

Technische Universität München  
Fakultät für Medizin

# **Die Regulation der Produktion des Hepatocyte Growth Factor in sinusoidalen Leberendothelzellen**

**Max Lüdemann**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Prof. Dr. Andreas Pichlmair, Ph. D.

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Percy A. Knolle
2. Prof. Dr. Dietmar Zehn

Die Dissertation wurde am 14.07.2021 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.02.2022 angenommen.

# Zusammenfassung

Die Regeneration der Leber nach vorausgehender chirurgischer Resektion oder nach einer umfassenden Schädigung durch Toxine ist im Detail bereits aufgeklärt worden. Die Schädigung der Leber durch das Immunsystem im Rahmen einer viralen Hepatitis, nämlich die gezielte Elimination infizierter Hepatozyten, unterscheidet sich aber grundsätzlich von der Entfernung großer Teile der Leber oder toxischer Leberschädigung. Die für die Leberregeneration verantwortlichen Faktoren nach dieser Form der Schädigung sind allerdings bisher nicht untersucht worden. Ziel der Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob die an der Aktivierung von T-Zellen in der Leber beteiligten Signal-Prozesse auch einen Einfluss auf die Leberregeneration haben können, insbesondere das für die Kostimulation von T-Zellen bekannte IL-6-trans-signalling von Leberendothelzellen (LSECs). Die Arbeit konzentriert sich deshalb auf die Rolle der LSECs in der Produktion des Hepatocyte Growth Factor als wichtigsten Stimulus der Leberregeneration und darauf, welche Mechanismen eine Steigerung der HGF-Produktion hervorrufen können. Wir konnten zeigen, dass LSECs als einzige Leberzellpopulation HGF konstitutiv und ohne die Notwendigkeit einer proteolytischen Maturierung durch Urokinase exprimieren. Wir konnten außerdem zeigen, dass IL-6-trans-signalling, nicht aber durch TNF hervorgerufene Signal-Prozesse eine verstärkte HGF-Produktion induzieren. Im Gegensatz zur konstitutiven Produktion von HGF unterschied sich die induzierte HGF-Produktion durch die Notwendigkeit einer proteolytischen Spaltung durch Urokinase. IL-6-trans-signalling induzierte auch eine vermehrte Expression der Urokinase, was die vermehrte HGF-Produktion als eine Kombination aus gesteigerter transkriptioneller Expression und gesteigerter proteolytischer Aktivität ausweist.

Um die Relevanz der Expression von HGF durch LSECs für die Regeneration von Hepatozyten-Masse in der Leber zu untersuchen, wurde ein neues in vitro System etabliert, das auf der dynamischen Messung elektrischer Impedanz von Hepatozyten-Kulturen basiert. Steigerung der elektrischen Impedanz von Hepatozyten ist als Zeichen einer gesteigerten Zellgröße (Hyperplasie) oder Zelldichte (Proliferation) zu interpretieren. Mit diesem innovativen Assay gelang es, den Einfluss der konstitutiven Expression von HGF durch LSECs sowie der gesteigerten HGF-Expression durch dynamische Messung der Impedanz von Hepatozyten nach Inkubation mit Zellkultur-Überstand von LSECs zu quantifizieren.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse geben neue Einblicke in die duale Funktion von LSECs als T-Zell-aktivierende Zellen, die dadurch Leberschaden auslösen, und als HGF-produzierende Zellen, die dadurch die Leberregeneration unterstützen. Die hier beschriebene enge Verbindung zwischen T-Zell-Kostimulation und HGF-Produktion durch das IL-6-trans-signalling in LSECs weist auf eine Doppelfunktion dieser Zellen in Immunüberwachung und Organregeneration hin, die bisher nicht bekannt war.

## Abstract

Despite intensive efforts to unravel the impact of the immune system on liver regeneration major questions remain unanswered. This work therefore focused how IL-6-transsignalling in LSECs impacts the initiation phase of liver regeneration. We show that LSEC are the only liver specific cell type that constitutively secretes HGF in measurable quantities. We provide evidence that isolated, murine LSECs do not act as sentinels for liver damage by signalling of DAMPs like ATP or their scavenging function alone. The activation of TLR-signalling on the LSECs surface does also not function as an inducer for liver regeneration. Despite IL-6 being important for liver regeneration only stimulation by IL-6-transsignalling, through Hyper-IL-6, further increased the production of HGF. A major step for the initiation of liver regeneration is the proteolytic cleavage of pro-HGF by the urokinase uPA. We show that *in vitro* IL-6-transsignalling on LSEC not only increased HGF levels but also the activity of uPA. Additional real-time impedance measurements on isolated hepatocytes revealed that HGF from LSEC-supernatant led to morphological changes that reflected growth and proliferation by hepatocytes. These changes were partially dependant on the uPA-activity and could be specifically reduced by the uPA-specific inhibitor BC-11. The fact that inhibition of uPA-activity did not lead to complete abrogation of effect of the supernatant from LSECs supernatant to increase impedance of hepatocytes is an hint that HGF secreted by LSECs points towards distinct activation processes for constitutively produced compared to induced HGF. We therefore assume that IL-6-transsignalling, which occurs between CD8<sup>+</sup>-T-cells and LSECs during T-cell priming, leads to a pre-emptive increase in HGF production and secretion as well as an increase in uPA-activity. These two mechanisms might increase the levels of HGF present locally at sites of T cell activation to quickly respond to immune cell-inflicted liver damage with hepatocyte proliferation. This early HGF production may contribute to the proverbial ability of the liver to regenerate quickly to damage.



# Inhalt

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 DIE LEBER ALS IMMUNOLOGISCHES ORGAN .....	1
1.1.1 Lokale Regulation von Immunantworten in der Leber .....	1
1.1.2 Hepatozyten .....	2
1.1.3 Sinusoidale Leberendothelzellen .....	3
1.1.4 Kupffer-Zellen.....	4
1.1.5 Hepatische Sternzellen .....	5
1.2 LEBERSCHADEN UND REGENERATION .....	6
1.2.1 Leberschaden.....	6
1.2.2 Aktivierung des Immunsystems und Leberschaden.....	6
1.2.3 Intoxikation und Leberschaden.....	8
1.2.4 Zelltod in der Leber .....	10
1.2.5 Der Einfluss von Zelltod auf die Leberregeneration .....	12
1.2.6 Leberregeneration .....	13
1.2.7 Schlüssel-Mediatoren der Leberregeneration .....	17
<b>2. ZIEL DER ARBEIT</b> .....	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
3.1 GERÄTE .....	19
3.2 VERBRAUCHSGÜTER .....	20
3.2.1 Verbrauchsgüter .....	20
3.2.2 Kits.....	21
3.2.3 Chemikalien und Reagenzien.....	21
3.2.4 Antikörper.....	23
3.2.5 Primer.....	23
3.2.6 Zytokine, Wachstumsfaktoren und rekombinante Proteine .....	24
3.3 PUFFER UND MEDIEN .....	24
3.3.1 Puffer .....	24
3.3.2 Zellkulturmedien.....	26
3.3.3 Mauslinien .....	27
3.3.4 Software.....	27
3.4 METHODEN.....	28
3.4.1 Isolation von sinusoidalen Leberendothelzellen aus der Leber.....	28
3.4.2 Isolation von T-Zellen aus der Milz durch Hämolyse.....	28
3.4.3 In vitro Behandlung von Sinusoidalen Leberendothelzellen .....	29
3.4.4 Impedanz-Messung von primären Zellen mit Hilfe des xCelligence .....	29
3.4.5 Konzentration von Überstand aus primärer Zellkultur .....	30
3.4.6 Enzym-linked immunoabsorbant Assay (ELISA) .....	30
3.4.7 Urokinase-Aktivitäts-Assay.....	31
3.4.8 Oberflächenfärbung von adhärenenten Zellen in Zellkultur zur durchflusszytometrischen Analyse	32
3.4.9 Intrazelluläre Färbung von phosphorylierten Proteinen.....	32
3.4.10 RNA Isolation aus primären Leberzellen .....	33
3.4.11 Quantitative Real-Time PCR.....	34
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>35</b>
4.1 SINUSOIDALE ENDOTHELZELLEN DER LEBER.....	35
4.2 LSEC ALS SENSOREN FÜR LEBERSCHÄDEN.....	37
4.2.1 Scavenging von acLDL und OVA sowie die durchflusszytometrische Analyse der LSEC - Aktivierung.....	37
4.2.2 Oberflächen-Ectonukleosidasen zum Abbau von ATP und Einfluss auf HGF-Produktion	39
4.2.3 Einfluss der Wachstumshormone VEGF und FGF auf die Produktion von HGF .....	41
4.3 LSEC-STIMULATION DURCH MEDIATOREN DES IMMUNSYSTEMS .....	42
4.3.1 Einfluss von Zytokinen auf die Produktion von HGF durch LSECs.....	42

4.3.2	<i>Einfluss von TLR-Signalen auf die Produktion von HGF durch LSEC</i> .....	44
4.4	LSECs BEI DER INTERAKTION MIT CD8 <sup>+</sup> -T-ZELLEN.....	45
4.4.1	<i>IL-6-transsignaling führt zu einer erhöhten HGF-Gesamtproteinmenge in LSEC-Überstand</i> .....	45
4.4.2	<i>Die Produktion von HGF reagiert dosisabhängig auf IL-6-transsignaling</i> .....	46
4.4.3	<i>IL-6-transsignaling führt zu Phosphorylierung von STAT3</i> .....	47
4.4.4	<i>IL-6-transsignaling induziert HGF-Produktion auf transkriptioneller Ebene</i> .....	49
4.4.5	<i>LSECs sind die einzige Leberzellpopulation, die konstitutiv HGF produziert</i> .....	50
4.4.6	<i>Konstitutive Produktion von HGF durch LSECs</i> .....	52
4.5	KATALYTISCHE SPALTUNG UND AKTIVIERUNG VON PRO-HGF DURCH UROKINASE.....	53
4.5.1	<i>Die katalytische Aktivität der uPA kann im Überstand einer LSEC-Zellkultur quantifiziert und durch IL-6-transsignaling verstärkt werden</i> .....	53
4.5.2	<i>Die HGF-Gesamtmenge im Überstand einer LSEC-Zellkultur kann durch die Inhibition der uPA verringert werden</i> .....	56
4.5.3	<i>LSEC-Überstand hat einen positiven Effekt auf den Zellindex einer Hepatozyten-xCelligence-Kultur in Abhängigkeit von IL-6-transsignaling</i> .....	57
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>79</b>
<b>9.</b>	<b>APPENDIX</b> .....	<b>80</b>
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	80

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Leber als immunologisches Organ

### 1.1.1 Lokale Regulation von Immunantworten in der Leber

Die Leber ist ein einzigartiges Organ, das mit einer Mischung aus venösem und arteriellem Blut versorgt wird. Der Großteil der Blutversorgung erfolgt durch die Portalvene. Diese führt nährstoffreiches Blut aus dem Verdauungstrakt in die Leber. Bakterielle Degradationsprodukte, die durch kleine Läsionen in der Darmwand oder durch bakterielle Translokation Zugang zu Blutgefäßen erlangen und über die Portalvene in die Leber gelangen, stellen eine stetige Quelle von Aktivierungssignalen für Zellen des Immunsystems im Mikromilieu der Leber dar (Son, Kremer, and Hines 2010). Portalvenöses Blut, welches direkt in die Leber gelangt, umgeht Organe mit speziellen Immunfunktionen wie die Milz (Paulos et al. 2007). Die einzigartige Kapazität der Leber, Fremdpartikel aus dem Pfortaderblut herauszufiltern, verhindert die lokale und systemische Entstehung von Entzündung (Kubes and Jenne 2018). Dabei ist die Architektur des Lebergewebes von tragender Bedeutung. Durch ihren Aufbau maximiert sie die Interaktion von Pathogenen/Degradationsprodukten und Immunzellen und stellt so eine wirksame Barriere gegen systemische Infektionen her (Kubes and Jenne 2018). Die stark geordnete Struktur der Leber sorgt für eine verlängerte Verweildauer des Blutes innerhalb der Sinusoide und erhöht so die Chance, dass Pathogene und ihre Moleküle vom Immunsystem erkannt werden können (Oda, Yokomori, and Han 2003). Um in diesem besonderen Milieu zu funktionieren, ist die Leber durch spezielle Makrophagen, sogenannte Kupffer-Zellen (KCs) besiedelt. Diese sind im sinusoidalen Lumen angesiedelt und können vorbeiströmendes Blut filtern, d.h. größere Moleküle oder Molekül-Komplexe und sogar ganze Bakterien zuverlässig erkennen, binden und eliminieren (Zeng et al. 2016). Für diese Funktion sind KCs mit einer Vielzahl von sogenannten „*Scavenging Receptors*“ (SR) ausgestattet (Terpstra et al. 2000). Diese Rezeptoren bilden mehrere Untergruppen und können so eine große Anzahl verschiedener Makromoleküle binden, um sie aus dem Blutstrom zu entfernen. Diese Interaktion kann dann zu weiteren Signalkaskaden innerhalb der KCs führen und so z.B. die Aktivierung weiterer Immunzellen im Lebergewebe zur



Folge haben (Guillot and Tacke 2019). Priming von T-Zellen innerhalb der Leber führt dabei zu einem tolerogenen Milieu. Dies wird durch suizidale Emperipolesis unterstützt, in deren Verlauf autoreaktive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch Hepatozyten internalisiert werden können und daraufhin abgebaut werden (Benseler et al. 2011).

### **1.1.2 Hepatozyten**

Die Hepatozyten bilden mit ca. 85 % der Lebermasse den überwiegenden Anteil des Lebergewebes (Tu et al. 2015). Mikroanatomisch sind Hepatozyten in einer einzelnen Zellschicht angeordnet, welche den Lebersinusoiden bildet, dessen Lumen von den Hepatozyten durch LSECs und den Dissé-Raum abgegrenzt wird (Fausto, Campbell, and Riehle 2006). Hepatozyten sind ca. 50-100 µm groß (Marguerat and Bahler 2012) und zeigen oftmals ein polyploides Erscheinungsbild (Celton-Morizur et al. 2010; Gentric, Celton-Morizur, and Desdouets 2012).

Die Hepatozyten vereinen dabei die wichtigsten physiologischen und biologischen Funktionen der Leber. Unter anderem gehört dazu die Produktion von Serum Albumin, Fibrinogen, Prothrombin sowie die Glukoneogenese oder Cholesterinsynthese.

Außerdem werden die wichtigen Entgiftungsschritte der Biotransformation über das Cytochrom P-450-System durchgeführt. Eine Überlastung der Entgiftungssysteme kann zum Untergang der Hepatozyten führen und so massive Leberschäden auslösen (Escudie et al. 2007; Jaeschke, Xie, and McGill 2014).

Die Hepatozyten sind ebenfalls das Ziel der hepatotropen Hepatitis-Viren, deren Infektion im Rahmen einer akuten Hepatitis zu schweren Leberschäden führen kann. Im Fall einer chronischen Hepatitis erhöhen sich die Chancen auf eine Leberzirrhose und langfristig die Möglichkeit des Auftretens von Leberzellkrebs.

All diesen Aufgaben und Herausforderungen, denen die Hepatozyten ausgesetzt sind, ist es geschuldet, dass die Leber als Organ mit nahezu einzigartigen regenerativen Fähigkeiten im menschlichen Körper ausgestattet ist. Die mehrphasige Regeneration der Leber beginnt mit der Proliferation der Hepatozyten, um verlorene funktionelle Kapazitäten möglichst schnell auszugleichen. Experimente an Mäusen haben gezeigt, dass diese Phase der Regeneration nach ca. zwei Tagen

abgeschlossen ist und erst danach non-parenchymale Zellen mit der Proliferation beginnen.

### 1.1.3 Sinusoidale Leberendothelzellen

Die Sinusoide der Leber, in denen sich die KCs befinden, werden durch die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC<sup>1</sup>) gebildet. LSECs sind im Gegensatz zu anderen Endothelzellen nicht mit einer Basalmembran ausgestattet, sondern trennen das Lumen des Sinusoids vom Dissé-Raum, der sich zwischen LSEC und Hepatozyt befindet. In einer gesunden Leber besitzen LSECs eine Fenestrierung, die in Siebplatten angeordnet ist. Die Fenestrierungen mit ca. 50-150 nm Größe verhindern dabei das Übertreten von Zellen aus dem sinusoidalen Lumen in den Dissé-Raum, während zugleich eine störungsfreie Passage von Makromolekülen aus dem Blut in den Dissé-Raum erfolgen kann. Diese Besonderheit ist notwendig, um die Hepatozyten mit Nährstoffen zu versorgen und Moleküle, die durch die Hepatozyten verstoffwechselt werden sollen, für die Hepatozyten zugänglich zu machen. LSECs sind ähnlich wie KCs mit einer Vielzahl von Scavenger-Rezeptoren<sup>2</sup> ausgestattet und sind aufgrund ihrer Menge und Anordnung in der Anatomie der Leber die größte und potenteste Zellpopulation, wenn es um die hocheffiziente Aufnahme von Molekülen oder frei schwimmenden Kleinstpartikeln bis 200 nm Größe geht (Ganesan et al. 2011) (Mehrfeld et al. 2018). Ihre Fähigkeit zur Internalisierung von Trümmerfragmenten ermöglicht es den LSECs, diese weiter zu prozessieren und im Rahmen ihrer immunologischen Funktion über den MHC I<sup>3</sup> den Zellen des Immunsystems zu präsentieren (Limmer et al. 2000). Das Priming der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch die LSECs führt dazu, dass weitere naive T-Zellen in die Leber gelockt und durch die LSECs aktiviert werden können (von Oppen et al. 2009). Gerade im Hinblick auf das besondere Mikromilieu innerhalb der Leber ist es daher notwendig, dass die Aktivierung von Immunzellen einer strengen Regulation unterliegt. Die LSECs sind als nicht-professionelle antigen-präsentierende Zellen in der Lage, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu primen. Diese Aktivierung ist allerdings nur von kurzer

---

<sup>1</sup> Engl.: Liver sinusoidal endothelial cell

<sup>2</sup> Engl.: Scavenging Receptors

<sup>3</sup> Engl.: Major histocompatibility complex I

Dauer und führt zur Differenzierung einer besonderen Population von Gedächtniszellen, nicht aber von Effektor-T-Zellen, womit LSECs zum immun-toleranten Mikromilieu der Leber beitragen (Thomson and Lu 1999). Die durch LSECs erzielte Aktivierung erfolgt selbst in Abwesenheit der Expression bekannter kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 (Huang et al. 1994) (Limmer et al. 2000). Die Kreuz-Präsentation eines Antigens durch LSECs induziert dabei bei naiven CD8+-T-Zellen eine rapide Veränderung, bei der die T-Zellen nach ihrer initialen Aktivierung wieder in einen Ruhezustand zurückfallen (Knolle and Wohlleber 2016). Diese kurzzeitige, aber schnell abflachende Aktivierung sorgt dabei für ein Lebermikromilieu, das eher auf Toleranz der Antigene als auf T-Zell-Aktivierung zielt (Limmer et al. 2000).

#### **1.1.4 Kupffer-Zellen**

Bei Kupffer-Zellen (KC) handelt es sich um leberspezifische Makrophagen, welche in einer gesunden Leber als Einzelzellen anzutreffen sind. Als Mitglieder des mononukleären Phagozytensystems in der Leber sind sie durch Phagozytose in der Lage, tote Zellen oder Zellbestandteile, Fremdpartikel sowie Bakterien aus dem Blutkreislauf zu entfernen (Lüllman-Rauch 2006). Kupffer-Zellen bilden die größte Population organspezifischer Makrophagen im Organismus und stellen zwischen 50-80 % dieser Makrophagenpopulation dar (Arii and Imamura 2000; Naito et al. 2004). KCs besitzen die für Makrophagen typische amöboide Erscheinung und bewegen sich auf der Oberfläche der LSECs entlang der Sinusoide. Obwohl KCs in der Leber verteilt sind, unterscheiden sie sich in Abhängigkeit zu ihrer Position im Leberlobulus (Takeishi et al. 1999; Naito et al. 2004). Ähnlich wie LSECs sind KCs mit einer großen Bandbreite von Scavenging-Rezeptoren ausgestattet und phagozytieren Bakterien. Anschließend werden diese über sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen zerstört. KCs stellen dabei eine essenzielle Abwehrmaßnahme des Immunsystems innerhalb der Leber dar, indem sie nicht nur Bakterien direkt phagozytieren, sondern auch neutrophile Granulozyten in das Gewebe rekrutieren (Ebe et al. 1999). Zudem kann die Aufnahme von LPS<sup>4</sup> durch

---

<sup>4</sup> Engl.: Lipopolysaccharide

KCs zur Aktivierung und zur Produktion von TNF<sup>5</sup> führen, welches zum Absterben von Hepatozyten und LSECs führen kann (Arai et al. 1993). KCs werden schon lange mit der Leberregeneration in Verbindung gebracht (Michalopoulos and DeFrances 1997). Ihre Wirkungsweise ist dabei abhängig von der Regenerationsphase. Während intakte KCs IL-18 sezernieren und so die Regeneration hemmen, wird die Freisetzung von IL-6 und TNF mit der Freisetzung von HGF durch Ito-Zellen in Verbindung gebracht (Xu et al. 2012).

### 1.1.5 Hepatische Sternzellen

Die Sternzellen der Leber, oder auch Itozellen, wurden bereits 1876 erstmalig von K. von Kupffer, nach dem auch die Kupfferzellen benannt sind, entdeckt. Der Name „Sternzellen“ ist auf ihre sternförmige Erscheinung zurückzuführen, und sie wurden ursprünglich durch von Kupffer fälschlicherweise den Phagozyten zugeordnet (Geerts 2001). 1951 wurden die Zellen durch T. Ito aufgrund ihrer Lipid-Vakuolen den Fettspeicherungszellen zugeordnet (Ito and Nemoto 1952). Erst 1971 wurde dann durch K. Wake belegt, dass Stern- und Ito-Zellen dieselbe Zellpopulation beschreiben, die sich durch ihre Fettspeichervakuolen und ihre Fähigkeit, Vitamin A zu speichern, auszeichnen und sich distinkt von KCs unterscheiden (Wake 1971).

In einer gesunden Leber werden ca. 5-8 % der Zellen den Ito-Zellen zugeordnet. Sie befinden sich üblicherweise in einem Ruhezustand (Geerts 2001). Im Falle eines Leberschadens kommt es zu einer Aktivierung der Sternzellen, was mit der Proliferation und der Produktion extrazellulärer Matrixproteine einhergeht (ECM<sup>6</sup>). Die Sternzellen sind dabei die Hauptlieferanten der ECM-Proteine wie z.B. Kollagen. Diese Proteine können unter verschiedenen Umständen, wie dem wiederholten Auftreten der Schäden, zu der Bildung einer Leberzirrhose führen. Gerade im Kontext chronischer Erkrankungen wird funktionelles Lebergewebe nicht mehr in ausreichendem Maße ersetzt, und die Wahrscheinlichkeit, an Leberkrebs zu erkranken, erhöht sich drastisch (Eng and Friedman 2000).

---

<sup>5</sup> Engl.: Tumor necrosis factor

<sup>6</sup> Engl.: Extracellulärmatrix

In Bezug auf die Leberregeneration wird den Sternzellen die Sezernierung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren wie FGF-1<sup>7</sup>, FGF-2 oder HGF zugeschrieben (Shen et al. 2011). Wenn die Aktivierung der Sternzellen z.B. durch Gliotoxin unterdrückt wird, kommt es zu einer signifikanten Reduktion der regenerativen Fähigkeiten der Leber (Kitto and Henderson 2021).

## **1.2 Leberschaden und Regeneration**

### **1.2.1 Leberschaden**

Grundsätzlich können Leberschäden in zwei wichtige Untergruppen aufgeteilt werden. Zum einen ist die Leber das Ziel hepatotropher Viren oder Pathogene, welche über den Magen-Darm-Trakt in den Organismus eindringen können und verschiedene immunologisch bedeutsame Signalkaskaden innerhalb der Leber stimulieren. Zum anderen sind wichtige Vorgänge der Detoxifikation und Biotransformation in der Leber beheimatet. Viele dieser lebensnotwendigen Mechanismen besitzen außerordentliche funktionelle Reserven, um unter non-physiologischen Bedingungen ausreichende Kapazitäten zur Detoxifikation zur Verfügung zu stellen. Leberschäden können in humanen und murinen Systemen über die Quantifizierung der Alanin-Aminotransferase-(ALT)-Mengen im Blut verfolgt werden. Die ALT ist ein Enzym, welches überwiegend in den Hepatozyten der Leber vorkommt und im Falle eines Leberschadens, sei es durch eine Intoxikation oder das Auslösen einer Immunantwort, in die Blutzirkulation freigesetzt wird. Dort kann sie mit einfachen Bluttests nachgewiesen werden.

### **1.2.2 Aktivierung des Immunsystems und Leberschaden**

Erreger, die in die Leber eindringen, werden lokal durch das angeborene und das adaptive Immunsystem bekämpft. Das angeborene Immunsystem reagiert direkt nach dem Eindringen des Erregers und wird überwiegend durch phagozytierende

---

<sup>7</sup> Engl.: Fibroblast growth factor

und professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC<sup>8</sup>) wie Makrophagen und dendritische Zellen vertreten. Die Unterscheidung zwischen „fremd“ und „eigen“ erfolgt dabei durch pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs<sup>9</sup>), die sich ausschließlich auf Nicht-Wirtszellen befinden. Die Erkennung der PAMPs erfolgt dabei über Mustererkennungsrezeptoren (PRR<sup>10</sup>) (Akira 2009; Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006). Die Bindung der PRRs führt zur Aktivierung pro-inflammatorischer Signalkaskaden (Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006). Zusätzlich dazu können Pathogene viralen Ursprungs mit Hilfe der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) erkannt werden.

Der Hepatitis-B-Virus, der pro Jahr hunderte Millionen Menschen auf der Welt befällt, gehört zur Hepadnavirus-Familie und infiziert ausschließlich die Hepatozyten im Lebergewebe. Durch die Übernahme derer Proteinbiosynthese-Maschinerie sowie durch die Aktivierung des Immunsystems kommt es zum Absterben der Zellen. Das Infektionsgeschehen führt dabei zum einen zu einer rasch verlaufenden Immunantwort, welche auf den beiden Interferonen IFN $\alpha$ <sup>11</sup> und IFN $\gamma$ <sup>12</sup> basiert (Kato et al. 2005), die durch ihre antiviralen Eigenschaften die Ausbreitung der Infektion eindämmen.

Zum anderen kommt es zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch die Präsentation von viralen Antigenen über die MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche von LSECs und KCs. Die so aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beginnen dann, vom Virus infizierte Hepatozyten durch die Freisetzung von Perforin und Granzym B und über den Fas/FasL-Signalweg auszuschalten (Knolle and Thimme 2014). Diese Mechanismen der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Effektorfunktion benötigen dabei einen direkten Zell-Zell-Kontakt mit dem infizierten Hepatozyten. Ergänzend dazu können LSECs geprimete CD8<sup>+</sup>-T-Zellen TNF sezernieren und über die nicht-kanonische TNF-Effektorfunktion selektiv in virus-infizierten Hepatozyten den Zelltod auslösen (Wohlleber et al. 2012).

Die dabei entstehenden Leberschäden sind vom Grad der Infektion abhängig. Hepatozyten, welche während einer fulminanten Hepatitis infiziert und durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt werden, durchlaufen im überwiegenden Fall einen apoptotischen

---

<sup>8</sup> Engl.: Antigen presenting cells

<sup>9</sup> Engl.: Pathogen-associated molecular pattern

<sup>10</sup> Engl.: Pattern recognition receptor

<sup>11</sup> Engl.: Interferon-alpha

<sup>12</sup> Engl.: Interferon-gamma

Zelltod. Die CD8<sup>+</sup>-Effektor-T-Zellen werden dabei durch die Zytokine produzierenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie durch die Antikörperproduktion der B-Zellen unterstützt.

Im Rahmen einer Hepatitis-B-Infektion kommt es in ca. 95 % der Fälle zu einer vollständigen Ausheilung der Infektion und der Leberschaden wird vollständig regeneriert. Selbst schwerste Infektionsgeschehen können dabei regeneriert werden, ohne die funktionelle Reserve der Leber auszuschöpfen.

Im Falle einer akuten, fulminanten Hepatitis führt eine starke HBV-spezifische T-Zell-Reaktion zur Überwindung der Infektion. In ca. 5 % der Fälle kann eine weniger stark ausgeprägte T-Zell-Antwort auch zu einer persistierenden Infektion führen (Rehermann and Nascimbeni 2005). Diese chronische HBV-Infektion ist durch hohe, zirkulierenden Antigenmengen gekennzeichnet, welche die HBV-spezifischen T-Zellen inaktivieren. Inaktivierte T-Zellen sind dabei durch die Expression verschiedener inhibitorischer Oberflächenmoleküle wie CTLA-4<sup>13</sup> und PD-1<sup>14</sup> gekennzeichnet (Schurich et al. 2011).

Neben der physiologischen Antwort des Immunsystems auf Pathogene kann die Leber auch durch eine autoimmune Immunreaktion geschädigt werden. Dabei kommt es durch eine Kombination aus Faktoren der Umwelt, genetischer Prädisposition und möglicherweise auch bisher unbekannter Virus-Infektionen zu einer Aktivierung von T-Helferzellen, die dann in Abhängigkeit zu kostimulatorischen Signalen eine Differenzierung zu Th1, Th2 oder Th17-Zellen durchlaufen (Liberal et al. 2013). Der Ausbruch einer Autoimmun-Hepatitis (AIH) erfordert eine lebenslange Behandlung mit immunmodulatorischen Faktoren wie z.B. Kortikosteroiden, da der sukzessiv auftretende Leberschaden langfristig, wie auch bei einer chronischen viralen Hepatitis, zur Leberzirrhose führt und die Chancen auf Leberzellkrebs massiv erhöht.

### 1.2.3 Intoxikation und Leberschaden

Die Detoxifikation von Xenobiotika ist eine Kernaufgabe der Leber. Als Xenobiotika werden in der Regel chemisch aktive Substanzen bezeichnet, die in dem beobachteten Organismus nicht produziert werden oder anwesend sein sollten. Dies

---

<sup>13</sup> Engl.: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

<sup>14</sup> Engl.: programmed cell death protein 1

können z.B. giftige Moleküle aus dem Knollenblätterpilz, chemische Verbindungen wie das Anästhetikum Halothan oder Medikamente auf Acetaminophenbasis sein.

Die starke Durchblutung der Leber sowie der direkte Transport von Blut aus dem Magen-Darm-Trakt über die Pfortader erlauben es dem Organismus, große Blutmengen direkt durch die Sinusoide der Leber zu leiten, um den leberspezifischen Zellpopulationen wie Hepatozyten und LSECs eine maximale Interaktionsoberfläche mit dem Blutkreislauf zu ermöglichen und so eine rasche Entfernung von Schadstoffen aus der Zirkulation zu erreichen.

Die Metabolisierung der Xenobiotika ist dabei ein mehrphasiger Prozess, der die Inaktivierung des Moleküls und die verbesserte Ausscheidung zum Ziel hat (Park et al. 2011). Die hydrophilen bzw. hydrophoben Eigenschaften eines Xenobiotikums sind dabei von tragender Bedeutung. Während hydrophile Moleküle intakte Zellmembranen ohne passende Transportmoleküle nicht passieren können und ihre gute Löslichkeit in Wasser zu einer raschen Ausscheidung aus dem System führt, werden hydrophobe Verbindungen schlechter ausgeschieden. Sie sind in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen und so eine Vielzahl von unerwünschten Interaktionen im Organismus auszulösen (Jakoby and Ziegler 1990).

Daher erfolgt ein als Biotransformation bezeichneter Prozess, dessen Ziel die Veränderung der Polarität des Xenobiotikums ist. Dabei kann es allerdings zur Bildung hochreaktiver Metabolite kommen, die, sollten sie nicht weiter prozessiert werden, irreversible kovalente Bindungen mit Proteinen des Hepatozyten eingehen und so die Zelle vergiften.

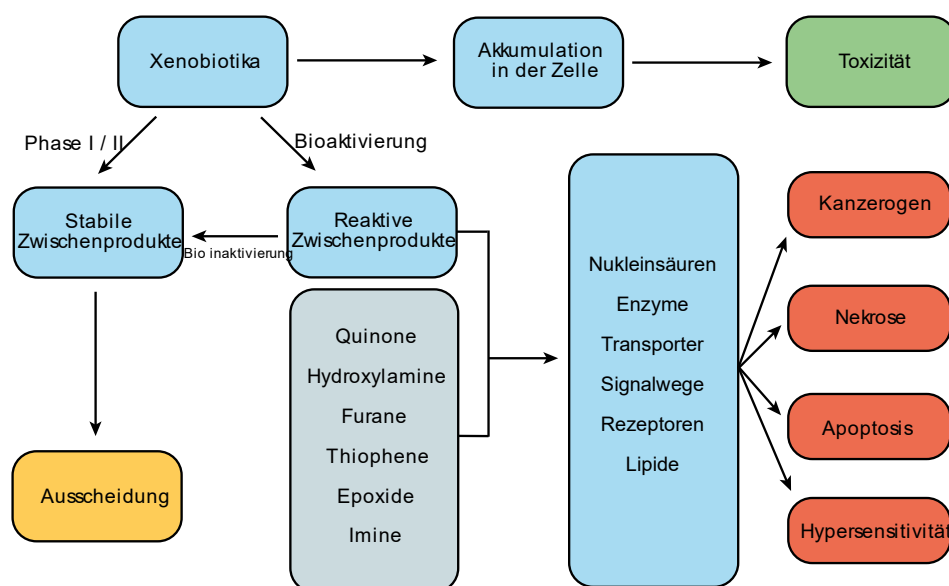


Abbildung 1: Metabolismus der Xenobiotika in der Leber nach Park et al. 2010.



In Phase I wird dabei mit Hilfe der Cytochrome P450 und NADPH ein reaktive OH-Gruppe gebildet, die dann beim Zielmolekül z.B. zu Oxidation oder Hydrolyse führt (Guengerich 2001). Metabolite, die noch keine ausreichende Polarität aufweisen, werden in Phase II durch Enzym-Transferasen mit einem Kofaktor konjugiert. Durch die Konjugation der Metabolite mit Kofaktoren wie Acetyl-CoA oder Glutathion (GSH) werden die Xenobiotika dabei verstoffwechselt. Der Kofaktor wird dabei verbraucht und erst über einen gewissen Zeitraum nachgebildet. In Phase III werden dann die mit GSH konjugierten Metabolite mit Hilfe von Acetyl-Cystein weiter acetyliert (Boylard and Chasseaud 1969).

Die so modifizierten Moleküle sind nun inaktiviert und hydrophil und können daher aus dem Hepatozyten wieder in das sinusoidale Lumen transportiert werden. Die finale Exkretion erfolgt dann in der Niere.

Obwohl der Mechanismus der Biotransformation eine Vielzahl von verschiedenen Transferasen nutzt, ist der verwendete Kofaktor mit GSH fast immer identisch. Schwere Vergiftungen können daher zu einer Depletion der GSH-Speicher in der Leber führen. Der pharmakologisch wirksame Bestandteil von Paracetamol, Acetaminophen (APAP), ist bei einer (un)beabsichtigten Überdosierung dazu in der Lage, die GSH-Speicher zu leeren und ein akutes Leberversagen herbeizuführen. APAP-induzierter Leberschaden ist der Hauptgrund für akutes Leberversagen im anglo-amerikanischen Sprachraum (Ostapowicz et al. 2002; Park, Dear, and Antoine 2015). Ein großes Problem entsteht hierbei durch die zeitlich verzögert auftretenden Symptome, deren Erscheinen nach ein bis zwei Tagen bereits mit einer akuten, fulminanten Hepatitis einhergeht, und die bei besonders schweren Verläufen eine Lebertransplantation nötig machen.

#### **1.2.4 Zelltod in der Leber**

Der Tod von Hepatozyten in der Leber kann verschiedene Ursachen haben und gehört zu den physiologischen Herausforderungen, die die Leber zu bewältigen hat. Während vereinzelt auftretender Zelltod keinerlei Einfluss auf die Funktion der Leber hat, können umfangreiche Schadensereignisse schwerwiegende Folgen haben. Pathophysiologische Schäden werden dabei oft mit einem Entzündungsvorgang,

einer Hepatitis, in Verbindung gebracht. Dabei sind die zeitlichen Abläufe nicht immer eindeutig. Schäden, die im Verlauf einer viralen Hepatitis auftreten, sind überwiegend auf die Entzündung und die adaptive Immunantwort zurückzuführen und führen bei virusinfizierten Hepatozyten zur Einleitung der Apoptose.

Bei der Apoptose handelt es sich um eine hochkontrollierte, physiologische Form des Zelltodes. Apoptose kann durch Zellstress oder durch externe Stimuli, z.B. über die Fas/FasL-Kaskade, ausgelöst werden und ist nach ihrer Induktion unumkehrbar (Bohm and Schild 2003; Kerr, Wyllie, and Currie 1972). Mechanistisch betrachtet befindet sich in der Zelle eine Gruppe von Cystein-Proteasen. Diese als Caspasen bezeichneten Proteasen können in die Initiator-Caspasen, 8, 9 und 10 und die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 unterschieden werden (Bantel and Schulze-Osthoff 2012).

Während der Apoptose erfolgt die Kondensation der zellkernären und zytoplasmatischen Bestandteile. DNA-Reparaturmechanismen werden inaktiviert und die DNA wird in Fragmente einer vielfachen Länge von 180 Basenpaaren zerlegt (Eastman and Barry 1992; Wyllie et al. 1984).

Abschließend erfolgt die Zerlegung in kleinere, membranumhüllte apoptotische Körperchen, die durch Phagozyten entfernt werden. Die Stressinduzierung der Apoptose kann z.B. durch Glucosemangel, Hypoxie oder durch Signale aus den Mitochondrien erfolgen, während die extrinsische Induktion z.B. über die TNF erfolgen kann.

Im Gegensatz zur Apoptose können Zellen auch in einer weniger feingliedrig regulierten klassischen Nekrose zugrunde gehen. Hierbei wird der Zelltod durch ein pathophysiologisches, traumatisches Ereignis ausgelöst, und die folgende Desintegration der Zellmembran setzt eine Vielzahl pro-inflammatorischer Moleküle frei, die Granulozyten und Makrophagen des Immunsystems aktivieren (Festjens, Vanden Berghe, and Vandenabeele 2006). Freigesetztes Adenosin-Triphosphat (ATP) und andere schadensassoziierte-Moleküle (DAMPs<sup>15</sup>) tragen zusätzlich zur Ausdehnung der Entzündungsreaktion in das umliegende Gewebe bei.

Neuere Forschungsergebnisse haben allerdings gezeigt, dass die Grenzen zwischen der Apoptose und Nekrose weniger eindeutig sind und Gewebe auch durch Mischformen, die als programmierte Nekrose bezeichnet werden, zugrunde gehen kann (Kaczmarek, Vandenabeele, and Krysko 2013). Daher wird zunehmend die

---

<sup>15</sup> Engl.: Damage-Associated Molecular Patterns

Unterscheidung zwischen programmiertem Zelltod (PCD.<sup>16</sup>) und dem regulierten Zelltod (RCD.<sup>17</sup>) getroffen, um den unterschiedlichen Arten des Zelltodes gerecht zu werden (Galluzzi et al. 2018).

Eine weitere wichtige Form des RCD ist dabei die Nekroptose, bei der das RIP1.<sup>18</sup> und RIP3 einen Komplex bilden, der als „Nekrosome“ bezeichnet wird und als Schlüsselmediator für die Initiation der Nekroptose gilt (Kaiser et al. 2011). Ausgelöst wird die Nekroptose durch Signale der TNF, wenn diese nicht in der Lage sind, eine geordnete Apoptose einzuleiten (Zhang et al. 2009; Kaiser et al. 2011).

### **1.2.5 Der Einfluss von Zelltod auf die Leberregeneration**

Die Mechanismen des Zelltodes in der Leber sind von tragender Bedeutung, wenn man sich mit der Leberregeneration auseinandersetzen will. Den vielfältigen Herausforderungen, denen die Leber ausgesetzt ist, stehen eine Vielzahl von Mechanismen gegenüber, die die Funktion der Leber sicherstellen sollen (Schulze-Osthoff and Bantel 2011). Während die Aktivierung der adaptiven Immunabwehr in der Regel mit einem apoptotischen Zelltod assoziiert wird, können Signale wie TNF bei hohen Konzentrationen oder Problemen bei der Apoptose-Initiation auch Nekroptose induzieren (Luedde, Kaplowitz, and Schwabe 2014). Obwohl also TNF-Signale einen direkten Einfluss auf den Tod virusinfizierter Hepatozyten haben, sind sie zugleich durch die Komplexbildung des TNF-Rezeptors 1 (TNF-R1), der TNF-R-assoziierten Todes-Domäne (TRADD.<sup>19</sup>) und RIP1 verantwortlich für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B.<sup>20</sup>, welches ein Schlüsselprotein für das Überleben der Hepatozyten ist (Wullaert et al. 2007).

Toxische Schäden z.B. durch eine APAP-Intoxikation zeigen hingegen eine Mischung von Apoptose und Nekrose (Kon et al. 2004; Ray et al. 1996), und Fas/FasL-defiziente Mäuse zeigten ein erhöhte Resistenz gegenüber APAP-induziertem Leberschaden (Liu, Govindarajan, and Kaplowitz 2004). Zugleich konnte nachgewiesen werden, dass der Knock-Out der Effektor-Caspasen 3 und 7, beides essenzielle Bestandteile der Apoptose, die Leberregeneration verschlechtert (Li et al.

---

<sup>16</sup> Engl.: Programmed cell death

<sup>17</sup> Engl.: Regulated cell death

<sup>18</sup> Engl.: Receptor-interacting Protein 1

<sup>19</sup> Engl.: TNF-R-associated death domain

<sup>20</sup> Engl.: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

2010). Die Regeneration der Leber ist daher ein komplexes, hochgradig reguliertes System, in dem alle leberspezifischen Zelltypen ihren Platz haben und wichtige Signale nicht nur über ein Signalmolekül kommuniziert, sondern durch eine konstante Integration verschiedenster Stimuli verarbeitet werden. Dieses Gleichgewicht kann bei schweren Vergiftungen wie APAP, durch die Amatoxine der Knollenblätterpilze oder bei akutem Leberversagen durch massiven nekrotischen Zelltod nicht aufrechterhalten werden und mündet in einem katastrophalen, vollständigen Leberversagen.

### **1.2.6 Leberregeneration**

Die Regeneration der Leber ist ein so beeindruckendes Phänomen, dass bereits der antike griechische Mythos des Prometheus davon berichtet. Die erste wissenschaftliche Publikation, die eine kompensatorische Regeneration des Leber-Parenchyms beschreibt, wurde bereits 1909 von Lindsay S. Milne veröffentlicht (Milne 1909). Trotz mehr als einem Jahrhundert Leberregenerationsforschung konnten noch nicht alle Fragen beantwortet werden.

Die Leber ist mit ca. 1,5 kg Gewicht eines der größten Organe im menschlichen Körper und ist mit vielen verschiedenen Funktionen ausgestattet (Fausto, Campbell, and Riehle 2006). Zusätzlich ist die Leber das Ziel verschiedener Krankheitserreger. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Leberschäden schnell und effizient zu beseitigen und dabei die eigentlichen Funktionen der Leber zu erhalten (Kren et al. 1997).

Um die Leberregeneration zu erforschen, wurde schon 1931 das Modell der Partiellen Hepatektomie (PH) vorgestellt (Higgins 1931), bei dem ca. 66 % des Lebergewebes einer Ratte entfernt wurden und das Tier überlebte. Das verbleibende Gewebe proliferierte und erreichte die originäre Lebermasse nach nur 5-7 Tagen. Die relative Einfachheit, hohe Toleranz und der geringe histologische Schaden am verbleibenden Lebergewebe haben die PH zu einer Standard-Methode der Regenerationsforschung werden lassen (Mao, Glorioso, and Nyberg 2014; Michalopoulos 2014; Michalopoulos and DeFrances 1997). Neben der PH werden verschiedene Chemikalien genutzt, um Leberschäden gezielt zu induzieren. Modelle, die auf diese Art und Weise den Leberschaden induzieren, führen in der Regel zu

einem nekrotischen Zelltod und imitieren so eher Leberschäden, die auch im klinischen Alltag eine gewichtige Rolle spielen (Michalopoulos 2017; Wei et al. 2015). Im Rahmen der Erforschung eines regenerierbaren, akuten Leberschadens wird z.B. Tetrachlormethan (CCL<sub>4</sub><sup>21</sup>) eingesetzt. Die Metabolite des CCl<sub>4</sub>-Abbaus sind Radikale und führen zu oxidativem Stress und Schaden an den Proteinen und der DNA der Zielzellen. Der Abbau führt zu einer massiven, initialen Erhöhung von Serum-ALT-Werten, die sich allerdings innerhalb von drei Tagen wieder beinahe vollständig normalisieren (Palmer and Spiegel 2004).

Die direkte Applikation von APAP in Nager-Modellen wird ebenfalls praktiziert und erzeugt ein Schadensmodell, welches eine Mischung aus apoptotischem und nekrotischem Zelltod herbeiführt. Im direkten Vergleich zum CCL<sub>4</sub>-System ist der initiale Leberschaden, gemessen an der Serum-ALT-Menge, geringer und kann dennoch zu einem fulminanten Leberversagen führen.

Sofern die physiologische Leberregeneration in einem ausreichenden Ausmaß stattfinden kann, ist sie ein hochregulierter Vorgang und konnte durch PH-Modelle gut entschlüsselt werden.

Innerhalb von Minuten nach der Entfernung eines großen Anteils des Lebergewebes kommt es zur Freisetzung und Aktivierung der Urokinase (uPA<sup>22</sup>), welche nun verschiedene Metalloproteinasen aktiviert (Mars et al. 1995). Die Aktivierung der uPA und der Metalloproteinasen führt zum Abbau der ECM (Kim et al. 1997), um die notwendige Remodellierung des Gewebes zu ermöglichen. Dabei kommt es zur Freisetzung und Aktivierung des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF<sup>23</sup>) (Appasamy et al. 1993; Michalopoulos and DeFrances 1997; Michalopoulos 2014). Zugleich haben die Veränderungen des Blutflusses nun zu einer Anpassung der Scherkräfte innerhalb der Lebersinusoide geführt. Der Einfluss dieser biomechanischen Anpassungen wird durch LSECs registriert und führt zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden wie Wnt und Notch (Sokabe et al. 2004; Preziosi et al. 2018; Abu Rmilah et al. 2019). Schon kurze Zeit nach der PH kommt es also zu einer Ausschüttung aller wichtigen Wachstumsfaktoren, die für die Leberregeneration verantwortlich sind. Dazu gehören neben HGF auch der vaskuläre

---

<sup>21</sup> Engl.: carbon tetrachloride

<sup>22</sup> Engl.: Urokinase-type plasminogen activator

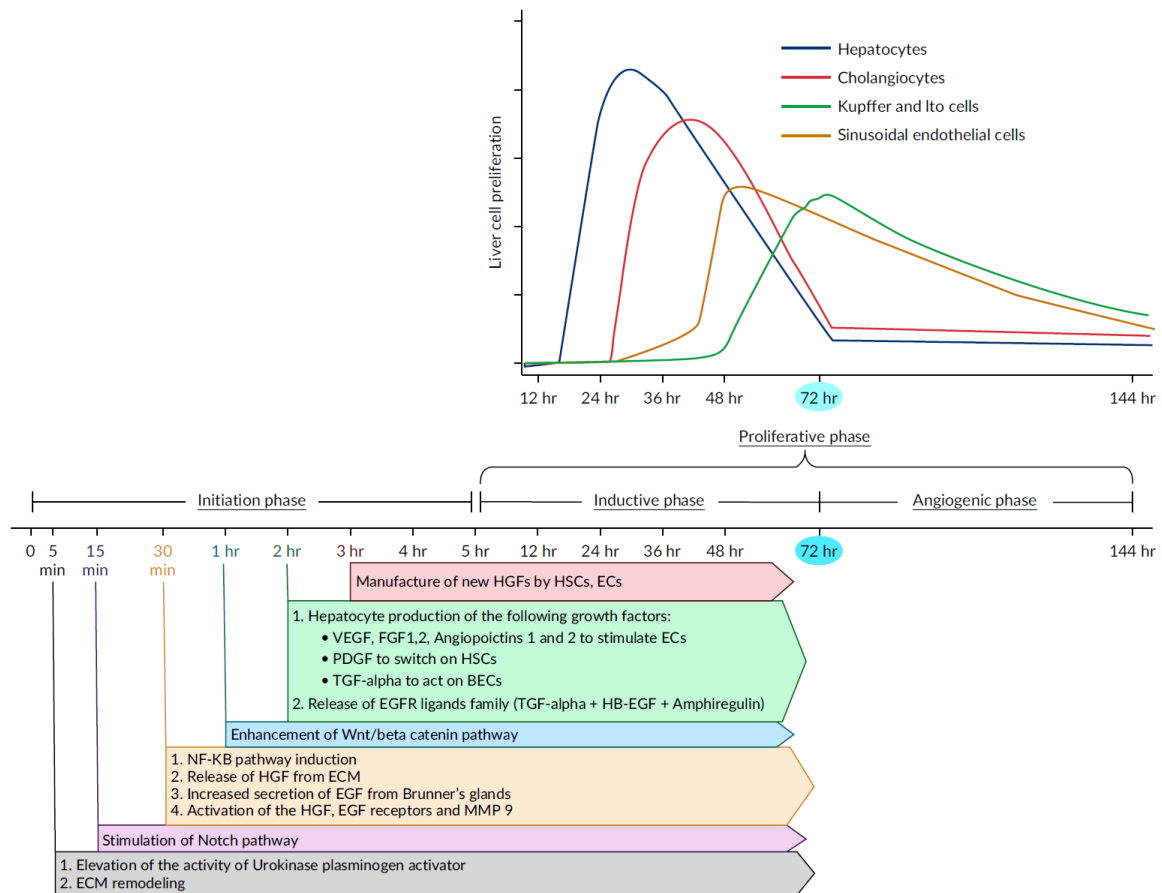
<sup>23</sup> Engl.: Hepatocyte growth factor

endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF<sup>24</sup>), der epidermale Wachstumsfaktor (EGF<sup>25</sup>) sowie Angiopoetin-2 und FGF (Zhang et al. 2020; Michalopoulos and DeFrances 1997). Die Kombination dieser Wachstumsfaktoren führt dazu, dass die verbleibenden Hepatozyten ihrerseits Proliferationskaskaden initiieren und so innerhalb von nur wenigen Stunden mit dem Ersetzen der verlorenen Hepatozyten beginnen. Zugleich behält das verbleibende Lebergewebe seine physiologische Funktion und ist in der Lage, sämtliche Aufgaben wie Entgiftung und die Produktion notwendiger Biomoleküle aufrechtzuerhalten (Kim et al. 1997; Michalopoulos 2014). Andere leberspezifische Zelltypen wie LSECs oder Kupffer-Zellen wiederum beginnen mit ihrer Proliferation erst deutlich verspätet. In Maus-Modellen beginnt die Proliferation der Hepatozyten nach ca. 14-18 h und erreicht innerhalb von ca. 28 h ihren Höchststand. Cholangiozyten, die für die Produktion der Galle notwendig sind, fangen zu diesem Zeitpunkt erst mit ihrer Proliferation an. Die Proliferation der LSECs beginnt zu einem ähnlichen Zeitpunkt, ca. 28-30 h post-PH, bleibt aber zunächst weit hinter den Hepatozyten und Cholangiozyten zurück und erreicht ihr Maximum erst nach ca. 48 h, lange nachdem die Hepatozyten ihren Proliferationszenit überschritten haben (Abu Rmilah et al. 2019). Während bei Mäusen die intakte Leberregeneration bereits nach drei Tagen ihre Proliferationsphasen überwiegend abgeschlossen hat, so ist beim Menschen die Proliferation des Lebergewebes für ca. zwei Wochen notwendig, bevor sich in beiden Fällen das Lebergewicht seiner ursprüngliche Größe annähert (Haga et al. 2008).

---

<sup>24</sup> Engl.: Vascular endothelial growth factor

<sup>25</sup> Engl.: Epidermal growth factor



**Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Leberregeneration nach Rmilah et al. 2019 nach einer 70 % PH in der Maus.**

Auch wenn mit Hilfe von Schadensmodellen wie der PH bedeutende Fortschritte im Bereich der Leberregenerationsforschung erreicht wurden, muss man festhalten, dass die Art und Weise dieses Schadens, wie er auftritt und welche Signalkaskaden dabei ausgelöst werden, einen sehr seltenen Sonderfall eines massiven Leberschadens ausmachen. Die sterile Sektion eines Leberlappens hinterlässt in dem verbleibenden Lebergewebe keinen nennenswerten Schaden und es kommt in der Regel nicht zu Entzündungserscheinungen oder gar nekrotischem Zelltod (Palmes and Spiegel 2004). Zugleich kommt es dennoch zu einer Aktivierung des Immunsystems, was sich positiv auf die Leberregeneration auswirkt, auch wenn die genauen Mechanismen und der ihnen zugrunde liegende Kontext nicht vollständig geklärt sind (Preziosi et al. 2018; D. Markose 2018).

### 1.2.7 Schlüssel-Mediatoren der Leberregeneration

HGF ist der Schlüsselmediator der Leberregeneration. Wenn HGF oder sein Rezeptor c-Met in Knock-Out-Mäusen vollständig ausgeschaltet wird, können keine lebensfähigen Mäuse gezüchtet werden. Die Deletion durch das Cre/loxP-System in der adulten Maus führt zu einer massiv eingeschränkten Leberfunktion im Hinblick auf eine Proliferationsrate der Hepatozyten sowie bei der Repopulation der geschädigten Leberbereiche (Bussolino et al. 1992; Kawaida et al. 1994; Huh et al. 2004; Michalopoulos 2014).

HGF wird dabei durch verschiedene Zellpopulationen innerhalb der Leber in einer biologisch inaktiven pro-HGF-Form gebildet und sezerniert. Diese pro-Form bindet an die ECM der Leber und kann beim Auftreten eines Leberschadens sehr schnell durch die Freisetzung der uPA und deren Aktivierung durch Bindung an den uPA-Rezeptor (uPAR) von der ECM gelöst und in biologisch aktives HGF gespalten werden. Zugleich unterstützt uPA die Remodellierung der Leber durch den Abbau der ECM und der Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin, welches zusätzlich die Fibrinfasern der ECM abbaut (Naldini et al. 1995; Gohda 2002; Michalopoulos 2014; Fukushima et al. 2018).

Die Erkennung von Leberschäden ist ein komplexer Vorgang, der durch verschiedene Mechanismen innerhalb der Leber stattfindet. Dabei können biomechanische Signale, wie die Erhöhung der Scherkräfte innerhalb der Sinusoide, die Freisetzung von PAMPS und DAMPs oder die Freisetzung von IL-6 innerhalb der Leber auslösen. IL-6 spielt dabei eine besondere Rolle, da es zur Modulation der Immunaktivität in der Leber benötigt wird und ihm zugleich ein essenzieller Anteil an der Leberregeneration zugesprochen wird (Clavien 1997; Tiberio et al. 2008; Gewiese-Rabsch et al. 2010; Rose-John 2012; Bottcher et al. 2014; Tao et al. 2017; Naseem, Hussain, and Manzoor 2018). Die Signalkaskaden um IL-6 und das IL-6-transsignalling helfen bei der Regeneration der Hepatozyten und stehen dabei in enger Verbindung zur Produktion und Aktivierung von HGF durch uPA und seinen Rezeptor.

Erst im späteren Verlauf der Regeneration kommen Signalmoleküle wie VEGF und EGF zum Einsatz, um die Proliferation der LSECs zu gewährleisten (Lu et al. 2021; Adamek et al. 2017; Bockhorn et al. 2007).



## 2. Ziel der Arbeit

Die Leberregeneration ist von existenzieller Bedeutung und sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSECs) spielen durch die Produktion von HGF eine besondere Rolle. Die Regulation der Leberregeneration wurde bisher vor allem mit Hilfe von partieller Hepatektomie und Applikation von Toxinen untersucht, wohingegen die meisten Leberschäden durch das Immunsystem hervorgerufen werden. Bisher gibt es nur wenige Modellsysteme und Untersuchungen, die sich gezielt mit der Rolle des Immunsystems und LSECs für die Leberregeneration beschäftigen. Da LSECs als antigen-präsentierende Zellen der Leber für die lokale Aktivierung von T Zellen durch IL-6 trans-signaling verantwortlich sind und Leberschädigung verstärken können, war insbesondere das Wechselspiel in der Vermittlung von Leberschaden und der Induktion von Leberregeneration durch LSECs nicht ausreichend untersucht.

Die vorliegende Arbeit hatte deshalb zum Ziel, die molekularen Trigger für die Expression von HGF durch LSECs zu charakterisieren, und beschäftigt sich mit folgenden Fragen:

1. Welche Rolle spielt die Aktivierung von LSECs über bakterielle Degradationsprodukte (PAMPs) oder extrazelluläres ATP (DAMPs) für die Produktion von HGF
2. Gibt es einen Beitrag der im Rahmen einer T Zell-Aktivierung freigesetzten Mediatoren wie TNF sowie IL-6 für die Aktivierung von LSECs und deren Produktion von HGF
3. Welche Rolle spielt IL-6 trans-signaling für die Aktivierung von LSECs und der HGF Produktion
4. Gibt es neben der transkriptionellen Induktion der HGF Genexpression zusätzliche proteolytische Kontrollen der Expression von funktionell aktivem HGF

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Geräte

Geräte	Hersteller
<b>AutoMACS Separator</b>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
<b>BioPlex Pro II Microplate Wash Station</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>EasyPet pipet controller</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Incubator Heracell 150i</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>Infinite M1 1000 PRO</b>	Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland
<b>LightCycler® 480 II</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>Microscope Axio Vert A1</b>	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
<b>Implen P330 Nanophotometer</b>	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<b>PCR Cycler (ProFlex PCR System)</b>	Applied Biosystems, Foster City, CA/USA
<b>Pipetten</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Perfusionspumpe (Masterflex® L/S® Digital Standard Drive)</b>	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
<b>pH-Meter (inoLab® pH 7110)</b>	WTW (Xylem Analytics), Weilheim
<b>Shaker Max Q400</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>SP6800 Spectral Analyzer</b>	SONY Biotech, Tokyo, Japan
<b>Sterile Werkbank Safe 2020</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>Thermostat</b>	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
<b>Tischzentrifuge Hereus Fresco 17</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>Waage</b>	Kern 572, Balingen-Frommingen, Deutschland
<b>xCelligence RTCA Multiplate</b>	ACEA Biosciences, San Diego, USA
<b>Zählkammer Neubauer <i>improved</i></b>	Hermann-Herenz, Hamburg, Deutschland
<b>Zentrifuge Multifuge X3R</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA

## 3.2 Verbrauchsgüter

### 3.2.1 Verbrauchsgüter

Bezeichnung	Hersteller
CellBIND Multiple Well Plate	Corning, New York, USA
12-Kammer Objektträger	Ibidi, Martinried, Deutschland
384-Mikrotiterplatte für qPCR	Roche, Basel, Schweiz
96-Well Mikrotiterplatte (V-Form)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser (Menzel-Gläser)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
E-Platte View 96	ACEA Biosciences, San Diego, USA
FACS Röhrchen	Bio-Rad, Hercules, USA
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Kanüle	Braun, Melsungen, Deutschland
MACS Separationssäule	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrotiterplatten (6, 12, 24, 96 (F, U))	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Petrischale (100 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (10 – 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Spritzen (2, 5, 20 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterile Reservoir	Corning, New York, USA
unbeschichte 24-Well Zellkulturplatte	Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm <sup>2</sup> )	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb (40, 70, 100 µm)	Corning, New York, USA

### 3.2.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
HGF ELISA DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
PAI-1 ELISA DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
VEGF ELISA DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
HGF-R/c-MET ELISA DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
EGF ELISA DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
uPAR ELISA DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
NucleoSpin RNA XS	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Sensifast cDNA Synthese Kit	Bioline, Memphis , USA

### 3.2.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Acetyliertes LDL – AF488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Adenosindiphosphat(ADP)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Adenosinmonophosphat(AMP)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Adenosin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
BC-11 Hydrobromid	Tocris, Bristol, Vereinigtes Königreich
BSA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
CD8a Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CPG	Invivogen, San Diego, USA
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DNase	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EGTA (C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> )	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
fetales Kälberserum (FCS <sup>26</sup> )	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany
Gentamycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gey's Balanced Salzlösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

<sup>26</sup> Engl.: Fetal calf serum

<b>(GBSS)</b>	
<b>Glucose</b>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<b>Glucose Monohydrat</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Hank´s balanced Salzlösung (HBSS)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Heparin-Natrium (5000 I.E/ml)</b>	Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Hydrocortison</b>	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
<b>Insulin</b>	Novo Nordisk, Kopenhagen, Dänemark
<b>Ionomycin</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Isofluran CP®</b>	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Ketamin (10 %)</b>	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
<b>Kollagen R Lösung 0,2 %</b>	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<b>Kollagenase</b>	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<b>Kollagenase Typ II</b>	Worthington Biochemical Cooperation, Lakewood, New York, USA
<b>Kollagenase Typ IV</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>L-Glutamin 200 mM</b>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany
<b>L-Glycin</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>L-Isoleucin</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Lipofectamine® 2000</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Lipopolysaccharides aus E. coli 055:B5</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Meerrettich Peroxidase markiertes Streptavidin</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Methanol (CH<sub>3</sub>OH)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Natrium-Acetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Natriumchlorid</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Natriumhydrogenphosphat (NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Natriumhydroxid (NaOH)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Nycodenz</b>	Axis-Shield Diagnostics, Oslo, Norway
<b>Oligomycin</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>OptimMEM</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Ovalbumin</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Ovalbumin AF-647</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Penicillin/streptomycin 10 000 U/ml</b>	Biochrome GmbH, Berlin, Germany
<b>Rinderserumalbumin (BSA)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Poly:IC</b>	Invivogen, San Diego, USA

<b>Salzsäure (HCl)</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Tetramethylbenzidine (TMB)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Trypanblau</b>	Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland
<b>Tween 20</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>Urokinase Substrat III</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>UltraComp eBeads</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>William's Medium E</b>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
<b>β-Mercaptoethanol 50mM</b>	Sigma-Aldrich, +A1:B63St.Louis, USA

### 3.2.4 Antikörper

Marker	Fluorochrom	Klon	Verd./Konz.	Hersteller
<b>CD3</b>	PE-Dazzle, APC	17A2	1:250	Thermo
<b>CD4</b>	PerCP-Cy5.5	PM4-5	1:250	BioLegend
<b>CD8</b>	eF450, BV510, AF488, PE, PE-Cy7,	53-6.7	1:250	BioLegend
<b>CD8</b>	Unkonjugiert	53-6.7	1:250	Miltenyi
<b>CD54 (ICAM)</b>	PE	YN1/1.7.4	1:150	Thermo
<b>CD106 (VCAM)</b>	eF-450	eBioD4B	1:150	Thermo
<b>CD146</b>	PE	ME-9F1	1:100	Miltenyi
<b>CD146</b>	Unkonjugiert	ME-9F1	1:100	Miltenyi
<b>pSTAT3</b>	AF488	IgG2b Clone # 232209	1:100	R&D Systems

### 3.2.5 Primer

Gen	Spezies	Sequenz(5' → 3')	Hersteller
<b>HGF</b>	Maus	FW: -GTAAATGGGATTCCAACACGAACAA- RW: -TGTCGTGCAGTAAGAACCCAACTC-	Eurofins

### 3.2.6 Zytokine, Wachstumsfaktoren und rekombinante Proteine

Reagenz	Hersteller
FGF	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Hyper-IL-6	Institut für Zytokine, Chemokine und Metalloproteinasen, Universität Kiel, Kiel
IFN $\gamma$	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
IL-1 $\beta$	Peptotech, Hamburg, Deutschland
IL-6	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
rm-HGF	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
rm-PAI	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
rm-uPA	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
TGF	Peptotech, Hamburg, Deutschland
TNF	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
VEGF	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

### 3.3 Puffer und Medien

#### 3.3.1 Puffer

Name	Inhalt	finale Konz.
<b>PBS</b>	H <sub>2</sub> O	100 %
	NaCl	135 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
<b>GBSS</b>	Gey's Balanced Salt Solution	100 %
	NaHCO <sub>3</sub>	2.27 g/L
	Glukose	1 g/L
<b>Ca<sup>2+</sup> depletierter Puffer</b>	L-Aspartat	0,1 mM
	L-Threonin	0,2 mM
	L-Serin	0,3 mM
	Glycin	0,5 mM
	L-Alanin	0,6 mM
	L-Glutaminsäure	0,9 mM
	KCL	3 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7 mM

	MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	24 mM
	Glukose	20 mM
	Fruktose	200 mM
<b>MACS<sup>27</sup>-Puffer</b>	PBS	100 %
	FCS	1 %
	EDTA	20 mM
<b>FACS<sup>28</sup>-Puffer</b>	PBS	99 %
	FCS	1 %
	Natriumazid	0,01 %
<b>ACK-Lyse Puffer</b>	H <sub>2</sub> O	100 %
	NH <sub>4</sub> Cl	150 mM
	KHCO <sub>3</sub>	10 mM
	Na <sub>2</sub> EDTA	0,1 mM
<b>Puffer A (EGTA-Puffer)</b>	Glukoselösung (9,9 g/L)	5,7 g/L
	KH Puffer	10 % (v/v)
	HEPES Puffer (pH 8,5)	10 % (v/v)
	Aminosäurelösung	15 % (v/v)
	L-Glutamin (200 mM)	0,5 mM
	EGTA (125 mM)	0,5 mM
<b>Puffer B (Kollagenase-Puffer)</b>	Glukoselösung (9,9 g/L)	5,7 g/L
	KH Puffer	10 % (v/v)
	HEPES Puffer (pH 8,5)	10 % (v/v)
	Aminosäurelösung	12 % (v/v)
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (130 mM)	2 mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (130 mM)	3,5 mM
	L-Glutamin (200 mM)	0,5 mM
	Kollagenase NB 4G	0,46 mg/ml
<b>Puffer C (Suspension-Puffer)</b>	Glukoselösung (9,9 g/L)	5,7 g/L

<sup>27</sup> Engl.: Magnetic activated cell sorting

<sup>28</sup> Engl.: Fluorescence activated cell sorting



	KH Puffer	10 % (v/v)
	HEPES Puffer (pH 7,6)	10 % (v/v)
	Aminosäurelösung	12 % (v/v)
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (130 mM)	1,1 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (100 mM)	0,41 mM
	BSA	0,17 % (w/v)

### 3.3.2 Zellkulturmedien

Name	Inhalt	Finale Konz.
<b>LSEC-Adhäsionsmedium</b>	Dulbecco's Modified Eage Medium	100 %
	FCS	10 %
	Glukoselösung	0,5 g/L
	L-Glutamin	2 mM
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	50 U/ml
<b>LSEC-Kulturmedium</b>	Dulbecco's Modified Eage Medium	100 %
	Glukoselösung	0,5 g/L
	L-Glutamin	2 mM
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	50 U/ml
<b>T-Zellmedium</b>	RPMI 1640	100 %
	FCS	10 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	100 U/ml
	L-Glutamin	2 mM
	β-Mercaptoethanol	0,1 mM
<b>Hepatozytenmedium</b>	William's Medium E (ohne Glc, Gln)	100 %
	L-Glutamin	2 mM
	Glukoselösung	0,5 g/L
	HEPES Puffer (pH 7.4)	20 mM
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	50 U/ml
	Gentamycin	89 µg/ml
	Hydrokortison	5,6 µg/ml
	Insulin	23 I.E/L
	DMSO	1,6 %

### 3.3.3 Mauslinien

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden bei Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bestellt und im Alter 12 bis 18 Wochen für die Experimente verwendet. Die Mäuse wurden unter pathogenfreien Hygienebedingungen und nach FELASA-Richtlinien gehalten.

Mauslinie	Beschreibung	Hersteller
<b>C57BL/6</b>	Wildtyp	Janvier

### 3.3.4 Software

Software	Hersteller
<b>FlowJo™</b>	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
<b>LightCycler® 480 Software</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>xCelligence® RTCA Software Pro</b>	ACEA Biosciences, San Diego, USA

## **3.4 Methoden**

### **3.4.1 Isolation von sinusoidalen Leberendothelzellen aus der Leber**

Die Mäuse werden betäubt und durch zervikale Dislokation erlöst. Anschließend erfolgt die Eröffnung des Abdominaraumes und die Leber wird in craniale Richtung umgelegt, um die Pfortader freizulegen. Eine 26G-Kanüle verbindet die Leber mit der Peristaltikpumpe, und die Perfussion der Leber mit ca. 4 ml/min der Kollagenase-Lösung beginnt. Bei erfolgreicher Perfussion entfärbt sich die Leber sehr schnell. Die Perfussion ist nach ca. 10 Sekunden abgeschlossen und die Leber kann vorsichtig herauspräpariert werden.

Im folgenden Schritt wird die isolierte Leber unter einer Sterilwerkbank mit Hilfe einer Schere gleichmäßig ausgestrichen und die so durch Collagenase teilverdaute Leber dissoziiert. Das teilverdaute Gewebe wird nun vollständig in ein Reaktionsgefäß überführt und für ca. 15 min bei 37 °C in einer 0,04 % Collagenase-Lösung unter orbitalen Schüttelbewegung weiter zersetzt, bis die extrazelluläre Matrix möglichst vollständig zersetzt ist. Nach dem zweiten Collagenase-Verdau wird die Gewebesuspension durch ein Edelstahlnetz (Maschenweite 250 µm) gedrückt und so homogenisiert. Um grobe Zelltrümmer und Agglomerate der extrazellulären Matrix zu entfernen, wird die Zellsuspension bei 1500 Umdrehungen für 8 min zentrifugiert. Die Zellsuspension wird in einem Dichtegradienten mit 30 % Nycodenz-Lösung aufgetrennt. Die Gradientenzentrifugation wird bei 1400 g für 20 min durchgeführt und dann ohne Bremse auslaufen gelassen. Die feine, weißliche LSEC-Schicht wird vorsichtig extrahiert und mit Hilfe von Miltenyi  $\alpha$ CD146-Microbeads und dem AutoMacs Pro Separator weiter aufgereinigt. Abschließend werden die LSEC in LSEC-Adhäsionsmedium auf ihre Zielkonzentration verdünnt und ausplattiert.

### **3.4.2 Isolation von T-Zellen aus der Milz durch Hämolyse**

Die Mäuse werden durch eine Isoflurannarkose betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wird die Milz seitlich aus dem Körper entfernt. Die Milz wird mit einem sterilen Spitzenstempel durch ein Edelsstahlsieb mit einer Maschengröße von 100 µm homogenisiert. Verbleibende Gewebereste werden mit

kaltem PBS von Stempel und Sieb ab gespült und mit dem homogenisierten Gewebe vereint. Die Zellsuspension wird anschließend bei 400 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, um die Zellen zu sedimentieren. Der Überstand wird verworfen. Die im Pellet enthaltenen Erythrozyten werden lysiert. Dazu wird das Pellet mit 1,5 ml ACK-Lyse-Puffer /Milz resuspendiert und für 2 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Lyse durch die Zugabe von PBS gestoppt. Die Zellsuspension wird anschließend durch einen weiteren Filter mit einer Maschengröße von ca. 45 µm erneut vereinzelt. Abschließend erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 400 x g für 5 min bei Raumtemperatur, während der sich sämtliche Leucozyten am Boden des Reaktionsgefäßes absetzen.

### **3.4.3 *In vitro* Behandlung von Sinusoidalen Leberendothelzellen**

Alle Zellen wurden unter folgenden Bedingungen gehalten: 37 °C, relative Luftfeuchtigkeit 90 %, CO<sub>2</sub>-Gehalt 5 %.

LSEC werden nach ihrer Isolation (siehe 3.5.1) und der initialen Waschung für 24 h in 10 % FCS supplementiertem DME-Medium bei 37 °C im Inkubator gehalten. Anschließend erfolgen zwei Waschschriffe mit warmen PBS sowie die Umstellung auf ein serumfreies GBSS-Medium. LSEC können in diesem Medium für ca. vier Tage gehalten werden.

Zur Behandlung der LSEC werden die Wells erneut gewaschen und anschließend mit GBSS-Medium mit den zugesetzten Zytokinen/Reagenzien überschichtet. In Experimenten, die im 96-Well-Format durchgeführt werden, werden 75 µl GBSS-Lösung pro Well eingesetzt. Im Fall vom 24-Well-Format werden 360 µl eingesetzt. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen können in der Tabelle unter 3.4.8 eingesehen werden.

### **3.4.4 Impedanz-Messung von primären Zellen mit Hilfe des xCelligence**

Zur Echtzeituntersuchung der Zellviabilität und möglicher morphologischer Veränderungen *in vitro* von primären, murinen Hepatozyten nutzen wir impedanzbasierte Zellanalytik. Dabei werden spezielle Zellkulturplatten benutzt, die über Gold-Mikro-Elektroden im Boden verfügen. Der eingesetzte xCelligence Real-

Time Cell Analyzer von ACEA Biosciences misst dabei alle 15 Minuten den Wechselstromwiderstand (Impedanz) in jedem Well. Bei einer Änderung von Zellzahl oder Viabilität verändert sich auch die Impedanz. Dies kann in Echtzeit verfolgt werden. Zunächst wird hierzu ein Nullwert erstellt, dazu werden 100 µl des Erhaltungsmediums für primäre, murine Hepatozyten in der xCelligence Platte gemessen. Dieser Nullwert wird dann automatisch durch die Steuerungssoftware von allen folgenden Messungen abgezogen. Pro Well werden ca. 8.000 frisch isolierte, primäre, murine Hepatozyten in 200 µl Anhaftmedium I bei 37 °C ausgesät. Nach 4 h erfolgen der Austausch des Mediums durch Anhaftmedium II sowie die ersten Messungen. Einen Tag später wird das Anhaftmedium II durch 100 µl Erhaltungsmedium ausgetauscht. Nach einer kurzen Ruhephase von ca. 4 h werden 50 µl Zellüberstände aus der primären LSEC Zellkultur hinzugegeben. Diese Überstände wurden im Vorfeld im Rahmen der *in vitro* Behandlung von LSEC erzeugt (3.5.3).

#### **3.4.5 Konzentration von Überstand aus primärer Zellkultur**

Die für uns interessanten Zytokine und Wachstumsfaktoren werden in den überprüften Zeiträumen nur in geringen Mengen produziert. Daher werden Zellüberstände aus der *in vitro* Zellkultur einem Konzentrationsschritt unterzogen. Dabei werden die Überstände aus mehreren Wells vereint und mit Hilfe von Amicon Ultra Zentrifugen Filtereinheiten der Firma Merck vereint. 2 ml des vereinten Überstandes werden dabei auf ca. 200 µl aufkonzentriert. Dazu wird ein Amicon Ultra mit einer Filtergröße von 10.000 Da bei ca. 2000 x g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Konzentrat kann nun für verschiedene Analysemethoden weiterverwendet werden.

#### **3.4.6 Enzym-linked immunoabsorbant Assay (ELISA)**

Die von uns hauptsächlich verwendeten ELISA wurden kommerziell von R&D Systems erworben. Die in den Kits enthaltenen Primärantikörper wurden entsprechend der Gebrauchsanweisungen verdünnt und aliquotiert. 100 µl der Primärantikörperlösung wurden über Nacht in 96-Well High-Binding Microplates der Firma Greiner inkubiert. Danach wurde die Platte sorgfältig mit Hilfe eines BIORAD

Bio Plex PRO II zweifach gewaschen und durch 1 % BSA (PAI-1 und uPAR) sowie 1 % BSA + 3 %NGS (HGF) für 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschrte mit dem Bio Plex Pro II. 100 µl Proben sowie der im Kit enthaltende Standard wurden dann für 2 h bei Raumtemperatur auf der Platte inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte sowie anschließend die Inkubation mit 100 µl des im Kit mitgelieferten Detektionsantikörpers für weitere 2 h. Abschließend werden nicht gebundene Detektionsantikörper durch drei weitere Waschschrte entfernt. Die Wells werden mit 100 µl einer Streptavidin-gekoppelten HRP-Lösung für weitere 20 min inkubiert. Nach erneuter Waschung werden pro Well 100 µl TMB-Substratlösung hinzugegeben und dann wird ca. 5 min gewartet. Dabei entsteht im Falle eines positiven Ergebnisses ein Farbumschlag zu Blau. Nach 5 min werden 50 µl ELISA-Stop-Lösung dazugegeben. Dies unterbricht die Reaktion und es erfolgt ein weiterer Farbumschlag zu Gelb. Die Messung der Farbintensität erfolgte mit Hilfe eines TECAN Infinite M200 pro bei 450 nm Wellenlänge. Zusätzlich erfolgte eine Wellenlängenkorrektur bei 540 nm zur Ermittlung des Hintergrundsignals.

### **3.4.7 Urokinase-Aktivitäts-Assay**

Das kommerziell erhältliche Urokinase-Substrat (Urokinase Substrate III, Merck #672159) wird mit einer Konzentration von 500 µg/ml zu der zu testenden Lösung gegeben. Dazu werden 50 µl der Probenlösung (z.B. Zellkultur-Überstand) in eine schwarze Polystyrolplatte mit klarem Boden (Greiner Bio-One)vorgelegt. Anschließend werden mit Hilfe einer Multi-Kanal-Pipette alle Test-Wells zeitgleich mit 100 µl der Substratlösung versetzt und die Messung zeitnah gestartet. Die Fluoreszenz-Messung wird mit folgenden Parametern im Tecan-Reader durchgeführt:

Exzitationswellenlänge: 375 nm

Emissionswellenlänge: 450 nm

Exzitationsbandbreite: 5 nm

Emissionsbandbreite: 5 nm

Verstärkung: manuell, 100x

Die Messung erfolgt dabei als Kinetik, in der alle 5 Minuten eine Messung vorgenommen wird. Je nach Aktivität der Urokinase in den Test-Proben können Messungen >1 h notwendig werden.

#### **3.4.8 Oberflächenfärbung von adhärennten Zellen in Zellkultur zur durchflusszytometrischen Analyse**

Die Zellen werden mit ca. 1 ml warmem PBS (37 °C) mehrfach gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 50 µl Accutase-Lösung (96-Well-Format) bzw. 250 µl (24-Well-Format). Die Zellen werden für 15-20 min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und regelmäßig im Mikroskop darauf überprüft, ob sie sich abgelöst haben. Dies kann durch leichte Schläge gegen die Plattenränder verstärkt werden. Nach ca. 20 min sollte sich der Großteil der Zellen abgelöst haben und frei in der Lösung schwimmen.

Die Suspension wird nun mit Hilfe einer 1000 µl-Pipette vorsichtig aufgenommen und in 96-Well-V-Boden-Platten überführt. Die Wells werden nun mit FACS-Puffer aufgefüllt und für 4 min bei 1600 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird durch einmaliges, zügiges Invertieren der Platte verworfen. Die am Boden sedimentierten Zellen sollten dabei im Konus des Well-Bodens verbleiben. Es erfolgt ein weiterer Waschschrift mit 200 µl FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation. Die Zellen werden dann mit ca. 100 µl der Färbelösung resuspendiert und für 15 min bei 4 °C gefärbt.

#### **3.4.9 Intrazelluläre Färbung von phosphorylierten Proteinen**

Zur Färbung von intrazellulären phosphorylierten Proteinen werden die Zellen mit 100 % Methanol bei 4 °C für 60 min permeabilisiert und fixiert. Anschließend erfolgt die Färbung mit dem entsprechenden konjugierten Antikörper für 30 min bei ebenfalls 4 °C in FACS-Puffer.

### **3.4.10 RNA Isolation aus primären Leberzellen**

Die Aufreinigung von RNA aus primären Leberzellen wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNA XS Kit der Firma MACHERY-NAGEL durchgeführt. Dabei werden 100 µl Puffer RA1 mit 2 µl TCEP pro Well eingesetzt, um die Zellen im Well zu lysieren und RNAsen am Abbau der RNA-Fragmente zu hindern. Anschließend erfolgt die Zugabe von 5 µl Carrier RNA working solution, um eine Stabilisierung der frei gewordenen RNA-Fragmente zu erreichen. Im folgenden Schritt werden die Proben mit 100 µl 70 % Ethanol verdünnt und homogenisiert. Nun werden die mitgelieferten NucleoSpin® RNA XS Säulen in die kleinen, mitgelieferten Sammeltubes gesteckt und das Zelllysat aus dem vorherigen Schritt vorsichtig mittig auf die Membran der Säule aufgetragen und für 30 Sekunden auf 11.000 g beschleunigt. Im nächsten Schritt werden 100 µl Membrane Desalting Buffer (MDB) auf jede Säule aufgetragen und erneut bei 11.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Nun werden vorsichtig 25 µl der rDNase Reaction mixture mittig auf die Membran der Säule aufgetragen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Eluation der RNA von den Säulen folgen drei Waschschrte. Zuerst werden 100 µl Puffer RA2 dazugegeben, um die rDNase aus dem vorherigen Schritt zu deaktivieren. Nun erfolgen zwei Waschschrte mit 400 bzw. 200 µl Puffer RA3. Zwischen jedem Schritt erfolgt ein Waschschrte mit 11.000 g für 30 Sekunden. Zur finalen Eluation wird die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt und es werden 10 µl Reinstwasser mittig auf die Membran aufgetragen und bei 11.000 g für 30 Sekunden durch die Membran gespült.



### 3.4.11 Quantitative Real-Time PCR

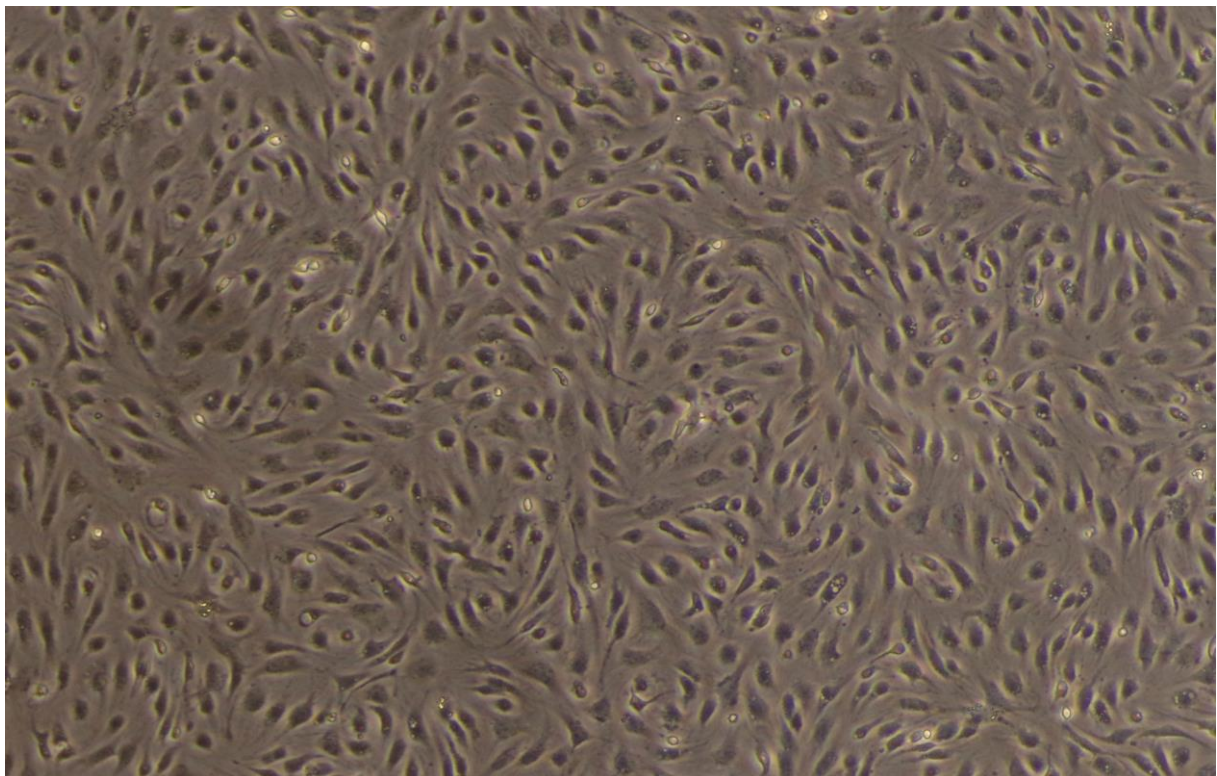
Pro qPCR werden 25 ng der cDNA eingesetzt. Es wird das Takyon No Rox SYBR Mastermix dTTP Blue Kit eingesetzt und nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Die Reaktion wird im Lightcycler 384-Well-Format durchgeführt und die relative Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich mit 18s-RNA sowie Actin-RNA-Kopien.

Reaktionsansatz	
<b>Takyon 2x Mastermix</b>	5 µL
<b>Forward-Primer (5 µM)</b>	1 µL
<b>Reverse-Primer (5 µM)</b>	1 µL
<b>DNA</b>	12,5 ng/µL
<b>PCR-reines H<sub>2</sub>O</b>	Bis 10 µL

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Sinusoidale Endothelzellen der Leber

Primäre, murine LSEC werden nach der Isolation ausplattiert. Nach einer kurzen Adhäsionsphase werden Zellen, die die Isolation nicht intakt überlebt haben, entfernt. Intakte Zellen werden sich dann vollständig ausbreiten. Wenn LSEC sich mit einer ausreichenden Zelldichte in der Zellkulturplatte ausgebreitet haben, entsteht bei Betrachtung durch ein Licht-Mikroskop ein gleichmäßiges „Pflasterstein“-Muster. Kontaminationen durch andere lebertypische Zellarten lassen sich dabei in der Regel sehr gut aufgrund ihres distinkt unterschiedlichen Aussehens identifizieren.



**Abbildung 3: Durchlichtmikroskopische Aufnahme einer konfluenten LSEC Zellkultur.** Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $8 \times 10^5$  in einer 24-Well-Zellkultur Platte ausplattiert. Nach 4h wurden dann nicht-adhärerte Zellen durch einen Mediumwechsel entfernt. Nach einer weiteren Ruheperiode von 24 h hat die LSEC-Kultur ihr charakteristisches „Pflasterstein“-Aussehen erreicht.

Neben ihrer phänotypischen Erscheinung besitzen LSEC eine Vielzahl verschiedener Oberflächenmoleküle, die zur Ausübung ihrer Funktionen von tragender Bedeutung sind. Durchflusszytometrisch bedeutsam sind dabei die Oberflächenmoleküle VCAM-1<sup>29</sup> (CD149), ICAM-1<sup>30</sup> (CD54) sowie PECAM-1<sup>31</sup> (CD31) (Poisson et al. 2017). Die

<sup>29</sup> Engl.: Vascular cell adhesion protein 1

<sup>30</sup> Engl.: Intercellular Adhesion Molecule 1

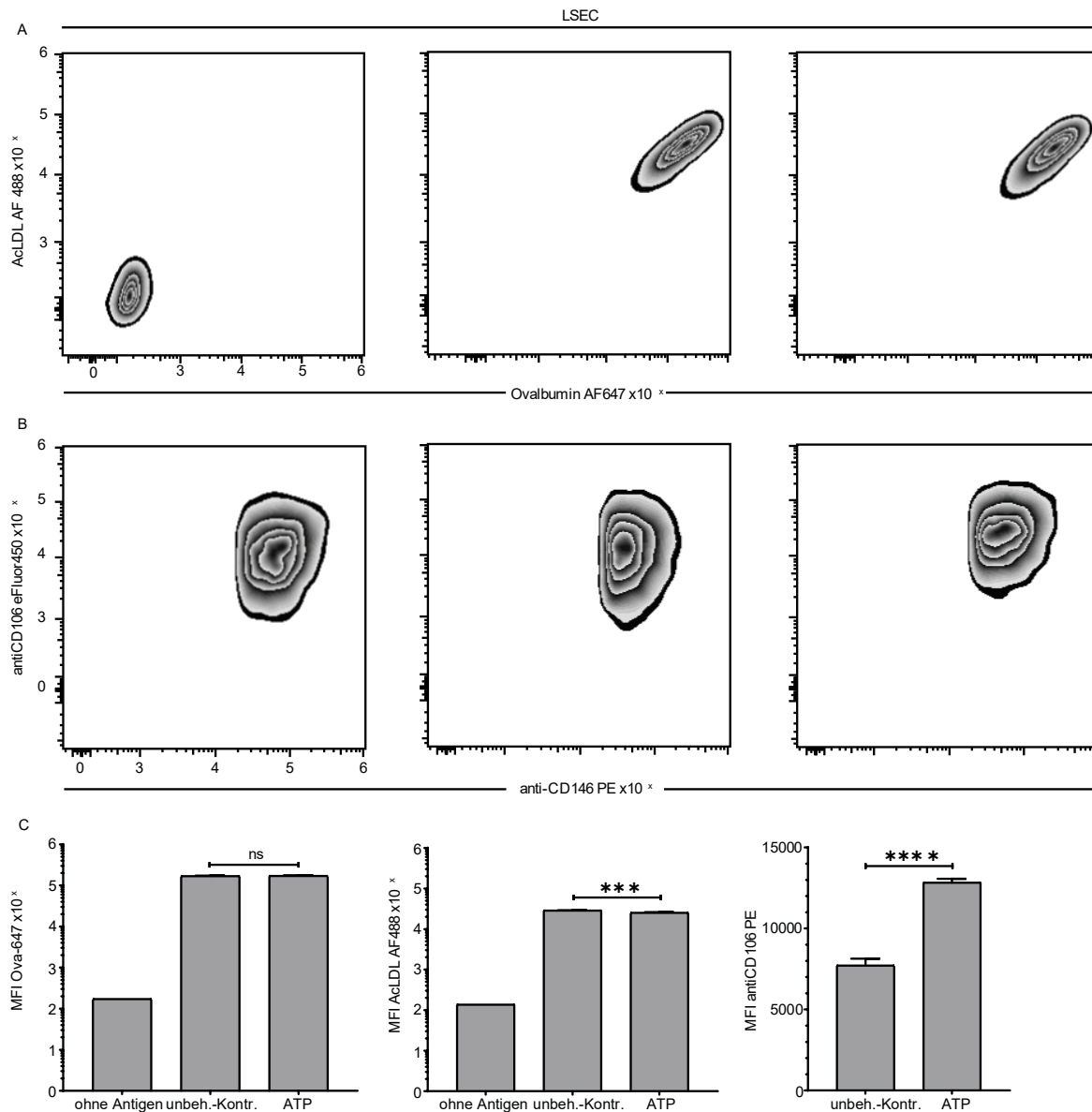
Isolation von primären LSEC wird dabei mit Hilfe von antiCD146 Antikörpern, welche an winzige, magnetische Körper gebunden sind, durchgeführt. Das Oberflächenmolekül CD106 wird in der Literatur als Aktivierungsmarker für LSEC beschrieben und erlaubt eine Aussage über eine mögliche Aktivierung, welche z.B. durch LPS herbeigeführt werden kann. Die durchlichtmikroskopische Analyse der LSEC-Zellkulturen wird dabei routinemäßig durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Kultur keine anderen Zelltypen beinhaltet.

---

<sup>31</sup> Engl.: Platelet endothelial cell adhesion molecule

## 4.2 LSEC als Sensoren für Leberschäden

### 4.2.1 Scavenging von acLDL und OVA sowie die durchflusszytometrische Analyse der LSEC -Aktivierung



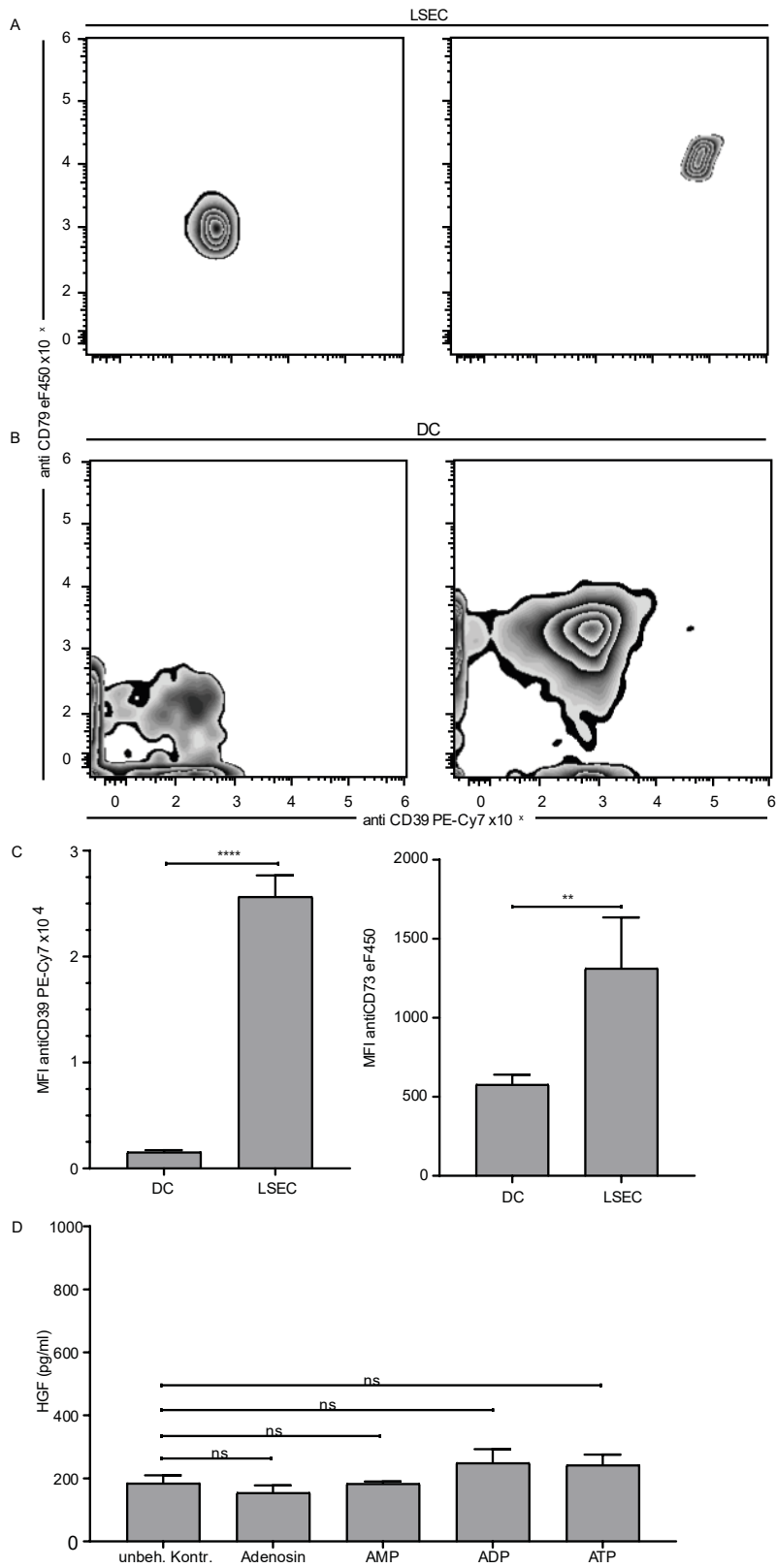
**Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analyse der Scavenger Funktion von LSECs.** Primäre, *in vitro* kultivierte CD146+ LSEC wurden mit 10 nM ATP inkubiert. (A) Fluoreszenzsignale der LSEC ohne acLDL-AF488 (5 µg/ml) oder Ova-AF647 (5 µg/ml), unstimulierte, für 10 Minuten inkubierte mit acLDL-AF488 und Ova-AF647 markierte LSEC. Rechts befinden sich LSEC, welche vor der Inkubation mit acLDL und Ova für 24 Stunden mit 10 nM ATP stimuliert wurden. (B) Analyse der MFI<sup>32</sup> der LSEC-Aktivierung durch Färbung mit antiCD106 eFluor450 und Reinheitsanalyse durch Färbung mit antiCD146 PE. Erstes Panel (v.l.) ohne acLDL-AF488 oder Ova-AF647, mittig eine unstimulierte LSEC-Kultur und rechts nach der Stimulation mit 10 nM ATP für 24 Stunden. (C) Quantifizierung der acLDL-AF488 und Ova-AF647 Aufnahme, sowie die Quantifizierung des Aktivierungsmarkers CD106. Ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$  ist gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde mittels unpaired t-tests ermittelt \*  $p < 0.05$

<sup>32</sup> Engl: Mean Fluorescence Intensity

LSEC besitzen eine Vielzahl verschiedener Scavenging-Rezeptoren und eine außergewöhnlich hohe endozytotische Kapazität, die es ihnen erlaubt, verschiedenste Makromoleküle aus dem Blut aufzunehmen (Sorensen et al. 2015; Elvevold, Smedsrod, and Martinez 2008). Die Analyse der Scavenging-Kapazität wird dabei durch die Aufnahme von Ovalbumin über den Mannose-Rezeptor sowie durch die Aufnahme von acetyliertem LDL durch die Stabilin-1 und Stabilin-2 Scavenging-Rezeptoren gemessen. Des Weiteren können LSEC durchflusszytometrisch auf die Expressionsstärke des Aktivierungsmarker VCAM-1 hin untersucht werden (Bartneck et al. 2015). Das Oberflächenmolekül VCAM-1 wird in einer Vielzahl von Situationen, bei denen es zu LSEC-Aktivierung kommt, verstärkt exprimiert und wird als Aktivierungsmarker genutzt.

Im Falle eines Leberschadens ist davon auszugehen, dass durch die absterbenden Hepatocyten DAMPs freigesetzt werden (Yang and Tonnesseen 2019). Die DAMPs können nun durch LSEC mit Hilfe ihrer Scavenging-Funktion aufgenommen werden. Wir kamen also zu dem Schluss, dass DAMPs einen möglichen Einfluss auf die Scavenging-Aktivität von LSEC haben könnten. Daher analysierten wir in 4.2.1 die endozytotische Aufnahmekapazität mit Hilfe von Ovalbumin und acLDL in Abbildung 2 A) sowie den Aktivierungszustand der LSEC in Abbildung 2 B) im Falle einer Stimulation durch extrazelluläres Adenosin-Tri-Phosphat (ATP), welches ein potentes DAMP darstellt. Trotz der in Abbildung 2 C deutlich sichtbaren Aktivierung der LSEC durch die erhöhte VCAM-1 Expression verändert sich das Aufnahmeverhalten von Ovalbumin sowie acLDL nur unwesentlich. Dies legt nahe, dass die Scavenging-Funktion der LSEC im Rahmen einer Aktivierung oder einer DAMP-Signalkaskade nur unwesentlich moduliert wird. ATP ist ein Derivat der Purinbase Adenosin und bildet zusammen mit dieser und den beiden Derivaten Adenosin-Di-Phosphat (ADP) und Adenosin-Mono-Phosphat (AMP) die Liganden der Purin-Signalkaskade. Zur weiteren Analyse einer möglichen Interaktion zwischen der Scavenging-Funktion und der Purin-Signalkaskade analysierten wir in Abbildung 3, ob LSECs die für die Prozessierung von ATP notwendigen Ecto- und Endonukleosidasen auf ihrer Oberfläche exprimieren.

## 4.2.2 Oberflächen-Ectonucleosidasen zum Abbau von ATP und Einfluss auf HGF-Produktion



**Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächennucleosidasen CD39 sowie CD73 von *in vitro* kultivierten CD146<sup>+</sup> LSECs und CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs. (A) Die beiden Nucleosidasen CD39 sowie CD73 auf der Oberfläche von LSECs im Vergleich zu ungefärbten LSEC. (B) Durchflusszytometrische Analyse isolierter**

*CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> DCs auf die Oberflächenmoleküle CD39 sowie CD73 im direkten Vergleich zwischen ungefärbten und gefärbten Proben. (C) Quantifizierung der MFI-Werte auf Basis der durchflusszytometrischen Messungen (D) ELISA-basierte Quantifizierung der HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand einer LSEC-Kultur nach einer 24-stündigen Stimulation mit ATP (10 nM), ADP (10 nM), AMP (10 nM) sowie Adenosin (10 nM), die durch die Nucleosidasen CD39 und CD73 freigesetzt werden. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$ . Die statistische Signifikanz wurde mittels unpaired t-tests ermittelt \*  $p < 0.05$  (C, D)*

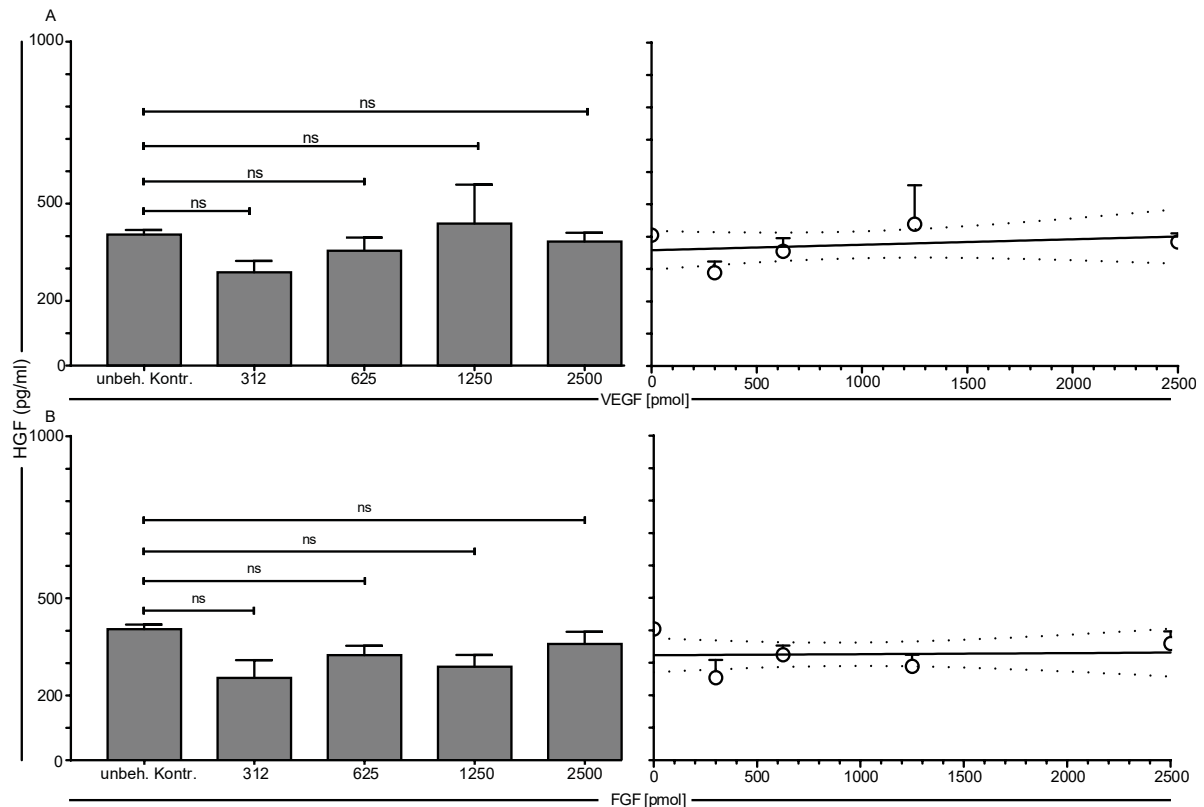
In Abbildung 2 konnten wir zeigen, dass LSEC in der Lage sind, Purin-Signale in Form von ATP zu erkennen und dadurch aktiviert zu werden. Dies wurde aus der Erhöhung der CD106-Expression ersichtlich. Die weitere Prozessierung von ATP im extrazellulären Raum ist dabei jedoch ein Aspekt, der berücksichtigt werden muss. Um ATP im Rahmen der Purin-Signalwege weiter zu verarbeiten, sind zwei membrangebundene Hydrolasen notwendig.

Dabei handelt es sich um die ENTPD-1<sup>33</sup> (CD39) sowie um die ecto-5'-nucleotidase (NT5E, CD79). Beide Moleküle sind membranverankerte Hydrolasen bzw. Nucleotidasen und spalten extrazellulär auftretendes ATP zu ADP und in einem weiteren Schritt zu AMP. Danach übernimmt CD79 den letzten Schritt der Phosphatabspaltung, an deren Ende dann die reine Purinbase Adenosin steht (Vaughn, Robson, and Burnstock 2012; Antonioli et al. 2013; Yoshida et al. 2015). Die Verarbeitung von Purin-Signalen ist komplex, und jedes Purin-Derivat kann dabei registriert werden und zu einer unterschiedlichen Signalkaskade im Inneren der Zielzelle führen (Eltzschig, Sitkovsky, and Robson 2012). In Abbildung 3 A können wir durchflusszytometrisch zeigen, dass LSEC beide Ectonucleosidasen auf ihrer Oberfläche tragen. Wir vergleichen dazu die MFI von CD39 und CD73 auf der Oberfläche von LSEC und DCs. In Abbildung 3 B sehen wir, dass DCs ebenfalls ein Signal für CD39 und CD73 exprimieren. Die Quantifizierung der MFI-Signale im direkten Vergleich zwischen DCs und LSEC in Abbildung 3 C zeigt jedoch, dass CD39 und CD73 signifikant stärker auf der Oberfläche der LSEC gemessen werden können. Wir können daher davon ausgehen, dass LSEC, die in Kontakt mit extrazellulärem ATP kommen, dieses weiterprozessieren und so möglicherweise durch die Derivate ADP, AMP und Adenosin Signale erhalten, die für die Produktion von HGF notwendig sein könnten. Daher quantifizierten wir in Abbildung 3D die Gesamtproteinmenge von HGF im Überstand einer LSEC Kultur, welche mit ATP, ADP, AMP und Adenosin stimuliert wurden. Dabei können wir sehen, dass ATP und seine Abbauprodukte keinen Einfluss auf die Akkumulation von HGF im Überstand der Kultur haben.

---

<sup>33</sup> Engl.: Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1

#### 4.2.3 Einfluss der Wachstumshormone VEGF und FGF auf die Produktion von HGF



**Abbildung 6: Lösliche Regenerationsmediatoren wie VEGF und FGF-2 haben keinen Einfluss auf die Produktion von HGF durch LSEC.** ELISA-basierter Nachweis von HGF im Zellkulturüberstand primärer CD146<sup>+</sup> LSEC-Kulturen. (A) HGF-Gesamtproteinmengen im Überstand einer LSEC-Kultur nach der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen VEGF für 24 Stunden. (B) Die Stimulation erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen FGF für 24 Stunden. Die Balkendiagramme zeigen die HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand der LSEC-Kulturen (A,B). Die Punktdiagramme (A,B) bilden die Grundlage für eine Lineare Regressionsanalyse zur Feststellung einer Dosis-Konzentrations-Beziehung zwischen der Stimulation mit VEGF (A) bzw. FGF-2 (B) und der Nachweisbarkeit der HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand der LSEC-Kultur. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$ . Die statistische Signifikanz wurde mittels unpaired t-tests der Regressionsgrade ermittelt \*  $p < 0.05$

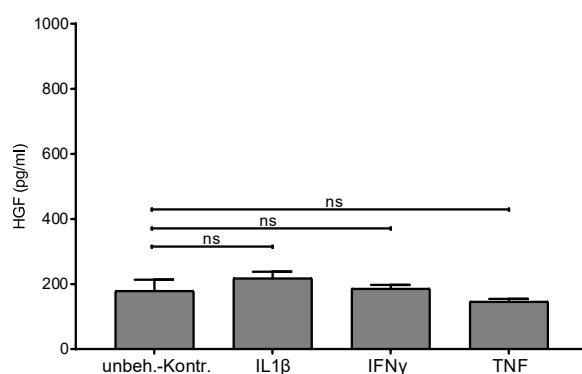
Obwohl VEGF ein potenter Wachstumsfaktor mit bekannter Verbindung zur Leberregeneration ist (Bockhorn et al. 2007; Abu Rmilah et al. 2019), ist seine Signalkaskade über den VEGF-Rezeptor 1 (LeCouter et al. 2003) nicht in der Lage, die Produktion von HGF durch LSEC anzuregen. Vielmehr entfaltet es seine Wirkung erst in späteren Phasen der Leberregeneration, wenn es um die Reetablierung der vaskulären Mikrostrukturen der Leber geht (Abu Rmilah et al. 2019). Die Gruppe der FGF-Wachstumsfaktoren ist mit sechs Untergruppen überaus umfangreich (Ornitz and Itoh 2015). Dabei ist besonders die Gruppe FGF1/FGF2 bei der Leberregeneration von Bedeutung (Valizadeh et al. 2019). Vergleichbar mit VEGF ist auch FGF bekannt für seine Fähigkeit zur Induktion von Leberregeneration (Itoh, Nakayama, and Konishi 2016; Ding et al. 2014).



Daher analysierten wir in Abbildung 4 A, ob eine Stimulation mit VEGF einen Einfluss auf die HGF-Produktion von LSEC hat. Dazu nutzen wir eine dosis-kinetische Analyse, um eine große Konzentrationsbandbreite zu überprüfen. Die anschließende Regressionsanalyse der HGF-Werte in Kombination mit einem unpaired t-Test konnte keinen signifikanten Unterschied der Steigung der Regressionsgrade im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen feststellen. Wir konnten daher ausschließen, dass VEGF einen HGF-induzierenden Einfluss auf LSEC-Zellkulturen hat. In Abbildung 4 B wurden nach derselben Methode LSEC-Zellkulturen in verschiedenen Konzentrationen mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 behandelt. Auch hier konnten die eingesetzten FGF-2-Konzentrationen keinen nachweisbaren Einfluss auf die HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand einer LSEC-Kultur ausüben. Selbst unphysiologisch hohe Konzentrationen von FGF oder VEGF scheinen dabei keine Reaktion hervorzurufen. VEGF und FGF sind bekannte Moleküle, für die es eine Vielzahl von Belegen zu ihrer Rolle während der Leberregeneration gibt. Dennoch haben sie keinen Einfluss auf die Produktion von HGF, was nahelegt, dass beide als Signale zur Verstärkung der HGF-Produktion nicht funktionieren.

### 4.3 LSEC-Stimulation durch Mediatoren des Immunsystems

#### 4.3.1 Einfluss von Zytokinen auf die Produktion von HGF durch LSECs



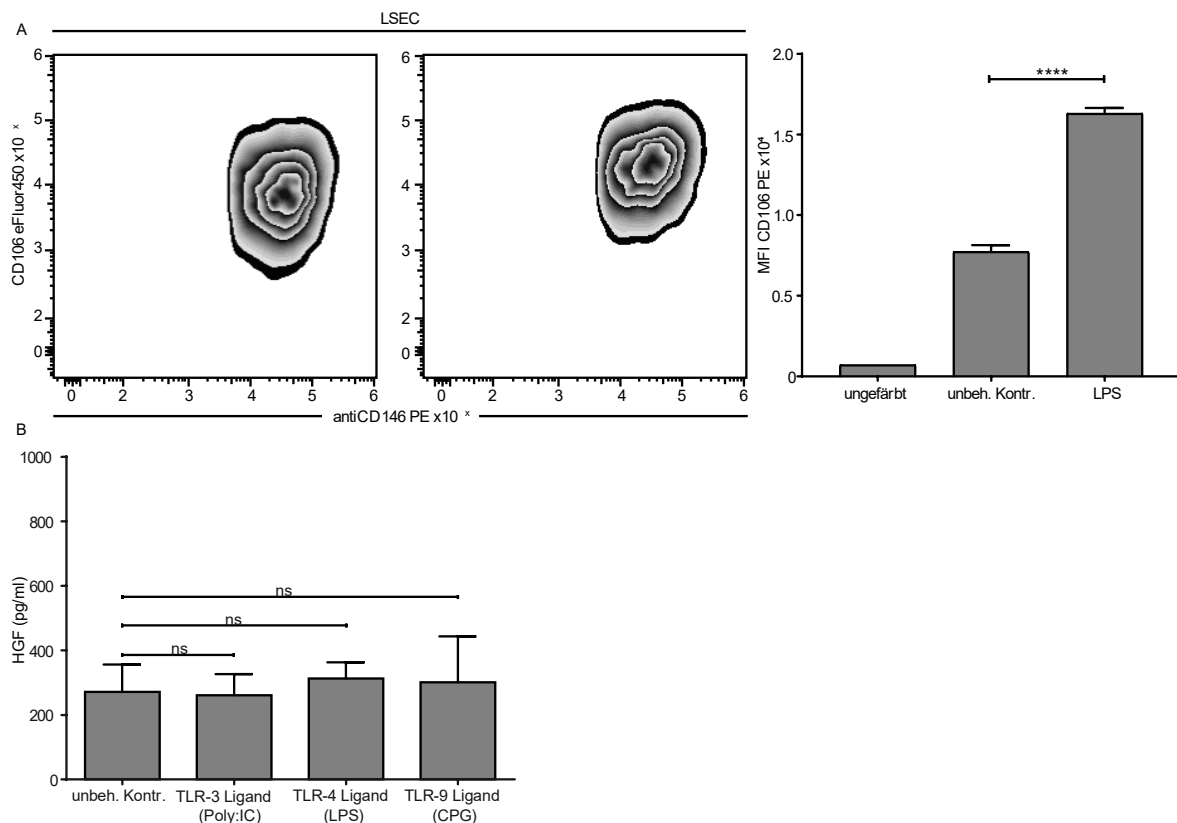
**Abbildung 7: Lösliche proinflammatorische Mediatoren haben keinen Einfluss auf die Produktion von HGF durch LSEC.** ELISA-basierter Nachweis von HGF im Zellkulturüberstand primärer CD146+ LSEC-Kulturen. Die Stimulation mit IL1β (5 ng/ml), IFNγ (5 ng/ml) bzw. TNF (5 ng/ml) erfolgte für 24 Stunden. Zu sehen ist die HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand der LSEC-Kultur. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$ . Die statistische Signifikanz wurde mittels einer einseitigen ANOVA-Analyse ermittelt \*  $p < 0.05$

Schäden der Leber können im Organismus nicht nur durch Vergiftungen wie z.B. durch APAP entstehen, sondern auch im Rahmen einer Aktivierung des Immunsystems.

LSECs sind neben ihrer bedeutsamen Scavenging-Funktion von Makromolekülen für ihre Fähigkeiten zur lokalen Modulation des Immunsystems bekannt (Sorensen et al. 2015; Kubes and Jenne 2018). Dabei übernehmen LSECs die Funktion einer APC, bei der LSECs Makromoleküle aus dem Blutstrom aufnehmen und mit Hilfe von MHC-I direkt den passierenden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen präsentieren (Limmer et al. 2000; Knolle and Limmer 2003). Im Gegensatz zu anderen im Körper vorkommenden APCs wie Makrophagen, B-Zellen oder dendritischen Zellen erzeugen LSECs eine distinkt unterschiedliche Reaktion der T-Zellen. Im Falle einer Aktivierung durch LSECs neigen die T-Zellen zu einer antigen-toleranten Reaktion (Knolle and Limmer 2003), welche allerdings durch hohe Antigenlasten und andere Signale modifiziert werden kann (Schurich et al. 2010).

Daher war es notwendig, zu analysieren, ob LSECs durch pro-inflammatorische Signale wie TNF, IL1 $\beta$  oder IFN $\gamma$  mit einer vermehrten Ausschüttung von HGF antworten. Diese Signale spielen eine wichtige Rolle, wenn z.B. durch eine Virus-Infektion das Immunsystem aktiviert worden ist. Im Falle einer Hepatitis-B-Infektion werden überwiegend Hepatozyten durch den Virus infiziert. Aktivierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen können dann z.B. TNF freisetzen und die TNFR-1 abhängige Apoptose der infizierten Hepatozyten einleiten (Wohlleber and Knolle 2016; Sinay Rabbany ; Del Campo, Gallego, and Grande 2018; Rabbany and Rafii 2018). IFN $\gamma$  wird im Falle einer viralen Hepatitis überwiegend durch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zur Verfügung gestellt (Wang et al. 2020). Des Weiteren können Makrophagen, die in der Leber angesiedelt sind, im Falle einer Infektion und Entzündungsreaktion IL1 $\beta$  in das umgebende Gewebe freisetzen (Del Campo, Gallego, and Grande 2018). In all diesen Fällen ist ein großer Verlust an Hepatozyten zu beobachten, und die Leberregeneration muss initiiert werden, um dies zu kompensieren. Aus diesem Grund analysierten wir in Abbildung 5 die HGF-Gesamtproteinmenge nach einer 24-stündigen Inkubation. Wir können dabei sehen, dass keines der von uns zur Stimulation genutzten Zytokine einen Einfluss auf die Expression von HGF durch die LSEC-Zellkultur hat.

### 4.3.2 Einfluss von TLR-Signalen auf die Produktion von HGF durch LSEC



**Abbildung 8: Exogenes LPS aktiviert LSEC. Signale, die über Liganden der TLR-3, -4 oder -9-Rezeptoren prozessiert werden, haben keinen Einfluss auf die Produktion von HGF durch LSEC-Kulturen.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der Aktivierung von LSEC nach 24-stündiger Stimulation mit 1 ng/ml LPS zeigt eine Erhöhung des CD106-Signals auf der LSEC-Oberfläche. Die Auswertung der MFI-Daten wird dabei als Quantifizierung des Aktivitätszustands der LSEC interpretiert. (B) ELISA-basierter Nachweis von HGF im Zellkulturüberstand primärer CD146<sup>+</sup> LSEC-Kulturen. Die Stimulation der unterschiedlichen TLR-Liganden Poly:IC (1 ng/ml), LPS (1 ng/ml) sowie CPG (1 ng/ml) erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$ . Die statistische Signifikanz wurde mittels unpaired t-tests ermittelt \*  $p < 0.05$ .

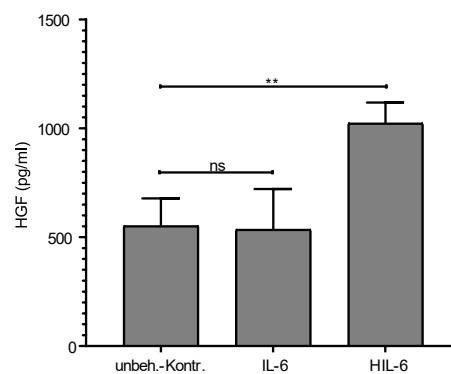
Blut aus der Portalvene erreicht die Leber nach seiner Passage durch den Darmtrakt. Dabei kann es vorkommen, dass PAMPs mikrobiellen Ursprungs aus dem Darmtrakt in die Leber transportiert werden.

Dabei ist LPS über den TLR-4-Signalweg ein wichtiges immunologisches Signal, das in der Regel das Vorhandensein von Bakterien anzeigt. Diese Tatsache war die Grundlage dafür, dass wir in Abbildung 6 analysieren, inwieweit LPS LSECs stimulieren kann. Abbildung 6 A zeigt die sichtbare Veränderung der LSEC-Aktivierung im Dot-Plot, in dem die ausgewählte LSEC-Population als Reaktion auf den LPS-Stimulus eine Rechtsverschiebung aufweist und damit eine Erhöhung des VCAM-1 Oberflächenmoleküls belegt. Die in Abbildung 6 A durchflusszytometrisch analysierte LSEC-Zellkultur wurde dabei auf vitale, CD146<sup>+</sup> LSEC gated. Die Quantifizierung der MFI-Werte von CD106 zeigte, dass das CD106-Signal nach 24 Stunden Stimulation mit LPS signifikant erhöht ist.

Die Aktivierungsreaktion der LSECs führte uns zu der Hypothese, dass LSECs im Falle eines LPS-Stimulus mit der Produktion von HGF reagieren könnten, um das Wachstumshormon als Antwort auf eine mögliche Schädigung der Leber durch eine LPS-induzierte Immunantwort freizusetzen. Daher nutzen wir in Abbildung 6 B erneut einen ELISA zur Bestimmung der HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand der LSEC-Kultur. LSECs exprimieren mehrere Toll-Like-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Chen and Sun 2011). Daher wurden separate LSEC-Kulturen ebenfalls mit Poly:IC, einem TLR-3 Liganden, sowie CPG, einem TLR-9 Liganden, für 24 Stunden behandelt und die daraus resultierenden Überstände in Abbildung 6 B analysiert. Keiner der von uns getesteten TLR-Liganden war dabei in der Lage, die HGF-Produktion einer *in vitro* LSEC-Kultur zu stimulieren.

#### 4.4 LSECs bei der Interaktion mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

##### 4.4.1 IL-6-transsignaling führt zu einer erhöhten HGF-Gesamtproteinmenge in LSEC-Überstand

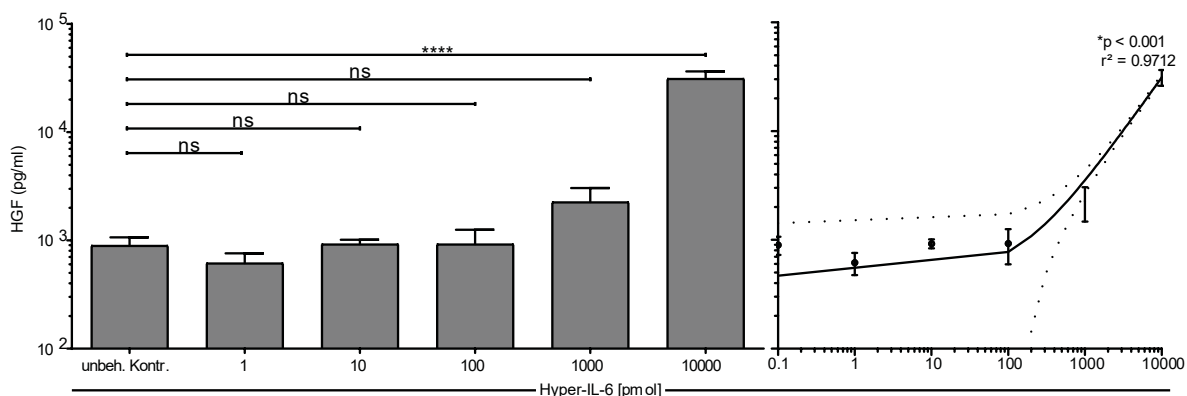


**Abbildung 9:** Stimulation mit IL-6-transsignalling führt zu einer erhöhten Produktion von HGF. ELISA-basierter Nachweis der Gesamt-HGF-Menge im Überstand einer primären LSEC-Zellkultur. Die Kulturen wurden mit jeweils IL-6 (10 nM) oder Hyper-IL-6 (10 nMol) für 24 Stunden stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$ . Die statistische Signifikanz wurde mittels unpaired t-tests ermittelt \*  $p < 0.05$ .

LSECs sind als Zellen des Immunsystems in der Leber über die MHC-I und II in der Lage Antigene, zu präsentieren und in Interaktion mit T-Zellen zu treten (Limmer et al. 2000; Knolle and Limmer 2003). Im Kontext eines immunsystembedingten Leberschadens kommt es zwischen LSECs und zu aktivierenden T-Zellen zu einer Kreuzpräsentation des Antigens sowie zu einer IL-6-Signalkaskade. Dieser als „Crosstalk“ bezeichnete Effekt wird durch das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 imitiert. Dabei kommt es zu einer Aktivierung der STAT3-Signalkaskade (Limmer et al. 2005), während die Signalprozessierung nicht mehr durch das kanonische, sondern durch

das IL-6-transsignaling durchgeführt wird (Bottcher et al. 2014; Rose-John 2012). Daher analysierten wir, ob kanonisches IL-6-signaling oder IL-6 transsignaling einen Einfluss auf die HGF-Verfügbarkeit im Überstand von LSEC-Kulturen haben kann. Dazu analysierten wir in Abbildung 7 die HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand einer LSEC-Kultur während einer Stimulation mit IL-6, also nach der Stimulation des kanonischen IL-6-Signalweges, sowie während einer Stimulation durch Hyper-IL-6 (HIL-6), ein Designerzytokin, welches IL-6-transsignaling für LSECs imitiert (Rose-John 2012). Wir konnten dabei feststellen, dass IL-6 zu keiner nennenswerten Erhöhung der HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand führt. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation mit HIL-6 zu einer nachweisbaren, signifikanten Erhöhung von HGF im Überstand. Dieser wichtige Befund überzeugte uns, dass IL-6 und HIL-6-Signalwege zu unterschiedlichen Reaktionen der LSECs im Kontext eines immunsysteminduzierten Leberschadens beitragen.

#### 4.4.2 Die Produktion von HGF reagiert dosisabhängig auf IL-6-transsignaling

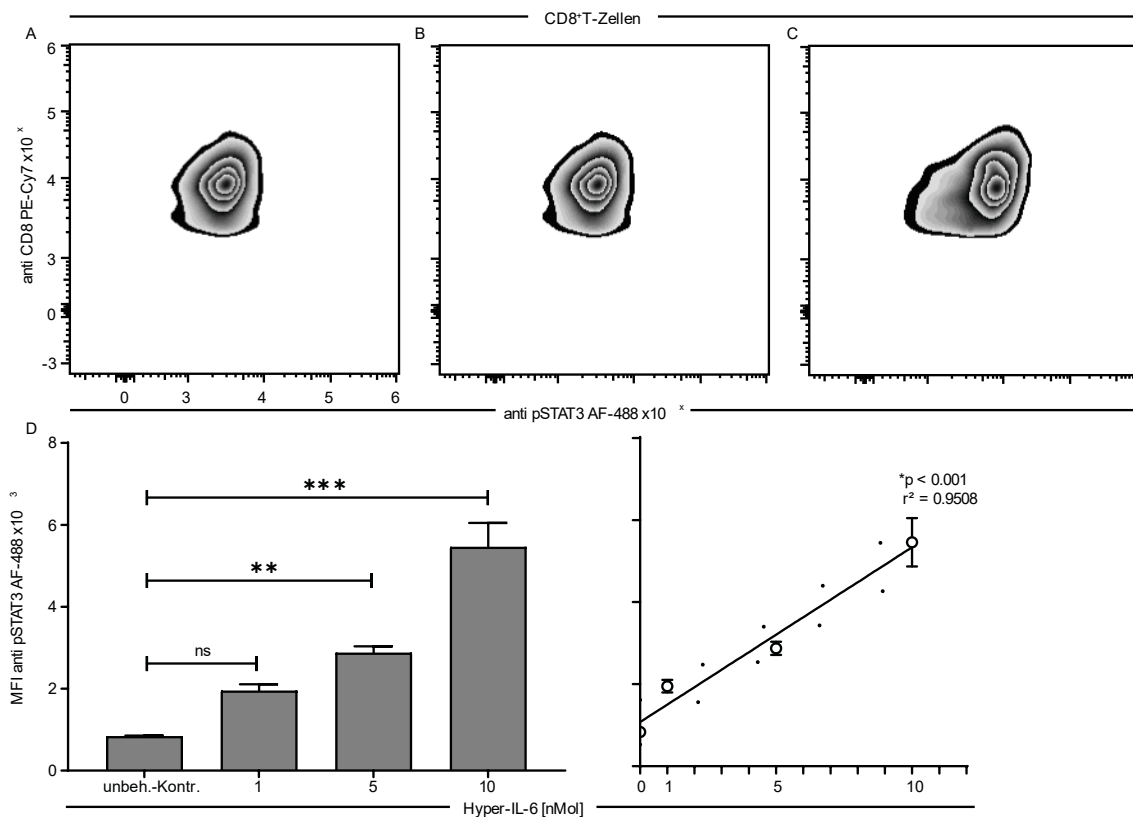


**Abbildung 10: Die Erhöhung der HGF-Produktion durch LSECs bei IL-6-transsignaling reagiert dosisabhängig.** ELISA-basierter Nachweis der Gesamt-HGF-Menge im Überstand einer primären LSEC-Zellkultur. Die Kulturen wurden mit den jeweils angegebenen Mengen Hyper-IL-6 für 24 Stunden stimuliert. Das Punktdiagramm bildet die Grundlage für eine Lineare Regressionsanalyse zur Feststellung einer Dosis-Konzentrations-Beziehung zwischen der Stimulation mit Hyper-IL-6 und der Nachweisbarkeit von HGF im Überstand der Kultur. Sie zeigt eine signifikante Veränderung der Geradensteigung mit  $*p < 0.001$ . Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$ . Die statistische Signifikanz wurde mittels einer einseitigen ANOVA-Analyse  $*p < 0.05$  ermittelt.

Nachdem wir in 4.4.1 Abbildung 7 zeigen konnten, dass die Stimulation von LSECs durch IL-6-transsignaling zu einer Zunahme von HGF im Überstand der Zellkultur führt, entschlossen wir uns in 4.4.2 Abbildung 8, zu überprüfen, ob es sich bei der Produktion von HGF durch LSECs um ein dosisabhängiges Phänomen handelt. Dazu behandelten wir die LSEC-Zellkultur mit ansteigenden Konzentrationen von HIL-6 und nutzten unseren ELISA-basierten HGF-Assay.

Die Analyse der Daten zeigt, dass ab einer Konzentration von ca. 1000 nM die Menge an nachweisbarem HGF ansteigt. Bei der Stimulation mit 1000 nM (entspricht ca. 1 ng/ml) übersteigt die erhöhte HGF-Menge allerdings noch keine Signifikanzschwelle. Erst ab ca. 10000 nM steigt die HGF-Menge sprunghaft an und erreicht bis zu 30n/ml mit einem p-Wert <0,0001. Diese Daten indizieren, dass LSECs durch ein ausreichend starkes Signal zur Produktion von HGF angeregt werden können. Dies deutet darauf hin, dass LSECs im Rahmen ihrer immun-modulatorischen Funktion als APC CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ein Antigen präsentieren und so zu einer Aktivierung der T-Zellen beitragen. Im selben Moment scheint der stattfindende Crosstalk ebenfalls Signalkaskaden auf der LSEC-Seite auszulösen. Um die Signifikanz der Dosisabhängigkeit nachzuweisen, führten wir eine Regressionsanalyse mit anschließendem t-Test durch. Dieser belegt, dass die Zunahme der HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand einer LSEC-Zellkultur dosisabhängig auf HIL-6-Stimulation reagiert.

#### 4.4.3 IL-6-transignalling führt zu Phosphorylierung von STAT3



**Abbildung 11: Stimulation mit Hyper-IL-6 führt zur Phosphorylierung des STAT3-Signalweges.** Durchflusszytometrische Analyse muriner CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Überprüfung der Stimulierungsfähigkeit des STAT3-Signalweges durch die Gabe von Hyper-IL-6. (A) ungefärbte Probe zur Etablierung der Färbung. (B) Unstimulierte

*CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigen bereits eine begrenzte Aktivierung des STAT3-Signalwegs. (C) Die Stimulation mit Hyper-IL-6 (10 nM) erfolgte für 1 Stunde. (D) Quantitative Analyse des MFI durch die Phosphorylierung von STAT3. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitige ANOVA-Tests ermittelt \*  $p < 0.05$ . Zusätzlich wurde eine Lineare Regressionsanalyse der Dosis-Konzentrationsbeziehung zwischen Hyper-IL-6 und der Phosphorylierung von STAT3 durchgeführt und ist gemäß einer einseitigen ANOVA-Analyse \* $p < 0.005$  signifikant.*

Die Stimulation durch HIL-6 wird in der Zelle über die Phosphorylierung von STAT3<sup>34</sup> prozessiert (Fischer et al. 1997; Rose-John 2012). Das Zytokine IL-6 ist ein wichtiges Signalmolekül in vielen Bereichen des Immunsystems (Hunter and Jones 2017). Auch bei der Stimulation durch HIL-6 erfolgt in der Regel eine Signalweiterleitung über den IL-6-Rezeptor. Dieser Rezeptor muss nach der Bindung von IL-6 mit dem membrangebundenen gp130-Adaptermolekül aggregieren, um die Signaltransduktion in die Zelle zu bewerkstelligen. Das Designermoleküle „Hyper-IL-6“ besteht in diesem Fall allerdings nicht nur aus dem Zytokine IL-6 selbst, sondern hat zusätzlich noch einen löslichen IL-6-Rezeptor gebunden. Dies hat zur Folge, dass ein Signal, welches durch Hyper-IL-6 vermittelt wird, stärker ist und, dass es im Rahmen von IL-6 transsignaling auch in Zellen ohne eigenen IL-6-Rezeptor verarbeitet werden kann (Fischer et al. 1997). Um die Wirksamkeit von Hyper-IL-6 zu validieren, wurden primäre CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus der murinen Milz isoliert. Anschließend wurden die T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Hyper-IL-6 für 30 Minuten behandelt. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Dazu werden viable Zellen durch eine Propidium-Iodid-Färbung erkennbar gemacht und mit einem anti-CD8-PE-Cy7 Antikörper sowie dem anti-pSTAT3-Alexa Fluor 488 Antikörper gefärbt. In Abbildung 30 A sieht man dabei, dass unstimulierte T-Zellen keine nachweisbare Phosphorylierung von STAT3 zeigen. In Abbildung 30 B wurden 500 pg/ml Hyper-IL-6 eingesetzt.

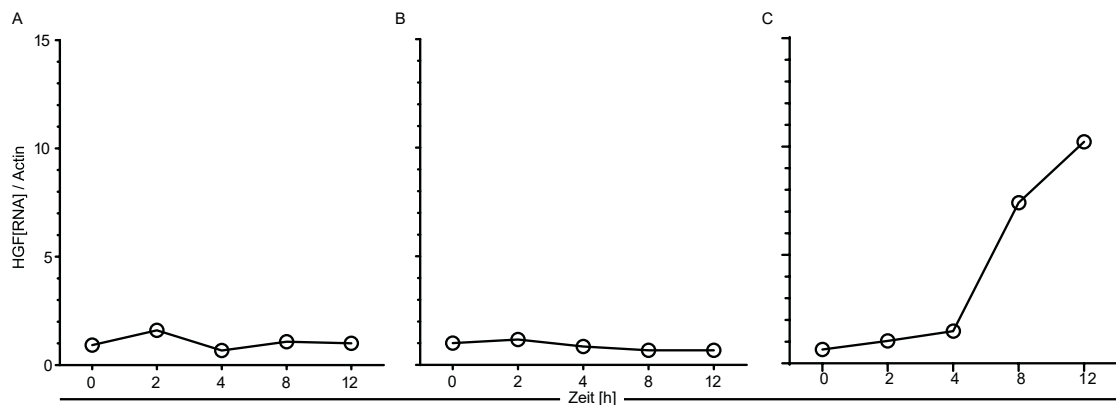
Um sicherzustellen, dass das von uns eingesetzte HIL-6 in der vorgesehenen Weise funktioniert, nutzten wir isolierte, murine CD8<sup>+</sup> T-Zellen und stimulierten sie mit HIL-6. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. In Abbildung 9 A ist eine vitale CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation zu erkennen, die allerdings nicht mit dem anti-pSTAT3-AF488-Antikörper gefärbt wurde. In Abbildung 9 B wurden T-Zellen korrekt gefärbt, aber nicht durch HIL-6 stimuliert. Abbildung 9 C zeigt ein repräsentatives Experiment einer mit 10 nM behandelten T-Zell-Population und demonstriert die Erhöhung des pSTAT3-Signals. In Abbildung 9 D ist die Quantifizierung der pSTAT3-MFI-Werte zu sehen sowie die statistische Analyse, die eine dosisabhängige Stimulation impliziert.

---

<sup>34</sup> Engl.: Signal transducer and transcription activator 3

Daher nutzten wir erneut, wie bereits in Abbildung 8, eine Regressionsanalyse mit anschließendem t-Test. Die Phosphorylierung von STAT3 durch Hyper-IL-6 ist dosisabhängig und ist ein weiterer Hinweis darauf, dass IL-6-transsignaling zu der Freisetzung von HGF durch LSECs führt, wie wir in 4.4.1 sehen konnten.

#### 4.4.4 IL-6-transsignaling induziert HGF-Produktion auf transkriptioneller Ebene



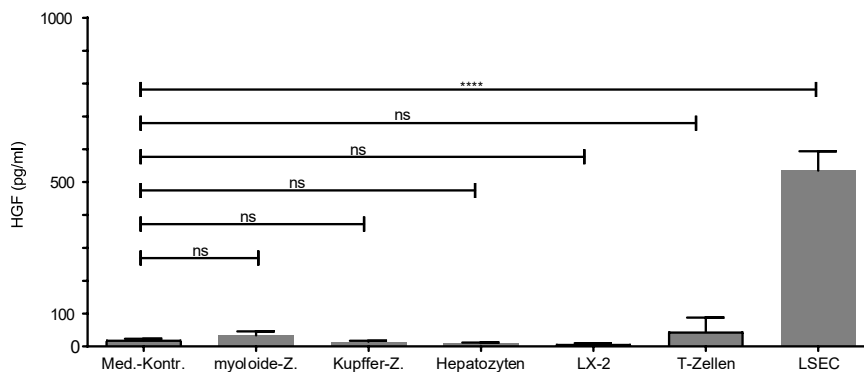
**Abbildung 12: IL-6 transsignaling erhöht die Verfügbarkeit von HGF-mRNA auf transkriptioneller Ebene.** (A, B, C) Die Isolation der HGF-mRNA erfolgte aus primären LSEC-Zellkulturen. (A) Werte der x-fachen Veränderung (fold-change) der HGF-mRNA im Verhältnis zur konstitutiv exprimierten Aktin-mRNA in einer unstimulierten LSEC-Kultur im Rahmen einer zeitkinetischen Expressions-Analyse über einen 12-stündigen Zeitraum. (B) Fold-Change der HGF-mRNA im Verhältnis zur konstitutiv exprimierten Aktin-mRNA in einer mit TNF (10 nM) stimulierten LSEC-Kultur über einen Zeitraum von 12 Stunden nach der Zugabe von TNF. (C) Fold-Change Zunahme der HGF-mRNA nach der Stimulation mit Hyper-IL-6 (10nM) im Verlauf der ersten 12 Stunden nach Beginn der Stimulation.

Nachdem wir in 4.4.1 sehen konnten, dass Hyper-IL-6 zu einer Zunahme von HGF im Überstand der LSEC-Kultur führte, konnten wir in 4.4.2 zeigen, dass diese Zunahme dosisabhängig zur Konzentration von Hyper-IL-6 ist und in 4.4.3, dass die Stimulation mit Hyper-IL-6 zu einer Phosphorylierung von STAT3 führt. Daraufhin haben wir in 4.4.4 untersucht, ob sich die Stimulation durch Hyper-IL-6 auch auf transkriptioneller Ebene auswirkt. Dazu isolierten wir die RNA von LSEC-Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten. In Abbildung 10 berechneten wir die x-Fache Veränderung der HGF-mRNA im Vergleich zur konstitutiv exprimierten Aktin-mRNA. In Abbildung 10 A sehen wir die Expression von HGF in einer unstimulierten LSEC-Kultur. In Abbildung 10 B wurde ein möglicher Einfluss von TNF auf die Expression von HGF der LSEC analysiert. Dabei sehen wir aber unsere Ergebnisse aus 4.3.1 Abbildung 5, nämlich dass TNF weder auf transkriptioneller noch translationaler Ebene reguliert, bestätigt. In Abbildung 10 C wurden die LSEC erneut mit 10 nM Hyper-IL-6 behandelt. Bereits zum ersten Messzeitpunkt, zwei Stunden nach dem



Beginn der Stimulation, lässt sich eine leichte Erhöhung der HGF-mRNA feststellen. Diese Steigerung setzt sich bis zum Zeitpunkt 2, 4 Stunden nach der Stimulation, fort. Der 8-Stunden-Zeitpunkt zeigt dann eine massive Erhöhung der HGF-mRNA. Die x-Fache Veränderung nach 12 Stunden hat sich weiter erhöht, beginnt allerdings abzuflachen. Wir können daher feststellen, dass LSECs auf Stimulation mit HIL-6 auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene reagieren und so mehr HGF zur Verfügung stellen.

#### 4.4.5 LSECs sind die einzige Leberzellpopulation, die konstitutiv HGF produziert



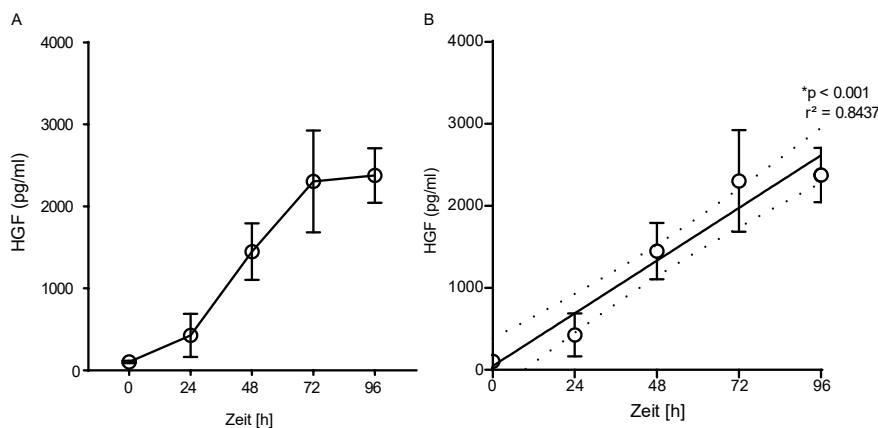
**Abbildung 13: LSECs sind die einzige Leberzellpopulation, die konstitutiv HGF produziert.** ELISA-basierte Bestimmung der HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand einer unstimulierten, primären Zellkultur aus der Leber. Nach der Isolation wurden die Zellen ohne weitere Stimulation für 24 Stunden in Kulturmedium ruhen gelassen. Med.-Kontr. ist dabei das reine Zellkulturmedium. Nach der Ruheperiode wurde die HGF-Gesamtmenge ermittelt. Von den vier analysierten primären Leberzellpopulationen wird HGF ausschließlich durch LSECs konstitutiv an das Medium abgegeben. Dies gilt ebenfalls für die LX-2-Zelllinie sowie T-Zellen. Einzig primäre LSECs produzierten signifikante Mengen HGF im Experimentalzeitraum. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$ . Die statistische Signifikanz wurde mittels unpaired t-tests ermittelt \*  $p < 0.05$ .

Obwohl HGF schon 1984 identifiziert wurde, gibt es in der Literatur immer noch eine rege Diskussion über den Ursprung von HGF in der Leber (Nakamura, Nawa, and Ichihara 1984; Michalopoulos 2014; DeLeve 2013). Dabei wurden jeder Zellpopulation in der Leber bereits HGF-produzierende Eigenschaften zugesprochen. Der genaue Ursprung bioaktiven HGFs in der Leber ist trotz seiner gravierenden Bedeutung für die Leberregeneration nur unzureichend geklärt. Wissenschaftliche Publikationen bieten für den Ursprung von HGF verschiedene Modelle. Bezeichnend ist dabei, dass die Zelltypen, die für die HGF-Produktion verantwortlich gemacht werden, sämtliche leberresidente Zellpopulationen wie Hepatozyten, Kupffer-Zellen oder gar myeloide Zellen umfassen (Abu Rmilah et al. 2019; Mao, Glorioso, and

Nyberg 2014). Erst seit Kurzem kumulieren Publikationen genug Indizien dafür, dass LSECs ebenfalls HGF produzieren. Dabei wurden aber in der Regel vor allem Modelle einer partiellen Hepatektomie eingesetzt, bei der Mäusen 50-70 % des gesunden Lebergewebes entfernt wird (Zhang et al. 2020; Rabbany and Rafii 2018). Hier muss unterschieden werden, dass bei einer partiellen Hepatektomie das verbleibende Lebergewebe nach wie vor intakt und unbeschädigt ist. Im Falle eines Schadens, der durch eine Immunantwort hervorgerufen wurde, kann diese Annahme nicht ohne Weiteres übernommen werden.

Daher analysierten wir mehrere verschiedene Leberzellpopulationen, nachdem wir zeigen konnten, dass LSECs HGF an ihren Überstand absondern und durch IL-6-transsignaling die Produktion von HGF weiter verstärkt werden kann. Der ELISA-basierte Assay zur Bestimmung der HGF-Gesamtproteinmenge wurde bei jeder der isolierten Zellkulturen nach 24 h Inkubationszeit angewendet und zeigt, dass weder Ly6C<sup>+</sup> myeloide Zellen noch Kupfferzellen noch primäre Hepatozyten innerhalb von 24 Stunden ohne Stimulation eine nachweisbare Menge HGF an ihren Überstand abgeben. Des Weiteren analysierten wir die humane Leberzelllinie LX-2, um zu überprüfen, ob eine immortalisierte Zelllinie möglicherweise nachweisbare Mengen HGF produziert, aber auch hier war kein HGF im Überstand nachweisbar. Aufgrund unserer Hypothese, dass LSECs im Rahmen einer immunologischen Interaktion mit T-Zellen HGF produzieren, überprüften wir, ob zuvor aktivierte T-Zellen HGF an ihre Umgebung abgeben. In Abbildung 11 haben wir daher die Überstände aus den verschiedenen Gruppen zu einem LSEC-konditionierten Überstand verglichen und können zeigen, dass mit Ausnahme von LSECs keine der getesteten primären oder immortalisierten Zellen eine nennenswerte Menge HGF absondern.

#### 4.4.6 Konstitutive Produktion von HGF durch LSECs



**Abbildung 14: Konstitutive Produktion von HGF durch LSECs.** (A) ELISA-basierte Bestimmung der HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand einer unstimulierten LSEC-Zellkultur. Die LSECs wurden ohne weitere Stimulation oder Medien austausch für den Experimentalzeitraum ruhen gelassen. Die Probenentnahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten und zeigt eine klare Erhöhung der HGF-Mengen im Überstand innerhalb der ersten 24 Stunden. Die HGF-Menge steigt bis zum 72-Stunden-Zeitpunkt stetig an. Nach dem 72-Stunden-Zeitpunkt verringert sich die HGF-Zunahme deutlich. (B) Einfache lineare Regressionsanalyse zur Überprüfung der Signifikanz zur HGF-Zunahme.

Nachdem wir uns bis einschließlich 4.4.4 mit der Stimulation verschiedener Signalwege in LSECs zur Produktion von bioaktivem HGF beschäftigt hatten, mussten wir in 4.4.5 feststellen, dass Signale, die wir bis dahin als unspezifische Hintergrundsignale des Assay-Systems betrachtet hatten, wohl in der Tat als quantifizierbare Messwerte betrachtet werden müssen. In Abbildung 11 konnten wir erkennen, dass ein Signal, welches im LSEC-konditionierten Überstand gemessen wird, in der Tat durch anwesendes HGF ausgelöst wird. Dies führte uns zu der Frage, ob LSECs nicht schon ohne Stimulation konstitutiv HGF produzieren und in das Medium sezernieren.

Daher begannen wir zuerst mit der Analyse von LSECs, die nach der Isolation für mehrere Tage kultiviert wurden. Abbildung 12 zeigt dabei den Verlauf von freiem HGF, welches durch ein ELISA-Assay im Überstand der LSEC-Kultur detektiert wurde. Ausgehend vom unteren Detektionslimit erkennt man dabei, dass LSECs ohne eine zusätzliche Stimulation bereits kurz nach ihrer Aussaat in einem beschränkten Maße beginnen, HGF zu produzieren. Das nachweisbare HGF akkumuliert dabei über Zeit im Überstand der LSEC-Zellkultur und indiziert, dass die konstitutive HGF-Produktion dabei nicht verändert wird. Zu späteren Zeitpunkten kommt es dabei zu keiner weiteren Steigung, dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Halbwertszeit des HGF-Proteins sowie die langsame Dedifferenzierung der LSECs zurückzuführen. Dies bedeutet, dass LSECs nicht nur durch die Stimulation

mit HIL-6 HGF produzieren, sondern auch konstitutiv. Da es sich bei HGF um ein starkes Proliferationssignal handelt, müssen wir uns daher die Frage stellen, wie ein gesundes Gewebe mit der konstitutiven Expression von HGF umgeht.

#### **4.5 Katalytische Spaltung und Aktivierung von pro-HGF durch Urokinase**

HGF wird in einer biologisch inaktiven pro-HGF-Form produziert und sezerniert (Michalopoulos 2014). Das pro-HGF kann durch die uPA katalytisch gespalten werden (Naldini et al. 1992). Die Spaltung ist ein wichtiger Schritt in der HGF-Aktivierung und notwendig für seine Bindung an den c-Met-Rezeptor, um die für die Proliferation notwendigen Signalkaskaden zu initiieren (Nakamura and Mizuno 2010). In 4.4 konnten wir zeigen, dass LSECs konstitutiv HGF produzieren und an den Überstand abgeben. Zusätzlich konnte durch die Stimulation mit HIL-6 eine weitere Zunahme der HGF-Produktion in einer dosisabhängigen Reaktion gezeigt werden. Daher entschieden wir uns im folgenden Schritt, ein System zu etablieren, um einen möglichen Einfluss der HIL-6-Stimulation auf die katalytische Aktivität der für die pro-HGF-Spaltung wichtigen Urokinase zu untersuchen.

##### **4.5.1 Die katalytische Aktivität der uPA kann im Überstand einer LSEC-Zellkultur quantifiziert und durch IL-6-transsignalling verstärkt werden**

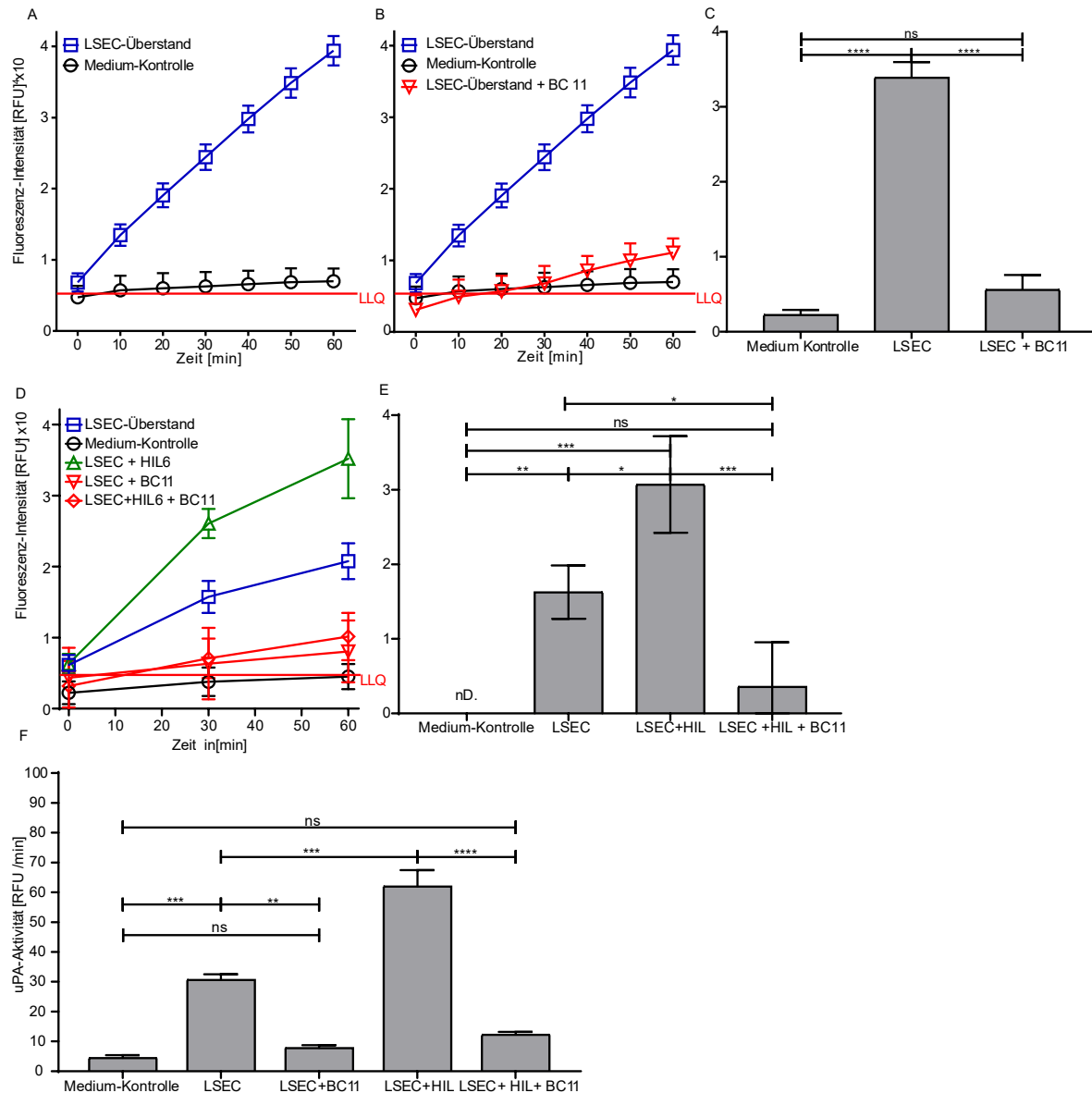
Das extrazellulär vorliegende Enzym uPA ist katalytisch aktiv. Um unsere Hypothese einer verstärkten Urokinase-Aktivität im Überstand einer LSEC-Zellkultur nach IL-6-transsignalling zu untersuchen, nutzen wir ein kommerziell erhältliches Urokinase Substrat (Urokinase Substrate III Fluorogenic Sigma # 672159), welches durch uPA gespalten werden kann. Durch die Spaltung des Substrats wird das durch eine Fluoreszenzmessung analysierbare 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) freigesetzt. Als katalytisch wirksames Enzym kann uPA durch verschiedene Moleküle inhibiert werden. Physiologisch sind dies vor allem die Plasminogen-activator Inhibitor I und II (Pai-1, Pai-2) (Watanabe et al. 2007), welche zu einer irreversiblen Inhibition der uPA führen. Wir nutzen für unsere *in vitro* Experimente den Inhibitor *BC-11 hydrobromide*

(BC11), welcher uPA spezifisch inhibiert (Semina, Rubina, Sysoeva, et al. 2016; Semina, Rubina, Stepanova, et al. 2016).

In Abbildung 13 A verglichen wir die Zunahme der Fluoreszenzaktivität des Kontrollmediums mit der Zunahme, wenn das Medium vorher für 24 Stunden durch LSECs konditioniert wurde. LSEC-konditioniertes Medium führt dabei zu einer rapiden Zunahme der Fluoreszenzintensität und unterstützt so unsere Hypothese, dass das LSEC-Medium eine Urokinase-Aktivität aufweist. In Abbildung 13 B wiederholten wir das Experiment und fügten den urokinasespezifischen Inhibitor BC-11 hinzu. Wir können sehen, dass die Zunahme der Fluoreszenz über den Messzeitraum von 1 Stunde fast vollkommen neutralisiert wurde. In Abbildung 13 C quantifizierten wir die Fluoreszenz-Messwerte nach 1 Stunde und zeigen, dass LSEC-konditioniertes Medium eine signifikant erhöhte Urokinase-Aktivität aufweist. Wenn das konditionierte Medium dann allerdings mit dem uPA-spezifischen Inhibitor BC-11 versetzt wird, erfolgt eine nahezu vollständige Inhibition der uPA-Aktivität. In Abbildung 13 D wurden LSECs nun während ihrer 24-stündigen Konditionierungszeit durch IL-6 stimuliert. Der dadurch entstandene Überstand wurde mit unserem Urokinase-Aktivitätsassay untersucht und wir können erkennen, dass IL-6-transsignalling die Urokinase-Aktivität im Überstand der LSEC-Kultur erhöht. Hier nutzten wir ebenfalls BC-11 und können erneut beobachten, wie die Zunahme der Urokinase-Aktivität nahezu komplett inhibiert wird. In Abbildung 13 E nutzten wir einen einseitigen ANOVA zur Prüfung der Signifikanz. Auch hier bestätigt sich unsere Hypothese, dass IL-6-transsignalling die Urokinase-Aktivität im Überstand der LSEC-Kultur erhöht. Um eine Quantifizierung der Urokinase-Aktivität in ein Verhältnis zu der Menge der anwesenden Urokinase zu setzen, nutzen wir eine kommerziell erhältliche rekombinante Urokinase. In Abbildung 13 F wurden nun die gemessenen *Relative Fluorescent Units* (RFU) in eine Funktion der Änderung über Zeit umgerechnet (RFU/min), um so eine Abschätzung der uPA-Aktivität zu erreichen. Es folgte ein einseitiger ANOVA-Test gegen drei verschiedene Konzentrationen der rekombinanten Urokinase, welcher hier als Standardreihe fungierte.

Wir können dabei zeigen, dass die uPA-Aktivität einer Medium-Kontrolle und verschiedener, durch BC-11 inhibierter Proben, signifikant von unbehandelten LSEC abweicht. Zusätzlich besteht ein signifikanter Unterschied zwischen LSEC-

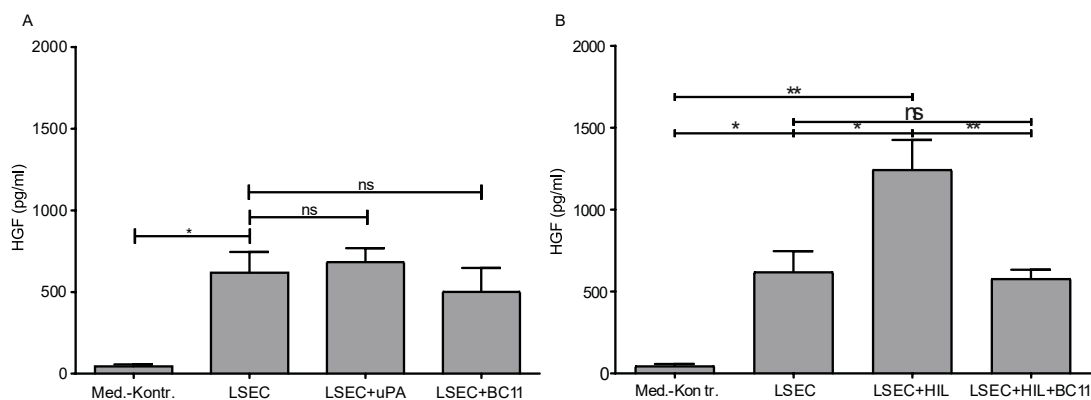
konditioniertem und LSEC + IL-6-transsignalling-konditioniertem Überstand in Bezug auf ihre uPA-Aktivität.



**Abbildung 15: Urokinase-Aktivität im Überstand durch Fluoreszenzmessung.** (A) Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Urokinase-Aktivität durch die katalytische Spaltung von Urokinase Substrat III (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) unter Abspaltung des fluorometrisch nachweisbaren AMC durch rekombinante Urokinase (1 nM). (A) Veränderung der Fluoreszenzintensität bei Kombination des Zellkulturmediums und Urokinase-Substrat III (Medium-Kontrolle) oder LSEC-konditioniertem Überstand mit dem Substrat zeigt einen Anstieg des Fluoreszenzsignals. (B, C) Zugabe des uPA-spezifischen Inhibitors BC-11 vermindert die Urokinase-Aktivität signifikant. (D, E) Zugabe von Hyper-IL-6 (10 nM) zu LSEC-Kulturen erhöht die Urokinase-Aktivität zusätzlich. (D) Berechnung zur zeitlichen Veränderung der Fluoreszenzwerte und Urokinase-Aktivität und anschließende Quantifizierung. Zugabe von BC-11 reduziert die Aktivität signifikant. Hyper-IL-6-behandelte LSECs zeigen einen nachweisbaren Anstieg der Urokinase-Aktivität. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$ . Die statistische Signifikanz wurde in (E) mittels unpaired t-tests und in (F) mittels einseitiger ANOVA-Analyse ermittelt \*  $p < 0.05$ .

#### 4.5.2 Die HGF-Gesamtmenge im Überstand einer LSEC-Zellkultur kann durch die Inhibition der uPA verringert werden

In 4.5.1 haben wir gezeigt, dass die Stimulation durch IL-6-transsignalling zu einer Verstärkung der uPA-Aktivität im Überstand der LSEC-Kulturen geführt hat. Ob dies Einfluss auf die HGF-Menge im Überstand hat. Dazu nutzten wir unseren ELISA-basierten HGF-Gesamtproteinassay und behandelten LSEC-Kulturen für 24 Stunden mit HIL-6, rekombinanter uPA sowie dem Inhibitor BC-11. Wie bereits in 4.4.2 gezeigt, kommt es bei Stimulation mit HIL-6 zu einer Erhöhung der HGF-Gesamtproteinmenge. Nach unserer Hypothese würde eine Inhibition der uPA-Aktivität sich auch in einer verminderten HGF-Gesamtproteinmenge widerspiegeln. Dies belegen wir in Abbildung 14 B. LSECs, die mit HIL-6 und BC-11 behandelt wurden, zeigen keine Erhöhung der HGF-Gesamtproteinmenge. Wenn LSECs zu Beginn der 24-stündigen Inkubationszeit mit BC-11 behandelt werden, kommt es zu keiner Reduktion von HGF im Überstand. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das HGF-Protein im Überstand nicht vollständig von der katalytischen Aktivität der uPA abhängig ist. Im Falle einer Supplementierung mit rekombinanter uPA ohne Hyper-IL-6 Unterstützung lässt sich keine signifikante Erhöhung der HGF-Menge feststellen. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass die transkriptionelle Hochregulation, die wir als Reaktion auf IL-6-transsignalling in Abbildung 10 zeigen konnten, der geschwindigkeitslimitierende Schritt für die Gesamtmenge von HGF im Überstand ist. Im Falle einer Behandlung mit HIL-6 und uPA gemeinsam kommt es zwar zu einer Erhöhung der HGF-Menge, dieser Effekt scheint jeder im Vergleich zur reinen HIL-6-Stimulation geringer zu sein.



**Abbildung 16: Inhibition der uPA-Aktivität durch BC-11 hat einen signifikanten Effekt auf die Menge nachweisbaren HGFs im Überstand einer LSEC-Kultur.** ELISA-basierter Assay zur Bestimmung der HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand einer LSEC-Zellkultur. (A) Die unbehandelte Kontrolle zeigt die konstitutive Expression von HGF. Die Supplementierung einer LSEC-Kultur mit rekombinanter uPA oder dem uPA-Inhibitor BC-11 führt zu keiner signifikanten Veränderung der HGF-Mengen im Überstand. (B) LSECs, die mit Hyper-IL-6

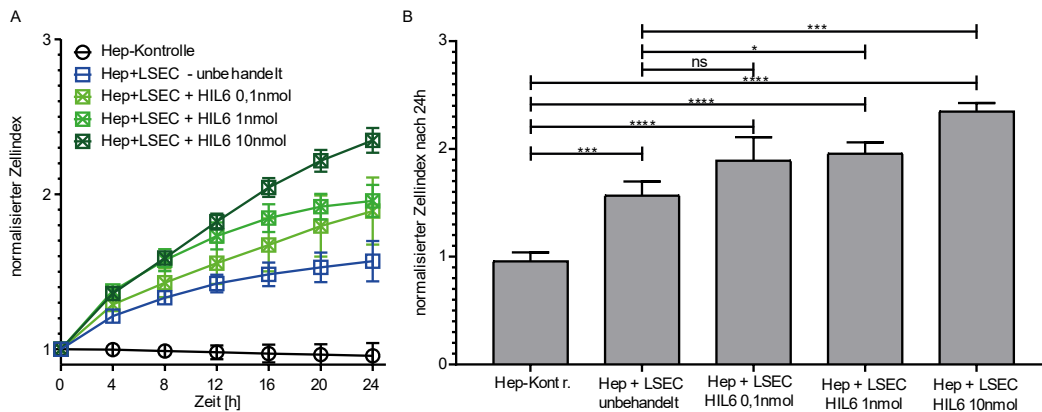
*sowie Hyper-IL-6 + uPA behandelt wurden, zeigen eine signifikante Erhöhung der HGF-Gesamtproteinmenge im Überstand. LSEC-Kulturen, die mit Hyper-IL-6 supplementiert und zusätzlich mit BC-11 versetzt wurden, zeigen jedoch keine Erhöhung der HGF-Gesamtmenge. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von ≥3. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA-Analyse ermittelt \*  $p < 0.05$ .*

#### **4.5.3 LSEC-Überstand hat einen positiven Effekt auf den Zellindex einer Hepatozyten-xCelligence-Kultur in Abhängigkeit von IL-6-transsignalling**

Nachdem wir in 4.4.1 festgestellt haben, dass nach der Behandlung mit IL-6-transsignaling eine erhöhte HGF-Menge im Überstand einer LSEC-Kultur feststellbar ist, analysierten wir in 4.4.4, ob diese Erhöhung sich auch auf transkriptioneller Ebene nachweisen lässt. Auch dabei konnten wir verifizieren, dass LSECs HGF produzieren. Es ist bekannt, dass HGF als biologisch inaktive pro-HGF transkribiert und sezerniert wird. Daher analysierten wir in 4.5, ob LSECs in der Lage sind, die für die HGF-Aktivierung notwendige Urokinase zu produzieren, und konnten zeigen, dass LSECs die uPA-Aktivität im Überstand ihrer Zellkultur erhöhen. Diese Erhöhung kann durch IL-6-transsignalling weiter verstärkt werden. Zugabe des uPA-spezifischen Inhibitors BC-11 reduziert die uPA-Aktivität in unbehandelten sowie in HIL-6-behandelten Proben signifikant. Daher etablierten wir in 4.5.3 einen Hepatozyten-xCelligence Assay, um zu analysieren, ob der Überstand einer LSEC-Kultur zu einer messbaren Impedanz-Änderung einer Hepatozyten-Kultur führt. Impedanzänderungen in einem xCelligence-Zellkultur-Assay sind ein wichtiger Hinweis auf starke morphologische Veränderungen oder Proliferation der Zellkultur. Wie wir in Abbildung 8 sehen konnten, reagiert die Menge des nachweisbaren HGF im Überstand einer LSEC-Kultur abhängig zur Konzentration der IL-6-transsignalling-Stimulation. Daher analysierten wir in 4.5.3, inwieweit sich die Impedanz einer Hepatozyten-xCelligence-Kultur durch Zugabe von Überstand, welcher zuvor durch LSECs konditioniert wurde verändert. Die Hepatozyten wurden zum Zeitpunkt  $t -24$  Stunden ausplattiert und adhären an die mit Goldkontakten durchzogene xCelligence-96-Well-Platte. Die LSECs wurden dazu für 24 Stunden mit drei verschiedenen Konzentrationen von Hyper-IL-6 behandelt. Danach wurde der Überstand zur Hepatozyten-Kultur hinzugegeben. Die Impedanzmessung zeigt dabei deutlich eine Zunahme der Impedanz über die Zeit des Experiments. Die blaue Kurve ist dabei der Überstand einer nicht mit Hyper-IL-6 stimulierten LSEC-Kultur. Wie erwartet hat die konstitutive HGF-Produktion der LSECs einen



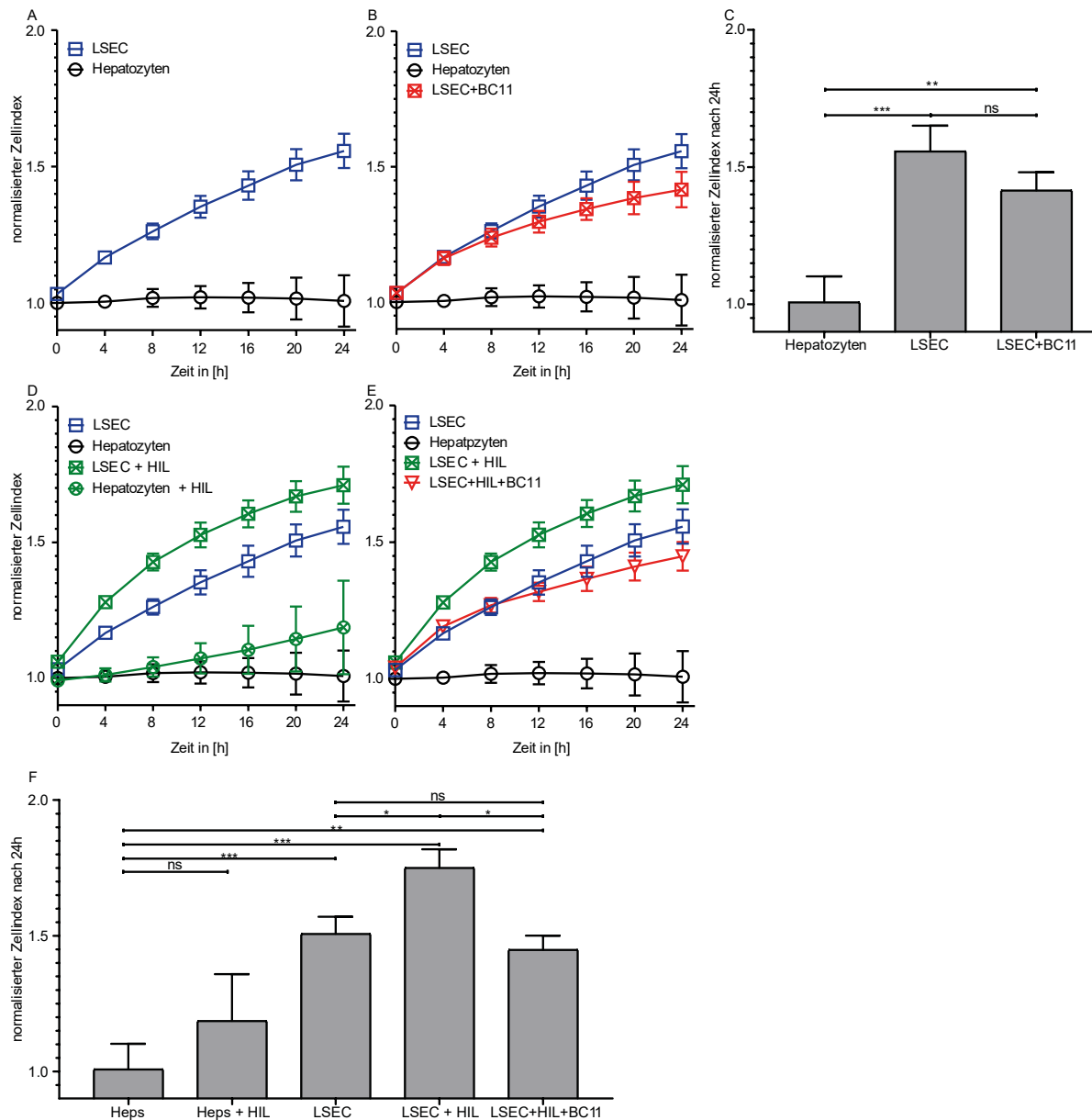
impedanzverstärkenden Effekt auf die Hepatozyten-Kultur. Die Zunahme der Impedanz kann weiterhin verstärkt werden, indem die LSEC-Kulturen zuvor mit Hyper-IL-6 konditioniert werden. Eine Quantifizierung der veränderten Impedanzwerte nach 24 Stunden zeigt dabei, dass bereits eine Stimulation mit 1 nM Hyper-IL-6 ausreichend ist, um im Hepatozyte-xCelligence nachweisbare Veränderungen auszulösen.



**Abbildung 17: Veränderung der Impedanz von Hepatozyten durch LSEC-Überstände ist konzentrationsabhängig von IL-6-transsignalling.** Impedanzbasierte Messung einer Hepatozyten-Zellkultur mit Hilfe der xCelligence Echtzeit-Impedanzmessung. Nicht-konfluente Hepatozyten wurden ausgesät und mit 50  $\mu$ l LSEC-konditionierten Überständen behandelt. (A) Die Zunahme der Impedanz korreliert dabei mit der Hyper-IL-6-Konzentration der LSEC-Kultur. (B) Quantifizierung des veränderten Zellindex der Hepatozyten-Kultur 24 Stunden nach der Zugabe des LSEC-konditionierten Überstandes. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Triplikate) von  $\geq 3$ . Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA-Analyse ermittelt \*  $p < 0.05$ .

In Abbildung 13 konnten wir zeigen, dass die Urokinase-Aktivität im Überstand von LSEC-Kulturen erhöht ist. Diese katalytische Aktivität wurde verringert, wenn der selektive uPA-Inhibitor BC-11 hinzugefügt wurde. In Abbildung 14 weisen wir nach, dass durch Inhibition von uPA die nachweisbare HGF-Menge im Überstand der LSEC-Kulturen signifikant verringert wird. In Abbildung 15 können wir demonstrieren, dass sich die Impedanzzunahme im xCelligence-Assay dosisabhängig zur IL-6-transsignalling-Stimulation verhält.

Daher nutzen wir in Abbildung 16 erneut einen Hepatozyten-xCelligence-Assay, um zu überprüfen, ob die Zunahme der Impedanz, welche durch IL-6-transsignalling-Stimulation herbeigeführt wurde, auf eine Inhibition durch BC-11 reagiert.



**Abbildung 18: Veränderung des Impedanzverhaltens von Hepatozyten durch LSEC-Überstand in Abhängigkeit von IL-6-transsignalling und Inhibition der Urokinase-Aktivität.** Impedanzbasierte Messung einer Hepatozyten-Zellkultur mit Hilfe der xCelligence Echtzeit-Impedanzmessung. Nicht-konfluente Hepatozyten wurden ausgesät und mit 50  $\mu$ l LSEC-konditionierten Überständen (LSEC) behandelt. (A) LSEC-konditionierter Überstand wurde nach 24 Stunden auf die Hepatozyten übertragen und führte zu einer Zunahme der Impedanz. (B) Zugabe von BC-11 zur LSEC-Kultur während der Konditionierungsphase reduziert die Zunahme der Impedanz der Hepatozyten-Kultur. (C) Quantifizierung des normalisierten Zellindex zum Endzeitpunkt 24 Stunden. Zugabe von BC-11 zur LSEC-Kultur während der Konditionierungsphase reduziert die Zunahme der Impedanz der Hepatozyten-Kultur. (D) LSEC-Überstand nach der Behandlung mit Hyper-IL-6 (10 nM) zeigt eine zusätzlich verstärkte Impedanzhöhung der Hepatozyten-Kultur. (E) Zugabe von BC-11 während der Konditionierungsphase negiert die Hyper-IL-6-induzierte Zunahme des Zellindex der Hepatozyten-Kultur und senkt sie auf das Niveau von nicht-Hyper-IL-6-supplementierten LSEC-Überständen. (F) Quantifizierung des normalisierten Zellindex zum Endzeitpunkt 24 Stunden zeigt sowohl den Einfluss der IL-6-transsignaling-Stimulation als auch die Inhibition durch BC-11. Statistische Signifikanz wurde durch eine einseitige ANOVA-Analyse mit  $*p < 0.05$  festgestellt.

Zum Zeitpunkt t-0 werden LSEC-konditionierte Überstände zu den Kulturen hinzugegeben. In Abbildung 16 A vergleichen wir dabei den Zellindex der Hepatozyten, welche mit unkonditioniertem Medium versorgt wurden, mit

Hepatozyten, die einen 24 Stunden lang konditionierten Überstand aus einer LSEC-Kultur erhalten haben. Zum Zeitpunkt der Zugabe wurde der Zellindex aller Proben auf den Wert 1 normalisiert. In den folgenden 24 Stunden wurde nun in 30-Minuten-Intervallen die Impedanz gemessen. Wir können dabei klar sehen, dass der Überstand einen zellindexverstärkenden Einfluss auf die Hepatozyten-Kultur hat. In Abbildung 16 B nutzten wir Überstand aus LSEC-Kulturen, welche mit BC-11 behandelt worden waren. Aus 4.5.1 und 4.5.2 wissen wir, dass eine Behandlung mit BC-11 die uPA-Aktivität inhibiert und die HGF-Menge im Überstand reduziert. Wir können sehen, dass in diesem Fall auch die Zunahme des Zellindexes reduziert wird. Im nächsten Schritt, Abbildung 16 C, wurde LSEC-Überstand, welcher durch IL-6-transsignaling konditioniert wurde, zu den Hepatozyten-Kulturen hinzugefügt. Im Vergleich zu Abbildung 16 A können wir eine noch stärkere Erhöhung des Zellindexes erkennen. Dies bietet uns einen weiteren Hinweis auf den positiven Effekt der LSEC-Kulturen auf Hepatozyten. Dieser Effekt korreliert mit der uPA-Aktivität und kann durch das Unterdrücken eben jener reduziert werden, wie wir in Abbildung 16 D sehen können.

## 5. Diskussion

Leberregeneration ist für eine einwandfreie Funktion der Leber unerlässlich. Leberschäden können nach ihrer Entstehungsursache unterschieden werden. Man kann zwischen Schäden unterscheiden, die durch Vergiftungen oder durch eine Immunantwort entstehen (Mao, Glorioso, and Nyberg 2014; Michalopoulos 2014).

Schwere Schäden, die ihre Ursache in der Vergiftung von Hepatozyten haben, führen nicht selten zu katastrophalem Organversagen. Schäden, die durch das Immunsystem entstehen, z.B. als Antwort auf eine virale Hepatitis, sind mit einer erfolgreichen Leberregeneration vergesellschaftet, und nur selten kommt es zu fulminanten Verläufen mit Organversagen (D. Markose 2018; Tao et al. 2017).

Obgleich die Regeneration der Leber intensiv erforscht wird, gibt es nach wie vor Lücken in unserem Wissen darüber, wie die Initiation der Leberregeneration nach einem immunsystemvermittelten Schaden erfolgt. Wichtige Aufgaben in den frühen Phasen einer Infektion und Schädigung der Leber durch Effektorzellen des Immunsystems werden dabei durch LSECs übernommen. Die komplexe Regulation der Regeneration mit ihren unterschiedlichen Phasen ist in vielen Bereichen von LSECs abhängig und wird in eine proliferative und angiokrine Phase unterteilt. In der ersten, proliferativen Phase wird eine massive Expansion der Hepatozyten beobachtet. Die angiokrine Phase, in deren Verlauf sich die Gefäße und Stützstruktur des neuen Lebergewebes bilden, beginnt erst mit dem Ende der proliferativen Phase und wird ebenfalls überwiegend durch LSECs orchestriert (Ding et al. 2014; Ding et al. 2010; Poisson et al. 2017; Colakoglu et al. 2010). Verlust von Lebergewebe, wie z.B. nach einer partiellen Hepatektomie, induziert dabei eine Verminderung des Proliferationsinhibitors TGF- $\beta$  sowie eine verstärkte Freisetzung von pro-proliferativen Zytokinen wie HGF oder Wnt2 (Poisson et al. 2017). Dabei wurde festgestellt, dass es zu einer Erhöhung der intra-sinusoidalen Scherkräfte kommt. Dies führt zu der Freisetzung von NO an das umgebende Gewebe, welches einen pro-proliferatorischen Effekt auf die Hepatozyten hat und für die weitere Koordination der Leberregenerationsphasen von großer Wichtigkeit ist (Golse et al. 2013). Partielle-Hepatektomie-Modelle leisten wichtige Beiträge bei der Erforschung der Leberregeneration, erlauben modellbedingt allerdings nur begrenzt Rückschlüsse auf die Regeneration von immunsysteminduzierten Leberschäden (Poisson et al. 2017).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich darauf, wie in frühen Stadien eines Leberschadens LSECs an der Leberregeneration teilhaben könnten. In diesem Kontext wird untersucht, ob LSECs durch ihre ausgeprägte Scavenging-Funktion den Zelltod der Hepatozyten registrieren und durch eine vermehrte Produktion von HGF reagieren können. Wir untersuchen weiter, ob LSECs eine Brücke zwischen einer Aktivierung der Immunsystems und der Leberregeneration schlagen, indem der bei der Antigenpräsentation stattfindende Crosstalk zwischen LSECs und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen neben der T-Zell-Aktivierung auch zu regenerationsfördernden Veränderungen auf Seite der LSECs führt, wie z.B. zur Freisetzung von HGF.

Bekanntermaßen ist die Scavenging-Aktivität der LSECs sehr ausgeprägt (Sorensen et al. 2015). Unsere Daten belegen, dass das Scavenging von ATP als DAMP zur Aktivierung und Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD106 führt. Die Veränderungen der Scavenging-Aktivität, die wir beobachteten, bewegten sich aber in einem sehr kleinen Bereich, von dem wir keinen biologischen Einfluss erwarten. Dass es trotz Aktivierung von LSECs nicht zu einer erhöhten Freisetzung von HGF kommt, ist nachvollziehbar, da vergleichbare phänotypische Veränderungen bei LSECs, z.B. bei Stimulation mit LPS in der physiologischen Nische der LSECs, durchaus auftreten können und dabei nicht zwangsläufig mit der Freisetzung von HGF beantwortet werden müssen.

Obwohl der Einfluss von LSECs als wichtiger Taktgeber bei der Leberregeneration mittlerweile akzeptiert ist (DeLeve and Maretti-Mira 2017), gibt es wenige Erkenntnisse darüber, wie eine Verbindung zwischen immunologischen und regenerativen Funktionen aussehen könnte. Modelle wie partielle Hepatektomien oder Vergiftungsassays blenden die Rolle des Immunsystems dabei vollkommen aus. Mittlerweile gibt es viele Hinweise darauf, dass es zu einer Rekrutierung von sinusoidalen Endothel-Vorgängerzellen aus dem Knochenmark (LSEC-Progenitorzellen) kommt, die auf Stimulation des Wachstumsfaktors VEGF reagieren und durch diesen rekrutiert werden. VEGF wird vor allem bei akuten Leberschäden wie bei APAP-Vergiftungen freigesetzt und ist daher eine wichtige Säule der Leberregeneration (DeLeve, Wang, and Wang 2016; Donahower et al. 2010; Donahower et al. 2006; Papastefanou et al. 2007). LSECs, so wie sie in unserem *in vitro* System genutzt werden, zeigen allerdings keine Veränderung der HGF-Produktion durch die Stimulation mit VEGF. Dies könnte ein wichtiger Hinweis auf die

stringente „Arbeitsteilung“ zwischen reifen LSECs und den LSEC-Progenitorzellen sein.

Unsere *in vitro* Studien zeigen, dass der Crosstalk zwischen maturierten LSECs und T-Zellen bereits ausreicht, um LSECs, auf transkriptioneller Ebene zur Produktion von HGF anzuregen. Diese Stimulation erfolgt bei partiellen Hepatektomien oder Vergiftungen nicht und stellt somit einen grundsätzlich anderen Mechanismus dar als die VEGF-Sdf1-Achse in den LSEC-Progenitorzellen.

Im Falle des LSEC-T-Zellen-Crosstalks führt die Aktivierung der T-Zellen dazu, dass antigen-präsentierende LSECs zeitnah durch die aktivierten Effektor-T-Zellen eliminiert werden. Eine zügige Reaktion auf Seiten der LSECs ist also geboten und spiegelt sich in unseren transkriptionellen Daten wider, die zeigen, dass LSECs innerhalb weniger Stunden die Expression von HGF signifikant erhöhen können. Wir konnten auch feststellen, dass unsere isolierten LSECs eine basale HGF-Produktion zeigen.

Daraus ergaben sich im folgenden Verlauf zwei wichtige Fragen. Zum einen gingen wie der Frage nach, ob die konstitutive HGF-Produktion ein Alleinstellungsmerkmal der LSECs ist oder ob andere Leberzelltypen ebenfalls HGF produzieren können. Zum anderen setzten wir uns mit der Frage auseinander, wie eine kontinuierliche Produktion von HGF mit seiner Rolle als potenter Wachstumsfaktor in der Leberregeneration in Einklang zu bringen ist.

Die erste Frage konnten wir schnell beantworten. Unsere Daten zeigen, dass lediglich LSECs stimulationsunabhängig HGF *in vitro* sezernieren.

Die basale Produktion von HGF durch LSECs in der intakten Leber ist dabei zwei weiteren physiologischen Auffälligkeiten geschuldet, denn die Leber hat aufgrund ihrer zentralen Aufgabenstellung täglich mit der Regeneration von abgestorbenen Hepatozyten zu tun, für die die Anwesenheit von HGF notwendig ist. Zugleich wissen wir, dass HGF als pro-Form nach seiner Sezernierung an die extrazelluläre Matrix binden und nach katalytischer Spaltung durch die Urokinase uPA freigesetzt werden und seine biologisch aktive Form einnehmen kann (Naldini et al. 1995). Es ist möglich, dass eine rein transkriptionelle Regulation der HGF-Produktion bei schweren Leberschäden nicht ausreichend sein wird, um in dem kurzen Zeitraum, der der Leber zur Einleitung der Regeneration bleibt, die benötigten HGF-Mengen zur Verfügung zu stellen.

Daher lenkten wir unseren Fokus auf die Aktivierung von HGF durch uPA. Unsere Daten zeigen, dass LSECs nicht nur HGF konstitutiv produzieren, sondern zusätzlich auch aktive Urokinase produzieren und sezernieren. Die Aktivität der Urokinase korrelierte, wie auch die Menge des sezernierten HGFs, mit einer IL-6-abhängigen Stimulation.

In weiteren Experimentalreihen zeigten wir, dass das Einbringen des uPA-spezifischen Inhibitors BC-11 die Aktivität der im Überstand vorhandenen Urokinase vollständig abrogieren konnte. Obwohl die Zugabe eines Inhibitors BC-11 die uPA-Aktivität in LSEC-konditioniertem Überstand vollkommen unterdrückte, spiegelte sich die Inhibition der Urokinase nur anteilig in der Quantifizierung der HGF-Proteinmengen wider. Die Tatsache, dass die Zugabe des Inhibitors nicht ausreicht, um die Produktion von HGF im Überstand vollkommen zu unterdrücken, führt nun allerdings zu einem Problem. Die Halbwertszeit eines aktivierten HGF-Moleküls befindet sich im Bereich von ca. 4-10 Minuten (Appasamy et al. 1993; Cao et al. 2017). Die Produktion von pro-HGF erscheint unabhängig davon, ob sie konstitutiv oder durch IL-6-transsignalling induziert wurde

Die Erhöhung der uPA-Aktivität im Falle des IL-6-transsignalling hat neben der Umwandlung von pro-HGF zu HGF auch einen Einfluss auf die ECM. Das Remodelling der ECM ist dabei ein wichtiger Punkt im Rahmen der Leberregeneration, da die starke Proliferation der Hepatozyten es notwendig macht, dass sich das Organ auf makroskopischer Ebene anpasst. Dieser duale Aktionsmodus der LSECs, welcher sich nach unseren Experimenten ausschließlich bei IL-6-transsignalling in LSECs zeigt, ist ein wichtiger Hinweis auf einen neuen Mechanismus zur Initiation der Leberregeneration. Der Crosstalk zwischen T-Zellen und LSECs entsteht nur dann, wenn LSECs Antigene aufnehmen und auf ihren MHC-Komplexen dem Immunsystem präsentieren, und findet so schon lange vor dem Auftreten des eigentlichen Schadens statt. Diese Aktivierungskaskade wird im Falle einer Intoxifikation vollkommen umgangen. Diese Unterschiede im Hinblick auf die Initiation der Leberregeneration könnten ein Modell liefern, warum Leberschäden, welche im Rahmen der Immunantwort entstehen, seltener zu katastrophalem Leberversagen führen.

Die Identifikation des IL-6-transsignallings als Stimulationssignal in unseren *in vitro* Systemen ist daher ein wichtiger Ausgangspunkt für die weitere Forschung. Deren nächster Fokus sollte auf der Etablierung passender *in vivo* Experimente liegen, bei denen ein toxischer Leberschaden hervorgerufen wird und der Einfluss einer Stimulation des Immunsystems auf die Leberregeneration gemessen wird. Dies könnte durch den Transfer naiver OT-1 T-Zellen, welche durch LSECs und die Verabreichung von Ovalbumin aktiviert werden, analysiert werden (Nakajima et al. 2019). Weitere Möglichkeiten ergeben sich daraus, dass man die Aktivität der uPA durch KO-Experimente vollständig oder stimulationsabhängig reduziert oder entfernt. Eine weitere Herangehensweise könnte durch die präventive Verabreichung von Hyper-IL-6 zur Initiation der HGF-Produktion bestehen, bei dem erst 24 oder 48 Stunden später ein toxischer Leberschaden induziert wird. Zusätzliche *in vitro* Forschung sollte sich auf die klare Differenzierung von pro- und maturem HGF sowie der Etablierung mikroskopischer Systeme zur Evaluation der Hepatozyten-Proliferation konzentrieren, um die Ergebnisse unserer xCelligence-Analysen zu verifizieren.

Die gewonnenen Erkenntnisse können langfristig helfen, durch spezifische Induktion von IL-6-transsignalling in LSECs die Leberregeneration in verschiedenen Situationen zu unterstützen. So wäre es denkbar, dass im Rahmen einer Leber-Lebendspende die Leber bereits vor der Operation auf die Regeneration geprimt wird und sich so das Regenerationsverhalten nach der Operation für Spender und Empfänger positiv beeinflussen lässt. Ein weiterer Aspekt liegt in der therapeutischen Behandlung des „Small-for-size“-Syndroms (SFSS), bei dem die transplantierte Leber nicht ausreichend regeneriert, um die metabolischen Herausforderungen des Empfänger-Organismus vollumfänglich zu übernehmen.

Ein weiteres Organ, bei dessen Heilung HGF zunehmend eine Bedeutung zugesprochen wird, ist die Lunge (Nakajima et al. 2019). Die Lunge besitzt ebenfalls spezielle Endothelzellen, welche sich einige Charakteristika mit LSECs teilen und ebenfalls in der Lage sind, HGF zu produzieren (Comhair et al. 2012; Usatyuk et al. 2014). Somit sind sie essenziell bei der Lungenregeneration. Gerade im Kontext der aktuellen Pandemielage durch Sars-CoV-2 und der damit einhergehenden Lungenschäden im Hinblick auf „Long-Covid“ ist es vorstellbar, dass die Lungenregeneration von IL-6-transsignalling profitieren könnte. Auf der anderen



Seit ist die gewebeschädigende Rolle von IL-6 bei COVID-19 Patienten unlängst bekannt geworden. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass weniger die Signal-Qualität einzelner Moleküle als eher der Kontext von IL-6-signaling über Organschaden oder Regeneration mitentscheiden. Für mögliche therapeutische Interventionen zur gezielten Verstärkung von Leberregeneration bedeuten diese Ergebnisse, dass es wahrscheinlich keine universellen Strategien zur Leberregeneration geben kann, sondern dass molekulare Interventionen abhängig vom Kontext des Leberschadens sind.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abu Rmilah, A., W. Zhou, E. Nelson, L. Lin, B. Amiot, and S. L. Nyberg. 2019. 'Understanding the marvels behind liver regeneration', *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 8: e340.
- Adamek, B., M. Zalewska-Ziob, J. K. Strzelczyk, J. Kasperczyk, K. Wolkowska-Pokrywa, G. Spausta, E. Hudziec, A. Wiczkowski, E. Swietochowska, M. Kukla, and Z. Ostrowska. 2017. 'Hepatocyte growth factor and epidermal growth factor activity during later stages of rat liver regeneration upon interferon alpha-2b influence', *Clin Exp Hepatol*, 3: 9-15.
- Akira, S. 2009. 'Pathogen recognition by innate immunity and its signaling', *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85: 143-56.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. 'Pathogen recognition and innate immunity', *Cell*, 124: 783-801.
- Antonioli, L., P. Pacher, E. S. Vizi, and G. Hasko. 2013. 'CD39 and CD73 in immunity and inflammation', *Trends Mol Med*, 19: 355-67.
- Appasamy, R., M. Tanabe, N. Murase, R. Zarnegar, R. Venkataramanan, D. H. Van Thiel, and G. K. Michalopoulos. 1993. 'Hepatocyte growth factor, blood clearance, organ uptake, and biliary excretion in normal and partially hepatectomized rats', *Lab Invest*, 68: 270-6.
- Arai, M., S. Mochida, A. Ohno, I. Ogata, and K. Fujiwara. 1993. 'Sinusoidal endothelial cell damage by activated macrophages in rat liver necrosis', *Gastroenterology*, 104: 1466-71.
- Arii, S., and M. Imamura. 2000. 'Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury', *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 7: 40-8.
- Bantel, H., and K. Schulze-Osthoff. 2012. 'Mechanisms of cell death in acute liver failure', *Front Physiol*, 3: 79.
- Bartneck, M., F. Topuz, C. G. Tag, S. Sauer-Lehnen, K. T. Warzecha, C. Trautwein, R. Weiskirchen, and F. Tacke. 2015. 'Molecular response of liver sinusoidal endothelial cells on hydrogels', *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 51: 64-72.
- Benseler, V., A. Warren, M. Vo, L. E. Holz, S. S. Tay, D. G. Le Couteur, E. Breen, A. C. Allison, N. van Rooijen, C. McGuffog, H. J. Schlitt, D. G. Bowen, G. W. McCaughan, and P. Bertolino. 2011. 'Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 16735-40.
- Bockhorn, M., M. Goralski, D. Prokofiev, P. Dammann, P. Grunewald, M. Trippler, A. Biglarnia, M. Kamler, E. M. Niehues, A. Frilling, C. E. Broelsch, and J. F. Schlaak. 2007. 'VEGF is important for early liver regeneration after partial hepatectomy', *J Surg Res*, 138: 291-9.
- Bohm, I., and H. Schild. 2003. 'Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death', *Mol Imaging Biol*, 5: 2-14.
- Bottcher, J. P., O. Schanz, C. Garbers, A. Zaremba, S. Hegenbarth, C. Kurts, M. Beyer, J. L. Schultze, W. Kastentmuller, S. Rose-John, and P. A. Knolle. 2014. 'IL-6 trans-signaling-dependent rapid development of cytotoxic CD8+ T cell function', *Cell Rep*, 8: 1318-27.

- Boylard, E., and L. F. Chasseaud. 1969. 'The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis', *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 32: 173-219.
- Bussolino, F., M. F. Di Renzo, M. Ziche, E. Bocchietto, M. Olivero, L. Naldini, G. Gaudino, L. Tamagnone, A. Coffe, and P. M. Comoglio. 1992. 'Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth', *J Cell Biol*, 119: 629-41.
- Cao, X. F., S. Z. Jin, L. Sun, Y. B. Zhan, F. Lin, Y. Li, Y. L. Zhou, X. M. Wang, L. Gao, and B. Zhang. 2017. 'Therapeutic effects of hepatocyte growth factor-overexpressing dental pulp stem cells on liver cirrhosis in a rat model', *Sci Rep*, 7: 15812.
- Celton-Morizur, S., G. Merlen, D. Couton, and C. Desdouets. 2010. 'Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling', *Cell Cycle*, 9: 460-6.
- Chen, Y., and R. Sun. 2011. 'Toll-like receptors in acute liver injury and regeneration', *Int Immunopharmacol*, 11: 1433-41.
- Clavien, P. A. 1997. 'IL-6, a key cytokine in liver regeneration', *Hepatology*, 25: 1294-6.
- Colakoglu, T., T. Z. Nursal, A. Ezer, F. Kayaselcuk, A. Parlakgumus, S. Belli, H. Karakayali, and M. Haberal. 2010. 'Effects of different doses of statins on liver regeneration through angiogenesis and possible relation between these effects and acute phase responses', *Transplant Proc*, 42: 3823-7.
- Comhair, S. A., W. Xu, L. Mavrikakis, M. A. Aldred, K. Asosingh, and S. C. Erzurum. 2012. 'Human primary lung endothelial cells in culture', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46: 723-30.
- D. Markose, P. Kirkland, P. Ramachandran, N.C. Henderson. 2018. 'Immune cell regulation of liver regeneration and repair', *Journal of Immunology and Regenerative Medicine*.
- Del Campo, J. A., P. Gallego, and L. Grande. 2018. 'Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies', *World J Hepatol*, 10: 1-7.
- DeLeve, L. D. 2013. 'Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration', *J Clin Invest*, 123: 1861-6.
- DeLeve, L. D., and A. C. Maretta-Mira. 2017. 'Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update', *Semin Liver Dis*, 37: 377-87.
- DeLeve, L. D., X. Wang, and L. Wang. 2016. 'VEGF-sdf1 recruitment of CXCR7+ bone marrow progenitors of liver sinusoidal endothelial cells promotes rat liver regeneration', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 310: G739-46.
- Ding, B. S., Z. Cao, R. Lis, D. J. Nolan, P. Guo, M. Simons, M. E. Penfold, K. Shido, S. Y. Rabbany, and S. Rafii. 2014. 'Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis', *Nature*, 505: 97-102.
- Ding, B. S., D. J. Nolan, J. M. Butler, D. James, A. O. Babazadeh, Z. Rosenwaks, V. Mittal, H. Kobayashi, K. Shido, D. Lyden, T. N. Sato, S. Y. Rabbany, and S. Rafii. 2010. 'Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration', *Nature*, 468: 310-5.
- Donahower, B. C., S. S. McCullough, L. Hennings, P. M. Simpson, C. D. Stowe, A. G. Saad, R. C. Kurten, J. A. Hinson, and L. P. James. 2010. 'Human recombinant vascular endothelial growth factor reduces necrosis and enhances hepatocyte regeneration in a mouse model of acetaminophen toxicity', *J Pharmacol Exp Ther*, 334: 33-43.
- Donahower, B., S. S. McCullough, R. Kurten, L. W. Lamps, P. Simpson, J. A. Hinson, and L. P. James. 2006. 'Vascular endothelial growth factor and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291: G102-9.
- Eastman, A., and M. A. Barry. 1992. 'The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis?', *Cancer Invest*, 10: 229-40.
- Ebe, Y., G. Hasegawa, H. Takatsuka, H. Umezumi, M. Mitsuyama, M. Arakawa, N. Mukaida, and M. Naito. 1999. 'The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration

- into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice', *Pathol Int*, 49: 519-32.
- Eltzschig, H. K., M. V. Sitkovsky, and S. C. Robson. 2012. 'Purinergic signaling during inflammation', *N Engl J Med*, 367: 2322-33.
- Elvevold, K., B. Smedsrod, and I. Martinez. 2008. 'The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294: G391-400.
- Eng, F. J., and S. L. Friedman. 2000. 'Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279: G7-G11.
- Escudie, L., C. Francoz, J. P. Vinel, R. Moucari, M. Cournot, V. Paradis, A. Sauvanet, J. Belghiti, D. Valla, J. Bernuau, and F. Durand. 2007. 'Amanita phalloides poisoning: reassessment of prognostic factors and indications for emergency liver transplantation', *J Hepatol*, 46: 466-73.
- Fausto, N., J. S. Campbell, and K. J. Riehle. 2006. 'Liver regeneration', *Hepatology*, 43: S45-53.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele. 2006. 'Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response', *Biochim Biophys Acta*, 1757: 1371-87.
- Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grotzinger, and S. Rose-John. 1997. 'I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion', *Nat Biotechnol*, 15: 142-5.
- Fukushima, T., S. Uchiyama, H. Tanaka, and H. Kataoka. 2018. 'Hepatocyte Growth Factor Activator: A Proteinase Linking Tissue Injury with Repair', *Int J Mol Sci*, 19.
- Galluzzi, L., I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. Garcia-Saez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jaattela, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. Lopez-Otin, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkenkin, U. M. Moll, C. Munoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nunez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J.

- Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino, and G. Kroemer. 2018. 'Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018', *Cell Death Differ*, 25: 486-541.
- Ganesan, L. P., S. Mohanty, J. Kim, K. R. Clark, J. M. Robinson, and C. L. Anderson. 2011. 'Rapid and efficient clearance of blood-borne virus by liver sinusoidal endothelium', *PLoS Pathog*, 7: e1002281.
- Geerts, A. 2001. 'History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells', *Semin Liver Dis*, 21: 311-35.
- Gentric, G., S. Celton-Morizur, and C. Desdouets. 2012. 'Polyploidy and liver proliferation', *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 36: 29-34.
- Gewiese-Rabsch, J., C. Drucker, S. Malchow, J. Scheller, and S. Rose-John. 2010. 'Role of IL-6 trans-signaling in CCl(4)induced liver damage', *Biochim Biophys Acta*, 1802: 1054-61.
- Gohda, E. 2002. '[Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF)]', *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 119: 287-94, 309.
- Golse, N., P. O. Bucur, R. Adam, D. Castaing, A. Sa Cunha, and E. Vibert. 2013. 'New paradigms in post-hepatectomy liver failure', *J Gastrointest Surg*, 17: 593-605.
- Guengerich, F. P. 2001. 'Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity', *Chem Res Toxicol*, 14: 611-50.
- Guillot, A., and F. Tacke. 2019. 'Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights', *Hepatology Commun*, 3: 730-43.
- Haga, J., M. Shimazu, G. Wakabayashi, M. Tanabe, S. Kawachi, Y. Fuchimoto, K. Hoshino, Y. Morikawa, M. Kitajima, and Y. Kitagawa. 2008. 'Liver regeneration in donors and adult recipients after living donor liver transplantation', *Liver Transpl*, 14: 1718-24.
- Higgins. 1931. 'Experimental pathology of liver: restoration of liver of white rat following partial surgical removal'.
- Huang, L., G. Soldevila, M. Leeker, R. Flavell, and I. N. Crispe. 1994. 'The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo', *Immunity*, 1: 741-9.
- Huh, C. G., V. M. Factor, A. Sanchez, K. Uchida, E. A. Conner, and S. S. Thorgeirsson. 2004. 'Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 4477-82.
- Hunter, C. A., and S. A. Jones. 2017. 'Corrigendum: IL-6 as a keystone cytokine in health and disease', *Nat Immunol*, 18: 1271.
- Ito, T., and M. Nemoto. 1952. '[Kupfer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver]', *Okajimas Folia Anat Jpn*, 24: 243-58.
- Itoh, N., Y. Nakayama, and M. Konishi. 2016. 'Roles of FGFs As Paracrine or Endocrine Signals in Liver Development, Health, and Disease', *Front Cell Dev Biol*, 4: 30.
- Jaeschke, H., Y. Xie, and M. R. McGill. 2014. 'Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans', *J Clin Transl Hepatol*, 2: 153-61.
- Jakoby, W. B., and D. M. Ziegler. 1990. 'The enzymes of detoxication', *J Biol Chem*, 265: 20715-8.
- Kaczmarek, A., P. Vandenabeele, and D. V. Krysko. 2013. 'Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance', *Immunity*, 38: 209-23.
- Kaiser, W. J., J. W. Upton, A. B. Long, D. Livingston-Rosanoff, L. P. Daley-Bauer, R. Hakem, T. Caspary, and E. S. Mocarski. 2011. 'RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice', *Nature*, 471: 368-72.
- Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. 'Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response', *Immunity*, 23: 19-28.

- Kawaida, K., K. Matsumoto, H. Shimazu, and T. Nakamura. 1994. 'Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 4357-61.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics', *Br J Cancer*, 26: 239-57.
- Kim, T. H., W. M. Mars, D. B. Stolz, B. E. Petersen, and G. K. Michalopoulos. 1997. 'Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat', *Hepatology*, 26: 896-904.
- Kitto, L. J., and N. C. Henderson. 2021. 'Hepatic Stellate Cell Regulation of Liver Regeneration and Repair', *Hepatol Commun*, 5: 358-70.
- Knolle, P. A., and A. Limmer. 2003. 'Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells', *Swiss Med Wkly*, 133: 501-6.
- Knolle, P. A., and R. Thimme. 2014. 'Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection', *Gastroenterology*, 146: 1193-207.
- Knolle, P. A., and D. Wohlleber. 2016. 'Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells', *Cell Mol Immunol*, 13: 347-53.
- Kon, K., J. S. Kim, H. Jaeschke, and J. J. Lemasters. 2004. 'Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes', *Hepatology*, 40: 1170-9.
- Kren, B. T., J. H. Trembley, G. Fan, and C. J. Steer. 1997. 'Molecular regulation of liver regeneration', *Ann N Y Acad Sci*, 831: 361-81.
- Kubes, P., and C. Jenne. 2018. 'Immune Responses in the Liver', *Annu Rev Immunol*, 36: 247-77.
- LeCouter, J., D. R. Moritz, B. Li, G. L. Phillips, X. H. Liang, H. P. Gerber, K. J. Hillan, and N. Ferrara. 2003. 'Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1', *Science*, 299: 890-3.
- Li, F., Q. Huang, J. Chen, Y. Peng, D. R. Roop, J. S. Bedford, and C. Y. Li. 2010. 'Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration', *Sci Signal*, 3: ra13.
- Liberal, R., C. R. Grant, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 2013. 'Autoimmune hepatitis: a comprehensive review', *J Autoimmun*, 41: 126-39.
- Limmer, A., J. Ohl, C. Kurts, H. G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold, and P. A. Knolle. 2000. 'Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance', *Nat Med*, 6: 1348-54.
- Limmer, A., J. Ohl, G. Wingender, M. Berg, F. Jungerkes, B. Schumak, D. Djandji, K. Scholz, A. Klevenz, S. Hegenbarth, F. Momburg, G. J. Hammerling, B. Arnold, and P. A. Knolle. 2005. 'Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance', *Eur J Immunol*, 35: 2970-81.
- Liu, Z. X., S. Govindarajan, and N. Kaplowitz. 2004. 'Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity', *Gastroenterology*, 127: 1760-74.
- Lu, J., Y. L. Zhao, X. Q. Zhang, and L. J. Li. 2021. 'The vascular endothelial growth factor signaling pathway regulates liver sinusoidal endothelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy', *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 15: 139-47.
- Luedde, T., N. Kaplowitz, and R. F. Schwabe. 2014. 'Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance', *Gastroenterology*, 147: 765-83 e4.
- Lüllman-Rauch, Renate. 2006. *Histologie*.
- Mao, S. A., J. M. Glorioso, and S. L. Nyberg. 2014. 'Liver regeneration', *Transl Res*, 163: 352-62.

- Marguerat, S., and J. Bahler. 2012. 'Coordinating genome expression with cell size', *Trends Genet*, 28: 560-5.
- Mars, W. M., M. L. Liu, R. P. Kitson, R. H. Goldfarb, M. K. Gabauer, and G. K. Michalopoulos. 1995. 'Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration', *Hepatology*, 21: 1695-701.
- Mehrfeld, C., S. Zenner, M. Kornek, and V. Lukacs-Kornek. 2018. 'The Contribution of Non-Professional Antigen-Presenting Cells to Immunity and Tolerance in the Liver', *Front Immunol*, 9: 635.
- Michalopoulos, G. K. 2014. 'Advances in liver regeneration', *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 8: 897-907.
- . 2017. 'Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance', *Hepatology*, 65: 1384-92.
- Michalopoulos, G. K., and M. C. DeFrances. 1997. 'Liver regeneration', *Science*, 276: 60-6.
- Milne, Lindsay S. 1909. 'The histology of liver tissue regeneration', *The Journal of Pathology and Bacteriology*.
- Naito, M., G. Hasegawa, Y. Ebe, and T. Yamamoto. 2004. 'Differentiation and function of Kupffer cells', *Med Electron Microsc*, 37: 16-28.
- Nakajima, D., Y. Watanabe, A. Ohsumi, M. Pipkin, M. Chen, P. Mordant, T. Kanou, T. Saito, R. Lam, R. Coutinho, L. Caldarone, S. Juvet, T. Martinu, R. K. Iyer, J. E. Davies, D. M. Hwang, T. K. Waddell, M. Cypel, M. Liu, and S. Keshavjee. 2019. 'Mesenchymal stromal cell therapy during ex vivo lung perfusion ameliorates ischemia-reperfusion injury in lung transplantation', *J Heart Lung Transplant*, 38: 1214-23.
- Nakamura, T., and S. Mizuno. 2010. 'The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine', *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86: 588-610.
- Nakamura, T., K. Nawa, and A. Ichihara. 1984. 'Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats', *Biochem Biophys Res Commun*, 122: 1450-9.
- Naldini, L., L. Tamagnone, E. Vigna, M. Sachs, G. Hartmann, W. Birchmeier, Y. Daikuhara, H. Tsubouchi, F. Blasi, and P. M. Comoglio. 1992. 'Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor', *EMBO J*, 11: 4825-33.
- Naldini, L., E. Vigna, A. Bardelli, A. Follenzi, F. Galimi, and P. M. Comoglio. 1995. 'Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction', *J Biol Chem*, 270: 603-11.
- Naseem, S., T. Hussain, and S. Manzoor. 2018. 'Interleukin-6: A promising cytokine to support liver regeneration and adaptive immunity in liver pathologies', *Cytokine Growth Factor Rev*, 39: 36-45.
- Oda, M., H. Yokomori, and J. Y. Han. 2003. 'Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation', *Clin Hemorheol Microcirc*, 29: 167-82.
- Ornitz, D. M., and N. Itoh. 2015. 'The Fibroblast Growth Factor signaling pathway', *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 4: 215-66.
- Ostapowicz, G., R. J. Fontana, F. V. Schiodt, A. Larson, T. J. Davern, S. H. Han, T. M. McCashland, A. O. Shakil, J. E. Hay, L. Hynan, J. S. Crippin, A. T. Blei, G. Samuel, J. Reisch, W. M. Lee, and U. S. Acute Liver Failure Study Group. 2002. 'Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States', *Ann Intern Med*, 137: 947-54.
- Palmes, D., and H. U. Spiegel. 2004. 'Animal models of liver regeneration', *Biomaterials*, 25: 1601-11.

- Papastefanou, V. P., E. Bozas, M. G. Mykoniatis, A. Grypioti, S. Garyfallidis, C. S. Bartsocas, and P. Nicolopoulou-Stamati. 2007. 'VEGF isoforms and receptors expression throughout acute acetaminophen-induced liver injury and regeneration', *Arch Toxicol*, 81: 729-41.
- Park, B. K., J. W. Dear, and D. J. Antoine. 2015. 'Paracetamol (acetaminophen) poisoning', *BMJ Clin Evid*, 2015.
- Park, B. K., H. Laverty, A. Srivastava, D. J. Antoine, D. Naisbitt, and D. P. Williams. 2011. 'Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity', *Chem Biol Interact*, 192: 30-6.
- Paulos, C. M., C. Wrzesinski, A. Kaiser, C. S. Hinrichs, M. Chieppa, L. Cassard, D. C. Palmer, A. Boni, P. Muranski, Z. Yu, L. Gattinoni, P. A. Antony, S. A. Rosenberg, and N. P. Restifo. 2007. 'Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells via TLR4 signaling', *J Clin Invest*, 117: 2197-204.
- Poisson, J., S. Lemoine, C. Boulanger, F. Durand, R. Moreau, D. Valla, and P. E. Rautou. 2017. 'Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases', *J Hepatol*, 66: 212-27.
- Preziosi, M., H. Okabe, M. Poddar, S. Singh, and S. P. Monga. 2018. 'Endothelial Wnts regulate beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: A sequel to the Wnt-Wnt situation', *Hepatol Commun*, 2: 845-60.
- Rabbany, S. Y., and S. Rafii. 2018. 'Blood flow forces liver growth', *Nature*, 562: 42-43.
- Ray, S. D., V. R. Mumaw, R. R. Raje, and M. W. Fariss. 1996. 'Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment', *J Pharmacol Exp Ther*, 279: 1470-83.
- Rehermann, B., and M. Nascimbeni. 2005. 'Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection', *Nat Rev Immunol*, 5: 215-29.
- Rose-John, S. 2012. 'IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6', *Int J Biol Sci*, 8: 1237-47.
- Schulze-Osthoff, K., and H. Bantel. 2011. 'Necrosis versus apoptosis in acetaminophen-induced hepatotoxicity', *Hepatology*, 53: 1070.
- Schurich, A., M. Berg, D. Stabenow, J. Bottcher, M. Kern, H. J. Schild, C. Kurts, V. Schuette, S. Burgdorf, L. Diehl, A. Limmer, and P. A. Knolle. 2010. 'Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells', *J Immunol*, 184: 4107-14.
- Schurich, A., P. Khanna, A. R. Lopes, K. J. Han, D. Peppia, L. Micco, G. Nebbia, P. T. Kennedy, A. M. Geretti, G. Dusheiko, and M. K. Maini. 2011. 'Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-Prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection', *Hepatology*, 53: 1494-503.
- Semina, E., K. Rubina, V. Sysoeva, K. Rysenkova, P. Klimovich, O. Plekhanova, and V. Tkachuk. 2016. 'Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching', *Eur J Cell Biol*, 95: 295-310.
- Semina, E. V., K. A. Rubina, V. V. Stepanova, and V. A. Tkachuk. 2016. '[Participation of Urokinase Receptor and Its Endogenous Ligands in Brain Development and Formation of Cognitive Functions]', *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 102: 881-903.
- Shen, K., W. Chang, X. Gao, H. Wang, W. Niu, L. Song, and X. Qin. 2011. 'Depletion of activated hepatic stellate cell correlates with severe liver damage and abnormal liver regeneration in acetaminophen-induced liver injury', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 43: 307-15.
- Sinay Rabbany, Shahin Rafi. 'Blood flow forces liver growth'.
- Sokabe, T., K. Yamamoto, N. Ohura, H. Nakatsuka, K. Qin, S. Obi, A. Kamiya, and J. Ando. 2004. 'Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by



- fluid shear stress in human coronary artery endothelial cells', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H2027-34.
- Son, G., M. Kremer, and I. N. Hines. 2010. 'Contribution of gut bacteria to liver pathobiology', *Gastroenterol Res Pract*, 2010.
- Sorensen, K. K., J. Simon-Santamaria, R. S. McCuskey, and B. Smedsrod. 2015. 'Liver Sinusoidal Endothelial Cells', *Compr Physiol*, 5: 1751-74.
- Takeishi, T., K. Hirano, T. Kobayashi, G. Hasegawa, K. Hatakeyama, and M. Naito. 1999. 'The role of Kupffer cells in liver regeneration', *Arch Histol Cytol*, 62: 413-22.
- Tao, Y., M. Wang, E. Chen, and H. Tang. 2017. 'Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules', *Mediators Inflamm*, 2017: 4256352.
- Terpstra, V., E. S. van Amersfoort, A. G. van Velzen, J. Kuiper, and T. J. van Berkel. 2000. 'Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 1860-72.
- Thomson, A. W., and L. Lu. 1999. 'Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance?', *Immunol Today*, 20: 27-32.
- Tiberio, G. A., L. Tiberio, A. Benetti, E. Cervi, N. Montani, M. Dreano, G. Garotta, K. Cerea, N. Steimberg, G. Pandolfo, A. Ferrari-Bravo, G. Mazzoleni, S. M. Giulini, and L. Schiaffonati. 2008. 'IL-6 Promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy', *Cytokine*, 42: 372-8.
- Tu, T., S. R. Calabro, A. Lee, A. E. Maczurek, M. A. Budzinska, F. J. Warner, S. V. McLennan, and N. A. Shackel. 2015. 'Hepatocytes in liver injury: Victim, bystander, or accomplice in progressive fibrosis?', *J Gastroenterol Hepatol*, 30: 1696-704.
- Usatyuk, P. V., P. Fu, V. Mohan, Y. Epshtein, J. R. Jacobson, J. Gomez-Cambronero, K. K. Wary, V. Bindokas, S. M. Dudek, R. Salgia, J. G. Garcia, and V. Natarajan. 2014. 'Role of c-Met/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3k)/Akt signaling in hepatocyte growth factor (HGF)-mediated lamellipodia formation, reactive oxygen species (ROS) generation, and motility of lung endothelial cells', *J Biol Chem*, 289: 13476-91.
- Valizadeh, A., M. Majidinia, H. Samadi-Kafil, M. Yousefi, and B. Yousefi. 2019. 'The roles of signaling pathways in liver repair and regeneration', *J Cell Physiol*.
- Vaughn, B. P., S. C. Robson, and G. Burnstock. 2012. 'Pathological roles of purinergic signaling in the liver', *J Hepatol*, 57: 916-20.
- von Oppen, N., A. Schurich, S. Hegenbarth, D. Stabenow, R. Tolba, R. Weiskirchen, A. Geerts, W. Kolanus, P. Knolle, and L. Diehl. 2009. 'Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization', *Hepatology*, 49: 1664-72.
- Wake, K. 1971. "'Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A', *Am J Anat*, 132: 429-62.
- Wang, H., H. Luo, X. Wan, X. Fu, Q. Mao, X. Xiang, Y. Zhou, W. He, J. Zhang, Y. Guo, W. Tan, and G. Deng. 2020. 'TNF-alpha/IFN-gamma profile of HBV-specific CD4 T cells is associated with liver damage and viral clearance in chronic HBV infection', *J Hepatol*, 72: 45-56.
- Watanabe, K., S. Togo, T. Takahashi, R. Matsuyama, H. Yamamoto, T. Shimizu, H. Makino, K. Matsuo, D. Morioka, T. Kubota, Y. Nagashima, and H. Shimada. 2007. 'PAI-1 plays an important role in liver failure after excessive hepatectomy in the rat', *J Surg Res*, 143: 13-9.
- Wei, W., O. Dirsch, A. L. McLean, S. Zafarnia, M. Schwier, and U. Dahmen. 2015. 'Rodent models and imaging techniques to study liver regeneration', *Eur Surg Res*, 54: 97-113.
- Wohlleber, D., H. Kashkar, K. Gartner, M. K. Frings, M. Odenthal, S. Hegenbarth, C. Borner, B. Arnold, G. Hammerling, B. Nieswandt, N. van Rooijen, A. Limmer, K. Cederbrant, M. Heikenwalder, M. Pasparakis, U. Protzer, H. P. Dienes, C. Kurts, M. Kronke, and

- P. A. Knolle. 2012. 'TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation', *Cell Rep*, 2: 478-87.
- Wohlleber, D., and P. A. Knolle. 2016. 'The role of liver sinusoidal cells in local hepatic immune surveillance', *Clin Transl Immunology*, 5: e117.
- Wullaert, A., G. van Loo, K. Heyninck, and R. Beyaert. 2007. 'Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond', *Endocr Rev*, 28: 365-86.
- Wyllie, A. H., R. G. Morris, A. L. Smith, and D. Dunlop. 1984. 'Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis', *J Pathol*, 142: 67-77.
- Xu, C. S., Y. Jiang, L. X. Zhang, C. F. Chang, G. P. Wang, R. J. Shi, and Y. J. Yang. 2012. 'The role of Kupffer cells in rat liver regeneration revealed by cell-specific microarray analysis', *J Cell Biochem*, 113: 229-37.
- Yang, R., and T. I. Tonnesen. 2019. 'DAMPs and sterile inflammation in drug hepatotoxicity', *Hepatol Int*, 13: 42-50.
- Yoshida, O., L. Dou, S. Kimura, S. Yokota, K. Isse, S. C. Robson, D. A. Geller, and A. W. Thomson. 2015. 'CD39 deficiency in murine liver allografts promotes inflammatory injury and immune-mediated rejection', *Transpl Immunol*, 32: 76-83.
- Zeng, Z., B. G. Surewaard, C. H. Wong, J. A. Geoghegan, C. N. Jenne, and P. Kubes. 2016. 'CRIg Functions as a Macrophage Pattern Recognition Receptor to Directly Bind and Capture Blood-Borne Gram-Positive Bacteria', *Cell Host Microbe*, 20: 99-106.
- Zhang, D. W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B. J. Lu, S. C. Lin, M. Q. Dong, and J. Han. 2009. 'RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis', *Science*, 325: 332-6.
- Zhang, X. J., V. Olsavszky, Y. Yin, B. Wang, T. Engleitner, R. Ollinger, K. Schledzewski, P. S. Koch, R. Rad, R. M. Schmid, H. Friess, S. Goerdt, N. Huser, C. Geraud, G. von Figura, and D. Hartmann. 2020. 'Angiocrine Hepatocyte Growth Factor Signaling Controls Physiological Organ and Body Size and Dynamic Hepatocyte Proliferation to Prevent Liver Damage during Regeneration', *Am J Pathol*, 190: 358-71.

## 7. Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1: METABOLISMUS DER XENOBIOTIKA IN DER LEBER NACH PARK ET AL. 2010.</b> .....	9
<b>ABBILDUNG 2: ZEITLICHER ABLAUF DER LEBERREGENERATION NACH RMILAH ET AL. 2019 NACH EINER 70 % PH IN DER MAUS.</b> .....	16
<b>ABBILDUNG 3: DURCHLICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINER KONFLUENTEN LSEC ZELLKULTUR. DIE ZELLEN WURDEN MIT EINER ZELLDICHTE VON <math>8 \times 10^5</math> IN EINER 24-WELL-ZELLKULTUR PLATTE AUSPLATTIERT. NACH 4H WURDEN DANN NICHT-ADHÄRIERTE ZELLEN DURCH EINEN MEDIUMWECHSEL ENTFERNT. NACH EINER WEITEREN RUHEPERIODE VON 24 H HAT DIE LSEC-KULTUR IHR CHARAKTERISTISCHES „PFLASTERSTEIN“-AUSSEHEN ERREICHT.</b> .....	35
<b>ABBILDUNG 4: DURCHFLUSSZYTOTOMETRISCHE ANALYSE DER SCAVENGER FUNKTION VON LSECs. PRIMÄRE, IN VITRO KULTIVIERTE CD146+ LSEC WURDEN MIT 10 nM ATP INKUBIERT. (A) FLUORESCENZSIGNALE DER LSEC OHNE acLDL-AF488(5 µg/mL) ODER OVA-AF647(5 µg/mL), UNSTIMULIERTE, FÜR 10 MIN INKUBIERTE MIT acLDL-AF488 UND OVA-AF647 MARKIERTE LSEC. RECHTS BEFINDEN SICH LSEC, WELCHE VOR DER INKUBATION MIT acLDL UND OVA FÜR 24 STUNDEN MIT 10 nM ATP STIMULIERT WURDEN. (B) ANALYSE DER MFI DER LSEC-AKTIVIERUNG DURCH FÄRBUNG MIT ANTI CD106 eFLUOR450 UND REINHEITSANALYSE DURCH FÄRBUNG MIT ANTI CD146 PE. ERSTES PANEL (v.l.) OHNE acLDL-AF488 ODER OVA-AF647, MITTIG EINE UNSTIMULIERTE LSEC-KULTUR UND RECHTS NACH DER STIMULATION MIT 10 nM ATP FÜR 24 STUNDEN. (C) QUANTIFIZIERUNG DER acLDL-AF488 UND OVA-AF647 AUFNAHME, SOWIE DIE QUANTIFIZIERUNG DES AKTIVIERUNGSMARKERS CD106. EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON <math>\geq 3</math> IST GEZEIGT. DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS UNPAIRED T-TESTS ERMITTELT * P &lt; 0.05</b> .....	37

<b>ABBILDUNG 5: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER OBERFLÄCHENUKLEOSIDASEN CD39 SOWIE CD73 VON IN VITRO KULTIVierten CD146<sup>+</sup> LSECs UND CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs.</b> (A) DIE BEIDEN NUCLEOSIDASEN CD39 SOWIE CD73 AUF DER OBERFLÄCHE VON LSECs IM VERGLEICH ZU UNGEFÄRBTEN LSEC. (B) DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE ISOLierter CD11b <sup>+</sup> , CD11c <sup>+</sup> DCs AUF DIE OBERFLÄCHENMOLEKÜLE CD39 SOWIE CD73 IM DIREKTEN VERGLEICH ZWISCHEN UNGEFÄRBTEN UND GEFÄRBTEN PROBEN. (C) QUANTIFIZIERUNG DER MFI-WERTE AUF BASIS DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN MESSUNGEN (D) ELISA-BASIERTE QUANTIFIZIERUNG DER HGF-GESAMTPROTEINMENGE IM ÜBERSTAND EINER LSEC-KULTUR NACH EINER 24-STÜNDIGEN STIMULATION MIT ATP (10 nM), ADP (10 nM), AMP (10 nM) SOWIE ADENOSIN (10 nM), DIE DURCH DIE NUCLEOSIDASEN CD39 UND CD73 FREIGESETZT WERDEN. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON $\geq 3$ . DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS UNPAIRED T-TESTS ERMITTELT * P < 0.05 (C, D).....	39
<b>ABBILDUNG 6: LÖSLICHE REGENERATIONSMEDIATOREN WIE VEGF UND FGF-2 HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE PRODUKTION VON HGF DURCH LSEC.</b> ELISA-BASIERTER NACHWEIS VON HGF IM ZELLKULTURÜBERSTAND PRIMÄRER CD146 <sup>+</sup> LSEC-KULTUREN. (A) HGF-GESAMTPROTEINMENGEN IM ÜBERSTAND EINER LSEC-KULTUR NACH DER STIMULATION MIT VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN VEGF FÜR 24 STUNDEN. (B) DIE STIMULATION ERFOLGTE MIT VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN FGF FÜR 24 STUNDEN. DIE BALKENDIAGRAMME ZEIGEN DIE HGF-GESAMTPROTEINMENGE IM ÜBERSTAND DER LSEC-KULTUREN (A,B). DIE PUNKTDIAGRAMME (A,B) BILDEN DIE GRUNDLAGE FÜR EINE LINEARE REGRESSIONSANALYSE ZUR FESTSTELLUNG EINER DOSIS-KONZENTRATIONS-BEZIEHUNG ZWISCHEN DER STIMULATION MIT VEGF (A) BZW. FGF-2 (B) UND DER NACHWEISBARKEIT DER HGF-GESAMTPROTEINMENGE IM ÜBERSTAND DER LSEC-KULTUR. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON $\geq 3$ . DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS UNPAIRED T-TESTS DER REGRESSIONSGRADE ERMITTELT * P < 0.05.....	41
<b>ABBILDUNG 7: LÖSLICHE PROINFLAMMATORISCHE MEDIATOREN HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE PRODUKTION VON HGF DURCH LSEC.</b> ELISA-BASIERTER NACHWEIS VON HGF IM ZELLKULTURÜBERSTAND PRIMÄRER CD146 <sup>+</sup> LSEC-KULTUREN. DIE STIMULATION MIT IL1b (5 ng/ml), IFN $\gamma$ (5 ng/ml) BZW. TNF (5 ng/ml) ERFOLGTE FÜR 24 STUNDEN. ZU SEHEN IST DIE HGF-GESAMTPROTEINMENGE IM ÜBERSTAND DER LSEC-KULTUR. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON $\geq 3$ . DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS EINER EINSEITIGEN ANOVA-ANALYSE ERMITTELT * P < 0.05.....	42
<b>ABBILDUNG 8: EXOGENES LPS AKTIVIERT LSEC. SIGNALE, DIE ÜBER LIGANDEN DER TLR-3, -4 ODER -9-REZEPTOREN PROZESSIERT WERDEN, HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE PRODUKTION VON HGF DURCH LSEC-KULTUREN.</b> (A) DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER AKTIVIERUNG VON LSEC NACH 24-STÜNDIGER STIMULATION MIT 1 ng/ml LPS ZEIGT EINE ERHÖHUNG DES CD106-SIGNALS AUF DER LSEC-OBERFLÄCHE. DIE AUSWERTUNG DER MFI-DATEN WIRD DABEI ALS QUANTIFIZIERUNG DES AKTIVITÄTszUSTANDS DER LSEC INTERPRETIERT. (B) ELISA-BASIERTER NACHWEIS VON HGF IM ZELLKULTURÜBERSTAND PRIMÄRER CD146 <sup>+</sup> LSEC-KULTUREN. DIE STIMULATION DER UNTERSCHIEDLICHEN TLR-LIGANDEN POLY:IC (1 ng/ml), LPS (1 ng/ml) SOWIE CPG (1 ng/ml) ERFOLGTE ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 24 STUNDEN. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON $\geq 3$ . DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS UNPAIRED T-TESTS ERMITTELT * P < 0.05.....	44
<b>ABBILDUNG 9: STIMULATION MIT IL-6-TRANSSIGNALING FÜHRT ZU EINER ERHÖHTEN PRODUKTION VON HGF.</b> ELISA-BASIERTER NACHWEIS DER GESAMT-HGF-MENGE IM ÜBERSTAND EINER PRIMÄREN LSEC-ZELLKULTUR. DIE KULTUREN WURDEN MIT JEWEILS IL-6 (10 nM) ODER HYPER-IL-6 (10 nMol) FÜR 24 STUNDEN STIMULIERT. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON $\geq 3$ . DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS UNPAIRED T-TESTS ERMITTELT * P < 0.05.....	45
<b>ABBILDUNG 10: DIE ERHÖHUNG DER HGF-PRODUKTION DURCH LSECs BEI IL-6-TRANSSIGNALING REAGIERT DOSISABHÄNGIG.</b> ELISA-BASIERTER NACHWEIS DER GESAMT-HGF-MENGE IM ÜBERSTAND EINER PRIMÄREN LSEC-ZELLKULTUR. DIE KULTUREN WURDEN MIT DEN JEWEILS ANGEGEBENE MENGEN HYPER-IL-6 FÜR 24 STUNDEN STIMULIERT. DAS PUNKTDIAGRAMM BILDET DIE GRUNDLAGE FÜR EINE LINEARE REGRESSIONSANALYSE ZUR FESTSTELLUNG EINER DOSIS-KONZENTRATIONS-BEZIEHUNG ZWISCHEN DER STIMULATION MIT HYPER-IL-6 UND DER NACHWEISBARKEIT VON HGF IM ÜBERSTAND DER KULTUR. SIE ZEIGT EINE SIGNIFIKANTE VERÄNDERUNG DER GERADENSTEIGUNG MIT *P < 0.001. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON $\geq 3$ . DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS EINER EINSEITIGEN ANOVA-ANALYSE * P < 0.05 ERMITTELT.....	46
<b>ABBILDUNG 11: STIMULATION MIT HYPER-IL-6 FÜHRT ZUR PHOSPHORYLIERUNG DES STAT3-SIGNALWEGES.</b> DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE MURINER CD8 <sup>+</sup> T-ZELLEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER STIMULIERUNGSFÄHIGKEIT DES STAT3-SIGNALWEGES DURCH DIE GABE VON HYPER-IL-6. (A) UNGEFÄRBT E PROBE ZUR ETABLIERUNG DER FÄRBUNG. (B) UNSTIMULIERTE CD8 <sup>+</sup> T-ZELLEN ZEIGEN BEREITS EINE BEGRENZTE AKTIVIERUNG DES STAT3-SIGNALWEGES. (C) DIE STIMULATION MIT HYPER-	

IL-6 (10 nM) ERFOLGTE FÜR 1 STUNDE. (D) QUANTITATIVE ANALYSE DES MFI DURCH DIE PHOSPHORYLIERUNG VON STAT3. DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS EINSEITIGE ANOVA-TESTS ERMITTELT \* P < 0.05. ZUSÄTZLICH WURDE EINE LINEARE REGRESSIONSANALYSE DER DOSIS-KONZENTRATIONSBEZIEHUNG ZWISCHEN HYPER-IL-6 UND DER PHOSPHORYLIERUNG VON STAT3 DURCHGEFÜHRT UND IST GEMÄß EINER EINSEITIGEN ANOVA-ANALYSE \*P <0.005 SIGNIFIKANT.

- .....47
- ABBILDUNG 12: IL-6 TRANS-SIGNALING ERHÖHT DIE VERFÜGBARKEIT VON HGF-MRNA AUF TRANSKRIPTIONELLER EBENE.** (A, B, C) DIE ISOLATION DER HGF-MRNA ERFOLGTE AUS PRIMÄREN LSEC-ZELLKULTUREN. (A) WERTE DER X-FACHEN VERÄNDERUNG (FOLD-CHANGE) DER HGF-MRNA IM VERHÄLTNISS ZUR KONSTITUTIV EXPRIMIERTEN AKTIN-MRNA IN EINER UNSTIMULIERTEN LSEC-KULTUR IM RAHMEN EINER ZEITKINETISCHEN EXPRESSIONS-ANALYSE ÜBER EINEN 12-STÜNDIGEN ZEITRAUM. (B) FOLD-CHANGE DER HGF-MRNA IM VERHÄLTNISS ZUR KONSTITUTIV EXPRIMIERTEN AKTIN-MRNA IN EINER MIT TNF (10 nM) STIMULIERTEN LSEC-KULTUR ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 12 STUNDEN NACH DER ZUGABE VON TNF. (C) FOLD-CHANGE ZUNAHME DER HGF-MRNA NACH DER STIMULATION MIT HYPER-IL-6 (10nM) IM VERLAUF DER ERSTEN 12 STUNDEN NACH BEGINN DER STIMULATION. ....49
- ABBILDUNG 13: LSECs SIND DIE EINZIGE LEBERZELLPOPULATION, DIE KONSTITUTIV HGF PRODUZIERT.** ELISA-BASIERTE BESTIMMUNG DER HGF-GESAMTPROTEINMENGE IM ÜBERSTAND EINER UNSTIMULIERTEN, PRIMÄREN ZELLKULTUR AUS DER LEBER. NACH DER ISOLATION WURDEN DIE ZELLEN OHNE WEITERE STIMULATION FÜR 24 STUNDEN IN KULTURMEDIUM RUHEN GELASSEN. MED.-KONTR. IST DABEI DAS REINE ZELLKULTURMEDIUM. NACH DER RUHEPERIODE WURDE DIE HGF-GESAMTMENGE ERMITTELT. VON DEN VIER ANALYSIERTEN PRIMÄREN LEBERZELLPOPULATIONEN WIRD HGF AUSSCHLIEßLICH DURCH LSECs KONSTITUTIV AN DAS MEDIUM ABGEGEBEN. DIES GILT EBENFALLS FÜR DIE LX-2-ZELLINIE SOWIE T-ZELLEN. EINZIG PRIMÄRE LSECs PRODUZIERTEN SIGNIFIKANTE MENGEN HGF IM EXPERIMENTALZEITRAUM. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON ≥3. DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS UNPAIRED T-TESTS ERMITTELT \* P < 0.05. ....50
- ABBILDUNG 14: KONSTITUTIVE PRODUKTION VON HGF DURCH LSECs.** (A) ELISA-BASIERTE BESTIMMUNG DER HGF-GESAMTPROTEINMENGE IM ÜBERSTAND EINER UNSTIMULIERTEN LSEC-ZELLKULTUR. DIE LSECs WURDEN OHNE WEITERE STIMULATION ODER MEDIENAUSTAUSCH FÜR DEN EXPERIMENTALZEITRAUM RUHEN GELASSEN. DIE PROBENENTNAHME ERFOLGTE ZU DEN ANGEGEBENEN ZEITPUNKTEN UND ZEIGT EINE KLARE ERHÖHUNG DER HGF-MENGEN IM ÜBERSTAND INNERHALB DER ERSTEN 24 STUNDEN. DIE HGF-MENGE STEIGT BIS ZUM 72-STUNDEN-ZEITPUNKT STETIG AN. NACH DEM 72-STUNDEN-ZEITPUNKT VERRINGERT SICH DIE HGF-ZUNAHME DEUTLICH. (B) EINFACHE LINEARE REGRESSIONSANALYSE ZUR ÜBERPRÜFUNG DER SIGNIFIKANZ ZUR HGF-ZUNAHME. ....52
- ABBILDUNG 15: UROKINASE-AKTIVITÄT IM ÜBERSTAND DURCH FLUORESZENZMESSUNG.** (A) FLUORESZENZBASIERTE BESTIMMUNG DER UROKINASE-AKTIVITÄT DURCH DIE KATALYTISCHE SPALTUNG VON UROKINASE SUBSTRAT III (Z-GLY-GLY-ARG-AMC) UNTER ABSPALTUNG DES FLUOROMETRISCH NACHWEISBAREN AMC DURCH REKOMBINANTE UROKINASE (1 nM). (A) VERÄNDERUNG DER FLUORESZENZINTENSITÄT BEI KOMBINATION DES ZELLKULTURMEDIUMS UND UROKINASE-SUBSTRAT III (MEDIUM-KONTROLLE) ODER LSEC-KONDITIONIERTEM ÜBERSTAND MIT DEM SUBSTRAT ZEIGT EINEN ANSTIEG DES FLUORESZENZSIGNALS. (B, C) ZUGABE DES uPA-SPEZIFISCHEN INHIBITORS BC-11 VERMINDERT DIE UROKINASE-AKTIVITÄT SIGNIFIKANT. (D, E) ZUGABE VON HYPER-IL-6 (10 nM) ZU LSEC-KULTUREN ERHÖHT DIE UROKINASE-AKTIVITÄT ZUSÄTZLICH. (D) BERECHNUNG ZUR ZEITLICHEN VERÄNDERUNG DER FLUORESZENZWERTE UND UROKINASE-AKTIVITÄT UND ANSCHLIEßENDE QUANTIFIZIERUNG. ZUGABE VON BC-11 REDUZIERT DIE AKTIVITÄT SIGNIFIKANT. HYPER-IL-6-BEHANDELTE LSECs ZEIGEN EINEN NACHWEISBAREN ANSTIEG DER UROKINASE-AKTIVITÄT. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON ≥3. DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE IN (E) MITTELS UNPAIRED T-TESTS UND IN (F) MITTELS EINSEITIGER ANOVA-ANALYSE ERMITTELT \* P < 0.05. ....55
- ABBILDUNG 16: INHIBITION DER UPA-AKTIVITÄT DURCH BC-11 HAT EINEN SIGNIFIKANTEN EFFEKT AUF DIE MENGE NACHWEISBAREN HGFs IM ÜBERSTAND EINER LSEC-KULTUR.** ELISA-BASIERTER ASSAY ZUR BESTIMMUNG DER HGF-GESAMTPROTEINMENGE IM ÜBERSTAND EINER LSEC-ZELLKULTUR. (A) DIE UNBEHANDELTE KONTROLLE ZEIGT DIE KONSTITUTIVE EXPRESSION VON HGF. DIE SUPPLEMENTIERUNG EINER LSEC-KULTUR MIT REKOMBINANTER UPA ODER DEM UPA-INHIBITOR BC-11 FÜHRT ZU KEINER SIGNIFIKANTEN VERÄNDERUNG DER HGF-MENGEN IM ÜBERSTAND. (B) LSECs, DIE MIT HYPER-IL-6 SOWIE HYPER-IL-6 + UPA BEHANDELT WURDEN, ZEIGEN EINE SIGNIFIKANTE ERHÖHUNG DER HGF-GESAMTPROTEINMENGE IM ÜBERSTAND. LSEC-KULTUREN, DIE MIT HYPER-IL-6 SUPPLEMENTIERT UND ZUSÄTZLICH MIT BC-11 VERSETZT WURDEN, ZEIGEN JEDOCH KEINE ERHÖHUNG DER HGF-GESAMTMENGE. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON ≥3. DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS EINSEITIGER ANOVA-ANALYSE ERMITTELT \* P < 0.05. ....56
- ABBILDUNG 17: VERÄNDERUNG DER IMPEDANZ VON HEPATOZYTEN DURCH LSEC-ÜBERSTÄNDE IST KONZENTRATIONSABHÄNGIG VON IL-6-TRANSSIGNALING.** IMPEDANZBASIERTE MESSUNG EINER

HEPATOZYTEN-ZELLKULTUR MIT HILFE DER xCELLIGENCE ECHTZEIT-IMPEDANZMESSUNG. NICHT-KONFLUENTE HEPATOZYTEN WURDEN AUSGESÄT UND MIT 50  $\mu$ L LSEC-KONDITIONIERTEN ÜBERSTÄNDEN BEHANDELT. (A) DIE ZUNAHME DER IMPEDANZ KORRELIERT DABEI MIT DER HYPER-IL-6-KONZENTRATION DER LSEC-KULTUR. (B) QUANTIFIZIERUNG DES VERÄNDERTEN ZELLINDEXES DER HEPATOZYTEN-KULTUR 24 STUNDEN NACH DER ZUGABE DES LSEC-KONDITIONIERTEN ÜBERSTANDES. GEZEIGT IST EIN REPRÄSENTATIVES EXPERIMENT (TRIPLIKATE) VON  $\geq 3$ . DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MITTELS EINSEITIGER ANOVA-ANALYSE ERMITTELT \*  $P < 0.05$ ..... 58

**ABBILDUNG 18: VERÄNDERUNG DES IMPEDANZVERHALTENS VON HEPATOZYTEN DURCH LSEC-ÜBERSTAND IN ABHÄNGIGKEIT VON IL-6-TRANSSIGNALING UND INHIBITION DER UROKINASE-AKTIVITÄT.**

IMPEDANZBASIERTE MESSUNG EINER HEPATOZYTEN-ZELLKULTUR MIT HILFE DER xCELLIGENCE ECHTZEIT-IMPEDANZMESSUNG. NICHT-KONFLUENTE HEPATOZYTEN WURDEN AUSGESÄT UND MIT 50  $\mu$ L LSEC-KONDITIONIERTEN ÜBERSTÄNDEN (LSEC) BEHANDELT. (A) LSEC-KONDITIONIERTER ÜBERSTAND WURDE NACH 24 STUNDEN AUF DIE HEPATOZYTEN ÜBERTRAGEN UND FÜHRTE ZU EINER ZUNAHME DER IMPEDANZ. (B) ZUGABE VON BC-11 ZUR LSEC-KULTUR WÄHREND DER KONDITIONIERUNGSPHASE REDUZIERTE DIE ZUNAHME DER IMPEDANZ DER HEPATOZYTEN-KULTUR. (C) QUANTIFIZIERUNG DES NORMALISIERTEN ZELLINDEX ZUM ENDZEITPUNKT 24 STUNDEN. SUPPLEMENTIERUNG DER HEPATOZYTEN-KULTUR MIT LSEC-ÜBERSTAND FÜHRT ZU EINER SIGNIFIKANTEN STEIGERUNG DES ZELLINDEX. (D) LSEC-ÜBERSTAND NACH DER BEHANDLUNG MIT HYPER-IL-6 (10 nM) ZEIGT EINE ZUSÄTZLICH VERSTÄRKTE IMPEDANZERHÖHUNG DER HEPATOZYTEN-KULTUR. (E) ZUGABE VON BC-11 WÄHREND DER KONDITIONIERUNGSPHASE NEGIERT DIE HYPER-IL-6-INDUZIERTE ZUNAHME DES ZELLINDEXES DER HEPATOZYTEN-KULTUR UND SENKT SIE AUF DAS NIVEAU VON NICHT-HYPER-IL-6-SUPPLEMENTIERTEN LSEC-ÜBERSTÄNDEN. (F) QUANTIFIZIERUNG DES NORMALISIERTEN ZELLINDEX ZUM ENDZEITPUNKT 24 STUNDEN ZEIGT SOWOHL DEN EINFLUSS DER IL-6-TRANSSIGNALING-STIMULATION ALS AUCH DIE INHIBITION DURCH BC-11. STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE DURCH EINE EINSEITIGE ANOVA-ANALYSE MIT \* $P < 0.05$  FESTGESTELLT. .... 59

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Percy A. Knolle der mir die Anfertigung der Arbeit ermöglicht hat und dessen fortlaufende Hilfe eine enorme Hilfe war.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Sainitin Donakonda, Dr. Dirk Wohlleber sowie Dr. Bastian Höchst bedanken, deren umfangreiche Erfahrung wichtige Hilfestellungen während der Anfertigung der Arbeit waren.

Zudem möchte ich mich bei Silke Hegenbarth, Savvoula Michailidou und all meinen Kollegen bedanken, die mir während der Forschungsarbeit mit Rat und Tat beiseite standen.

Abschließend möchte ich meinen Dank an meine Familie und Freunde richten deren Unterstützung, Geduld und Ermutigungen wichtige Stützen in dieser Zeit waren.

## 9. Appendix

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
acLDL	acetylated low density lipoprotein
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosin-monophosphat
APAP	Acetaminophen
APC	antigen-presenting cells
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of differentiation
CD146	melanoma cell adhesion molecule
cDNA	complementary DNA
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAMP	damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DC	dendritic cell
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECM	Extracellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzym-linked immunoabsorbant Assay
ENTPD-1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fas	Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 6
FasL	Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 6
FCS	Fetal calf serum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GBSS	Gey's balanced salt solution
GFP	Green fluorescent protein
GzmB	Granzyme B
HBSS	Hank's balanced salt solution
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus

<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecule 1
<b>ICAM</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IgA</b>	Immunglobulin A
<b>JNK</b>	Janus-Kinase
<b>KC</b>	Kupffer cell
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LSEC</b>	Liver sinusoidal endothelial cell
<b>MACS</b>	Magnetic activating cell sorting
<b>MHC I</b>	Major histocompatibility class I
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>mTOR</b>	mammalian target of TOR complex
<b>NK</b>	Natural killer
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>PAI-1</b>	Plasminogen activator inhibitor-1
<b>PAI-2</b>	Plasminogen activator inhibitor-1
<b>PAMP</b>	Pathogen associated molecular pattern
<b>PBS</b>	Phosphat buffered saline
<b>PCD</b>	Programmed cell death
<b>PD-1</b>	Prorammed death protein 1
<b>PECAM</b>	Platelet endothelial cell adhesion molecule
<b>PH</b>	partial hepatectomy
<b>PRR</b>	Pattern-Recognition Receptor
<b>RCD</b>	Regulated cell death
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>STAT3</b>	Signal transducer and activator of transcription 3
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxyethyl)phosphin -hydrochlorid
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>TLR3</b>	Toll-like receptor 3
<b>TLR4</b>	Toll-like receptor 4
<b>TLR9</b>	Toll-like receptor 9
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>TNFR</b>	Tumor necrosis factor receptor
<b>uPA</b>	urokinase type plasminogen activator
<b>uPAR</b>	urokinase type plasminogen activator receptor
<b>VCAM</b>	Vascular cell adhesion protein 1
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor