete Kulturschale ausgesät. Nachdem eine 80-90%ige Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und die Reaktion mittels LSEC Wachstumsmedium gestoppt. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt (2.2.1.5) und pro Versuchsbedingung wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in ein Well einer 96-Well Rundbodenplatte überführt. Um die Zellen zu sedimentieren wurde die Platte für 5min bei 300xg zentrifugiert. Für alle weiteren

Zentrifugationsschritte wurden gleiche Zentrifugationsbedingungen verwendet. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte bei 4°C. Die Zellen wurden mit 150µl einer 1:5.000 Verdünnung eines Lebendfarbstoffs (*viability dye*) in 1% FBS/PBS (Blockierungspuffer) aufgenommen und 20min inkubiert, um tote Zellen zu markieren. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und 3x mit Blockierungspuffer gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Zellen mit gleichem Puffer für 30min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 100µl einer 1:600 Verdünnung des direkt Fluorophor gekoppelten monoklonalen Maus anti-CD146-PE Antikörpers oder der monoklonalen Maus IgG<sub>1</sub>-PE Isotypenkontrolle in Blockierungspuffer für 30min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit gleichem Puffer für 5min gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 100µl Fixierlösung aufgenommen und für 20min inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift wurden die Zellen in 300µl Blockierungspuffer aufgenommen und in ein Durchflusszytometrie Röhrchen überführt. Die Durchflusszytometrie zur Detektion toter, CD146 positiver und negativer Zellen wurde am Navios Durchflusszytometer durchgeführt. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Programms FlowJo. Der Prozess der Durchflusszytometrie sowie der Auswertung der Ergebnisse wurde freundlicherweise von Frau Dr. Kathrin Skibbe am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

### **2.2.3.7 Cytochrome P450 Aktivität**

Die physiologische Aktivität isolierter und kultivierter PHH wurde mit Hilfe des P450-Glo CYP2C9 bzw. CYP3A4 Assays von Promega in einer nichtlytischen Reaktion durchgeführt (n=3). Hierzu wurden PHH in einer 96-Well Platte (50.000 Zellen/Well) ausgesät und für einen Tag kultiviert. Daraufhin wurde das Medium zeitversetzt durch 50µl Medium, welches eine 1:50 Verdünnung des Substrats Luciferin-H bzw. eine 1:1.000 Verdünnung des Substrates Luciferin-IPA enthielt, ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 5min, 60min, 120min, 180min, 240min, 300min und 360min. Anschließend wurden pro Well 25µl der Lösung abgenommen und in eine weiße 96-Well Liminometer Platte überführt. Diese Lösung wurde mit 25µl Rekonstitutionspuffer versetzt und 30min bei RT inkubiert. Die gesamte Platte wurde

mit Hilfe des FLUOstar Omega von BMG LABTECH gemessen. Zur Berechnung der generierten Lumineszenz wurden die erhaltenen Werte auf eine Negativkontrolle (ohne Zellen) normiert.

### **2.2.3.8 Phagozytotische Aktivität**

Um die phagozytotische Aktivität der KC zu überprüfen, wurden diese mit Amin modifizierten, 1µm großen, gelb-grün fluoreszierenden ( $\lambda_{\text{ex}}=470\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=540\text{nm}$ ) Latex *beads* in einer 1:5.000 Verdünnung in KC Kulturmedium für 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit warmen PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:2) für 10min bei 4°C fixiert. Die Zellen wurden 2x mit gekühltem PBS für 5min gewaschen. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung des zelltypspezifischen Markers CD68 (2.2.3.5). Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte am LSM Axiovert 100M bei einer 40x Vergrößerung.

### **2.2.3.9 Aufnahme von acetyliertem *low-density* Lipoprotein**

LSEC wurden mit 5µg/ml acetyliertem *low-density* Lipoprotein (AcLDL), welches mit dem Fluorophor Alexa488 konjugiert ist, in LSEC Wachstumsmedium für 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert (n=4). Anschließend wurde überschüssige Fluorophorlösung durch das Waschen mit warmen PBS entfernt. Die Zellen wurden mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:2, 10min, 4°C) fixiert und zusätzlich mit dem Oberflächenmarker CD146 wie in 2.2.3.5 beschrieben gefärbt. Zur Detektion wurde das LSM Axiovert 100M von Zeiss bei einer 40x Vergrößerung verwendet.

### **2.2.3.10 Detektion von Autofluoreszenz**

HSC wurden in Objektträgern unter Verwendung von Sternzellwachstumsmedium ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Inkubation für einen Tag wurden die Zellen mit vorgewärmten PBS (37°C) gewaschen und mit Fluoromount-G<sup>TM</sup> überschichtet. Auf den Objektträger wurde ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und dieses mit Nagellack fixiert. Die Autofluoreszenz, die durch die Speicherung von Vitamin A (Retinol) in den Sternzellen erzeugt wird, wurde mit Hilfe des Leica TCS SP8 Mikroskops unter Verwendung des UV Lasers und einer 40x Vergrößerung

durchgeführt (n=4). Hierbei wurde eine spezielle Detektionsmethode namens BrightR (*brightness reinforcement*) angewendet. Es handelt sich um eine Erweiterung des Leica TCS SP8 Mikroskops und ermöglicht die Verstärkung schwacher Signale und somit die Darstellung dunkler oder trüber Strukturen.

### **2.2.3.11 Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

Die Methode des *enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) kann verwendet werden, um die Sekretion von Proteinen ins Zellkulturmedium zu untersuchen. Bei der Verwendung von quantitativen Immunoassays liegt ein monoklonaler Antikörper auf einer beschichteten 96-Well Platte immobilisiert vor. Nach der Zugabe des spezifischen Antigens in die Wells der Platte, wird dieses von dem immobilisierten Antikörper gebunden. Anschließend wird nicht gebundenes Antigen durch Waschen aus den Wells entfernt. Nachfolgend wird ein Enzym gekoppelter polyklonaler Antikörper in die Wells gegeben. Dieser bindet an das immobilisierte Antigen. Anschließend kann eine Farbreaktion induziert werden, welche proportional zum Antigengehalt ist. Im Anschluss wird die Farbentwicklung gestoppt und die Intensität gemessen. Durch die gleichzeitige Verwendung eines Standards, kann eine Quantifizierung erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurden TLR stimulierte NPC auf die Sekretion von Zytokinen untersucht. Hierfür wurden die NPC mit TLR Liganden für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gesammelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Überstände wurden zeitnah auf Eis aufgetaut. Zellfragmente wurden, durch die Zentrifugation für 10min bei 135xg und 4°C, abgetrennt. Die Sekretion von IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1 und IFN- $\lambda$ 2/3 wurde mittels ELISA nach den Angaben der Hersteller analysiert. Die verwendeten ELISA Kits sind unter 2.1.4 aufgeführt. Die Messung der Farbentwicklung wurde mit Hilfe des FLUOstar Omega bei 450nm gemessen. Die dazugehörigen Hintergrundabsorptionen wurden bei 550nm detektiert.

## 2.2.4 Analytische Methoden

### 2.2.4.1 Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen kultivierter Zellen erfolgt mit Hilfe des EVOS™ XL Core Imaging Systems von AMG. Zur Untersuchung immunzytochemisch gefärbter Zellen wurde das LSM Axiovert 100M von Zeiss und das TSC SP8 von Leica verwendet. Um die geeignetsten Bedingungen zur Detektion bestimmter Fluorophore zu erhalten, mussten die Einstellungen der Filter und der Laser entsprechend angepasst werden. Die Detektionsbedingungen wurden anhand der jeweiligen Isotypenkontrolle bzw. Negativkontrolle eingestellt, so dass unspezifische Signale minimal detektiert wurden. Die Bildanalyse erfolgte mit Hilfe der Programme LSM *Image Browser* und Leica LAS AF Lite.

### 2.2.5 Statistik

Die Immunfluoreszenzfärbungen von zelltypspezifischen Markern wurden in fünf unabhängigen Experimenten (biologischer Replikate) durchgeführt. Für eine quantitative Analyse wurden DAPI gefärbte Zellen, Marker positive Zellen und Marker negative Zellen in zehn unabhängigen Bildaufnahmen pro Zelltyp und Experiment bei einer 20× Vergrößerung durchgeführt.

Alle Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) angegeben. Mit Hilfe des ungepaarten T-Tests wurden die Unterschiede zwischen zwei Gruppen bestimmt. Durch den F-Test wurden signifikante Varianzen der Gruppen bestimmt. Lagen diese vor, wurde die Welch-Korrektur durchgeführt. Ab einem P-Wert von  $p < 0,05$  wurden die Daten als signifikant erachtet.



### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Charakterisierung und Qualität primärer Hepatozyten und NPC**

Die Isolation und Kultivierung von primären humanen Leberzellen spielt bei Untersuchungen und Studien der Leberphysiologie und -pathophysiologie (Lalor et al. 2006) eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus ist die Isolation von Primärzellen aus dem Lebergewebe desselben Patienten für vergleichende Studien besonders wichtig. Im ersten Versuchsteil dieser Arbeit wurde die Isolation primärer humaner Leberzellen optimiert, um eine hohe Ausbeute und Qualität der kultivierten Zellen zu erreichen.

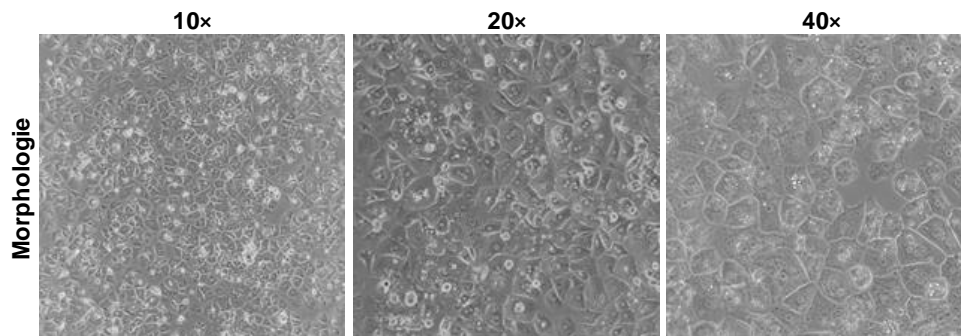
##### **3.1.1 Zellausbeuten**

Für die Untersuchung von primären Zellen ist die Zellausbeute von großer Bedeutung. Insbesondere ist für die simultane Isolation verschiedener Zellen aus dem gleichen Gewebestück eine hohe Ausbeute an Leberzellen ein wichtiger Faktor. Zur Separation und Aufreinigung der einzelnen Leberzelltypen wurden Techniken wie die Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit, die Dichtegradientenzentrifugation, die MACS Zellseparation und die selektive Anheftung angewendet. Nach der Isolation der Leberzellen wurden die Zellen mittels Trypan Blau gefärbt und die Lebendzellzahl bestimmt (2.2.1.5). Im Mittel konnten pro Gramm Lebergewebe  $2,0 \pm 0,4 \times 10^7$  PHH,  $1,8 \pm 0,5 \times 10^6$  KC,  $4,3 \pm 1,9 \times 10^5$  LSEC und  $3,2 \pm 0,5 \times 10^5$  HSC isoliert werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Vollständigkeit des Verdaus von der Qualität des Lebergewebes abhängig war. Wichtige Parameter der Qualität des Gewebes sind die Größe der Schnittkante, das Gewebevolumen, allgemeine Krankheitsparameter sowie der Fibrosestatus des Gewebes.

##### **3.1.2 Identifikation und Qualität humaner Hepatozyten**

Die PHH wurden durch die Verwendung einer Zwei-Schritt Collagenase Perfusion sowie Zentrifugationen bei geringer Geschwindigkeit aus humanem Lebergewebe

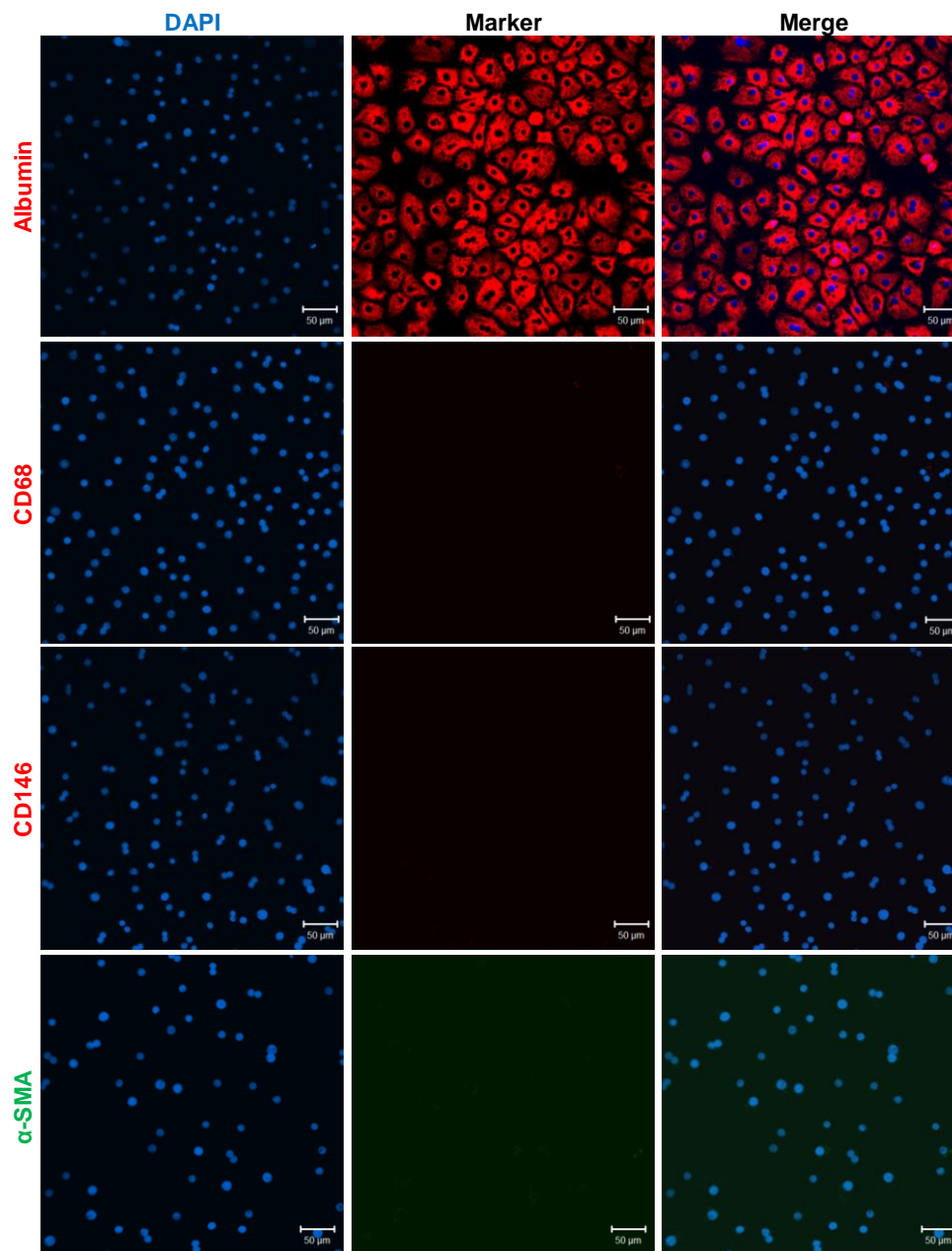
isoliert (2.2.1.2) und in Collagen I beschichtete Kulturplatten ausgesät. Nach der Kultivierung für einen Tag wurden Durchlichtbilder der Zellen aufgenommen. Mikroskopisch betrachtet zeigten die kultivierten Zellen eine für Hepatozyten charakteristische, meist mehrzellkernige und polygonale Morphologie (Abbildung 8).



**Abbildung 8. Morphologie primärer Hepatozyten in Kultur.** PHH wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und in Collagen I beschichtete Kulturplatten ausgesät. Nach einem Tag in Kultur wurden Durchlichtbilder kultivierter PHH bei unterschiedlichen Vergrößerungen (10x, 20x und 40x) mit Hilfe des EVOS™ XL Core Imaging Systems (AMG) aufgenommen.

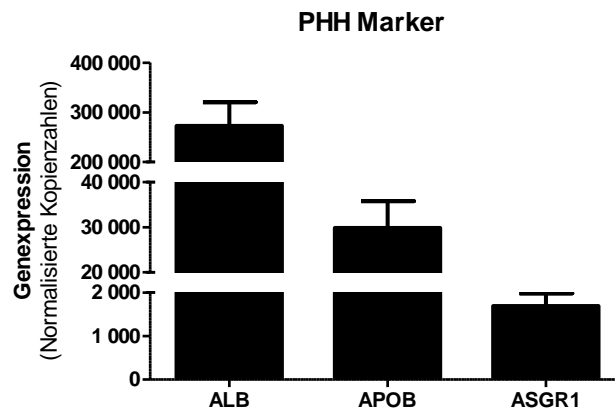
Zur Identifikation der PHH Population wurde der Hepatozyten Marker Albumin immunzytochemisch angefärbt (2.2.3.5). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine starke Albumin Expression in den kultivierten PHH. Zur Quantifizierung der Populationsreinheit wurden die Albumin positiven Zellen sowie die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte Zellkerne) ausgezählt. Dies wurde in jeweils zehn Aufnahmen von fünf unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Hierbei konnte eine Reinheit von  $95,5 \pm 1,7\%$  Albumin positiver Zellen bestimmt werden. Die Zellkernfärbung mittels DAPI zeigte, dass die PHH einen runden und meist doppelten Zellkern aufwiesen (Abbildung 9). Um auszuschließen, dass die Albumin Färbung von der Kultivierung in FBS haltigem Medium herrührt, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Hierzu wurden KC und HSC, die in FBS haltigem Medium kultiviert wurden, analog gefärbt. In diesem Fall war keine unspezifische Albumin Färbung detektierbar. Für die Identifikation von kontaminierenden NPC wurden in der PHH Population die NPC Marker CD68, CD146 und  $\alpha$ -SMA immunzytochemisch angefärbt (2.2.3.5). Als Positivkontrollen dienten die in dieser Arbeit isolierten primären KC, LSEC und HSC Populationen. Die Ergebnisse der Positivfärbungen von CD68, CD146 und  $\alpha$ -SMA werden in den folgenden Abschnitten dargestellt. Die Detektion

der NPC Marker zeigte eine äußerst geringe Kontamination der PHH mit NPC. Somit konnte eine hohe Reinheit der PHH Population dargestellt werden.



**Abbildung 9. Identifikation kultivierter PHH.** Der zelltypspezifische Marker Albumin wurde in der PHH Zellpopulation immunzytochemisch angefärbt. Zur Identifikation kontaminierender NPC wurden die Marker für KC (CD68), LSEC (CD146) und HSC ( $\alpha$ -SMA) in der PHH Population gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem LSM Axiocvert 100M von Zeiss bei 20x Vergrößerung aufgenommen (Maßstabsbalken: 50 $\mu$ m).

Des Weiteren wurde RNA aus kultivierten PHH zwei Tage nach der Zellisolation extrahiert (2.2.2.1) und die Genexpression von Hepatozyten spezifischen Markern mittels qRT-PCR (2.2.2.3) bestimmt (n=10). Kultivierte PHH wiesen eine deutliche Genexpression der Marker Albumin (*ALB*), Apolipoprotein B (*APOB*) und *asialoglycoprotein receptor 1* (*ASGR1*) auf, was auf die Identität von Hepatozyten hinweist (Abbildung 10).

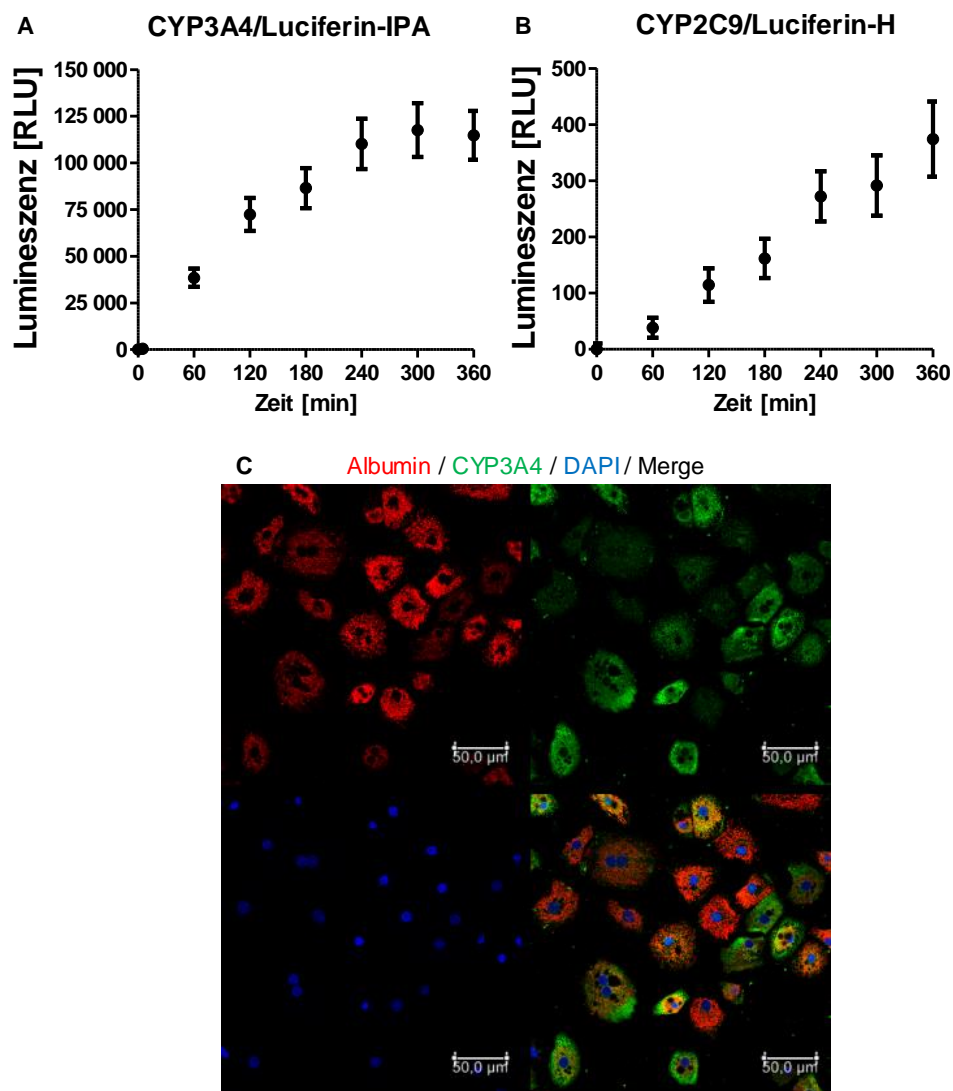


**Abbildung 10. Genexpression Hepatozyten spezifischer Marker durch PHH.** PHH wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und in Collagen I beschichtete Kulturplatten ausgesät. Nach zwei Tagen in Kultur wurde die RNA aus den Zellen isoliert und die Genexpression Hepatozyten spezifischer Marker mittels qRT-PCR bestimmt (n=10). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte der Kopienzahlen (Mittelwert  $\pm$  SEM) normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin.

Hepatozyten exprimieren das Enzym Cytochrom P450, das für die Oxidation von Xenobiotika und endogener Substanzen eine wichtige Rolle spielt (Raucy et al. 2002, Van Booven et al. 2010, Thummel, Wilkinson 1998, Roymans et al. 2004). Aufgrund dessen wurde die physiologische Aktivität der Cytochrom P450 Isoformen 3A4 (CYP3A4) und 2C9 (CYP2C9) untersucht. Hierzu wurden Hepatozyten mit den Substraten der Enzyme (Luciferin-IPA bzw. Luciferin-H), für unterschiedliche Dauer (5min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h und 6h) inkubiert und die Enzymaktivität durch einen Luciferase basierten Assay bestimmt. Hierbei wurde die generierte Lumineszenz in drei unabhängigen biologischen Replikaten gemessen (2.2.3.7). Die Lumineszenzintensität zeigte für beide Isoformen einen eindeutigen zeitabhängigen Anstieg. Der Vergleich beider Enzym Isoformen zeigte eine deutlich höhere Aktivität für die CYP Isoform 3A4 (Abbildung 11 A, B). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse

## Ergebnisse

wurden das Enzym CYP3A4 sowie der PHH Marker Albumin in primären PHH immunzytochemisch gefärbt (2.2.3.5). Die Aufnahmen zeigten eine starke Proteinexpression von CYP3A4 bei gleichzeitiger Expression von Albumin. Darüber hinaus wurden durch die unterschiedlich ausgeprägten CYP3A4 Signale unterschiedliche Aktivitätszustände der PHH erkennbar (Abbildung 11C).

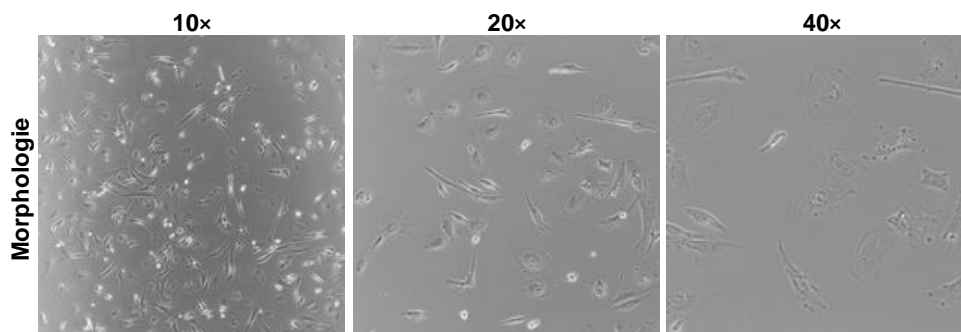


**Abbildung 11. Funktionelle Aktivität kultivierter PHH.** Primäre Hepatozyten wurden aus Lebergewebe isoliert und für einen Tag kultiviert. Anschließend erfolgte die Messung der Aktivität der Enzyme (A) CYP3A4 und (B) CYP2C9 (n=3). Hierzu wurden die Zellen mit dem jeweiligen Substrat für unterschiedliche Dauer (5min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h und 6h) inkubiert. Anschließend erfolgte auf einem Luciferase basierten System die Generierung der Lumineszenz. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte der Lumineszenz (Mittelwert  $\pm$  SEM). (C) Darüber hinaus wurde das Enzym CYP3A4 (grün) sowie der Marker Albumin (rot) in den PHH immunzytochemisch gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) gefärbt (n=3). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem LSM TSC SP8 der Firma Leica bei 40x Vergrößerung aufgenommen (Maßstabsbalken: 50µm).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die isolierten PHH die für Hepatozyten charakteristischen Morphologie Merkmale aufwiesen. Darüber hinaus exprimierten die Zellen Hepatozyten spezifische Marker sowohl auf Protein- als auch auf RNA Ebene, während nur sehr geringe Kontaminationen durch NPC auftraten. Zudem wiesen die Zellen eine physiologische Aktivität in Kultur auf, die durch die Expression und Aktivität des Enzyms CYP3A4 dargestellt wurde. Zusammengenommen konnten PHH mit hoher Reinheit und physiologischer Aktivität aus humanem Lebergewebe isoliert und kultiviert werden.

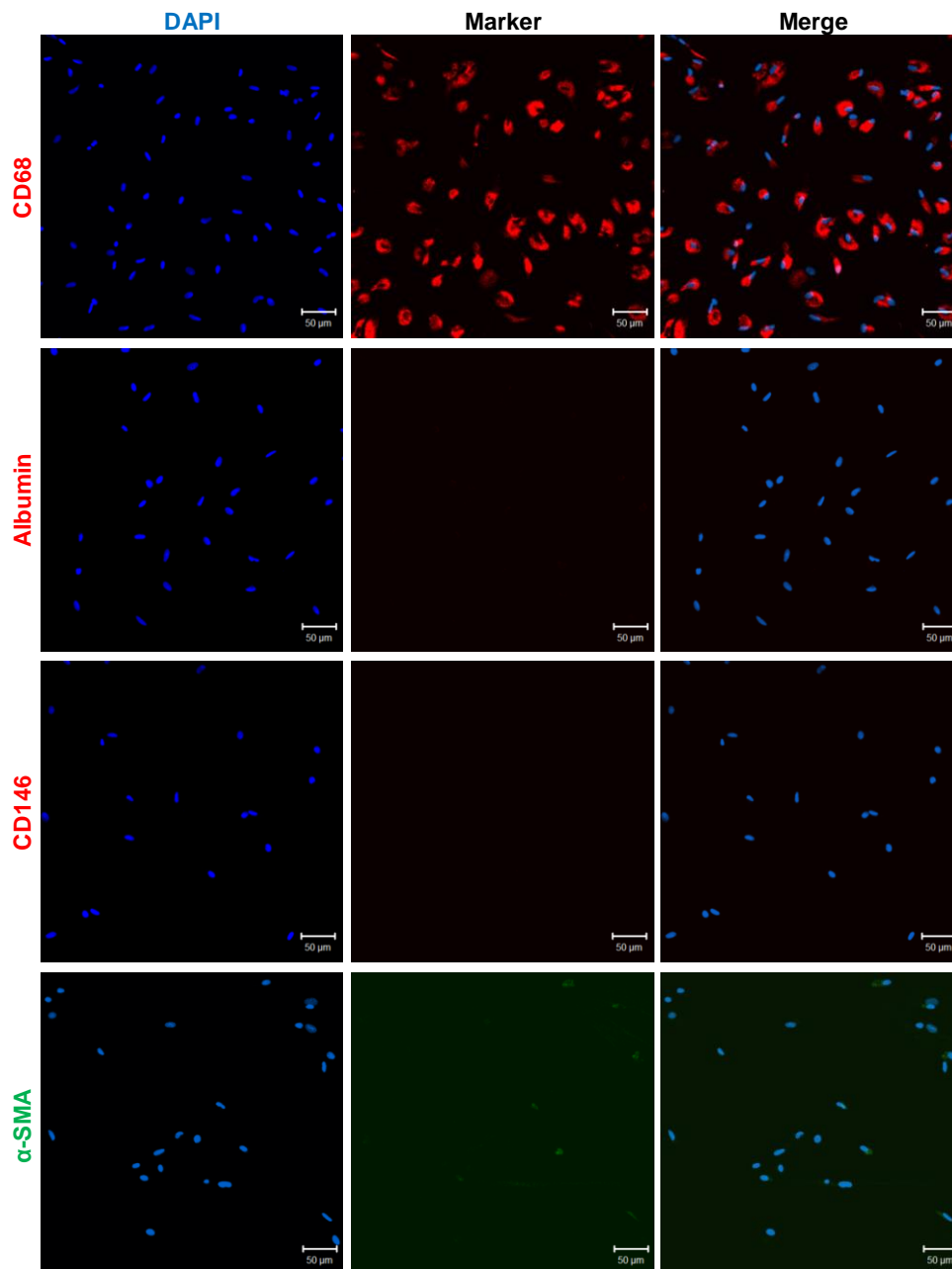
### 3.1.3 Identifikation und Qualität humaner KC

KC wurden von den PHH durch die Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit und von HSC durch eine Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Des Weiteren wurden KC, durch die Markierung mit CD14 *MicroBeads* und MACS, von LSEC separiert. Anschließend wurden die KC ausgesät. Zur Erhöhung der Reinheit der KC Population wurde die Eigenschaft der selektiven Anheftung genutzt. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die KC schneller als die anderen Zellpopulationen an Plastikoberflächen anheften. Nach 30min Inkubation wurden nicht adhärierte Zellen durch einen Wechsel des Kulturmediums entfernt (2.2.1.2). Bis zur Verwendung wurden die Zellen für 5-7 Tage kultiviert. Phasenkontrastaufnahmen zeigten eine für KC typische irreguläre Morphologie, bestehend aus einer gestreckten und einer ovalen Form (Abbildung 12).



**Abbildung 12. Morphologie primärer KC in Kultur.** KC wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und in Kulturplatten ausgesät. Nach 5-7 Tagen in Kultur wurden Durchlichtbilder der Zellen bei unterschiedlichen Vergrößerungen (10x, 20x und 40x) aufgenommen.

Zur Identifikation der KC wurde der Marker CD68 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gefärbt (2.2.3.5). Um die Populationsreinheit zu quantifizieren wurden die CD68 positiven Zellen und die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte Zellkerne) ausgezählt. Dies wurde in jeweils zehn Aufnahmen von fünf unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Die Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie und die quantitative Auswertung ergaben, dass  $94,5 \pm 1,2\%$  CD68 positive KC vorlagen. Darüber hinaus zeigten die Zellkernfärbungen mittels DAPI eine bohnenförmige Zellkernstruktur (Abbildung 13) (Kmiec 2001). Zur Überprüfung der durch PHH, LSEC und HSC verursachten Kontaminationen wurden die Marker Albumin, CD146 und  $\alpha$ -SMA in der KC Population immunzytochemisch gefärbt (2.2.3.5). Als Positivkontrolle der Färbungen diente die jeweils isolierte Zellpopulation. In der Population lagen in seltenen Fällen geringe Kontaminationen durch HSC vor (Abbildung 13).

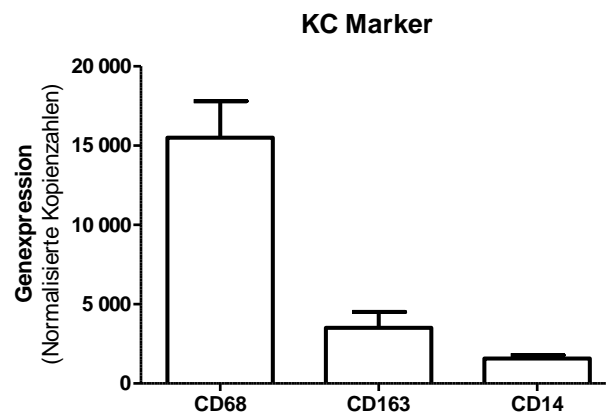


**Abbildung 13. Qualität kultivierter primärer KC.** In der KC Population wurde der KC Marker CD68 immunzytochemisch gefärbt. Zur Identifikation kontaminierender PHH und NPC wurden die Marker für PHH (Albumin), LSEC (CD146) und HSC ( $\alpha$ -SMA) in der KC Population gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem LSM Axiovert 100M von Zeiss bei 20x Vergrößerung aufgenommen (Maßstabsbalken: 50 $\mu$ m).

Um die Identität von KC auf RNA Ebene zu überprüfen, wurde RNA aus kultivierten KC isoliert (2.2.2.1) und die Expression der Makrophagen Marker *CD68*, *CD163* und *CD14* mittels qRT-PCR bestimmt (2.2.2.3) (Fabriek et al. 2005). Alle drei Marker

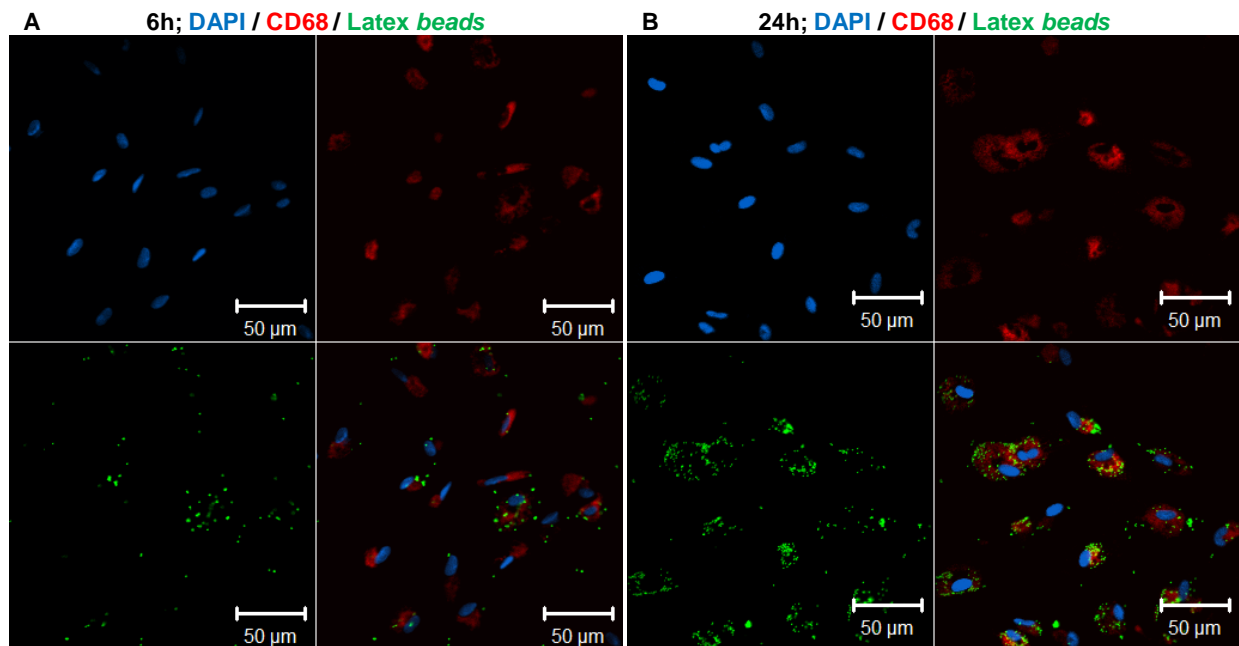


wurden in der KC Population exprimiert, jedoch konnte für *CD68* das höchste Genexpressionslevel verzeichnet werden (Abbildung 14).



**Abbildung 14. Genexpression KC spezifischer Marker.** KC wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und für 5-7 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die Extraktion der RNA und die Detektion der Genexpression von Makrophagen Markern mittels qRT-PCR (n=10). Die Daten repräsentieren Mittelwerte der Kopienzahlen (Mittelwert  $\pm$  SEM), normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin.

KC sind Makrophagen, die bevorzugt Partikel einer Größe von  $\geq 200$ nm phagozytieren (Li et al. 2011). Aufgrund dessen wurden KC mit  $1\mu\text{m}$  großen Latex *beads*, die mit einem Fluorophor konjugiert vorlagen, für 6h und 24h inkubiert (2.2.3.8). Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen zusätzlich mittels eines CD68 spezifischen Antikörpers immunzytochemisch gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigten, dass es nach 6h zu einer Phagozytose der Latex *beads* durch die KC gekommen ist (Abbildung 15A). Nach 24h konnte eine massive Aufnahme und Anreicherung der *beads* innerhalb der Zellen dargestellt werden (Abbildung 15B).



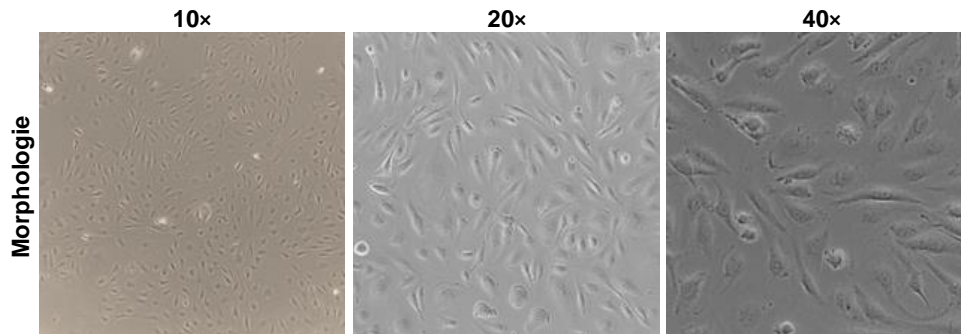
**Abbildung 15. Phagozytotische Aktivität primärer KC.** Die funktionelle Aktivität kultivierter KC wurde durch die Aufnahme von 1µm großen fluoreszenzmarkierter Latex *beads* analysiert. Zusätzlich wurde der Marker CD68 (rot) innerhalb der Zellen fluoreszenzmarkiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem LSM Axiovert 100M von Zeiss bei 40x Vergrößerung aufgenommen (Maßstabsbalken: 50µm).

Zusammenfassend konnte anhand der Morphologie, der Expression der zellspezifischen Marker auf Protein- und RNA Ebene sowie der zeitabhängigen Phagozytose von 1µm großen Latex *beads* gezeigt werden, dass es sich bei der isolierten Zellpopulation um hoch reine und physiologisch aktive Kupffer Zellen handelte.

### 3.1.4 Identifikation und Qualität humaner LSEC

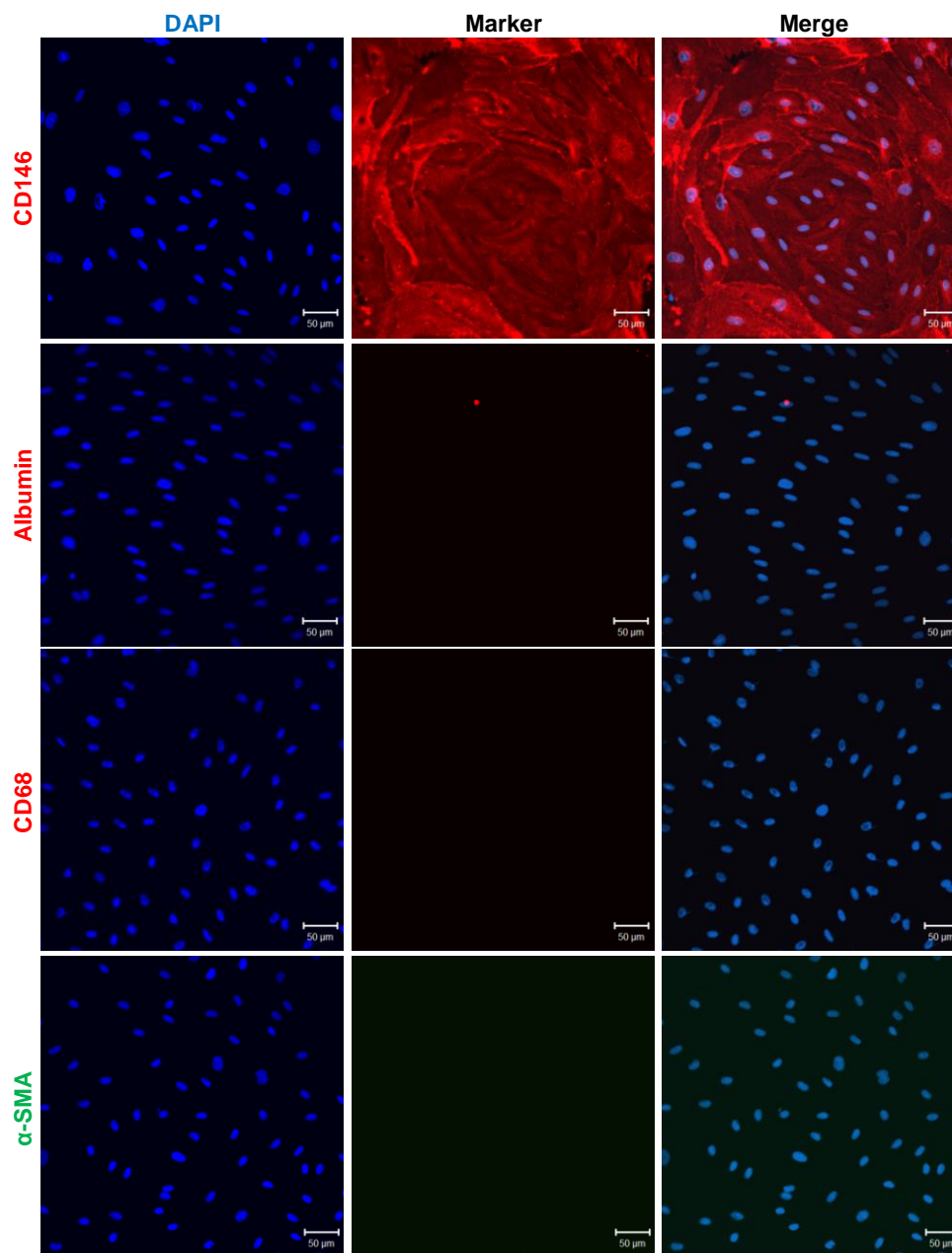
LSEC wurden von PHH und HSC durch die Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit bzw. einer Dichtegradientenzentrifugation separiert. Des Weiteren wurden KC mit Hilfe von CD14<sup>+</sup> *MicroBeads* durch MACS abgetrennt. Anschließend wurden die LSEC unter Verwendung von CD146<sup>+</sup> *MicroBeads* durch MACS gereinigt. Isolierte LSEC wurden auf Collagen I beschichteten Petrischalen unter Verwendung von LSEC Wachstumsmedium ausgesät (2.2.1.2). Unter diesen Bedingungen zeigten die LSEC proliferative Aktivität, sodass die Zellen nach dem

Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz (ca. an Tag fünf nach der Isolation) in Collagen I beschichteten Platten passagiert werden konnten. Nachdem dem erneuten Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurden die Zellen in diversen Experimenten verwendet. In Kultur formten die LSEC eine Monoschicht mit so genannter „Kopfsteinpflaster“-artiger (*cobblestone*) Morphologie (Abbildung 16) (Daneker et al. 1998, Elvevold et al. 2008).

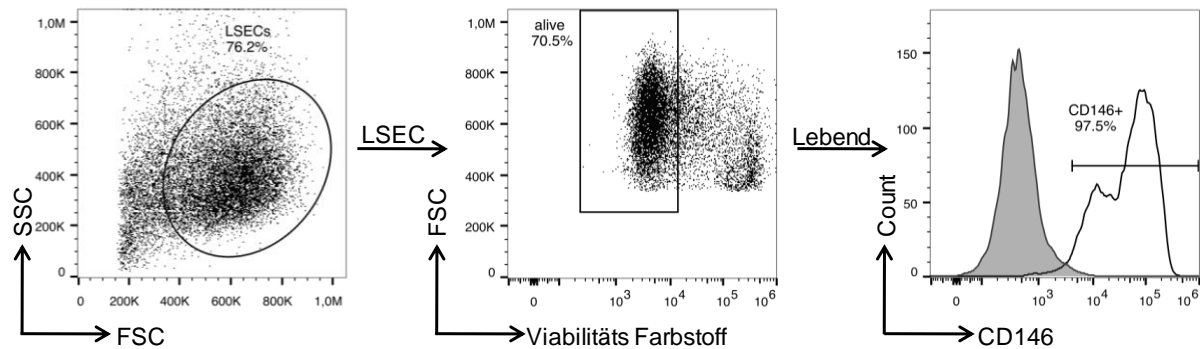


**Abbildung 16. Morphologie primärer LSEC in Kultur.** LSEC wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und in Collagen beschichteten Kulturschalen ausgesät. Nach ca. zehn Tagen in Kultur wurden Durchlichtbilder der Zellen bei unterschiedlichen Vergrößerungen (10x, 20x und 40x) aufgenommen.

Um die Identität der Zellpopulation zu untersuchen, wurde der Marker CD146 in den LSEC immunzytochemisch gefärbt (2.2.3.5). Die Detektion des Markers erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Auszählung der Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte Kerne) sowie der CD146 positiven Zellen, in jeweils zehn Bildern aus jeweils fünf unabhängigen biologischen Replikaten, konnte eine Reinheit von  $97,8 \pm 1,1\%$  CD146 positiver LSEC bestimmt werden. Zur Identifikation von kontaminierenden PHH, KC und HSC wurden die Marker Albumin, CD68 und  $\alpha$ -SMA in der LSEC Population gefärbt. Als Positivkontrollen dienten die jeweiligen isolierten Zellpopulationen. Die Aufnahmen zeigten keine unspezifischen Färbungen und kaum Kontamination durch PHH, KC und HSC (Abbildung 17). Aufgrund der möglichen Anreicherung der LSEC *in vitro* ergab sich die Möglichkeit, die Oberflächenexpression von CD146 mittels Durchflusszytometrie zu detektieren. Hierfür wurden LSEC mit einem Lebendfarbstoff markiert und gleichzeitig der Marker CD146 angefärbt. Die Expression wurde mittels Durchflusszytometrie (2.2.3.6) in drei unabhängigen biologischen Replikaten gemessen. Nach dem Ausschluss von toten Zellen konnte eine Reinheit von  $93,5 \pm 2,6\%$  CD146 positiver LSEC bestimmt werden (Abbildung 18).

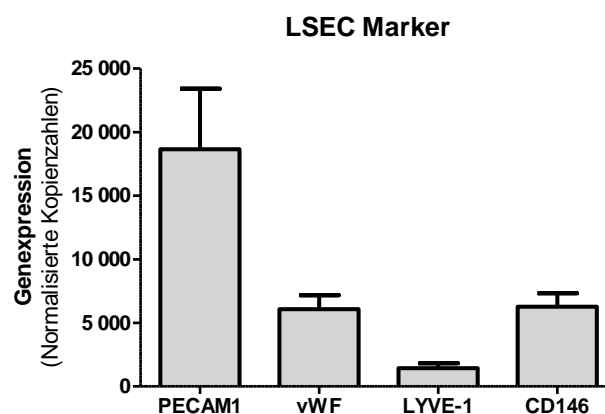


**Abbildung 17. Qualität kultivierter primärer LSEC.** In der LSEC Population wurde der zelltypspezifische Marker CD146 immunozytochemisch gefärbt. Zur Identifikation kontaminierender PHH und NPC in der LSEC Fraktion wurden die Marker für PHH (Albumin), KC (CD68) und HSC ( $\alpha$ -SMA) gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem LSM Axiovert 100M von Zeiss bei 20 $\times$  Vergrößerung aufgenommen (Maßstabsbalken: 50 $\mu$ m).



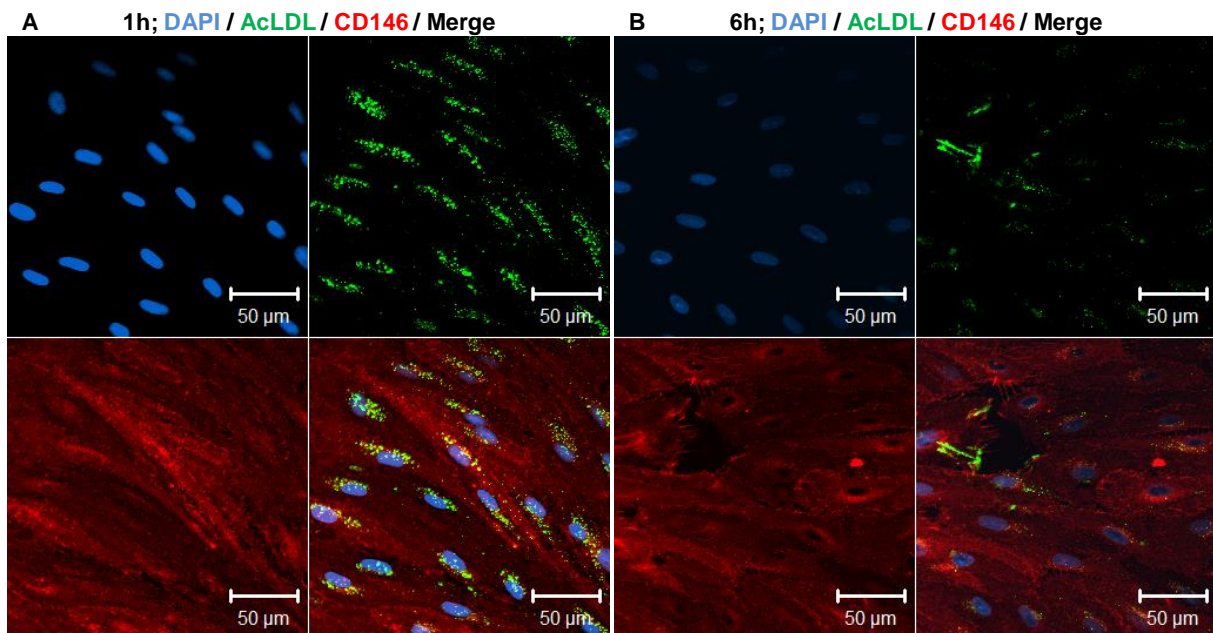
**Abbildung 18. Detektion CD146 positiver LSEC mittels Durchflusszytometrie.** In den LSEC wurde der Marker CD146 immunzytochemisch gefärbt. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen wurden die Zellen analog mit einer Isotypenkontrolle behandelt. Durch die gleichzeitige Verwendung eines Lebendfarbstoffs konnten tote Zellen ausgeschlossen werden. Die Detektion erfolgte am Navios Durchflusszytometer (Beckman Coulter). Die Analyse der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Programms FlowJo (Treestar) durchgeführt. Die Daten zeigen exemplarisch die Detektion CD146 positiver Lebendzellen. SSC (Seitwärtsstreuung), FSC (Vorwärtsstreuung).

Die Genexpression von bekannten zelltypspezifischen Markern wurde zusätzlich auf RNA Ebene überprüft. Hierzu wurde RNA aus primären LSEC extrahiert (2.2.2.1) und die Genexpression der Marker mittels qRT-PCR (2.2.2.3) analysiert (n=10). Die Expressionsanalysen zeigten, dass die LSEC sowohl eine hohe Genexpression von *PECAM1* als auch mäßige Expressionslevel für die Marker von-Willebrand-Faktor (*vWF*), *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE-1)* und *CD146* aufwiesen (Abbildung 19).



**Abbildung 19. Genexpression LSEC spezifischer Marker.** LSEC wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und für ca. zehn Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die Extraktion der RNA und die Detektion der Genexpression von LSEC Markern mittels qRT-PCR (n=10). Die Daten repräsentieren Mittelwerte der Kopienzahlen, normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin.

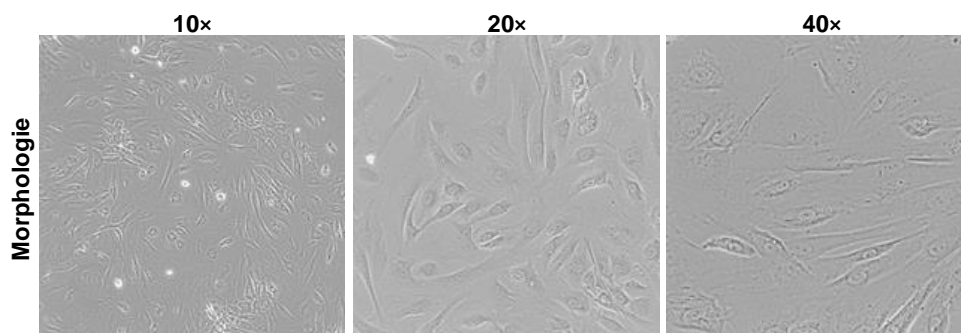
LSEC endozytieren bevorzugt lösliche Makromoleküle, die im Durchmesser  $\leq 200\text{nm}$  sind (Li et al. 2011). Aufgrund dessen wurde die funktionale Aktivität von Endothelzellen *in vitro* durch die Aufnahme von acetyliertem *low-density* Lipoprotein (AcLDL) kontrolliert. Hierzu wurden die LSEC mit  $5\mu\text{g/ml}$  AcLDL-Alexa488 für 1h und 6h kultiviert (2.2.3.9). Anschließend erfolgte die immunzytochemische Färbung des Markers CD146 (2.2.3.5). Die Fluoreszenzaufnahmen zeigten, dass kultivierte LSEC eine hohe Kapazität für die Endozytose von AcLDL aufwiesen. Nach einstündiger Inkubation mit AcLDL kam es zu einer schnellen und definierten Aufnahme in die Zellen (Abbildung 20A). Nach sechs Stunden schien es zu einer Metabolisierung des AcLDL gekommen zu sein, so dass eine deutliche Abnahme der AcLDL spezifischen Fluoreszenzsignale zu beobachten war (Abbildung 20B). Zusammengenommen zeigten kultivierte LSEC eine definierte Morphologie und eine starke Proteinexpression des Markers CD146. Darüber hinaus exprimierten kultivierte LSEC unterschiedliche Endothelzellmarker und zeigten eine zeitabhängige Aufnahme bzw. Metabolisierung von AcLDL, so dass die isolierte Zellpopulation als reine LSEC Kultur definiert werden konnte.



**Abbildung 20. Physiologische Aktivität primärer LSEC in Kultur.** Zur Untersuchung der physiologischen Aktivität primärer LSEC wurden die Zellen mit AcLDL-Alexa488 für 1h (A) und 6h (B) inkubiert. Anschließend wurde der Marker CD146 (rot) innerhalb der LSEC Population gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem LSM Axiovert 100M von Zeiss bei 40x Vergrößerung aufgenommen (Maßstabsbalken: 50µm).

### 3.1.5 Identifikation und Qualität humaner HSC

Die HSC wurden von den PHH mittels Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit separiert. Die unterschiedliche Zelldichte der NPC wurde für die Trennung der HSC von den KC und LSEC mittels einer Dichtegradientenzentrifugation ausgenutzt. Nach der Zentrifugation lagen die HSC in einer Schicht geringerer Dichte (obere Schicht) getrennt von den KC und LSEC als Schicht mit höherer Dichte (untere Schicht) vor. Die HSC wurden abgenommen und die gesamten Zellen wurden in einer Kulturflasche in HSC Wachstumsmedium ausgesät. Die HSC Population zeigte proliferative Aktivität unter Standard Inkubationsbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach dem Erreichen einer 90%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert und unter Verwendung von DMEM, 10% FBS, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin und 2mM L-Glutamin in Plastik Kulturplatten ausgesät (2.2.1.2). Frisch isolierte HSC formten eine sternförmige Morphologie und transformierten innerhalb von 7-10 Tagen in einen aktivierten Zustand, der sich durch einen Myofibroblasten ähnlichen (spindelförmigen) Phänotyp auszeichnete (Abbildung 21) (Sato et al. 2003).

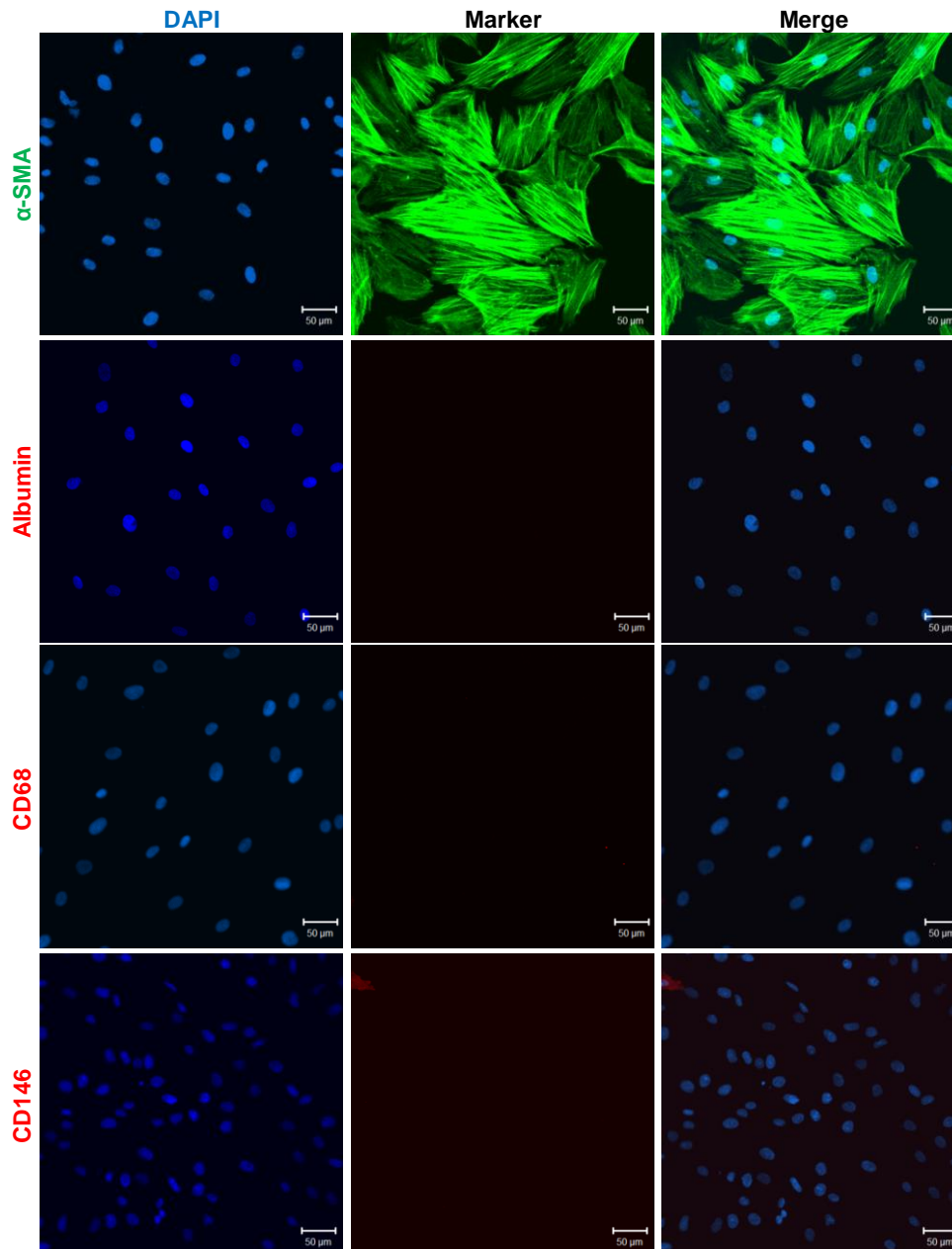


**Abbildung 21. Morphologie primärer HSC in Kultur.** HSC wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und in einer Kulturflasche unter Verwendung von HSC Wachstumsmedium ausgesät. Nach dem Erreichen einer 90%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert und erneut bis zur 80%igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden Durchlichtbilder der HSC bei unterschiedlichen Vergrößerungen (10x, 20x und 40x) mit Hilfe des EVOS™ XL Core Imaging Systems (AMG) aufgenommen.

Bisher sind Marker sowohl für ruhende (*quiescent*) als auch für aktivierte HSC ein häufig diskutiertes Thema (Cassiman et al. 2002, Kawai et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde  $\alpha$ -SMA, ein bekannter Marker für aktivierte Sternzellen (Geerts 2001), immunzytochemisch gefärbt. Die Fluoreszenzbilder zeigten, dass kultivierte HSC die  $\alpha$ -SMA Strukturen ausbildeten, welche den aktivierten Status

belegten. Zur Quantifizierung der Reinheit wurde die Gesamtzellzahl (DAPI gefärbte Kerne) sowie die Anzahl der  $\alpha$ -SMA positiven Zellen in jeweils zehn Bildern aus jeweils fünf unabhängigen biologischen Replikaten bestimmt. Die quantitative Analyse ergab, dass  $97,1 \pm 1,5\%$   $\alpha$ -SMA positive Zellen vorlagen. Darüber hinaus wurden Färbungen gegen Marker für PHH, KC und LSEC durchgeführt, um Kontaminationen zu identifizieren. In seltenen Fällen konnten KC und LSEC detektiert werden. Durch Passagieren der HSC konnte eine erhöhte Reinheit der HSC erreicht werden.

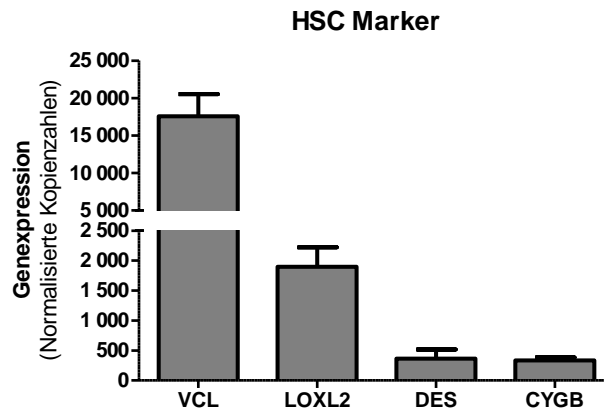




**Abbildung 22. Qualität kultivierter primärer HSC.** HSC wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und für ca. zehn Tage kultiviert und passagiert. Die Identität der kultivierten HSC Zellpopulation wurde durch immunzytochemische Färbungen des Markers  $\alpha$ -SMA analysiert. Zur Identifikation kontaminierender Zellen wurden die Marker für PHH (Albumin), KC (CD68) und LSEC (CD146) immunzytochemisch gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem LSM Axiovert 100M von Zeiss bei 20x Vergrößerung aufgenommen (Maßstabsbalken: 50 $\mu$ m).

Um die Identität von HSC zu validieren, wurde die RNA aus kultivierten Zellen isoliert (2.2.2.1) und die Genexpression von HSC spezifischen Markern mittels qRT-PCR (2.2.2.3) analysiert. Die HSC Population zeigte eine starke Genexpression der

Marker Vinculin (VCL), *lysyl oxidase-like enzyme* (LOXL2) sowie moderate Expressionen der Marker Desmin (DES) und Cytoglobin (CYGB) (Abbildung 23).

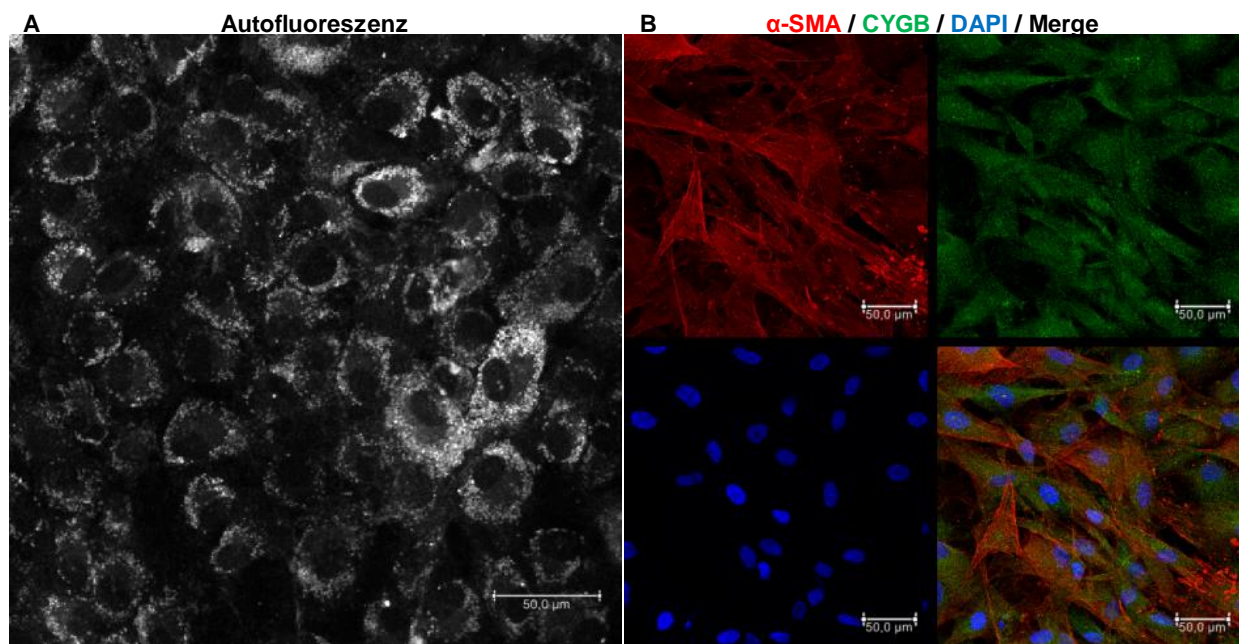


**Abbildung 23. Genexpression HSC spezifischer Marker.** HSC wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und für ca. zehn Tage kultiviert und passagiert. Anschließend erfolgten die Extraktion der RNA und die Detektion der Genexpression von HSC spezifischen Markern mittels qRT-PCR (n=10). Die Daten repräsentieren Mittelwerte der Kopienzahlen (Mittelwert  $\pm$  SEM), normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin.

Aufgrund der charakteristischen Eigenschaft von HSC Vitamin A zu speichern, können Sternzellen durch die Autofluoreszenz identifiziert werden, wenn sie mit Lasern kurzer Wellenlänge angeregt werden (Friedman 2008, Wake 1971). Da die Aktivierung von Sternzellen mit dem Verlust der Vitamin A Speicherung einher geht (Mezaki et al. 2013), wurden HSC verwendet, die für nur ca. fünf Tage kultiviert wurden. Für die Einstellung der Anrengungsbedingungen wurde die volle UV Laser Energie verwendet, um die verbliebenen Signale von Vitamin A zu detektieren. Zusätzlich wurde die BrightR (*brightness reinforcement*) Detektionsmethode angewendet. Diese Methode ist eine vorteilhafte Erweiterung des TCS SP8 Mikroskops von Leica, welches eine Amplifikation schwacher Signale erlaubt, wodurch diese zugänglich gemacht werden können (2.2.3.10). In der HSC Population zeigten die Fluoreszenzaufnahmen unterschiedliche Intensitätsebenen rapide verblassender autofluoreszierender Retinoltropfen (Abbildung 24A). Dieses Phänomen verdeutlichte den unterschiedlichen Aktivierungsstatus der kultivierten Sternzellen. Isolierte HSC besaßen die physiologische Aktivität der Vitamin A Speicherung. Die Autofluoreszenz deutete die Vitamin A Speicherung durch die kultivierten HSC an und somit ihre physiologische Aktivität *in vitro*. Cytoglobin

(CYGB) ist ein Marker zur Unterscheidung von HSC und Myofibroblasten. Darüber hinaus wird der Marker sowohl in ruhenden als auch in aktivierten Sternzellen exprimiert (Motoyama et al. 2014). Um zu analysieren, ob es sich bei der vorliegenden Zellpopulation um HSC handelt, wurde die Proteinexpression von CYGB bei gleichzeitiger  $\alpha$ -SMA Expression dargestellt. Die kultivierten Zellen zeigten eine deutliche Expression sowohl für den Marker  $\alpha$ -SMA als auch für CYGB, so dass die Zellpopulation eindeutig als HSC identifiziert werden konnte (Abbildung 24B).

Zusammengefasst konnte die HSC Population unter anderem durch die Transformation der Zellen von einem inaktiven in einen aktivierten Zustand morphologisch dargestellt werden. Die HSC Identität konnte sowohl durch die Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA und CYGB als auch durch die Genexpression von HSC Markern sowie der Speicherung von Vitamin A belegt werden.



**Abbildung 24. Physiologische Aktivität kultivierter HSC.** HSC wurden aus humanem Lebergewebe isoliert und kultiviert. (A) Nach fünftägiger Inkubation wurden die Vitamin A Autofluoreszenz unter Verwendung des TCS SP8 Mikroskops von Leica mit Hilfe des UV Lasers visualisiert. Hierbei wurde die Detektionsmethode BrightR (*brightness reinforcement*) verwendet, um schwache Signale zu amplifizieren. (B) Nach ca. zehntägiger Inkubation wurde in der HSC Population  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA, rot), als Marker des aktivierten Zustandes, und Cytoglobin (CYGB, grün) als Marker zur Unterscheidung von HSC und Myofibroblasten immunzytochemisch gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) sichtbar gemacht. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem LSM TCS SP8 von Leica bei 40 $\times$  Vergrößerung durchgeführt (Maßstabsbalken, 50 $\mu$ m).

## **3.2 TLR Signaltransduktion in NPC**

Die Rolle der NPC als Teil des angeborenen Immunsystems für die Abwehr gegen hepatotrope Viren (z. B. HCV) ist nicht vollständig geklärt. Aufgrund dessen sollte in der vorliegenden Arbeit die TLR Signalwege und die antivirale Aktivität primärer humaner NPC untersucht werden. Hierzu wurden KC, LSEC und HSC, aus Gewebe von Leberresektaten oder explantierter Lebern isoliert (2.2.1.2). Die isolierten und kultivierten Zellen wurden in unterschiedlichen Experimenten verwendet, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

### **3.2.1 Genexpression der TLR in primären NPC**

TLR sind wichtige PRR des angeborenen Immunsystems und spielen eine entscheidende Rolle zur Abwehr von Pathogenen wie dem HCV. In der vorliegenden Arbeit soll die TLR Signaltransduktion in primären NPC untersucht werden. Hierfür wurden NPC isoliert und für unterschiedliche Dauer kultiviert (2.2.1.2). Daraufhin wurden die Zellen mit den Agonisten von TLR1-9 für 24h stimuliert und die RNA aus den Zellen extrahiert (2.2.2.1). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Genexpressionslevel von TLR1-9 mittels qRT-PCR (2.2.2.3). Hierbei wurden die Expressionslevel sowohl im unbehandelten Zustand (w/o) als auch nach Stimulation des Rezeptors durch den jeweiligen Liganden bestimmt (n=6) (Tabelle 20). Die Ergebnisse zeigten, dass KC hohe Level an TLR1-4 und TLR6-8 sowie mäßige RNA Kopienzahlen an TLR5 exprimierten. Im Falle von TLR2 und TLR3 kam es nach der Stimulation des Rezeptors zu einer signifikanten Induktion des Rezeptor Genexpressionslevel. Im Gegensatz dazu erfolgte nach der Stimulation von TLR4-7 eine signifikante Suppression der Rezeptor Genexpression. LSEC und HSC exprimierten hohe Level an TLR3 und TLR4 sowie mäßige Level an TLR1, TLR2, TLR5-8. Durch die Stimulation mit dem jeweiligen Liganden kam es in LSEC und HSC zu einer Induktion der TLR3 Genexpression. Darüber hinaus kam es zu einer Suppression der Expression von TLR4 und TLR6 in LSEC sowie TLR4, TLR5 und TLR6 in HSC. In allen drei Zelltypen lag die TLR9 Genexpression unterhalb des Detektionslimits.

Tabelle 20. TLR Genexpression in kultivierten NPC

KC					
	w/o		Liganden Stimulation		
Gen	MW	± SEM	MW	± SEM	P-Wert Signifikanz
<i>TLR1</i>	819,3	± 155,5	828,1	± 225,7	0,974 n.s.
<i>TLR2</i>	<b>780,2</b>	± <b>142,0</b>	<b>4.775,2</b>	± <b>1.275,8</b>	<b>0,010</b> **
<i>TLR3</i>	<b>651,2</b>	± <b>66,4</b>	<b>4.759,3</b>	± <b>937,7</b>	<b>0,001</b> **
<i>TLR4</i>	<b>678,7</b>	± <b>139,2</b>	<b>189,6</b>	± <b>21,9</b>	<b>0,005</b> **
<i>TLR5</i>	<b>78,7</b>	± <b>21,0</b>	<b>9,1</b>	± <b>2,1</b>	<b>0,007</b> **
<i>TLR6</i>	<b>481,8</b>	± <b>73,9</b>	<b>232,0</b>	± <b>49,3</b>	<b>0,011</b> *
<i>TLR7</i>	<b>220,1</b>	± <b>59,8</b>	<b>48,2</b>	± <b>9,6</b>	<b>0,015</b> *
<i>TLR8</i>	540,3	± 170,6	193,4	± 39,1	0,071 n.s.
<i>TLR9</i>	n.d.		n.d.		
LSEC					
	w/o		Liganden Stimulation		
Gen	MW	± SEM	MW	± SEM	P-Wert Signifikanz
<i>TLR1</i>	57,9	± 14,9	48,5	± 13,2	0,639 n.s.
<i>TLR2</i>	94,0	± 20,6	159,1	± 50,2	0,254 n.s.
<i>TLR3</i>	<b>386,4</b>	± <b>53,7</b>	<b>4.013,5</b>	± <b>577,1</b>	<b>0,000</b> ***
<i>TLR4</i>	<b>899,5</b>	± <b>226,8</b>	<b>195,2</b>	± <b>12,4</b>	<b>0,010</b> *
<i>TLR5</i>	6,6	± 1,3	5,0	± 0,9	0,304 n.s.
<i>TLR6</i>	<b>127,7</b>	± <b>19,2</b>	<b>78,9</b>	± <b>11,3</b>	<b>0,043</b> *
<i>TLR7</i>	6,1	± 1,5	3,5	± 1,2	0,199 n.s.
<i>TLR8</i>	7,8	± 2,1	7,1	± 2,1	0,816 n.s.
<i>TLR9</i>	n.d.		n.d.		
HSC					
	w/o		Liganden Stimulation		
Gen	MW	± SEM	MW	± SEM	P-Wert Signifikanz
<i>TLR1</i>	81,6	± 19,9	48,4	± 4,5	0,129 n.s.
<i>TLR2</i>	115,8	± 64,9	87,7	± 29,6	0,699 n.s.
<i>TLR3</i>	<b>629,8</b>	± <b>91,6</b>	<b>4.280,3</b>	± <b>440,5</b>	<b>0,000</b> ***
<i>TLR4</i>	<b>328,0</b>	± <b>55,7</b>	<b>146,9</b>	± <b>23,6</b>	<b>0,009</b> ***
<i>TLR5</i>	<b>4,7</b>	± <b>1,4</b>	<b>1,5</b>	± <b>0,3</b>	<b>0,040</b> *
<i>TLR6</i>	<b>114,5</b>	± <b>11,5</b>	<b>72,5</b>	± <b>7,3</b>	<b>0,006</b> **
<i>TLR7</i>	9,0	± 3,3	6,0	± 2,0	0,439 n.s.
<i>TLR8</i>	6,2	± 3,1	1,4	± 0,3	0,153 n.s.
<i>TLR9</i>	n.d.		n.d.		

Die Daten repräsentieren die Kopienzahlen als Mittelwerte (MW) ± SEM, normalisiert auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin. Signifikante Änderungen nach vierundzwanzigstündiger Stimulation mit dem jeweiligen TLR Liganden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001). n.d. (nicht detektierbar); n.s.(nicht signifikant).

### **3.2.2 Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine in NPC**

Bisher konnte gezeigt werden, dass primäre NPC TLR exprimieren. Nun sollte geprüft werden, ob ein funktionell aktives Toll-*like* Rezeptorsystem in kultivierten NPC vorliegt. Hierzu wurden kultivierte KC, LSEC und HSC mit TLR Liganden stimuliert (2.2.1.3). Nach 6h Inkubation wurde die RNA isoliert (2.2.2.1) und die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 mittels qRT-PCR (2.2.2.3) untersucht (n=15). IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 wurden von allen drei Zelltypen auf RNA Ebene exprimiert (Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 23). Die Genexpression der Zytokine konnte mittels TLR Stimulation durch die jeweiligen Liganden in einer zelltypabhängigen Weise deutlich induziert werden. KC zeigten im Vergleich zu LSEC und HSC die höchste Genexpression von TNF- $\alpha$  und IL-10. Im Gegensatz dazu wiesen HSC die höchste Expression von IL-6 auf.

Tabelle 21. Genexpression inflammatorischer Zytokine nach TLR Stimulation in KC

KC					
Stimulation	<i>IL-6</i>		Signifikanz	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	
	MW $\pm$ SEM			MW $\pm$ SEM	Signifikanz
w/o	9.862,3 $\pm$ 2.128,5			352,7 $\pm$ 42,4	
TLR1/2	<b>35.275,5 <math>\pm</math> 5.080,3</b>		***	<b>2.509,5 <math>\pm</math> 395,5</b>	***
TLR2	<b>47.645,5 <math>\pm</math> 7.852,1</b>		***	<b>4.297,4 <math>\pm</math> 940,1</b>	***
TLR3	<b>27.112,3 <math>\pm</math> 4.233,8</b>		***	<b>2.523,1 <math>\pm</math> 360,0</b>	***
TLR4	<b>49.002,0 <math>\pm</math> 8.927,0</b>		***	<b>2.833,9 <math>\pm</math> 569,2</b>	***
TLR5	<b>87.368,8 <math>\pm</math> 11.585,9</b>		***	<b>10.402,4 <math>\pm</math> 2.067,9</b>	***
TLR2/6	<b>39.569,6 <math>\pm</math> 5.965,4</b>		***	<b>3.599,6 <math>\pm</math> 954,8</b>	**
TLR7	<b>56.604,8 <math>\pm</math> 10.009,9</b>		***	<b>9.387,8 <math>\pm</math> 1.389,0</b>	***
TLR8	<b>24.331,4 <math>\pm</math> 3.313,7</b>		***	<b>3.358,6 <math>\pm</math> 731,1</b>	***
TLR9	12.280,9 $\pm$ 2.598,3		n.s.	<b>695,6 <math>\pm</math> 75,0</b>	***

Stimulation	<i>IL-10</i>		Signifikanz
	MW $\pm$ SEM		
w/o	148,9 $\pm$ 33,4		
TLR1/2	233,4 $\pm$ 31,4		n.s.
TLR2	<b>467,4 <math>\pm</math> 69,3</b>		***
TLR3	151,8 $\pm$ 26,4		n.s.
TLR4	<b>346,7 <math>\pm</math> 78,8</b>		*
TLR5	<b>544,9 <math>\pm</math> 80,0</b>		***
TLR2/6	<b>270,0 <math>\pm</math> 45,7</b>		*
TLR7	<b>533,9 <math>\pm</math> 89,3</b>		***
TLR8	233,5 $\pm$ 54,1		n.s.
TLR9	178,2 $\pm$ 35,9		n.s.

Die Daten repräsentieren die Kopienzahlen als Mittelwerte (MW)  $\pm$  SEM, normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin. Signifikante Änderungen nach sechsständiger Stimulation mit dem jeweiligen TLR Liganden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001). n.s.(nicht signifikant).

## Ergebnisse

Tabelle 22. Genexpression inflammatorischer Zytokine nach TLR Stimulation in LSEC

LSEC					
Stimulation	<i>IL-6</i>		Signifikanz	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	
	MW $\pm$ SEM			MW $\pm$ SEM	Signifikanz
w/o	3.156,1	728,0		244,0 $\pm$ 46,6	
TLR1/2	4.428,9 $\pm$ 740,2		n.s.	<b>512,4 <math>\pm</math> 100,4</b>	*
TLR2	4.160,7 $\pm$ 780,4		n.s.	<b>522,4 <math>\pm</math> 103,2</b>	*
TLR3	<b>13.250,3 <math>\pm</math> 3.062,5</b>		**	<b>720,9 <math>\pm</math> 128,3</b>	**
TLR4	<b>5.853,4 <math>\pm</math> 919,8</b>		*	<b>710,6 <math>\pm</math> 155,5</b>	**
TLR5	<b>14.118,1 <math>\pm</math> 5.035,4</b>		*	<b>896,8 <math>\pm</math> 148,9</b>	***
TLR2/6	<b>7.576,4 <math>\pm</math> 913,4</b>		***	<b>791,0 <math>\pm</math> 129,3</b>	***
TLR7	4.165,8 $\pm$ 630,7		n.s.	326,6 $\pm$ 84,2	n.s.
TLR8	3.944,8 $\pm$ 640,4		n.s.	<b>493,5 <math>\pm</math> 102,6</b>	*
TLR9	2.527,5 $\pm$ 508,4		n.s.	216,0 $\pm$ 40,0	n.s.

Stimulation	<i>IL-10</i>		Signifikanz
	MW $\pm$ SEM		
w/o	40,3 $\pm$ 9,2		
TLR1/2	52,0 $\pm$ 12,1		n.s.
TLR2	46,6 $\pm$ 11,2		n.s.
TLR3	74,1 $\pm$ 14,2		n.s.
TLR4	58,3 $\pm$ 11,9		n.s.
TLR5	<b>94,1 <math>\pm</math> 18,7</b>		*
TLR2/6	64,7 $\pm$ 12,5		n.s.
TLR7	44,0 $\pm$ 9,8		n.s.
TLR8	34,7 $\pm$ 5,2		n.s.
TLR9	32,9 $\pm$ 6,3		n.s.

Die Daten repräsentieren die Kopienzahlen als Mittelwerte (MW)  $\pm$  SEM, normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin. Signifikante Änderungen nach sechsständiger Stimulation mit dem jeweiligen TLR Liganden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001). n.s.(nicht signifikant).



## Ergebnisse

Tabelle 23. Genexpression inflammatorischer Zytokine nach TLR Stimulation in HSC

HSC					
Stimulation	<i>IL-6</i>		Signifikanz	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	
	MW $\pm$ SEM			MW $\pm$ SEM	Signifikanz
w/o	11.396,2 $\pm$ 1.388,1			61,3 $\pm$ 15,5	
TLR1/2	<b>38.148,5 <math>\pm</math> 4.652,1</b>		***	<b>316,9 <math>\pm</math> 83,9</b>	**
TLR2	<b>40.810,2 <math>\pm</math> 5.489,9</b>		***	<b>810,0 <math>\pm</math> 273,6</b>	*
TLR3	<b>54.436,2 <math>\pm</math> 5.968,9</b>		***	152,5 $\pm$ 40,4	*
TLR4	<b>63.691,4 <math>\pm</math> 7.048,1</b>		***	<b>476,6 <math>\pm</math> 163,9</b>	*
TLR5	<b>132.965,1 <math>\pm</math> 28.404,6</b>		***	<b>899,9 <math>\pm</math> 211,7</b>	***
TLR2/6	<b>53.066,1 <math>\pm</math> 13.437,0</b>		**	<b>319,3 <math>\pm</math> 77,5</b>	**
TLR7	<b>51.273,5 <math>\pm</math> 13.121,3</b>		**	<b>489,7 <math>\pm</math> 161,7</b>	*
TLR8	<b>31.228,8 <math>\pm</math> 8.693,9</b>		*	<b>248,1 <math>\pm</math> 87,5</b>	*
TLR9	15.212,0 $\pm$ 3.002,6		n.s.	71,5 $\pm$ 13,7	n.s.

Stimulation	<i>IL-10</i>		Signifikanz
	MW $\pm$ SEM		
w/o	12,2 $\pm$ 3,5		
TLR1/2	25,2 $\pm$ 8,7		n.s.
TLR2	<b>43,5 <math>\pm</math> 13,4</b>		*
TLR3	22,2 $\pm$ 5,8		n.s.
TLR4	<b>41,1 <math>\pm</math> 11,8</b>		*
TLR5	<b>57,0 <math>\pm</math> 14,4</b>		**
TLR2/6	24,4 $\pm$ 5,7		n.s.
TLR7	24,0 $\pm$ 5,9		n.s.
TLR8	20,2 $\pm$ 4,3		n.s.
TLR9	13,8 $\pm$ 3,4		n.s.

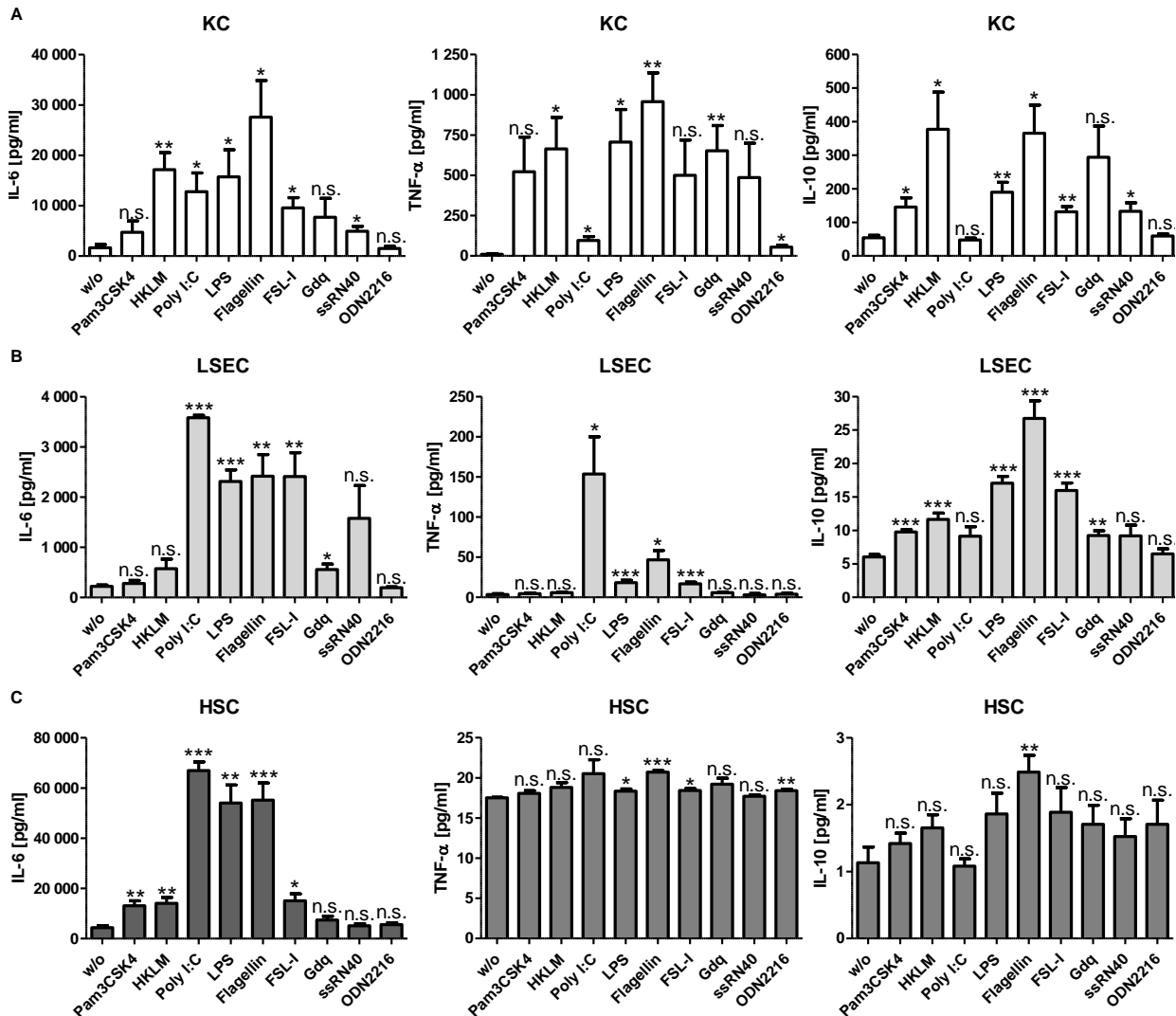
Die Daten repräsentieren die Kopienzahlen als Mittelwerte (MW)  $\pm$  SEM, normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin. Signifikante Änderungen nach sechsständiger Stimulation mit dem jeweiligen TLR Liganden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001). n.s.(nicht signifikant).

Bisher konnte gezeigt werden, dass primäre NPC inflammatorische Zytokine auf RNA Ebene exprimieren. Im Anschluss war es das Ziel, die Zytokinproduktion auf

Proteinebene zu analysieren. Hierzu wurden kultivierte NPC für 24h mit TLR Liganden stimuliert (2.2.1.3). Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und auf die Sekretion von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 mittels ELISA (2.2.3.11) untersucht (n=3). KC zeigten eine hohe basale Sekretion von IL-6 ( $1.647,4 \pm 632,5$  pg/ml). Die Stimulation mit HKLM, Poly I:C, LPS, Flagellin, FSL-1 und ssRNA40 führte zu signifikant erhöhter IL-6 Sekretion. In unbehandelten KC war das TNF- $\alpha$  Proteinlevel sehr gering ( $10,2 \pm 4,3$  pg/ml). Die Stimulation mit TLR Agonisten führte zu einer signifikanten Induktion auf ein Maximum nach der Flagellin Stimulation ( $957,0 \pm 178,9$  pg/ml) (Abbildung 25A). Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wurde in unbehandelten Zellen ( $54,3 \pm 7,1$  pg/ml) sowie nach der Stimulation mit Poly I:C und ODN2216 in KC nur schwach sezerniert. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der KC mit PAM3CSK4 ( $145,4 \pm 27,6$  pg/ml), HKLM ( $377,0 \pm 110,9$  pg/ml), LPS ( $189,9 \pm 29,4$  pg/ml), Flagellin ( $365,3 \pm 84,0$  pg/ml), FSL-1 ( $365,3 \pm 84,0$  pg/ml), Gdq ( $293,8 \pm 93,0$  pg/ml) oder ssRNA40 ( $133,1 \pm 25,2$  pg/ml) zu einer signifikanten Sekretion von IL-10 (Abbildung 25A). Die IL-6 Sekretion in LSEC lag auf einem mäßigen Niveau ( $223,5 \pm 25,5$  pg/ml), konnte jedoch nach Stimulation mit Poly I:C auf ein Maximum von  $3.582,7 \pm 47,2$  pg/ml erhöht werden. Die Behandlung mit LPS, Flagellin oder FSL-I führte zu einem vergleichbaren Ausmaß der IL-6 Sekretion (Abbildung 25B). Die TNF- $\alpha$  Sekretion war sehr gering in unbehandelten LSEC ( $3,4 \pm 1,1$  pg/ml) und schien auf die Aktivierung durch Poly I:C ( $153,5 \pm 46,5$  pg/ml), LPS ( $18,4 \pm 2,8$  pg/ml), Flagellin ( $46,7 \pm 11,6$  pg/ml) und FSL-1 ( $16,9 \pm 2,0$  pg/ml) begrenzt zu sein. Auch die basale Sekretion von IL-10 war in LSEC sehr gering ( $6,0 \pm 0,4$  pg/ml). Diese konnte nach der Stimulation mit PAM3CSK4 ( $9,8 \pm 0,3$  pg/ml), HKLM ( $11,6 \pm 0,9$  pg/ml), LPS ( $17,1 \pm 1,0$  pg/ml), Flagellin ( $26,7 \pm 2,6$  pg/ml), FSL-1 ( $16,0 \pm 1,1$  pg/ml) und Gdq ( $9,2 \pm 0,7$  pg/ml) signifikant erhöht werden (Abbildung 25B). HSC zeigten eine relativ hohe basale Expression von IL-6 ( $4.402,6 \pm 804,3$  pg/ml), die durch die Stimulation mit Pam3CSK4 ( $24.362,1 \pm 7.509,6$  pg/ml), HKLM ( $27.7669 \pm 9.119,8$  pg/ml) und FSL-I ( $28.256,0 \pm 8.875,6$  pg/ml) erhöht werden konnte. Des Weiteren wurde die maximale Sekretion nach der Aktivierung durch Poly I:C ( $66.950,4 \pm 3.467,1$  pg/ml), LPS ( $54.034,3 \pm 7.200,1$  pg/ml) und Flagellin ( $55.203,0 \pm 6.839,6$  pg/ml) erreicht. Das Level der TNF- $\alpha$  Sekretion war in HSC sehr gering ( $17,5 \pm 0,1$  pg/ml). Dieses konnte durch die Behandlung mit TLR Liganden nur

## Ergebnisse

geringfügig erhöht werden. In unbehandelten HSC war die IL-10 Sekretion extrem gering ( $1,1 \pm 0,2$  pg/ml) und konnte durch die Aktivierung von TLR nicht erhöht werden (Abbildung 25C).



**Abbildung 25. TLR induzierte Sekretion inflammatorischer Zytokine in primären humanen NPC.** Primäre (A) KC, (B) LSEC und (C) HSC wurden mit den Liganden für TLR1-9 für 24h stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und auf die Sekretion von IL-6, TNF-α und IL-10 mittels ELISA analysiert (n=3). Signifikante Änderungen nach vierundzwanzigstündiger Stimulation mit dem jeweiligen TLR Liganden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001). n.s.(nicht signifikant).

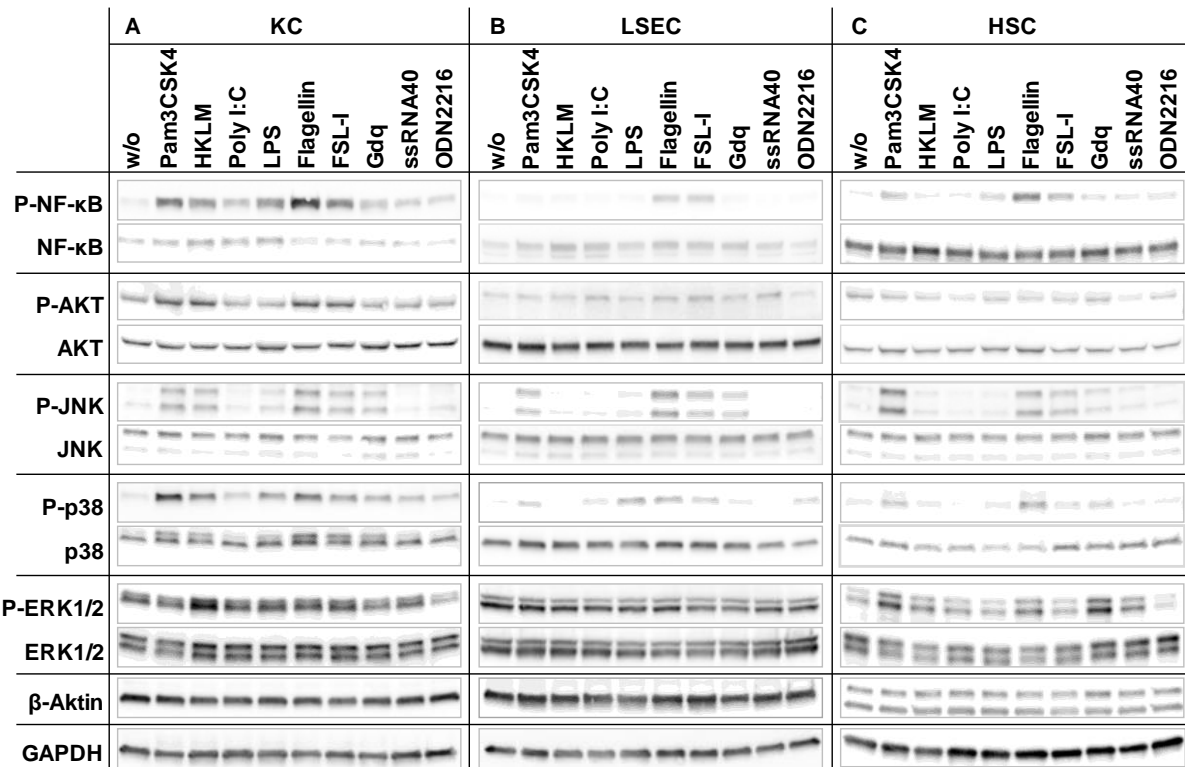
Der Vergleich der drei Zelltypen identifizierte KC als Hauptquelle für die Produktion von TNF-α und IL-10. Darüber hinaus wurde IL-6 sowohl von KC als auch von HSC in hohem Maße produziert. Die TLR Aktivierung führte zu einer zelltypabhängigen

Expression und Sekretion von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 in humanen KC, LSEC und HSC. Folglich konnte eine intakte Aktivierung der TLR Signalwege in kultivierten primären NPC dargestellt werden.

### 3.2.3 Signaltransduktion in TLR stimulierten NPC

NPC exprimieren eine Reihe an PRR, um Pathogene wie Viren und Bakterien zu erkennen. Nach der Erkennung von pathogenen Strukturen werden die Zellen aktiviert und *downstream* Signalkaskaden werden initiiert, wodurch Verteidigungsmechanismen ausgelöst werden. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Signalkaskaden (NF- $\kappa$ B, AKT, JNK1/2, p38 und ERK1/2) nach Stimulation der TLR durch ihre Liganden analysiert. Hierfür wurden kultivierte NPC mit TLR Liganden für 30min stimuliert, die Proteinlysate gesammelt und diese zur Analyse der genannten Signalwege mittels Western Blot verwendet (n=3). In KC wurde der NF- $\kappa$ B Signalweg durch die Stimulation aller TLR Liganden aktiviert. Insbesondere wurden die Signalwege AKT, JNK und p38 durch die Stimulation mit PAM3CSK4, Flagellin und FSL-1 aktiviert. Letzterer Signalweg wurde zusätzlich durch die Aktivierung mit LPS und Gdq stimuliert (Abbildung 26A). In LSEC führte die Stimulation mit Flagellin und FSL-I zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B, JNK und p38 Kaskaden. Zusätzlich wurde JNK durch die Stimulation mit PAM3CSK4 und Gdq induziert. Der p38 Signalweg wurde zusätzlich durch die Stimulation von PAM3CSK4, Poly I:C, LPS, Gdq und ODN2216 aktiviert (Abbildung 26B). In HSC führt die TLR Aktivierung durch PAM3CSK4, Flagellin und FSL-1 primär zur Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B, JNK und p38 (Abbildung 26C). In allen getesteten NPC lag eine Grundaktivierung des AKT und ERK Signalweges vor, wodurch vermutet werden konnte, dass diese eine eher untergeordnete Rolle in der TLR vermittelten Signalweiterleitung spielten. Zusammenfassend führten die TLR Stimulationen in NPC zu einer zelltypspezifischen Aktivierung unterschiedlicher Signalwege.

## Ergebnisse

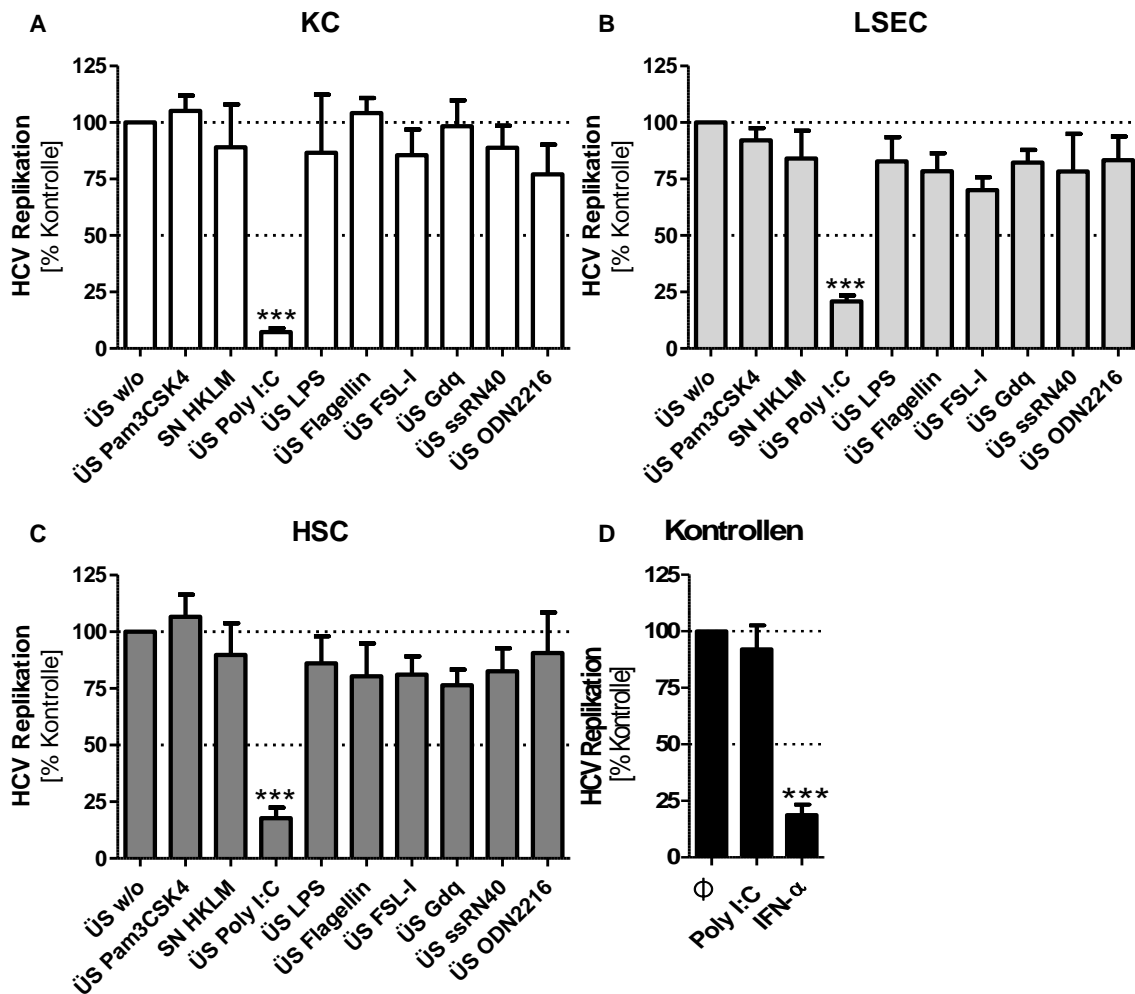


**Abbildung 26. TLR vermittelte Signalwege in primären NPC.** Kultivierte humane (A) KC, (B) LSEC und (C) HSC wurden mit TLR Liganden für 30min stimuliert. Die Gesamtproteinextrakte wurden isoliert und die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege mittels Western Blot analysiert. Als Ladungskontrollen dienten die Proteine  $\beta$ -Aktin oder GAPDH. Die Abbildungen zeigen exemplarische Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen biologischen Replikaten.

### **3.3 Antivirale Immunantwort primärer NPC**

#### **3.3.1 Antivirale Aktivität von NPC nach TLR Stimulation**

In der vorliegenden Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass kultivierte primäre NPC eine hohe Reinheit aufwiesen, funktionell aktiv waren und ein intaktes TLR Signaling vorwiesen. Auf dieser Grundlage sollte nun die antivirale Kapazität der humanen NPC gegenüber dem HCV untersucht werden. Hierzu wurden kultivierte NPC mit TLR Liganden für 24h stimuliert und die Überstände gesammelt. Daraufhin wurde die Zelllinie Con1, die ein subgenomisches HCV Replikon trägt, mit den Zellkulturüberständen für 72h stimuliert und die RNA isoliert. Die antivirale Aktivität der NPC wurde durch Messung der HCV Replikation mittels qRT-PCR bestimmt (n=4). Die ermittelten Kopienzahlen wurden auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin normalisiert. Zusätzlich wurden Con1 Zellen mit 50 $\mu$ g/ml Poly I:C bzw. 200U/ml IFN- $\alpha$  behandelt, um zum einen den direkten antiviralen Effekt des Liganden auszuschließen und zum anderen eine antivirale Positivkontrolle zu erhalten. Die Ergebnisse der HCV Replikation zeigten, dass ausschließlich durch die Zellkulturüberstände Poly I:C stimulierter NPC ein antiviraler Effekt gegenüber dem HCV vermittelt wurde. Im Gegensatz dazu führten die Kulturüberstände von NPC, die mit den übrigen TLR Liganden behandelt wurden, zu keiner signifikanten Änderung der HCV Replikation. Die HCV Replikation wurde durch Poly I:C stimulierte KC um 95,3 $\pm$ 1,1% (Abbildung 27A), durch LSEC (Abbildung 27B) um 81,4 $\pm$ 11,3% und durch HSC um 74,7 $\pm$ 9,9% (Abbildung 27C) verringert. Der Ligand Poly I:C selbst führte zu keiner Beeinflussung der HCV Replikation in Con1 Zellen. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit IFN- $\alpha$  zu einer starken antiviralen Antwort mit einer Suppression der HCV Replikation um (71,1 $\pm$ 6,6%) (Abbildung 27D). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass NPC nur nach der TLR3 Aktivierung ein antivirales Potential entwickelten.

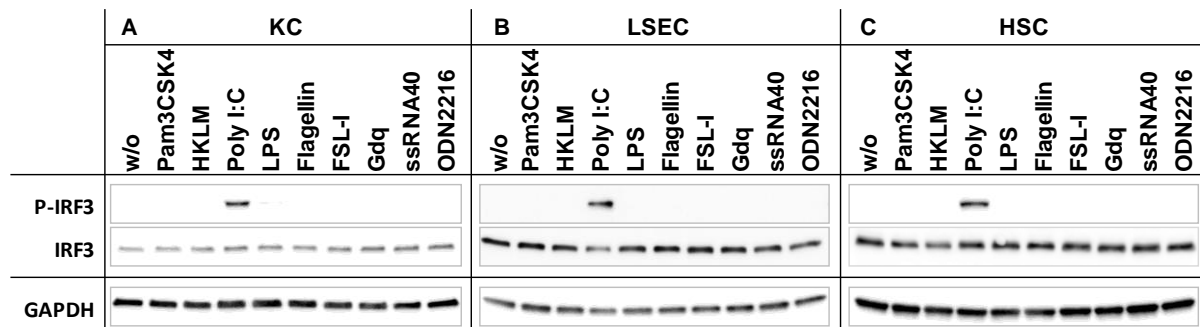


**Abbildung 27. Antivirale Aktivität TLR stimulierter NPC.** (A) KC, (B) LSEC und (C) HSC wurden mit den Liganden für TLR1-9 für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände (ÜS) gesammelt. Daraufhin wurden Con1 Zellen mit den Überständen für 72h in einer 1:2 Verdünnung inkubiert. (D) Zur Kontrolle des Con1 Replikonsystems wurden die Zellen mit 50µg/ml Poly I:C bzw. 200U/ml IFN-α stimuliert. Nach erfolgter Inkubation wurde die RNA aus den Zellen isoliert und die HCV Replikation mittels qRT-PCR analysiert (n=4). Alle Werte wurden auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens β-Aktin normalisiert. Signifikante Änderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\*\*\*) P-Wert<0,001). ∅ (unbehandelte Con1 Zellen).

### 3.3.2 Expression antiviraler Mediatoren in NPC

Der Transkriptionsfaktor IRF3 ist ein bekannter Regulator für die Induktion von Interferonen bei Virus Infektionen (Sato et al. 2000, Yoneyama et al. 2002). Aufgrund dessen sollte die TLR induzierte Aktivierung von IRF3 untersucht werden. Hierzu wurden NPC mit TLR Liganden für 90min stimuliert und Proteinlysate präpariert. Anschließend wurde die Expression und Aktivierung von IRF3 auf Proteinebene

mittels Western Blot analysiert. In KC, LSEC und HSC lag eine deutliche Aktivierung bzw. Phosphorylierung des IRF3 nach der Behandlung mit dem TLR3 Liganden Poly I:C vor (Abbildung 28A-C). Zudem lag in allen drei Zelltypen eine konstante IRF3 Proteinexpression vor.

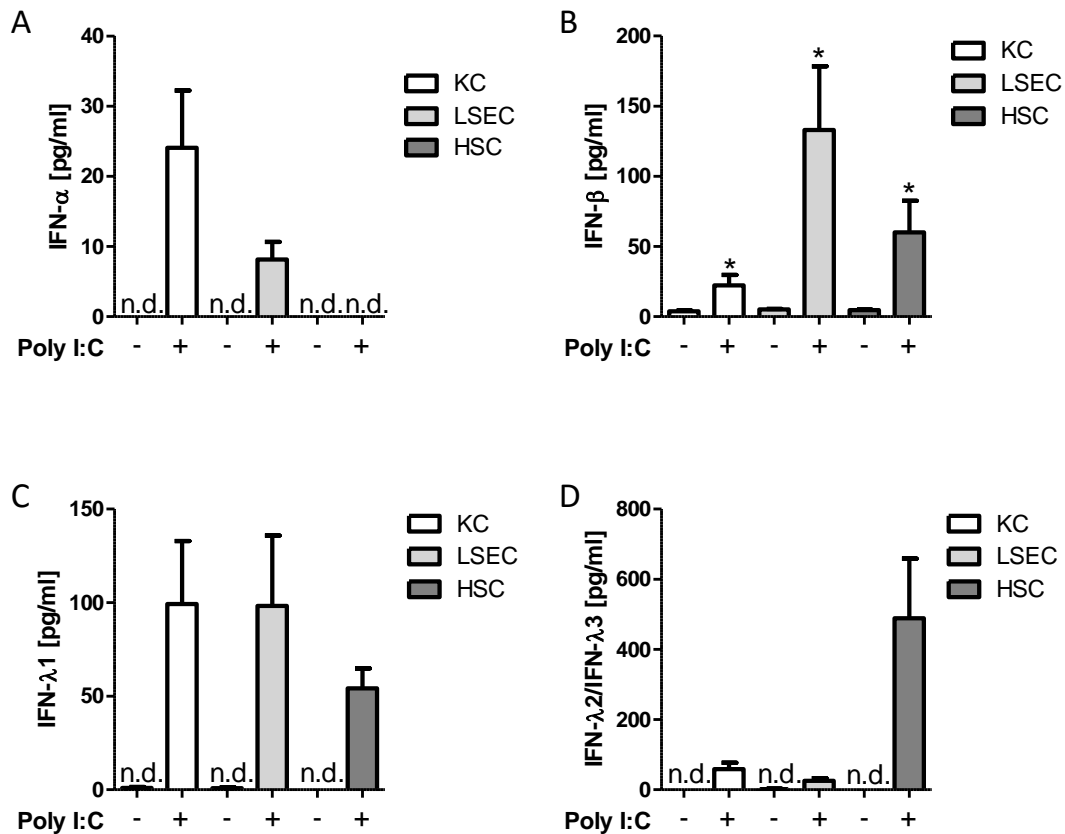


**Abbildung 28. Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 nach Stimulation der TLR.** (A) KC, (B) LSEC und (C) HSC wurden mit den Liganden für TLR1-9 für 90min stimuliert. Anschließend wurden die Proteinextrakte gesammelt und mittels Western Blot auf die Proteinexpression und Aktivierung von IRF3 untersucht. GAPDH diene als Ladungskontrolle.

Im nächsten Schritt sollte die Sekretion von IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1 und IFN- $\lambda$ 2/3 als potentielle Mediatoren des antiviralen Effekts von NPC, untersucht werden. Hierfür wurden NPC mit Poly I:C für 24h stimuliert, die Zellkulturüberstände gesammelt und die Sekretion der genannten Interferone mittels ELISA untersucht (n=4). IFN- $\alpha$  konnte in unbehandelten Zellen und in Poly I:C stimulierten HSC nicht detektiert werden. Die Stimulation mit Poly I:C führte in KC ( $24,1 \pm 8,1 \text{ pg/ml}$ ) und LSEC ( $8,1 \pm 2,5 \text{ pg/ml}$ ) zur Induktion des IFN- $\alpha$  (Abbildung 29A). Das basale Sekretionslevel von IFN- $\beta$  war sehr gering. Nach der Stimulation mit Poly I:C kam es zur erhöhten Sekretion in KC ( $22,2 \pm 7,5 \text{ pg/ml}$ ), LSEC ( $133,1 \pm 45,4 \text{ pg/ml}$ ) und HSC ( $60,0 \pm 22,5 \text{ pg/ml}$ ) (Abbildung 29B). Die IFN- $\lambda$ 1 Sekretion lag in allen drei Zelltypen unter dem Detektionslimit, wurde jedoch durch die Stimulation mit Poly I:C induziert (KC  $99,3 \pm 33,6 \text{ pg/ml}$ ; LSEC  $98,2 \pm 37,7 \text{ pg/ml}$ ; HSC  $54,2 \pm 10,6 \text{ pg/ml}$ ) (Abbildung 29C). Die Sekretion von IFN- $\lambda$ 2/3 lag in unbehandelten Zellen unter dem Detektionslimit, wurde jedoch in KC ( $32,8 \pm 9,1 \text{ pg/ml}$ ), LSEC ( $28,8 \pm 9,3 \text{ pg/ml}$ ) und HSC ( $488,8 \pm 169,8 \text{ pg/ml}$ ) durch die Stimulation mit Poly I:C induziert. Insgesamt zeigten Poly I:C stimulierte HSC die stärkste IFN- $\lambda$ 2/3 Sekretion (Abbildung 29D). Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass NPC im unbehandelten Zustand



eine sehr geringe oder nicht nachweisbare IFN Sekretion aufwiesen. Die Stimulation mit dem TLR3 Liganden Poly I:C führte zu einer Aktivierung und Sekretion von Typ I und Typ III Interferonen.



**Abbildung 29. Poly I:C induzierte Sekretion von IFN in NPC.** Primäre NPC (KC, LSEC und HSC) wurden mit dem TLR3 Ligand Poly I:C für 24h stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und auf die Sekretion von (A) IFN- $\alpha$ , (B) IFN- $\beta$ , (C) IFN- $\lambda$ 1 und (D) IFN- $\lambda$ 2/3 mittels ELISA untersucht (n=4). Signifikante Änderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05). n.d. (nicht detektierbar).

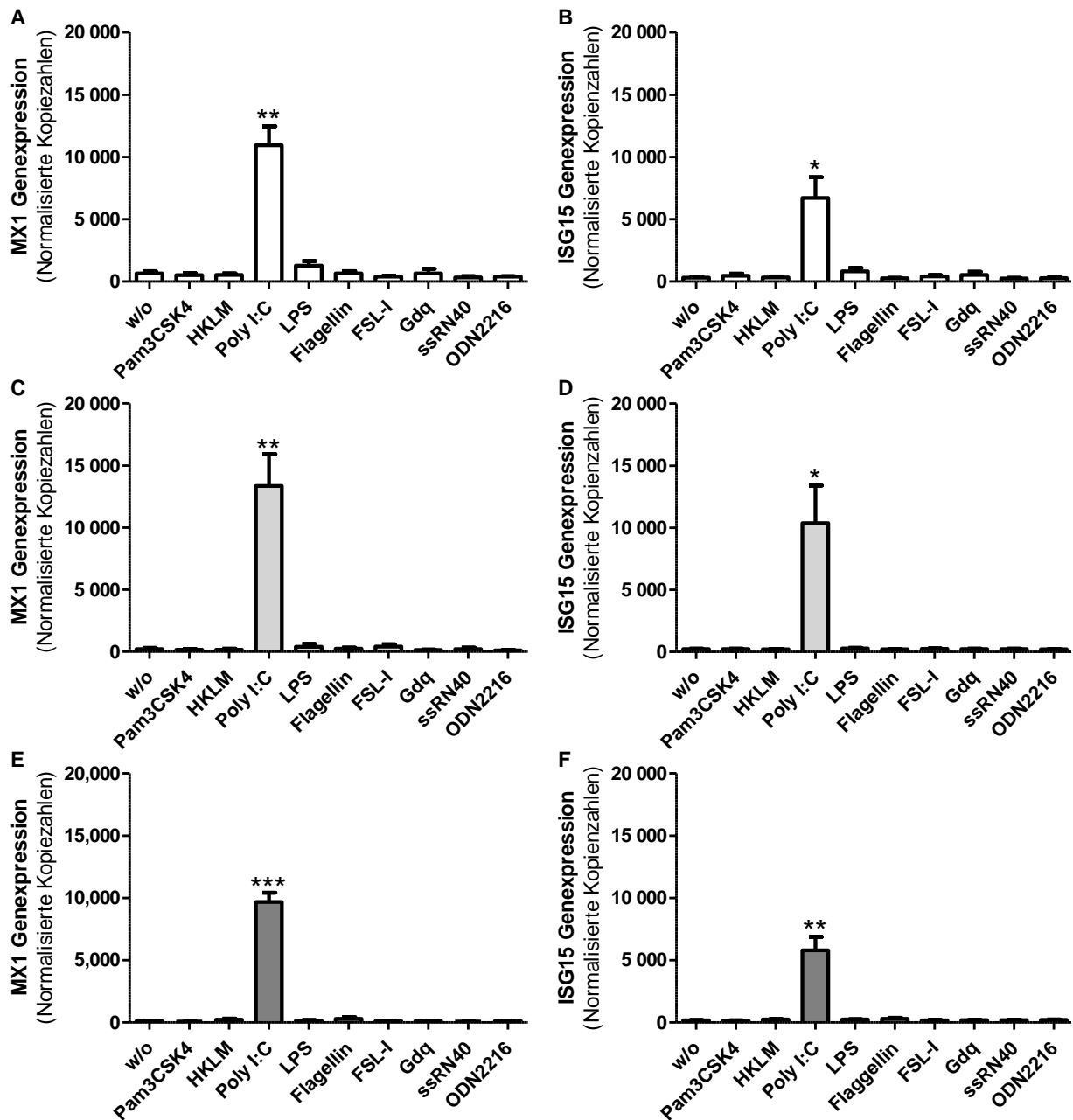
### 3.3.3 Poly I:C induzierte ISG Genexpression in NPC

Interferone sind bekannte Aktivatoren der ISG und vermitteln eine antivirale Aktivität, welche die HCV Replikation *in vitro* und *in vivo* unterdrückt (Muir et al. 2010, Robek et al. 2005, Marcello et al. 2006). Zur Untersuchung der TLR induzierten ISG Expression, wurden NPC mit TLR Liganden für 6h stimuliert, die RNA extrahiert und exemplarisch auf die Genexpression der ISG *myxovirus resistance 1* (MX1) und ISG15 mittels qRT-PCR analysiert (n=3). KC, LSEC und HSC zeigten geringe basale

## Ergebnisse

---

Expressionen von MX1 und ISG15 (Abbildung 30). Darüber hinaus führte die Stimulation mit dem TLR3 Liganden Poly I:C zu einer signifikanten Induktion der Genexpressionen von MX1 und ISG15 in KC (MX1 *fold change* (FC)  $25,9 \pm 3,6$ ; P-Wert 0,001; ISG15 FC  $15,4 \pm 3,8$ ; P-Wert 0,013), LSEC (MX1 FC  $63,0 \pm 12,1$ ; P-Wert 0,004, ISG15 FC  $45,8 \pm 13,4$ ; P-Wert 0,021) und HSC (MX1 FC  $111,1 \pm 19,1$ ; P-Wert 0,002, ISG15 FC  $32,5 \pm 6,0$ ; P-Wert 0,003).

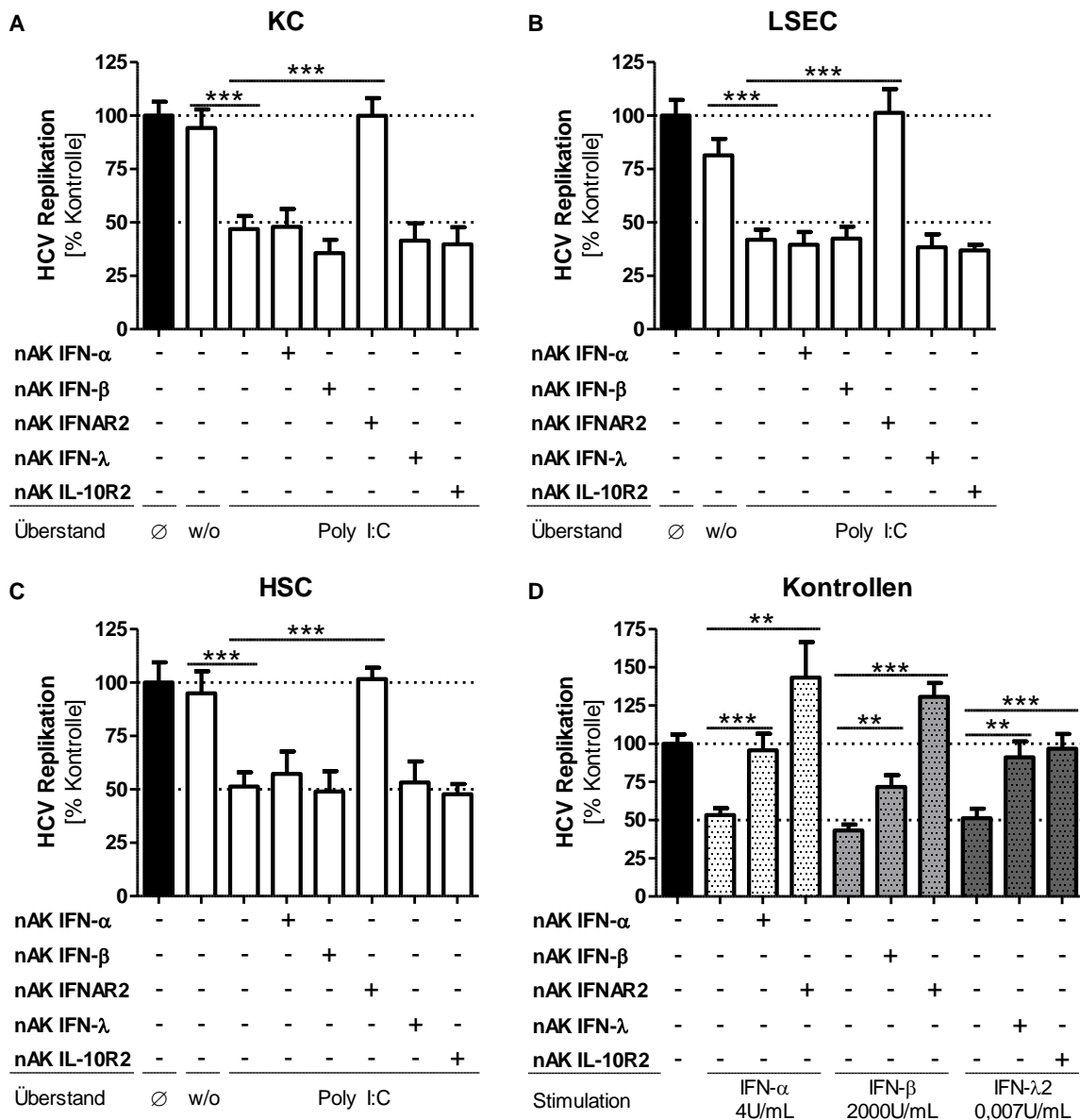


**Abbildung 30. TLR vermittelte ISG Genexpression in NPC.** Primäre NPC (KC, LSEC und HSC) wurden mit den Liganden für TLR1-9 für 6h stimuliert. Nach erfolgter Inkubation wurde die RNA isoliert und die Genexpression der ISG MX1 und ISG15 mittels qRT-PCR untersucht (n=3). Die Daten repräsentieren die Kopiezahlen als Mittelwerte  $\pm$  SEM, normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin. Signifikante Änderungen nach TLR Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001).

### 3.3.4 Neutralisation der Poly I:C vermittelten antiviralen Aktivität

In der vorliegenden Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass Poly I:C stimulierte NPC eine antivirale Kapazität gegenüber dem HCV aufweisen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TLR3 aktivierte NPC Typ I und Typ III Interferone sowie ISG exprimierten. Im Anschluss war die Zielsetzung, einen möglichen Mediator des antiviralen Effektes mittels spezifischer neutralisierender Antikörper gegen IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1/2/3 zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden NPC mit Poly I:C für 24h stimuliert und die Überstände gesammelt. In einem Vorversuch wurden die Kulturüberstände Poly I:C stimulierter NPC in unterschiedlichen Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:15, 1:20 verdünnt in Con1 Kulturmedium) auf Con1 Zellen gegeben und für 72h inkubiert. Daraufhin wurde die RNA isoliert und die HCV Replikation mittels qRT-PCR gemessen. Für die weiteren Versuche wurde die Konzentration gewählt, bei der die HCV Replikation um 50% im Vergleich zu unbehandelten Con1 Zellen verringert wurde. Diese Überstandverdünnungen wurden mit den neutralisierenden Antikörpern vorinkubiert und anschließend auf die Con1 Zellen gegeben. In einem parallelen Ansatz wurden Con1 Zellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen die jeweiligen Rezeptoren (IFNAR2 und IL-10R2) vorbehandelt, um diese zu blockieren und anschließend mit den antiviral wirkenden Überständen inkubiert. Die Funktionalität des Systems wurde kontrolliert, indem Con1 Zellen mit den jeweiligen Interferonen stimuliert wurden. In einem separaten Ansatz wurden diese Interferone mit den neutralisierenden Antikörpern des jeweiligen Interferons für 3h vorinkubiert und auf die Con1 Zellen gegeben. Nach 72h Inkubation wurde die RNA extrahiert und die HCV Replikation mittels qRT-PCR analysiert. Die Behandlung von Con1 Zellen mit den Überständen Poly I:C stimulierter KC, LSEC und HSC zeigte einen signifikanten Rückgang der HCV Replikation (KC  $53,2 \pm 6,2\%$ , LSEC  $58,1 \pm 4,7\%$ ; HSC  $48,7 \pm 6,6\%$ )(Abbildung 31). Die direkte Neutralisierung der Interferone zeigte keinen reversiblen Effekt der HCV Suppression. Durch die Blockierung des IFNAR2 konnte der suppressive Effekt in allen drei Zelltypen vollständig aufgehoben werden. Die antivirale Aktivität konnte durch die Neutralisation des IL-10R2 Rezeptors nicht beeinträchtigt werden. Die Kontrollen zeigten, dass die HCV Replikation durch die Stimulation mit den Interferonen deutlich verringert wurde. Hierbei konnte eine Suppression um  $44,5 \pm 6,1\%$  für IFN- $\alpha$ ,  $53,1 \pm 4,1\%$  für IFN- $\beta$  und  $44,4 \pm 6,8\%$  für

IFN- $\lambda$ 2 erreicht werden. Diese Effekte konnte durch die Inkubation mit den jeweiligen neutralisierenden Antikörpern aufgehoben werden, wodurch die Funktionalität des Systems bzw. der Antikörper gezeigt werden konnte. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die antivirale Aktivität der TLR3 aktivierten NPC über Typ I Interferone vermittelt wurde.



**Abbildung 31. Suppression des TLR3 vermittelten antiviralen Effektes in NPC.** (A) KC, (B) LSEC und (C) HSC wurden mit dem TLR3 Liganden Poly I:C für 24h stimuliert und die Zellkulturüberstände wurden gesammelt. Die Überstände wurden mit neutralisierenden Antikörpern (nAK) gegen IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  oder IFN- $\lambda$  für 3h vorinkubiert, um die IFN Aktivität zu blockieren. Con1 Zellen wurden mit neutralisierenden Antikörpern gegen den Typ I Rezeptor (IFNAR2) oder den IFN- $\lambda$  Rezeptor (IL-10R2) vorbehandelt, um die Rezeptorbindung zu blockieren. (D) Zur Kontrolle der Antikörperaktivität wurden Con1 Zellen mit IFN Lösungen behandelt, die entweder nur das jeweilige IFN (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  oder IFN- $\lambda$ 2) enthielt oder zusätzlich mit dem jeweiligen nAK vorbehandelt wurden. Nach zweiundsiebzigstündiger Inkubation wurde die RNA aus den Zellen isoliert und die HCV Replikation mittels qRT-PCR analysiert (n=3). Alle Werte wurden auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin normalisiert. Signifikante Änderungen im Vergleich zur unbehandelten Zellkulturüberstandkontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\*\* P-Wert<0,05; \*\*\* P-Wert<0,001).  $\emptyset$  (unbehandelte Con1 Zellen).

### **3.3.5 Expression unterschiedlicher IFN- $\alpha$ Subtypen in humanen NPC**

In der bisherigen Arbeit wurde eine antivirale Wirkung von Poly I:C stimulierten NPC auf ein HCV Replikon gezeigt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass der antivirale Effekt über den Typ I IFN Rezeptor verläuft. Allerdings konnte die Neutralisation von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  den antiviralen Effekt nicht aufheben. Für das IFN- $\alpha$  sind insgesamt 13 Subtypen bekannt, während nur eine Form des IFN- $\beta$  existiert (Gibbert et al. 2013). In wie weit der verwendete IFN- $\alpha$  neutralisierende Antikörper die einzelnen Subtypen bindet, ist unklar. Aufgrund dessen sollte die Genexpression der einzelnen IFN- $\alpha$  Subtypen in humanen NPC detaillierter untersucht werden. Hierzu wurden kultivierte KC, LSEC und HSC für 6h und 24h mit Poly I:C stimuliert. Anschließend wurde die RNA extrahiert (2.2.2.1) und die Genexpression der IFN- $\alpha$  Subtypen mittels qRT-PCR (2.2.2.3) bestimmt (n=3). Die Daten zeigen, dass die Genexpressionslevel aller IFN- $\alpha$  Subtypen auf einem geringen Niveau lagen. Der Subtyp IFN- $\alpha$ 1 wurde in allen drei Zelltypen durch Poly I:C induziert. Insgesamt zeigten die KC das höchste Potential für die Poly I:C induzierte IFN- $\alpha$  Produktion. Nach der vierundzwanzigstündigen Stimulation mit dem Liganden wurde die Genexpression von IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\alpha$ 7, IFN- $\alpha$ 8, IFN- $\alpha$ 10, IFN- $\alpha$ 13 und IFN- $\alpha$ 17 signifikant induziert (Tabelle 24). In LSEC wurde der IFN- $\alpha$ 4 Subtyp nach der vierundzwanzigstündigen Poly I:C Stimulation signifikant erhöht (Tabelle 25). Die sechsstündige Poly I:C Stimulation führte in HSC zu einer signifikanten Induktion des Subtyps IFN- $\alpha$ 8 (Tabelle 26). Unabhängig von der Poly I:C Stimulation konnten die Subtypen IFN- $\alpha$ 2 und IFN- $\alpha$ 6 in keinem der Zelltypen detektiert werden.

Tabelle 24. Genexpression von IFN- $\alpha$  Subtypen in KC

Gen	KC					
	6h			24h		
	w/o	Poly I:C		w/o	Poly I:C	
	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	Signifikanz	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	Signifikanz
<i>IFN-<math>\alpha</math>1</i>	19,6 $\pm$ 5,9	26,7 $\pm$ 10,9	n.s.	<b>27,3<math>\pm</math>4,6</b>	<b>78,7<math>\pm</math>12,3</b>	*
<i>IFN-<math>\alpha</math>2</i>	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	
<i>IFN-<math>\alpha</math>4</i>	0,9 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 1,3	n.s.	1,8 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 1,0	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>5</i>	1,4 $\pm$ 0,5	8,9 $\pm$ 5,9	n.s.	2,6 $\pm$ 1,1	13,1 $\pm$ 5,1	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>6</i>	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	
<i>IFN-<math>\alpha</math>7</i>	1,1 $\pm$ 0,2	9,3 $\pm$ 3,8	n.s.	<b>0,6<math>\pm</math>0,3</b>	<b>21,1<math>\pm</math>7,7</b>	*
<i>IFN-<math>\alpha</math>8</i>	1,2 $\pm$ 0,3	7,6 $\pm$ 2,7	n.s.	<b>4,3<math>\pm</math>2,2</b>	<b>37,6<math>\pm</math>10,9</b>	*
<i>IFN-<math>\alpha</math>10</i>	3,3 $\pm$ 0,7	27,1 $\pm$ 11,9	n.s.	<b>6,7<math>\pm</math>2,4</b>	<b>48,4<math>\pm</math>10,2</b>	**
<i>IFN-<math>\alpha</math>13</i>	17,9 $\pm$ 5,4	17,5 $\pm$ 6,6	n.s.	<b>20,9<math>\pm</math>3,4</b>	<b>68,5<math>\pm</math>12,8</b>	*
<i>IFN-<math>\alpha</math>16</i>	n.d.	0,9 $\pm$ 0,6	n.s.	1,5 $\pm$ 1,5	1,1 $\pm$ 0,5	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>17</i>	2,2 $\pm$ 0,6	15,5 $\pm$ 6,3	n.s.	2,0 $\pm$ 0,7	23,1 $\pm$ 4,7	**
<i>IFN-<math>\alpha</math>21</i>	1,3 $\pm$ 0,4	18,3 $\pm$ 7,4	n.s.	4,3 $\pm$ 2,7	18,9 $\pm$ 8,3	n.s.

Die Daten repräsentieren die Kopienzahlen als Mittelwerte (MW)  $\pm$  *standard error of mean* (SEM), normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin. Signifikante Änderungen nach sechsständiger oder vierundzwanzigständiger Stimulation mit Poly I:C im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01). n.d. (nicht detektierbar); n.s.(nicht signifikant).



Tabelle 25. Genexpression von IFN- $\alpha$  Subtypen in LSEC

Gen	LSEC					
	6h			24h		
	w/o	Poly I:C		w/o	Poly I:C	
	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	Signifikanz	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	Signifikanz
<i>IFN-<math>\alpha</math>1</i>	4,3 $\pm$ 1,6	3,1 $\pm$ 1,3	n.s.	19,6 $\pm$ 11,8	14,9 $\pm$ 7,8	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>2</i>	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	
<i>IFN-<math>\alpha</math>4</i>	0,5 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,6	n.s.	<b>3,3<math>\pm</math>0,8</b>	<b>0,7<math>\pm</math>0,4</b>	*
<i>IFN-<math>\alpha</math>5</i>	0,7 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,3	n.s.	1,9 $\pm$ 0,8	2,6 $\pm$ 1,3	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>6</i>	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	
<i>IFN-<math>\alpha</math>7</i>	0,2 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 1,1	n.s.	1,4 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,4	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>8</i>	0,6 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,6	n.s.	3,4 $\pm$ 1,2	3,7 $\pm$ 1,5	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>10</i>	2,7 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,2	n.s.	7,8 $\pm$ 1,9	7,5 $\pm$ 2,0	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>13</i>	3,7 $\pm$ 1,6	3,5 $\pm$ 1,7	n.s.	18,4 $\pm$ 9,7	14,3 $\pm$ 6,1	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>16</i>	n.d.	0,7 $\pm$ 0,3	n.s.	0,4 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>17</i>	1,0 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,6	n.s.	3,0 $\pm$ 1,0	5,4 $\pm$ 4,0	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>21</i>	1,0 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,7	n.s.	4,2 $\pm$ 1,4	0,6 $\pm$ 0,4	n.s.

Die Daten repräsentieren die Kopienzahlen als Mittelwerte (MW)  $\pm$  *standard error of mean* (SEM), normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltgens  $\beta$ -Aktin. Signifikante Änderungen nach sechsständiger oder vierundzwanzigständiger Stimulation mit Poly I:C im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05). n.d. (nicht detektierbar); n.s.(nicht signifikant).

Tabelle 26. Genexpression von IFN- $\alpha$  Subtypen in HSC

Gen	HSC					
	6h			24h		
	w/o	Poly I:C		w/o	Poly I:C	
	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	Signifikanz	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	Signifikanz
<i>IFN-<math>\alpha</math>1</i>	<b>36,2<math>\pm</math>6,6</b>	<b>13,4<math>\pm</math>2,4</b>	*	<b>12,2<math>\pm</math>2,8</b>	<b>37,9<math>\pm</math>9,7</b>	*
<i>IFN-<math>\alpha</math>2</i>	n.d.	n.d.	n.s.	n.d.	n.d.	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>4</i>	0,8 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,4	n.s.	0,9 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 1,1	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>5</i>	0,3 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3	n.s.	0,8 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,9	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>6</i>	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	
<i>IFN-<math>\alpha</math>7</i>	0,4 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,7	n.s.	1,1 $\pm$ 0,2	5,8 $\pm$ 2,8	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>8</i>	<b>0,4<math>\pm</math>0,3</b>	<b>3,3<math>\pm</math>0,7</b>	*	0,8 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 3,6	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>10</i>	5,5 $\pm$ 1,0	7,4 $\pm$ 1,7	n.s.	3,4 $\pm$ 0,4	10,6 $\pm$ 3,9	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>13</i>	37,0 $\pm$ 10,5	13,9 $\pm$ 3,8	n.s.	13,6 $\pm$ 4,7	30,1 $\pm$ 9,7	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>16</i>	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	
<i>IFN-<math>\alpha</math>17</i>	0,6 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,6	n.s.	0,7 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 2,4	n.s.
<i>IFN-<math>\alpha</math>21</i>	2,0 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 1,2	n.s.	1,6 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 3,4	n.s.

Die Daten repräsentieren die Kopienzahlen als Mittelwerte (MW)  $\pm$  *standard error of mean* (SEM), normalisiert auf 100.000 Kopien des Haushaltgens  $\beta$ -Aktin. Signifikante Änderungen nach sechsständiger oder vierundzwanzigständiger Stimulation mit Poly I:C im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (w/o) wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05). n.d. (nicht detektierbar); n.s. (nicht signifikant).

### **3.4 Vergleich der Immunantwort von NPC aus HCV positiven und HCV negativen Patienten**

NPC spielen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort gegenüber hepatotropen Pathogenen. In HCV infizierten Patienten liegt eine gesteigerte Expression sowohl von Typ I und Typ III Interferonen vor (Onoguchi et al. 2007, Diegelmann et al. 2010). Auf Grund dessen sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der HCV Infektion auf die TLR vermittelte Immunantwort untersucht werden.

#### **3.4.1 HCV induzierte Genexpression inflammatorischer Zytokine**

In der vorliegenden Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass im Vergleich zu LSEC und HSC vor allem KC für die Expression der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10 verantwortlich waren. Im Gegensatz dazu zeigten HSC das größte Potential für die Expression von IL-6. Auf dieser Grundlage war nun das Ziel zu untersuchen, welchen Einfluss die HCV Infektion auf die Zytokin Expression in KC, LSEC und HSC besitzt. Hierzu wurden primäre NPC aus humanem Lebergewebe von nicht infizierten (Kontrollgruppe, n=15) und HCV infizierten Patienten (HCV Gruppe, n=10) isoliert. Nach der Isolation sowie erfolgter Kultivierung wurden die Zellen mit TLR Liganden für 6h stimuliert und die RNA isoliert. Die Werte der Genexpressionen der HCV Gruppe wurden mit denen der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt (*fold change*). KC zeigten nach der Stimulation mit PAM3CSK4, Poly I:C, FSL-1, ssRNA40 und ODN2216 einen signifikanten Anstieg der IL-6 Genexpression. Die HCV Infektion führte zu einem Rückgang der TNF- $\alpha$  Expression nach Stimulation durch Poly I:C und ssRNA40. Darüber hinaus lag in der unbehandelten Kontrolle (w/o) sowie nach Stimulation mit ODN2216 in HCV infizierten Proben eine verringerte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 vor (Tabelle 27). In LSEC zeigte die HCV Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine gesteigerte Genexpressionen von IL-6 nach Stimulation mit PAM3CSK4, HKLM, LPS, FSL-1 und ssRNA40. Im Gegensatz dazu lagen keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der HCV Gruppe für die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10 vor (Tabelle 28). In den HSC lag in der HCV Gruppe eine signifikant verringerte IL-6 Expression nach der Stimulation mit HKLM, LPS, Flagellin und FLS-1 vor (Tabelle 29).

Um die Vergleichbarkeit der Kontrollgruppe und HCV Gruppen darzustellen, wurden die Patientencharakteristika zusammengetragen (z. B. Art der Operation, Alter, Geschlecht, GOT und GPT Wert im Blut). Hierbei wurde zu jedem Zelltyp die jeweiligen Patientengruppen ausgewertet (Tabelle 30).

## Ergebnisse

**Tabelle 27. Vergleich der Genexpression inflammatorischer Zytokine in KC von HCV positiven und HCV negativen Patienten**

KC								
Stimulation	<i>IL-6</i>				<i>TNF-α</i>			
	FC ± SEM	P-Wert	Signifikanz	FC ± SEM	P-Wert	Signifikanz		
w/o	1,7 ± 0,4	0,076	n.s.	1,0 ± 0,3	0,882	n.s.		
PAM3CSK4	<b>1,7 ± 0,3</b>	<b>0,034</b>	*	1,1 ± 0,5	0,876	n.s.		
HKLM	1,5 ± 0,3	0,066	n.s.	0,9 ± 0,5	0,862	n.s.		
Poly I:C	<b>3,4 ± 0,4</b>	<b>0,013</b>	*	<b>0,6 ± 0,4</b>	<b>0,040</b>	*		
LPS	1,4 ± 0,3	0,127	n.s.	0,9 ± 0,6	0,821	n.s.		
Flagellin	1,5 ± 0,3	0,092	n.s.	0,7 ± 0,5	0,224	n.s.		
FSL-1	<b>2,1 ± 0,3</b>	<b>0,011</b>	*	0,9 ± 0,5	0,798	n.s.		
Gdq	1,5 ± 0,3	0,085	n.s.	0,8 ± 0,5	0,594	n.s.		
ssRNA40	<b>2,0 ± 0,3</b>	<b>0,029</b>	*	<b>0,4 ± 0,4</b>	<b>0,010</b>	*		
ODN2216	<b>2,3 ± 0,4</b>	<b>0,014</b>	*	1,0 ± 0,3	0,854	n.s.		

Stimulation	<i>IL-10</i>			
	FC ± SEM	P-Wert	Signifikanz	
w/o	<b>0,4 ± 0,4</b>	<b>0,010</b>	*	
PAM3CSK4	0,8 ± 0,3	0,394	n.s.	
HKLM	0,9 ± 0,3	0,699	n.s.	
Poly I:C	0,7 ± 0,4	0,222	n.s.	
LPS	1,0 ± 0,4	0,940	n.s.	
Flagellin	0,9 ± 0,3	0,762	n.s.	
FSL-1	0,9 ± 0,4	0,600	n.s.	
Gdq	0,7 ± 0,4	0,178	n.s.	
ssRNA40	0,5 ± 0,5	0,096	n.s.	
ODN2216	<b>0,5 ± 0,4</b>	<b>0,040</b>	*	

Die Daten repräsentieren den *fold change* (FC) ± SEM der Zytokin Genexpressionen der Kontrollgruppe (Zellen, isoliert aus Gewebe von HCV negativen Patienten) im Vergleich zur HCV Gruppe (Zellen, isoliert aus Gewebe von HCV infizierten Patienten). Signifikante Änderungen zwischen den beiden Gruppen wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001). n.s. (nicht signifikant).

## Ergebnisse

**Tabelle 28. Vergleich der Genexpression inflammatorischer Zytokine in LSEC von HCV positiven und HCV negativen Patienten**

LSEC								
Stimulation	<i>IL-6</i>				<i>TNF-α</i>			
	FC ± SEM	P-Wert	Signifikanz	FC ± SEM	P-Wert	Signifikanz		
w/o	1,7 ± 0,4	0,095	n.s.	0,6 ± 0,3	0,069	n.s.		
PAM3CSK4	<b>2,6 ± 0,4</b>	<b>0,029</b>	*	0,7 ± 0,4	0,237	n.s.		
HKLM	<b>2,0 ± 0,4</b>	<b>0,017</b>	*	0,8 ± 0,4	0,438	n.s.		
Poly I:C	2,2 ± 0,5	0,069	n.s.	1,8 ± 0,5	0,176	n.s.		
LPS	<b>1,8 ± 0,3</b>	<b>0,020</b>	*	0,7 ± 0,5	0,230	n.s.		
Flagellin	0,9 ± 0,5	0,743	n.s.	0,7 ± 0,3	0,085	n.s.		
FSL-1	<b>2,2 ± 0,3</b>	<b>0,002</b>	**	0,9 ± 0,3	0,521	n.s.		
Gdq	1,4 ± 0,3	0,128	n.s.	0,9 ± 0,5	0,795	n.s.		
ssRNA40	<b>1,7 ± 0,3</b>	<b>0,044</b>	*	0,7 ± 0,5	0,356	n.s.		
ODN2216	1,8 ± 0,4	0,082	n.s.	0,7 ± 0,3	0,123	n.s.		

Stimulation	<i>IL-10</i>		
	FC ± SEM	P-Wert	Signifikanz
w/o	1,0 ± 0,5	0,944	n.s.
PAM3CSK4	0,5 ± 0,5	0,112	n.s.
HKLM	0,5 ± 0,5	0,112	n.s.
Poly I:C	0,4 ± 0,5	0,012	n.s.
LPS	1,0 ± 0,6	0,917	n.s.
Flagellin	0,7 ± 0,5	0,206	n.s.
FSL-1	0,8 ± 0,5	0,522	n.s.
Gdq	0,9 ± 0,5	0,804	n.s.
ssRNA40	1,3 ± 0,5	0,563	n.s.
ODN2216	0,9 ± 0,5	0,709	n.s.

Die Daten repräsentieren den *fold change* (FC) ± SEM der Zytokin Genexpression der Kontrollgruppe (Proben, isoliert aus Gewebe von HCV negativen Patienten) im Vergleich zur HCV Gruppe (Proben, isoliert aus Gewebe von HCV infizierten Patient). Signifikante Änderungen zwischen den beiden Gruppen wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001). n.s. (nicht signifikant).

## Ergebnisse

**Tabelle 29. Vergleich der Genexpression inflammatorischer Zytokine in HSC von HCV positiven und HCV negativen Patienten**

HSC								
Stimulation	<i>IL-6</i>				<i>TNF-<math>\alpha</math></i>			
	FC $\pm$ SEM	P-Wert	Signifikanz	FC $\pm$ SEM	P-Wert	Signifikanz		
w/o	1,0 $\pm$ 0,3	0,868	n.s.	0,7 $\pm$ 0,5	0,354	n.s.		
PAM3CSK4	0,7 $\pm$ 0,3	0,134	n.s.	0,6 $\pm$ 0,6	0,175	n.s.		
HKLM	<b>0,6 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>0,019</b>	*	0,5 $\pm$ 0,7	0,149	n.s.		
Poly I:C	0,9 $\pm$ 0,3	0,481	n.s.	1,2 $\pm$ 0,6	0,739	n.s.		
LPS	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>0,000</b>	***	0,4 $\pm$ 0,7	0,149	n.s.		
Flagellin	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>0,041</b>	*	0,5 $\pm$ 0,5	0,059	n.s.		
FSL-1	<b>0,4 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>0,025</b>	*	0,5 $\pm$ 0,5	0,058	n.s.		
Gdq	0,5 $\pm$ 0,5	0,056	n.s.	0,9 $\pm$ 0,7	0,818	n.s.		
ssRNA40	0,6 $\pm$ 0,5	0,170	n.s.	1,5 $\pm$ 0,7	0,501	n.s.		
ODN2216	0,6 $\pm$ 0,3	0,084	n.s.	0,7 $\pm$ 0,4	0,210	n.s.		

Stimulation	<i>IL-10</i>			
	FC $\pm$ SEM	P-Wert	Signifikanz	
w/o	0,5 $\pm$ 0,5	0,123	n.s.	
PAM3CSK4	0,5 $\pm$ 0,6	0,171	n.s.	
HKLM	0,8 $\pm$ 0,7	0,587	n.s.	
Poly I:C	0,6 $\pm$ 0,5	0,294	n.s.	
LPS	0,5 $\pm$ 0,6	0,119	n.s.	
Flagellin	0,5 $\pm$ 0,5	0,098	n.s.	
FSL-1	0,9 $\pm$ 0,6	0,830	n.s.	
Gdq	1,0 $\pm$ 0,6	0,983	n.s.	
ssRNA40	0,6 $\pm$ 0,6	0,181	n.s.	
ODN2216	0,6 $\pm$ 0,5	0,313	n.s.	

Die Daten repräsentieren den *fold change* (FC)  $\pm$  SEM der Zytokin Genexpression der Kontrollgruppe (Proben, isoliert aus Gewebe von HCV negativen Patienten) im Vergleich zur HCV Gruppe (Proben, isoliert aus Gewebe von HCV infizierten Patient). Signifikante Änderungen zwischen den beiden Gruppen wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001). n.s. (nicht signifikant).

## Ergebnisse

**Tabelle 30. Patientencharakteristika**

<b>KC</b>		
	Kontrollgruppe (n=15) MW±SEM	HCV Gruppe (n=9) MW±SEM
Transplantation	3	8
Resektion	12	1
Geschlecht männlich	9	3
Geschlecht weiblich	6	6
Alter [Jahre]	55,9±3,6	56,6±2,1
GOT [IU/ml]	254,7±46,9	115,1±29,6
GPT [IU/ml]	228,9±38,2	95,6±24,8
Fibrose Status	2,7±0,4	3,8±0,1
<b>LSEC</b>		
	Kontrollgruppe (n=15) MW±SEM	HCV Gruppe (n=10) MW±SEM
Transplantation	3	10
Resektion	12	0
Geschlecht männlich	6	9
Geschlecht weiblich	9	1
Alter [Jahre]	51,9±3,7	56,0±2,0
GOT [IU/ml]	214,8±43,3	181,7±68,3
GPT [IU/ml]	205,4±40,0	104,8±30,6
Fibrose Status	0,4±0,3	3,7±0,3
<b>HSC</b>		
	Kontrollgruppe (n=15) MW±SEM	HCV Gruppe (n=10) MW±SEM
Transplantation	3	9
Resektion	12	1
Geschlecht männlich	7	8
Geschlecht weiblich	8	2
Alter [Jahre]	56,4±3,1	56,0±2,0
GOT [IU/ml]	218,5±54,5	352,2±188,4
GPT [IU/ml]	197,5±46,8	214,0±112,7
Fibrose Status	1,0±0,0	3,6±0,3

Die Daten repräsentieren Mittelwerte (MW) ± SEM

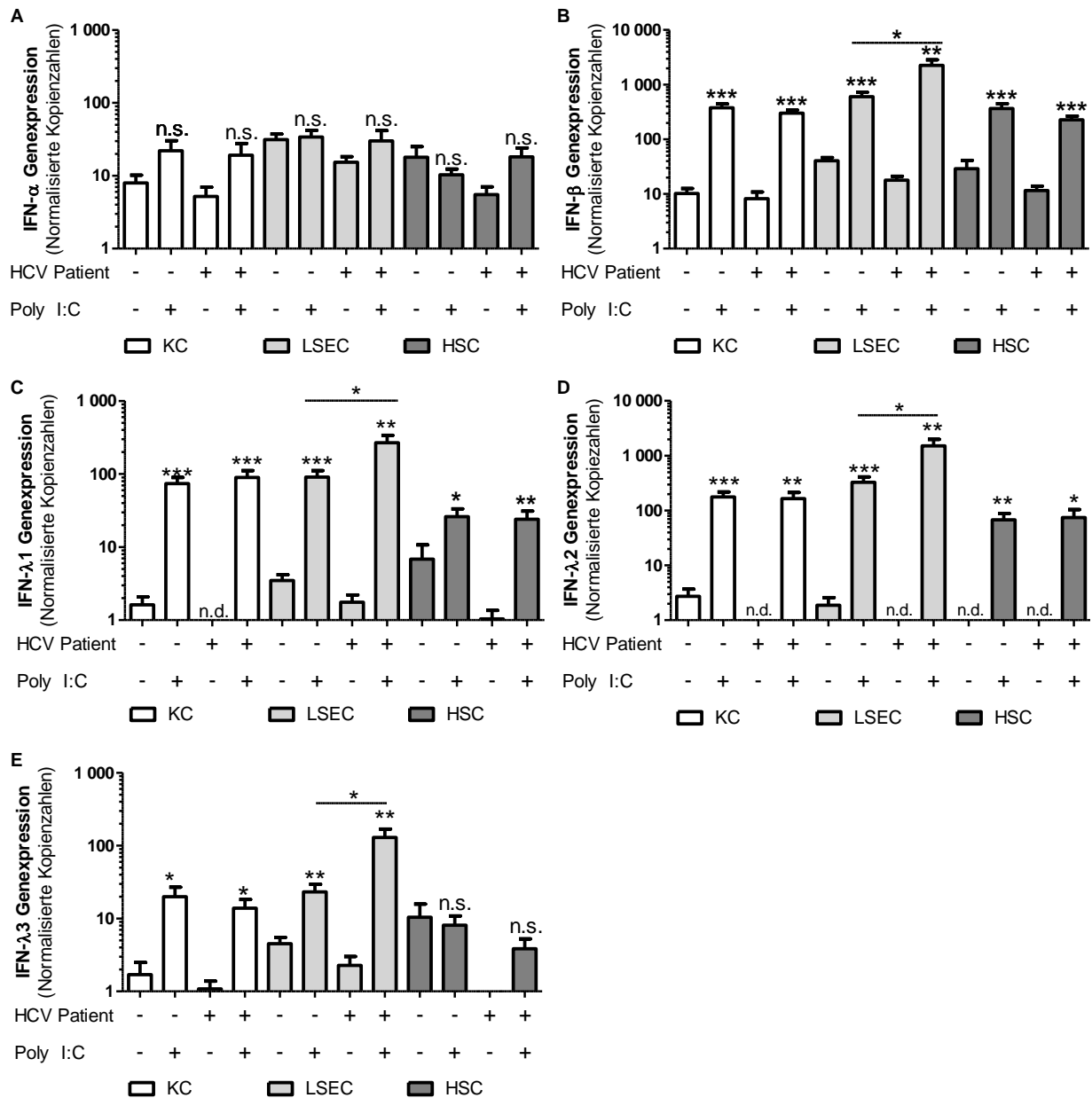


### 3.4.2 HCV induzierte Genexpression von Typ I und Typ III Interferonen

Bisher konnte gezeigt werden, dass Poly I:C stimulierte NPC ein antivirales Potential aufwies und Typ I und Typ III Interferone sezernierten. Im Anschluss war es das Ziel, die IFN Genexpression nach der Stimulation mit Poly I:C zu untersuchen. Hier sollte die IFN Genexpression in NPC verglichen werden, die aus Lebern HCV infizierter Patienten und nicht infizierter Patienten (Kontrollen) isoliert wurden. Die kultivierten Zellen wurden mit Poly I:C für 6h stimuliert und die RNA extrahiert. Anschließend wurden die Expressionen der IFN Gene mittels qRT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass die IFN- $\alpha$  Genexpression durch Poly I:C nicht induziert werden konnte (Abbildung 32A). Die Poly I:C Behandlung führte, unabhängig vom Infektionsstatus, in allen Fällen zu einer Erhöhung der IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 Genexpression (Abbildung 32 B-D). Die IFN- $\lambda$ 3 Expression konnte in KC und LSEC durch die Stimulation mit Poly I:C signifikant induziert werden, blieb jedoch in HSC unbeeinträchtigt (Abbildung 32E). Der Vergleich der Poly I:C vermittelten IFN Genexpression in Zellen HCV positiver und HCV negativer Patienten zeigte, dass alleinig LSEC, isoliert aus HCV positivem Lebergewebe, sensitiver auf die Poly I:C Stimulation reagierten. In LSEC HCV positiver Patienten induzierte Poly I:C signifikant höhere Expressionslevel von IFN- $\beta$  (FC  $3,7 \pm 0,5$ ; P-Wert 0,014), IFN- $\lambda$ 1 (FC  $3,4 \pm 0,5$ ; P-Wert 0,023), IFN- $\lambda$ 2 (FC  $5,4 \pm 0,6$ ; P-Wert 0,022) und IFN- $\lambda$ 3 (FC  $6,9 \pm 0,6$ ; P-Wert 0,011), im Vergleich zur Poly I:C induzierten Expression in LSEC HCV negativer Patienten. Darüber hinaus zeigten KC und HSC HCV positiver und HCV negativer Patienten keinen signifikanten Unterschied der Poly I:C induzierten IFN Genexpression.

Um die Vergleichbarkeit der Kontrollgruppe und HCV Patientengruppe darzustellen, wurden die Patientencharakteristika zusammengetragen (z. B. Art der Operation, Alter, Geschlecht, GOT Wert im Blut, GPT Wert im Blut). Hierbei wurde zu jedem Zelltyp die jeweiligen Patientengruppen ausgewertet (Tabelle 31).

## Ergebnisse



**Abbildung 32. Poly I:C induzierte IFN Genexpression in NPC nicht infizierter und HCV infizierter Patienten.** Primäre NPC (KC, LSEC und HSC) wurden mit dem Liganden Poly I:C für 6h stimuliert. Nach erfolgter Inkubation wurde die RNA isoliert und auf die Genexpression von Typ I und Typ III IFN mittels qRT-PCR untersucht. Die Daten repräsentieren die Kopienzahlen als Mittelwerte  $\pm$  SEM, normalisiert auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin. Signifikante Änderungen wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05; \*\* P-Wert<0,01, \*\*\* P-Wert<0,001). n.d. (nicht detektierbar); n.s.(nicht signifikant).

## Ergebnisse

**Tabelle 31. Patientencharakteristika**

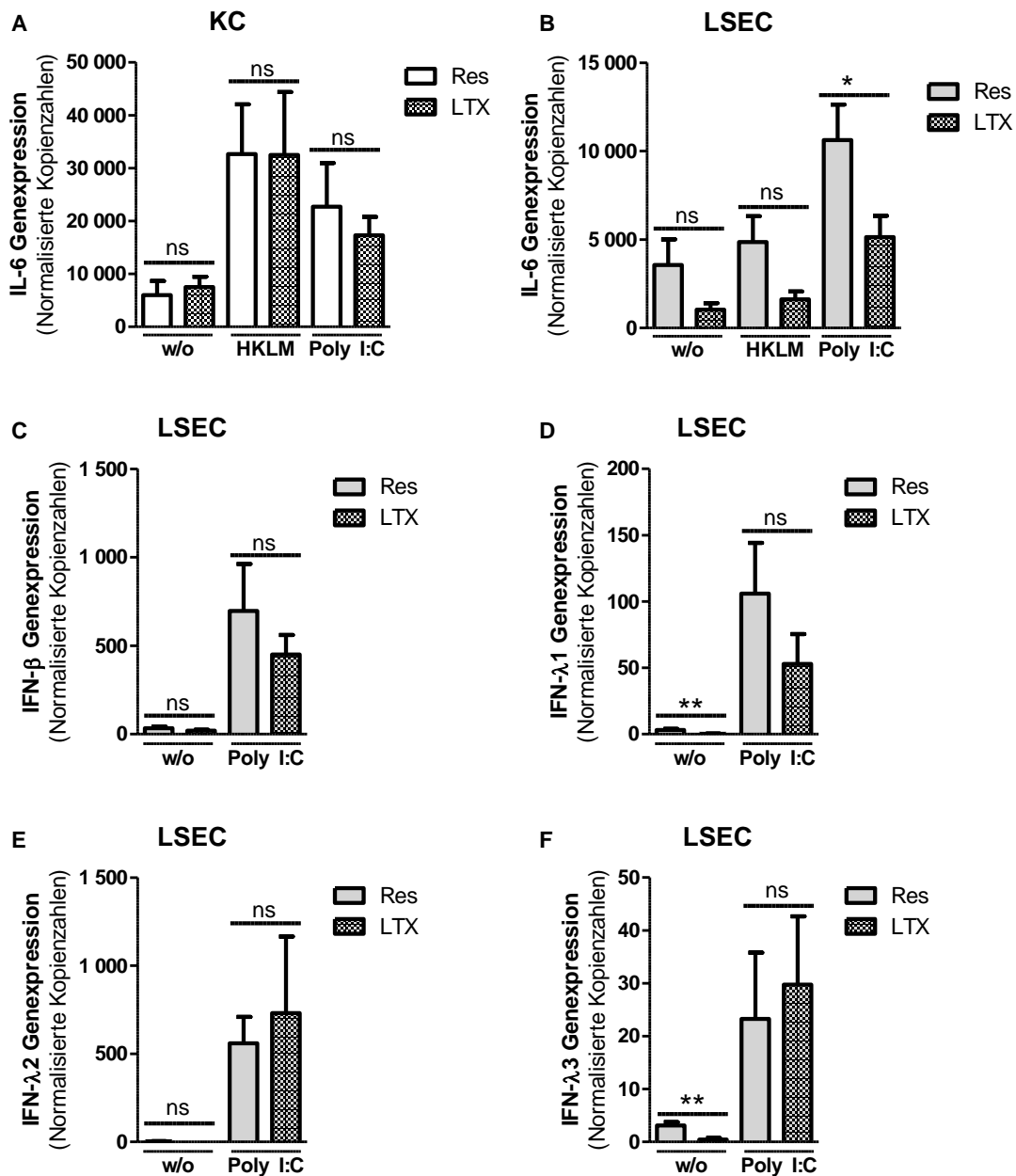
<b>KC</b>		
	Kontrollgruppe (n=15) MW±SEM	HCV Gruppe (n=10) MW±SEM
Transplantation	3	9
Resektion	12	1
Geschlecht männlich	8	7
Geschlecht weiblich	7	3
Alter [Jahre]	54,9±4,2	55,6±2,1
GOT [IU/ml]	214,0±57,7	241,4±119,6
GPT [IU/ml]	153,4±37,6	169,9±77,0
Fibrose Status	1,5±0,4	3,9±0,1
<b>LSEC</b>		
	Kontrollgruppe (n=15) MW±SEM	HCV Gruppe (n=10) MW±SEM
Transplantation	2	10
Resektion	13	0
Geschlecht männlich	9	7
Geschlecht weiblich	6	3
Alter [Jahre]	56,7±4,6	55,0±1,1
GOT [IU/ml]	233,9±64,1	216,1±115,3
GPT [IU/ml]	141,0±40,6	163,8±77,5
Fibrose Status	1,7±0,4	3,7±0,3
<b>HSC</b>		
	Kontrollgruppe (n=15) MW±SEM	HCV Gruppe (n=10) MW±SEM
Transplantation	2	10
Resektion	13	0
Geschlecht männlich	5	9
Geschlecht weiblich	10	1
Alter [Jahre]	58,5±5,2	53,1±1,6
GOT [IU/ml]	277,3±88,6	222,3±114,1
GPT [IU/ml]	187,1±61,4	164,7±77,36
Fibrose Status	2,2±0,5	3,7±0,3

Die Daten repräsentieren Mittelwerte (MW) ± SEM

### **3.4.3 Einfluss des Gewebersprungs auf die Zytokin Genexpression**

Bisher konnte in KC und LSEC, die aus HCV infiziertem Lebergewebe isoliert wurden, eine gesteigerte TLR vermittelte Induktion der Genexpression unterschiedlicher Zytokine gezeigt werden. Da die Zellen von HCV infizierten Patienten vorwiegend aus explantierten Lebern gewonnen wurde, sollte die Genexpression der Zytokine in Abhängigkeit des Leberursprungs, Resektion (Res) oder Transplantation (LTX), untersucht werden. Hierzu wurden KC und LSEC aus nicht HCV infiziertem Gewebe von Leberresektionen und –transplantationen isoliert und kultiviert (n=6). Daraufhin wurden die Zellen exemplarisch mit dem TLR2 Liganden HKLM oder dem TLR3 Liganden Poly I:C für 6h inkubiert und die RNA aus den Zellen isoliert. Für beide Zelltypen erfolgte die Analyse der IL-6 Genexpression. In LSEC erfolgte im Falle der TLR3 Stimulation zusätzlich die Genexpressionsanalyse für IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 und IFN- $\lambda$ 3.

KC zeigten in Reaktion auf die TLR3 Stimulation mittels Poly I:C keinen signifikanten Unterschied der IL-6 Expression zwischen der Resektionsgruppe und der Transplantationsgruppe (Abbildung 33A). Im Falle der Poly I:C Stimulation konnte in den LSEC der LTX Gruppe eine signifikante Verringerung der IL-6 Genexpression festgestellt werden (Abbildung 33B). Darüber hinaus zeigten die LSEC im unstimulierten Zustand (w/o) eine verringerte Genexpression für IFN- $\lambda$ 1 und IFN- $\lambda$ 3 in der LTX Gruppe (Abbildung 33 D, F). In allen weiteren Analysen lagen keine signifikanten Veränderungen zwischen den beiden Gruppen vor. Aufgrund dessen konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass die zuvor dargestellte gesteigerten Zytokin Genexpressionen in KC und LSEC aus HCV infiziertem Gewebe auf einen durch das Virus vermittelten Effekt zurückzuführen war.



**Abbildung 33. Vergleich der Zytokkin Genexpressionen in KC und LSEC aus Resektionsgewebe und Transplantationsgewebe.** Primäre KC und LSEC wurden aus Resektionslebergewebe (Res) oder Transplantationslebergewebe (LTX) isoliert und kultiviert (n=6). Anschließend wurden die Zellen mit den Liganden HKLM oder Poly I:C für 6h stimuliert. Nach erfolgter Inkubation wurde die RNA isoliert und die Genexpression von IL-6 in KC (A) und LSEC (B) sowie die Genexpression von IFN-β, IFN-λ1, IFN-λ2 und IFN-λ3 in LSEC (C-F) mittels qRT-PCR untersucht. Die Daten repräsentieren die Kopienzahlen als Mittelwerte ± SEM, normalisiert auf das Haushaltsgen β-Aktin. Signifikante Änderungen wurden hervorgehoben (\* P-Wert<0,05).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Isolierte PHH, KC, LSEC und HSC aus humanem Lebergewebe weisen charakteristische Eigenschaften auf**

Die hohe Qualität von primären humanen Leberzellen, Hepatozyten und NPC ist für Untersuchungen verschiedener Aspekte der Leberfunktionen besonders wichtig. Bisher sind unterschiedliche Isolierungsmethoden für Zellen aus Lebergewebe von Nagetieren und Menschen beschrieben worden. Allerdings fokussieren die meisten Methoden auf die Präparation einzelner Zelltypen (Hepatozyten oder NPC) aus Lebergewebe oder Biopsien (Alabraba et al. 2007, Braet et al. 1994, Chang et al. 2014, Bhogal et al. 2011). Hingegen profitieren vergleichende Studien von der Verwendung von Zellen, die aus demselben Lebergewebe eines Individuums stammen. Zudem stellt die Isolation von mehreren Zelltypen eine verbesserte Nutzung der Leber als Ressource für Primärzellen dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prozedur für die gleichzeitige Isolation von primären humanen Hepatozyten, KC, LSEC und HSC aus demselben Lebergewebe optimiert. Für die Isolation von Leberzellen ist die Wahl des Enzyms zur Verdauung der Leber ein wichtiger Faktor. Dieses kann sowohl die Viabilität als auch die Qualität und die Ausbeute der zu isolierenden Zellen direkt beeinflussen. Im Jahr 1982 wurde die Verwendung einer Kombination aus Pronase E und Collagenase vorgestellt, die mittlerweile eine oft verwendete Methode zur Isolation von KC und HSC darstellt (Knook et al. 1982). Für Methoden, in denen einzelne Zelltypen isoliert werden, wird Pronase oft als Verdauungsenzym eingesetzt, da dieses eine selektive Zerstörung von Hepatozyten hervorruft und somit die Zellqualität und -ausbeute der isolierten NPC erhöht (Valatas et al. 2003). Allerdings wurde berichtet, dass Pronase den CD14 Rezeptor auf KC spaltet (Ikejima et al. 1999). Der CD14 Rezeptor erkennt LPS und vermittelt das Signal zur Zytokinproduktion über den Corezeptor TLR4 (Heinzelmann, Bosshart 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Zwei-Schritt Perfusion, basierend auf der Technik von Seglen verwendet, in der  $\text{Ca}^{2+}$  freie EGTA Lösung und  $\text{Ca}^{2+}$  enthaltene Collagenase Typ IV Lösung eingesetzt wurden (Seglen

1976). In unterschiedlichen Studien wurde diese Methode mit geringen Modifikationen genutzt, um Hepatozyten von NPC zu trennen (Mitry et al. 2002). Bei der Verwendung dieser Prozedur konnte in der vorliegenden Arbeit, in Übereinstimmung mit der bisherigen Literatur, festgestellt werden, dass die Dauer der Collagenase Perfusion von entscheidender Bedeutung ist. Die Perfusionsdauer sollte 20min nicht überschreiten, da hierdurch die Zellviabilität und die Ausbeute verringert werden, wohingegen eine zu kurze Dauer die Separation der Leberzellen verhindert (Zeng et al. 2013).

Einige Isolationsmethoden beinhalten die Zentrifugation, Elutriation (Irving et al. 1984) und/oder eine Iodixanol, Percoll oder Stractan Dichtegradientenzentrifugation (Valatas et al. 2003, Daneker et al. 1998, Friedman, Roll 1987) zur Isolation einzelner Nagetier- oder humaner NPC Subpopulationen. Da NPC eine ähnliche Dichte aufweisen, ist die Separationsmethode für eine hohe Qualität der Zellpräparation essentiell. Damm *et al.* stellte eine Methode vor, in der PHH durch eine Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit isoliert werden. Anschließend erfolgt die Separation der NPC als eine Fraktion durch eine Percollgradienten Zentrifugation (25% und 50%) (Damm et al. 2013). Im Anschluss können KC durch die selektive Anheftung an Plastik von LSEC und HSC isoliert werden. Des Weiteren können die LSEC durch die Markierung mit CD31 *MicroBeads* mittels MACS isoliert werden. Die CD31<sup>+</sup> LSEC werden nach der Aufreinigung ausgesät. Die CD31 dezimierte Zellsuspension enthält die HSC, die direkt ausgesät werden können. Es ist anzunehmen, dass diese Methode eine hohe Reinheit an LSEC erzielt, während die Präparationen der KC und HSC eine ungenügende Reinheit aufweisen würden. Zusätzliche Schritte wären hier notwendig, um reine Zellsuspensionen zu erhalten. Im Gegensatz zu dieser Methode wurde in dieser Arbeit ein Drei-Schichten Iodixanol Dichtegradient verwendet, um die NPC voneinander zu separieren. Der Vorteil dieser Methode ist, dass KC und LSEC als eine Fraktion von den HSC getrennt werden konnten. Bisher sind keine geeigneten Oberflächenmarker für die Separation von HSC durch MACS erhältlich. Eine Ausnahme ist der Stamm/Vorläufer Zellmarker CD133. Mit Hilfe dieses Markers konnte die Isolation einer CD133<sup>+</sup> HSC Subpopulation aus der Ratte gezeigt werden (Kordes et al. 2007). In der

vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche magnetische *beads* verwendet, die spezifisch für KC (CD14) und LSEC (CD146) waren, um die Zellreinheit zu erhöhen. Die hier verwendete Methode führte zu hohen Zellausbeuten, die mit Methoden für die Isolation einzelner Zellpopulationen vergleichbar sind. In der hier verwendeten Methode wurde jedoch eine höhere Zellreinheit für kultivierte Zellen erreicht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zellpopulationen *in vitro* eine charakteristische Morphologie sowie funktionale physiologische Aktivität aufwiesen. Folglich stellen die so isolierten Zellen eine vielversprechende Methode zur experimentellen Untersuchung unterschiedlicher Leberfunktionen dar.

Die hier vorgestellte Methode repräsentiert ein variables Werkzeug mit einer breiten Spanne weiterer Perspektiven. Zum einen ist die Isolation der NPC nicht strikt erforderlich, so dass auch nur Hepatozyten präpariert werden können. Zusätzlich können CD133 positive HSC im Anschluss an die Dichtegradientenzentrifugation, durch die Markierung mit magnetischen *beads*, isoliert werden. Des Weiteren ist es möglich die CD14 und CD146 dezimierte Zellsuspension nach der Separation von PHH, KC, LSEC und HSC, direkt zur Isolation von NK- oder T-Zellpopulationen zu verwenden bzw. diese für eine spätere Präparation zu kryokonservieren. Alle isolierten Zellpopulationen können für Monozellkultur aber auch für Kokultur Experimente eingesetzt werden.

Die Charakterisierung der isolierten Zellen ist für die Bewertung der Zellqualität essentiell. Hierbei sind zelltypspezifische Marker zur Identifikation ein häufig diskutiertes Thema. In der vorliegenden Arbeit wurden die PHH Population durch die Marker Albumin, ApoB und CYP3A4 identifiziert. Als weiterer Marker für Hepatozyten könnte Cytokeratin 18 verwendet werden. Alle genannte Hepatozyten Marker sind in der Literatur etabliert (Nava et al. 2005, Liao, Ning 2006, Hubbard et al. 1979, Stockert 1995, Hubbard, Stukenbrok 1979). Zur Überprüfung der Funktionalität der Zellen wurde die Aktivität der Enzyme CYP3A4 und CYP2C9 dargestellt. Es existieren weitere Isoformen der CYP450 Familie, jedoch werden die gewählten Isoformen hauptsächlich in der Leber exprimiert (Raucy et al. 2002, Van Booven et al. 2010, Thummel, Wilkinson 1998).



Kultivierte KC wurden durch die Marker CD68, CD14 und CD163 identifiziert. Die Funktionalität der KC konnte durch die zeitabhängige Aufnahme von 1µm großen Latexpartikeln dargestellt werden. Sowohl die Marker als auch der Funktionalitätstest finden häufig Anwendung zur Darstellung der KC Qualität (Fabriek et al. 2005, Holness, Simmons 1993, Lau et al. 2004).

Kultivierte LSEC wurden durch die Marker PECAM1, vWF, LYVE-1 und CD146 identifiziert (Zanetta et al. 2000, Schrage et al. 2008, Nonaka et al. 2007, Mouta Carreira et al. 2001). Für die Identifikation von LSEC existiert eine Reihe an weiteren Markern, wobei ein Teil dieser Marker auch in vaskulären Endothelzellen exprimiert werden. Zu diesen gehören unter anderem *liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin* (L-SIGN). Zu den spezifischeren Markern gehören Stabilin-1 (STAB-1), Stabilin-2 (STAB-2) und CD32B (Bashirova et al. 2001, Mousavi et al. 2007, Vaporciyan et al. 1993, DeLeve et al. 2004, Hansen et al. 2005, Falkowski et al. 2003, Sorensen et al. 2012, Politz et al. 2002, McCourt et al. 1999). Die Aktivität der Zellen wurde durch die zeitabhängige Aufnahme von AcLDL bei gleichzeitiger Expression von CD146 nachgewiesen. Bei diesem Aktivitätsassay handelt es sich um eine häufig eingesetzte Methode zur Unterscheidung der LSEC von anderen Zellen (Voyta et al. 1984, Li et al. 2011). Allerdings ist bekannt, dass auch Kupffer Zellen AcLDL aufnehmen, jedoch in einem deutlich geringeren Maß als LSEC (Van Berkel et al. 1991). Aufgrund dessen war es für den Aktivitätsassay unerlässlich, eine geringe Konzentration des AcLDL sowie eine kurze Inkubationszeit zu wählen, da die Aufnahme des Moleküls durch KC nicht ausgeschlossen werden konnte (Ling et al. 1997, Van Berkel et al. 1991).

Kultivierte HSC wurden in ihrem aktiven Zustand durch die Marker  $\alpha$ -SMA, VCL, LOXL2 und Desmin identifiziert (Kawai et al. 2003, Enzan et al. 1994). Des Weiteren können zur Charakterisierung humaner Sternzellen sowohl Marker für den ruhenden (*quiescent*) Zustand als auch für den aktivierten Zustand von HSC herangezogen werden. Hierzu zählen *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), *platelet-derived growth factor receptor beta polypeptide* (PDGFRB), Collagen Typ I alpha I (Col1A1), Lysyl-Oxidase (LOX) sowie dessen Isoformen (Perepelyuk et al. 2013, Yokoi et al. 1984, Morini et al. 2005, Neubauer et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die

funktionelle Aktivität kultivierter Sternzellen über die Vitamin A Autofluoreszenz nachgewiesen (Friedman 2008, Wake 1971). Hierbei war zu beachten, dass die Sternzellen in Kultur in einen aktiven Zustand transformieren, der mit dem Verlust der Vitamin A Speicherfunktion einhergeht. Aufgrund dessen wurden Sternzellen verwendet, die nur für wenige Tage kultiviert wurden. Darüber hinaus wurde der Marker CYGB in den Sternzellen angefärbt. CYGB dient zum einen als Marker für aktivierte und inaktivierte HSC. Zum anderen wird CYGB nur von HSC und nicht von Myofibroblasten exprimiert, so dass eine Unterscheidung der beiden Zelltypen stattfinden konnte (Motoyama et al. 2014).

Primäre Zellkulturen von Hepatozyten sind zu einem Standardmodell zur Untersuchung von hepatotoxischen Effekten von neuen Medikamenten und Chemikalien geworden (Sahi et al. 2010). *In vivo* erleichtert die Nähe zwischen den Hepatozyten und den hepatischen Immunzellen die Induktion der pro- oder antiinflammatorischen Immunantwort. Aufgrund dessen sind Leberzellkokulturen eine nützliche Anwendung, z. B. um die Toxizität von Xenobiotika zu testen. Unter anderem wurden Kokulturen primärer Hepatozyten und KC als Modell verwendet, um den Xenobiotik Metabolismus und dessen pharmakologische Auswirkungen zu testen (Milosevic et al. 1999). Hier wurden primäre Hepatozyten und KC von unterschiedlichen Rattenlebern isoliert. Die Zelltypen wurden als Monokulturen und als Kokulturen verwendet, um den Metabolismus und die intrazelluläre Kommunikation, durch den Austausch von löslichen Faktoren, zu untersuchen. Unter Verwendung von Zellkultur Inserts mit einer porösen Membran (Trans-Well Situation) wurden die Zelltypen räumlich getrennt gehalten. Die Autoren folgern, dass das Trans-Well System verglichen mit dem Zell-Zell Kokultursystem ein näheres Modell zur *in vivo* Situation schafft, da eine physikalische Barriere zwischen den KC und den Hepatozyten vorliegt (Milosevic et al. 1999). Durch die Verwendung von Monozellkulturen und Kokulturen konnte die initiale Rolle von KC und KC abgeleiteten Faktoren (Austausch über das Medium) auf die Hepatozyten Toxizität dargestellt werden. In einer weiteren Studie wurden primäre Hepatozyten und KC aus derselben Rattenleber isoliert und für ein Kokulturmodell mit direktem Zell-Zell Kontakt verwendet. Hierbei wurden die Xenobiotika induzierten inflammatorischen

Interaktionen analysiert (Tukov et al. 2006). Die Autoren demonstrieren, dass die Ergebnisse der Studie die Daten aus Tiermodellen reflektieren und empfehlen dieses Modell für die Vorhersage der Xenobiotika vermittelten Inflammation *in vivo*.

Die Leberfibrose ist eine Konsequenz chronischer Leberschädigung. Unter anderem sind chronische virale Hepatiden (Hepatitis B und C), Alkoholmissbrauch und nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) Hauptgründe für die Entstehung der Leberfibrose und ein daraus resultierendem erhöhten Risikos für die Entwicklung einer Leberzirrhose sowie des hepatozellulären Karzinoms (Bataller et al. 2005). Die Fibrose ist charakterisiert durch eine kontinuierliche, exzessive Produktion von ECM sowie Collagen, was zu einer permanenten Narbenbildung und Organdysfunktion und letztlich zum Organversagen führen kann (Wynn, Ramalingam 2012). HSC wurden als der Collagen produzierende Zelltyp in der Leber identifiziert (Friedman et al. 1985). In dem Prozess der Leberfibrogenese werden HSC aktiviert und transformieren zu Myofibroblasten. Während des Prozesses der Leberschädigung werden KC aktiviert und setzen inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die wiederum den aktivierten Status der HSC auslösen und somit die Produktion von ECM und Collagen induzieren (Kolios et al. 2006). Des Weiteren wird der Prozess der LSEC Kapillarisation als ein Vorläufer der Leberfibrose genannt. Die Kapillarisation ist, durch den Verlust der Fenestrierung und der Entwicklung einer organisierten basalen Membran, charakterisiert. Dieser Prozess wird durch den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der von Hepatozyten und HSC produziert wird, vorangetrieben. Die Kapillarisation der LSEC wiederum aktiviert die Sternzellen, wodurch die Fibrose gefördert wird (DeLeve 2014). Bisher ist die effektivste Therapie der Leberfibrose das Entfernen des auslösenden Mechanismus (Bataller, Brenner 2005). Für die Entwicklung von anti-fibrotischen Therapeutika sind weitere Studien notwendig, um eine robuste Vermeidung der Fibrogenese zu erhalten. Die hier verwendete Leberzellpräparation ermöglicht es, zelluläre und molekulare Mechanismen der fibrotischen Prozesse zu analysieren und kann zur Entwicklung von effektiven Therapeutika für Patienten mit chronischen Leberschäden beitragen.

Zusammengefasst wurde eine *all-in-one* Technik zur Isolation von PHH, KC, LSEC und HSC aus humanem Lebergewebe entwickelt. Diese Methode führt zu hohen Zellausbeuten und einer hohen Reinheit der Zellpopulationen mit erhaltener physiologischer Aktivität *in vitro*. Die dargestellte Methode ist variabel und erlaubt zusätzliche Separationsschritte. Isolierte Zellen können sowohl als Monokultur als auch in Kokulturen genutzt werden, um z. B. Hepatotoxizität oder pathophysiologischen chronischen Lebererkrankungen zu untersuchen. Die *all-in-one* Leberpräparationstechnik stellt ein vielversprechendes Werkzeug für die Untersuchung zellulärer und molekularer Mechanismen der Leberfunktion und Lebererkrankung dar.

## **4.2 Die TLR Signaltransduktion in primären NPC ist zelltypspezifisch**

NPC stellen eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems dar. Die Zellen sind mit PRR (z. B. TLR) ausgestattet, die nach Erkennung der PAMP Reaktionen des angeborenen Immunsystems auslösen. Bisherige Studien thematisierten den TLR Signalweg muriner NPC und humaner Hepatozyten (Broering et al. 2008, Broering et al. 2014). Es konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass murine KC (mit Ausnahme von TLR5) und murine LSEC (mit Ausnahme von TLR5 und TLR9) alle TLR produzieren (Wu et al. 2010). Darüber hinaus wurde die TLR1-9 Genexpression in murinen und humanen HSC nachgewiesen (Wang et al. 2009). Für das humane System liegen nur wenige Daten bezüglich der TLR Expressionen vor. In humanen KC wurde die Expression von TLR2, TLR3 und TLR4 mittels Durchflusszytometrie dargestellt (Tu et al. 2008, Visvanathan et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde der TLR Signalweg in humanen KC, LSEC und HSC, die aus dem identischen Lebergewebe isoliert wurden, analysiert. Zunächst konnte hier die TLR1-8 Genexpression in humanen KC, LSEC und HSC gezeigt werden. Die Genexpression von TLR9 lag in allen drei Zelltypen unterhalb des Detektionslimits. Des Weiteren wurde untersucht, ob die TLR Genexpression durch die Stimulation mit dem jeweiligen Liganden induziert werden konnte. Die Stimulation mit dem Liganden Poly I:C führte zur signifikanten Induktion der TLR3 Genexpression. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation von TLR4, TLR5, TLR6 durch ihre Liganden zur Suppression der Rezeptor Genexpressionen. Letzteres Phänomen könnte als Toleranzmechanismus der NPC verstanden werden. Unter physiologischen Bedingungen ist die Leber permanent Pathogenen ausgesetzt, die von den Leberzellen (z. B. LSEC) erkannt werden. Die dauerhafte Pathogen Belastung kann zu einer Toleranzinduktion führen, die durch die Zellen der Leber vermittelt wird. Durch Toleranzmechanismen innerhalb der Leber werden dauerhafte Entzündungsreaktionen unter physiologischen Bedingungen vermieden. Eine dauerhafte Aktivierung des Immunsystems würde letztlich zur Schädigung der Hepatozyten, die einen Großteil der Leberfunktionen ausführen, und damit zur Schädigung der Leber selbst führen (Tiegs, Lohse 2010, Knolle, Gerken 2000).

In dieser Arbeit wurden primäre NPC Zellpopulationen mit einem definierten Phänotyp und definierten Charakteristiken verwendet, um die Fähigkeit zur TLR abhängigen Zytokinproduktion der einzelnen Zelltypen zu untersuchen. Darüber hinaus wurden die Signalwege, die nach der Aktivierung der TLR zur Transkription von Zytokinen und Interferonen führen, analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von NPC mit TLR Liganden vor allem zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges sowie der MAPK JNK und p38 führte. Diese Signalwege führten letztlich zur Induktion der Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine. In der Literatur liegen nur begrenzt Daten vor, in denen das Potential der TLR induzierten Zytokinproduktion von humanen NPC beschrieben wird. Unter anderem wurde gezeigt, dass humane KC nach der Stimulation mit LPS (TLR4 Ligand) die Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 sezernieren (Knolle et al. 1995). Darüber hinaus konnte eine weitere Studie zeigen, dass murine KC nach der Stimulation von TLR1-9 die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 sezernieren. Im Gegensatz dazu kommt es in murine LSEC nach der Stimulation von TLR1-4, TLR6 sowie TLR8-9 zur Sekretion von TNF- $\alpha$ , während IL-6 nur nach Stimulation von TLR3 und TLR4 sezerniert wird (Wu et al. 2010). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass murine HSC nach Stimulation von TLR3 und TLR4 TNF- $\alpha$  sezernieren (Wang et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane KC, LSEC und HSC pro- und antiinflammatorische Zytokine (IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10) in Reaktion auf die TLR Stimulation in einer zelltypspezifischen Weise produzieren. Werden die hier untersuchten Zelltypen (KC, LSEC und HSC) untereinander und mit Daten zu PHH (Broering et al. 2014) verglichen, zeigten KC das höchste Potential für die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10. Darüber hinaus wiesen die HSC und die KC das höchste Potential zur Expression von IL-6 auf. Des Weiteren zeigten HSC nur ein sehr geringes Potential der TLR induzierten Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-10. Durch die Aktivierung der TLR werden die Zytokine von NPC freigesetzt, wodurch weitere Zellen aktiviert werden. Besonders KC, die als sogenannte „Fresszellen“ dienen, phagozytieren Pathogene und körpereigene Substanzen (Erythrozyten, apoptotische Zellen, Zelltrümmer), um diese aus dem Blutstrom zu entfernen (Dini et al. 2002). Ferner sind KC bei der Aufrechterhaltung der Toleranz der Leber beteiligt. Dieser

Prozess könnte durch die Produktion des inflammatorischen Zytokins IL-10 unterstützt werden.

In der vorliegenden Arbeit führte die Stimulation von NPC mit dem TLR3 Liganden Poly I:C zu einer Induktion der Genexpression von Typ I (IFN- $\beta$ ) und Typ III (IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 und IFN- $\lambda$ 3) Interferonen sowie zur Genexpression von ISG. Anders als in murinen KC führte die TLR4 Stimulation nicht zur Induktion von IFN- $\beta$  (Broering et al. 2008, Wu et al. 2010). Im Einklang mit der bestehenden Literatur kam es in humanen LSEC und HSC verglichen mit dem murinen System ausschließlich nach Stimulation des TLR3 zur Expression von IFN- $\beta$  (Broering et al. 2008, Wu et al. 2010, Wang et al. 2009).

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass primäre NPC (KC, LSEC und HSC) eine funktionelle TLR Signaltransduktion aufwiesen. Diese löste zelltypspezifische Immunantworten aus, welche die Produktion inflammatorischer Zytokine und IFN beinhaltete.

### **4.3 Die antivirale Aktivität humaner NPC ist auf den TLR3 begrenzt und verläuft über Typ I Interferone**

Die TLR stellen wichtige Rezeptoren der angeborenen Immunantwort dar. Die Aktivierung der Rezeptoren führt zur Produktion von pro- und antiinflammatorischer Zytokine. Die TLR sind für die Erkennung von unterschiedlichen PAMP wie z. B. bakterielle Komponenten und viraler Strukturen verantwortlich. Das HCV ist ein hepatotropes RNA Virus, das die Parenchymzellen der Leber (Hepatozyten) befällt. Bisher ist wenig über die direkte Wechselwirkung zwischen KC, LSEC und HSC und dem HCV bekannt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass auch NPC Rezeptoren wie z. B. *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN) exprimieren, die jedoch nicht von Hepatozyten exprimiert werden. Diese Rezeptoren binden den HCV und unterstützen möglicherweise die Infektion von Hepatozyten oder reichern das Virus innerhalb der Leber an (Tu et al. 2010, Lai et al. 2006, Pohlmann et al. 2003). Experimentelle Studien konnten bisher zeigen, dass TLR3 und TLR4 aktivierte murine KC und TLR3 aktivierte murine LSEC, durch die Produktion des Typ I Interferons IFN- $\beta$ , einen starken suppressiven Effekt auf das murine HCV Replikonsystem MH1 ausüben (Broering et al. 2008, Wu et al. 2010). Darüber hinaus werden auch Typ III Interferone durch virale Infektionen induziert und üben eine antivirale Aktivität aus (Sheppard et al. 2003). In dieser Hinsicht konnte gezeigt werden, dass Typ III Interferone die HBV Replikation in der murinen Hepatozyten Zelllinie (HBV-Met) und die HCV Replikation in der humanen Hepatozyten Zelllinie Huh7 inhibieren (Robek et al. 2005). Des Weiteren konnten Thomas *et al.* zeigen, dass die Typ III IFN Genexpression (und nicht die Typ I IFN Genexpression) in Leberbiopsien von Schimpansen hochreguliert ist (Thomas et al. 2012). Ferner wurde gezeigt, dass die Typ III IFN Genexpression durch die Stimulation mit dem RIG-I bzw. TLR3 Liganden Poly I:C induziert wird (Thomas et al. 2012, Broering et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde das humane Con1 Replikonsystem verwendet, um die TLR abhängige antivirale Aktivität humaner NPC auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Unter Verwendung des HCV Replikonsystems konnte gezeigt werden, dass Poly I:C behandelte humane NPC die HCV Replikation supprimieren. Poly I:C stimulierte



NPC vermittelten die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3, die Expression und Sekretion von Typ I und Typ III Interferonen sowie die Expression von ISG. Zur Identifikation des Mediators wurden die Überstände Poly I:C stimulierter Zellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  oder IFN- $\lambda$  inkubiert. In diesem Fall konnte der antivirale Effekt nicht aufgehoben werden. Da bekannt ist, dass IFN- $\lambda$  die antivirale Effizienz von IFN- $\alpha$  steigern (Marcello et al. 2006) wurde vermutet, dass Typ I Interferone zusammen mit Typ III Interferone den antiviralen Effekt vermitteln. Um der Frage nachzugehen, wurden die genannten Interferontypen gleichzeitig mittels neutralisierender Antikörper blockiert. In Übereinstimmung mit den einzelnen Blockierungen konnte kein signifikanter Effekt detektiert werden (Daten wurden nicht gezeigt). Im Gegensatz zu Studien in primären humanen Hepatozyten (Broering et al. 2014), konnte keine prädominante Rolle der Typ III Interferone festgestellt werden. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit die Rezeptoren für Typ I (IFNAR2) und Typ III (IL-10R2) Interferone mittels neutralisierender Antikörper blockiert. Interessanterweise konnte im Fall des Typ I Rezeptors IFNAR2 der antivirale Effekt der Poly I:C stimulierten NPC vollständig aufgehoben werden. Es konnte somit gefolgert werden, dass die antivirale Aktivität über Typ I Interferone verläuft, jedoch nicht über IFN- $\alpha$  oder IFN- $\beta$ .

Es existieren 13 IFN- $\alpha$  Subtypen, jedoch nur eine Form des IFN- $\beta$ . Aufgrund dessen wurde die Genexpression der IFN- $\alpha$  Subtypen in den NPC untersucht. Hierbei konnten nur niedrige Expressionslevel detektiert werden, die auch durch die Stimulation mit Poly I:C nur geringfügig gesteigert werden konnten. Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass IFN- $\alpha$  nur eine untergeordnete Rolle in der antiviralen Aktivität der NPC spielt. Potentielle Kandidaten für die Vermittlung des antiviralen Effektes bleiben IFN- $\epsilon$ , - $\kappa$  und - $\omega$ , die ebenfalls an den IFNAR2 binden. Deren Rolle in diesem Zusammenhang sollte in zukünftigen Arbeiten geklärt werden.

#### **4.4 LSEC von HCV positiven Patienten besitzen eine höhere Sensitivität gegenüber Poly I:C**

Es ist bekannt, dass das HCV in den TLR Signalweg eingreift und die Immunantwort von Hepatozyten und Immunzellen behindert. Es wurde gezeigt, dass *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) aus chronisch infizierten HCV Patienten, verglichen mit den PBMC nicht infizierter Patienten, erhöhte TLR Expressionen aufweisen (Riordan et al. 2006). Auf zellulärer Ebene ist bekannt, dass das Virus die Signaltransduktion humaner KC beeinflusst. Darüber hinaus ist das Virus in der Lage die Produktion inflammatorischer Zytokine zu induzieren sowie die angeborene und die adaptive Immunantwort zu inhibieren. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von humanen Makrophagen mit dem HCV Core Protein bzw. mit dem NS3 zur Produktion von IL-6, TNF- $\alpha$ , und IL-10 führt (Tu et al. 2010, Chang et al. 2007). TNF- $\alpha$  ist ein zytotoxischer Faktor, der zur Apoptose von Hepatozyten führen kann (Malhi et al. 2010). Darüber hinaus inhibiert das Virus die Poly I:C vermittelte Produktion von Typ I Interferonen ( $\alpha/\beta$ ) (Li et al. 2005). Da die HCV Infektion keinen direkt zellschädigenden Effekt besitzt, wird angenommen, dass die Leberschädigung durch die Immunantwort des Wirts ausgelöst wird. Die Immunantwort der NPC kann zur Bekämpfung des HCV oder zur Zerstörung des Lebergewebes, durch die Unterstützung von Prozessen wie der Leberfibrose und der Leberzirrhose, beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Immunantwort von NPC nach Stimulation der TLR1-9 untersucht. Hierbei wurde die Immunantwort von Zellen aus HCV positiven Patienten der Immunantwort von Zellen aus HCV negativen Patienten gegenübergestellt. Es konnte hier gezeigt werden, dass in der HCV Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe die KC und LSEC nach Stimulation der TLR jeweils eine erhöhte IL-6 Genexpression zeigten. Im Gegensatz dazu lag in den HSC der HCV Gruppe eine geringe IL-6 Genexpression vor. Darüber hinaus führte die TLR3- und TLR8 Stimulation von KC zu einer verringerten TNF- $\alpha$  Genexpression in der HCV Gruppe. Die Genexpression von IL-10 lag in der HCV Gruppe im unbehandelten Zustand (w/o) und nach Stimulation des TLR9 verringert vor. KC und HSC zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Expression von Typ I und Typ III Interferonen zwischen beiden Versuchsgruppen. Allein in LSEC aus HCV positiven Patienten kam

es zu einer signifikant erhöhten Sensitivität gegenüber der Poly I:C Stimulation und somit zur erhöhten Genexpression von IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 und IFN- $\lambda$ 3. In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass die dauerhafte Aktivierung von TLR, über einen Zeitraum von zehn Tagen, zu einer erhöhten Sensitivität von PHH gegenüber des TLR3 Liganden führt. Diese äußerte sich in einer erhöhten Genexpression von Interferonen und ISG (Broering et al. 2014). KC und LSEC fungieren als erster Angriffspunkt für Pathogene. Auch in diesem Fall kann eine erhöhte Sensitivität der Zellen durch die chronische HCV Infektion der Patienten angenommen werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass NPC wichtige Mediatoren der Immunantwort exprimierten. Die Produktion von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 führt unter anderem zur Aktivierung von Nachbarzellen und von NK-Zellen, wodurch die Apoptose von Hepatozyten unterstützt wird (Notas et al. 2009). Die Expression von Interferonen führt zu einem direkten antiviralen Effekt gegenüber dem HCV. LSEC stellen die Barriere zu den Hepatozyten dar und scheinen in dem antiviralen Prozess besonders sensitiv zu sein. Weitere Untersuchungen direkter und indirekter Interaktionen zwischen PHH, LSEC und dem HCV könnten Aufschluss geben.

## 4.5 Ausblick

Die in der Arbeit dargestellte *all-in-one* Isolationsmethode besitzt ein hohes Potential zur Untersuchung der zellulären Beteiligung der Leberzellen in unterschiedlichen Lebererkrankungen. Die Methode ist variabel und ermöglicht es, weitere Zelltypen, wie z. B. Lymphozyten zu isolieren. Darüber hinaus bietet die Isolationsmethode die Möglichkeit die zelluläre Kommunikation der einzelnen Zellpopulationen unter Verwendung von Kokulturmodellen zu untersuchen.

KC, LSEC und HSC, die aus HCV infiziertem Lebergewebe isoliert wurden, zeigten ein unterschiedliches Ansprechen gegenüber TLR Liganden. Insbesondere zeigten die LSEC HCV infizierter Patienten eine gesteigerte Sensitivität in Reaktion auf die Stimulation mit dem Liganden Poly I:C. Die unterschiedlichen Sensitivitäten der NPC, resultierend aus der HCV Infektion, sind besonders im Hinblick auf die Toleranzmechanismen der Leber interessant. In der Leber wird die Toleranz gegenüber den eigentlichen Entzündungsreaktionen favorisiert. Aufgrund dessen könnte das Modell verwendet werden, um die Wechselwirkung der Zellen mit dem HCV weiter aufzuschlüsseln. Da die Verfügbarkeit an Lebergewebe von HCV infizierten Patienten limitiert ist, könnte Gewebe von nicht HCV infizierten Patienten verwendet werden. Diese Lebergewebe könnten mit einer HCV Partikellösung oder einer Poly I:C Lösung *ex vivo* durchspült werden, um die HCV Infektion zu simulieren. Der Vorteil hierbei wäre, dass die Leberarchitektur erhalten ist und somit der *in vivo* Situation ähnelt. Im Anschluss können die Primärzellen isoliert und das Zusammenspiel der Leberzellen im Rahmen der Virus induzierten Immunantwort analysiert werden.

Die Aktivierung des TLR3 führte zu einer antiviralen Immunantwort in den NPC. Neutralisationsexperimente konnten zeigen, dass das antivirale Potential über den Typ I IFN Rezeptor verläuft. Der antivirale Effekt konnte jedoch nicht auf IFN- $\alpha$  oder IFN- $\beta$  zurückgeführt werden. Da noch weitere Vertreter der Typ I Interferone (IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  und IFN- $\omega$ ) existieren, kann eine Spezifizierung des Neutralisationsexperiments zur Identifikation eines oder mehrerer Mediatoren der antiviralen Aktivität führen.

## 5 Zusammenfassung

Die chronische Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) ist unter anderem mit einer erhöhten Expression von Interferon sensitiven Genen (ISG) in der Leber verbunden. Die chronische Infektion mit dem Virus kann zur Entstehung von Leberfibrose, Leberzirrhose oder zum hepatozellulärem Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) führen. Nicht-parenchymale Leberzellen (NPC) spielen in der angeborenen Immunabwehr und bei der Induktion der Immuntoleranz eine entscheidende Rolle. Ihre Funktion in der Abwehr gegenüber dem HCV ist nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die simultane Isolation von Hepatozyten, Kupffer Zellen (KC), lebersinusoidalen Endothelzellen (LSEC) und hepatischen Sternzellen (HSC) aus humanem Lebergewebe optimiert. Die kultivierten Zellen wurden im Hinblick auf ihre Morphologie, der Expression von zelltypspezifischen Markern sowie der zelltypspezifische Kontrolle der physiologischen Aktivität bewertet. Die hier verwendete Methode führte zu hoch reinen Primärzellpopulationen mit erhaltener physiologischer Aktivität *in vitro*.

Anschließend wurde das TLR System in kultivierten KC, LSEC und HSC analysiert. Die Stimulation der TLR1-9 führte zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege. Hierzu zählt unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor-kappaB* (NF- $\kappa$ B) und des mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) Weges (JNK, p38 und ERK1/2). Darüber hinaus führte die Stimulation der TLR1-9 in KC, LSEC und HSC zu einer zelltypabhängigen Produktion inflammatorischer Zytokine (Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und IL-10).

Zur Untersuchung der antiviralen Aktivität von KC, LSEC und HSC wurde das Con1 HCV Replikonsystem verwendet. Die Stimulation von Con1 Zellen mit den Überständen von NPC, die zuvor mit TLR1-9 Liganden behandelt wurden, führte ausschließlich im Fall von TLR3 zu einer Suppression der HCV Replikation. Des Weiteren führte diese Stimulation zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *interferon regulatory factor 3* (IRF3), der ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Induktion von

Interferonen (IFN) darstellt. Die Stimulation mit dem TLR3 Liganden Poly I:C führte in allen drei Zelltypen zur Produktion von IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 und IFN- $\lambda$ 3 sowie von ISG. Zur Identifikation von Mediatoren, die den antiviralen Effekt vermitteln, wurden Experimente zur Neutralisation von Typ I und Typ III Interferonen sowie deren Rezeptoren durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass der antivirale Effekt über den Typ I IFN Rezeptor verläuft. Allerdings wurde durch die Neutralisation von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  der antivirale Effekt nicht aufgehoben, so dass nicht ausgemacht werden konnte, welches Typ I IFN für diesen Prozess verantwortlich ist.

Um den Einfluss der HCV Infektion auf die TLR Sensitivität der NPC zu untersuchen, wurden Zellen aus HCV infizierten Patienten mit Zellen aus nicht infizierten Patienten verglichen. LSEC von HCV positiven Patienten reagierten auf die Stimulation mit dem TLR3 Liganden Poly I:C mit einer gesteigerten Genexpression von IL-6, IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 und IFN- $\lambda$ 3, während in KC und HSC lediglich geringe Unterschiede im Fall von IL-6 und TNF- $\alpha$  festgestellt werden konnten.

Zusammengefasst konnten in der vorliegenden Arbeit humane Hepatozyten, KC, LSEC und HSC mit einer hohen Zellzahl, einer hohen Reinheit und einer erhaltenen physiologischen Aktivität isoliert und kultiviert werden. Die kultivierten NPC zeigten eine funktionierende TLR Signaltransduktion, die zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Interferonen führte. Ein antiviraler Effekt wurde ausschließlich nach der Stimulation des TLR3 vermittelt und scheint über die Produktion von Typ I Interferonen zu verlaufen. Die hier dargestellten Erkenntnisse geben Aufschluss über die Funktion der KC, LSEC und HSC in der Immunabwehr und Immuntoleranz gegenüber dem HCV.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124, 783-801.
- 2 Alabraba, E.B., Curbishley, S.M., Lai, W.K., Wigmore, S.J., Adams, D.H., Afford, S.C. (2007): A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells. *J. Immunol. Methods*. 326, 139-144.
- 3 Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413, 732-738.
- 4 Bashirova, A.A., Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Eilering, J.B., Martin, M.P., Wu, L., Martin, T.D., Viebig, N., Knolle, P.A., KewalRamani, V.N., van Kooyk, Y., Carrington, M. (2001): A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 193, 671-678.
- 5 Bataller, R., Brenner, D.A. (2005): Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 115, 209-218.
- 6 Bataller, R., Sancho-Bru, P., Gines, P., Brenner, D.A. (2005): Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1346-1355.
- 7 Bhogal, R.H., Hodson, J., Bartlett, D.C., Weston, C.J., Curbishley, S.M., Haughton, E., Williams, K.T., Reynolds, G.M., Newsome, P.N., Adams, D.H., Afford, S.C. (2011): Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One*. 6, e18222.
- 8 Bio-Rad. (2014): Trans-Blot Turbo Instrument Protocol, Rev A, 10039859. <http://www.bio-rad.com/de-de/product/semi-dry-rapid-blotting-systems/trans-blot-turbo-transfer-system>.
- 9 Blight, K.J., Norgard, E.A. (2006): HCV Replicon Systems. In: Tan, S.L. (Eds.) *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. 1. Ed., 311-351. Norfolk (UK): Horizon Bioscience.
- 10 Blouin, A., Bolender, R.P., Weibel, E.R. (1977): Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* 72, 441-455.
- 11 Bouwens, L., Baekeland, M., De Zanger, R., Wisse, E. (1986): Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology*. 6, 718-722.

- 12 Braet, F., De Zanger, R., Sasaoki, T., Baekeland, M., Janssens, P., Smedsrod, B., Wisse, E. (1994): Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Lab. Invest.* 70, 944-952.
- 13 Braet, F., Wisse, E. (2002): Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* 1, 1.
- 14 Broering, R., Lutterbeck, M., Trippler, M., Kleinehr, K., Poggenpohl, L., Paul, A., Gerken, G., Schlaak, J.F. (2014): Long-term stimulation of Toll-like receptor 3 in primary human hepatocytes leads to sensitization for antiviral responses induced by poly I:C treatment. *J. Viral Hepat.* 21, 480-490.
- 15 Broering, R., Wu, J., Meng, Z., Hilgard, P., Lu, M., Trippler, M., Szczeponek, A., Gerken, G., Schlaak, J.F. (2008): Toll-like receptor-stimulated non-parenchymal liver cells can regulate hepatitis C virus replication. *J. Hepatol.* 48, 914-922.
- 16 Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., Martin, M. (2011): TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* 90, 417-427.
- 17 Canbay, A., Feldstein, A.E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S.F., Gores, G.J. (2003): Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology.* 38, 1188-1198.
- 18 Cassiman, D., Libbrecht, L., Desmet, V., Denef, C., Roskams, T. (2002): Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J. Hepatol.* 36, 200-209.
- 19 Chang, S., Dolganiuc, A., Szabo, G. (2007): Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J. Leukoc. Biol.* 82, 479-487.
- 20 Chang, W., Yang, M., Song, L., Shen, K., Wang, H., Gao, X., Li, M., Niu, W., Qin, X. (2014): Isolation and culture of hepatic stellate cells from mouse liver. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 46, 291-298.
- 21 Clavien, P.A., Camargo, C.A., Jr, Cameron, R., Washington, M.K., Phillips, M.J., Greig, P.D., Levy, G.A. (1996): Kupffer cell erythrophagocytosis and graft-versus-host hemolysis in liver transplantation. *Gastroenterology.* 110, 1891-1896.
- 22 Correia, J.D., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. (2001): Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex - Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.* 276, 21129-21135.



- 23 Damm, G., Pfeiffer, E., Burkhardt, B., Vermehren, J., Nüssler, A.K., Weiss, T.S. (2013): Human parenchymal and non-parenchymal liver cell isolation, culture and characterization. *Hepatology International*. 7, 951-958.
- 24 Dancygier, H. (2003): Mikroskopische Anatomie. In: Dancygier, H. (Eds.) *Klinische Hepatologie*. 1. Ed., 10-39. Berlin, Heidelberg: Springer.
- 25 Daneker, G.W., Lund, S.A., Caughman, S.W., Swerlick, R.A., Fischer, A.H., Staley, C.A., Ades, E.W. (1998): Culture and characterization of sinusoidal endothelial cells isolated from human liver. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 34, 370-377.
- 26 de Weerd, N.A., Samarajiwa, S.A., Hertzog, P.J. (2007): Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J. Biol. Chem.* 282, 20053-20057.
- 27 DeLeve, L.D. (2011): Vascular liver disease and the liver sinusoidal endothelial cell. In: Anonymous (Eds.) *Vascular Liver Disease*. 1. Ed., 25-40. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer.
- 28 DeLeve, L.D. (2014): Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology*. 123, 1861-1866.
- 29 DeLeve, L.D., Wang, X., Hu, L., McCuskey, M.K., McCuskey, R.S. (2004): Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G757-63.
- 30 Diegelmann, J., Beigel, F., Zitzmann, K., Kaul, A., Goeke, B., Auernhammer, C.J., Bartenschlager, R., Diepolder, H.M., Brand, S. (2010): Comparative Analysis of the Lambda-Interferons IL-28A and IL-29 regarding Their Transcriptome and Their Antiviral Properties against Hepatitis C Virus. *Plos One*. 5, e15200.
- 31 Dini, L., Pagliara, P., Carla, E.C. (2002): Phagocytosis of apoptotic cells by liver: a morphological study. *Microsc. Res. Tech.* 57, 530-540.
- 32 Dubuisson, J. (2007): Hepatitis C virus proteins. *World J. Gastroenterol.* 13, 2406-2415.
- 33 Elvevold, K., Smedsrod, B., Martinez, I. (2008): The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G391-400.
- 34 Elvevold, K.H., Nedredal, G.I., Revhaug, A., Smedsrod, B. (2004): Scavenger properties of cultivated pig liver endothelial cells. *Comp. Hepatol.* 3, 1-11.
- 35 Enzan, H., Himeno, H., Iwamura, S., Saibara, T., Onishi, S., Yamamoto, Y., Hara, H. (1994): Immunohistochemical Identification of Ito Cells and their

- Myofibroblastic Transformation in Adult Human Liver. *Virchows Archiv-an International Journal of Pathology.* 424, 249-256.
- 36 Fabrik, B., Dijkstra, C., van den Berg, T. (2005): The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology.* 210, 153-160.
- 37 Falkowski, M., Schledzewski, K., Hansen, B., Goerdts, S. (2003): Expression of stabilin-2, a novel fasciclin-like hyaluronan receptor protein, in murine sinusoidal endothelia, avascular tissues, and at solid/liquid interfaces. *Histochem. Cell Biol.* 120, 361-369.
- 38 Friedman, S.L. (2008): Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* 88, 125-172.
- 39 Friedman, S.L., Roll, F.J. (1987): Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. *Anal. Biochem.* 161, 207-218.
- 40 Friedman, S.L., Roll, F.J., Boyles, J., Bissell, D.M. (1985): Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 8681-8685.
- 41 Geerts, A. (2001): History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 21, 311-335.
- 42 Ghany, M.G., Strader, D.B., Thomas, D.L., Seeff, L.B., American Association for the Study of Liver Diseases. (2009): Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.* 49, 1335-1374.
- 43 Gibbert, K., Schlaak, J.F., Yang, D., Dittmer, U. (2013): IFN-alpha subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. *Br. J. Pharmacol.* 168, 1048-1058.
- 44 Guan, Y., Ranoa, D.R., Jiang, S., Mutha, S.K., Li, X., Baudry, J., Tapping, R.I. (2010): Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J. Immunol.* 184, 5094-5103.
- 45 Hamming, O.J., Terczynska-Dyla, E., Vieyres, G., Dijkman, R., Jorgensen, S.E., Akhtar, H., Siupka, P., Pietschmann, T., Thiel, V., Hartmann, R. (2013): Interferon lambda 4 signals via the IFNlambda receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *EMBO J.* 32, 3055-3065.
- 46 Han, J., Barton, D. (2002): Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA-Publ. RNA Soc.* 8, 512-525.
- 47 Hansen, B., Longati, P., Elvevold, K., Nedredal, G.I., Schledzewski, K., Olsen, R., Falkowski, M., Kzhyshkowska, J., Carlsson, F., Johansson, S., Smedsrod, B.,

- Goerdts, S., Johansson, S., McCourt, P. (2005): Stabilin-1 and stabilin-2 are both directed into the early endocytic pathway in hepatic sinusoidal endothelium via interactions with clathrin/AP-2, independent of ligand binding. *Exp. Cell Res.* 303, 160-173.
- 48 Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 303, 1526-1529.
- 49 Heinzelmann, M., Bosshart, H. (2005): Heparin binds to lipopolysaccharide (LPS)-binding protein, facilitates the transfer of LPS to CD14, and enhances LPS-induced activation of peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 174, 2280-2287.
- 50 Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 408, 740-745.
- 51 Holness, C.L., Simmons, D.L. (1993): Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood.* 81, 1607-1613.
- 52 Hoofnagle, J.H. (2002): Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* 36, 21-9.
- 53 Hubbard, A.L., Stukenbrok, H. (1979): An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver. II. Intracellular fates of the <sup>125</sup>I-ligands. *J. Cell Biol.* 83, 65-81.
- 54 Hubbard, A.L., Wilson, G., Ashwell, G., Stukenbrok, H. (1979): An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver. I. Distribution of <sup>125</sup>I-ligands among the liver cell types. *J. Cell Biol.* 83, 47-64.
- 55 Ikejima, K., Enomoto, N., Seabra, V., Ikejima, A., Brenner, D.A., Thurman, R.G. (1999): Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am. J. Physiol.* 276, G591-8.
- 56 Irving, M.G., Roll, F.J., Huang, S., Bissell, D.M. (1984): Characterization and culture of sinusoidal endothelium from normal rat liver: lipoprotein uptake and collagen phenotype. *Gastroenterology.* 87, 1233-1247.
- 57 Isaacs, A., Lindenmann, J. (1987): Virus interference. I. The interferon. *J. Interferon Res.* 7, 429-438.
- 58 Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., Marcellin, P., Muir, A.J., Ferenci, P., Flisiak, R., George, J., Rizzetto, M., Shouval, D., Sola, R., Terg, R.A., Yoshida, E.M., Adda, N., Bengtsson, L., Sankoh, A.J., Kieffer, T.L., George, S., Kauffman, R.S., Zeuzem,

- S., ADVANCE Study Team. (2011): Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* 364, 2405-2416.
- 59 Jiang, Q.Q., Akashi, S., Miyake, K., Petty, H.R. (2000): Cutting edge: Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *Journal of Immunology.* 165, 3541-3544.
- 60 Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H., Lee, J.O. (2007): Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell.* 130, 1071-1082.
- 61 Kang, J., Kwon, S., Park, S., Kim, Y.K., Choi, S., Kim, J.P., Ahn, B. (2009): PKR protein kinase is activated by hepatitis C virus and inhibits viral replication through translational control. *Virus Res.* 142, 51-56.
- 62 Kawai, S., Enzan, H., Hayashi, Y., Jin, Y.L., Guo, L.M., Miyazaki, E., Toi, M., Kuroda, N., Hiroi, M., Saibara, T., Nakayama, H. (2003): Vinculin: a novel marker for quiescent and activated hepatic stellate cells in human and rat livers. *Virchows Arch.* 443, 78-86.
- 63 Kawai, T., Akira, S. (2006): TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13, 816-825.
- 64 Kawasaki, T., Kawai, T. (2014): Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5, 461.
- 65 Kim, C.W., Chang, K.M. (2013): Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin. Mol. Hepatol.* 19, 17-25.
- 66 Kmiec, Z. (2001): Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 161, III-XIII, 1-151.
- 67 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, 226-229.
- 68 Knolle, P.A., Gerken, G. (2000): Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* 174, 21-34.
- 69 Knolle, P.A., Limmer, A. (2001): Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol.* 22, 432-437.
- 70 Knook, D.L., Seffelaar, A.M., de Leeuw, A.M. (1982): Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Exp. Cell Res.* 139, 468-471.
- 71 Kolios, G., Valatas, V., Kouroumalis, E. (2006): Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J. Gastroenterol.* 12, 7413-7420.

- 72 Kordes, C., Sawitza, I., Muller-Marbach, A., Ale-Agha, N., Keitel, V., Klonowski-Stumpe, H., Haussinger, D. (2007): CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 410-417.
- 73 Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., Donnelly, R.P. (2003): IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4, 69-77.
- 74 Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011): Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16-34.
- 75 Kupffer, C.v. (1876): Ueber Sternzellen der Leber. *Archiv für Mikroskopische Anatomie.* 12, 353-358.
- 76 Lai, W.K., Sun, P.J., Zhang, J., Jennings, A., Lalor, P.F., Hubscher, S., McKeating, J.A., Adams, D.H. (2006): Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *Am. J. Pathol.* 169, 200-208.
- 77 Lalor, P.F., Lai, W.K., Curbishley, S.M., Shetty, S., Adams, D.H. (2006): Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo. *World J. Gastroenterol.* 12, 5429-5439.
- 78 Lange, C.M., Jacobson, I.M., Rice, C.M., Zeuzem, S. (2014): Emerging therapies for the treatment of hepatitis C. *EMBO Mol. Med.* 6, 4-15.
- 79 Lau, S.K., Chu, P.G., Weiss, L.M. (2004): CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am. J. Clin. Pathol.* 122, 794-801.
- 80 Lee, S.M., Kok, K.H., Jaume, M., Cheung, T.K., Yip, T.F., Lai, J.C., Guan, Y., Webster, R.G., Jin, D.Y., Peiris, J.S. (2014): Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 3793-3798.
- 81 Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Jr, Lemon, S.M. (2005): Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2992-2997.
- 82 Li, R., Oteiza, A., Sorensen, K.K., McCourt, P., Olsen, R., Smedsrod, B., Svistounov, D. (2011): Role of liver sinusoidal endothelial cells and stabilins in elimination of oxidized low-density lipoproteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G71-81.

- 83 Liao, W., Ning, G. (2006): Knockdown of apolipoprotein B, an atherogenic apolipoprotein, in HepG2 cells by lentivirus-mediated siRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 478-483.
- 84 Liaskou, E., Wilson, D.V., Oo, Y.H. (2012): Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm.* 2012, 949157.
- 85 Ling, W., Lougheed, M., Suzuki, H., Buchan, A., Kodama, T., Steinbrecher, U.P. (1997): Oxidized or acetylated low density lipoproteins are rapidly cleared by the liver in mice with disruption of the scavenger receptor class A type I/II gene. *J. Clin. Invest.* 100, 244-252.
- 86 Lohmann, V., Bartenschlager, R. (2014): On the history of hepatitis C virus cell culture systems. *J. Med. Chem.* 57, 1627-1642.
- 87 Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. (1999): Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 285, 110-113.
- 88 Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., Flavell, R.A. (2004): Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5598-5603.
- 89 Malhi, H., Guicciardi, M.E., Gores, G.J. (2010): Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol. Rev.* 90, 1165-1194.
- 90 Marcello, T., Grakoui, A., Barba-Spaeth, G., Machlin, E.S., Kotenko, S.V., MacDonald, M.R., Rice, C.M. (2006): Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology.* 131, 1887-1898.
- 91 McCourt, P.A., Smedsrod, B.H., Melkko, J., Johansson, S. (1999): Characterization of a hyaluronan receptor on rat sinusoidal liver endothelial cells and its functional relationship to scavenger receptors. *Hepatology.* 30, 1276-1286.
- 92 McCuskey, R. (2012): Anatomy of the liver. In: Boyer, T.D., Manns, M.P. Sanyal, A.J. (Eds.) *Zakim and Boyer's Hepatology: a textbook of liver disease*. 6. Ed. *Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. Vol. 6, 3-19. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Elsevier Sciences.
- 93 Medzhitov, R., Janeway, C., Jr. (2000): Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343, 338-344.
- 94 Mezaki, Y., Morii, M., Hebiguchi, T., Yoshikawa, K., Yamaguchi, N., Yoshino, H., Senoo, H. (2013): The role of retinoic acid receptors in activated hepatic stellate cells. *Med. Hypotheses.* 81, 222-224.

- 95 Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C. (1997): Liver regeneration. *Science*. 276, 60-66.
- 96 Milosevic, N., Schawalder, H., Maier, P. (1999): Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 368, 75-87.
- 97 Mitry, R.R., Hughes, R.D., Dhawan, A. (2002): Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 463-467.
- 98 Moc, I., Horn, F. (2012): Die Leber. In: Horn, F. (Eds.) *Biochemie des Menschen*. 5. Ed., 539-562. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- 99 Moradpour, D., Penin, F., Rice, C.M. (2007): Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 453-463.
- 100 Moreira, R.K. (2007): Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 131, 1728-1734.
- 101 Morini, S., Carotti, S., Carpino, G., Franchitto, A., Corradini, S.G., Merli, M., Gaudio, E. (2005): GFAP expression in the liver as an early marker of stellate cells activation. *Ital. J. Anat. Embryol.* 110, 193-207.
- 102 Motoyama, H., Komiya, T., Le Thi Thanh Thuy, Tamori, A., Enomoto, M., Morikawa, H., Iwai, S., Uchida-Kobayashi, S., Fujii, H., Hagihara, A., Kawamura, E., Murakami, Y., Yoshizato, K., Kawada, N. (2014): Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. *Laboratory Investigation*. 94, 192-207.
- 103 Mousavi, S.A., Sporstol, M., Fladeby, C., Kjekens, R., Barois, N., Berg, T. (2007): Receptor-mediated endocytosis of immune complexes in rat liver sinusoidal endothelial cells is mediated by FcγRIIb2. *Hepatology*. 46, 871-884.
- 104 Mouta Carreira, C., Nasser, S.M., di Tomaso, E., Padera, T.P., Boucher, Y., Tomarev, S.I., Jain, R.K. (2001): LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res.* 61, 8079-8084.
- 105 Muir, A.J., Shiffman, M.L., Zaman, A., Yoffe, B., de la Torre, A., Flamm, S., Gordon, S.C., Marotta, P., Vierling, J.M., Lopez-Talavera, J.C., Byrnes-Blake, K., Fontana, D., Freeman, J., Gray, T., Hausman, D., Hunder, N.N., Lawitz, E. (2010): Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 52, 822-832.

- 106 Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., Miyake, K. (2002): Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3, 667-672.
- 107 Nava, S., Westgren, M., Jaksch, M., Tibell, A., Broome, U., Ericzon, B.G., Sumitran-Holgersson, S. (2005): Characterization of cells in the developing human liver. *Differentiation.* 73, 249-260.
- 108 Neubauer, K., Knittel, T., Aurisch, S., Fellmer, P., Ramadori, G. (1996): Glial fibrillary acidic protein-a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J. Hepatol.* 24, 719-730.
- 109 Nonaka, H., Tanaka, M., Suzuki, K., Miyajima, A. (2007): Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev. Dyn.* 236, 2258-2267.
- 110 Notas, G., Kisseleva, T., Brenner, D. (2009): NK and NKT cells in liver injury and fibrosis. *Clin. Immunol.* 130, 16-26.
- 111 Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., Fujita, T. (2007): Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J. Biol. Chem.* 282, 7576-7581.
- 112 Perepelyuk, M., Terajima, M., Wang, A.Y., Georges, P.C., Janmey, P.A., Yamauchi, M., Wells, R.G. (2013): Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 304, G605-G614.
- 113 Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R. (2004): Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202, 8-32.
- 114 Ploss, A., Dubuisson, J. (2012): New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut.* 61 Suppl 1, i25-35.
- 115 Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., McKeating, J.A. (2003): Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* 77, 4070-4080.
- 116 Politz, O., Gratchev, A., McCourt, P.A., Schledzewski, K., Guillot, P., Johansson, S., Svineng, G., Franke, P., Kannicht, C., Kzhyshkowska, J., Longati, P., Velten, F.W., Johansson, S., Goerdts, S. (2002): Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues. *Biochem. J.* 362, 155-164.
- 117 Poordad, F., McCone, J., Jr., Bacon, B.R., Bruno, S., Manns, M.P., Sulkowski, M.S., Jacobson, I.M., Reddy, K.R., Goodman, Z.D., Boparai, N., DiNubile, M.J.,



- Sniukiene, V., Brass, C.A., Albrecht, J.K., Bronowicki, J., SPRINT2-Investigators. (2011): Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *N. Engl. J. Med.* 364, 1195-1206.
- 118 Prokunina-Olsson, L., Muchmore, B., Tang, W., Pfeiffer, R.M., Park, H., Dickensheets, H., Hergott, D., Porter-Gill, P., Mumy, A., Kohaar, I., Chen, S., Brand, N., Tarway, M., Liu, L., Sheikh, F., Astemborski, J., Bonkovsky, H.L., Edlin, B.R., Howell, C.D., Morgan, T.R., Thomas, D.L., Rehermann, B., Donnelly, R.P., O'Brien, T.R. (2013): A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* 45, 164-171.
- 119 Racanelli, V., Rehermann, B. (2006): The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 43, S54-S62.
- 120 Raucy, J.L., Mueller, L., Duan, K., Allen, S.W., Strom, S., Lasker, J.M. (2002): Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 475-482.
- 121 Regan, T., Nally, K., Carmody, R., Houston, A., Shanahan, F., Macsharry, J., Brint, E. (2013): Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J. Immunol.* 191, 6084-6092.
- 122 Riordan, S.M., Skinner, N.A., Kurtovic, J., Locarnini, S., McIver, C.J., Williams, R., Visvanathan, K. (2006): Toll-like receptor expression in chronic hepatitis C: correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury. *Inflamm. Res.* 55, 279-285.
- 123 Robek, M.D., Boyd, B.S., Chisari, F.V. (2005): Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J. Virol.* 79, 3851-3854.
- 124 Roberts, R.A., Ganey, P.E., Ju, C., Kamendulis, L.M., Rusyn, I., Klaunig, J.E. (2007): Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 96, 2-15.
- 125 Roymans, D., Van Looveren, C., Leone, A., Parker, J.B., McMillian, M., Johnson, M.D., Koganti, A., Gilissen, R., Silber, P., Mannens, G., Meuldermans, W. (2004): Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 67, 427-437.
- 126 Sahi, J., Grepper, S., Smith, C. (2010): Hepatocytes as a tool in drug metabolism, transport and safety evaluations in drug discovery. *Curr. Drug Discov. Technol.* 7, 188-198.
- 127 Sarrazin, C., Berg, T., Buggisch, P., Dollinger, M., Hinrichsen, H., Hueppe, D., Manns, M., Mauss, S., Petersen, J., Simon, K., van Thiel, I., Wedemeyer, H.,

- Zeuzem, S. (2014): Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C. *Z. Gastroenterol.* 52, 1185-1197.
- 128 Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., Taniguchi, T. (2000): Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity.* 13, 539-548.
- 129 Sato, M., Suzuki, S., Senoo, H. (2003): Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct. Funct.* 28, 105-112.
- 130 Schrage, A., Loddenkemper, C., Erben, U., Lauer, U., Hausdorf, G., Jungblut, P.R., Johnson, J., Knolle, P.A., Zeitz, M., Hamann, A., Klugewitz, K. (2008): Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. *Histochem. Cell Biol.* 129, 441-451.
- 131 Schulze-Bergkamen, H., Untergasser, A., Dax, A., Vogel, H., Buchler, P., Klar, E., Lehnert, T., Friess, H., Buchler, M.W., Kirschfink, M., Stremmel, W., Krammer, P.H., Muller, M., Protzer, U. (2003): Primary human hepatocytes--a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 38, 736-744.
- 132 Seglen, P.O. (1976): Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13, 29-83.
- 133 Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D., Klucher, K.M. (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4, 63-68.
- 134 Smedsrod, B., De Bleser, P.J., Braet, F., Lovisetti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E., Geerts, A. (1994): Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut.* 35, 1509-1516.
- 135 Smedsrod, B., Melkko, J., Araki, N., Sano, H., Horiuchi, S. (1997): Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem. J.* 322, 567-573.
- 136 Smith, K.D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M.A., Barrett, S.L.R., Cookson, B.T., Aderem, A. (2004): Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* 4, 1247-1253.

- 137 Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- 138 Sorensen, K.K., McCourt, P., Berg, T., Crossley, C., Le Couteur, D., Wake, K., Smedsrod, B. (2012): The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 303, R1217-30.
- 139 Stockert, R.J. (1995): The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol. Rev.* 75, 591-609.
- 140 Tacke, F., Weiskirchen, R. (2012): Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 67-80.
- 141 Takaoka, A., Yanai, H. (2006): Interferon signalling network in innate defence. *Cell. Microbiol.* 8, 907-922.
- 142 Takeda, K., Akira, S. (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14.
- 143 Takeda, K., Akira, S. (2004): TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3-9.
- 144 Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003): Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376.
- 145 Tamm, E.R., Kurtz, A. (2012): Leber. Anatomie und Physiologie. In: Messmann, H. (Eds.) *Klinische Gastroenterologie*. 1. Ed., 498-502. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- 146 Thomas, E., Gonzalez, V.D., Li, Q., Modi, A.A., Chen, W., Nouredin, M., Rotman, Y., Liang, T.J. (2012): HCV Infection Induces a Unique Hepatic Innate Immune Response Associated With Robust Production of Type III Interferons. *Gastroenterology.* 142, 978-988.
- 147 Thomson, A.W., Knolle, P.A. (2010): Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 753-766.
- 148 Thummel, K.E., Wilkinson, G.R. (1998): In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 389-430.
- 149 Tiegs, G., Lohse, A.W. (2010): Immune tolerance: what is unique about the liver. *J. Autoimmun.* 34, 1-6.

- 150 Tu, Z., Bozorgzadeh, A., Pierce, R.H., Kurtis, J., Crispe, I.N., Orloff, M.S. (2008): TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells. *J. Exp. Med.* 205, 233-244.
- 151 Tu, Z., Pierce, R.H., Kurtis, J., Kuroki, Y., Crispe, I.N., Orloff, M.S. (2010): Hepatitis C virus core protein subverts the antiviral activities of human Kupffer cells. *Gastroenterology.* 138, 305-314.
- 152 Tukov, F.F., Maddox, J.F., Amacher, D.E., Bobrowski, W.F., Roth, R.A., Ganey, P.E. (2006): Modeling inflammation-drug interactions in vitro: a rat Kupffer cell-hepatocyte coculture system. *Toxicol. In Vitro.* 20, 1488-1499.
- 153 Valatas, V., Xidakis, C., Roumpaki, H., Kolios, G., Kouroumalis, E.A. (2003): Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures. *Cell Biol. Int.* 27, 67-73.
- 154 Van Berkel, T.J., De Rijke, Y.B., Kruijt, J.K. (1991): Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. *J. Biol. Chem.* 266, 2282-2289.
- 155 Van Booven, D., Marsh, S., McLeod, H., Carrillo, M.W., Sangkuhl, K., Klein, T.E., Altman, R.B. (2010): Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics.* 20, 277-281.
- 156 Vaporciyan, A.A., DeLisser, H.M., Yan, H.C., Mendiguren, I.I., Thom, S.R., Jones, M.L., Ward, P.A., Albelda, S.M. (1993): Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science.* 262, 1580-1582.
- 157 Vinas, O., Bataller, R., Sancho-Bru, P., Gines, P., Berenguer, C., Enrich, C., Nicolas, J.M., Ercilla, G., Gallart, T., Vives, J., Arroyo, V., Rodes, J. (2003): Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology.* 38, 919-929.
- 158 Visvanathan, K., Skinner, N.A., Thompson, A.J., Riordan, S.M., Sozzi, V., Edwards, R., Rodgers, S., Kurtovic, J., Chang, J., Lewin, S., Desmond, P., Locarnini, S. (2007): Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology.* 45, 102-110.
- 159 Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E., Zetter, B.R. (1984): Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* 99, 2034-2040.
- 160 Wake, K. (1971): "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am. J. Anat.* 132, 429-462.

- 161 Wang, B., Trippler, M., Pei, R., Lu, M., Broering, R., Gerken, G., Schlaak, J.F. (2009): Toll-like receptor activated human and murine hepatic stellate cells are potent regulators of hepatitis C virus replication. *J. Hepatol.* 51, 1037-1045.
- 162 Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P.A., Modlin, R.L., Liblau, R.S., Gressner, A.M., Kaufmann, S.H. (2007): Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity.* 26, 117-129.
- 163 Wisse, E. (1972): An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells. *J. Ultrastruct. Res.* 38, 528-562.
- 164 Wisse, E. (1970): An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* 31, 125-150.
- 165 Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P., McCuskey, R.S. (1985): The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology.* 5, 683-692.
- 166 Wisse, E., van't Noordende, J.M., van der Meulen, J., Daems, W.T. (1976): The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell Tissue Res.* 173, 423-435.
- 167 World Health Organization. (April 2014): Hepatitis C, Fact Sheet N°164. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html>.
- 168 Wu, J., Meng, Z., Jiang, M., Zhang, E., Trippler, M., Broering, R., Bucchi, A., Krux, F., Dittmer, U., Yang, D., Roggendorf, M., Gerken, G., Lu, M., Schlaak, J.F. (2010): Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology.* 129, 363-374.
- 169 Wynn, T.A., Ramalingam, T.R. (2012): Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* 18, 1028-1040.
- 170 Yokoi, Y., Namihisa, T., Kuroda, H., Komatsu, I., Miyazaki, A., Watanabe, S., Usui, K. (1984): Immunocytochemical Detection of Desmin in Fat-Storing Cells (Ito-Cells). *Hepatology.* 4, 709-714.
- 171 Yoneyama, M., Suhara, W., Fujita, T. (2002): Control of IRF-3 activation by phosphorylation. *J. Interferon Cytokine Res.* 22, 73-76.
- 172 Zanetta, L., Marcus, S.G., Vasile, J., Dobryansky, M., Cohen, H., Eng, K., Shamamian, P., Mignatti, P. (2000): Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential

method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer.* 85, 281-288.

173 Zeng, W.Q., Zhang, J.Q., Li, Y., Yang, K., Chen, Y.P., Liu, Z.J. (2013): A new method to isolate and culture rat kupffer cells. *PLoS One.* 8, e70832.

## **7 Anhang**

### **7.1 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerken, dem Direktor der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, für die Bereitstellung der Laboratorien und seinem finanziellen Beitrag bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Schlaak, der mir die Durchführung dieser Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte. Ebenso möchte ich Ihm für die anhaltende Unterstützung und den stets kompetenten Rat während der gesamten Arbeit danken.

Bei Frau Dr. Ruth Bröring möchte ich mich ganz besonders bedanken. Neben ihrer großartigen Betreuung dieser Arbeit, möchte ich ihr für die vielen Denk- und Diskussionsanstöße, für ihr großes Interesse sowie für die gewährte Freiheit danken. Ich bedanke mich bei Frau Dr. Kathrin Skibbe (Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen) für ihre kompetente Unterstützung bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen.

Bei allen Mitarbeitern der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Essen möchte ich mich für die Bereitstellung des humanen Lebergewebes bedanken. Insbesondere seien hier Herr Prof. Dr. Paul, Herr Prof. Dr. Treckmann, Herr Prof. Dr. Kaiser, Herr Dr. Mathé, Herr Dr. Benkö, Frau Dr. Schulze und Herr Dr. Tecklenborg erwähnt.

Frau Sabrina Driftmann und Frau Kathrin Kleinehr möchte ich für die exzellente technische Unterstützung danken.

Ein großer Dank gebührt allen Mitarbeitern des „Gastro“ Labors für die organisatorische und technische Hilfe, die gute Zusammenarbeit sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich bei allem bedingungslos unterstützt haben und immer für mich da waren.

Vom ganzen Herzen möchte ich mich bei Tobias bedanken. Danke, dass du immer die richtigen Worte findest und mir stets Rückenwind gibst.



## 7.2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

### Veröffentlichte Artikel

1. Broering, R., Lutterbeck, M., Trippler, M., Kleinehr, K., Poggenpohl, L., Paul, A., Gerken, G., Schlaak, J.F. (2014): Long-term stimulation of Toll-like receptor 3 in primary human hepatocytes leads to sensitization for antiviral responses induced by poly I:C treatment. *J. Viral Hepat.* 21, 7, 480-490.
2. Thoens, C., Berger, C., Trippler, M., Siemann, H., Lutterbeck, M., Broering, R., Schlaak, J., Heinemann, F.M., Heinold, A., Nattermann, J., Scherbaum, N., Alter, G., Timm, J. (2014): KIR2DL3NKG2A natural killer cells are associated with protection from productive hepatitis C virus infection in people who inject drugs. *J. Hepatol.* 61, 3, 475-481.
3. Tucci, F.A., Broering, R., Lutterbeck, M., Schlaak, J.F., Kuppers, R. (2014): Intrahepatic B-cell follicles of chronically hepatitis C virus-infected individuals lack signs of an ectopic germinal center reaction. *Eur. J. Immunol.* 44, 6, 1842-50.
4. Hoyo-Becerra, C., Huebener, A., Trippler, M., Lutterbeck, M., Liu, Z.J., Truebner, K., Bajanowski, T., Gerken, G., Hermann, D.M., Schlaak, J.F. (2013): Concomitant interferon alpha stimulation and TLR3 activation induces neuronal expression of depression-related genes that are elevated in the brain of suicidal persons. *PLoS One.* 8, 12, e83149.

### Eingereichte Artikel

1. Werner, M., Driftmann, S., Kleinehr, K., Kaiser, G. M., Mathé, Z., Treckmann, J. W., Paul, A., Skibbe, K., Timm, J., Canbay, A., Gerken, G., Schlaak, J. F., Broering, R. (2014): All-In-One: Advanced preparation of human parenchymal and non-parenchymal liver cells. *PLoS One.* In Revision (PONE-D-14-5111).
2. Broering, R., Trippler, M., Werner, M., Real, C. I., Megger, D., Bracht, T., Schweinsberg, V., Sitek, B., Eisenacher, M., Meyer, H., Baba, H., Weber, F., Hoffmann, A. C., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2015): Hepatic expression of

proteasome subunit alpha type-6 is upregulated during viral hepatitis and putatively regulates the expression of proviral host genes in hepatitis C virus infection. J Viral Hepat. In Revision (JVH-00022-2015).

### **Artikel in Vorbereitung**

1. Werner, M., Driftmann, S., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G., Schlaak, J. F., Broering, R. (2015): Poly I:C-stimulated primary human non-parenchymal liver cells are potent suppressors of hepatitis C virus replication.

### **Poster und Abstracts**

1. Broering, R., Trippler, M., Lutterbeck, M., Real, C. I., Megger, D.A., Bracht, T., Schweinsberg, V., Sitek, B., Eisenacher, M., Meyer, H.E., Baba, H.A., Hoffmann, A.C., Weber, F., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2015): Proteasome subunit alpha type-6 regulates the expression of proviral host genes in hepatitis C virus infection. Zeitschrift für Gastroenterologie. 01, 53-A5\_45. (Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, München)
2. Lutterbeck, M., Kleinehr, K., Driftmann, S., Treckmann, J.W., Mathé, Z., Kaiser, G., Paul, A., Skibbe, K., Timm, J., Canbay, A., Gerken, G., Schlaak, J. F., Broering, R. (2015): All-In-One: Advanced human parenchymal and non-parenchymal liver cell preparation. Zeitschrift für Gastroenterologie. 01, 53-A1\_5. (Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, München)
3. Lutterbeck, M., Driftmann, S., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G., Schlaak, J. F., Broering, R. (2015): Antiviral activity of human non-parenchymal liver cells is restricted to toll-like receptor 3 and involves type I interferons. (The International Liver Congress™ of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Wien, Österreich).
4. Lutterbeck, M., Broering, R., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G. and Schlaak, J. F. (2014): Poly I:C-mediated activation of human non-parenchymal liver cells leads to an antiviral state against HCV, which is not exclusively mediated by

- type-I or type-III interferons. *Der Gastroenterologe*. 9, 2, 182. (Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen, Neuss).
5. Broering, R.; Trippler, M.; Real, C.I., Lutterbeck, M., Kleinehr, K., Poggenpohl, L., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2014): Proteasome subunit alpha type-6 seems to be an innate player in viral hepatitis. *Der Gastroenterologe*. 9, 2, 176. (Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen, Hattingen.)
  6. Lutterbeck, M., Broering, R., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G. and Schlaak, J. F. (2014): Human non-parenchymal liver cells produce type I and type III interferons in response to poly I:C, thereby mediating an antiviral state against HCV. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 01, 52-P5\_23. (Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Tübingen)
  7. Thoens, C., Berger, C., Trippler, M., Siemann, H., Lutterbeck, M., Broering, R., Schlaak, J. F., Heinemann, F.M., Heinold, A., Nattermann, J., Scherbaum, N., Alter, G., Timm, J (2014): KIR2DL3+ NKG2A- Natural Killer Cells Protect People who Inject Drugs against Productive Hepatitis C Virus Infection. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 01, 52-P5\_27. (Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Tübingen)
  8. Broering, R.; Trippler, M.; Real, C.I.; Lutterbeck, M.; Kleinehr, K.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. Interferon stimulated gene 15, a proviral factor in hepatitis C virus replication, is regulated by the Proteasome subunit alpha type-6. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 01, 52\_P5\_26. (Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Tübingen)
  9. Real, C. I., Broering, R., Jahn-Hofmann, K., Ickenstein, L., John, M., Kleinehr, K., Driftmann, S., Lutterbeck, M., Kemper, T., Vornlocher, H.P., Schirmbeck, R., Lu, M.; Gerken, G., Schlaak, J. F. (2014): Hepadnaviral replication in HBV-transgenic mice lacking the surface antigen is accompanied by toll-like receptor 3 mediated interferon responses. *Journal of Hepatology*. 60, 1, S116. (The International Liver Congress™ of the European Association for the Study of the Liver (EASL), London, England)

10. Broering, R.; Trippler, M.; Lutterbeck, M.; Real, C.I.; Kleinehr, K.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. (2014) Interferon stimulated gene 15, a pro-viral factor for hepatitis C virus, and proteasome subunit alpha type-6 are induced by Poly(I:C) and reciprocally affect each other. *Journal of Hepatology*. 60, 1, S115. (The International Liver Congress™ of the European Association for the Study of the Liver (EASL), London, England)
11. Lutterbeck, M., Broering, R., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G. and Schlaak, J. F. (2014): Toll-like receptor 3 stimulation of human non-parenchymal liver cells triggers an antiviral state against HCV which is not exclusively mediated by type-I or type-III IFNs. *Journal of Hepatology*. 60, 1, S138. (The International Liver Congress™ of the European Association for the Study of the Liver (EASL), London, England)
12. Lutterbeck, M., Real, C.I., Skibbe, K., Timm, J., Paul, A., Gerken, G., Schlaak, J. F., Broering, R. (2014): All-in-one liver cell preparation: high quality of functional primary human hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells and hepatic stellate cells. 60, S1, 814A. (American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, USA)
13. Broering, R., Lutterbeck, M., Kleinehr, K., Trippler, M., Paul, A., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2013): Continuous activation of toll-like receptor 3 in primary human hepatocytes leads to hyper-responsiveness to poly I:C in vitro. *Der Gastroenterologe*. 8, 2, 166. (Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen, Neuss)
14. Lutterbeck, M., Broering, R., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G. and Schlaak, J. F. (2013): Toll-like receptor stimulated primary human non-parenchymal liver cells secrete inflammatory cytokines and potently suppress hepatitis C virus replication. *Der Gastroenterologe*. 8, 2, 169. (Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen, Hattingen)
15. Lutterbeck, M., Broering, R., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G. and Schlaak, J. F. (2013): TLR stimulated human non-parenchymal liver cells are potent suppressors of HCV replication. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 01, 51-P5\_40.

- (Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Hannover)
16. Wang, B., Broering, R., Real, C.I., Lutterbeck, M., Gerken, G., Lu, L., Schlaak J. F. (2013): Activation by Pathogen- and Damage-Associated Molecular Patterns Regulates the Expression of RANTES in Primary Hepatic Stellate Cells. Zeitschrift für Gastroenterologie. 51-P1\_52. (Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Hannover)
  17. Broering, R.; Lutterbeck, M.; Kleinehr, K.; Trippler, M.; Paul, A.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. (2013): Continuous Toll-like receptor 3 activation in primary human hepatocytes, mimicking chronic hepatitis C infection, leads to hyper-responsiveness to poly I:C in vitro. Zeitschrift für Gastroenterologie. 01, 51-P5\_05. (Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Hannover)
  18. Lutterbeck, M., Broering, R., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G. and Schlaak, J. F. (2013): Toll-like receptor 3 stimulated primary human non-parenchymal liver cells are potent suppressors of hepatitis C virus replication. Journal of Hepatology. 58, S145. (The International Liver Congress™ of the European Association for the Study of the Liver (EASL), 2013, Amsterdam)
  19. Broering, R.; Lutterbeck, M.; Trippler, M.; Paul, A.; Kleinehr, K.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. (2013): Repetitive Activation of Toll Like Receptor 3 in Primary Human Hepatocytes Leads to Hyper-Responsiveness to Poly I:C in Vitro. Journal of Hepatology. 58, S144-S145. (The International Liver Congress™ of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam)
  20. Lutterbeck, M., Broering, R., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2013): Hepatitis C virus replication is potently regulated by toll-like receptor stimulated primary human non-parenchymal liver cells. (American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Washington, DC)
  21. Broering, R., Trippler, M., Real, C. I., Lutterbeck, M., Kleinehr, K., Poggenpohl, L., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2013): Proteasome subunit alpha type-6 has been identified as a regulator of the interferon stimulated gene 15, a pro-viral

- factor in hepatitis C virus replication. *Hepatology*. 58, S1, 10. (American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Washington, DC)
22. Broering, R.; Trippler, M.; Real, C. I.; Lutterbeck, M.; Kleinehr, K.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. (2013): Proteasome Subunit Alpha Type-6 Is a Regulator of the Interferon Stimulated Gene 15, a Proviral Factor in Hepatitis C Virus Replication. *Hepatology*. 58, 1177A. (American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Washington, DC)
23. Broering, R., Lutterbeck, M., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2012): Toll-like receptor-activated primary human hepatocytes produce inflammatory cytokines and different types of interferon, resulting in HCV suppression in a co-culture model. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 08, 50-K012. (Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Hamburg)
24. Broering, R., Lutterbeck, M., Kleinehr, K., Paul, A., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2012): Toll-like receptor-activated human hepatocytes produce inflammatory cytokines and type III interferons, resulting in IFN- $\gamma$ -mediated suppression of HCV in vitro. *Journal of Hepatology*. 56, S56. (The International Liver Congress™ of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Barcelona, Spanien)

### **7.3 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Optimierung der Isolation humaner nicht-parenchymaler Zellen der Leber und Charakterisierung ihrer immunregulatorischen Bedeutung*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Melanie Werner befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

Prof. Dr. med. Jörg F. Schlaak

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Melanie Werner

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Melanie Werner